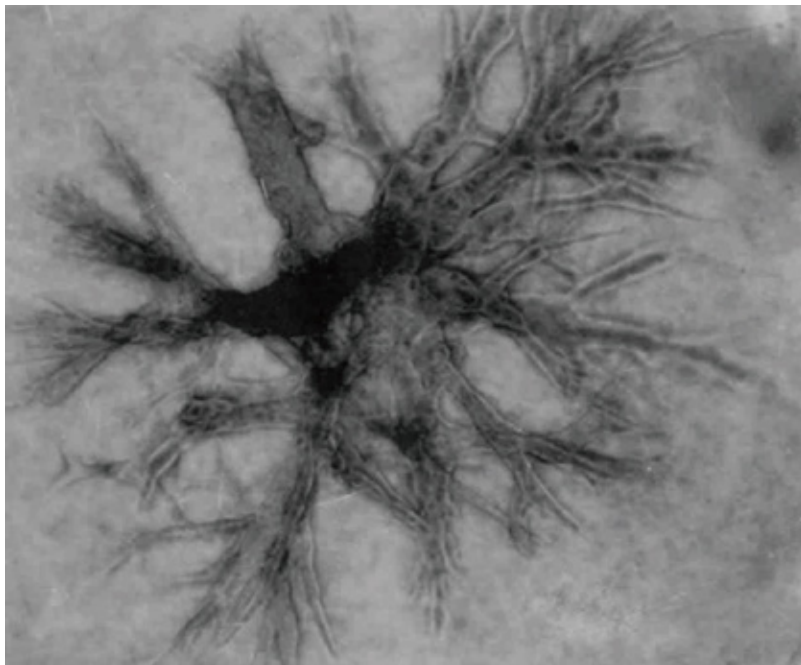


Cellmatrix®

Cellmatrix® 细胞培养用 胶原蛋白使用指南

Collagen Gel Matrix Culture
胶原蛋白凝胶基质培养法及应用实例



胶原蛋白凝胶中小鼠乳腺癌细胞的增殖（培养2周）

目录

I 关于细胞培养	1
I-1 前言	
I-2 细胞培养的基础	
I-3 使用胶原蛋白的细胞培养	
I-4 胶原蛋白作为细胞基质的作用	
II 关于胶原蛋白	4
II-1 胶原蛋白的分子结构及相关性质	
II-2 胶原蛋白的分类	
II-3 胶原蛋白的功能	
II-4 胶原蛋白的应用	
III 关于Cellmatrix（细胞培养用胶原蛋白）	9
III-1 Cellmatrix的特征和种类	
III-2 Cellmatrix Type I的物理及化学性质	
IV 胶原蛋白凝胶培养法	14
IV-1 胶原蛋白凝胶基质溶液的制备法	
IV-2 胶原蛋白凝胶表层培养法	
IV-3 胶原蛋白凝胶包埋培养法	
IV-4 凝胶内细胞的提取法、传代法以及细胞集落的选择法	
IV-5 细胞增殖度的检测法	
IV-6 培养细胞样品的储存法	
V 胶原膜表层培养法	19
VI 总结·文献	20
相关资料的说明	21

I 关于细胞培养

I-1 前言

近年来,由于培养技术的进步,在体内执行不同功能的各类器官、组织和细胞都能够取出体外进行培养。例如,直接从活体取出的器官和组织切片置于培养设备中进行培养的方式被称为**器官培养 (Organ Culture)**和**组织培养 (Tissue Culture)**。与之相对的,使用蛋白分解酶等处理的器官和组织,以及培养分离的细胞统称为**细胞培养 (Cell Culture)**。通过使用细胞培养法,可以将各个细胞作为独立的个体来使用,现在越来越多的领域开始使用这个方法。

进行细胞培养的目的之一就是“**在培养设备中重现在活体内发生的现象**”。由于细胞培养法可任意改变和获得细胞的物理性和化学性环境,并且在各种实验上都有优点,所以建立可重现生命现象的细胞培养系统具有重要意义。为此,研究人员迄今为止已经设计和提出了多种细胞培养法,并且仍在努力寻找更好的培养系统。

I-2 细胞培养的基础

要进行细胞培养,就必须先从组织中分离细胞。为此,主要使用蛋白分解酶。纤维性组织一般使用分解胶原蛋白的胶原酶,分离细胞间的粘附时,一般使用胰蛋白酶、链霉菌蛋白酶等。此外,例如 EDTA 等的钙整合剂对细胞分离也有效。

将分离的细胞直接转移至培养器进行的培养称为**原代培养 (Primary Culture)**。然后,将培养器中的细胞转移至下一个培养器称为**传代 (Passage)**,传代的细胞依次称为第二代细胞、第三代细胞等。

细胞在被称为培养液或**培养基 (Culture Medium)**这类含有营养成分的溶液中培养。该培养基与动物的体液相类似,其组成以氯化钠为主的无机盐、各类氨基酸、糖类以及维生素为基础。若想细胞生长,只使用这样的基础培养基是不够的,通常还需添加动物的血清(Serum)。这是因为血清中会含有激素、细胞增殖因子、细胞粘附因子等大部分的必须因子。

细胞培养法根据细胞的物理性支持基质,大致可分为 3 类,即**单层培养 (Monolayer Culture)**、**悬浮培养 (Suspension Culture)**、以及**包埋培养 (Embedded Culture)**。

单层培养法是在培养皿接种分离的细胞,细胞会在培养皿的表面粘附和伸展,形成单层。例如,使用单层培养法培养**上皮细胞 (Epithelial Cell)**,会形成铺路石状的单层。另外,单层培养**成纤维细胞 (Fibroblast)**的话,会形成纤维状的细长形状的单层。

悬浮培养法是接种细胞后,持续搅拌培养基,防止细胞粘附于培养器表面,形成悬浮状态。

处于单层培养和悬浮培养中间的是**微载体培养 (Microcarrier Culture)**。这种培养是让细胞在小型的球状载体上单层生长,在罐体中搅拌载体,进行悬浮培养。通过使用这个方法,可以增大培养面积,适用于细胞的大量培养。

最后,包埋培养是悬浮培养的一种,是在固态或半流动态的基质中包埋细胞,固定培养的方法。作为细胞的支持基质,通常使用软琼脂、甲基纤维素、胶原蛋白凝胶等。

一般来说,细胞粘附于玻璃、塑料或胶原蛋白等基质后,才能开始增殖。这称为**锚定依赖性增长 (Anchorage-Dependent Growth)**。此外,还有完全无需粘附于细胞就能增殖的细胞。大部分的血细胞和癌细胞就属于这一类细胞。这类细胞在悬浮培养,或不允许细胞粘附的软琼脂和甲基纤维素中也能增殖。这称为**锚定非依赖性增长 (Anchorage-Independent Growth)**。

由于几乎所有细胞都存在粘附依赖性,必须要粘附于培养器,所以关于原代培养细胞的细胞分化和细胞增殖的研究都主要通过单层培养进行。但是,某个种类的细胞,尤其是在上皮细胞中,使用单层培养法可能会无法实现分化和细胞增殖功能。因此,既可培养粘附依赖性细胞,又能够弥补传统单层培养法缺点的新型培养法的开发备受期待。胶原蛋白凝胶培养法就是其中之一。

I-3 使用胶原蛋白的细胞培养

胶原蛋白是动物界中存在最广泛的蛋白,占动物身体中全体蛋白的 1/3 以上,构成了动物的皮肤、肌腱和骨质等的结缔组织。虽然动物的身体由多数的细胞组成,但胶原蛋白作为细胞和细胞间的基质,发挥着重要的作用。

胶原蛋白在活体中的作用原本被认为是支撑动物身体的结构。但是,近期研究表明,胶原蛋白在细胞的发育、分化和形态形成等作为细胞间的基质,对细胞有生物学上的影响。^{1,2)}

因此利用胶原蛋白来培养细胞帮助很大。实际上,通过使用胶原蛋白作为细胞培养的基质,实现了以前在塑料或玻璃

培养皿中无法进行的细胞增殖、长期培养、传代培养、形态形成以及诱导细胞分化等^{2,3)}的单层培养,证明胶原蛋白作用效果的案例也层出不穷。

I-4 胶原蛋白作为细胞基质的作用

大量的报告(表 1)²⁾中提到了与玻璃和塑料基质相比,利用胶原蛋白基质更能促进细胞的粘附、增殖和分化等的实验案例。最初在胶原蛋白和玻璃上比较各种细胞的成长的是 Ehrmann 和 Gey⁴⁾提出的。1953 年, Grobstein 报告了胶原蛋白基质对细胞增殖和形态形成具有重要作用⁵⁾。此外,还有报告称,角膜内皮细胞⁶⁾、乳腺上皮细胞⁷⁾、表皮细胞⁸⁾以及成纤维细胞相比在玻璃制培养皿中培养,在胶原蛋白基质中培养可以长期存活。

