

# μ-Plate Angiogenesis 96 wellを用いた チューブ形成アッセイ

## 1 はじめに

ウェル内にウェルが形成されたフォーマットを持ち、血管形成研究での実績が証明されているμ-Slide Angiogenesisが、96ウェルフォーマットでご利用いただけるようになりました。このウェル構造では、ゲルとその上を覆う培地がメニスカスを形成することなくフラットな表面を形成できるため、高品質な位相差画像と均一な細胞分布が得られます。

このアプリケーションノートでは、Matrigel™およびマルチチャンネルピペットを用いたμ-Plate Angiogenesis 96 well の取り扱いについて説明しています。

チューブ形成アッセイの詳細については、アプリケーションノート19「μ-Slide Angiogenesisを使用したチューブ形成アッセイ」を併せてご参照ください。

データ解析については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」に記載されています。

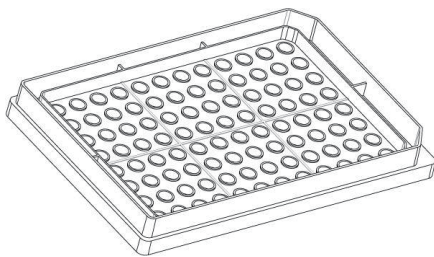


図1：μ-Plate Angiogenesis 96 well

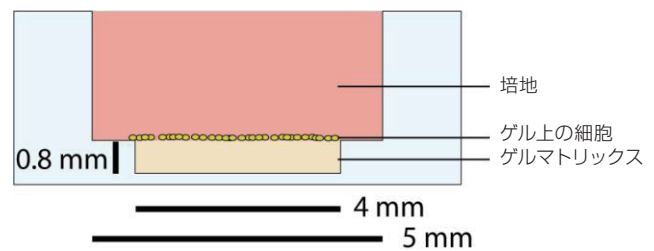


図2：1ウェルの断面図

## 2 材料

μ-Plate Angiogenesisを用いたチューブ形成アッセイには、以下の材料が必要となります：

細胞	： HUVEC (PromoCell, C-12200, C-12203)	1×10 <sup>4</sup> 個／ウェル
培地	： 内皮細胞増殖培地 (PromoCell, C-22010)	70 μl／ウェル
ゲルマトリックス	： BD Matrigel™ (増殖因子低減 [GFR]、#356231)	10 μl／ウェル
スライド	： μ-Plate Angiogenesis 96 well, ibiTreat (ibidi, ib89646)	1枚
剥離剤	： Accutase (PromoCell, C-41310)	8 ml／T75フラスコ

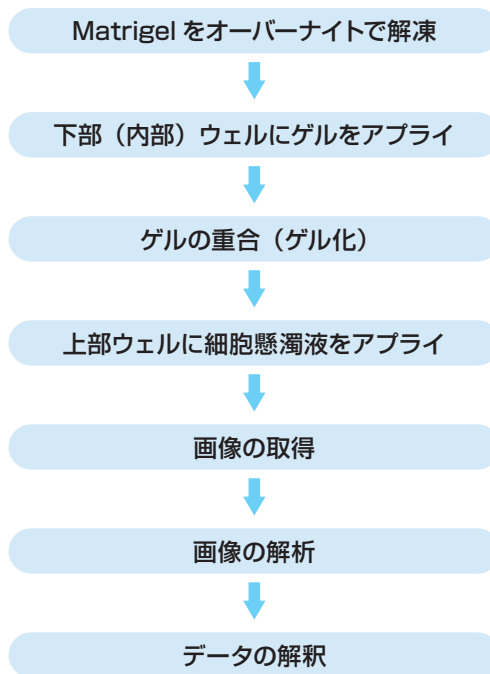
その他に必要な道具：

- ・ 方眼紙
- ・ 冷却ラックあるいは砕いた氷
- ・ マルチチャンネルピペットで8つに分注するためのPCRチューブストリップ
- ・ チップを装着したマルチチャンネルピペット

上記の培地およびゲルの容量は、1ウェルあたりの容量です。この容量に使用するウェル数をかけて必要な総量を算出する必要があります。また、マルチチャンネルピペットによるピペッティングでは、すべてのウェルに正しい量を注入するために多少余分な液量が必要となります。

### 3 ワークフロー

このプロトコールのステップは、アプリケーションノート19「μ-Slide Angiogenesisを使用したチューブ形成アッセイ」と同じです。



### 4 ゲルおよびプレートの調製

#### ゲルのアプライ

マルチチャンネルピペットでゲルを使用する際には、ゲルを8連のPCRチューブストリップ（あるいは円錐底の96ウェルプレートの1列）に分注し、氷上で冷却しておく必要があります。

