

保管方法

冷凍 (-20°C) 注1,2

注1 使用時は冷凍庫から取り出した後、室温に戻してから開封し、すぐに使用する。

注2 コラーゲン膜の強度低下や孔が生じる恐れがあるので、本製品を緩衝能の無い精製水などに浸すことは避ける。

透過性コラーゲン膜 (CM-6、CM-24) への細胞播種

A. コラーゲン膜の片面のみに細胞を播種する場合

- (1) ウェル内および膜上に培地を加え、膜を室温で5分以上浸す。注1,2

CM-6 : ウェル内2,000μL、膜上1,000μL

CM-24 : ウェル内500μL、膜上200μL

注1 膜の弛みを軽減するため、先にウェル内に培地を添加する。

注2 この操作を行うことで膜を中和する。膜が中和されると培地がピンク色から黄色へ変化する。

- (2) (1) で用いた培地を除去し、コラーゲン膜が浸るよう培地をウェル内に添加する。

CM-6 : 2,000μL、CM-24 : 500μL

- (3) コラーゲン膜上に細胞懸濁液を添加する。

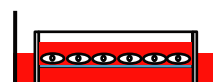
CM-6 : 1,000μL、CM-24 : 200μL

膜への播種細胞数目安 (培養面積)

CM-6 : 7×10^4 cells^{注3} (5.3 cm²)

CM-24 : 1×10^4 cells^{注3} (0.64 cm²)

注3 上記は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。



B. コラーゲン膜の両面に細胞を播種する場合

- (1) Aと同様にコラーゲン膜を培地に浸す。



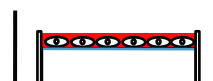
- (2) (1) で用いた培地を除去し、CM-6/CM-24を上下反対にしてウェル内へ配置する。



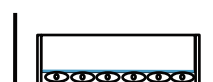
- (3) コラーゲン膜の裏面に細胞懸濁液を添加する。注4

CM-6 : 200μL、CM-24 : 50μL

注4 播種細胞数はAの(3)を参考にする。

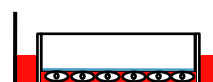


- (4) インキュベーターで細胞が接着するまで数時間ほど培養した後、ピンセットを用いてCM-6/CM-24を裏返す。



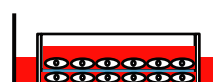
- (5) コラーゲン膜が浸るよう培地をウェル内に添加する。

CM-6 : 2,000μL、CM-24 : 500μL



- (6) コラーゲン膜の表面に細胞懸濁液を添加する。注4

CM-6 : 1,000μL、CM-24 : 200μL



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) コラーゲン膜上下の培地を除去する。
- (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) トリプシン溶液を適量添加し、2～3分間37℃でインキュベートする。^{注1}

酵素液量目安 CM-6 : 1,500μL

CM-24 : 100μL

注1 ご使用の細胞によって、酵素液や処理時間をご検討ください。

- (4) 緩衝液等でピペッティングして細胞を回収する。

RNA回収

必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出試薬もしくはキット

手順

- (1) コラーゲン膜上下の培地を除去する。
- (2) コラーゲン膜上の培養面積に鑑みて、市販のRNA抽出試薬などを添加し、ピペッティングしてRNAを回収する。^{注1}

培養面積 CM-6 : 5.3 cm²

CM-24 : 0.64 cm²

注1 下の写真のように膜裏面からのRNA回収も可能です。培養が進むと膜が弛み、しわが生じます。



写真 CM-6裏面でのピペッティングの様子

切片作製

フレームからコラーゲン膜を切り出した後、凍結切片やパラフィン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^{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) 培地を除去した後、4%PFAを膜上下に添加して4℃で一晩固定する。^{注2}
注2 両面培養の場合、フレームからメスなどで膜を切り取ると、使用する液量が少量で済む。
- (2) PBSで1回洗浄する。
- (3) PBSを除去し、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200μL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100μL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100μL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200μL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し、遮光にて4℃で一晩乾燥させた後、観察する。

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
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	12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

よくあるQ&Aはこちら

<https://atelocollagen.com/atelocell/faq/07>

