

**CytoSelect™ 24-well Collagen Cell Invasion
Assay
(Colorimetric Format)**

Cat. No. CBA-110-COL

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

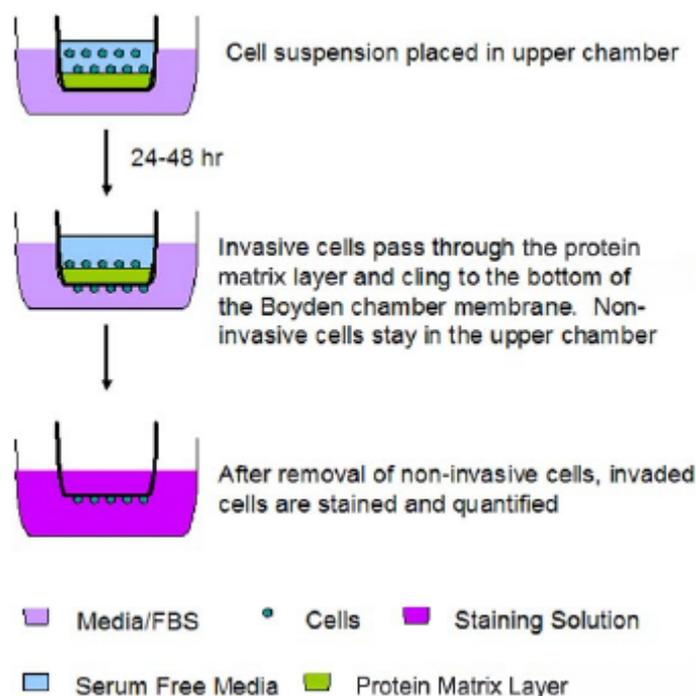
正常な周辺組織に浸潤する悪性腫瘍細胞の浸潤能は深刻な病的状態や癌による死亡の原因となります。浸潤には接着、基底膜・細胞外マトリックスのタンパク質加水分解、細胞移動などのいくつか異なる機能が必要です。転移細胞はある細胞表面のプロテアーゼ受容体の発現が増大する間に多くのタンパク質分解酵素（例えば、リソソーム加水分解物、コラーゲナーゼ、プラスミノゲン活性化因子）を産生します。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ Collagen Cell Invasion Assay Kit では腫瘍細胞の浸潤性をアッセイするためのウシタイプ I コラーゲン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™ Collagen 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™ Collagen 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(8 μm 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ウシタイプ I コラーゲンマトリックスが均一にコートされています。このコラーゲン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。浸潤細胞はコラーゲン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、染色・定量します。



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 Stain Solution (Part No. 11002): 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 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. 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 Collagen 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 μL を内部のコンパートメントに加え、細胞培地の基底膜層を再水和させる。
3. 無血清培地に 0.5~1.0 x 10⁶ 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. コラーゲン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 μL を除去する (50 μL はそのまま残る)。
5. インサートに細胞懸濁液を 250 μl 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 μl 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。綿棒を使ってインサートの内側から非浸潤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。

9. 事前に用意した 400 μ l の Cell Stain Solution が入った未使用の well にインサートを移し、室温に 10 分間おいておく。
10. ビーカーにはった水で何度も丁寧に染色されたインサートを洗う。インサートを空気乾燥させる。
11. (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。
12. 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。
13. 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 Invasion Assay Kit を使用した典型的な結果です。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。

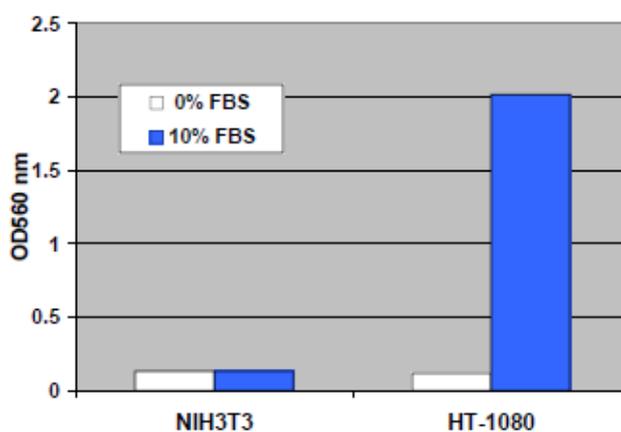
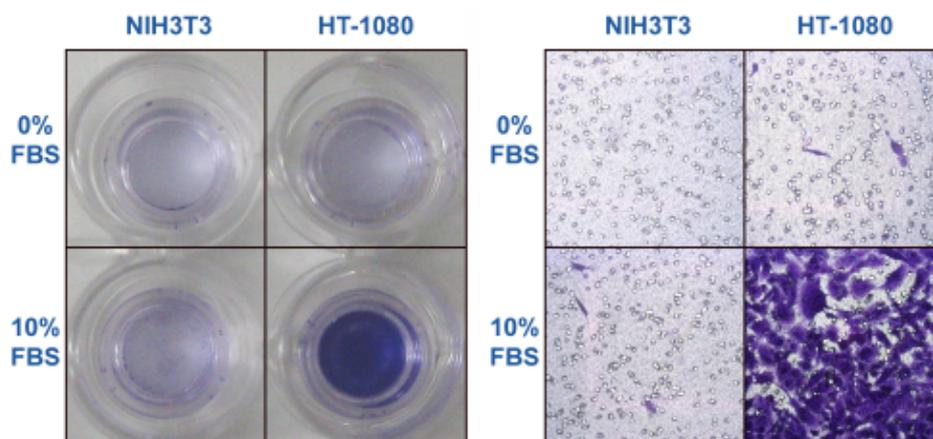


図 1: ヒト線維肉腫 HT-1080 のコラーゲン浸潤能

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 に対する浸潤性をテストした。浸潤膜の底の浸潤細胞を染色し (上図)、抽出後 OD560nm 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.