

CytoSelect™ 24-well Cell Migration Assay
(8 μ m, Colorimetric Format)

Cat. No. CBA-100

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

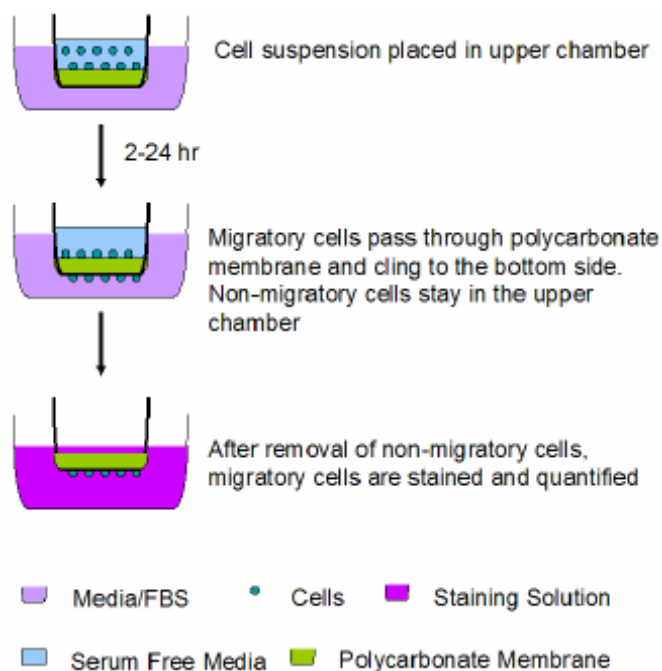
細胞遊走は免疫応答や受精後の胚形態形成、組織修復および再生などの様々な段階に関与しています。また、癌や精神遅滞、アテローム動脈硬化症、関節炎などの疾患の進行においても極めて重要な役割を果たしています。遊走促進物質への細胞の初期応答には、誘因物質へ極性を持つこと、また突出することが挙げられます。これらの突出は広大な葉状仮足あるいはスパイク状の糸状仮足からなります。いずれの場合でも、これらの突出はアクチン重合によって促進され、細胞外基質 (ECM) 接着もしくは細胞-細胞間の相互作用によって安定化されます。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Cell 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 (8 μ m ポアサイズ) を利用しています。本キットには 12 サンプルのアッセイに十分な量の試薬が含まれています。8 μ m のポアサイズは上皮、線維芽細胞の遊走に適しています。白血球の走化性の場合は小さいポアサイズ (3 μ m) 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過します。その後細胞を膜の上層から剥離し、遊走細胞を染色、定量します。



キットの構成内容

1. 24-well Cell Migration Plate (Part No. 10301): 12 細胞培養用インサート (8 μ m ポアサイズ) が付属した 24-well プレートが 1 枚
2. Cell Stain Solution (Part No. 10101): ボトル 1 本 – 10.0mL
3. Extraction Solution (Part No. 11003): ボトル 1 本 – 10.0mL
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が必要な試薬・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 CaCl_2 ・2mM MgCl_2 を含む DMEM)
4. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO_2)
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. 24-well Migration Plate を 10 分間室温に置いておく。
2. 無血清培地に $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 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 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、2~24 時間インキュベーションする。
6. 注意しながら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. あらかじめ用意しておいた 400 μ l の Cell Stain Solution が入った well にインサートを移し、室温に 10 分間おいておく。
8. ビーカーにはった水で染色されたインサート丁寧何回か洗浄する。インサートを空気乾燥させる。
9. (オプション) 高倍率にした光学顕微鏡で少なくとも任意 3 箇所のフィールドについて遊走細胞

数を数える。

10. 空の well に各インサートを移し、1-well あたり 200 μ L の Extraction Solution を加える。それからオービタルシェーカーで 10 分間インキュベーションする。
11. 96-well マイクロタイタープレートに各サンプル 100 μ L を移し、プレートリーダーで OD560nm を測定する。

参考実験結果

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

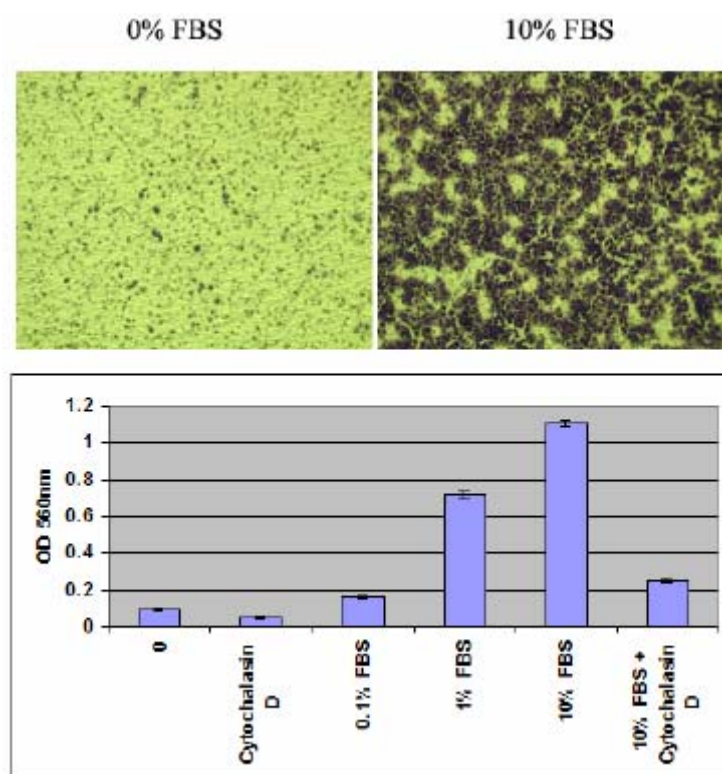


図 1: ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞の走化性

HT-1080 細胞と NIH3T (ネガティブコントロール)を 150,000cells/well で播き、2 μ M Cytochalasin D 存在下もしくは非存在下で 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)、抽出後 OD560nm で定量 (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.