

Corning® BioCoat™ Matrigel® インベーションチャンバー

よくある質問と回答

CORNING

Corning® BioCoat™ マトリゲルインベーションチャンバーは、悪性細胞の浸潤研究に有用なツールです。転移を起こす際、細胞はプロテアーゼを分泌して基底膜を破壊し、遊走します。Corning® Matrigel® 基底膜マトリックスコートインサートを用いた浸潤アッセイは、細胞の転移能力を量的、質的に調べ、細胞浸潤のメカニズム研究や阻害アッセイを行うための「gold standard」となっています¹⁻¹⁰。

Corning® BioCoat™ マトリゲルインベーションチャンバー使用前に、どのように準備をすればいいですか？

製品を -20 °C の冷凍庫から取り出し、室温に戻してください。インサートがコンパニオンプレートのウェルの刻み（ノッチ）にセットされていることを確認します。あらかじめ温めておいた重炭酸塩ベースの培地をインサートに加えます。添加培地量は、下記に従ってください。5% CO₂ インキュベーター内で、2 時間水和を行います。

	24 ウェル	6 ウェル
インサートとウェルの添加培地量	0.5 mL (インサート) 0.5 mL (ウェル)	2.0 mL (インサート) 2.0 mL (ウェル)

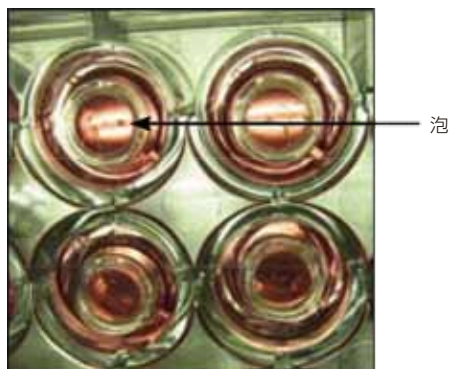
注意: 全てのインサートを一回の実験で使用しない場合、使用する分だけを溶かしてください。凍結融解を繰り返すと、マトリゲルのコーティングが劣化します。製品は、無菌条件下で封を開け、無菌操作にてコンパニオンプレートに移します。使用しないインサートは、すぐにパッケージの封を閉じ、-20 °C の冷凍庫に戻してください。

誘引物質は、上下両方のチャンバーに入れるべきですか？

誘引物質は、下側（basolateral 側）に入れてください。誘引物質はゆっくりと上側（apical 側）へと拡散し、細胞を誘導する濃度勾配ができます。実験の詳細手順は、ユーザーガイドに従ってください。

泡が生じてしまったらどうしたらよいですか。また、避ける方法がありますか？

Corning® BioCoat™ マトリゲルインベーションチャンバーを、ウェルの刻み（ノッチ）に正しくセットし、泡が入らないよう操作することは重要です。誘引物質含有培地や、コントロール用培地を、コンパニオンプレートのウェルに入れます。無菌的な手技にて、培地を入れたコンパニオンプレートのウェルに、インサートをセットします。泡を防ぐため、インサートをやや斜めに傾けながら培地に浸し、刻み（ノッチ）に合わせてセットします。泡が入ってしまったときは、そっとプレートの横をたたいて、泡を取り除きます。何度もインサートを外したりはめたりすると、かえって泡が増えることがありますので、注意してください。



参考文献

1. Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Sarkar, F.H. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3-diindolylmethane is mediated by the NF- κ B downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of VEGF in prostate cancer. *Cancer Res.* **67**(7):3310 (2007).
2. Albini, A., and Benelli, R. The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. *Nat. Protocols.* **2**(3):505 (2007).
3. Oxelmark, E., Roth, J.M., Brooks, P.C., Braunstein, S.E., Schneider, R.J., Garabedian, M.J. The cochaperone p23 differentially regulates estrogen receptor target genes and promotes tumor cell adhesion and invasion. *Mol. Cell Biol.* **26**(14):5205 (2006).
4. Duxbury, M.A., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W., Whang, E.E. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene.* **23**:1448 (2004).
5. Seton-Regers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., Brugge, J.S. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**(5):1257 (2004).
6. Singh, A., Singh, U.P., Grizzle, W.E., Lillard, Jr J.W. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab. Invest.* **84**:1666 (2004).
7. Takada, Y., Kobayashi, Y., Aggarwal, B.B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- κ B activation by inhibiting I κ B α kinase activation, thereby suppressing NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J. Biol. Chem.* **280**(17):17203 (2005).

遊走・浸潤の間に、細胞が弱ってしまうのが心配です。上のチャンバーに血清を入れてもかまいませんか？

血清の添加はお勧めしていません。0.1% BSA をお試し下さい。血清を入れなくてはならない場合は、0.4% 程度としてください。血清濃度が高くなると、濃度勾配が乱れる原因となります。

Corning® BioCoat™ マトリゲルインベーションチャンバーやコントロールインサートを使用したとき、メンブレンの裏側に出てくる細胞が均一ではありませんでした。大丈夫ですか？

