

Collagen (Ratte)

Aus Rattenschwanzsehnen
Lyophilisat, steril

Best. Nr. 1 179 179

3 Gefäße mit 10 mg

Version 4, Januar 2002

Stabil bei 2–8°C

Produktübersicht

	Lyophilisat, steril.
Herstellung	Das Collagen wird aus Rattenschwanzsehnen nach einer modifizierten Methode von Bornstein gereinigt (1, 2). Collagen aus Rattenschwanz besteht überwiegend aus Typ I Collagen.
Rekonstitution	<p>Es wird empfohlen, das Lyophilisat in steriler 0,2% Essigsäure (v/v), zu lösen. Für die Herstellung von Collagen-Gelen sollte der Inhalt der Flasche in je 3,3 ml 0,2% steriler Essigsäure (v/v) gelöst werden. Dies ergibt eine Endkonzentration von 3 mg/ml.</p> <p>Für die Beschichtung von Kulturschalen kann die Lösung auf 1–2mg/ml weiter verdünnt werden.</p> <p>Hinweis: Zum Lösen die Essigsäure nur über das Lyophilisat gießen, nicht einrühren, einigen Stunden stehen lassen, bis es sich gelöst hat. Zum vollständigen Lösen des Produkts kann eine Inkubationszeit bis zu 24 h bei 15–25°C notwendig sein.</p>
Biologische Aktivität	Das Collagen wird auf seine Fähigkeit getestet, die Anheftung von humanen Nabelschnurendothelzellen zu fördern.
Arbeitskonzentration	<p>Die empfohlene Anwendungskonzentration für die Beschichtung von Kulturgefäßen ist 5 µg/cm².</p> <p>Für die Herstellung von Collagen Gelen wird eine Endkonzentration von 2–3mg/ml eingestellt.</p>
Speziesspezifität	Collagen (Rattenschwanz) ist bei den meisten Säugerzellen wirksam.
Anwendung	<ul style="list-style-type: none">• Collagen (Rattenschwanz) wird als Substrat zur Kultivierung von Zellen eingesetzt.• Collagen (Rattenschwanz) wird zur Beschichtung von<ul style="list-style-type: none">– Oberflächen (Kulturgefäße, Objektträger, Deckgläser, etc.) oder zur– Herstellung von Collagen Gelen verwendet.
Lagerung/Stabilität	<p>Stabil bei 2–8°C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum.</p> <p>Hinweis: Die rekonstituierte Lösung in steriler Essigsäure ist bei 2–8°C stabil.</p>

Protokolle und benötigte Materialien

Beschichtung von Zellkulturschalen

Überblick	<p>Rattenschwanz-Collagen ist für die Kultivierung von Zellen wichtig, die für Wachstum und Proliferation ein Substrat benötigen. Als Substrat wird Collagen entweder als dünner aufgetrockneter Collagen-Film oder als hydratisiertes Collagen-Gel eingesetzt (3–12).</p> <p>Ein dünner Collagen-Film wird hergestellt, indem man die Collagen-Lösung auf der Oberfläche einer Petrischale verteilt und lufttrocknen lässt.</p>
Zusätzlich benötigte Reagenzien	<ul style="list-style-type: none">• sterile 0,2% Essigsäure (v/v)• Medium oder Puffer zum Waschen

Protokoll

Beschichtung von Zellkulturschalen mit Collagen (= Collagen-Film).

Schritt	Aktion
1	Jedes Gefäß mit lyophilisiertem Collagen in 5 ml steriler 0,2% Essigsäure (v/v) lösen (= 2 mg/ml Collagen-Lösung).
2	2,5 µl per 1 cm ² (2 mg/ml) der zu beschichtenden Oberfläche in das Kulturgefäß pipettieren (5 µg/cm ²). Hinweis: Die Menge kann je nach Bedarf erhöht oder reduziert werden.
3	Die Collagen-Lösung vorsichtig mit einem sterilen Gummischaber über die Oberfläche des Kulturgefäßes verteilen.
4	Die aufgetragene Schicht 1h bei 15–25°C in der sterilen Werkbank lufttrocknen.
5	Es ist empfehlenswert, die beschichtete Oberfläche mit Medium oder Puffer zu spülen.
6	Die Kulturschalen können sofort benutzt oder unter sterilen Bedingungen gelagert werden.

