保管方法

冷蔵（2～10℃）【冷凍禁止】

コラーゲン ミクロスフェアの取り扱い

ミクロスフェアは疎水度が高いプラスチック製のチューブやチップに付着してしまい、ロスが生じやすいため、親水性ポリマーでコーティングされたタンパク低吸着タイプを使用すると良い
(例：eppendorf 社製 Protein LoBind シリーズなど)。

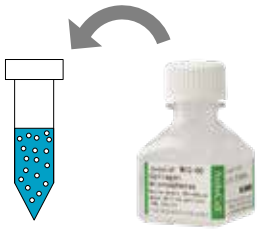
事前準備 (製品1本分の溶媒を培地に置換する場合)

A. 遠心管を使用する場合

必要な器具および試薬

① 50mL遠心管
② 培地

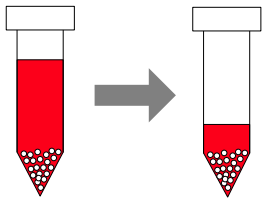
手順



（1） 製品全量[注1] を 50mL 遠心管に入れる。

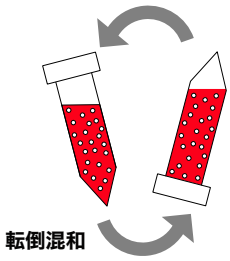
注 1　当製品にはミクロスフェアが 15mL、溶媒 (PBS) を含めると 25mL入っている。

（2） 製品ボトルに残るミクスフェアを移すため、製品ボトルに 8mL 程度培地を入れ、懸濁して遠沈管に移す作業を 3 回繰り返す。



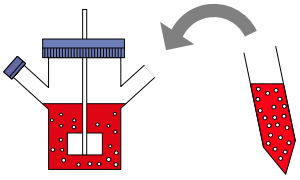
(3) 500×g で 5 分間、25℃で遠心し[注2,3]、上清を 30mL 除去する。[注4]

注 2　静置して沈降させても良い。
注 3　遠心機の急激な減速により、遠心して沈降したミクロスフェアが舞い上がることがあるため、減速設定を緩やかにすると良い。
注 4　上清を除去する際の少しの水流でもミクロスフェアが舞い上がることがあるため、上清を 10mL 程度残すほうがミクロスフェアをロスしにくい。



(4) 培地 30mL を入れ、ゆるやかに転倒混和する。

(5) (3)～(4) の操作を 2 回繰り返す。



(6) 培地に懸濁したミクロスフェアをスピナーフラスコやバイオリアクターなどの培養容器へ移す。

B. スピナーフラスコを使用する場合

以降は 125mL 容量 (最大ワーキングボリューム 75mL) の場合の手順を示す。

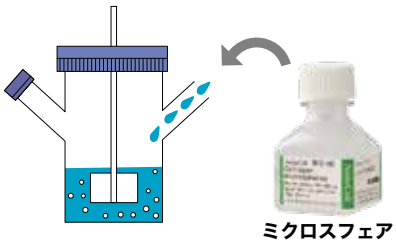
必要な器具および試薬

① スピナーフラスコ[注1]　125mL 容量

② 培地

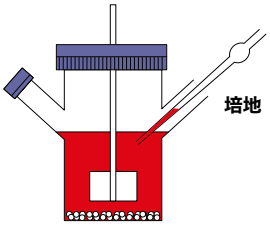
注 1　ピペットでのアクセスを考慮して、適切なアーム形状のスピナーフラスコを選択する。

手順

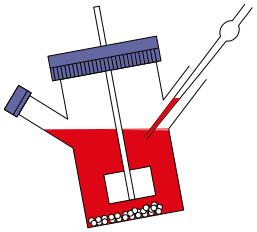


(1)　製品全量[注2] をスピナーフラスコに入れる。

注 2　当製品にはミクロスフェアが 15mL、溶媒 (PBS) を含めると 25mL入っている。

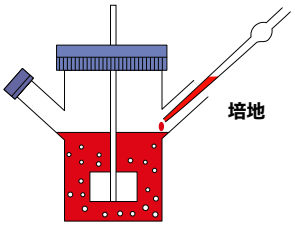


(2)　製品ボトルに残るミクロスフェアを移すため、製品ボトルに培地 25mL 入れ、スピナーフラスコに移す操作を 3 回繰り返す。ここで、スピナーフラスコ内の液量が 100mL になる。