表1 在胶原蛋白基质中培养的细胞

Cell types	Type of collagen	Reference
Cell lines		
BHK cells	Addition of collagen to medium	Sanders and Smith (1970)
Hela, BHK cells	Gel	Schor (1980)
Cell lines including Hela	Gel	Cleator and Beswick (1972)
Hamster fibrohemangiosarcoma, L. cells Hela, cells	Gel	Cuprar and Lever (1974)
Diploid fibroblasts (WI-38)	Film	McKeehan and Ham (1976)
Melanoma cells, Synan hamster	Gel	Schor <i>et al.</i> (1982)
Rama 25 cells derived from rat mammary tumor	Gel	Bennett (1980)
Human breast tumor cells	Gel	Leung and Shiu (1982)
MCF-7	Collagen-coated cellulose sponge	Russo <i>et al.</i> (1976,1977)
Walker tumor 256	Collagen-coated cellulose sponge	Leighton <i>et al.</i> (1967)
Several transplantable tumors	Collagen-coated cellulose sponge	Leighton <i>et al.</i> (1968)
Neurons		
Cerebral and sympathetic neurons, chick embryo	Film	Iverson <i>et al.</i> (1981)
Sympathetic neurons, chick embryo	Film	McCarty and Partlow (1976); Hanson and Partlow (1978)
Optic lobe neurons, chick embryo	Film	Adler <i>et al.</i> (1979)
Sympathetic neurons, rat	Film and gel	Hawrot (1980)
Sensory neurons, fetal rat	Film	Bunge and Bunge (1978)
Tumors		
Mammary tumor, mouse	Gel	Yang <i>et al.</i> (1979, 1980)
Colon carcinoma cells, human	Film	Murakami and Masui (1980)
Renal tumor cells, hamster	Gel	Talley <i>et al.</i> (1982)
Bladder cancer, human	Collagen-coated cellulose sponge	Leighton <i>et al.</i> (1980)
Liver cells		
Liver, human embryo	Film	Hillis and Bang (1962)
Liver, human embryo	Film	Festenstein (1963)
Liver, human embryo	Film	Zuckerman <i>et al.</i> (1967)
Liver, human fetus and rat	Gel	Cleator and Beswick (1972)
Liver, rat	Film	Alexander and Gnsham (1970)
Liver, bullfrog	Film	Stanchfield and Yager (1978)
Liver, rat	Gel	Michalopoulos and Pitot (1975)
Liver, rat	Gel	Sattler <i>et al.</i> (1978)
Mammary cells		
Mammary epithelial cells, mouse	Gel	Yang <i>et al.</i> (1980)
Mammary epithelial cells, rat	Film	Salomon <i>et al.</i> (1981)
Mammary epithelial cells, human	Gel	J. Yang <i>et al.</i> (1981)
Mammary epithelial cells, human	Gel	N.S. Yang <i>et al.</i> (1981)

Cell type	Type of collagen	Reference
Other epithelial cells		
Skin epithelial cells, human, rabbit, mouse	Gel	Karasek and Charlton (1971); Liu and Larasek (1978)
Corneal epithelial cells, bovine	Gel	Gospodarowicz <i>et al.</i> (1978)
Transitional epithelial cells, rat	Collagen-coated nylon-mesh disks	Chlapowski and Haynes (1979)
Thyroid epithelial cells, porcine	Gel	Chambard <i>et al.</i> (1981)
Submandibular epithelial cells, mouse	Gel	Yang <i>et al.</i> (1982)
Pancreatic endocrine cells	Gel	Montesano <i>et al.</i> (1983)
Miscellaneous		
Brain capillary endothelial cells, rat	Film	Bowman <i>et al.</i> (1981)
Capillary endothelial cells, bovine	Gel	Schor <i>et al.</i> (1979)
Preimplantation embryo, rabbit	Film	Cole <i>et al.</i> (1966)
Granulocyte / macrophage progenitor cells, mouse	Gel	Lanotte <i>et al.</i> (1981)
Chondrocytes, chick	Gel	Yasui <i>et al.</i> (1982)
Muscle and fibroblasts		
Muscle, chick embryo	Film	Hauschka and Konigsberg (1966)
Muscle, chick embryo	Gel	Gey <i>et al.</i> (1974)
Fibroblasts, chick embryo	Gel	Dunn and Ebendal (1978)
Foreskin fibroblasts, human	Gel	Schor <i>et al.</i> (1981, 1982)
Kidney fibroblasts, rabbit	Film	Rucker <i>et al.</i> (1972)
Mesenchymal cells	Gel	Greenburg and Hay (1982)

※ 部分引用Yang J. and Nandi S. Int. Rev. Cytol., 81, 249-286 (1983)

胶原蛋白对于细胞分化有重要作用。例如,维持肝细胞分化和功能进行培养非常困难,但是在胶原蛋白凝胶上培养可以维持 20 天¹⁹⁾,或使用从肝组织中取出的基质,可以维持 5 个月以上的分化并存活。例如,报告称肌原细胞在胶原蛋白涂层的培养皿上发生细胞融合,并分化成肌纤维²⁰⁾。

此外,使用胶原蛋白凝胶悬浮培养法培养小鼠乳腺上皮细胞,在激素的存在前提下,可以诱导乳蛋白的一种酪蛋白的合成^{15,16)}。除了对细胞分化有效外,它还可以作用于角膜上皮细胞引起的角膜基质的生成²¹⁾,表皮结构的多层结构生成等。胶原蛋白在细胞分化中具有重要作用。

胶原蛋白在细胞增殖中也发挥着重要的作用。J.Yang, J.Enami, S.Nandi 等研究人员使用胶原蛋白凝胶,进行乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞的原代培养,成功实现了长期培养^{2,12,13,14,15,16,17,33)}。乳腺上皮细胞在使用胶原蛋白凝胶后,可以在无血清条件下进行培养,并且还能在 *in vitro* 中测试各种激素和成长因子的影响。此外,还可以在 *in vivo* 相似的系统中研究细胞增殖、细胞的形态形成、分化、致癌机制以及克隆等^{2,18)}。

胶原蛋白之所以能够促进细胞分化和细胞增殖,推测是因为它具有以下 2 种作用。作用 1 是胶原蛋白凝胶表层或胶原蛋白凝胶中培养细胞时,形成细胞基底膜的能力。在使用胶原蛋白凝胶基质培养的小鼠乳腺细胞中,虽然在电子显微镜中观察到了基底膜,但是在塑料培养皿上的培养并没有发现¹¹⁾。作用 2 是可以阻止细胞转移至塑料制培养皿时产生的细胞扁平化以及由于伸展引起的体积增大,保持细胞原有的形状和体积²⁾。如上所述,在细胞基质中使用胶原蛋白这一新型培养法,对于在单层培养中受限的研究,可能会有新的发现。

II 关于胶原蛋白

II-1 胶原蛋白的分子结构及相关性质

II-1-1 氨基酸组成和氨基酸序列

胶原蛋白的氨基酸组成和序列与其他的蛋白相比,具有高度特异性,这与后述的胶原蛋白分子的螺旋结构密切相关。

(a) 氨基酸组成²³⁾

甘氨酸约占所有氨基酸残基的 1/3,亚氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸)约占 2/9,疏水性氨基酸残基非常少。其中,不存在色氨酸,酪氨酸仅少量存在于端肽(非螺旋部分)。(表 2)

表2 牛胶原蛋白 α 链的氨基酸组成

氨基酸	每1000个残基的残基数			
	$\alpha 1$ (I) ^{a)}	$\alpha 2$ ^{b)}	$\alpha 1$ (II) ^{c)}	$\alpha 1$ (III) ^{d)}
3-羟脯氨酸	1	—	2	—
4-羟脯氨酸	85	85	91	127
天冬氨酸	45	47	43	48
苏氨酸	16	17	22	14
丝氨酸	34	24	26	44
谷氨酸	77	71	87	71
脯氨酸	135	120	129	106
甘氨酸	327	328	333	366
丙氨酸	120	101	102	82
半胱氨酸	—	—	—	2
缬氨酸	18	34	17	12
蛋氨酸	7	4	11	7
异亮氨酸	9	17	9	11
亮氨酸	21	34	26	15
酪氨酸	44	3	1	3
苯丙氨酸	12	16	14	9
羟赖氨酸	55	11	23	7
赖氨酸	32	21	15	25
组氨酸	3	8	2	8
精氨酸	50	57	51	44

a) Rauterbeg, J., and Kuhn, K., Eur J. Biochem., 19, 398 (1971).

b) Fietzek, P. P., Munch, M., Breitzkreutz, D., and Kuhn, K., FEBS Lett., 9, 229 (1970).

c) Miller, E. J., and Lunde, L. G., Biochemistry, 12, 3153 (1973).

d) Butler, W. T., Birkedal-Hansen, H., Beegle, W. F., Taylor, R. E., and Chung, E., J. Biol. Chem., 250, 8907 (1975).

【引用自 Bornstein, P. and Traud, W., The Proteins (Neurath, H., and Hill, R. L. ed.) vol. 4, p. 453. Academic Press (1979)】

(b) 氨基酸序列^{23, 24)}

一级结构的特点是重复 Gly-X-Y。每三个残基存在甘氨酸是胶原蛋白形成螺旋所必须的条件。虽然 X 和 Y 是任意的氨基酸,但根据种类所占的 X 和 Y 的频率也有差别(表 3)。

重点是,脯氨酸存在于 X 位置,羟脯氨酸存在于 Y 位置。但是,端肽部分没有发现这种规则的序列。

表3 Gly-X-Y序列中各氨基酸残基的分布

氨基酸	$\alpha 1(I)$ 链 X/Y	$\alpha 2$ 链 X/Y ^{a)}
脯氨酸	16 / 4	90 / 3
羟脯氨酸	11 / 112 ^{b)}	0 / 83
苯丙氨酸	12 / 0	10 / 0
亮氨酸	18 / 1	25 / 5
精氨酸	9 / 42	9 / 35
赖氨酸	12 / 20	8 / 10
谷氨酰胺	7 / 19	7 / 17
天冬氨酸	6 / 5	13 / 7
谷氨酸	42 / 6	31 / 3
苏氨酸	3 / 12	4 / 9
丝氨酸	18 / 17	12 / 12
天冬酰胺	17 / 15	7 / 11
丙氨酸	59 / 63	39 / 46
缬氨酸	9 / 8	9 / 20
异亮氨酸	3 / 4	8 / 8
蛋氨酸	2 / 5	0 / 4
组氨酸	2 / 0	5 / 1
羟赖氨酸	0 / 4	0 / 7
酪氨酸	0 / 0	1 / 0
甘氨酸	1 / 0	0 / 0

a) Rauterberg, J., and Kuhn, K., Eur J. Biochem., 19, 398 (1971).

b) Fietzek, P. P., Munch, M., Breikreutz, D., and Kuhn, K., FEBS Lett., 9, 229 (1970).

