

ORIS™ Cell Migration Assay Kit FAQs

<http://www.platypustech.com/>

<http://www.biogenesis.com.tw/>

tech@biogenesis.com.tw

Q1: Qris Cell Migration Assay 如何操作呢?

A1:

- 1). 先將 stoppers 塞入 wells 內.檢視有無塞緊
- 2). Loading cells, 100ul/well.搖晃均勻
- 3). 細胞培養至貼附,密度達 9 成以上
- 4). 移除 stoppers,更換 medium
- 5). 在顯微鏡下觀察,並可配合 image J 計算細胞數. 或直接在 plate reader 下測螢光強度.

Q2: Oris Cell Invasion Assay 如何操作呢?

A2:

- 1). 先 coating 第一層 BME (Serum Free Medium Prepare),濃度約略 3.5mg/ml
- 2). 將 stoppers 塞入 wells 內.檢視有無塞緊
- 2). Loading cells, 100ul/well.搖晃均勻
- 3). 細胞培養至貼附,密度達 9 成以上
- 4). 移除 stoppers,更換 medium
- 5). coating 第二層 BME (Complete Medium with serum or Grow Factor, but phenol-red free),
濃度建議 >9mg/ml.
- 6). 加入 Serum Free and phenol-red free Medium Culture
- 7). 在顯微鏡下觀察,並可配合 image J 計算細胞數. 或直接在 plate reader 下測螢光強度.

Q3: Oris Cell Migration / Invasion Assay 可以保存多久?

A3: 室溫下, 避免高溫,避免 UV Light 狀況下, 至少 1 年.

Q4: 何種細胞適合使用 Oris Cell Migration / Invasion Assay?

A4: 只要是貼附性的細胞,均能使用

Q5: Oris Cell Migration / Invasion Assay 可以進行何種觀察呢?

- A5:**
- a. 模擬 cell 在 in vivo 進行 2D / 3D migration / Invasion 的狀態
 - b. Kinetic 觀察,可以在同一 well 下,觀察不同時間點,大幅提高實驗一致性.
 - c. High Through Screening 大量基因表現,大量藥物篩檢
 - d. 在顯微放大倍數 40X 下,能觀察到全視野之 cell 進行 migration.有效減少爭議
 - e. 能有效表現出 cell metastasis 的速度與能力.

Q6: 因為第一層 BME 非常的薄,單單只是 coating 功能,我能忽略它嗎?

A6: 並不建議忽略它,即使他非常的薄. 因為他不僅扮演著 3D 的功能外,亦能幫助 cell 貼附,甚至是第二層 BME 對於細胞的包覆能力的提升.

Q7: Oris Cell Migration / Invasion Assay 實驗結束後,該如何進行觀察?

A7: 可以利用光學顯微鏡,螢光顯微鏡,螢光 plate reader 等方式來觀察.其中,顯微鏡可以配合照相系統,拍完照後,立即使用免費軟體 Image J, (free from the NIH at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). 有效,快速,運算 cell migration 數目,提高效率,並做一量化. 在使用螢光 plate reader 時,能得到一個 migration 前後螢光相對量,亦是有效量化的一種表現

Q8: 何時才會用到 kit 附的 Mask 呢?

A8: 當使用螢光 plate reader 使,建議使用底部激發光的機台.將 Mask 裝入 96 well plate 底部的卡榫,即可單單量化中間有進行 migration 的區域.

Q9: 我能將 Stoppers 重複使用嗎?

A9: 雖客戶有如此使用, 但站在原廠的立場,並不建議.

Q10: 能使用其他牌子的 96 well culture plate 嗎?

A10: 不行,目前,只能使用 Nunc 特定的 96 well culture black plate. 其他的,規格不合.

Q11: 如何 seeding cells?

A11: 當 stopper 插入 well 後,即可在 stopper 兩側小孔中,選一小孔注入細胞.請注意,loading 體積要 >100 ul, <150ul. 不然,過小體積會導致不均勻,過多體積則會溢出.通常,loading 100 ul 後,搖晃 plate 即可非常均勻!!

Q12: 細胞密度建議為何?

A12: 依照細胞 size 大小,很難去做一有效的建議.但,通常在實驗開始前,細胞貼附要能滿至少 9 成以上,這樣的效果最佳.

Q13: 若實驗無法一次做滿 96 well,剩餘的 stoppers 該如何保存?

A13: 因為 stoppers 為 Strip 形式,所以為 4 個 stopper 為一 strip. 若未做滿 96well,可以將剩下的密封保存,使用前再照一下 UV Light 即可. 若 plate 還有剩下的 well 未使用,可用滅菌過的 96well PCR 封膜將之貼附即可.

Q14: 如何將 stopper 拔除呢?

