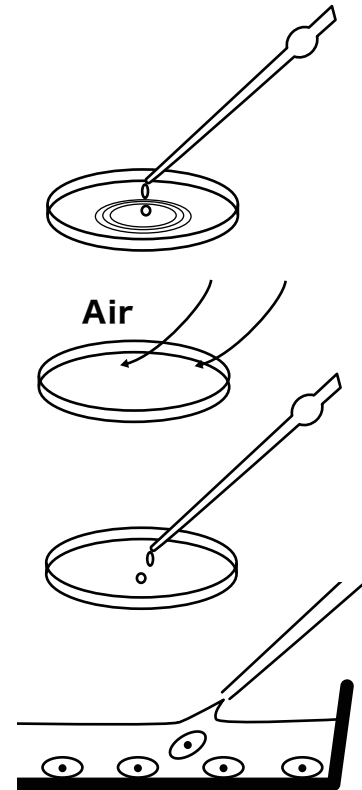


I. コラーゲンコーティングした培養皿での培養

- (1) 通常の組織培養皿中に KOKENCELLGEN I -AC または I -PC (0.5%, 0.3% どちらでもよい) を適量 (35mm φ培養皿で 1mL ~ 2mL, 注1) 加え、培養皿全面に伸ばす。
- (2) クリーンベンチ内で培養皿のふたをあけ、このまま 25°C 以下で風乾する。
- (3) PBS (150mM NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH7.4) で数回洗い中和する。
- (4) Cell suspension を加え通常の培養を行なう。

注1. コラーゲン溶液は粘性が高いため、35mm φ 培養皿で 0.5mL, 50mm φ 培養皿で 1mL 以下の溶液では、培養皿全面に伸ばすことが不可能になる。もし、培養皿あたりのコラーゲン量を少なくしたい場合は、コラーゲン溶液を塩酸にて pH3 に調整した蒸留水を用いて希釈して使用する。

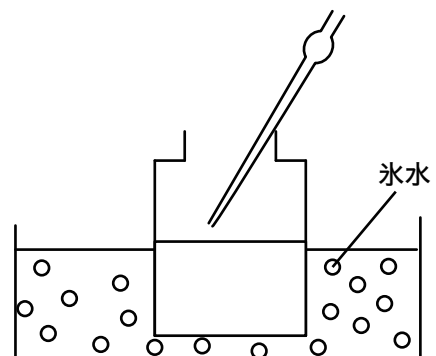


II. コラーゲンゲルの調整方法

A. KOKENCELLGEN I -AC, I -PC を用いる場合

試薬

1. 培地 (10 倍濃度) (注 2) 1mL
2. HEPES pH7.4 (100 倍濃度) 0.1mL
3. NaHCO₃ (100 倍濃度) 0.1mL
4. 蒸留水 0.8mL
5. KOKENCELLGEN
I -AC または I -PC, (0.5% または 0.3%) ...8mL



試薬詳細

1. 培地 (10 倍濃度：粉体の培地で通常使用する濃度の 10 倍) 注2	1mL
2. HEPES pH7.4 (1 ~ 5. 混合時の最終濃度が 10mM になるようにする。従ってこの溶液の濃度は 10mM × 100 = 1,000mM)	0.1mL
3. NaHCO ₃ (1 ~ 5. 混合時の最終濃度が 10mM になるようにする。従ってこの溶液の濃度は 10mM × 100 = 1,000mM)	0.1mL
4. 蒸留水	0.8mL
5. KOKENCELLGEN I -AC または I -PC, (0.5% または 0.3%)	8mL

(1) 氷水浴中にて 1.2.3.4 の順で加え最後に 5 を加える。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ティングにより洗浄洗い込みが必要となる。ピペティングの際、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。

この方法での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。コラーゲンゲルの硬さは、最終コラーゲン濃度に依存する。

(2) 血清が必要な場合は、この混合液に 2 ~ 4°C で加える。

注2. ハンクス培地、イーグル MEM などは、通常の濃度の 10 倍液を作ることが可能であるが、ダルベッコモディファイドイーグル培地のような、“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 5 倍濃度として調製し、コラーゲン、または蒸留水の量で調節する。また、コラーゲン濃度が低いゲルを作る場合は、5. のコラーゲン溶液の量を減らし、この分蒸留水で補う。(コラーゲン濃度 0.1% まではゲル化する。)

B. KOKENCELLGEN 中性溶液を使用する場合

(1) 本剤の通常の保存は冷凍であるのでこれを最初に解凍する。解凍する方法は 2 つある。

- ・ 25°C の温水浴で攪拌しながら解凍する方法。攪拌しないと一部ゲル化することがある。
- ・ 使用前日に冷凍庫から冷蔵庫へ移しておき、自然解凍させる。

(2) 解凍が終了したら直ちに氷水浴へ入れる。

(3) 血清が必要な場合はこの溶液に 2 ~ 4°C で加える

注：1 回で使い切る場合は必要ないが 1 瓶を繰り返し使用する場合、凍結、融解の繰り返しを避けるため、1 回の実験に必要なコラーゲン溶液用量を試薬瓶に小分けして冷凍保存し、必要な分を解凍して使用すると良い。