Herstellung von Collagen-Gelen

Überblick

Collagen-Gele können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden. Bei einer Methode wird die Collagen-Lösung Ammoniakdämpfen ausgesetzt (s. Methode 1), bei einer weiteren der pH-Wert und die Ionenstärke der ist das Rattenschwanz-Collagen-Gel ein leichtes und nützliches System. Beide Verfahren werden im folgenden beschrieben; alle Arbeiten sollten in einer Laminar-Flow-Box (sterile Werkbank) durchgeführt werden.

Arbeitshinweise

- Um die Bildung eines homogenen Gels zu ermöglichen und die Klumpenbildung zu vermeiden, sollten die Kulturschalen während der Gelbildung nicht oder nur sehr vorsichtig bewegt werden
- Nach Anheftung der Zellen kann das Gel mit einer sterilen Pipettenspitze vom Kulturgefäß abgelöst werden. Das Gel schwimmt dann frei im Medium.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausrüstung

- sterile 0,2% Essigsäure (v/v), pH 3,0 oder 1 mM Salzsäure, pH 3
- Phenolrot (optional)
- 25% Ammoniaklösung (v/v)
- Zellkulturmedium
- 35 mm Petrischalen
- 60 mm Petrischalen

Methode 1

Schritt	Aktion
1	Jedes Gefäß in 3,3 ml steriler 0,2% Essigsäure (v/v), pH 3,0 oder 1 mM Salzsäure, pH 3,0 lösen (= 3 mg/ml Collagen-Lösung). Hinweis: Bei Zugabe von 2 µl/ml Phenolrot ist die pH-Änderung leichter zu kontrollieren.
2	Lösung über Nacht aufquellen lassen.
3	Davon je 100 µl/cm ² in die Kulturschalen pipettieren. Hinweis: Dies ergibt ein Collagen-Gel von 1 mm Schichtdicke
4	Collagen-Lösung dem Ammoniak-Dampf bei 15-25°C oder bei 37°C aussetzen.
5	Für eine 35-mm-Petrischale z.B. ergibt sich folgende Mengenerrechnung: • 1 ml Collagen-Lösung in eine 35-mm-Petrischale pipettieren. • 100 µl 25% Ammoniaklösung (v/v) in eine 60 mm-Petrischale pipettieren. • Kleinere Schale in größere setzen, Deckel schließen. Hinweis: Ist Phenolrot in der Collagen-Lösung enthalten, kann die Änderung des pH-Wertes an dem Farbumschlag sofort abgelesen werden. • Ohne pH-Indikator die 35-mm-Petrischale nach max. 2 min herausnehmen. Hinweis: Zeit abhängig von der Schichtdicke.
6	Nach etwa 2 min sollte das Gel sich verfestigt haben. Gel mit ausreichender Menge Medium 30 min äquilibrieren. Hinweis: Es ist notwendig überschüssige Ammoniaklösung zu entfernen, da diese auf Zellen toxisch wirkt. Eine längere Äquibrationszeit ist für dickere Gele notwendig
7	Überschüssiges Medium absaugen.
8	Zellen auf das Gel aussäen.

