

保管方法

冷凍 (-20℃)

3D Readyアテロコラーゲンの取り扱い

(1) 製品到着後は冷凍庫で保管し、使用の際は製品を冷蔵庫に移して一晩かけて解凍する。^{注1,2}

注1 解凍後は冷蔵庫で約1か月保管可能であるが、製品開封後の長期保管は避け、早期に使用することが推奨される。

注2 凍結融解の繰り返しを避けるため、初回の解凍時に予め密閉容器へ小分けにして冷凍庫で保管しても良い。

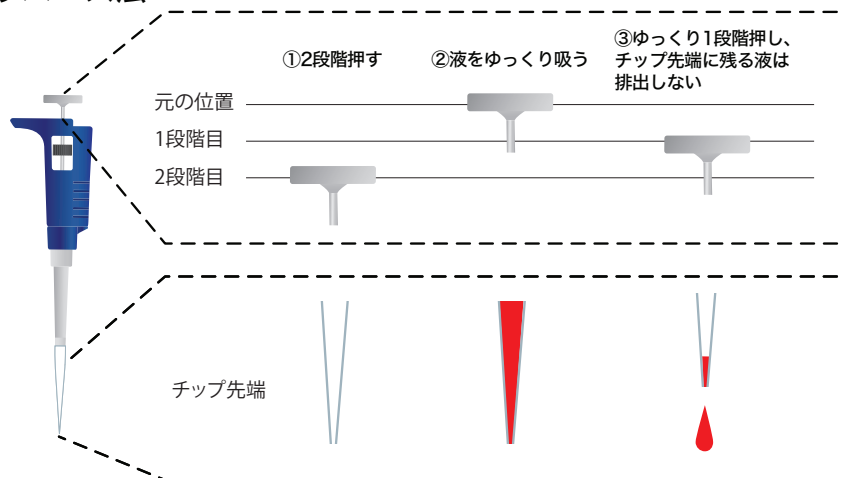
(2) 冷蔵温度よりも高い温度環境で製品を取り扱う際は、必ず氷上等で冷却しながら使用する。^{注3}

注3 液温度が上昇することで製品中のコラーゲンの線維化が起こり、ゲル化が進むため、温度管理に注意する。

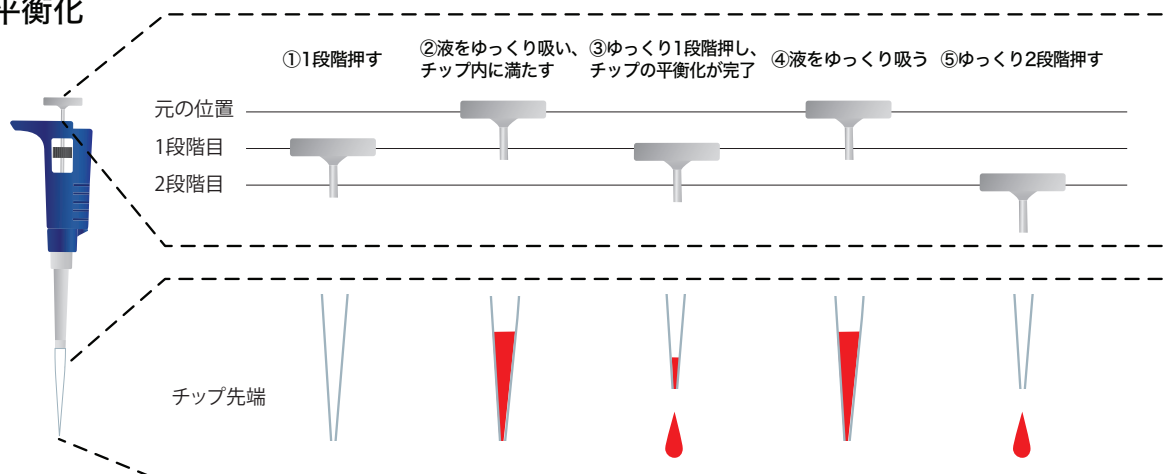
(3) 製品は粘性が高く、チップ内部や容器等に付着して液量のロスが生じるため、以下に示すリバース法でゆっくりピペティングし、溶液を出してから数秒待つとロスが少なくなる。^{注4}

注4 フィルター付きチップの場合は、設定容量が大きいとチップ内のフィルターに溶液がつく恐れがあるため、リバース法の代わりに平衡化が推奨される。

リバース法



平衡化



コラーゲンゲル内培養

- (1) ディッシュやマルチウェルプレートで培養した細胞を酵素処理等によって回収し、細胞懸濁液中の細胞数を計測する。
- (2) 必要な細胞数を分取、遠心し、細胞ペレット又は細胞懸濁液を調整する。^{注1,2}
 - 注1 実験の目的や期間にもよるが、細胞数は $1.0\sim 3.0\times 10^4$ cells/mL程度から条件検討をすることが推奨される。
 - 注2 細胞懸濁液を用いる場合には、希釈されてコラーゲン濃度が低下するため、製品の1/10量以下が望ましい。
- (3) 製品を添加し、ピペティングによりよく混合する。
- (4) マルチウェルプレートなどの培養容器に分注し^{注3}、素早く37°Cに設定したインキュベーターに入れる。
 - 注3 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(96wellプレートであれば50-100 μ L)。
- (5) 2時間後、ゲルが形成されていることを確認し^{注4}、血清入りの液体培地を添加して培養を行う。^{注5,6}
 - 注4 コラーゲンゲルは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ゲ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。
 - 注5 平面培養で使用する培地量と同程度(96wellプレートで100-200 μ L)の液体培地を添加する。培養が進むと、平面培養と比較して細胞数が多くなるため、頻繁な培地交換が必要になる。
 - 注6 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。ゲル化後に添加した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。

RNA回収

必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出薬もしくはキット^{注1,2,3}
 - 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。
 - 注2 カラムタイプのキットではコラーゲンゲル由来のコラーゲン線維がカラムに詰まり、収量が低いことがある。その場合、フェノール系抽出液で抽出し、クロロホルムで分離した後、回収した水相を用いてカラムタイプのキットの取扱説明書に従い、RNAを精製するとRNA収量が安定することがある。
 - 注3 DNase処理によってRNA収量が下がることもあるため、実験の目的に応じて要否を判断する。

手順

- (1) コラーゲンゲル上の液体培地を除去する。
- (2) コラーゲンゲル量に鑑みて、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取扱説明書参照。

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) コラーゲンゲ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) コラーゲンゲ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、コラーゲンゲルに対して十分量のスクロース溶液を用いる。
- (4) コラーゲンゲルが沈むまで、ローテーター等を用いてコラーゲンゲ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) コラーゲンゲルを取り出し、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 コラーゲンゲ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。

3D Readyアテロコラーゲンラインナップ

製品番号	製品	包装
3D-LG01	3D Readyアテロコラーゲン DMEM-LG1 無菌 3D Ready Atelocollagen DMEM-LG1 (Low Glucose)	12mL/本
3D-LG05	3D Readyアテロコラーゲン DMEM-LG5 無菌 3D Ready Atelocollagen DMEM-LG5 (Low Glucose)	12mL/本×5本
3D-HG01	3D Readyアテロコラーゲン DMEM-HG1 無菌 3D Ready Atelocollagen DMEM-HG1 (High Glucose)	12mL/本
3D-HG05	3D Readyアテロコラーゲン DMEM-HG5 無菌 3D Ready Atelocollagen DMEM-HG5 (High Glucose)	12mL/本×5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/12>