これは、一般的に起こる現象です。複数の視野を数えて平均化してください。使用するウェルのn数は3以上をお勧めします。

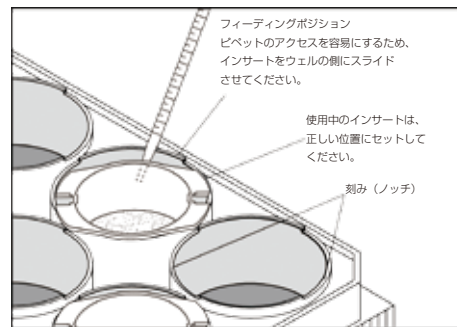
アッセイを行う際は、泡が入っていないか確認してください。泡は、細胞遊走の妨げとなります。Falcon® セルカルチャーインサートを使用するときは、一般的なプレートの使用は避け、必ずコンパニオンプレートにセットしてください。下図のように、インサートが刻み（ノッチ）にはまっていることを確認してください。

・ Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート 24-well

[カタログ番号 353504]

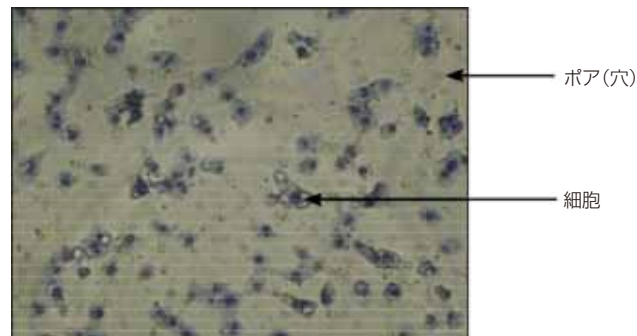
・ Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート 6-well

[カタログ番号 353502]



顕微鏡下では、染色後の細胞はどのように見えますか？

細胞の種類により多少見え方が異なります。通常とは異なる形態をとります。メンブレンのポア（穴）は、丸や卵型あるいは屈曲して見えます。



8. Ichikawa, H., Takada, Y., Murakami, A., Aggarwal, B.B. Identification of a novel blocker of I kappa B alpha kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NFkappa B-regulated gene products. *J. Immunol.* **174** (11):7383 (2005).
9. Silvera, D., Rezina, A., Darvishian, F., Levine, P.H., Zolfaghari, L., Goldberg, J., Hochman, T., Formenti, S.C., Schneider, R.J. Essential role for eIF4G1 overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat. Cell Biol.* **11**:903-908 (2009).
10. Kaji, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K., Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat. Cell Biol.* **11**:312-319 (2009).

インキュベーション時間が長いと、遊走・浸潤の間に細胞が増殖しますか？

可能性はあります。浸潤率を算出して補正することをお勧めします。

<計算式>

% 浸潤の計算式：

% 浸潤 = (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) / (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) × 100

浸潤指数の計算式：

浸潤指数 = (% 浸潤試験細胞) / (% 浸潤コントロール細胞)

詳しくは、ユーザーガイドを参照してください。

細胞染色用に、推奨している試薬はありますか？

ヘマトキシリン / エオシン (H&E) やライト染色など、核と細胞質を染め分ける染色法を推奨しています。市販のキットには、Diff-Quick (シスメックス カタログ番号 16920) や Hemacolor® Stain Set (Merck カタログ番号 111674) があります。

マトリゲルをインサートから拭き取るときに、何かコツはありますか？

インサート内の培地はあらかじめ捨て、湿った綿棒で拭ってください。底が下の床面に当たらないようにインサートは斜めに持ち、細胞をしっかりと拭き取ってください。このとき、メンブレンが外れないように力を加減してください。

メンブレンはどのように切り取ったらよいですか？専用の器具はありますか？

メンブレンは、染色が終了するまで切り取らないでください。切り取りの専用器具はありませんが、#11の外科用メスなどで枠から切り取ってください。切り取ったメンブレンはすぐに細胞がいる方を下に向けてスライドグラスにおき、上から封入液で封じて、カバーガラスを被せます。

水和した後のインサートは、どのくらい保管できますか？水和後に、数日間保管できますか？

インサートは、2時間水和した後に、すぐ使用してください。もし翌日に使用すると、データのばらつきが大きくなります。24時間以上経過したものは、使用しないでください。

自分の細胞では、うまく浸潤がおきません。どうしたらよいですか？

- ・ 無血清培地で細胞をまく場合は、酵素を使わずに細胞回収してからインサートに播種するか、血清で洗ってトリプシンの働きを止めてください。
- ・ Falcon® セルカルチャーインサート専用のコンパニオンプレートを使用し、インサートを正しい位置にセットしてください。
- ・ Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート 24-well
[カタログ番号 353504]
- ・ Falcon® セルカルチャーインサートコンパニオンプレート 6-well
[カタログ番号 353502]
- ・ インサートの下側に、泡が入っていないかを確認してください。
- ・ 細胞の種類により浸潤の状態は違います。ご自分の細胞に適した条件を検討してください。
例：誘引用の血清濃度を 10% に上げる。播種する細胞数を増やす (24 ウェルインサートは 50,000、6 ウェルインサートなら 250,000)。これらを検討しても変わらない場合は、浸潤時間を 24 時間からさらに延ばしてみてください。)
- ・ Corning® BioCoat™ マトリゲルインベージョンチャンバーは、各種細胞で詳細を示した論文が発表されています。参考論文は、WEB サイトに掲載しておりますが、PubMed などの検索もお勧めします。

PubMed : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

検索用キーワード : Matrigel, Invasion, Chamber (または Insert) + ご自分の使う細胞名

技術的なお問い合わせは CLSJP@corning.com へご連絡ください。

商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit www.corning.com/discoverylabware.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks.

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

**コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部**

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階

Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291

www.corning.com/lifesciences

CLSJP@corning.com

© 2022 Corning Incorporated
CLS-006-01