

ブライターゼ-Cによるゲル培養後の細胞回収と継代

ヒト真皮線維芽細胞 NHDF (Normal Human Dermal Fibroblast) をコラーゲングル (Tri-D キット: Bovine ASC) の上で1週間培養した後、コラーゲンをブライターゼ-Cで消化して細胞を回収した実験例を以下に記す。

実験手順

- ① Tri-D キット (Bovine ASC) を用いて、24 well plate に 1 well あたり 1 mL のゲルを製作する。ゲルのコラーゲン濃度は 1 mg/mL。
- ② NHDF を 5×10^3 cells/well ずつ播種する。
- ③ 10% FBS/DMEM を各ウェル 1 mL ずつ入れて培養し、3 日おきに培地交換
- ④ ブライターゼ-C (40 mg/vial) 凍結乾燥品を滅菌水 2 mL で溶解して 20 mg/mL の溶液にする。
- ⑤ ④で調製したブライターゼ-C 原液を 2 mM CaCl_2 /PBS で希釈して 1 mg/mL の溶液を調製する。2 mM CaCl_2 /PBS は用事調製してフィルター滅菌する。
- ⑥ ゲル培養をしている各ウェルを PBS 1 mL ずつで 3 回洗浄する。
- ⑦ ブライターゼ-C 溶液 (1 mg/mL) をウェルあたり 1 mL 添加した後、CO₂ インキュベーターに入れ、37°C で 1 時間インキュベートする。
- ⑧ コラーゲングルが溶解していることを目視で確認し、各ウェルの細胞液を回収して 15 mL チューブに入れる。未消化のコラーゲングルが残っている場合は、さらに 30 分間インキュベートする。
- ⑨ 1,500 rpm で 5 分間遠心する。
- ⑩ 上清を吸引除去する。
- ⑪ PBS 10 mL を加えて細胞を軽く懸濁する。
- ⑫ 洗浄操作 (⑨~⑪) を 5 回繰り返す。
- ⑬ 1,500 rpm で 5 分間遠心した後、上清を吸引除去する。
- ⑭ 細胞を回収する。回収した細胞を再度培養する場合は以下の操作を行う。
- ⑮ 遠心した細胞のペレットに 0.05% Trypsin/EDTA 溶液を 2 mL 加えてピペットで懸濁し、CO₂ インキュベーターに入れ、37°C で 5 分間インキュベートする。
- ⑯ 1,500 rpm で 5 分間遠心する。
- ⑰ 上清を吸引除去する。
- ⑱ PBS 5 mL を加えて細胞を軽く懸濁する。
- ⑲ 1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を吸引除去する。
- ⑳ 10% FBS/DMEM で細胞を懸濁してディッシュに播種する。
- ㉑ コラーゲングル培養の場合、翌日ウェルを観察してコラーゲングルが残存するブライタ

ーゼ-C で消化されていないか確認する。

注意点

- ・ ブライターゼ-C の活性発現には Ca^{2+} が必要なので、コラーゲンゲル消化時は 2 mM CaCl_2/PBS で希釈したブライターゼ-C 溶液を使用する。2 mM CaCl_2/PBS を長期保存すると、リン酸カルシウムの沈殿が生じるので、フィルター滅菌した 1 M CaCl_2 溶液を PBS に添加して用事調製する。
- ・ コラーゲン消化におけるブライターゼ-C 使用量は、コラーゲン濃度と量に依存する。目安は、1 mg/mL のコラーゲン (ASC: 酸可溶性コラーゲン) ゲル 1 mL に対してブライターゼ-C 1 mg を用いて 37°C で 1 時間消化。
- ・ ブライターゼ-C によるコラーゲンゲルの消化後、細胞回収後に再度ゲル培養をするときは、細胞液の遠心と上清吸引除去、PBS 添加の繰り返しによる洗浄操作は最低 5 回行う。洗浄が不十分の場合、残存するブライターゼ-C により、次のコラーゲンゲルに細胞を播種したときに、コラーゲンゲルが分解されてしまう。
- ・ ブライターゼ-C による細胞回収のあと、再度培養を行う場合は Trypsin/EDTA 処理を行う。Trypsin/EDTA 処理により、残存するブライターゼ-C の不活性化と細胞を分散することが目的である。

応用例

- ・ コラーゲンゲル培養あるいは IV 型コラーゲンを含むマトリジェル培養でできたオルガノイドを崩さずに回収する場合は、コラゲナーゼ (ブライターゼ-C) で消化後、Trypsin/EDTA 処理を行わず、十分に PBS 洗浄して回収する。細胞をバラバラにして FACS 等で解析する場合は Trypsin/EDTA 処理を行う。
- ・ ゲルの消化速度はゲル作製に用いたコラーゲンが ASC (酸可溶性コラーゲン) か PSC (ペプシン可溶化コラーゲン) かによって異なる。PSC コラーゲンゲルの場合、ゲル 1 mL に対してブライターゼ-C 100 μg - 1 mg の使用量で、37°C にて 30 分間 - 1 時間で消化される。細胞およびゲル培養に使用するコラーゲンの種類、濃度、量によって、ブライターゼ-C の使用量と消化時間を調整する。

関連製品

Tri-D kit ウシ真皮 酸処理 (ASC)	ASC: 酸可溶性コラーゲン
Tri-D kit ウシ真皮 ペプシン処理 (PSC)	PSC: ペプシン処理可溶化コラーゲン
Tri-D kit ブタ真皮 ペプシン処理 (PSC)	
Tri-D kit ティラピア ペプシン処理 (PSC)	
ブライターゼ-C 凍結乾燥品 (40 mg/vial)	