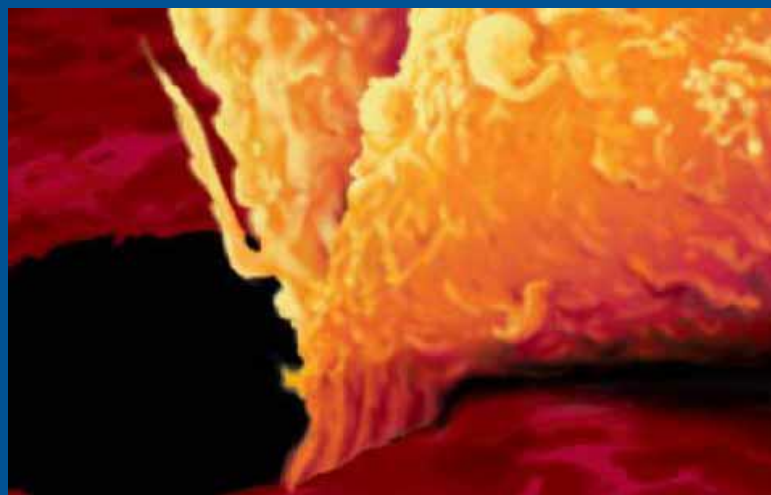


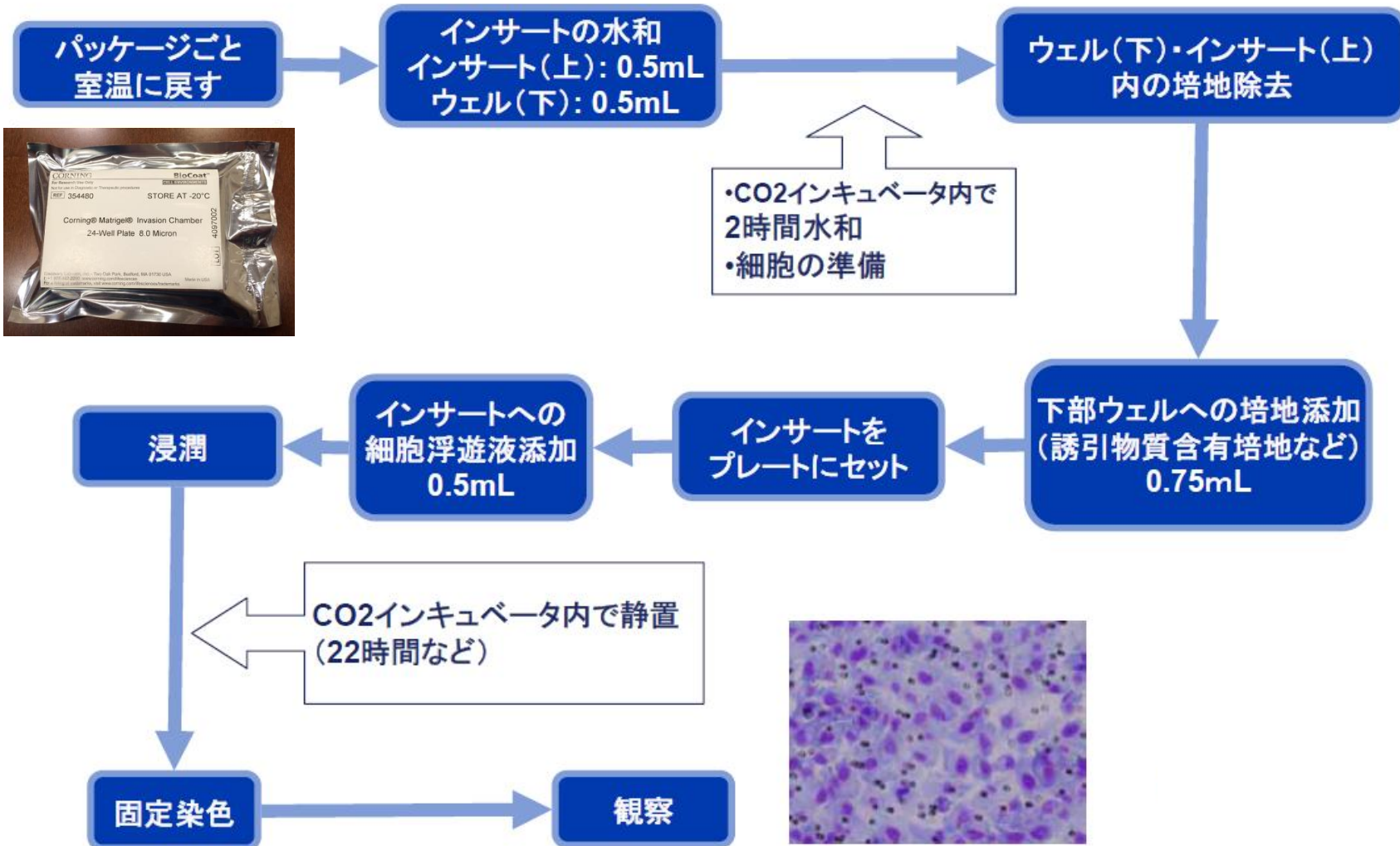
CORNING

浸潤/遊走アッセイ 実験手順

Corning
Life Sciences Japan



浸潤実験の流れ(24ウェルの場合)



製品仕様

製品内容

●24ウェルタイプ

カタログ番号: 354480

12個のインサートがセットされた

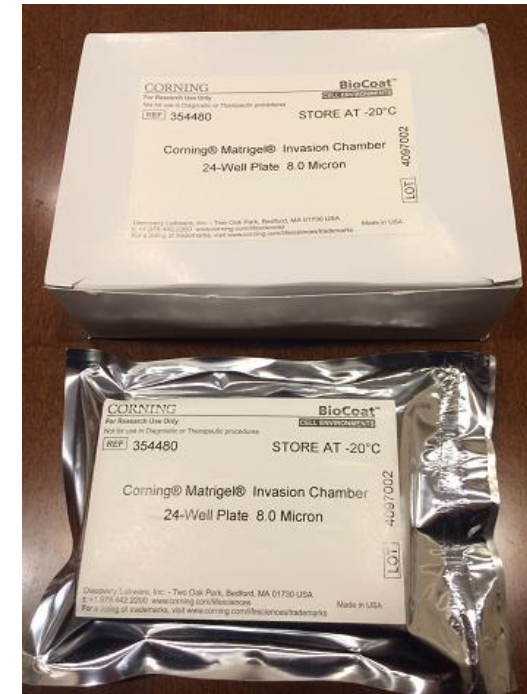
24ウェルFalcon®細胞培養コンパニオンプレートが2枚

●6ウェルタイプ

カタログ番号: 354481

6個のインサートがセットされた

6ウェルFalcon®細胞培養コンパニオンプレートが4枚



354480

* いずれもインベージョンチャンバーの個数は、24個/1ケースとなります。

その他必要なもの

● コントロールインサート

24ウェル: 353097 (インサートのみ48個/ケース)
354578 (インサート24個・プレート2枚つき)

353097



6ウェル: 353093 (インサートのみ48個/ケース)
354576 (インサート24個・プレート2枚つき)

● コンパニオンプレート

24ウェル: 353504 (50枚/ケース)
6ウェル: 353502 (50枚/ケース)

ウェルの上部にインサートのずれ防止用のノッチ(赤丸部分)があります

354578



● 適当な固定液と染色試薬

例: Diff-Quik染色キット(シスメックス株式会社 カタログ番号: 16920)

