

保管方法

冷凍 (-20℃)

コラーゲングル上培養の準備

- (1) 冷凍保管品を25℃の温水浴で攪拌しながら解凍する。^{注1}
(攪拌しないと一部ゲル化することがある)

注1 複数回に分けて使用する場合は、凍結、融解の繰り返しを避けるため、一回の実験に必要なコラーゲン溶液使用量を試薬瓶に小分けして冷凍保存し、必要な分を解凍して使用するとよい。

- (2) 解凍が終了したら直ちに氷上に置く。
- (3) 血清が必要な場合はこの溶液に2~4℃で加える。^{注2}

注2 血清はコラーゲンのゲル化に影響を与える可能性があるため、血清なしでゲルを形成することが推奨される。ゲル化後に添加する血清入りの液体培地により、ゲル内は速やかに平衡化される。

コラーゲングル上培養

- (1) 解凍したコラーゲン中性溶液を、マルチウェルプレートなどの培養容器に分注する。^{注1}

注1 分注量は平面培養で使用する培地量の半量程度を目安とする。

参考：96well → 50-100μL

24well → 350-500μL

- (2) 培養容器を37℃に設定したインキュベーターに入れる。
- (3) 2時間後、ゲルが形成されていることを確認し^{注2}、ゲル上に細胞懸濁液を加えて通常の培養を行う。

注2 コラーゲングルは1時間ほどで概ねゲル化するが、液体培地添加時にコラーゲングル表面が崩れることもあるため、2時間インキュベートすることが推奨される。

RNA回収

必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出薬もしくはキット^{注1}

注1 当社の検討では、RNA収量はフェノール系RNA抽出試薬、RNA純度はカラムタイプのキットの方が高い傾向にあった。

手順

- (1) コラーゲングル上の液体培地を除去する。
- (2) コラーゲングル量に鑑みて、市販のRNA抽出試薬やキットを使用する。

細胞回収

必要な試薬

- ① 0.2% コラゲナーゼ溶液^{注1,2}
- ② PBS

注1 コラゲナーゼは細胞分散用を推奨する。その他の種類の使用条件は各試薬メーカーのプロトコル参照。

注2 コラゲナーゼ溶液を調製する緩衝液は、コラゲナーゼの活性に必要な2mM Ca²⁺を含むものを使用する。

手順

- (1) コラーゲンゲル上の液体培地を除去する。
- (2) チップの先端で軽くゲルを砕く。
- (3) コラゲナーゼ溶液を最終濃度が0.02%~0.2%になるように加える。
例) 96wellプレートでゲルを100μL作製した場合、0.2%コラゲナーゼ溶液を100μL添加する(終濃度0.1%)。
- (4) 37°Cでインキュベートする。
(コラゲナーゼの種類やロットによって溶解時間は変動するが、15分程度で溶解できる。)
- (5) ゲルが溶解したことを確認したのち、溶解液をチューブに移す。
- (6) 遠心し上清を除去する。
- (7) PBSを適宜加え懸濁する。再度遠心し上清を除去する。
- (8) (7)の作業を3~5回繰り返し、コラゲナーゼを除去する。

組織学的評価

必要な機器および試薬

- ① 4% パラホルムアルデヒド (PFA)
- ② 30% スクロース溶液 (in phosphate buffer, pH7.4)
- ③ 凍結切片作製用包埋剤 (Leica 社製 FSC22、SECTION-LAB 社製 SCEM など)
- ④ 凍結切片作製装置 (クライオスタット)
- ⑤ スライドガラス^{注1}
- ⑥ 0.05% Tween20 を含む Tris Buffered Saline (TBST)
- ⑦ ブロッキング剤もしくは血清
- ⑧ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑨ 核染色液 (PBS で希釈した DAPI など)
- ⑩ PBS

注1 染色時に作製した切片がスライドガラスから剥がれやすいため、20μm厚以下で切片を作製すること、また剥離防止加工が施された接着性の高いスライドガラスを使用することが推奨される。

組織学的評価（続き）

I. 凍結切片作製

- (1) コラーゲングル上の液体培地を除去する。
- (2) 4% PFAを添加し、遮光して4℃で一晩固定を行う。
- (3) コラーゲングルを培養容器から薬さじなどで取り出し、30%スクロース溶液に移す。^{注1}
注1 凍結時にサンプル中に氷塊が形成されるのを防ぐため、コラーゲングルに対して十分量のスクロース溶液を用いる。
- (4) コラーゲングルが沈むまで、ローテーター等を用いてコラーゲングルとスクロース溶液を4℃で混和する。^{注2}
注2 必要に応じてスクロース溶液を交換するなどして、しっかりとゲル内の水分をスクロース溶液に置換する。
- (5) コラーゲングルを取り出し、キムワイプなどで軽くスクロース溶液を除き、凍結切片作製用包埋剤に入れ、1時間馴染ませる。
- (6) 新しい包埋剤中にゲルを入れ、ドライアイス上で急速に凍結し、すぐに凍結切片を作製しない場合には-80℃で保存する。
- (7) クライオスタットを用いて凍結切片を作製する。^{注3}
注3 当社ではクライオスタット庫内および試料台を-35℃設定にて切片を作製している。

II. 切片作製後の免疫組織染色など

- (1) 切片の貼り付いているスライドガラスを、PBSで洗浄後、PBSを変えて5分間2回インキュベートする。^{注4}
注4 コラーゲングル切片がスライドガラスから剥がれやすいため、一般的な手法である洗浄時のシェイカーの使用は避けることが推奨される。洗浄しきれない抗体による非特異的なシグナルが見られる場合には、インキュベート回数又は時間を増やす。
- (2) TBSTで15分透過処理を行う。
- (3) ブロッキング剤や血清を用いて、湿箱中で1時間ブロッキングする。
- (4) 1次抗体をブロッキング剤や血清を含むTBSTで希釈し、4℃または室温でインキュベートする。
- (5) TBSTで洗浄後、TBSTを変えて5分間2回インキュベートする。^{注4}
- (6) 共染色を行う場合、(4)～(5)を繰り返す。
- (7) 2次抗体の混合液をブロッキング剤や血清を含むTBSTで希釈し、4℃または室温でインキュベートする。
- (8) TBSTで洗浄後TBSTを変えて5分間2回インキュベートする。^{注4}
- (9) PBSで洗浄後、核染色を行う。
- (10) PBSで洗浄後、PBSを変えて5分間2回インキュベートする。^{注4}
- (11) 退色防止剤入りの封入剤で封入する。

コラーゲン中性溶液ラインナップ

製品番号	製品	包装
DME-02	コラーゲン中性溶液DMEM Low Glucose 2mg/mL pH7.4 無菌 Atelocollagen Neutral Solution, DMEM Low Glucose	20mL/本
DME-02H	コラーゲン中性溶液DMEM Low Glucose 2mg/mL pH7.4 無菌 Atelocollagen Neutral Solution, DMEM High Glucose	20mL/本
RPM-02	コラーゲン中性溶液RPMI 1640 2mg/mL pH7.4 無菌 Atelocollagen Neutral Solution, RPMI 1640	20mL/本

コラーゲンの種類

ウシ皮由来アテロコラーゲン

よくあるQ&Aはこちら

<https://atelocollagen.com/atelocell/faq/01>

