

CytoSelect™ 96-well Cell Migration Assay

(3 μ m, Fluorometric Format)

Cat. No. CBA-104

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

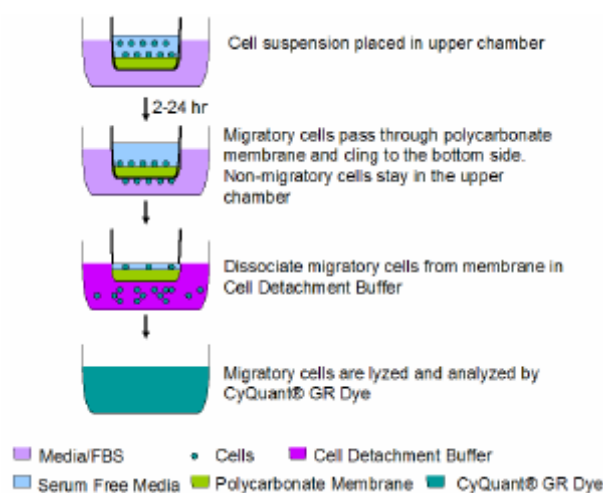
細胞遊走は免疫応答や受精後の胚形態形成、組織修復および再生などの様々な段階に関与しています。また、癌や精神遅滞、アテローム動脈硬化症、関節炎などの疾患の進行においても極めて重要な役割をもちます。遊走促進物質への細胞の初期応答は誘因物質へ極性をもち、突出することです。これらの突出は広大な葉状仮足あるいはスパイク状の糸状仮足からなります。いずれの場合でも、これらの突出はアクチン重合によって促進され、細胞外基質 (ECM) 接着もしくは細胞-細胞間の相互作用によって安定化されます。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well 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96サンプル分に十分な量の試薬が含まれています。3 μ m 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 μ m) をお勧めします。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well 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

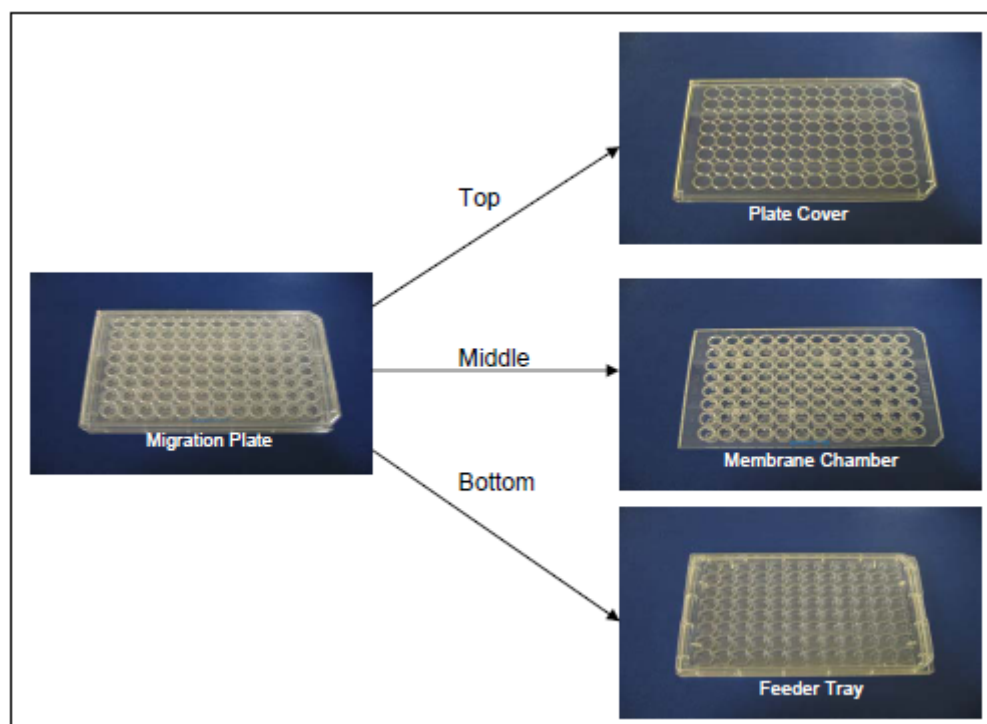
Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well Cell Migration Assay Kit は96-well プレートにポリカーボネート膜チャンバー (3 μ m ポアサイズ) が付属しています。その膜は遊走細胞と非遊走細胞を分け隔てる役割をします。遊走細胞は化学遊走物質の方へ突出し(アクチン細胞骨格再構成を経て)、最終的にはポリカーボネート膜のポアを通り抜けます。その後遊走細胞を膜から分離し、続いて CyQuant® GR Dye で検出します。



キットの構成内容

1. 96-well Cell Migration Plate (Part No. 10401): 滅菌済 96-well プレートが 1 枚
2. 96-well Cell Harvesting Tray (Part No. 10402): 96-well トレイが 1 枚

3. Cell Detachment Solution (Part No. 10403): ボトル 1 本 - 20.0mL
4. 4X Lysis Buffer (Part No. 10404): ボトル 1 本 - 10.0mL
5. CyQuant[®] GR Dye (Part No. 10405): チューブ 1 本 - 75 μ L