【引用自 Bornstein, P. and Traud, W., The Proteins (Neurath, H., and Hill, R. L. ed.) vol. 4, p. 453. Academic Press (1979)】

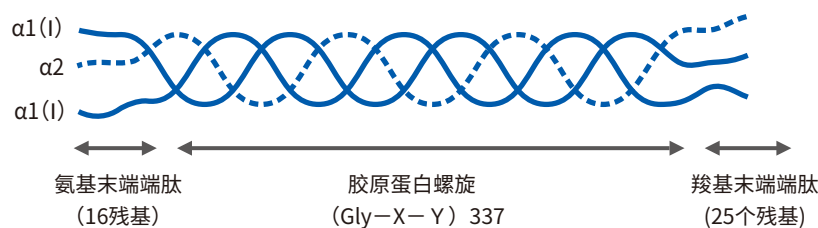
II-1-2 胶原蛋白的立体结构^{23,25,26)}

胶原蛋白分子是由不断重复 Gly-X-Y, 氨基酸约 1,000 残基(分子量约 10 万)的 3 条多肽链(α 链)组合形成(图 1)。中心部分形成螺旋状, 两端分散。螺旋部分由 3 条多肽链分别在约 3.3 残基处形成一周向左旋转的螺旋。三链螺旋作为一个整体围绕中心轴在 30~45 个残基处向右旋转一周, 形成螺旋。像这样的螺旋结构被称为 coiled-coil 结构或超螺旋结构。当超螺旋结构发生脆性变性形成凝胶化时, 多肽链会分成 1 条 α 链、2 条 β 链、3 条 γ 链。

胶原蛋白的螺旋部分整体呈圆柱形或棒状。由约 1000 个残基的 3 条多肽链组成的胶原蛋白分子的大小, 可以形成长度约 3000 埃, 粗约 15 埃的圆柱体。圆柱体中心轴一侧只有甘氨酸, 其他的所有残基都朝外。这是因为甘氨酸以外的残基的侧链都较大, 会产生空间位阻。此外, 与其它蛋白不同, 即使疏水性氨基酸残基的数量很少, 也会提高其暴露在圆柱体外侧的比例。这与胶原蛋白溶解性差相关。

胶原蛋白结构的变性温度与动物种类差异, 细胞的环境温度相关。例如, 人胶原蛋白的变性温度为 40°C²⁷⁾, 但在南极生活的鱼的胶原蛋白变性温度为 5°C 左右²³⁾。此外, 同一动物的胶原蛋白, 根据组织的不同, 变性温度也会有差异。对于这样的胶原蛋白分子的热稳定性, 羟脯氨酸发挥着重要作用。这可能是由于在脯氨酸中引入 OH 基团导致分子内更容易形成氢键结合或介由 H₂O 的氢键结合。因此, 羟脯氨酸含量越高, 变性温度越高。

图1 I型胶原蛋白的结构



II-1-3 胶原蛋白纤维和交联结构

胶原蛋白在活体内会形成纤维。在试管中也可以再生这种纤维，向胶原蛋白的酸性溶液中添加碱进行中和的话就会变浑浊。降低离子强度值到 0.05 以下的话，在 4°C 的低温下也会浑浊，在此之上的离子强度，稍微提高温度也可变浑浊。该浑浊是胶原蛋白的纤维形成的物质，这是与在活体内发现的胶原蛋白纤维相同，显示 670 埃的周期性。当在中性的 pH 值附近加热适当离子强度的胶原蛋白溶液时，溶液会逐渐凝胶化，并在几分钟 ~ 几十分钟后整体形成均匀浑浊的凝胶。下述的胶原蛋白凝胶培养法(参考 IV)，就是利用该胶原蛋白的纤维形成引起凝胶化的特点，在活体内盐浓度为 0.14 M，pH=7.4，温度 =37°C 的条件下进行。活体内的纤维结构因组织的而异，并根据组织的功能发挥作用。例如，在肌腱中，胶原蛋白分子排列整齐，纤维成束。在皮肤中，胶原蛋白的排列错综复杂。虽然关于胶原蛋白纤维的细微结构和形成纤维的机制有众多的研究，但仍然有许多未解之谜²⁸⁾。

胶原蛋白分子在生体内形成纤维的时候，为了使纤维安定性在胶原蛋白分子内或分子间引入交联，最终使其不溶解，该交联的引入通过如下的机制进行。

第一阶段，端肽中的赖氨酸和羟赖氨酸的ε-氨基酸通过赖氨酰氧化酶氧化并转化为醛类。它们分别称为醛赖氨酸和羟赖氨酸。然后，醛赖氨酸和羟赖氨酸与在同一分子，或者其他分子中特定位置的赖氨酸或羟赖氨酸等发生羟醛缩合，或通过移位碱基形成交联。这是主要的交联结构，除此之外，研究人员也发现了一些较为复杂的交联结合，胶原蛋白的生理性作用及其物性相关的研究还在不断地发展²⁹⁾。

II-2 胶原蛋白的分类

II-2-1 根据分子种类进行分类^{23,30)}

具有胶原蛋白结构的分子种类至少有 6 种(I~V 型和 I 型三聚体)。此外，组成胶原蛋白分子的多肽链有 8 种($\alpha 1(I)$ ~ $\alpha 1(III)$)、 $\alpha 2$ 、C、D、A、B) (表 4)。其中，数量最多的是 I 型胶原蛋白，占有所有胶原蛋白的 80%~90%，其在使用方面也最重要。

表4 胶原蛋白的种类和特征

胶原蛋白肽链	分子量 (链组成)	名称	组织分布	组成氨基酸糖
$\alpha 1(I)$ $\alpha 2$	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$	I 型	真皮、骨骼、牙本质、肌腱、动脉壁、子宫壁、椎间盘纤维环和其他细胞间质	两种链的混合体。赖氨酸残基的羟基化率约为 15%。含糖量低。
$\alpha 1(I)$ $\alpha 2$	$[\alpha 1(I)]_3$	I 型三聚体	各种细胞培养系统、鸡胚胎、肌腱、头骨、摄入山豆素后的大鼠牙本质、正常人皮肤	
$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	II 型	透明软骨、玻璃体(眼)、脊柱、椎间盘髓核	赖氨酸残基的羟基化率约为 50%。羟基化的赖氨酸残基皆与糖结合。
$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	III 型	真皮、动脉壁、子宫壁、胃肠壁(分布与 I 型相同，但在骨和肌腱中仅有微量)	含有半胱氨酸残基。羟脯氨酸残基比脯氨酸残基多。赖氨酸残基的羟基化率与 I 型大致相同。
C D	?	基底膜胶原蛋白(IV 型)	基底膜	含有半胱氨酸残基。羟脯氨酸残基比脯氨酸残基多。赖氨酸残基的羟基化率与 I 型大致相同。
A B	可能存在 B_2A 、 B_3 、 A_2B	AB(或 V 型)胶原蛋白	各种细胞表层	

※ 引用自：藤原作平、コラーゲン代謝と疾患(永井裕、藤本大三郎編)，p.112，講談社(1982)，Bornstein, P. and Truub, W., The Proteins (Neurath, H., and Hill, R.L.,ed) Vol.4, p.419,Academic Press (1979)

II-2-2 基于溶解性的分类

在使用胶原蛋白时,胶原蛋白的溶解性尤为重要。根据增溶方法,所获得的胶原蛋白性质不一。例如,中性盐溶性胶原蛋白大多为刚合成的新胶原蛋白分子,酸溶性胶原蛋白有许多聚集体(分子量 60 万以上)。此外,能被中性盐或酸溶解的胶原蛋白主要为 I 型,其他类型几乎不能溶解(表 5)。

表5 基于溶解性的胶原蛋白分类

种类	增溶方法	特点
中性盐溶性胶原蛋白	0.15 ~ 0.5M NaCl in 0.05M Tris-HCl, pH7.5	多为新合成的胶原蛋白。 α 链和 β 链的部分较多,主要为 I 型胶原蛋白。
酸溶性胶原蛋白	0.5M 醋酸或 0.1-0.3M 柠檬酸缓冲液 pH 3.5-3.7	与中性盐溶性胶原蛋白相比,, γ 链更多,聚集体分子量更高。主要为 I 型胶原蛋白。
酶溶性胶原蛋白	胃蛋白酶和链霉蛋白酶等的蛋白分解酶酸 pH	端肽(非螺旋部分)被链霉蛋白酶去除。纤维形成速度慢,稳定性低。除 I 型以外, II 型和 III 型也可溶。
不溶性胶原蛋白		一般指提取中性盐溶性胶原蛋白和酸溶性胶原蛋白后的残留物。通过交联被坚固地稳定化。

II-3 胶原蛋白的功能

一直以来,研究人员认为胶原蛋白主要负责维持活体的形态,保护各个内脏间的结合等物理性功能。但是,最近研究表明,胶原蛋白还具有重要的生物学作用。例如,诱导血小板聚集,促进血小板释放颗粒、各类细胞的基质和细胞的分化(生肌细胞分化成肌纤维等)、骨骼和牙齿的钙化、创伤的治愈,以及维持光和物质的透过性等等(在这些功能中,胶原蛋白作为基质在维持各类细胞的增殖形态以及分化功能中发挥的作用请参考 I-2 部分)。因此,今后在利用胶原蛋白时,可参考以上作用进行研究开发。