Zusätzlich benötigte Reagenzien

- sterile 0,2% Essigsäure (v/v), pH 3,0 oder 1 mM Salzsäure, pH 3,0.
- 10 × (5 ×) konzentriertes steriles Medium, mit Natriumbikarbonat, pH 7,4,
- 0,2 M Hepes, steril, (10fach), pH 7,3 [1 M Hepes*, getestet in der Gewebekultur, 1:5 mit sterilem doppelt dest. Wasser verdünnen]

Methode 2

Schritt	Aktion
1	Das Lyophilisat eines jeden Gefäßes in 3,3 ml steriler 0,2% Essigsäure, pH 3,0 oder 1 mM Salzsäure, pH 3,0, lösen (= 3mg/ml Collagen-Lösung).
2	Folgende Lösungen bei 2-8°C mischen, Bildung von Luftblasen vermeiden: • 1 (bzw. 2) Teile steriles 10fach (bzw. 5fach) konzentriertes Medium, mit Natriumbikarbonat, pH 7,4, • 1 Teil steriles 0,2 M Hepes (10fach), pH 7,3 [1 M Hepes*, getestet in der Gewebekultur, 1:5 mit sterilem doppelt dest. Wasser verdünnen]. • 8 (bzw. 7) Teile sterile Collagen-Lösung. Hinweis: Die Mischung bleibt flüssig bei 2-8°C.
3	100 µl/cm ² dieser neutralisierten Collagen-Lösung in das Kulturgefäß pipettieren. Hinweis: Dies ergibt ein Collagen-Gel von 1mm Schichtdicke.
4	Zum Gelieren die Lösung ca. 2-3 h bei 15-25°C oder bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubieren. Hinweis: Die Kulturschalen können bei 2-8°C unter sterilen Bedingungen gelagert werden.
5	Vor Gebrauch sollte das Gel mit Kulturmedium 15 min äquilibriert werden.
6	Zellen wie gewöhnlich aussäen.

Subkultivierung der Zellen

Für die Subkultivierung der Zellen kann das Collagengel mit Collagenase (z.B. 0,1% Collagenase A* in HBSS, 10-20 min, bei 37°C) verdaut werden.

Die Zellen werden danach abzentrifugiert. Wenn die Zellen erneut auf Collagen kultiviert werden sollen, müssen sie vollständig frei von Collagenase gewaschen werden.

Hinweis: Falls die Zellen noch in Aggregaten vorliegen, können Einzelzellsuspensionen durch weitere Behandlung mit Trypsin/EDTA* oder Dispase* gewonnen werden.

Kultivierung von Zellen in Collagengelen

Sollten die Zellen im Collagengel kultiviert werden, so werden die Zellen in Medium einer 100fach höheren Konzentration suspendiert. 1 Teil Zellsuspension wird dann mit 100 Teilen neutralisierter nach Methode 2 hergestellter Collagenlösung bei 2-8°C gemischt. Ein geeignetes Aliquot wird dann in das Zellkulturgefäß pipettiert und bei 15-25°C oder 37°C inkubiert. Medium wird, sobald wie möglich, nachdem das Gel sich verfestigt hat, zugegeben.

- Hinweis:** Das Verhältnis Zellsuspension zu Collagenlösung kann variiert werden. Aber das führt zu einer Veränderung der Gelkonsistenz.

Literatur

- Bornstein, M. B. (1958), *Lab. Invest.* **7**, 134-137.
- Michalopoulos, G. & Pitot, H. C. (1975), *Exp. Cell Res.* **94**, 70-78.
- Iversen, P. L. et al. (1981) *In Vitro* **17**, 540-552.
- Yang, J. et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3401-3405.
- Yang, N. S. et al. (1981) *Cancer Res.* **41**, 4093-4100.
- Yang, J. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2088-2092.
- Sinha, D. K. & Pazik, J. E. (1986) *In Vitro* **22**, 519-524.
- Montesano, R. & Orci, L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4894-4897.
- Methods Enzymol. (1982) 82, Part A: Extracellular Matrix, Section I. Collagen, 3-555.
- Kleinmann, H. K. et al. (1981) *J. Cell Biol.* **88**, 473-485.
- Yang, J. & Nandi, S. (1983) *Int. Rev. Cytol.* **81**, 249-286.
- Kleinmann, H. K. et al. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 1-13.

*zu beziehen von Roche Applied Science

www.roche-applied-science.com/pack-insert/1179179b.pdf



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
Nonnenwald 2
82372 Penzberg
Germany