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 CaCl_2 ・2mM MgCl_2 を含む DMEM)
4. FBS もしくは希望の化学誘因物質
5. 細胞培養インキュベーター (37°C、5% CO_2)
6. 光学顕微鏡
7. 蛍光プレートリーダーに適した 96-well プレート
8. 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. 96-well Migration Plate を 10 分間室温においておく。

2. 無血清培地に $0.5 \sim 5.0 \times 10^6$ 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刺激する薬剤を細胞懸濁液に直接加える。

(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)

3. 滅菌下で 96-well Migration Plate からカバーと膜チャンバーを分ける。
4. フィーダートレイの well に評価する化学誘因物質もしくは 10% FBS を含む $150 \mu\text{l}$ の培地を加える。
5. フィーダートレイ (化学誘因物質を含む) に膜チャンバーを戻す。**膜の下に気泡が入らないようにする。**
6. step2 の細胞懸濁液 (化学誘因物質を含まない) をやさしく混ぜ、膜チャンバーに $100 \mu\text{l}$ を加える。
7. プレートのカバーし、2~24 時間インキュベーションする。
8. インキュベーションが終了する前に、96-Well Cell Harvesting Tray の well に事前に温めておいた Cell Detachment Solution を $150 \mu\text{l}$ ずつ加える。
9. 注意してインキュベーターから 96-well Migration Plate をとりだし、フィーダートレイから膜チャンバーを外す。

(注意: フィーダートレイは Step12 で使用するため取っておく)

10. 吸引処理か反転して膜チャンバーの上層から細胞/培地を除去する。 $150 \mu\text{l}$ の Cell Detachment Solution が入った Cell Harvesting Tray (Step8) に膜チャンバーを置く。それから 37°C 、30 分間インキュベーションする。
11. 膜チャンバー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。
12. 未使用の 96-well プレート(キットには含まれていません) に $75 \mu\text{l}$ の detachment solution (step11)と、フィーダートレイ中の培地 $75 \mu\text{l}$ (step9) をそれぞれ加える。
13. CyQuant[®]GR を 4X Lysis Buffer で 1:75 に希釈し (例えば $5 \mu\text{l}$ の CyQuant[®]GR dye に $370 \mu\text{l}$ の 4X Lysis Buffer を加える)、十分量の 4X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution を準備する。
14. 各 well (予め $150 \mu\text{l}$ の Cell Detachment Solution が含まれている) に $50 \mu\text{l}$ の 4X Lysis Buffer / CyQuant[®]GR dye solution を加える。20 分間、室温においておく。
15. 蛍光測定に適した 96-well プレートに $150 \mu\text{l}$ 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。

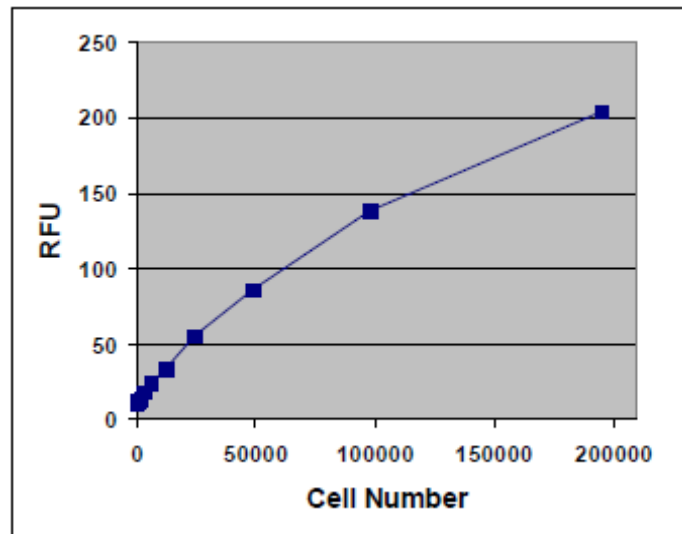


図 2: HL-60 の定量

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。

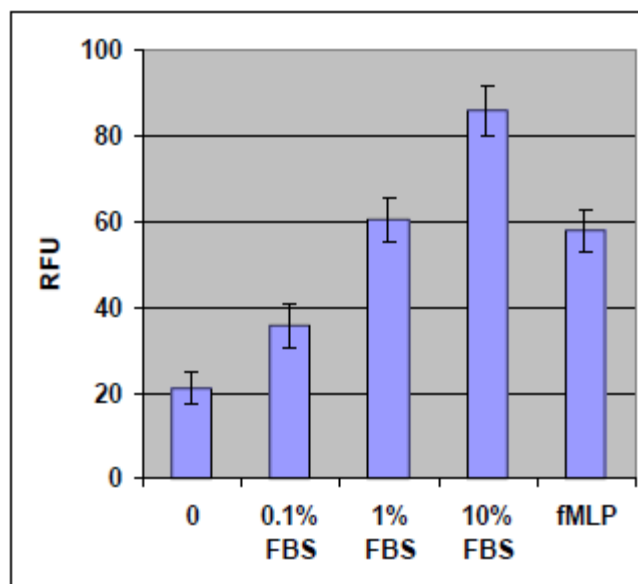


図 3: HL-60 の走化性

HL-60 細胞を 250,000cells/well で播き、1 時間培養して FBS あるいは fLMP (200 μ M) に対する遊走性をテストした。遊走細胞を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.
4. CyQuant GR Dye is licensed from Molecular Probes, Inc., and is used in cell migration and invasion kits only.