

## I. 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：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。

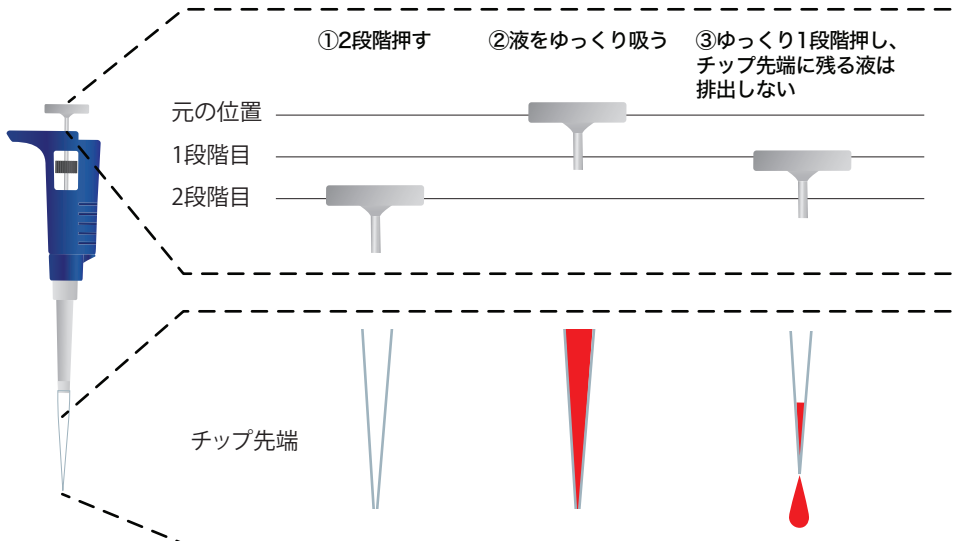
- (2) 冷蔵温度よりも高い温度環境で製品を取り扱う際は、必ず氷上等で冷却しながら使用する。

注3：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。

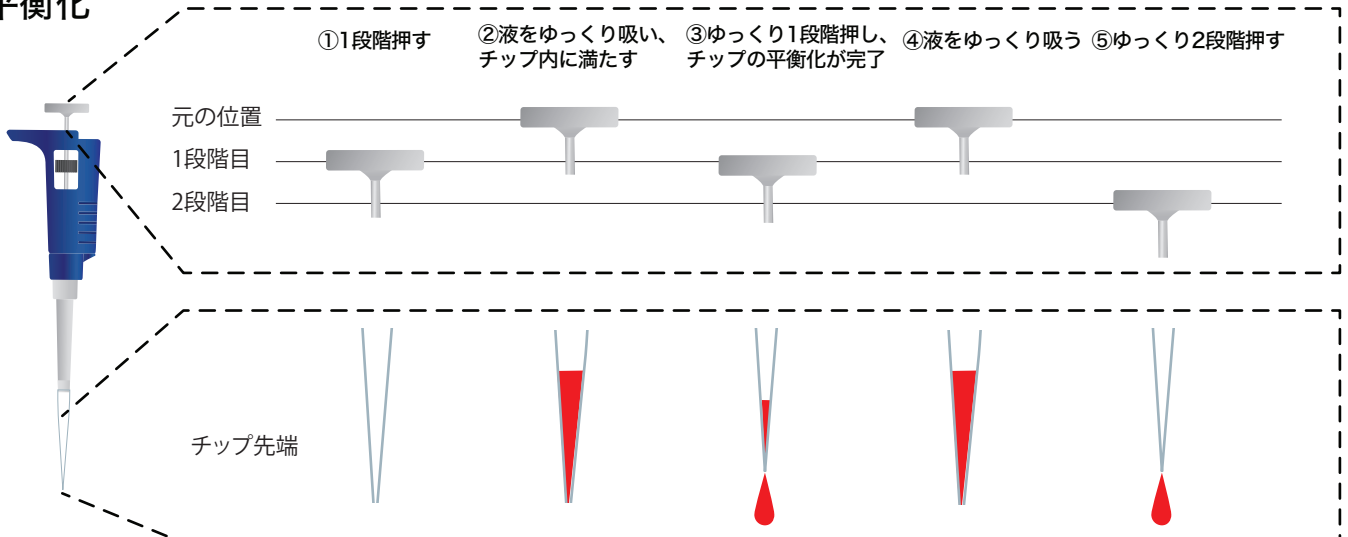
- (3) 製品は粘性が高く、チップ内部に付着して液量のロスが生じるため、以下に示すリバーズ法でゆっくりピペティングし、溶液を出してから数秒待つとロスが少なくなる。

注4：フィルター付きチップを使用する場合は、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、リバーズ法の代わりに平衡化が推奨される。

### リバーズ法



### 平衡化



## II. 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製する。

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、ピペッティングによりよく混合する。

注3：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。ゲル化後に添加する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。

(4) マルチウェルプレートなどの培養容器に分注し、素早く37°Cに設定したインキュベーターに入れる。

注4：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  $\mu$ L)。

(5) 2時間後、ゲルが形成されていることを確認し、血清入りの液体培地を添加して培養を行う。

注5：製品は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6：平面培養で使用する培地量と同程度(96wellプレートで100-200  $\mu$ 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。

## III. コラーゲンゲルからのRNA回収

---

(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。

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においてそれぞれ高い傾向が認められた。

## IV. コラーゲングルからの凍結切片作製

- (1) コラーゲング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) コラーゲングルを培養容器から薬さじなどで取り出し、30% (w/v) Sucrose溶液 (in phosphate buffer, pH7.4)中に移す。  
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、コラーゲングルに対して十分量のsucrose溶液を用いる。
- (4) コラーゲングルが沈むまで、ローター等を用いてコラーゲングルとsucrose溶液を4℃で混和する。  
注2：必要に応じてsucrose溶液を交換するなどして、しっかりとゲル内の水分をsucrose溶液に置換する。
- (5) コラーゲングルを取り出し、キムワイプなどで軽くsucrose溶液を除き、凍結切片作製用包埋剤 (O.C.T. compoundなど) 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：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。
- (8) 作製した切片は、シリカゲルを入れた容器内に入れ、遮光して4℃で保存する。

## V. 切片作製後の免疫組織染色

- (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1：コラーゲング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。洗浄しきれてい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 (Tris Buffered Saline + 0.05% Tween20) 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2：注1と同じ。
- (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3：注1と同じ。
- (9) PBSで洗浄後、PBSで希釈したDAPIなどで核染色を行う。
- (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：注1と同じ。
- (11) 退色防止剤入りの封入剤で封入する。