

## 保管方法

### 冷凍 (-20℃) 注1,2

- 注1 使用時は冷凍庫から取り出した後、室温に戻してから開封し、すぐに使用する。  
 注2 コラーゲン膜の強度低下や孔が生じる恐れがあるので、本製品を緩衝能の無い精製水などに浸すことは避ける。

## 透過性コラーゲン膜 (MEN-01) への細胞播種

### A. コラーゲン膜の片面のみに細胞を播種する場合

- (1) 50mmディッシュ内に8mL、膜上に2mLの培地を加え、膜を室温で5分以上浸す。注1,2,3

注1 膜の下に気泡がある場合はディッシュを傾げるかピンセットやピペットチップなどを用いてMEN-01を上下させて気泡を抜く。

注2 膜の弛みを軽減するため、先にディッシュ内に培地を添加する。

注3 この操作を行うことで膜を中和する。膜が中和されると培地がピンク色から黄色へ変化する。



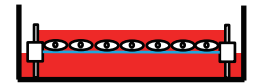
- (2) (1) で用いた培地を除去した後、ディッシュ内に8mL、膜上に1mLの培地を加える。



- (3) 膜上に細胞懸濁液1mLを添加する。

膜への播種細胞数目安： $1 \times 10^5$  cells<sup>注4</sup> (培養面積8.0cm<sup>2</sup>)

注4 上記は一例として線維芽細胞を用いた場合の数値で、最適な播種細胞数は細胞種や実験の目的によって調整する。



### B. コラーゲン膜の両面に細胞を播種する場合

- (1) Aと同様にコラーゲン膜を培地に浸し、その培地を除去した後、細胞を播種する。注5

注5 播種細胞数はAの(3)を参考にする。



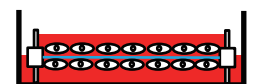
- (2) インキュベーターで細胞が接着するまで数時間ほど培養した後、培地を除去し、ピンセットを用いてMEN-01を裏返す。



- (3) ディッシュ内に8mL、膜上に1mLの培地を加える。



- (4) コラーゲン膜上に細胞懸濁液1mLを添加する。注5



## 透過性コラーゲン膜（CM-6、CM-24）への細胞播種

### A. コラーゲン膜の片面のみに細胞を播種する場合

- (1) ウェル内および膜上に培地を加え、膜を室温で5分以上浸す。<sup>注1,2</sup>

CM-6：ウェル内2,000 $\mu$ L、膜上1,000 $\mu$ L

CM-24：ウェル内500 $\mu$ L、膜上200 $\mu$ L

注1 膜の弛みを軽減するため、先にウェル内に培地を添加する。

注2 この操作を行うことで膜を中和する。膜が中和されると培地がピンク色から黄色へ変化する。



- (2) (1) で用いた培地を除去し、コラーゲン膜が浸るよう培地をウェル内に添加する。

CM-6：2,000 $\mu$ L、CM-24：500 $\mu$ L



- (3) コラーゲン膜上に細胞懸濁液を添加する。

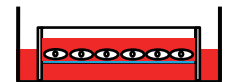
CM-6：1,000 $\mu$ L、CM-24：200 $\mu$ L

膜への播種細胞数目安（培養面積）

CM-6： $7 \times 10^4$  cells<sup>注3</sup>（5.3 cm<sup>2</sup>）

CM-24： $1 \times 10^4$  cells<sup>注3</sup>（0.64 cm<sup>2</sup>）

注3 上記は一例として線維芽細胞を用いた場合の数値で、最適な播種細胞数は細胞種や実験の目的によって調整する。



### B. コラーゲン膜の両面に細胞を播種する場合

- (1) Aと同様にコラーゲン膜を培地に浸す。



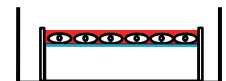
- (2) (1) で用いた培地を除去し、CM-6/CM-24を上下反対にしてウェル内へ配置する。



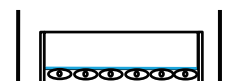
- (3) コラーゲン膜の裏面に細胞懸濁液を添加する。<sup>注4</sup>

CM-6：200 $\mu$ L、CM-24：50 $\mu$ L

注4 播種細胞数はAの(3)を参考にする。

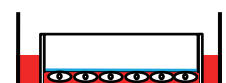


- (4) インキュベーターで細胞が接着するまで数時間ほど培養した後、ピンセットを用いてCM-6/CM-24を裏返す。



- (5) コラーゲン膜が浸るよう培地をウェル内に添加する。

CM-6：2,000 $\mu$ L、CM-24：500 $\mu$ L



- (6) コラーゲン膜の表面に細胞懸濁液を添加する。<sup>注4</sup>

CM-6：1,000 $\mu$ L、CM-24：200 $\mu$ L



## 細胞回収

### 必要な試薬

- ① PBS (-)
- ② トリプシン溶液 (0.05% トリプシン/EDTAなど)