● その他

例: 細胞、培地、誘引物質、綿棒、カッター(メス)、顕微鏡、スライドグラス、カバーガラス、ピンセットなど



353504

製品を室温に戻す



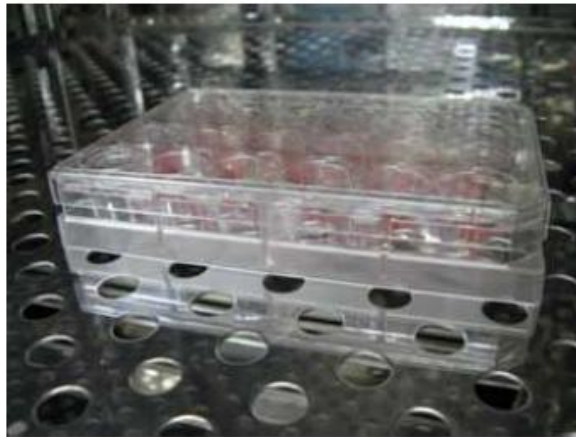
- Corning® BioCoat™ マトリゲルインベーションチャンバーを室温に戻し、パッケージから取り出します。
- 24ウェルタイプのパッケージ内には、プレート1枚にインサート12個がセットされています。

インベーションチャンバーの水和 1



- プレートのウェルとインサートに**誘引物質(血清など)**を**含まない培地**をそれぞれ入れます
(24ウェル:0.5mL、6ウェル:2.0mL)
- インサート底面のマトリゲル層に**触れないように**してください

インベージョンチャンバーの水和 2



- CO₂インキュベータで2時間水和します
- 水和後には、インサート下面に細かな気泡が見られますが、常に起こりうる現象です
- コントロールインサート(ノンコートインサート)を水和する必要はありません

細胞の準備



- インベージョンチャンバーの水和が終わる頃にタイミングを合わせて、浸潤用の細胞浮遊液を調整します
- 細胞浮遊液には、誘引物質を入れません

コントロールインサートの準備とプレートへの培地の分注



- コントロールインサートを、必要な数準備します（長時間培地に浸すとインサート内に培地がはいりますので、すぐにはプレートにセットしないでください）
- **プレートのウェルに、誘引物質（血清など）入りの培地等を入れます**

インサートの準備とセット



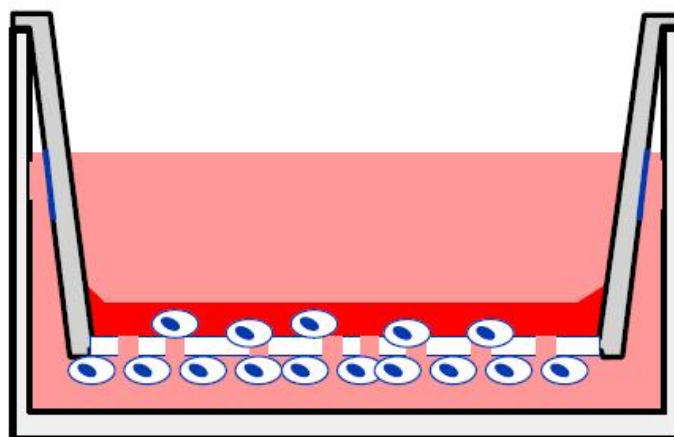
- 水和したインサートから培地を抜きます（慣れない間は、空のウェルにインサートを移すと見やすくなります）
- インサート底面のマトリゲル層には、触れないようにしてください