作为参考,表 6 总结了胶原蛋白的化学和生化特性,并与其变性物明胶进行了对比。

表6 胶原蛋白的化学和生化特性以及与明胶的对比

检测法	胶原蛋白	明胶
氨基酸检测法	1/3 为甘氨酸,亚胺酸含量高,不含色氨酸,疏水性氨基酸较少,还有羟脯氨酸 / 羟赖氨酸。	基本相同,但碱性处理的明胶略有不同。
等离子点	9.0 ~ 9.2	4.8 ~ 5.2(碱性处理明胶) 6.5 ~ 9.0(酸处理法明胶)
使用胃蛋白酶等蛋白酶进行处理	可溶,但胶原螺旋部分(I 型为 95%)保持完整	分解
使用细菌胶原酶进行处理	分解	相同
动物胶原酶的特异性分解	产生 3/4 和 1/4 片段	切断成小肽或完全不切断
圆二色光谱	220 nm 附近显示正吸收	显示负值
粘性	高	显著降低
凝胶化能力	有,在中性 pH 以及适当的离子强度下温度会提高(25~37°C)(形成纤维)	有,大部分的 pH 范围,温度降低(25°C 以下)(通过氢键)
盐析(溶解度)	溶于中性盐,但可用浓 NaCl 盐析	溶解
分子量	约 30 万	10 万(α)、20 万(β)、30 万(γ)、和 30 万以上大分子量成分,以及 10 万以下的小分子量成分也存在。
酸性中的溶解度	溶解度良好,但添加 NaCl 会沉淀	溶解度良好

II-4 胶原蛋白的应用

在使用胶原蛋白时，需考虑原料，胶原蛋白的类型，溶解的方法等，选择适合目的选择使用胶原蛋白非常重要。例如，肌腱胶原蛋白与皮肤胶原蛋白相比，更不易受蛋白酶的作用影响，酸溶性胶原蛋白比酶溶性胶原蛋白形成纤维的速度更快，凝胶的强度更高。

以下总结了胶原蛋白现有的用途以及今后备受期待的用途。

II-4-1 化妆品

现在，世界各国不断地应用胶原蛋白于化妆品领域，在日本也有许多公司售卖使用了胶原蛋白的产品。作为化妆品使用的胶原蛋白有两类，分别是酸溶性和酶溶性胶原蛋白，以及水解成分子量约 1,000~10,000 左右的肽获得的胶原蛋白。第一类主要用于护肤霜和软膏，可保持皮肤的水分，赋予弹性和光滑等的效果。胶原蛋白肽主要用于洗发水、护发素、护发剂、指甲油等。其作用主要是补水，形成膜保护皮肤等。

II-4-2 医用材料^{31, 32)}

最近，胶原蛋白在医用材料中的应用备受瞩目。使用的胶原蛋白的形状因用途而异，但大致分为不破坏组织结构直接利用，以及利用可溶性胶原蛋白。直接利用组织结构的案例有作为人造血管的牛颈动脉以及治疗烧伤用的猪皮。利用可溶性胶原蛋白时，大部分用于加工成适用于该用途的形状(表 7)。

胶原蛋白适用于医用材料的理由如下：

首先，胶原蛋白与其它蛋白相比，抗原性非常低。胶原蛋白的抗原决定部位主要存在于端肽中，但酶溶性胶原蛋白中，其端肽已被去除，抗原性几乎不成问题。此外，在纤维和膜的加工过程中导入戊二醛或 γ 射线交联的话，酸溶性胶原蛋白的抗原性会明显减少。由于胶原蛋白作为各类细胞的基质发挥作用，作为医用材料应用于活体时，与组织的亲和性良好，可用作细胞发育的踏板。因此，与合成大分子相比，胶原蛋白与活体的相容性更好。

另外，胶原蛋白还可以通过化学修饰调节性质。例如，通过引入交联，缓解了活体内胶原蛋白的消化分解速度。甲基化胶原蛋白并形成血栓性，或者琥珀酰化胶原蛋白形成抗血栓性。

表7 胶原蛋白的形状及其应用

形状	用途
溶液	血浆离子增强液，涂层
凝胶	玻璃体替代物，伤口敷料
粉末	止血剂，Drug Delivery
纺丝纤维	缝合线，人工血管，人工皮肤，人工肌腱
滤膜	角膜，Drug Delivery
膜	血液透析膜，人工硬脑膜，人工鼓膜，防粘连膜
管	人工血管，人工胆管，管状器官
中空丝	血液透析膜，人工肺膜
海绵	伤口敷料，止血剂

※ 引用自 宮田輝夫、A. L. Rubin, K. H. Stenzel., 人工臓器資料集成(越川昭三、桜井靖久、中林宣男), p.90, ライフ・サイエンス・センター (1976)

III 关于Cellmatrix（细胞培养用胶原蛋白）

III-1 Cellmatrix的特征和种类

通过使用 Cellmatrix Type I-A，可简单进行例如悬浮胶原蛋白凝胶培养法，以及胶原蛋白凝胶包埋培养法等使用胶原蛋白的新型培养法。

大量的报告显示，

- 与传统单层培养法相比，可观察到原代培养细胞(尤其是上皮细胞)的增殖维持和促进形态形成
- 与传统单层培养法相比，可诱导维持细胞分化功能

胶原蛋白凝胶培养法使用的领域越来越广泛。此外，传统的胶原蛋白涂层法也可使用 Cellmatrix。

Cellmatrix Type I-A



- 浓度为 3.0 mg/mL, pH 3.0 的猪腱来源酸可溶性 Type I 胶原蛋白溶液
- 与鼠尾来源胶原蛋白凝胶相比，可更快地重组坚硬且一致性高的凝胶
- 不仅在凝胶表面，细胞在凝胶中也能成长发育，培养结果重复性高
- 使用凝胶培养的细胞可在与 *in vivo* 相似的三维形态中增殖

Cellmatrix Type I-P



- 浓度为 3.0 mg/mL, pH 3.0 的猪腱来源胃蛋白酶可溶性 Type I 胶原蛋白溶液
- 与 Cellmatrix Type I-A 相比，凝胶强度低，适用于不追求凝胶强度的培养
- 价格优惠，适用于大量培养
- 包被 Cellmatrix Type I-A 或 Type I-P 于组织培养皿可有效在胶原蛋白膜表面培养细胞

Cellmatrix Type I-C



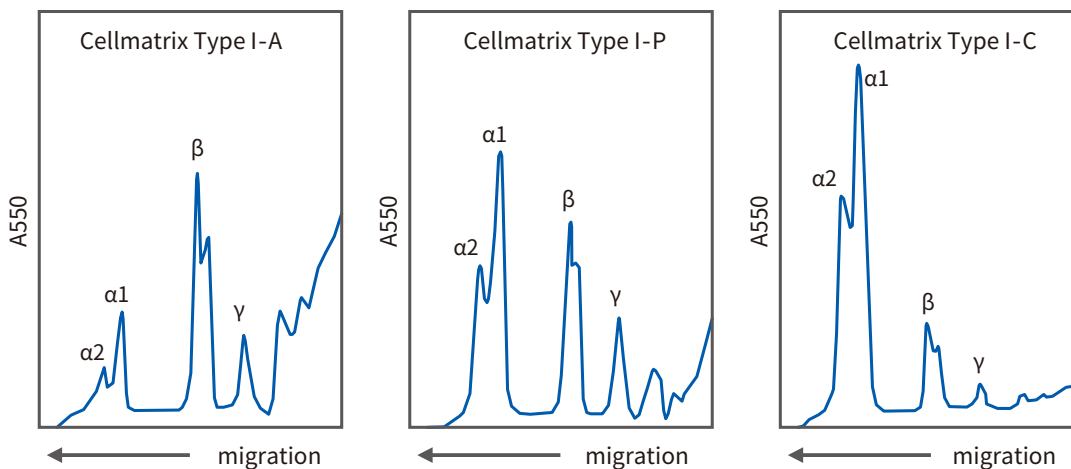
- 浓度为 3.0 mg/mL, pH 3.0 的猪皮来源胃蛋白酶可溶性 Type I 胶原蛋白溶液
- 用于包被培养皿，在胶原蛋白膜表面培养细胞

III-2 Cellmatrix Type I 的物理及化学性质

III-2-1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分别等量混合 Cellmatrix Type I-A, Type I-P, Type I-C 和含有浓度为 0.2% SDS 的磷酸缓冲液。45°C, 30 min 加热变性后, 使用浓度为 5% 丙烯酰胺的凝胶, 并用 Waber 和 Obsorn 的方法进行电泳(图 2)。Type I-C 与 Type I-A 和 Type I-P 相比, 几乎不存在巨大的聚集体。

图2 Cellmatrix Type I的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

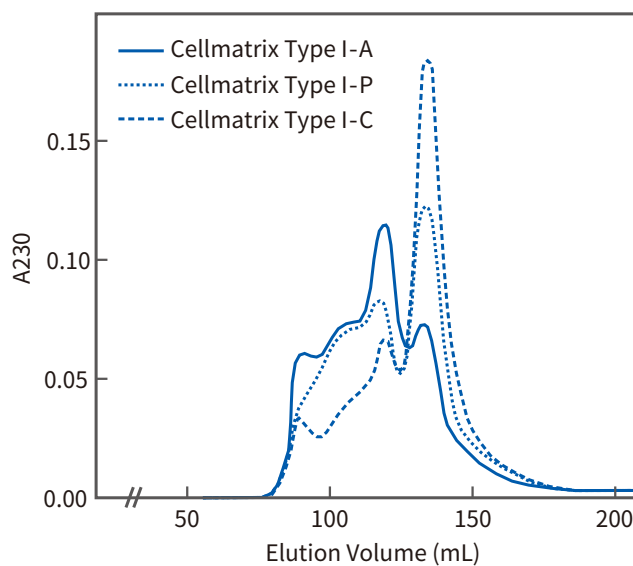


III-2-2 分子量分布

45°C, 30 min 加热变性 Cellmatrix Type I-A、Type I-P 和 Type I-C 后, 使用 TOYOPEARL HW-60S 过滤凝胶, 测定分子量分布(图 3)。

