

CytoSelect™ 96-well Cell Invasion Assay (Fluorometric Format)

Cat. No. CBA-112

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力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。

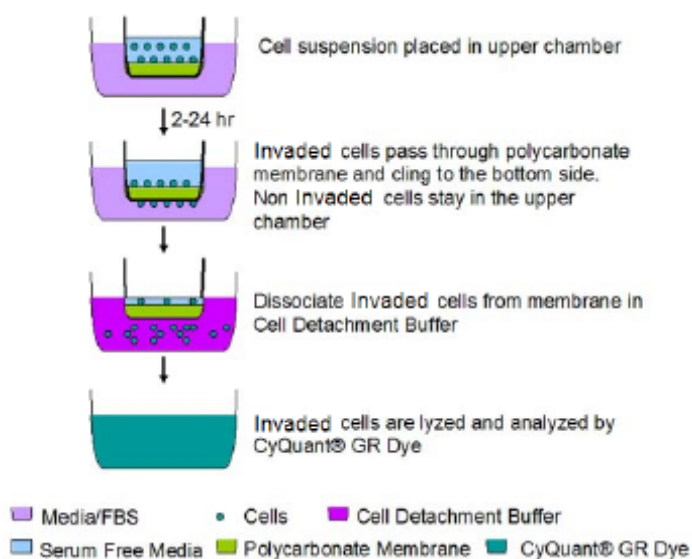
Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well Cell Invasion Assay Kit では腫瘍細胞の浸潤性をアッセイするための基底膜をコートしたインサートを利用しています。本キットでは Calcein AM で細胞を予め標識したり非浸潤細胞を取り除いたり（コットンでの拭き取り）する必要はありません。すべての浸潤細胞を膜から剥離、溶解し、CyQuant® GR Dye で検出します。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well Cell Invasion Assay Kit は細胞浸潤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。

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well 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。