インサートのセットと細胞の播種



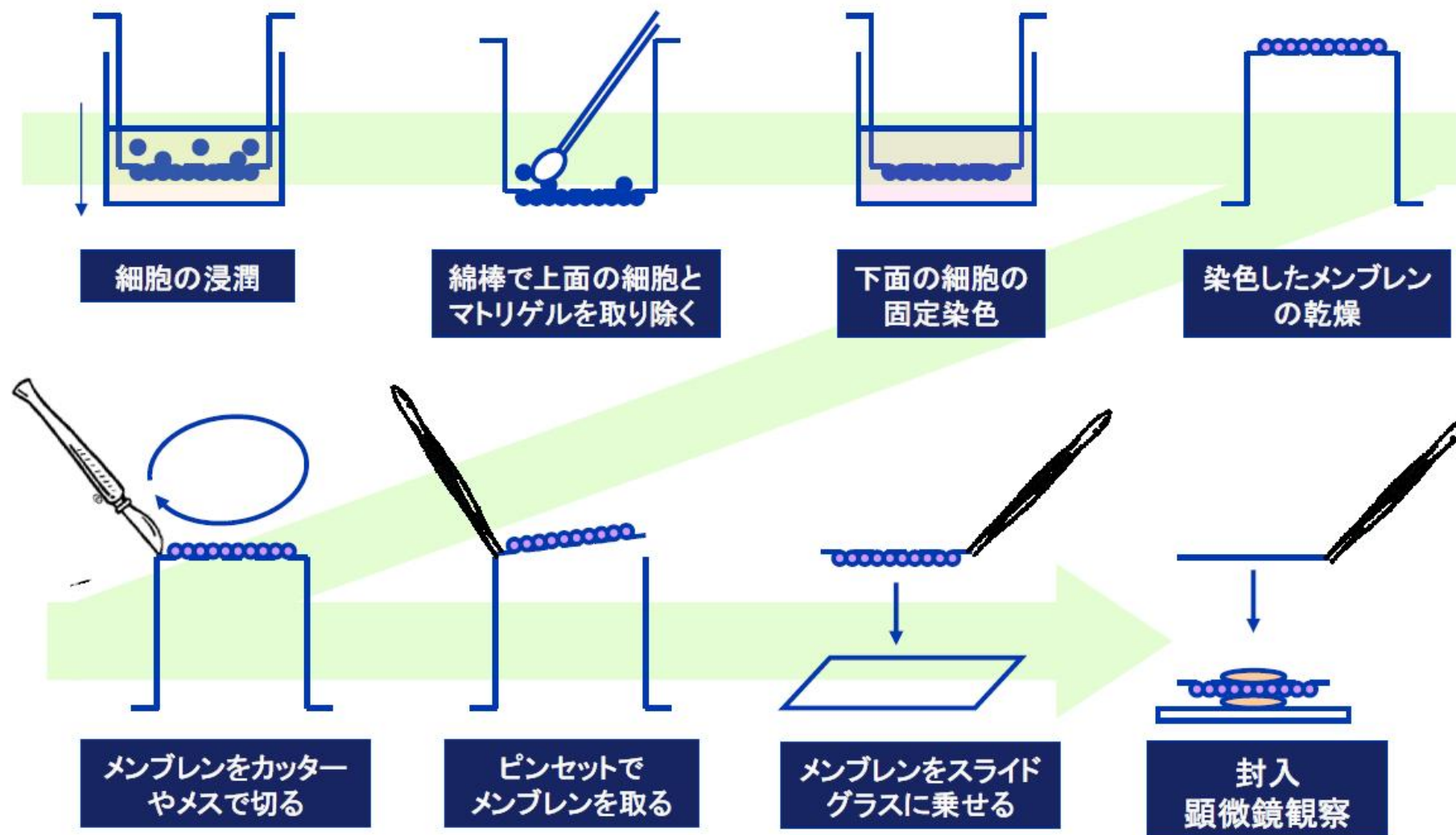
- 培地0.75mLを入れておいたプレートに、水和して培地を抜いたインサートをセットします
- コントロールインサートも同様にセットします
- 調整しておいた細胞浮遊液を、各インサートに入れます
(24ウェル: 0.5mL、6ウェル: 2mL)
- プレートの底を見て、大きな気泡がないか、インサートがずれていないかを確認してください

