

CytoSelect™ 24-well Cell Migration Assay

(3 μ m, Fluorometric Format)

Cat. No. CBA-103

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もちます。遊走促進物質への細胞の初期応答は誘因物質へ極性をもち、突出することです。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。

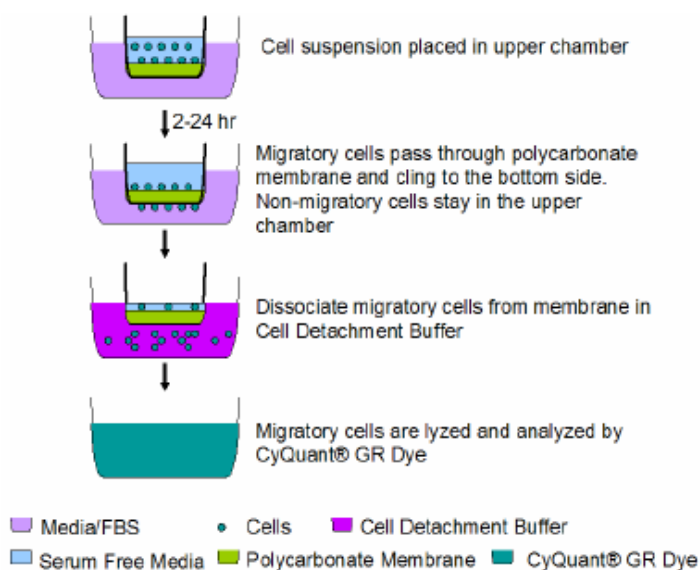
Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit では細胞の遊走特性をアッセイするためにポリカーボネート膜プレート (3 μm ポアサイズ) を利用しています。本キットでは Calcein AM で細胞を前標識したり非遊走細胞を取り除いたり(コットンでの拭き取り)する必要はありません。すべての遊走細胞を膜から剥離、溶解し、CyQuant®GR Dye で検出します。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit は細胞遊走の定量に適したシステムです。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。3 μm ポアサイズは白血球細胞の遊走に適しています。上皮や線維芽細胞の走化性の場合は大きいポアサイズ (8 μm) をお勧めします。

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

アッセイ原理

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell Migration Assay Kit は 24-well プレートにポリカーボネート膜インサート(3 μm ポアサイズ)が付属しています。こ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。遊走細胞は化学遊走物質の方へ突出し(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ポアを通り抜けます。その後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. 10301): 細胞培養用インサート (3 μ m ポアサイズ) が 12 個付属した 24-well プレートが 1 枚
2. Cell Detachment Solution (Part No. 10101): ボトル 1 本 - 5.0mL
3. 4X Lysis Buffer (Part No. 10102): ボトル 1 本 - 5.0mL
4. CyQuant[®] GR Dye (Part No. 10103): チューブ 1 本 - 25 μ L
5. Forceps (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 0.5~5.0 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 に評価する化学誘因物質もしくは 10% FBS を含む培地を 500 μ l 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、1~24 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。そしてそれを事前に用意した 200 μ l の Cell Detachment Solution が入った well に移す。
7. (注意: 化学誘因物質や膜を通過して遊走した細胞や培地中の細胞が入った 24-well Migration Plate 中の培地はとっておく)。
8. インサートを何回か優しく傾け、膜の底面から細胞を完全に剥離させる。
9. 同じアッセイサンプル (Step7) 用の Cell Detachment Solution 200 μ L が入った well に遊走細胞を含んだ 500 μ L の培地溶液 (Step5) のうち 400 μ L を移す。よく混ぜ、96-well プレート

にその混合液 180 μ L を移す。

10. CyQuant[®]GR を 4X Lysis Buffer で 1:75 に希釈し (例えば 5 μ l の CyQuant[®]GR dye に 370 μ l の 4X Lysis Buffer を加える)、十分量の 4X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution を準備する。
11. 遊走細胞が入っている 96-well プレートの各 well に 60 μ L の 4X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution を加える。20 分間、室温においておく。
12. 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 Migration 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。

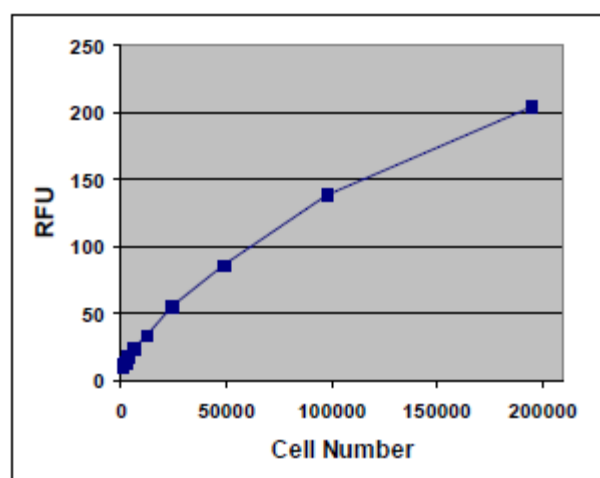


図 1: ヒト骨髓球細胞 HL-60 の定量

HL-60 細胞を Cell Detachment Buffer で処理後溶解し、4X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR Dye (150 μ L の細胞懸濁液を 50 μ l の 4X Lysis Buffer/dye で混合) で検出した。

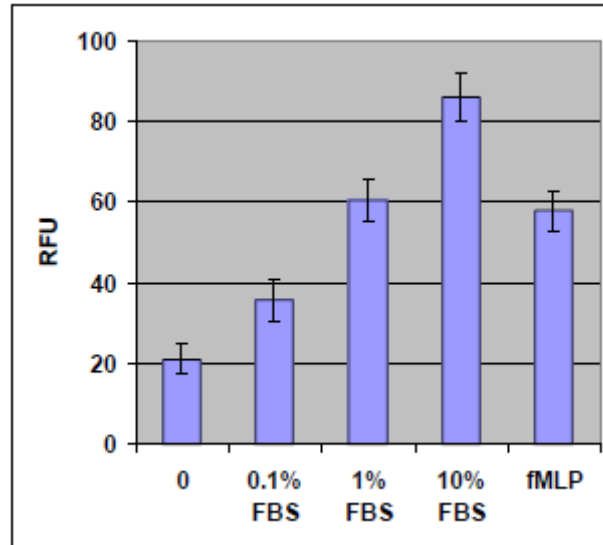


図 2: HL-60 走化性

HL-60 細胞を 250,000cells/well で播き、1 時間培養して FBS あるいは fMLP (100 μ M) に対する走化性をテストした。遊走細胞はアッセイプロトコールに従い CyQuant[®] GR Dye で定量した。

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.