

# **CytoSelect™ 24-well Laminin Cell Invasion Assay (Fluorometric Format)**

**Cat. No. CBA-111-LN**

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

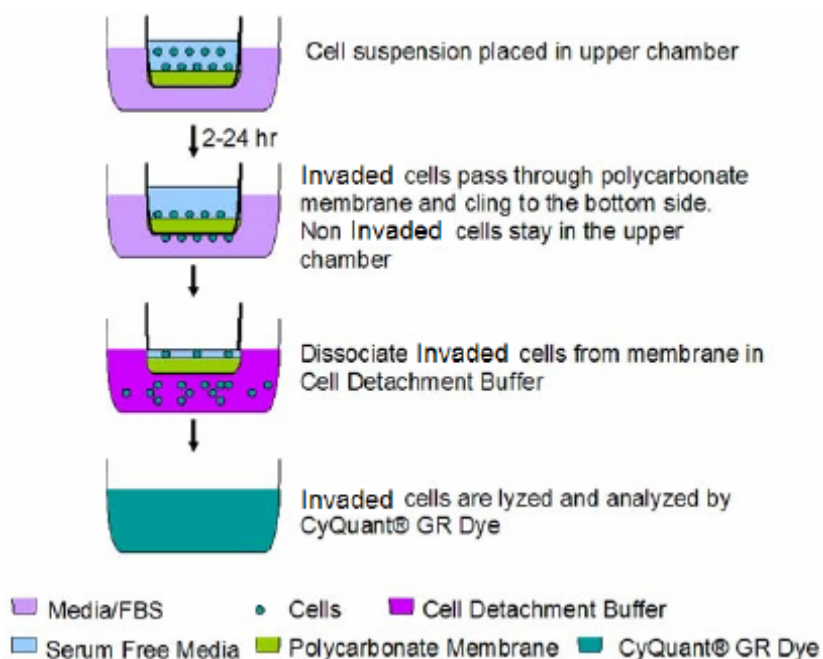
正常な周辺組織に浸潤する悪性腫瘍細胞の浸潤能は深刻な病的状態や癌による死亡の原因となります。浸潤には接着、基底膜・細胞外マトリックスのタンパク質加水分解、細胞移動などのいくつか異なる機能が必要です。転移細胞はある細胞表面のプロテアーゼ受容体の発現が増大する間に多くのタンパク質分解酵素（例えば、リソソーム加水分解物、コラゲナーゼ、プラスミノゲン活性化因子）を産生します。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Laminin Cell Invasion Assay Kit では腫瘍細胞の浸潤性をアッセイするための齧歯類の Laminin I をコートしたインサートを利用しています。本キットには 12 サンプル分に十分な量の試薬が含まれています。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Laminin Cell Invasion 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™ Laminin Cell Invasion Assay Kit は 24-well プレートにポリカーボネート膜インサート (8um ポアサイズ) が付属しています。インサート膜の上層には乾燥した齧歯類 Laminin I マトリックスが均一にコートされています。この Laminin マトリックス層は非浸潤細胞から浸潤細胞を分け隔てる役割をします。浸潤細胞は Laminin マトリックス層を分解でき、最終的にはポリカーボネート膜のポアを通過します。その後浸潤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. Collagen Invasion Chamber Plate (Part No. 111001-COL): コラーゲンコート済み細胞培養インサート 12 個が付属した 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<sup>®</sup> GR Dye (Part No. 10103): チューブ 1 本 - 25  $\mu$  L
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. 浸潤細胞株
2. 細胞培養培地
3. 無血清培地 (例えば、0.5% BSA・2mM CaCl<sub>2</sub>・2mM MgCl<sub>2</sub> を含む DMEM)
4. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO<sub>2</sub>)
5. 光学顕微鏡
6. 96-well マイクロタイタープレート
7. マイクロタイタープレートリーダー

### 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. 滅菌下で Laminin Invasion chamber Plate を 10 分間室温においておく。
2. 温めた無血清培地 300  $\mu$  L を内部のコンパートメントに加え、細胞培地の Laminin 層を再水和させる。
3. 無血清培地に 0.5~1.0 x 10<sup>6</sup> cells/ml を含んだ細胞懸濁液を準備する。細胞浸潤を阻害もしくは刺激する薬剤を細胞懸濁液に直接加えておく。

(注意: アッセイを行う前 24 時間飢餓状態にしておいた方がよい)

4. Laminin 層を乱さないように注意しながらインサートから再水和培地 (Step2) 250  $\mu$  L を除去する (50  $\mu$  L はそのまま残る)。
5. インサートに細胞懸濁液を 250  $\mu$  l を加える。
6. Invasion 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  $\mu$  l 加える。
7. 12~24 時間インキュベーションする。
8. 注意してインサートから培地を吸引除去する。225  $\mu$  l の Cell Detachment Solution が入った未使用の well にインサートを移し、37°C 10 分間インキュベーションする。
9. 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。

