

## 保管方法

冷蔵（2～10℃）

## 細胞播種の事前準備

### 必要な器具

- 1-Aの場合      ①任意のピンセット  
                     ②滅菌ガーゼ
- 1-Bの場合      ①先の平たい水平ピンセット

### 手順

1-Bの場合、圧縮後に3DハニカムBoostedがピンセットに付着しやすいため、数が多い場合には1-Aの方が適している。

- (1-A) 任意のピンセットを用いて、図1の向きで円柱状の3DハニカムBoostedを滅菌ガーゼ上に置く。図2を参考に、細胞懸濁液を調製する間、置いたままにするなどして5分以上かけて乾燥しない程度に十分に水分を除去する。

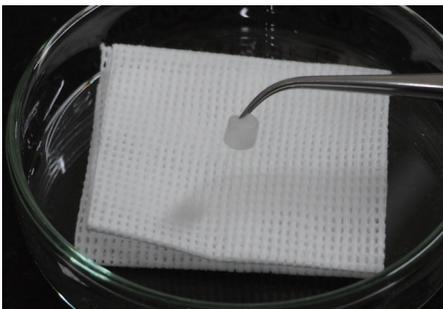


図1. 滅菌ガーゼ上に置く様子

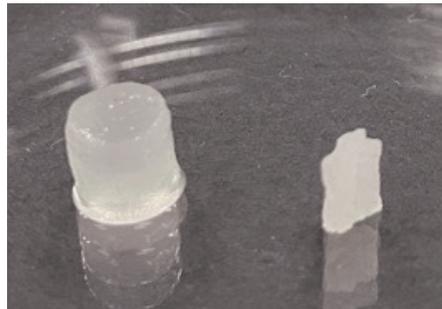


図2. 脱水前(左)と脱水後(右)の3Dハニカム Boosted

- (1-B) 水平ピンセットを用いて、図3の向きで円柱状の3DハニカムBoostedを掴み取り、図4のように圧縮して図5の程度までスポンジに含まれる水分を絞り出すように水分を除去する。



図3. 脱水前の3DハニカムBoosted



図4. 圧縮の様子

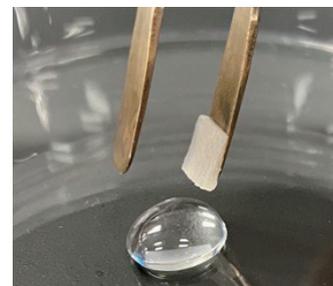


図5. 圧縮後の3DハニカムBoosted

- (2) 水分を除去したスポンジ<sup>注1</sup>を、円柱が自立する向きに合わせて96wellプレート等の培養器材に入れる。

注1：水分が十分に除去できていない場合、細胞播種効率が低くなる。

## 細胞播種

### 手順

- (1) 50 $\mu$ L の細胞懸濁液<sup>注1</sup> をゆっくりと滴下し、図6のように元の円柱状に戻ることを確認する。



図6. 細胞播種後の3DハニカムBoosted

注1 現在のところ、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$  cells の細胞が培養可能であることを確認しています。

- (2) 4時間～1日後、3Dハニカム Boosted が十分浸るよう培地を加える。<sup>注2,3</sup>

例) 96well プレート : 150  $\mu$ L 前後  
24well プレート : 1 mL 前後  
35mm ディッシュ : 3 mL 前後

注2 細胞播種後にすぐ培地を添加する必要がある場合は、播種された細胞が流れないようにゆっくりと3Dハニカム Boosted に当たらないように添加する。

注3 例えば3Dハニカム Boosted に  $1 \times 10^4$  cells 播種して96wellプレートで培養した場合、培養数日後の時点で培地交換だけでは培地成分が不足し始めるため、96wellプレートでは約1週間の培養が限界である。細胞播種数や培養期間によって、途中から大きいサイズの培養器材へ移すか、最初から大きいサイズの培養器材の使用を検討する。

## 細胞回収

### 必要な器具および試薬

- ① ピンセット
- ② 滅菌ガーゼ
- ③ PBS(-)
- ④ トリプシン溶液

### 手順

以下は1個の3Dハニカム Boosted から細胞回収をする場合の手順であり、複数個の場合には使用する容器や添加する液量を適宜検討する。

- (1) 35mm ディッシュに PBS (-) を 4mL 入れる。
- (2) 滅菌ガーゼの上に培養後の 3D ハニカム Boosted を置いて培地を除去する。
- (3) (1)の PBS (-) に 3D ハニカム Boosted を入れ、PBS (-) を含ませる。
- (4) 滅菌ガーゼの上に 3D ハニカム Boosted を置いて PBS (-) を除去する。
- (5) 3D ハニカム Boosted から培地の赤みが抜けるまで、(3)～(4)の操作を4回ほど繰り返す。

