

保管方法

冷蔵 (2~10℃)

コラーゲンのコーティング方法

必要な試薬

- ① コラーゲン酸性溶液 I-AC または I-PC (各製品 0.3%溶液、0.5%溶液のいずれも可)
- ② 1mM HCl
- ③ PBS(-)

手順

- (1) 冷やした1mM HClを用いて、氷上にてコラーゲン酸性溶液を10倍程度に希釈する。^{注1,2}
 - 注1 培養器材の表面構造や、使用する細胞の接着力に応じてコラーゲン濃度の検討が必要であるが、当社調べでは0.001-0.1%の希釈溶液を用いている事例が多い。
 - 注2 コラーゲン溶液は粘性があるため、スターラーやローテーターなどを使用して泡立たないようにゆっくりと混合する。
- (2) 培養器材の培養面に希釈したコラーゲン溶液を適量加え、培養面全体に均一に伸ばす。^{注3}
 - 注3 コラーゲン溶液は粘性が高いため、添加量が少ないと培養面全体に伸ばしにくくなる。
参考液量：35mmディッシュ → 1~2ml 程度
100mmディッシュ → 3~4ml 程度
- (3) 室温で1時間以上静置した後、培養器材からコラーゲン溶液を除去する。^{注4}
 - 注4 細胞によっては、一晚静置するなどして完全に乾燥させる方が適している場合もある。
- (4) PBSで数回洗浄し、中和する。
- (5) 細胞懸濁液を加えて培養を行う。

コラーゲングル内培養の準備（コラーゲン含有培地の調製方法）

注意

コラーゲンの変性や不均一なゲル化を避けるため、氷上で作業する。特にコラーゲン酸性溶液I-ACはゲル化しやすいため、使用するチューブや試薬は氷上や冷蔵庫などで十分に冷やしておくこと。

必要な試薬

(10mL調製する場合)

1.	10倍濃度の培地 ^{注1,2}	1mL（終濃度1倍）
2.	1M HEPES pH7.4	0.1mL（終濃度10mM）
3.	1M NaHCO ₃	0.1mL（終濃度10mM）
4.	蒸留水	0.8mL
5.	コラーゲン酸性溶液I-ACまたはI-PC ^{注3,4} (各製品0.3%溶液、0.5%溶液のいずれも可)	8mL

注1 ハンクス培地、イーグルMEMなどは、10倍濃度で調製可能であるが、DMEMのような、“rich”な培地は10倍濃度で完全に溶解しないことがある。その場合は3～5倍濃度として調製し、培地の終濃度が1倍となるようにコラーゲンまたは蒸留水の量を調節する。

注2 培地成分を含まないコラーゲングルを作製したい場合は濃縮したPBSで代用できる。

注3 この方法で最終コラーゲン濃度は、0.5%溶液を使用した場合は約0.4%、0.3%溶液を使用した場合は約0.24%となる。なお、コラーゲングルの硬さはコラーゲン濃度に依存するため、柔らかいゲルを作る場合は、5.のコラーゲン溶液の量を減らし、その分蒸留水で補う（最終コラーゲン濃度0.1%まではゲル化する。）

注4 コラーゲン酸性溶液I-PC 0.3%溶液からゲルを作製する場合、ゲル形成中に細胞が沈むことが懸念されるため、0.5%溶液の使用を推奨する。なお、コラーゲン酸性溶液I-ACはゲル化速度が早く、この限りではない。

手順

(1) 氷上にて1.2.3.4.の順に加え、最後に5を加える。^{注5}

注5 コラーゲン溶液は、粘度が高く器壁に付着したものを無視できないので、ピペッティングにより洗浄洗い込みが必要となる。ピペッティングの際、気泡を溶液中に入れてしまうと消泡しにくいので、気泡をいれないように注意する。

(2) 血清が必要な場合は、この混合液に2～4℃で加える。^{注6}

注6 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。

コラーゲンゲル内培養

必要な試薬

- ① コラーゲン含有培地(調製方法は前項参照)