浸潤



- CO₂インキュベータ内で所定時間インキュベーションし、浸潤を行います
- 製品添付のプロトコールでは、インサートあたりHT1080細胞が25,000細胞で22時間となっていますが、細胞数・浸潤時間などの条件は、使用する細胞により適宜設定してかまいません

浸潤とその後の処理の流れ



固定染色の準備



- 固定液・染色液を準備します
- 特定の染色液の指定はありません
 - 写真はディフクイック(シスメックス株式会社)を使用した例です
 - 細胞が顕微鏡下で判別できるようになる染色法を選択してください

細胞の拭い取り



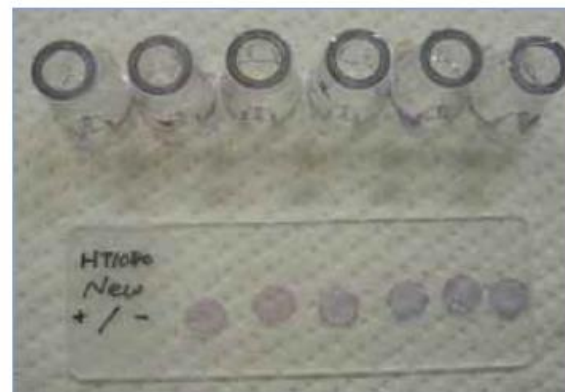
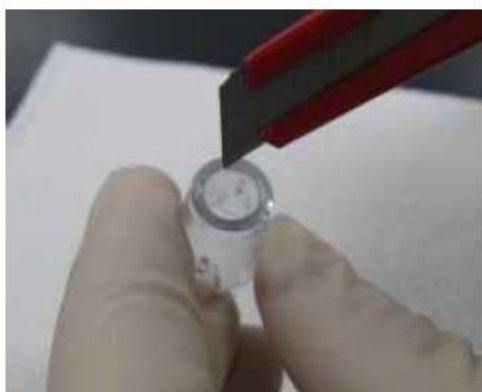
- 浸潤終了後、インサートをプレートから取り出し、培地を抜き取ります
- インサートの内側を綿棒で拭きます（拭い残しを減らすには、インサート底面の角に綿棒の先が行き渡るように注意してください）
- インサートの裏側に触れないよう気をつけてください
- 細胞が乾燥しないように、処理は手早く行ってください

固定・染色



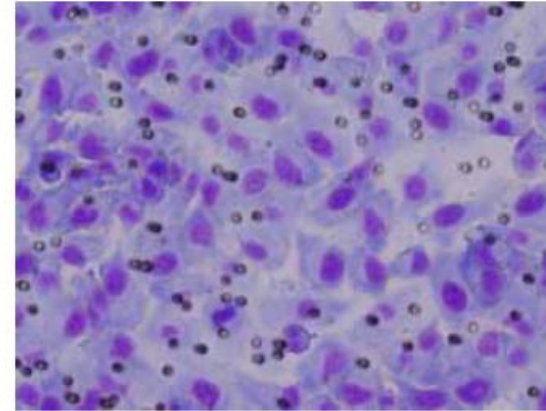
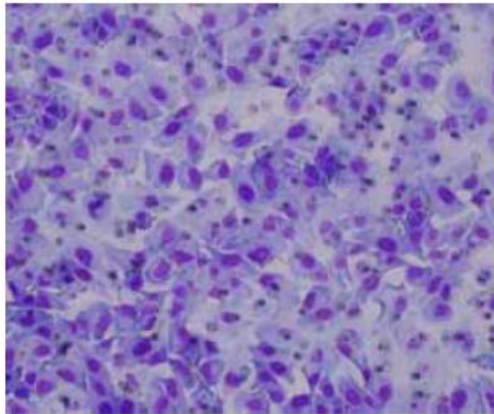
- 内側を拭ったインサートを、固定液につけます
- 固定液をよく切った後で、染色液につけます
 - *固定、染色の時間は、ディフクイックを使用した場合で1-2分程度で十分です
- 染色したインサートを水につけ、余分な染色液を除きます（何度か水を替えると抜けやすくなります）
- インサートの水分を切り、よく乾かします（乾燥が不十分だと顕微鏡像が見つらいことがあります）

