

## 保管方法

常温

## 細胞播種

### A. 通常の細胞播種

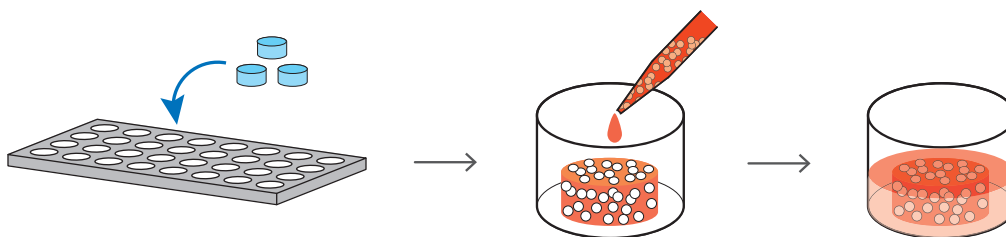
- (1) 96wellプレート等にマイティ어を入れる。
- (2) 50 $\mu$ Lの細胞懸濁液をゆっくりと滴下する。

播種細胞数目安  $5 \times 10^4$  cells<sup>注1</sup>

注1 例として前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた場合の数値で、最適な播種細胞数は細胞の種類によって異なる。

- (3) マイティ어に細胞を接着させるため、2時間程度インキュベートした後、マイティ어가十分に浸るよう培地を加える。

培地量目安 100 $\mu$ L (96 well plateの場合)



### B. スポンジ内への均等な細胞播種

(力学刺激培養などスポンジ内の細胞の均一性が重要な場合はコラーゲン含有培地を併用する。)

- (1) 96wellプレートにマイティ어を入れる。
- (2) コラーゲン含有培地<sup>注1,2</sup>で調製した100 $\mu$ Lの細胞懸濁液を加える。

播種細胞数目安  $5 \times 10^4$  cells<sup>注3</sup>

注1 コラーゲン含有培地は 3D Ready アテロコラーゲン(最終ページ参照)を使用することができる。

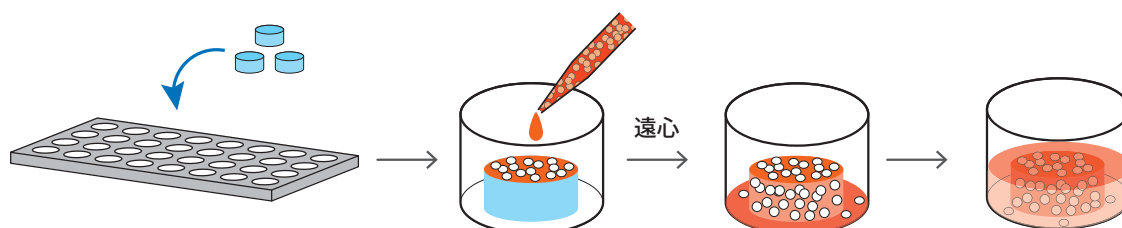
注2 コラーゲン含有培地を用いることにより、マイティ어全体へ均一に細胞を播種し易くなる。

また、力学刺激培養などのマイティ어に過度の圧力を加える評価を行う場合、マイティ어의崩壊を防ぐとともに細胞に均等な圧力が加わり易くなる。

注3 一例として前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた場合の数値で、最適な播種細胞数は細胞の種類によって異なる。

- (3) プレートごと500 $\times$ gで1~5分間遠心する。
- (4) 2時間程度インキュベートした後、マイティ어가十分に浸るよう培地を加える。

培地量目安 50 $\mu$ L



## DNA量に基づいた細胞増殖評価

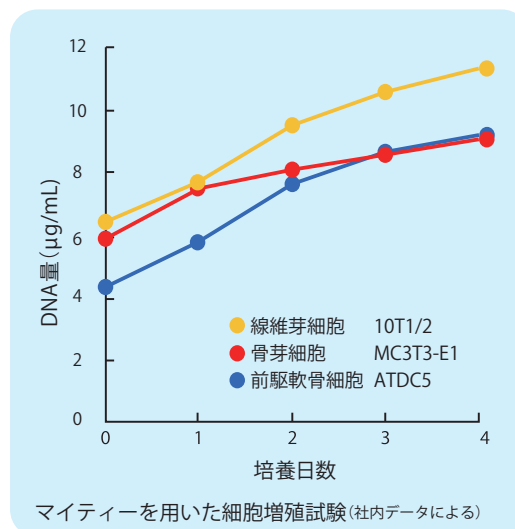
細胞を生きた状態で回収することは困難なため、細胞数はDNA量を指標に測定する。

### 必要な機器および試薬

- ① 組織破砕機
- ② 市販のDNA定量キット

### 手順

- (1) 培養後のマイティ어를破碎する。  
 破碎例 2mL マイクロチューブにマイティ어、細胞溶解液 300 $\mu$ L、  
 さらにジルコニアビーズ( $\phi$ 7 mm) 1個を加え、ビーズ式破砕機  
 にて破碎する (Frequency 25/s、1分間、常温)。
- (2) 遠心後の上清を用いて、市販のDNA定量キット等を用いてDNA量を測定する。



## RNA回収

### 必要な試薬

- ① ガーゼもしくはキムワイブ
- ② PBS
- ③ マイクロチューブ
- ④ 市販のRNA抽出液 (TRIzol™ など) もしくはキット<sup>注1</sup>  
 注1 一部のフェノールおよびグアニジン塩酸塩から構成されているRNA抽出  
 試薬の場合、RNAだけでなくDNAやタンパク質も抽出できる。

### 手順

- (1) ピンセットを用いて、ガーゼの上に培養後のスポンジを置いて余剰な培地を吸い取り、新しいウェルに入れる。
- (2) スポンジが入ったウェルにPBSを添加した後、すぐに再びガーゼの上に置き余剰な水分を吸い取ってマイクロチューブに入れる。
- (3) RNA抽出試薬を添加し、チップ先でスポンジを押し潰しながら混合する。  
 下の写真のようにグアニジン塩酸塩を含むRNA抽出液の場合、スポンジの大半は溶解する。



- (4) 溶解されずに残ったスポンジをスピンドウンして沈降させ、上清を回収する。
- (5) 以降は、市販のRNA抽出試薬やキットの取扱説明書に従い、上清からRNAを抽出する。

## 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
- 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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。

## コラーゲンスポンジ マイティーマイティラインナップ

製品	サイズ	製品番号	包装
コラーゲンスポンジ マイティーマイティ 無菌 Atelocollagen Sponge, MIGHTY	φ5×3mm	CSM-25	25個/本
		CSM-50	50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-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 (Low Glucose)	12mL/本
3D-HG05	3D ReadyアテロコラーゲンDMEM-HG5 無菌 3D Ready Atelocollagen DMEM-HG5 (Low 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/03>