与电泳结果相同, Type I-A 与 Type I-P 和 Type I-C 相比, 大分子量部分的比例较高。

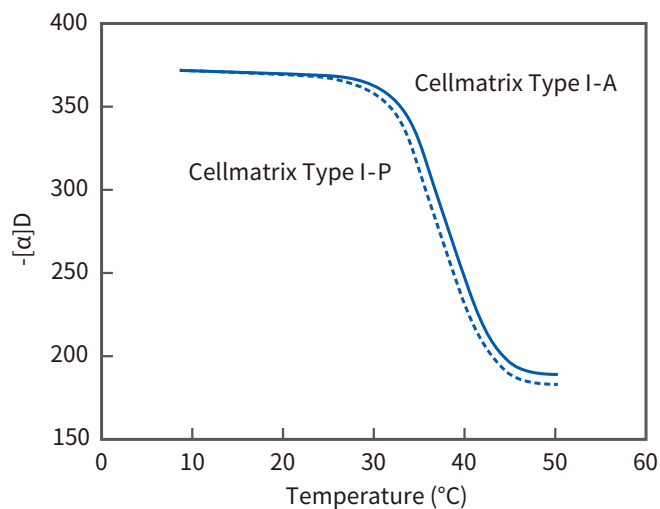
图3 使用Cellmatrix Type I 的TOYOPEARL HW-60S进行凝胶过滤层析



III-2-3 变性温度

检测 Cellmatrix Type I-A 和 Type I-P 对各温度的旋光度变化，研究变性温度(图 4)。结果显示，Type I-A 的变性温度为 39.5°C, 与 Type I-P 的变性温度 39°C 相比，变性温度更高。

图4 Cellmatrix Type I的旋光度变化



III-2-4 氨基酸组成

Cellmatrix Type I-A、Type I-P 和 Type I-C 在 6N 盐酸中，真空 110°C，24 h 的条件下水解并进行氨基酸分析(表 8)。与 Type I-A 相比，Type I-P 的酪氨酸较少，Type I-C 的酪氨酸更少，表明胶原蛋白的端肽部分已去除。

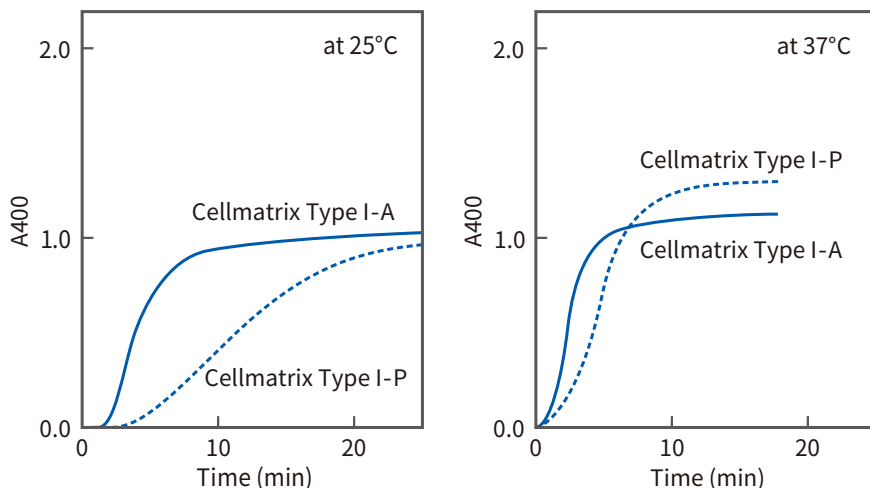
表8 Cellmatrix Type I 的氨基酸组成 (残基/1,000残基)

Cellmatrix	Type I-A	Type I-P	Type I-C
羟脯氨酸	97.0	100.4	99.1
天冬氨酸	43.5	44.1	44.5
苏氨酸	17.2	16.5	16.5
丝氨酸	33.2	31.3	34.5
谷氨酸	73.0	70.8	71.0
脯氨酸	117.6	113.5	112.0
甘氨酸	324.5	329.2	332.4
丙氨酸	113.8	112.9	111.0
缬氨酸	22.7	24.3	24.0
蛋氨酸	6.7	5.5	5.0
异亮氨酸	12.2	14.6	14.5
亮氨酸	30.2	30.8	30.1
酪氨酸	5.0	2.5	1.2
苯丙氨酸	12.5	13.5	14.0
羟赖氨酸	9.2	9.0	8.0
赖氨酸	23.1	22.6	22.7
组氨酸	5.2	4.9	4.8
精氨酸	53.8	53.8	53.1

III-2-5 凝胶化速度

Cellmatrix Type I 在生理条件下会形成纤维并凝胶化。取 8 份 Cellmatrix 和 1 份 10 倍浓度的磷酸缓冲盐水和 1 份 NaOH 在 4°C 下混合, 调至 pH 7.4, 并加热至 25°C 和 37°C, 检测 400 nm 处的吸光度变化(图 5)。结果显示, Type I-A 的凝胶化速度非常快。此外, Type I-A 与 Type I-P 相比, 温度对凝胶化的影响小。

图5 Cellmatrix Type I的凝胶化速度



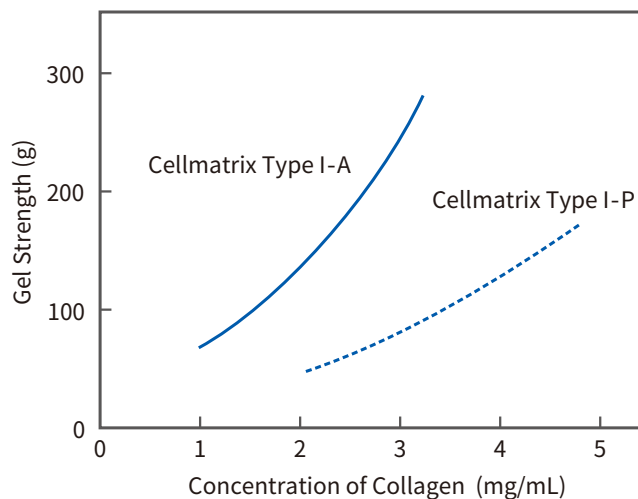
III-2-6 凝胶强度

【浓度对凝胶强度的影响】

在与 III-2-5 凝胶化速度相同的实验条件下, 使用各浓度的 Cellmatrix Type I-A、Type I-P 进行制备。37°C 下放置 1 h 后, 使用流变仪检测凝胶强度(图 6)。

Type I-A 与 Type I-P 相比, 显示非常高的凝胶强度。此外, 浓度依赖性也很高。

图6 浓度对Cellmatrix Type I凝胶强度的影响

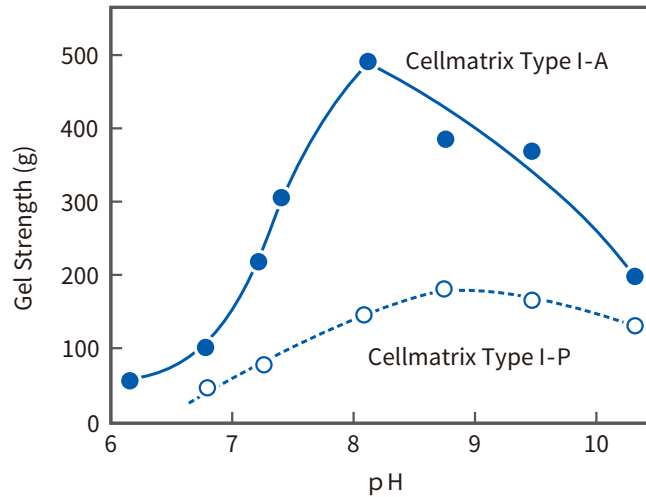


【pH对凝胶强度的影响】

添加磷酸盐缓冲溶液至 Cellmatrix Type I，在 NaOH 中将 pH 值调至 6~10, 37°C 下放置 1 h 后检测凝胶强度，检测 pH 对其的影响(图 7)。

Type I-A 与 Type I-P 相比，凝胶强度的 pH 依赖性更高，凝胶强度值也非常高。

图7 pH对Cellmatrix Type I凝胶强度的影响

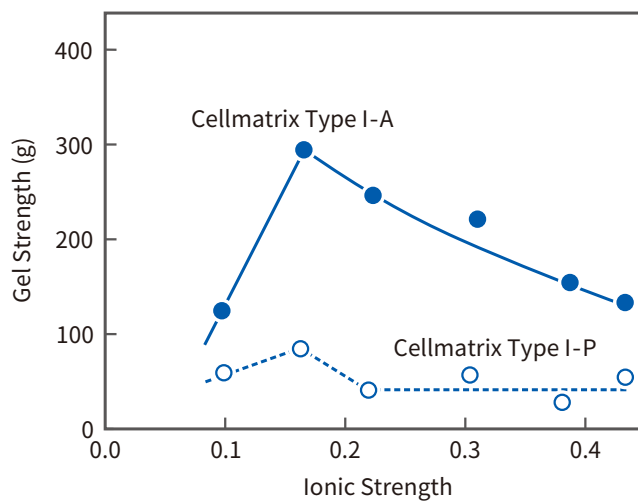


【离子浓度对凝胶强度的影响】

添加磷酸盐缓冲溶液至 Cellmatrix Type I，在 NaOH 中将 pH 值调至 7.4, 37°C 下放置 1 h 后检测凝胶强度，研究离子强度的影响(图 8)。

