

CytoSelect™ 24-well Cell Haptotaxis Assay (8 μ m, Collagen Coated, Fluorometric)

Cat. No. CBA-101-COL

研究目的のみのご使用になります
(診断目的にはご使用いただけません)

はじめに

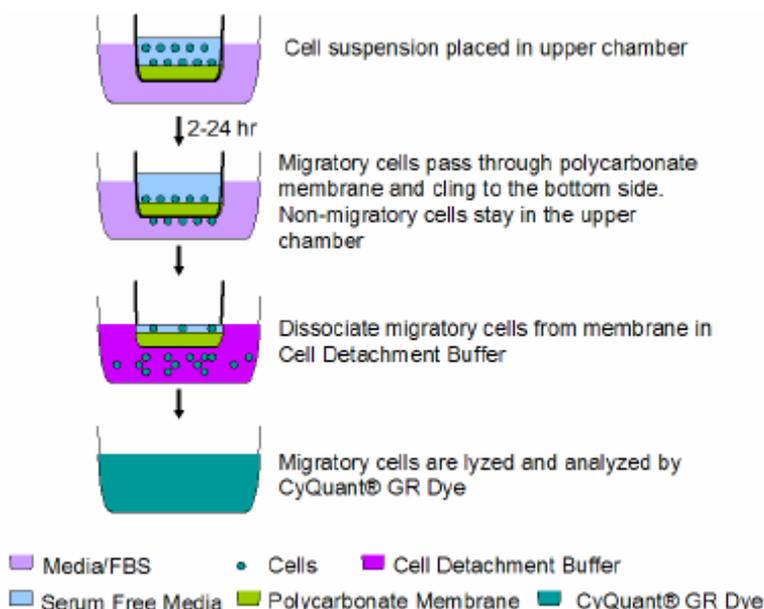
細胞遊走は免疫応答や受精後の胚形態形成、組織修復および再生などの様々な段階に関与しています。また、癌や精神遅滞、アテローム動脈硬化症、関節炎などの疾患の進行においても極めて重要な役割を果たしています。遊走促進物質への細胞の初期応答には、誘因物質へ極性を持つこと、また突出することが挙げられます。これらの突出は広大な葉状仮足あるいはスパイク状の糸状仮足からなります。いずれの場合でも、これらの突出はアクチン重合によって促進され、細胞外基質 (ECM) 接着もしくは細胞-細胞間の相互作用によって安定化されます。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Haptotaxis Assay Kit では細胞の遊走特性をアッセイするためにポリカーボネート膜プレート (8 μ m ポアサイズ)、インサートの底面にはコラーゲン I をコートしたものを利用しています。本キットは 12 サンプル分に十分な量の試薬が含まれています。本キットでは Calcein AM による細胞標識作業は必要ありません。遊走細胞を溶解後 CyQuant®GR Dye で検出します。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Haptotaxis Assay Kit は研究使用のみを対象としており、診断や治療の目的には使用できません。

アッセイ原理

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Haptotaxis Assay Kit は 24-well プレートにポリカーボネート膜インサート (8 μ m ポアサイズ) が付属しています。その膜は遊走細胞と非遊走細胞を分け隔てる役割をします。遊走細胞は細胞外マトリックス濃度勾配の方へ突出し(アクチン細胞骨格再構成を経て)、最終的にはポリカーボネート膜の穴を通り抜けます。それから遊走細胞を膜から分離し、続いて CyQuant®GR Dye で検出します。



キットの構成内容

1. 24-well Cell Migration Plate (Part No.10001-COL): 12 細胞培養用インサート (3 μ m ポアサイズ) が付属した 24-well プレートが 1 枚
2. 4X Lysis Buffer (Part No. 10102): ボトル 1 本 - 5.0mL
3. CyQuant[®]GR Dye (Part No. 10103): チューブ 1 本 - 25 μ L
4. 綿棒 (Part No. 11004): 40 本
5. はさみ (Part No. 11005): 1 本

キットには含まれていない他に必要な試薬・機器

1. 遊走細胞株
2. 細胞培養培地
3. 無血清培地 (例えば、0.5% BSA・2mM CaCl₂・2mM MgCl₂ を含む DMEM)
4. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO₂)
5. 光学顕微鏡
6. 蛍光プレートリーダーに適した 96-well プレート
7. 蛍光プレートリーダー

保存

全構成品は使用期限まで 4°C で保存してください

アッセイ プロトコール

1. 24-well Migration Plate を 10 分間室温においておく。
2. 無血清培地に 0.5~1.0 x 10⁶ cells/ml を含む細胞懸濁液を準備する細胞遊走を阻害もしくは刺激する薬剤を細胞懸濁液に直接加える。
3. migration plate の lower well に希望の化学誘因物質もしくは 10% FBS を含む培地を 500ul 加える。
4. インサートに細胞懸濁液を 300 μ l を加える。
5. プレートをカバーし、2~24 時間インキュベーションする。
6. 注意してインサートから培地を吸引除去する。綿棒を使ってインサートの内側から非遊走細胞をやさしく除去する。ポリカーボネート膜に穴をあけないように注意する。内側周辺の細胞を除去すること。
7. CyQuant[®]GR を 1X Lysis Buffer で 1:300 に希釈し (例えば 300 μ l の 4X Lysis Buffer に 900 μ L の水を加え、それから 4 μ L の CyQuant[®]GR dye を加える)、十分量の 1X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution を準備する。
8. 300 μ L の 1X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution が入った well にインサートを移して、10 分間、室温においておく。