### 手順

- (1) コラーゲン膜上下の培地を除去する。
- (2) Caを含まないPBS (-) などの緩衝液を添加し、洗浄後除去する。
- (3) トリプシン溶液を適量添加し、2~3分間37°Cでインキュベートする。<sup>注1</sup>

酵素液量目安 MEN-01 : 2,000 $\mu$ L

CM-6 : 1,500 $\mu$ L

CM-24 : 100 $\mu$ L

注1 ご使用の細胞によって、酵素液や処理時間をご検討ください。

- (4) 緩衝液等でピペティングして細胞を回収する。

## RNA回収

### 必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出試薬もしくはキット

### 手順

- (1) コラーゲン膜上下の培地を除去する。
- (2) コラーゲン膜上の培養面積に鑑みて、市販のRNA抽出試薬などを添加し、ピペティングしてRNAを回収する。<sup>注1</sup>

培養面積 MEN-01 : 8.0 cm<sup>2</sup>

CM-6 : 5.3 cm<sup>2</sup>

CM-24 : 0.64 cm<sup>2</sup>

注1 下の写真のように膜裏面からのRNA回収も可能です。培養が進むと膜が弛み、しわが生じます。

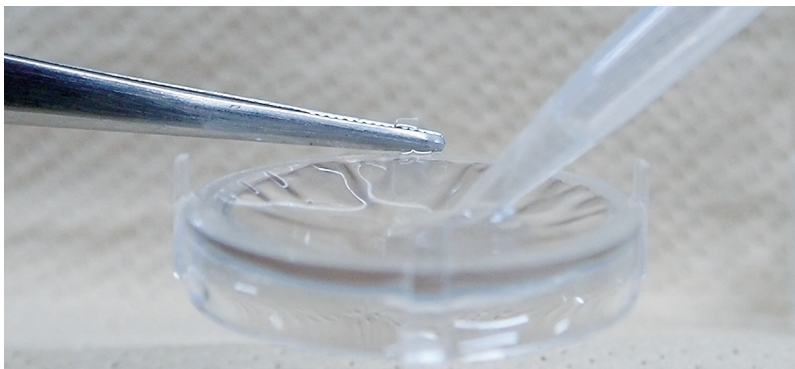


写真 CM-6裏面でのピペティングの様子

## 切片作製

---

フレームからコラーゲン膜を切り出した後、凍結切片やパラフィン切片を作製した事例があります。膜の断面を観察する場合には粘着フィルム法（川本法）が有効な場合があります。

## 組織学的評価

---

### 必要な機器および試薬

- ① 固定液（4%パラホルムアルデヒドなど）
- ② TBS-T(Tris Buffered Saline + 0.05% Tween20)
- ③ 市販のブロッキング剤など
- ④ PBS
- ⑤ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑥ 核染色液<sup>注1</sup>

注1 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) 培地を除去した後、4%PFAを膜上下に添加して4℃で一晩固定する。<sup>注2</sup>  
注2 両面培養の場合、フレームからメスなどで膜を切り取ると、使用する液量が少量で済む。
- (2) PBSで1回洗浄する。
- (3) PBSを除去し、TBS-Tを加えて15分間静置する。
- (4) TBS-Tを除去し、ブロッキング剤を200μL入れ、室温で1時間静置する。
- (5) ブロッキング剤を含むTBS-Tで希釈した一次抗体液を100μL添加して4℃で一晩インキュベートする。
- (6) 一次抗体液を除去し、TBS-Tで3回洗浄する。
- (7) ブロッキング剤を含むTBS-Tで希釈した二次抗体液を100μL添加し、遮光して室温で3時間インキュベートする。
- (8) 二次抗体液を除去し、TBS-Tで3回洗浄したのちに、PBSに置換する。
- (9) 核染色液をPBSで希釈した溶液を200μL添加し、遮光して室温で15分間インキュベートする。
- (10) 核染色液を除去し、PBSで1回洗浄する。
- (11) スライドガラスに封入剤を用いて封入し、遮光にて4℃で一晩乾燥させた後、観察する。

## 透過性コラーゲン膜ラインナップ

製品番号	製品	サイズ	包装
MEN-01	透過性コラーゲン膜50mmディッシュ用 無菌 Atelocollagen, Permeable Membrane for 50 mm Culture Dish	製品：φ45mm×10mm 膜：φ32mm 膜厚：25μm	5個/箱
CM-6	透過性コラーゲン膜6wellプレート用 無菌 Atelocollagen, Permeable Membrane for 6-well Culture Plate	製品：φ31mm×8mm 膜：φ26mm 膜厚：25μm	12個/箱
CM-24	透過性コラーゲン膜24wellプレート用 無菌 Atelocollagen, Permeable Membrane for 24-well Culture Plate	製品：φ14mm×8mm 膜：φ9mm 膜厚：25μm	24個/箱
CLF-01	研究用コラーゲン膜 Atelocollagen Membrane	膜：100mm×90mm 膜厚：35μm	1枚/箱

### 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/07>