Type I-A 与 Type I-P 相比，凝胶强度的离子浓度依赖性高，凝胶强度值也非常高。

图8 离子浓度对Cellmatrix Type I凝胶强度的影响



IV 关于胶原蛋白

IV-1 胶原蛋白凝胶基质溶液的制备法

IV-1-1 准备

提前准备以下溶液 A、B 和 C，并在冰中冷却待用。

A 溶液: 0.3% Cellmatrix Type I-A 或 Type I-P

B 溶液: 10 倍浓度或 5 倍浓度的浓缩培养基

亦可参考以下内容，自行制备：

浓缩培养基和市售粉末培养基请不要添加碳酸氢钠，一般使用时，制备 10 倍浓度的溶液，并过滤除菌。此外，在 10 倍浓度的培养基中添加一般使用量 10 倍量的抗生物质。但是，如果是 DME 溶液这种 10 倍浓度难溶的情况下，可制备 5 倍浓度的溶液。

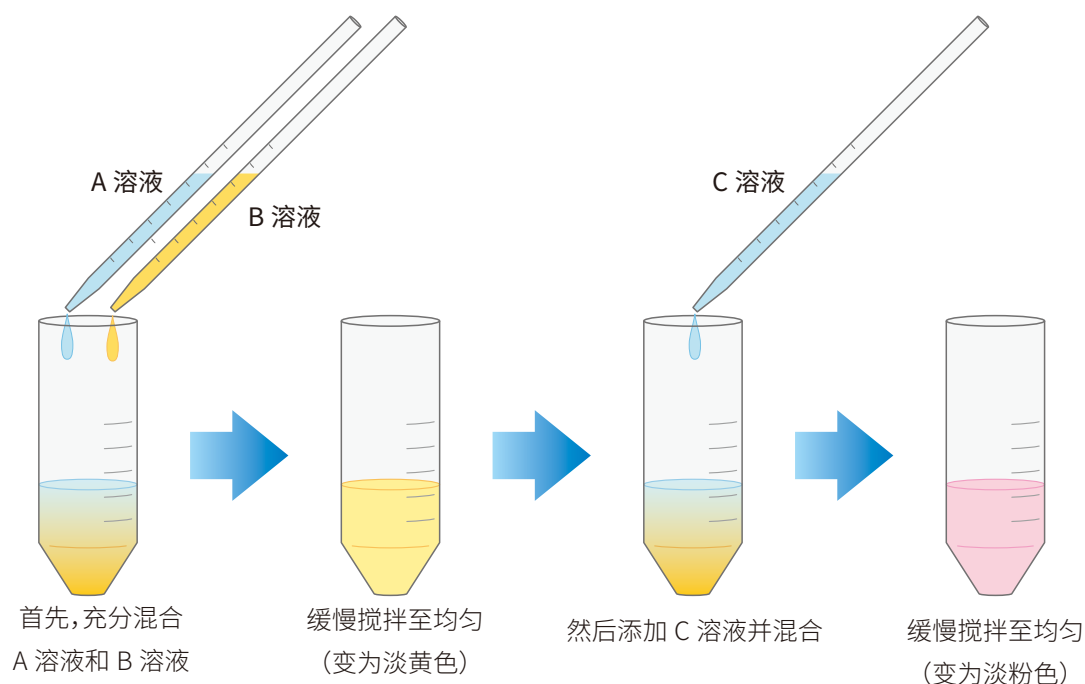
C 溶液: 重组用缓冲液

使用 100 mL 0.05N 氢氧化钠溶液，溶解 2.2 g 碳酸氢钠和 4.77 g HEPES，过滤灭菌制备的溶液。重组后的 HEPES 浓度为 20 mM。

注意 1 大量储存重组用缓冲液时，碳酸氢钠会释放 CO_2 ，建议分装成 10 mL 并密封保存。另外，若不添加碳酸氢钠，请按照括号中的方法制备重组用缓冲液（使用 100 mL 0.08N 氢氧化钠溶液，溶解 4.77 g HEPES，并过滤灭菌。）

IV-1-2 制备胶原蛋白混合溶液

边冷却边以 8:1:1 的比例混合 A、B、C 溶液（B 溶液为 5 倍浓度培养基时，以 7:2:1 的比例混合。若置于冰中，胶原蛋白不会发生凝胶化）。



下文中,A、B、C 混合溶液简称为胶原蛋白混合溶液

如果想要添加血清、血清白蛋白、生长因子或细胞(参考胶原蛋白凝胶内培养)等至胶原蛋白凝胶中时,请在 A、B、C 混合溶液制备完成后,低温加入。

注意 2 混合 A、B、C 溶液时,若冷却的方法有误,则会凝胶化,所以需要充分进行冷却(适宜温度为 4°C)。

注意 3 关于胶原凝胶使用的移液器,由于胶原蛋白粘性高,不建议使用常规的移液器。建议使用前端部分较粗的一次性塑料制移液管(例如,Falcon,Corning 的培养用 5 mL、10 mL 移液管)或活塞代排式移液器。

注意 4 混合 A、B、C 溶液使用的容器,由于胶原蛋白的粘性高,不建议使用像试管那样的细长型容器。因此,建议使用离心管(例如,50 mL 培养用塑料制离心管等)以及锥形瓶等较宽的容器。

【胶原蛋白混合溶液的pH值和离子浓度】

A、B、C 溶液以 8:1:1 的比例混合添加后,pH 值为 7.4,离子浓度 NaCl 为 0.14M。混合溶液的 pH 值参考酚红的颜色来确定。但是,当 pH 值不是 7.4 时,可以尝试添加 1N-HCl 或 1N-NaOH。或者,通过调整 C 溶液的量重新制备。放入 CO₂ 孵育箱后,胶原蛋白凝胶的 pH 值无法马上进行调整,因此制备胶原蛋白凝胶时请充分注意。

IV-1-3 制备胶原蛋白凝胶

将冷却的胶原蛋白混合溶液分注于培养皿。这时,请使用移液器的尖端搅拌 2~3 次培养皿,制备厚度均匀的胶原蛋白层(若使用大量的胶原蛋白制备较厚的胶原蛋白层时,可省略此步骤)。胶原蛋白混合溶液在加热的同时会凝胶化,所以使用 0.3% 的 Cellmatrix Type I-A 时,25°C 下需要 10~20 min,37°C 下孵育需要 5~10 min 完成凝胶化(参考 III-2 物理及化学性质)。

注意 5 将胶原蛋白混合溶液转移至培养皿,凝胶化过程中请不要振动。例如,转移至 CO₂ 孵育箱时要注意尽量不要摇晃它。如果在凝胶化过程中振动胶原蛋白混合溶液的话,可能会凝胶化失败。

注意 6 建议使用一次性塑料制移液器(例如,1 mL 以下建议使用 CLAY ADAMS 的可调移液器),无需清洗,非常方便。

【清洗玻璃制仪器的方法】

如粘附有胶原蛋白培养瓶,可用 50~60°C 的热水浸泡 30 min,在胶原蛋白变性后,使用洗涤剂进行清洗。清洗移液管时,可用高压灭菌锅(120°C,15 min)或浸泡在沸水浴中溶解胶原蛋白。也可在强酸(2N 以上的 HCl)中浸泡几日。

IV-2 胶原蛋白凝胶表层培养法

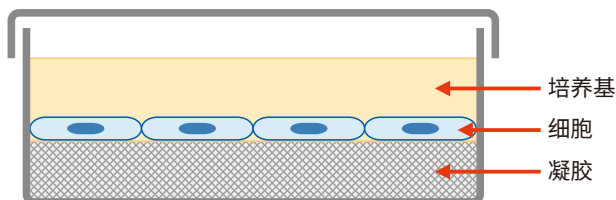
IV-2-1 贴壁胶原蛋白凝胶培养法 (Attached Collagen Gel Culture Method)

本方法是在胶原蛋白凝胶基质上单层培养细胞的培养法。

【操作步骤】

1. 根据 IV-1 的方法,在培养皿制备胶原蛋白凝胶。
2. 在凝胶上接种 Cell Suspension,细胞粘附于凝胶后,使用常规的单层培养法的方法进行培养。
3. 添加血清以及其他的生理活性物质至凝胶中时,需在制备混合溶液时预先进行混合(由于培养基会快速渗入胶原蛋白凝胶中,所以无需特意添加血清至凝胶中)。(图 10)

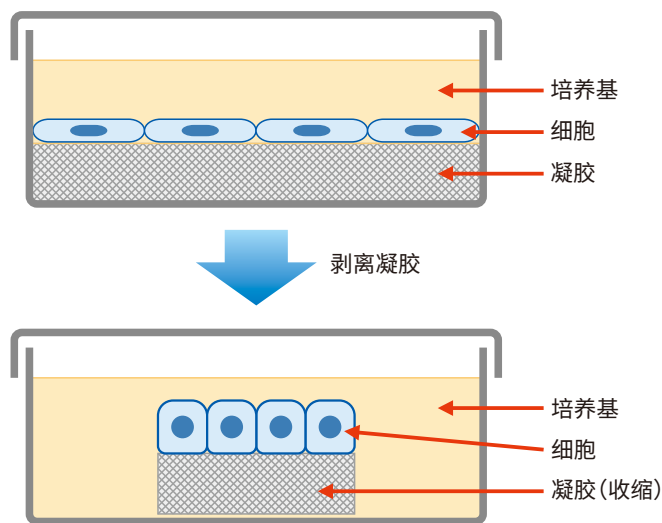
图10 贴壁胶原蛋白凝胶培养法



IV-2-2 悬浮胶原蛋白凝胶培养法 (Floating Collagen Gel Culture Method)

本方法是使用上述的胶原蛋白凝胶表层培养法(IV-2-1)进行培养,细胞粘附于胶原蛋白凝胶形成单层后,从培养皿中剥离凝胶,细胞粘附状态下在培养基中进行悬浮的方法。通过该方法进行培养,可以使细胞长期维持分化功能(图 11)。剥离凝胶时,使用注射针或镊子沿着培养皿内壁转一圈后,将注射针从外围向中间按压,凝胶就会悬浮于培养基中。更换培养基时,请小心不要让凝胶吸入移液管。