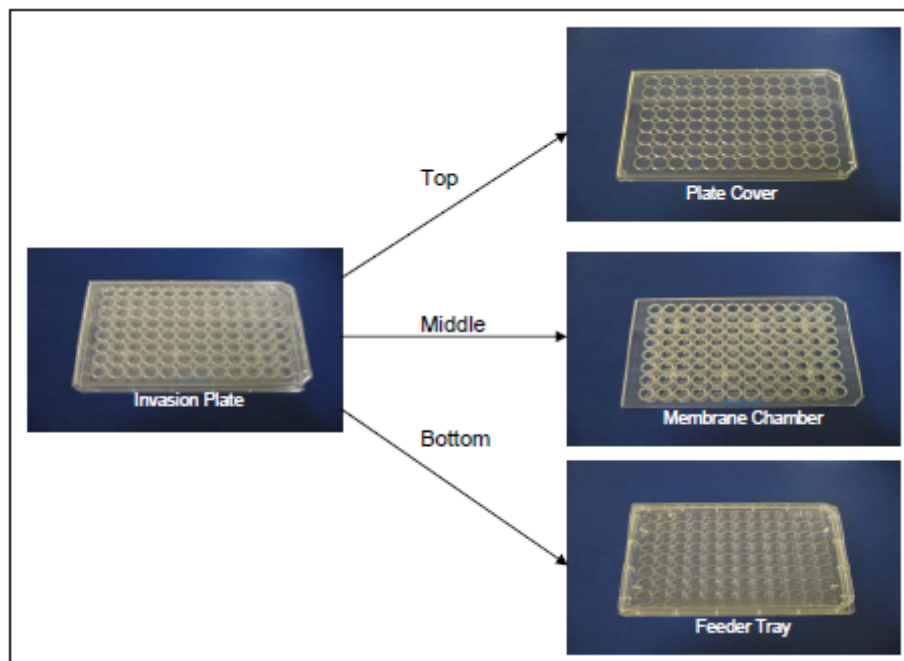
アッセイ原理

Cell Biolabs 社の CytoSelect™ 96-well Cell Invasion Assay Kit は 96-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基底膜マトリックス溶液が均一にコートされています。この基底膜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。浸潤細胞は層のマトリックスタンパク質を分解でき、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. 96-well Cell Invasion Plate (Part No. 11201): ECM コート済み細胞培養インサートが付属した 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. 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. 蛍光プレートリーダーに適した 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. 96-well Migration Plate を 10 分間室温においておく。
2. 温めた無血清培地 100 μ L 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。室温で 1 時間置く。
3. 無血清培地に 0.2~2.0 $\times 10^6$ cells/ml を含む細胞懸濁液を準備する。浸潤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。
4. 基底膜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) を除去する。
注意:もし再水和培地が少量ならばそのまま残しておいてもアッセイに支障は無いでしょう
5. 滅菌下で Feeder トレイからカバーと膜チャンバーをとりはずす。Feeder トレイのウェルに希望の化学誘因物質もしくは 10% FBS を含む培地を 150 μ l 加える。
6. 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。**
7. step3 の細胞懸濁液をやさしく混ぜ、膜チャンバーに 100 μ l を加える。
8. プレートをカバーし、2~24 時間インキュベーションする。
9. 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 μ l ずつ加える。
10. 注意してインキュベーターから 96-well Invasion 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。
11. 吸引処理か逆さまにして膜チャンバーの上層から細胞/培地を除去する。150 μ l の Cell Detachment Solution が入った Cell Harvesting Tray (Step9) 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。
12. 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。
13. CyQuant[®]GR を 4X Lysis Buffer で 1:75 に希釈し (例えば 5 μ l の CyQuant[®]GR dye に 370 μ 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 μ l の Cell Detachment Solution が含まれている) に 50 μ 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 μ 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 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。

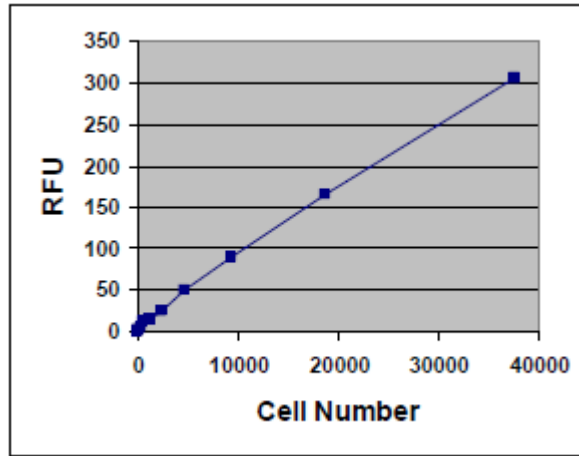


図 2: HT-1080 の定量

HT-1080 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 4X Lysis Buffer/dye で混合) で検出した。

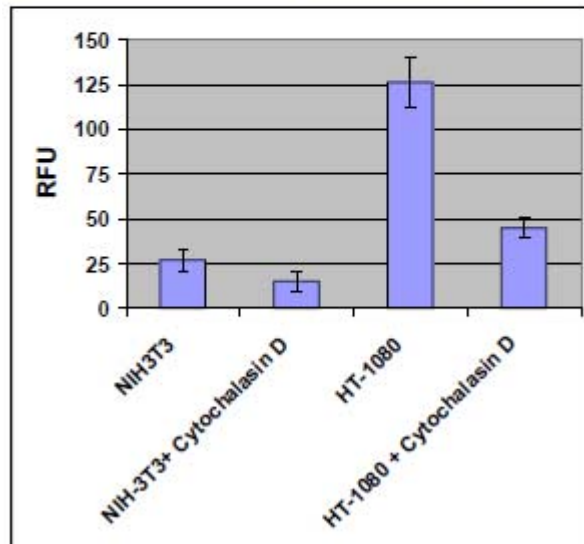
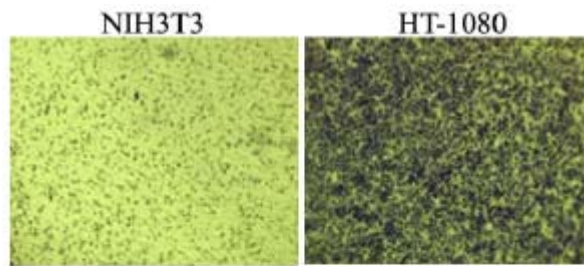


図 3: HT-1080 の浸潤能アッセイ

HT-1080 細胞と NIH3T3 (ネガティブコントロール) について、2 μ M Cytochalasin D 存在下もしくは

非存在下での 10%FBS に対する浸潤能をテストした。各アッセイには 200,000cells を使用した。ポリカーボネート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。

参考文献:

1. Erkell. L. J., Schirmacher, V. (1988) Cancer Res 48, 6933-6937.
2. Montgomery, A. M. P., De Clerck, Y. A., Langley, K. E., Reifeld, 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.