メンブレンの切り取り



- 乾燥したインサートからメンブレンを切り取ります
- 刃先の新しいカッターやメス刃を使用してください
- 刃を刺したら、のこぎりを引くように徐々に切ります（刃を刺したまままわすと、メンブレンが裂けることがあります）
- メンブレンの向きがどれも同じになるように並べるとピントが合わせやすくなります

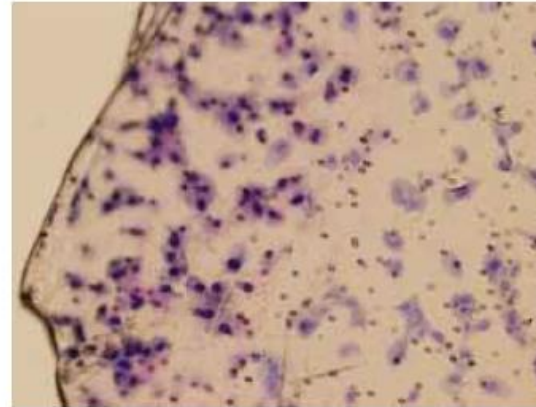
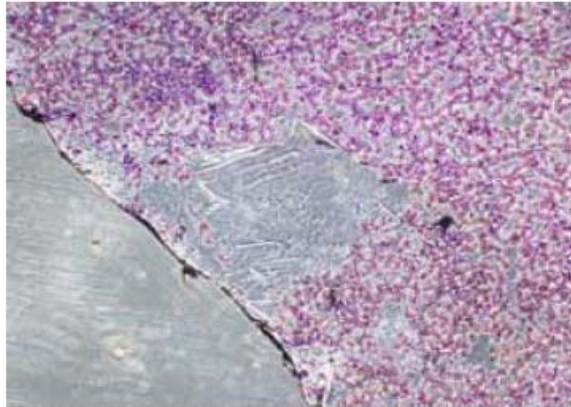
観察・計数



- 封入前に観察する場合は、上からスライドグラスをかぶせると、メンブレンの面が安定しやすくなります
- 顕微鏡観察は、見える細胞数に応じて40倍から200倍程度で行ってください
- 1枚のメンブレンで複数の視野を数えます
- 倍率が高いときは計数面積が狭くなるため、視野数を増やすことをお勧めします
- 右の写真で黒い粒のように見えるのは、メンブレンのポアです

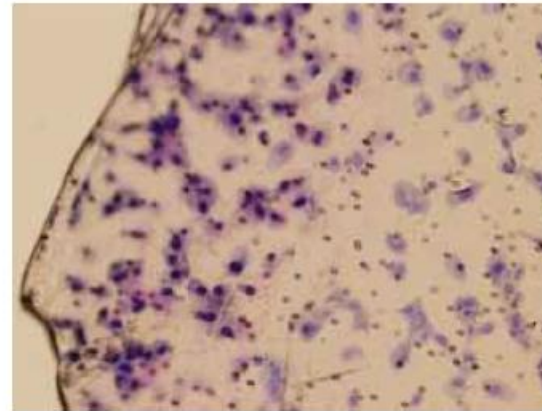
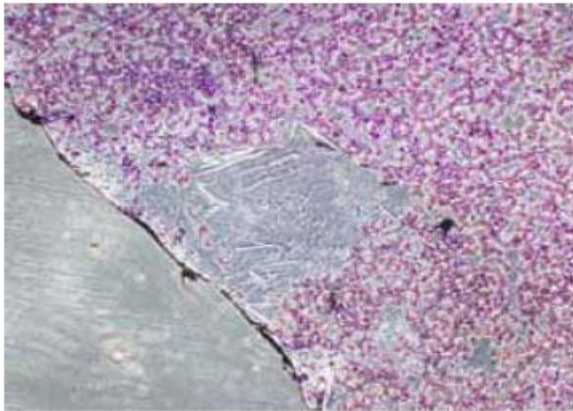
*倍率は、左側写真が100倍、右側写真が200倍ですが、加工してあるため本来の倍率とは異なります