图11 悬浮胶原蛋白凝胶培养法



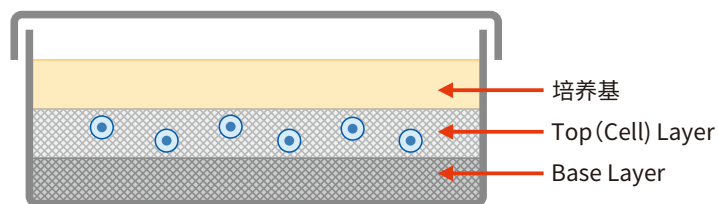
IV-3 胶原蛋白凝胶包埋培养法 (Collagen Gel Embedded Culture Method)

本方法是将细胞包埋于胶原蛋白凝胶基质,三维培养细胞的方法。

【操作步骤】

1. 首先,在培养皿中制备胶原蛋白凝胶层,作为 Base Layer。
2. 然后,在少量的血清或培养基等中分散细胞,将分散的细胞添加至胶原蛋白混合溶液中,并充分混合。如果通过移液器进行混合的话,胶原蛋白会起泡,因此建议摇晃容器进行混合。
3. 将上述的细胞和胶原蛋白混合溶液分注于 Base Layer 上后,立即在 37°C 下凝胶化,作为 Top Layer(或 Cell Layer)。凝胶中,所以无需特意添加血清至凝胶中)。(图 10)
4. Top Layer 硬化后,覆盖培养基(Overlay Medium)。(图 12)

图12 胶原蛋白凝胶包埋培养法



注意 7 制备 Base Layer 的目的在于制备包含细胞的 Cell Layer 时,防止部分细胞在凝胶化前贴壁于培养皿底部形成单层。

【各尺寸培养皿中胶原蛋白和培养基的使用量】

使用不同尺寸的培养皿时建议的胶原蛋白凝胶以及培养基用量请参考表 9。

表9 各尺寸培养皿的胶原蛋白凝胶以及培养基建议使用量

培养皿的尺寸	Base Layer	Top Layer	Overlay Medium
16 mm (多孔)	0.5 mL	0.5 mL	1 mL
35 mm	1 mL	2 mL	2 mL
60 mm	2 mL	5 mL	5 mL
100 mm	5 mL	10 mL	12~15 mL

注意 8 覆盖 Cell Layer 后,立即放入 37°C 的孵育箱使其凝胶化。(细胞块等由于重量会下沉,导致分布不均)

【更换培养基】

根据胶原蛋白中的细胞数量决定培养基的更换频率。由于胶原蛋白凝胶中的细胞是三维增殖的,与单层培养相比,细胞数量较多,因此当细胞数量增加时必须频繁的更换培养基。如果因细胞增殖过多,缺乏营养导致受损的话,请立即根据后述的方法进行传代。

【胶原蛋白溶液的种类和浓度对培养细胞的影响】

根据使用细胞的种类(尤其是上皮细胞),研究人员已通过实验确认胶原蛋白的浓度,即胶原蛋白的凝胶强度对不同细胞的形态、功能以及增殖有影响。因此,使用胶原蛋白时,应根据细胞的种类选择合适的胶原蛋白浓度。使用胶原蛋白培养首次培养的细胞时,建议用无菌的稀盐酸(pH 3.0)稀释 0.3% 胶原蛋白溶液至 0.2%、0.1% 和 0.05% 后再使用,然后根据其结果选择适合该细胞的胶原蛋白浓度进行培养。例如,研究人员在调查细胞的形态和功能时使用 0.3% 胶原蛋白溶液,若想要加速细胞增殖或大量获得细胞时使用 0.15% 胶原蛋白。

注意 9 使用稀盐酸(pH 3.0)稀释 0.3% 胶原蛋白溶液的方法:由于 0.3% 胶原蛋白溶液粘度高,即使添加稀盐酸也很难获得均匀的溶液,所以添加至稀盐酸后请充分摇晃容器进行混合或使用磁力搅拌器进行充分搅拌。建议使用磁力搅拌器在 4°C 下搅拌 4~8 h。搅拌时请控制速度以防起泡。

【Cellmatrix Type I-A和Type I-P的差异】

Cellmatrix Type I-A 是天然的酸溶性胶原蛋白,Type I-P 是胃蛋白酶溶解的酸溶性胶原蛋白。这两种胶原蛋白纤维化(凝胶化)时,重组形成的纤维是不一样的。此外,在物化性质上,它们在相同浓度时的凝胶强度也不同。因此,根据细胞的种类,细胞的增殖和形态在 Cellmatrix Type I-A 和 Type I-P 中也有差异。以研究人员使用的细胞(上皮细胞,上皮癌细胞)为例,Type I-P 的增殖速度更快,但是 Type I-A 具有更接近于活体内形态的三维结构。另外,Type I-A 的胶原蛋白凝胶透明度更高,更易于显微镜观察。

IV-4 在胶原蛋白凝胶内增殖的细胞的提取法、传代法以及细胞集落的选择法

IV-4-1 细胞的提取法

为提取活细胞,必须使用胶原酶溶解凝胶。请根据以下操作步骤进行操作。

【操作步骤】

1. 去除覆盖的培养基后,使用剪刀将培养皿中的胶原蛋白凝胶剪成约 3mm² 的方块,添加胶原酶(Type S-1 等)至终浓度为 0.02%。使用摇床(例如, rotary shaker 100 rpm)摇晃溶解。(例如, 1 mL 的凝胶添加 20 μL 的 1% 胶原酶)设定温度为 37°C。1 mL 的凝胶完全溶解一般需要 30 min~1 h。但是,根据胶原蛋白凝胶内的细胞种类不同,会影响凝胶,使溶解

性变差。

2. 将培养皿中的细胞转移至离心管,并在慢速的离心机中收集细胞。
3. 在 Hank's 液或其他溶液中分散细胞,清洗并再次慢速离心。
4. 然后用于 DNA 测定或传代等。

IV-4-2 传代法

【操作步骤】

1. 如上所述,使用胶原酶溶解凝胶,提取细胞。(以下所有步骤均需要在无菌环境中进行)
2. 清洗细胞 2~3 次,完全去除胶原酶。
3. 使用少量的培养基分散细胞,并混合于冷却的胶原酶混合溶液中。接着,使用常规法转移至培养皿,使其凝胶化。
4. 如果仅进行胶原酶处理,则是以细胞块的状态进行培养。若想进行单一细胞的培养,胶原酶处理后,还需使用链霉菌蛋白酶、胰蛋白酶或胰蛋白酶 +EDTA 等分散细胞块。
5. 充分清洗细胞后,根据上述的步骤与胶原蛋白混合溶液混合,在凝胶中进行培养。
6. 作为简单的传代法,也可用剪刀剪碎含有细胞的胶原蛋白凝胶,部分使用冷却的胶原蛋白混合溶液分散,转移至新的培养皿中凝胶化。

IV-4-3 细胞集落的选择法

通过在胶原蛋白凝胶内培养,可以像软琼脂培养那样提取出三维增殖的细胞集落。

【操作步骤】

1. 在胶原蛋白凝胶内培养少量的细胞 ($10^2\sim 10^4$ cells/60 mm dish),等待细胞集落发育成合适的大小(直径 0.5~1 mm)。
2. 使用眼科剪刀在解剖显微镜下切取细胞集落(切割成周围附有胶原蛋白凝胶的细胞集落)。
3. 将附有胶原蛋白凝胶的细胞集落混合于胶原蛋白混合溶液,然后分注于新的培养皿,凝胶化并培养。
4. 若想细胞集落变得更小
 - a. 使用剪刀剪碎细胞集落
 - b. 使用胶原酶处理
 - c. 胶原酶处理后,使用链霉菌蛋白酶、胰蛋白酶或胰蛋白酶 +EDTA 等使细胞集落变小。
5. 使用酶分离的细胞,充分清洗后,在胶原蛋白混合溶液中分散后在胶原蛋白凝胶内进行培养。

IV-5 细胞增殖度的检测法

要确定在胶原蛋白凝胶中增殖的细胞数量,可检测 DNA 的数量或统计细胞核数量来推算细胞数量。

IV-5-1 DNA量的测定 (Hinegardner方法)³⁴⁾

通过使用荧光法,即使是 0.1 μg 的 DNA(约等于 $\sim 1.7\times 10^4$ cells)也可检测。

【操作步骤】

1. 使用剪刀将胶原蛋白剪成细条状后,用胶原酶溶解,并通过离心(转速达到 8,000 rpm 后立即关闭)收集细胞;
2. 使用 PBS (Phosphate-Buffered Saline) 清洗细胞,再次离心;
3. 使用乙醇固定细胞;
4. 5~10 min 后离心,吸走乙醇,干燥;
5. 添加二氨基苯甲酸盐酸盐溶液(用 1 mL 蒸馏水溶解 0.4 g Diaminobenzoin Acid)(使用 1.5 mL 离心管时使用 0.2 mL 苯甲酸),60°C 下加热 45 min;
6. 反应终止后,添加 1N-HCl,检测荧光强度(Ex 415 nm,Em 505 nm)。

IV-5-2 细胞核数量的测定方法 (Sanfordetst方法) ³⁵⁾

通过在胶原蛋白凝胶内培养,可以像软琼脂培养那样提取出三维增殖的细胞集落。

【操作步骤】

1. 使用剪刀将胶原蛋白剪成细条状后,用胶原酶溶解凝胶;
2. 通过离心收集细胞;
3. 在 0.1 M 柠檬酸 /0.1% 结晶紫溶液中分散细胞,并用搅拌器剧烈搅拌以破坏细胞;
4. 用血细胞计数器统计染色的细胞核。

