

## 保管方法

---

アルミ袋に入った状態で室温保管する。<sup>注1</sup>

注1 加湿後に再乾燥するとコラーゲン線維構造が変化し、透過性が低下するため、加湿される条件を避ける。

## 対応する24wellプレート

---

インサートは製品添付の24wellプレート（IWAKI、製品番号：3820-024）のwell径に最適化されているが、各社から市販されている24wellプレートにも使用可能である。<sup>注1</sup>

注1 一部の海外製の24wellプレートはwellにバリがあり、インサートをセットするとインサートの傾きが生じることやプレートの蓋が閉まらないこともあり得る。

## 細胞播種

---

(1) Well内に600 $\mu$ L インサート内に100 $\mu$ Lの培地を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に30分以上静置してインサートを平衡化する。

(2) Well内とインサート内の培地を除く。<sup>注1,2</sup>

注1 Well内の培地はパスツールピペットで除き、インサート内の培地はマイクロピペットを使用して慎重に除くなどして、培地を除くときに膜を破かないように注意する。

注2 フレームに培地交換用の孔が2つあり、インサートを取り外さなくても孔を通してwell内の培地にアクセスして除去できる。

(3) Well内に新しい培地を600 $\mu$ L加える。<sup>注3</sup>

注3 共培養する場合は、well内に1種類目の細胞懸濁液600 $\mu$ Lを入れる。

(4) インサート内に細胞懸濁液を100 $\mu$ L加える。

膜への播種細胞数目安：1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells<sup>注4</sup>（培養面積0.33cm<sup>2</sup>）

注4 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の種類によって異なる。

(5) CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて培養する。

## 培地交換

---

(1) Well内とインサート内の培地を除く。<sup>注1,2</sup>

注1 Well内の培地はパスツールピペットで除き、インサート内の培地はマイクロピペットを使用して慎重に除くなどして、培地を除くときに膜を破かないように注意する。

注2 フレームに培地交換用の孔が2つあり、インサートを取り外さなくても孔を通してwell内の培地にアクセスして除去できる。

(2) インサート内に新しい培地を100 $\mu$ L加える。

(3) 続いてwell内に新しい培地を600 $\mu$ L加える。

(4) CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて培養する。

## 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) Well内とインサート内の培地を除去する。
- (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100 $\mu$ L添加し、2分間程度インキュベートする。<sup>注1</sup>  
注1 ご使用の細胞によって、酵素液や処理時間をご確認ください。
- (4) 緩衝液等でピペッティングして細胞を回収する。

## 生細胞数測定

---

市販の生細胞数測定キット (WST-8など) を使用して、測定可能。

## RNA抽出

---

### 必要な試薬

- ① PBS (-)
- ② 市販のRNA抽出試薬もしくはキット

### 手順

- (1) 培地を除去してからPBS(-)をインサート内に100 $\mu$ L、well内に600 $\mu$ L加えてリンスし、除去する。
- (2) (1) の作業もう一度繰り返す。
- (3) 以降は、市販のRNA抽出試薬やキットを取扱説明書通りに使用する。

## 位相差顕微鏡観察・蛍光顕微鏡観察

---

注1 膜が透明ではないため通常の平面培養ほど明瞭ではないが、位相差顕微鏡を用いて細胞を観察することは可能である。

注2 細胞培養中の蛍光観察は膜の影響で細胞がぼやけて観察が困難である。そのため、蛍光を観察する場合は後述の方法でフレームから膜を切り離れた後に観察すると良い。

## フレームからのコラーゲン膜の回収および細胞観察

### 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等）
- ② PBS
- ③ ピンセット
- ④ 市販のディスポーザブルメス（貝印社製ディスポメスNo.11など）
- ⑤ スライドガラスおよびカバーガラス
- ⑥ 封入剤

### 手順

- (1) 培地を除き、PBSで洗浄した後に固定液で適宜固定し、固定液除去後にPBSで洗浄する。
- (2) ピンセットを用いてインサートを取り出し、インサートを上下逆さにしてプレートのフタ等の上に置く。
- (3) 市販のディスポーザブルメス等を用いてフレームの線に沿ってコラーゲン膜の周縁部を慎重に切り取り、フレームからコラーゲン膜を取り出す（図1）。<sup>注1,2</sup>

注1 メスを上下に小刻みに動かしながらフレームの線に沿うように切ると切り出しやすい。

注2 貝印社製ディスポメス No.11 のように先端が細く尖っているとコラーゲン膜を切り出しやすい(図2)。

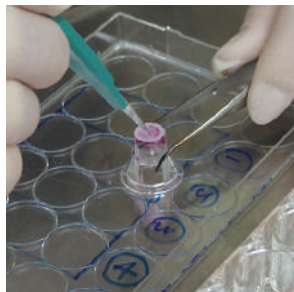


図1.膜の切り出しの様子

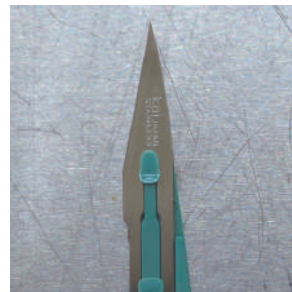


図2.切り出しに適したメスの刃先形状

- (4) ピンセットでコラーゲン膜を回収する（図3）。
- (5) 細胞を観察する場合、コラーゲン膜をスライドガラスに載せて必要に応じてPBSまたは封入剤等を添加し、カバーガラスで覆ってから観察する（図4）。<sup>注3</sup>

注3 細胞播種面がレンズ側になるように向けて封入する。

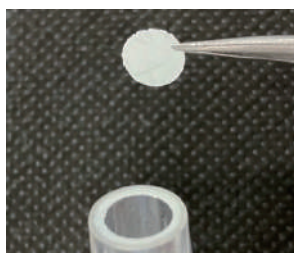


図3.切り出したコラーゲン膜



図4.コラーゲン膜にカバーガラスをかけた様子

## 切片作製

前ページのフレームからコラーゲン膜の回収に従い、コラーゲン膜を切り出した後、凍結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) 前ページのフレームからのコラーゲン膜の回収に従い、細胞を固定液で固定した後にコラーゲン膜を切り出す。
- (2) 必要に応じて切り出したコラーゲン膜を成形すると、表裏が判別しやすい（図5）。

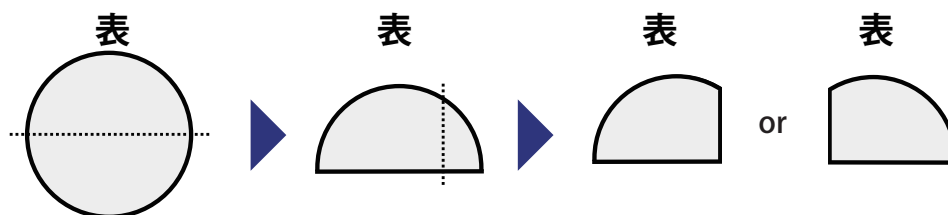


図5.切り出したコラーゲン膜の成形例

- (3) 成形した膜に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後、細胞播種面がレンズ側になるように向けて観察する。

## 製品情報

製品番号	製品	サイズ	包装
FAI-24	FibColl® 高透過性アテロコラーゲンインサート 24well用 無菌 FibColl Atelocollagen Inserts 24	製品:φ19mm×16mm 膜:φ6.4mm 膜厚:約35μm	24個/箱

## 関連製品：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	24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