手順

- (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1,2}
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、コラーゲン含有培地の1/10量以下が望ましい。
- (3) コラーゲン含有培地を添加し、ピペティングによりよく混合する。
- (4) マルチウェルプレートなどの培養容器に分注し^{注3}、素早く37℃に設定したインキュベーターに入れる。
注3 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 μ L)。
- (5) 製品によって1~2時間後、ゲルが形成されていることを確認し、^{注4}血清入りの液体培地を添加して培養を行う。^{注5}
注4 I-ACから調製したコラーゲン含有培地は30分ほどで概ねゲル化するが、1時間インキュベートすることが推奨され、I-PCから調製したコラーゲン含有培地は1時間ほどで概ねゲル化するが、2時間インキュベートすることが推奨される。
注5 平面培養で使用する培地量と同程度(96wellプレートで100-200 μ 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。

コラーゲンゲルからのRNA回収

必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出薬もしくはキット^{注1,2,3}
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の方が高い傾向にあった。
注2 カラムタイプのキットではコラーゲンゲル由来のコラーゲン線維がカラムに詰まり、収量が低いことがある。
その場合、フェノール系抽出液で抽出し、クロロホルムで分離した後、回収した水相を用いてカラムタイプのキットの取扱説明書に従い、RNAを精製するとRNA収量が安定することがある。
注3 DNase処理によってRNA収量が下がるため、実験の目的に応じて要否を判断する。

手順

- (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。

細胞回収

必要な試薬

- ① 0.2% コラゲナーゼ溶液^{注1,2}
- 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参照。

注2 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) コラーゲンゲル上の液体培地を除去する。
- (2) チップの先端で軽くゲルを砕く。
- (3) コラゲナーゼ溶液を最終濃度が0.02%~0.2%になるように加える。
例) 96wellプレートでゲルを100μL作製した場合、0.2%コラゲナーゼ溶液を100μL添加する(終濃度0.1%)。
- (4) 37°Cでインキュベートする。
(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、15分程度で溶解できる。)
- (5) ゲルが溶解したことを確認したのち、溶解液をチューブに移す。
- (6) 遠心し上清を除去する。
- (7) PBSを適宜加え懸濁する。再度遠心し上清を除去する。
- (8) (7)の作業を3~5回繰り返し、コラゲナーゼを除去する。

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 (in phosphate buffer, pH7.4)
- 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^{注1}
- ⑥ 0.05% Tween20 を含む Tris Buffered Saline (TBST)
- ⑦ ブロッキング剤もしくは血清
- ⑧ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑨ 核染色液 (PBS で希釈した DAPI など)
- ⑩ PBS

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、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。

組織学的評価（続き）

I. 凍結切片作製

- (1) コラーゲンゲ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) コラーゲンゲルを培養容器から薬さじなどで取り出し、30%スクロース溶液に移す。^{注1}
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、コラーゲンゲルに対して十分量のスクロース溶液を用いる。
- (4) コラーゲンゲルが沈むまで、ローテーター等を用いてコラーゲンゲルとスクロース溶液を4℃で混和する。^{注2}
注2 必要に応じてスクロース溶液を交換するなどして、しっかりとゲル内の水分をスクロース溶液に置換する。
- (5) コラーゲンゲルを取り出し、キムワイプなどで軽くスクロース溶液を除き、凍結切片作製用包埋剤に入れ、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}
注3 当社ではクライオスタット庫内および試料台を-35℃設定にて切片を作製している。

II. 切片作製後の免疫組織染色など

- (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4}
注4 コラーゲンゲ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4}
- (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4}
- (9) PBSで洗浄後、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}
- (11) 退色防止剤入りの封入剤で封入する。

コラーゲン酸性溶液ラインナップ

製品番号	製品	包装
IPC-30	コラーゲン酸性溶液I-PC 3mg/mL pH3.0 無菌 Atelocollagen Acidic Solution	50mL/本
IPC-50	コラーゲン酸性溶液I-PC 5mg/mL pH3.0 無菌 Atelocollagen Acidic Solution	50mL/本
IAC-30	コラーゲン酸性溶液I-AC 3mg/mL pH3.0 無菌 Native Collagen Acidic Solution	50mL/本
IAC-50	コラーゲン酸性溶液I-AC 5mg/mL pH3.0 無菌 Native Collagen Acidic Solution	50mL/本

コラーゲンの種類

コラーゲン酸性溶液I-PC：ウシ皮由来アテロコラーゲン

コラーゲン酸性溶液I-AC：ウシ皮由来ネイティブコラーゲン

よくあるQ&Aはこちら

<https://atelocollagen.com/atelocell/faq/01>