各ウェルを満たすのに必要な量よりも少なくとも+10μlの量のゲルを分注しておいてください。

例：μ-Plate Angiogenesis 96 well全体（12列）にピペッティングする場合には、8連のPCRチューブそれぞれに130μl分注してください。

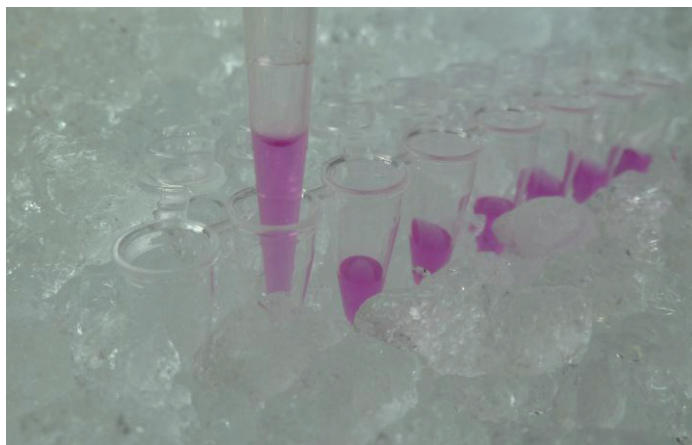


図3：氷上のPCRチューブストリップにMatrigelを分注します

以下のステップにしたがってください：

1) 細胞を播種する前日に、Matrigel™を4℃の冷蔵庫内で氷上に置きます。ゲルはオーバーナイトでゆっくり解凍させます。

注意：ゲルをピペティングする際には、必ず予冷したピペットチップ（4℃）を使用してください！

2) PCRチューブストリップ（または96ウェルプレート）を氷上あるいは適切に冷却された台に置きます。解凍したゲルの入ったバイアルも氷上に置きます。予冷したピペットチップを用いてPCRチューブストリップの各チューブに必要量を分注します。

3) μ-Plate Angiogenesisの無菌包装を開封し、防護フィルムをはがします（図4を参照）。

4) マルチチャンネルピペットの容量を10μlに調節し、ゲルを吸い上げます（図5を参照）。

5) μ-Plate Angiogenesisのウェルにゲルを分注する際、上部ウェルの隅へのゲルの流入を防ぐため、ピペットは垂直に保ってください（図6を参照）。

#### ピペティング操作について

気泡を避けるために、チップをゲル内に入れたままでピペットを用いて吸引および吐出（10μl）を3回行います。その後、10μlをウェルに移します。

Matrigel™は粘度が高いため、ピペットの容量を10μl超あるいは10μl未満に調整する必要がある可能性があります（アプリケーションノート19「μ-Slide Angiogenesisを使用したチューブ形成アッセイ」を参照）。

ゲルの容量を正確にコントロールするために、低倍率（例：4倍）の位相差顕微鏡でゲルを観察してください。

蒸発効果を避けるため、すべてのピペティング手順は数分以内に完了するようにしてください。

#### ゲル化

必要なウェルすべてをMatrigel™で満たしたら、μ-Plate Angiogenesisを付属のフタで閉じて、ゲルを重合（ゲル化）させるためにインキュベーターの中に置いてください（30分から60分）。

蒸発を最小限に抑えるため、サイドリザーバーに滅菌水を注入することができます。この滅菌水があふれてウェルに流入することを防ぐために、リザーバー容量は半分だけ満たしてください。