IV-6 培养细胞样品的保存方法

【操作步骤】

1. 细胞保存首先需要固定。用 PBS 清洗胶原蛋白凝胶后,在 10% 福尔马林(Hank's 液)中浸泡过夜,固定凝胶以及细胞。固定后在流水冲洗除去福尔马林;
2. 固定后,将其浸入含有 0.02% NaN_3 (叠氮化物)的蒸馏水中,即可作为 Wet Sample 保存。这时,可以将该样品放至培养皿中保存,亦可将凝胶从培养皿中取出放到别的容器中保存。使用培养皿保存时,需在培养皿周围贴上胶带防止蒸发。此外,也可以按照组织标本的制备法,按照 70% 酒精,100% 酒精,二甲苯的顺序各浸泡数小时后,在二甲苯中保存。之后,可通过石蜡包埋制备显微镜切片;
3. 固定后,自然干燥或在 50°C 以下的干燥机中干燥即可制备 Dry Sample;
4. 关于染色,固定后,添加吉姆萨液,放置数小时后用流水冲洗去除多余的染料;
5. 然后,按照上述步骤作为 Wet Sample 或 Dry Sample 保存。

V 胶原膜表层培养法 (胶原蛋白涂层培养法)

V-1 制备膜后,中和的方法

【操作步骤】

1. 取少量胶原蛋白溶液(稀盐酸溶液 pH 3.0)适当稀释 10 倍以上,然后注入培养皿中,并稍微摇晃使其涂布均匀。若想要尽快干燥,可吸走多余的胶原蛋白溶液;
2. 为防止胶原蛋白变性,请在 25°C 以下的温度进行干燥(将无菌的空气注入培养皿或打开培养皿的盖子置于超净工作台进行干燥);
3. 胶原蛋白溶液干燥后,使用 UV 灭菌(若胶原蛋白溶液是在无菌的状态下进行干燥的话,则无需灭菌)。灭菌条件为使用 15 W UV 灯在距离培养皿 20 cm 处照射 20 min;
4. 灭菌后,使用 Hank's 液或培养基充分清洗,去除胶原蛋白膜的酸;
5. 将细胞悬液涂覆到胶原蛋白膜层上,细胞粘附于胶原蛋白膜后,按常规的单层培养法进行培养。

V-2 中和后,制备膜的方法

通过在胶原蛋白凝胶内培养,可以像软琼脂培养那样提取出三维增殖的细胞集落。

【操作步骤】

1. 按照 IV-1-2 的方法,边冷却(建议温度: 4°C)边制备胶原蛋白混合溶液;
2. 向培养皿中注入少量的胶原蛋白混合溶液,并稍微摇晃使其涂布均匀(该操作需要边冷却,边迅速地进行以防胶原蛋白混合溶液凝胶化);
3. 接下来的操作步骤与 V-1 操作步骤的 2~5 相同。但是,步骤 4 的操作由于需去除胶原蛋白中的盐,所以操作相同。

VI 总结・文献

关于以上所述的胶原蛋白凝胶培养法, 近期在日本国内有许多的研究发表, 1985年3月胶原蛋白研究会以该主题召开了座谈会³⁶⁾。同年5月, 日本组织培养学会也举行了相同主题的会议。综上, 胶原蛋白凝胶培养法在越来越多的领域中被使用。

以下是部分引用文献以及参考文献, 更多应用文献请咨询中国地区总代理富士胶片和光。

文献

1. 永井裕、藤本大三郎編、コラーゲン代謝と疾患。講談社 (1982)
2. J. Yang & S. Nandi, *Int. Rev. Cytol.*, 81, 249-286 (1983)
3. H. K. Kleinman, R. J. Klebe & G. R. Martin, *J. Cell. Biol.*, 88, 473 (1981)
4. R. L. Ehrmann & G. O. Gey, *Natl. Cancer Inst.*, 16 (6), 1375-1400 (1956)
5. C. Grobstein, *Exp. Zool.*, 124, 383-388 (1953)
6. D. Gospodarowicz, G. Greenberg & C. R. Birdwell, *Cancer Res.*, 38, 4155 (1978)
7. M. Wicha, L. A. Liotta, S. Garbisa & W. R. Kidwell, *Exp. Cell. Res.*, 124, 181 (1979)
8. J. C. Murray, G. Stingle, H. K. Kleinman, G. R. Martin & S. I. Katz, *J. Cell Biol.*, 80, 197 (1978)
9. C. A. Sottler, & G. Michalopoulos, *Cancer Res.*, 38, 1539 (1978)
10. G. O. Gey, M. Suotelis, M. Foard & F. B. Bang, *Exp. Cell Res.*, 84, 63 (1974)
11. J. T. Emerman & D. R. Pitelka, *In Vitro.*, 13, 316-328 (1977)
12. J. Yang, J. Richards, P. Bowman, R. Guzman, J. Enami, K. McCormick, S. Hamamoto, D. R. Pitelka & S. Nandi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 3401-3405 (1979)
13. J. Yang, R. Guzman, J. Richards & S. Nandi, *In Vitro.*, 16, 502-506 (1980)
14. J. Yang, J. Richards, R. Guzman, W. Imagawa & S. Nandi, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2088-2092 (1980)
15. J. T. Emerman, J. Enami, D. R. Pitelka & S. Nandi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74 (10), 4460-4470 (1977)
16. J. Enami & S. Nandi, *J. Dairy Sci.*, 61 (6), 729-732 (1978)
17. 榎並淳平ほか、組織培養、9 (10), 397-400 (1983)
18. 榎並淳平ほか、日本組織培養学会第56回研究会発表、組織培養研究、2 (2), 48-49 (1983)
19. G. Michalopoulos & H. E. Pitot, *Exp. Cell. Res.*, 94, 70 (1975)
20. S. D. Hauschka & I. R. Konigsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55, 119 (1966)
21. J. W. Dodson & E. D. Hay, *J. Exp. Zool.*, 189, 51 (1974)
22. J. C. Murray, G. Stingle, H. K. Kleinman, G. B. Martin & S. I. Katz, *J. Cell Biol.*, 80, 197 (1978)
23. P. Bornstein and W. Traub., in *The Proteins* (Neurath, H. and Hill, R., eds), Vol. IV 411-632, Academic Press (1979)
24. D. J. S. Hulmes, A. Miller, D. A. D. Rarry, K. A. Piez, and J. Woodhead-Galloway, *J. Mol. Biol.*, 79, 137-148 (1973)
25. G. N. Ramachandran, in *Treatise on Collagen* (Ramachandran, G. N. ed.), Vol. 1 pp,103-184, Academic Press (1967)
26. 林利彦、現代科学。3月号, 26-34 (1981)
27. L. Peltonen, A. Palotie, T. Hayashi, and D. J. Prockop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 162-166 (1980)
28. 林利彦、コラーゲン代謝と疾患 (永井裕、藤本大三郎編), 13-49, 講談社 (1982)
29. コラーゲンの架橋の構造と機能に関する討論会、東京 (1981)
30. 藤原作平、コラーゲン代謝と疾患 (永井裕、藤本大三郎編), 110-133, 講談社 (1982)
31. M. Chvapil, in *Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects Vol.1* (Parry, D. A. D. and Creamer, L. K., eds.), 247-269, Academic Press (1979)
32. 宮田暉男、西沢優、コラーゲン—化学・生物学・医学 (野田晴彦、永井裕、藤本大三郎編), 251-282, 南江堂 (1975)
33. J. Yang, J. Richards, R. Guzman, W. Imagawa & S. Nandi, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2088-2092 (1980)
34. R. T. Hinegardner, *Anal. Biochem.*, 39, 197-201 (1971)
35. K. K. Sanford, W. R. Earle, V. J. Evans. et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 11, 773-795 (1951)
36. 第32回コラーゲン研究会抄録、5~38 (1985)
37. 組織培養研究、4 (2), 146-179 (1985)

相关资料的说明

《胶原蛋白培养法》引用了以下论文的内容。

因此,若使用本文中所述的方法进行胶原蛋白培养时,在发表研究结果时,请引用并标记以下的论文。

【日语论文】

榎並 淳平、肥塚 正博、羽多 正隆、川村 和男、橘 陽一、草間 良恵、古閑 睦好

- 1) 「コラーゲン・ゲル培養法(Ⅰ)」組織培養 13(1), 26-30, 1987
- 2) 「コラーゲン・ゲル培養法(Ⅱ)」組織培養 13(2), 64-68, 1987

【英语论文】

- 3) Enami, J., Koezuka, M., Hata, M., Enami, S. and Koga, M.

“Gel Strength-Dependent Branching Morphogenesis of Mouse Mammary Tumor Cells in Collagen Gel Matrix Culture”

Dokkyo J. Med. Sci. 12, 25-30, 1985

- 4) Enami, J., Enami, S., Kawamura, K., Kohmoto, K., Hata, M., Koezuka, M. and Koga, M.

Growth of Normal and Neoplastic Mammary Epithelial Cells of the Mouse by Mammary

Fibroblast-Conditioned Medium Factor In “Growth and Differentiation of Mammary Epithelial Cells in Culture”

ed. J. Enami and R.G Ham, pp. 125-153 (1987). Japan Scientific Societies Press(学会出版センター),

Tokyo, Japan

- 5) Enami, J. and Tsukada, Y.

Use of Collagen Gel as Three-Dimensional Matrix for Explant Culture In “Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures”

ed. J.B. Griffiths, A. Doyle and D.G. Newell, 3A, pp. 5.1-5.8 (1994). John Wiley & Sons, Chichester,

UK.



総合研究所 バイオメディカル部

〒581-0024 大阪府八尾市二俣2-22

TEL: 072-949-8702

EE-mail: info-bematrix@nitta-gelatin.co.jp

富士胶片 and 光(广州) 贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询



2203NGAU01

- 1) 本资料是由富士胶片 and 光译制
- 2) 本资料所刊载的内容和数据, 皆来自生产商Nitta Gelatin