

CytoSelect™ 48-well Cell Adhesion Assay
Fibrinogen Coated
(Fluorometric Format)

Cat. No. CBA-059

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

細胞接着は胚形成、遊走/浸潤、組織修復および創傷治癒に関連した複雑な過程です。これらの過程を実行するために、細胞は細胞外マトリックス成分に結合し(接着レセプターを介して)、最終的に細胞の運動性、分化、増殖や生存に影響を与える細胞骨格成分と複合体を形成します。Cell Biolab 社の CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit は細胞接着を評価するための迅速で定量的な方法をご提供します。このキットには 48 サンプル(フィブリノーゲン コート済みウェルが 40 個と BSA コート済みウェルが 8 個)の評価に十分な試薬を含んでいます。

Cell Biolab 社の CytoSelect™ Cell Adhesion 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

CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit はフィブリノーゲンコート済み 48-well プレート(Adhesion Plate Layout 参照)を利用しています。まず細胞をコートした基質の上に播き、接着細胞を接着させます。次に、非接着性細胞を洗浄除去し、接着細胞を溶解して CyQuant® GR Dye で検出します。

キットの構成内容

1. Fibrinogen Adhesion Plate (Part No. 105801): フィブリノーゲン コート済み well 40 個と BSA コート済み well 8 個の 48-well プレートが 1 枚
2. 4X Lysis Buffer (Part No. 10404): ー10.0mL が 1 本
3. CyQuant® GR Dye (Part No. 105101): ー50 μ L が 1 本

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
B	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
C	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
D	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
E	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
F	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA

キットには含まれていないが必要な試薬・機器

1. 細胞培養培地
2. 無血清培地 (例えば、0.5% BSA・2mM CaCl_2 ・2mM MgCl_2 を含む DMEM)
3. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO_2)
4. 2mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 を含む 1x PBS

5. 光学顕微鏡
6. 蛍光プレートリーダー用 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. 滅菌条件下で Fibrinogen Adhesion Plate を 10 分間室温に置いておく。
2. 無血清培地に $0.1 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/ml を含む細胞懸濁液を準備する。細胞接着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. $150 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を well に加える (BSA コートの well はネガティブコントロールです)。
4. インキュベーター内で 30~90 分間インキュベーションする。
5. 注意しながらそれぞれの well から培地を吸引除去あるいは排泄する (注意: well を乾燥させないこと)。各 well を $250 \mu\text{L}$ の PBS で 4-5 回穏やかに洗浄する。
6. 十分量の 1X Lysis Buffer/CyQuant® GR Dye (300:1) を調製する (例えば、 $5 \mu\text{L}$ の dye を $1495 \mu\text{L}$ の 1X Lysis Buffer と混合)。
7. $200 \mu\text{L}$ の 1X Lysis Buffer/CyQuant® GR Dye 溶液を細胞を含むそれぞれの well に加える。室温で 20 分間振盪させながらインキュベーションする。
8. 蛍光測定用の 96-well プレートに各サンプル $150 \mu\text{L}$ を移す。480nm/520nm における蛍光を蛍光プレートリーダーで測定する。

参考実験結果

下記の図は CytoSelect™ Cell Adhesion Assay Kit を使用した一例です。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。

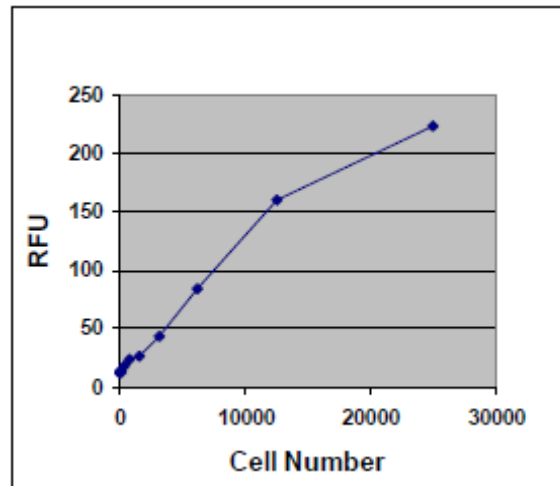


図 1: ヒト HT-1080 の定量

HT-1080 細胞を 1X PBS で処理後溶解し、2X Lysis Buffer/CyQuant® Dye (75 μ L の細胞懸濁液を 75 μ L の 2X Lysis Buffer/dye と混合) で検出した。

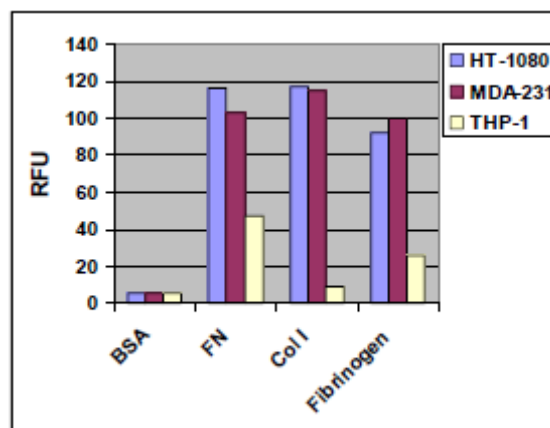


図 2: ECM 介在性細胞接着

血清飢餓細胞を 75,000cells/well 使用し、1 時間 ECM コート済 48-well プレートに接着させた。プロトコルに従い接着細胞を溶解し、CyQuant® GR Dye で定量した。

参考文献:

1. Hynes, R.O. (1992) Cell 69, 11-25.
2. Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H. (1995) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 549-599.

CyQuant® GR Dye については Molecular Probes 社からライセンスを受けています。