ゲルの重合中に細胞懸濁液を調製します。



図4：防護フィルムをはがします

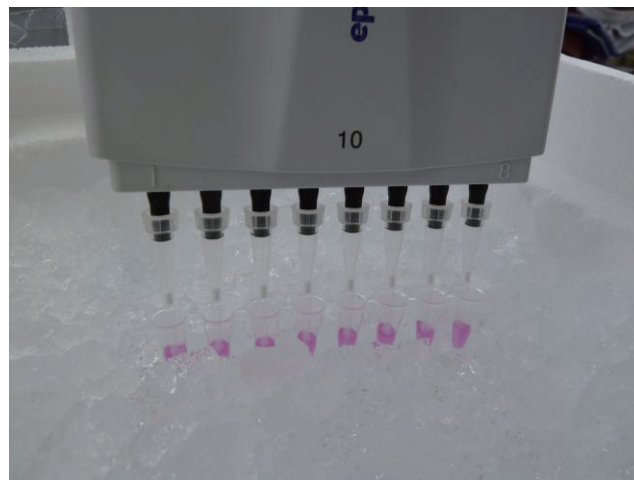


図5：PCRチューブストリップからゲル10μlを吸入します

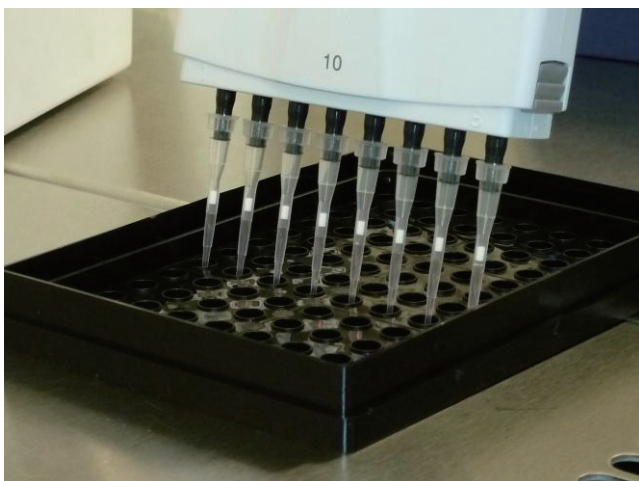


図6：Matrigel™10μlを下部（内部）ウェルに分注します



図7：細胞懸濁液70μlを上部ウェルに分注します

## 5 細胞の播種

ゲル表面に播種される細胞数は、信頼性が高い結果を得るための重要なパラメータです。必要な細胞数は、細胞の種類と大きさによって決まります。最良の結果を得るために、一連の実験を開始する前に播種する細胞数を最適化してください。この最適化の詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」をご覧ください。

以下のステップにしたがってください：

- 1) 最終的な細胞数を1ウェルあたり10,000個とするために、細胞懸濁液の濃度を $1.4 \times 10^5$ 個/mlに調整します。その後、十分に混合します。
- 2) インキュベーターからμ-Slideを取り出し、ラック上に置きます。
- 3) 上部ウェルに細胞懸濁液を70μlずつアプライします。ピペットチップは垂直に保ち、ピペットチップがゲルに触れないように注意してください。
- 4) μ-Plate Angiogenesisのフタを閉じます。これで、スライドを観察するための準備は整いました。



5) 数分後に細胞はゲル面に落下し、1平面上に並びます。このウェルの構造上、(ゲルの上だけでなく) プラスチックの縁の部分に沈降している細胞もあります。

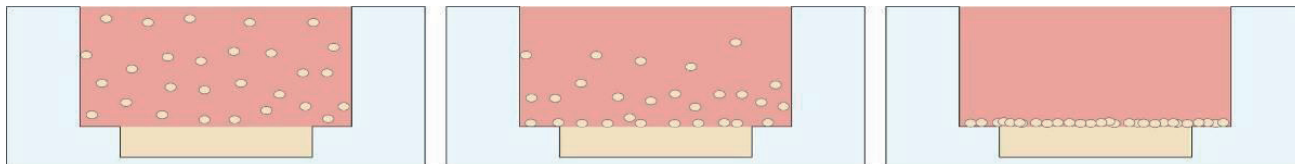


図8：細胞の沈降プロセス。数分後に細胞がゲル面に落下します。

## 6 顕微鏡による観察

取り扱う細胞の種類により異なる特定の発達特性に従って、ゲル表面上にネットワークが形成されます。たとえば、チューブの全長を観察する場合には、播種後最初の数時間でパラメータは最大値に達し、その後は基本値に達するまで数時間かけてゆっくりと低下します。

これらの特性を決定する方法の詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」に記載されています。

細胞を播種した直後に、インキュベーションチャンバーを搭載した倒立顕微鏡にプレートを設定します。ご使用のイメージングシステムで観察したい領域を選択後、タイムラプス撮影を開始します。HUVECの場合には、低倍率(4倍または10倍)で1時間間隔での撮影が推奨されます。注意：細胞がゲル内に移動して焦点面が変化することがあります。そのため、経過時間全体にわたってシャープな写真を撮影するには、ソフトウェアのオートフォーカスプログラムをご利用になることを推奨します。

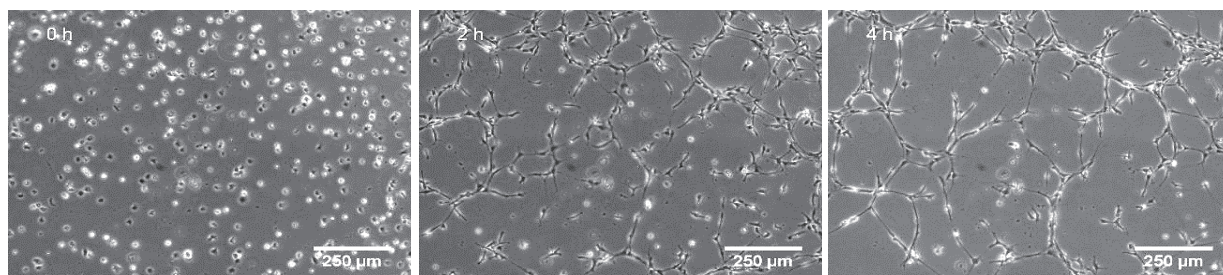


図9：0、2、および4時間後に倍率10倍で撮影したタイムラプス撮影写真

## 7 データ解析

最適な結果を得るため、そして迅速に客観的データ解析を行うために、WimTube Softwareをご利用になることを推奨します。画像をプラットフォームにアップロードしていただくと、数分で結果をダウンロードすることができます。このリンクから「Wimasis画像解析プラットフォーム」にアクセスしてください。