- (6) 1.5mL チューブに 3D ハニカム Boosted を入れ、トリプシン溶液 100 $\mu$ L を添加して 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で 5 分間インキュベートする。
- (7) 3D ハニカム Boosted のポア内部を通すように培地 1mL を添加し、同じ培地をポア内部に数回通してから、15mL 遠心管に回収する。
- (8) (7)の操作を再度行う。
- (9) 15mL 遠心管を 1,000rpm、室温で 3 分間遠心し、上清を吸引除去する。
- (10) 細胞ペレットを任意の培地量で適宜懸濁する。

## DNA定量

---

### 必要な器具および試薬

- ① 1.5mL チューブ
- ② マイクロチューブ用キャップロック
- ③ ピンセット
- ④ 滅菌ガーゼ
- ⑤ Triton™ X-100
- ⑥ Proteinase K
- ⑦ ウォーターバス

### 手順

- (1) 1.5mL チューブに 0.2%Triton™X-100 を 400 $\mu$ L 添加する。
- (2) 滅菌ガーゼの上に培養後の 3D ハニカム Boosted を置いて培地を除去する。
- (3) (1)の 1.5mL チューブに 3D ハニカム Boosted を入れ、ボルテックスする。
- (4) キャップロックを取り付け、100 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 10 分間インキュベートする。
- (5) 室温に冷めるまで静置してから、スピンドウンする。
- (6) キャップロックを外し、Proteinase K を 30 $\mu$ L 添加してボルテックスする。
- (7) キャップロックを再び取り付け、56 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 3D ハニカム Boosted が溶解するまでインキュベートする。
- (8) 以降は、PicoGreen® などの DNA 定量試薬を取扱説明書通りに使用する。

## RNA回収

---

- (1) 滅菌ガーゼの上に培養後の 3D ハニカム Boosted を置いて培地を除去する。
- (2) 以降は、市販の RNA 抽出試薬やキットを取扱説明書通りに使用する。<sup>注1</sup>

注1 使用する製品に合わせて適宜ホモジナイズを行う。

## 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
- 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<sup>注1</sup>
- ⑥ 0.1% TritonX-100 / ブロッキング剤 / PBS 溶液
- ⑦ PBS
- ⑧ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑨ 核染色液<sup>注2</sup>

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、20 $\mu$ m 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。

注2 コラーゲン自体に青色の自家蛍光があるので、DAPI ではなく DRAQ5 などの核染色液を使用すると観察しやすい。

### 手順

- (1) 培地を除去後、4%PFAを添加して固定する。
- (2) 30%スクロース溶液に一晩浸漬する。<sup>注3</sup>

注3 凍結時にサンプル中に氷塊が形成されるのを防ぐため、必要に応じてスクロース溶液を交換するなどして、しっかりとサンプル内の水分をスクロース溶液に置換する。
- (3) 凍結切片作製用包埋剤に包埋して凍結する。
- (4) 凍結したサンプルをクライオスタット<sup>注4</sup>を用いて薄切し、スライドガラスに貼付する。

注4 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。
- (5) 切片をPBSに0.1%TritonX-100やブロッキング剤を添加した溶液へ浸漬し、透過処理およびブロッキング処理を行う。
- (6) 一次抗体液に4℃で一晩浸漬する。
- (7) PBSで洗浄後、二次抗体液に室温で1時間浸漬する。
- (8) PBSで洗浄後、核染色する。

## 3DハニカムBoostedラインナップ

製品番号	製品	サイズ	ポアサイズ	包装
3D-HCB	3DハニカムBoosted 無菌 3D Honeycomb Boosted	φ5×5mm	100~300μm	25個/本

## 関連製品

製品番号	製品	サイズ	ポアサイズ	包装
CSH-10	コラーゲンスポンジ ハニカム 無菌 Atelocollagen, Honeycomb Sponge 表面積: 約2,000cm <sup>2</sup> /g 単位体積当りの重量: 12~13mg/mL	約3×3×2mm	200~400μm	100mg/本
CSH-96	ハニカムディスク 96 無菌 Atelocollagen, Honeycomb Disc 96	φ6×2mm	200~400μm	25枚入り/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/13>