10. CyQuant<sup>®</sup>GR を 4X Lysis Buffer で 1:75 に希釈し (例えば 5  $\mu$ l の CyQuant<sup>®</sup>GR dye に 370  $\mu$ l の 4X Lysis Buffer を加える)、十分量の 4X Lysis Buffer / CyQuant<sup>®</sup>GR dye solution を準備する。
11. 各 well (予め 225  $\mu$ l の Cell Detachment Solution と細胞が含まれている) に 75  $\mu$ l の 4X Lysis Buffer / CyQuant<sup>®</sup>GR dye solution を加える。20 分間、室温においておく。  
蛍光測定に適した 96-well プレートに 200  $\mu$ 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。

### 参考実験結果

下記の図は CytoSelect<sup>™</sup> Laminin Cell Invasion 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。

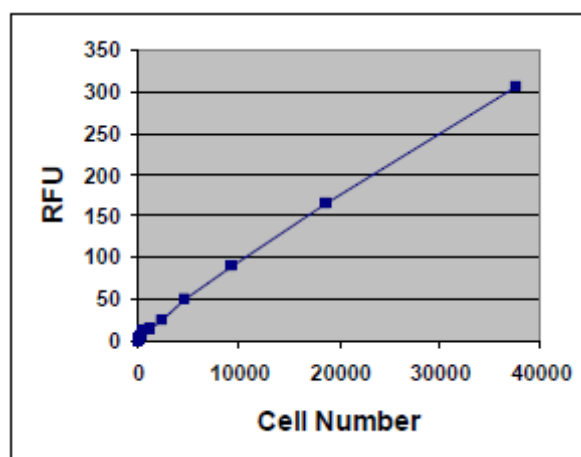


図 1: ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞の定量

HT-1080 細胞懸濁液を Cell Detachment Buffer で 1:2 の割合に希釈した。蛍光プレートの 96well に 150  $\mu$ l ずつ希釈細胞懸濁液を加え、50  $\mu$ l の 4X Lysis Buffer / CyQuant<sup>®</sup>GR dye solution (1:75) を加えた。

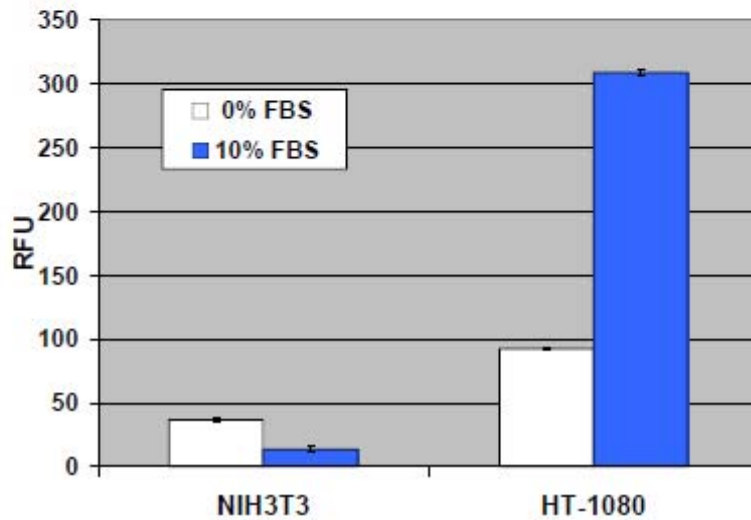
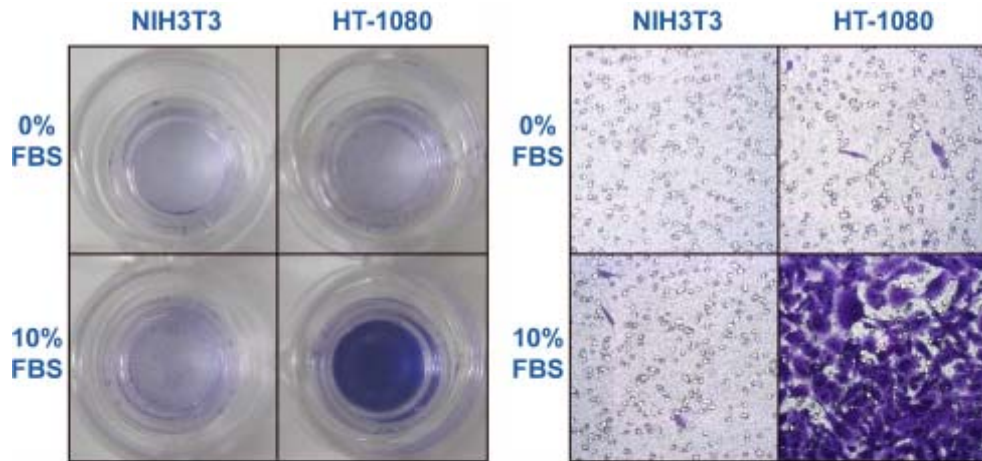


図 2: ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞のラミニン浸潤能

HT-1080 細胞と NIH3T3 (ネガティブコントロール) を 200,000cells/well で播き、24 時間培養して FBS に対する浸潤能をテストした。浸潤膜の底面の浸潤細胞を染色し (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. Erkel. L. J., Schirmacher, V. (1988) Cancer Res 48, 6933-6937.
2. Montgomery, A. M. P., De Clerck, Y. A., Langley, K. E., Reisfeld, R. A., Mueller, B. M. (1993) Cancer Res 53, 693-700.
3. Monsky, W. L., Lin, C. Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S. K., Muller, S. C., Chen, W. T. (1994) Cancer Res 54, 5702-5712.