画像はさまざまなパラメータ（血管の長さ、ループ、細胞で覆われた領域など）に基づいて解析されます。データ解析および解釈の詳細については、アプリケーションノート27「チューブ形成アッセイのデータ解析」に記載されています。

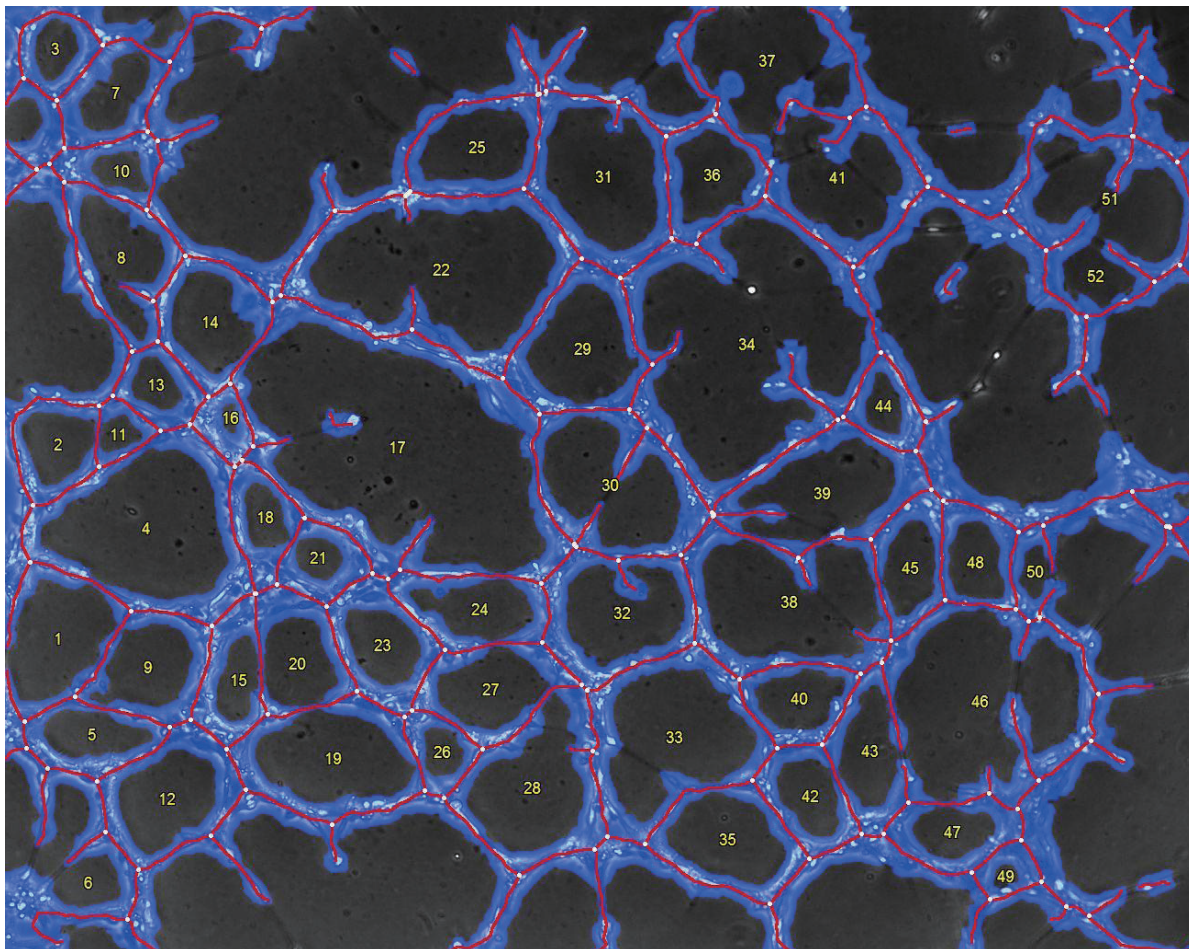


図10：WimTube Moduleを用いたデータ解析。チューブは赤、細胞で覆われた領域は青で示しています。分岐点は白い点で示しています。番号はチューブにより形成された閉じたループを示しています。