A14: 請使用 kit 附的 remove tool 來拔除,拔除時,手握 tool 底部,垂直,輕輕慢慢的拔除即可.

Q15: 我可以使用何種染劑?

A15: 任何染劑,如螢光染劑 (Hoechst 33342, 7-AAD, DAPI, Calcein AM, Cell Tracker...)或 Giemsa 皆可.

Q16: 在 Oris Cell Migration / Invasion Assay 包裝內,是否有附 dye?

A16: 沒有.需額外購買.

Q17: 細胞可以同時染兩種 dye 或更多?

A17: 可以的.只要您的機台有足夠的 filter,即可如此應用

Q18: Kinetic 觀察和 End-point 觀察有何不同?

A18: Kinetic 指的是,細胞染色後依然在 living 下具有螢光激發的表現. End-Point 指的是,螢光染劑加入後,細胞即固定且死亡,並不會持續生長. 為最後的時間點,故稱為 end-point.

Q19: Calcein AM 是屬於 End-Point or Kinetic?

A19: 他是屬於 End-Point, 所以細胞染色後,就要立即觀察,發綠色螢光.

Q20: 如何使用 Kinetic Dye?

A20: 比如 Invitrogen Cell Tracker Green, or Hoechst 33342, 請先依照說明書 working concentration 來配置. 重點是,先染細胞後,再來 seeding cell. 這與 end-point 剛好相反.

Q21: 當我操作 Invasion Assay 時,細胞上層有 coating 一層 BME,這樣,在使用 Calcein AM 時,細胞能染到顏色嗎?

A21: 可以的. Calcein AM 能滲透進去 BME 並且染到細胞

Q22: 為何操作 Invasion Assay 時,細胞行進的方向會單一朝向 central zone?不會朝下或朝上?

A22: 因為,細胞底下之第一層 BME 是使用 Serum Free Medium 來調配的,但,細胞上層第二層 BME 則是使用 Serum Medium or have other chemicals, like grow factor. ..所以,會造成一個 chemoattractant, 所以並不會朝下做一移動,且,第二層 BME 非常的薄,只 loading 40 ul per well, 加上細胞本身就有厚度在,並且第二層 BME 上加的又是 Serum Free Medium, 所以,並無足夠的 chemoattractant 吸引細胞向上移動,僅僅能朝向 central zone 來做一 migration.

Q23: Platypus 是否有在販賣 Calcein AM or Stoppers separate?

A23: 沒有, Platypus 並無單獨販賣 Calcein AM or Stoppers.

Q24: Cell Migration 有哪幾中包裝呢?

A24: 有 7 種包裝:

- 1). CMA1.101, stoppers 已經塞在 96 well plate 內.
- 2). CMAU101, stoppers 尚未塞在 96 well plate 內.
- 3). CMA1.101, plate 已 Collagen I 處理過,且 stoppers 已經塞在 96 well plate 內
- 4). CMAUCCI, plate 已 Collagen I 處理過, stoppers 尚未塞在 96 well plate 內.
- 5). CMAFN1.101, plate 已 Fibronectin 處理過,且 stoppers 已經塞在 96 well plate 內
- 6). CMATR1.101, plate 上同時有 3 種處理,一為 culture treated, Collagen I and Fibronectin.
- 7). CMAUFL4, 提供 4 盤 96 well plate 空盤,96 個 stoppers,尚未塞在 well 內

Q25: Platypus 有計畫發行 48, 24, or 12 well Assay Plate 嗎?

A25: 並無此規畫,因為研發 96well plate 用意在於能進行 HTS,且,能在顯微鏡下全視野的觀察,最具完整性 data 的表現

Q26: Oris BME 濃度為何?有單獨販賣嗎?

A26: 可參照每管上的標籤,約略 15.5mg/ml. Oris BME 單只附在 Invasion Assay 上,並無單獨販賣.

Q27: Oris Assay 可以配合實驗室既有的 BME system 嗎?

A27: 可以的,但,一些條件可能就要使用者自行再去調整.

Q28: Oris Assay 實驗的一致性為何?與 Wound healing Assay 相較下,再現性為何?

A28: 實驗數據如下,採用 HT1080 fibrosarcoma cells,加入 Latrunculin A (0-100 nM)為 migration 抑制劑. 相同條件下,一為 Oris Assay, 另一為 48 well plate, P200 tip 創傷細胞後.在經由 6hrs 的觀察. 經由 7 重複的實驗下.可見,Oris Assay 實驗的一致性與再現性均比一般的 plate assay 來的優.

| % CoV | | |
|---------------|-----------|-----|
| [Latrunculin] | Oris™ CMA | WHA |
| 0 | 6% | 16% |
| 50 nM | 12% | 25% |
| 100 nM | 19% | 42% |