9. 蛍光測定に適した 96-well プレートに 200 μ l の混合液を移す。蛍光プレートリーダー (480nm/520nm) で蛍光を読む。

実験結果

下記の図は CytoSelect™ Cell Haptotaxis Assay Kit を使用した典型的な結果です。蛍光測定に 485/520nm フィルターをセットした 530nm カットオフの SpectraMax Gemini XS Fluorometer (Molecular Device 社) を使用しました。参照程度に下記データをご使用下さい。このデータを実際の結果として説明することはおやめ下さい。

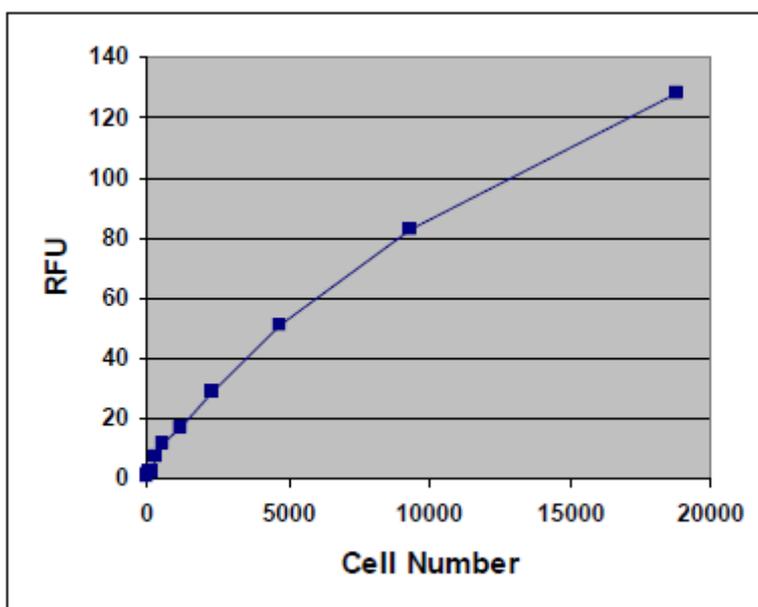


図 1: 乳ガン MDA-231 細胞の定量

MDA-231 細胞を培養後溶解し、1X Lysis Buffer / CyQuant®GR Dye で検出した。

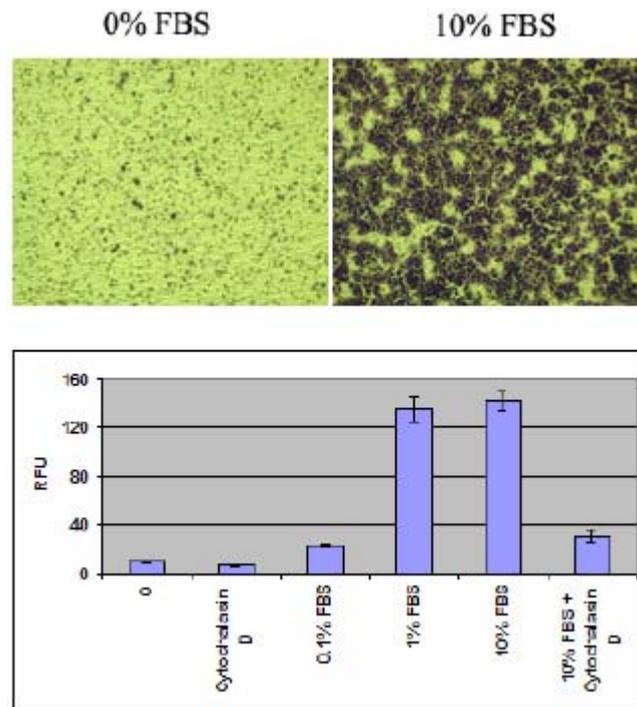


図 2: 乳ガン MDA-231 細胞の走触性と走化性

MDA-231 細胞を 150,000cells/well で播き、4 時間培養して FBS に対する遊走性をテストした。ポリカーボネート膜の底面の遊走細胞を染色し (上図)、プロトコールに従い CyQuant®GR Dye で定量した (下図)。

参考文献:

1. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003) Science 302, 1704-9.
2. Horwitz R, Webb D. (2003) Curr Biol. 13, R756-9.
3. Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1996) Cell 84, 359-369.
4. CyQuant GR Dye is licensed from Molecular Probes, Inc., and is used in cell migration and invasion kits only.