観察・計数



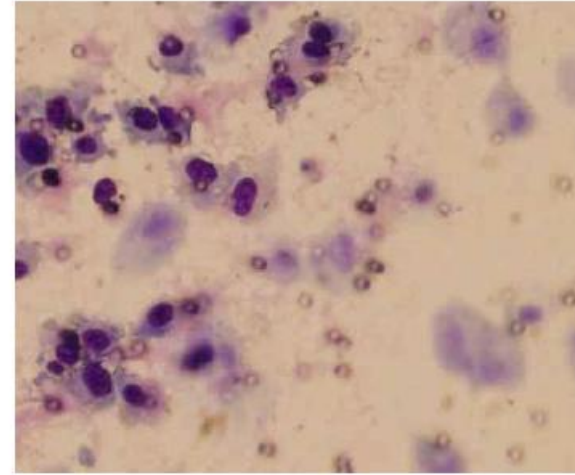
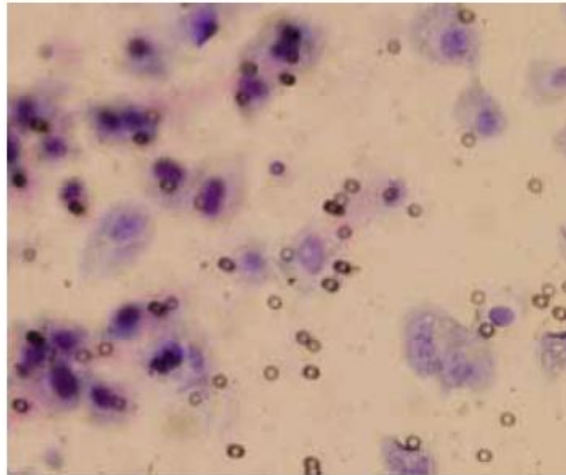
- 細胞が削り取られた部分（左側写真）や、メンブレンの端に拭い残しがある部分（右側写真の色の濃い部分）は、計数対象から外してください
- 染色具合にむらがあっても、細胞が視認できれば問題ありません

観察・計数



- 細胞が削り取られた部分(左側写真)や、メンブレンの端に拭い残しがある部分(右側写真の色の濃い部分)は、計数対象から外してください
- 染色具合にむらがあっても、細胞が視認できれば問題ありません

観察・計数



- メンブレンの裏と表の細胞は、ピントが合う位置が違うため、見分けられます
 - 左: 浸潤した細胞(色が薄い)にピントを合わせると拭い残し(色の濃い)の細胞はぼやけたように見えます
 - 右: 拭い残しの細胞(色の濃い)にピントを合わせると浸潤した細胞(色が薄い)はぼやけたように見えます

データ計算

- %浸潤の計算式:

$$\%浸潤 = \frac{\text{(マトリゲルインサートメンブレンを浸潤している平均細胞数)}}{\text{(コントロールインサートメンブレンを移動する平均細胞数)}} \times 100$$

- 浸潤指数の計算式:

$$\text{浸潤指数} = \frac{\text{(％浸潤試験細胞)}}{\text{(％浸潤コントロール細胞)}} \times 100$$

注意: データはコントロールメンブレンの通過移動に対するマトリゲルマトリックスおよびメンブレンの通過浸潤として表されます。“浸潤指数”はまたコントロール細胞の浸潤に対する試験細胞の浸潤の比としても表されます。

お問い合わせ先



ScientificSupportJP@corning.com

Tel:03-3586-1268

何かご不明な点などございましたらメールにてお問い合わせください。