

コラーゲンスポンジハニカム(CSH-10)を使用する場合は、スポンジ体積がハニカムディスク96の約3分の1(4ページ参照)であることを考慮して試薬や細胞の量を調整し、以下のハニカムディスク96の使用方法を参考にお取り扱いください。

保管方法

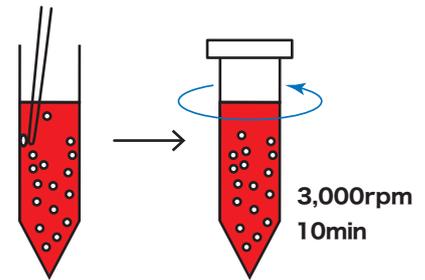
常温

脱泡

注1 湿度が低いとハニカムを容器から取り出す際、静電気が生じてスポンジが扱いにくいいため、徐電器(イオナイザー)の使用を推奨する。

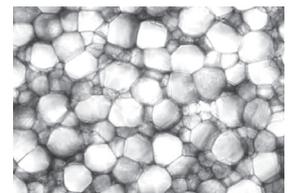
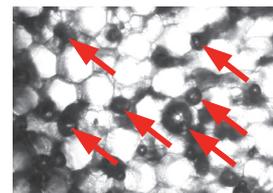
注2 乾燥状態のハニカムに直接細胞を播種することもできるが、スポンジ内に気泡が残り、細胞播種の妨げになる恐れがある。

- (1) ハニカムを培地またはPBSに浸し、ピンセットやピペットを用いてハニカムを軽く潰す。
- (2) 3,000 rpm (1,500×g)、10分にて遠心脱泡する。



脱泡前のハニカム

脱泡後のハニカム



赤矢印(←):気泡

細胞播種

- (1) 脱泡したハニカムを滅菌ガーゼを使うなどして、出来るだけ脱泡したハニカムの水分を除いた後に培養プレートに入れる。
- (2) ハニカム上部よりゆっくりと細胞懸濁液^{注1}を滴下する。

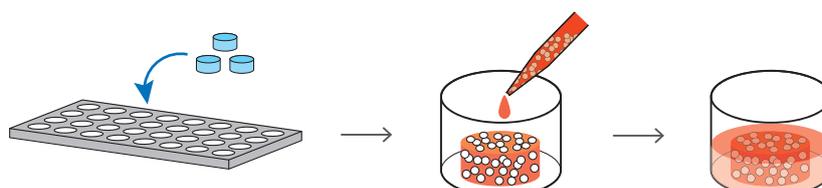
播種細胞数目安 2×10^5 cells / 80 μ L / ハニカム1個^{注2}

注1 細胞接着率を向上させるためには、高濃度のコラーゲン含有培地(3D Ready アテロコラーゲンなど)を使用すると良い。

注2 最適な播種細胞数は細胞の種類によって異なり、上記は一例として肝がん細胞を用いた場合の数値。

- (3) ハニカムに細胞を接着させるため、4時間程度インキュベートした後、ハニカムが十分浸るように培地を加える。

培地量目安 24 well plate : 500 μ L
 96 well plate : 150 μ L



細胞回収

トリプシンを用いて細胞を回収することもできるが、収率は低いため、全細胞を回収する必要がある場合は、コラゲナーゼを使用する方法を推奨する。

必要な試薬

- ① 0.1%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ール参照。

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。

96 well plate使用時の手順

- (1) PBSで洗浄する。
- (2) 出来るだけ溶液を持ち込まないようにハニカムをピンセットで新しいウェルへ移す。
- (3) 0.1%コラゲナーゼ溶液を150 μ L添加し、37 $^{\circ}$ 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。)
- (4) ハニカムが溶解したことを確認したのち、溶解液をマイクロチューブに移す。
- (5) 遠心し上清を除去する。
- (6) PBSを適量加え懸濁する。再度遠心し上清を除去する。
- (7) (6) の作業を3~5回繰り返し、コラゲナーゼを除去する。

RNA回収

コラーゲンならではの注意点はないため、市販のRNA抽出試薬やキットの取扱説明書に従い、RNAを抽出する。

(当社では、市販のRNA抽出液中で培養後のハニカムをチップ先で押し潰しながらよく混合後、溶解されずに残ったハニカムを遠心して沈降させ、その上清からRNAを抽出しています。)

切片作製

パラフィン切片や凍結切片の作製、およびビブラトーム(マイクロスライサー)で薄切事例がある。

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
- ③ 凍結切片作製用包埋剤 (O.C.T.compound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 0.1%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^{注2}

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 μ 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を用いて4 $^{\circ}$ Cで4時間固定する。
- (2) 30%スクロース溶液に一晩浸漬する。^{注3}

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) クライオスタットを用いて薄切し、スライドガラスに貼付して切片を作製する。
- (5) PBSに0.1%TritonX-100やブロッキング剤を添加した溶液へ30分間浸漬し、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 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬する。
- (7) PBSなどで3回洗浄する。
- (8) 二次抗体液に室温で1時間浸漬する。
- (9) PBSなどで洗浄後、核染色する。

コラーゲンスポンジ ハニカムラインナップ

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 ² /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
3D-HCB	3DハニカムBoosted 無菌 3D Honeycomb Boosted ※本書とは別に取扱説明書がございます。	φ5×5mm	100~300μm	25個/本

関連製品

コラーゲン含有培地

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-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-LG,3D-HG には 5 本入りの用意もございます。

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/02>