(3)　ミクロスフェアが沈むまで 30 分程度待って上清を 50mL 抜き取る[注3]。

注 3　スピナーフラスコのアームの形状によっては、上清を抜き取りにくいことがある。上清を除去する際の少しの水流でもミクロスフェアが舞い上がることがあるため、上清を 30mL 程度残すほうがミクロスフェアをロスしにくい。



(4) 培地 50mL を入れ、軽く混合する。

(5)　(3)～(4) の操作をもう一度繰り返し、最後に (3) の操作を行う。[注4]

注 4　使用するミクロスフェアが製品 1 本 (15mL) よりも多い場合は十分に培地に置き換わるまで、(3)～(4) の操作回数を増やす。

スピナーフラスコを使用した培養

必要な機器および試薬

① スピナーフラスコ

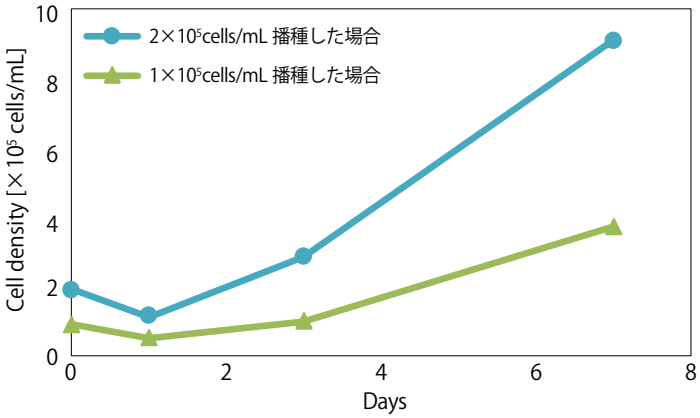
② スターラーやインキュベーターなどの撹拌・培養装置

I. 細胞播種および培養

(1)　前項で準備したミクロスフェアを懸濁した培地を37℃に温めた後、細胞懸濁液を加え、すぐにミクロスフェアと細胞が一様に分散するように撹拌する。

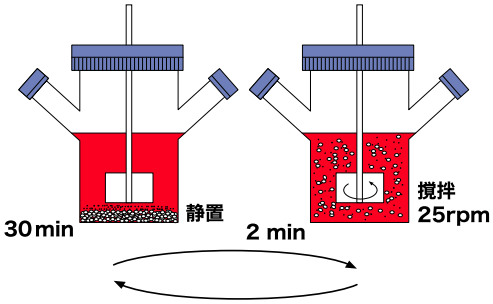
播種細胞数目安：1×10^7 cells[注1]/ 50 mL-培地(15 mLミクロスフェアを含む)

注 1　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。記載条件で線維芽細胞を培養すると右図のような細胞増殖が見られる（社内データ）。



(2)　30分静置後、25rpmで2分撹拌し、再び30分間静置する。この操作を12回(6時間)繰り返す。その後は25rpmで撹拌し続け、培養[注2]する。

注 2　フラスコ内の細胞数が増すに従って撹拌速度を徐々に上げる。細胞によるミクロスフェア間のブリッジ形成を抑制し、細胞の増殖が阻害されることを防ぐ。ただし、撹拌速度が速すぎると細胞に対するダメージが高くなるため、注意する。

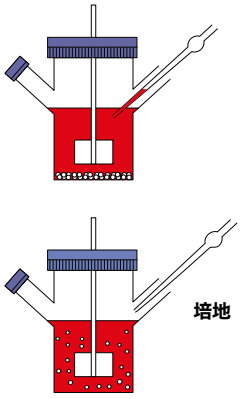


II. 培地交換 [注3]

(1)　撹拌を止め、ミクロスフェアを沈めた後に上清を抜き取る。

(2)　新しい培地を加える。

注 3　培地は通常、週に 2〜3 回交換する。フラスコ内の細胞数が増すに従って培地交換の回数を増やす (pH 指示薬の色の変化も参考にする)。



事前準備およびディッシュを使用した培養(小スケールの場合)

必要な器具および機器

① 低接着表面の細胞培養用35mmディッシュ

② 卓上小型振とう機（波動型揺動タイプ）

手順

（1）ミクロスフェアを均一に分散させた製品から300 μLをマイクロチューブに分取し、遠心して上清を除去する。

（2）培地を添加して、再び遠心して上清を除去する。

（3）培地300μLに懸濁し、浸漬する。例）4℃で一晩浸漬する。

（4）低接着表面の35 mmディッシュへ培地に懸濁したミクロスフェア300μL、および細胞懸濁液300μLを添加して軽く混合後、インキュベーター内で30分間静置する。

