



## ブライターゼ-C によるゲル培養した細胞の回収と継代

ヒト真皮線維芽細胞 NHDF (Normal Human Dermal Fibroblast) をコラーゲンゲル(ASC および PSC) の上で 1 週間培養した後、コラーゲンゲルをブライターゼ-C で消化して細胞を回収した実験例を以下に記す。

ASC : 酸抽出コラーゲン

PSC : ペプシン可溶化コラーゲン

### 実験手順

#### 1. ゲルの作製および細胞の培養

① ASC および PSC コラーゲン溶液を用いて、24 well plate に 1 well あたり 1 mL のゲルを作製する。コラーゲンゲル濃度は 1 mg/mL。

※ゲルの作製方法については、研究試薬用コラーゲン使用方法を参照

② NHDF を  $5 \times 10^3$  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

#### 2. 細胞の回収

コラーゲン消化におけるブライターゼ-C の使用量は、コラーゲンゲル濃度と量に依存する。

#### ASC の場合

① ブライターゼ-C (40 mg/vials) 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。

② ブライターゼ-C 原液を 2 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS で希釈して 1 mg/mL の溶液を調製する。2 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS は用事調製しフィルター滅菌する。

③ ゲル培養している各ウェルを PBS 1 mL ずつで 3 回洗浄する。

④ ブライターゼ-C 溶液(1 mg/mL) を各ウェルに 1 mL 添加して CO<sub>2</sub> 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。

⑤ コラーゲンゲルがすべて溶解していることを確認し、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ゲルが残っている場合はさらに 30 min インキュベートする。

⑥ 1500 rpm で 5 min 遠心する。

⑦ 上清をアスピレートして除去する。

⑧ PBS 10 mL を加えて細胞を軽く懸濁する。

- ⑨ 洗浄操作(⑨~⑪)を 5 回繰り返す。
- ⑩ 1500 rpm で 5 min 遠心した後、上清をアスピレートして除去する。
- ⑪ 細胞を回収する。

### **PSC の場合**

- ① ブライターゼ-C (40 mg/vials)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。
- ② ブライターゼ C 原液を 2 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS で希釈して 100 µg/mL~1 mg/mL の溶液を調製する。2 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS は用事調製しフィルター滅菌する。
- ③ ゲル培養している各ウェルを PBS 1 mL ずつで 3 回洗浄する。
- ④ ブライターゼ-C 溶液(100 µg/mL~1 mg/mL)を各ウェルに 1 mL 添加して CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、37°C で 30 min~1 時間インキュベートする。
- ⑤ コラーゲンゲルがすべて溶解していることを確認し、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ゲルが残っている場合はさらに 30 min インキュベートする。
- ⑥ 1500 rpm で 5 min 遠心する。
- ⑦ 上清をアスピレートして除去する。
- ⑧ PBS 10 mL を加えて細胞を軽く懸濁する。
- ⑨ 洗浄操作(⑨~⑪)を 5 回繰り返す。
- ⑩ 1500 rpm で 5 min 遠心した後、上清をアスピレートして除去する。
- ⑪ 細胞を回収する。

### **3. 細胞の継代**

- ⑫ 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、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、37°C で 5 min インキュベートする。
- ⑬ 1500 rpm で 5 min 遠心する。
- ⑭ 上清をアスピレートして除去する。
- ⑮ PBS 5 mL を加えて細胞を軽く懸濁する。
- ⑯ 1500 rpm で 5 min 遠心し、上清をアスピレートして除去する。
- ⑰ 10%FBS/DMEM で細胞を懸濁してディッシュに播種する。
- ⑱ コラーゲンゲル培養の場合、翌日ウェルを観察してコラーゲンゲ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 1 mM 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要なので、コラーゲンゲル消化時は 2 mM  $\text{CaCl}_2/\text{PBS}$  で希釈したブライターゼ-C 溶液を使用する。2 mM  $\text{CaCl}_2/\text{PBS}$  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 1M  $\text{CaCl}_2$  溶液を PBS に添加して用事調製する。
- ・ ブライターゼ-C によるコラーゲンゲルの消化後、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。洗浄が不十分だと、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単一分散することが目的である。

## 応用

- ・ 他の細胞でゲル培養してできたオルガノイドを崩さずに回収する場合は、コラーゲンゲル消化後、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。
- ・ 細胞の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。

## 関連商品

商品コード	商品名
892 101 ASC-1-100-20	ウシ真皮由来 I 型コラーゲン(酸抽出) 3mg/mL
892 102 ASC-1-100-100	
892 103 PSC-1-100-20	ウシ真皮由来 I 型コラーゲン(ペプシン可溶化) 3mg/mL
892 104 PSC-1-100-100	
892 107 PSC-3-100-05	ウシ真皮由来 III 型コラーゲン(ペプシン可溶化) 3mg/mL
892 108 PSC-3-100-20	
892 151 PSC-5-105-01	ウシ角膜由来 V 型コラーゲン(ペプシン可溶化) 3mg/mL
892 111 PSC-1-200-20	ブタ真皮由来 I 型コラーゲン(ペプシン可溶化) 3mg/mL
892 112 PSC-1-200-100	
892 431	Brightase-C 40mg×1 pc.
892 432	Brightase-C 40mg×2 pcs.