播種細胞数目安：1×10^5 cells / 300μL-ミクロスフェア

（5）卓上小型振とう機を用いて、ディッシュを2分間振とうした後、30分程度静置する。

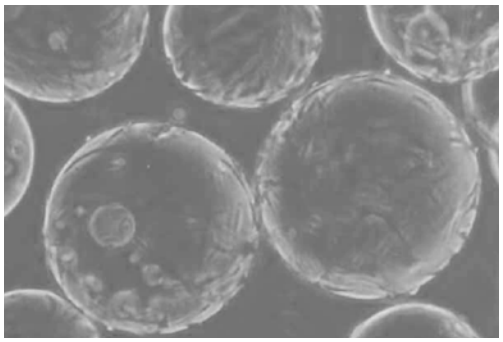
振とう条件目安：傾斜角度 6度、回転数 10rpm

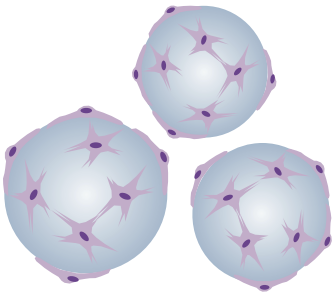
（6）（5）の操作を8回繰り返し、ミクロスフェアに細胞を接着させる。

（7）培地を1.5 mL追加し、ディッシュを振とうしながら培養する。

振とう条件目安：傾斜角度 6度、回転数 15 rpm

（8）培地交換は、ディッシュを静置してミクロスフェアを沈降させ、上清の半量を交換する。





ミクロスフェア表面に接着した細胞の位相差顕微鏡写真（左）とイメージ図（右）

（細胞はミクロスフェア表面に接着し、その様子は位相差顕微鏡で観察できる。）

細胞回収

A. コラゲナーゼを使用する場合

試薬

① 0.2%コラゲナーゼ溶液 注1

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を参照。
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）ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。

（2）コラゲナーゼの最終濃度が0.1%になるように、同量の0.2%コラゲナーゼ溶液を添加し、37℃でインキュベートする。注2

注 2　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、30 ～ 60 分程度で溶解する。

（3）ミクロスフェアが溶解したことを確認したのち、遠心し上清を除去する。

（4）細胞を十分に懸濁できる程度のPBSを加えて混合し、再度遠心して上清を除去する。

（5）（4）の作業を3～5回繰り返し、コラゲナーゼを除去する。

B. トリプシンを使用する場合 注3

注3　コラーゲンへの接着性が高い細胞種は剥がれにくい場合があるので、コラゲナーゼを使用する方法が良い。

試薬

① PBS

② トリプシン溶液（0.5%トリプシン溶液など）

③ セルストレーナー（メッシュサイズ：40, 100μm）

手順

（1）ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収し、遠心して上清を除去する。

（2）PBSを添加して洗浄し、再び遠心して上清を除去する。

（3）トリプシン溶液を添加し、37℃で15分間インキュベートする。注4

注 4　使用する細胞によって、酵素液や処理時間を検討する。

（4）培地を添加して懸濁する。

（5）100μmおよび40μmメッシュの順にセルストレーナーでろ過してミクロスフェアを除き、細胞を回収する。

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]

注 1　フェノール抽出試薬やスピンカラム法での回収事例がある。

手順

（1）ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。

（2）遠心し、上清を除去する。

（3）以降は、RNA抽出薬やキットの取扱説明書に従ってRNAを回収する。

組織学的評価

必要な試薬

① 4%パラホルムアルデヒド（PFA）

② 0.2%TritonX-100

③ Bovine serum albumin（BSA）

④ PBS

⑤ 各種一次抗体、二次抗体

⑥ 核染色液 [注1]

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）ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。

（2）遠心し、上清を除去する。

（3）ミクロスフェアに4%PFAを添加し、固定する。

（4）PBSで洗浄後、0.2%TritonX-100を用いて透過処理を行う。

（5）0.1%BSAを含む一次抗体液に4℃で16時間浸漬する。

（6）PBSで洗浄後、二次抗体液に室温で1時間浸漬する。

（7）PBSで洗浄後、核染色を行う。

コラーゲン ミクロスフェアラインナップ

製品番号	製品	仕様	包装
MIC-00	コラーゲン ミクロスフェア　無菌 Atelocollagen Microspheres	粒子数：約300万粒/15mL 表面積：約3,800cm^2 /15mL 粒子径：φ100～400μm	15 mL / 本※ ※溶媒(PBS)を含めた全量は25mL

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/05

© 2024 KOKEN CO., LTD.