

ラット骨髄由来間葉系細胞 取り扱い説明書

■ 凍結骨髄由来間葉系細胞の融解 ■

- ① 液体窒素から凍結アンプルを取り出し、37°Cの湯浴または恒温槽で、約半分程度融解するまで攪拌する。この際、アンプルが暴発する恐れがあるので、プロテクターや手袋を装着して作業することが望ましい。
- ② 約半分程度融解したら湯浴または恒温槽から取り出し、アンプルを攪拌させながら、余熱で融解し、氷中に保つ。
- ③ 15mLの遠心管にPBS(-)を10mL入れる。
- ④ 操作③の遠心管に、アンプル中の細胞浮遊液を移し、数回ピペッティングした後、900rpm、室温(20~30°C)で5分間遠心分離を行う。
- ⑤ 上清を除去し、10~15%FBSを含むMEMまたは α MEM培地(増殖用培地)を適当量添加し、細胞数を計測する。
- ⑥ 細胞を表1に示す培養容器にあわせて適宜濃度調製し、播種する(約 1×10^4 cells/cm²)。

表 1: 分化誘導時の播種密度

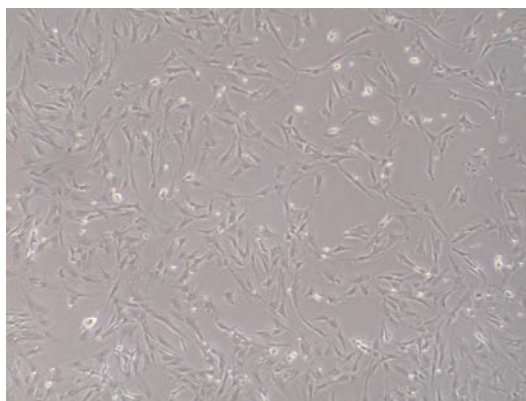
培養容器	培地量	播種細胞数
6-well plate	2.0mL	1.0×10^5 cells/well
12-well plate	1.5mL	2.0×10^4 cells/well
24-well plate	1.0mL	1.0×10^4 cells/well

- ⑦ 播種翌日より分化誘導を開始する。

■ ラット骨髄由来間葉系細胞から骨芽細胞への分化 ■

- ① (播種翌日)顕微鏡観察により、当該細胞の培養容器底面に対する接着及び伸展が認められたら(図1参照)、培地を全て吸引除去し、5%(v/v)となるように骨芽細胞分化用サプリメント(注文Cat.No.: DSKE200)を添加した増殖用培地を加える。

図 1: 播種翌日の細胞像(一例)

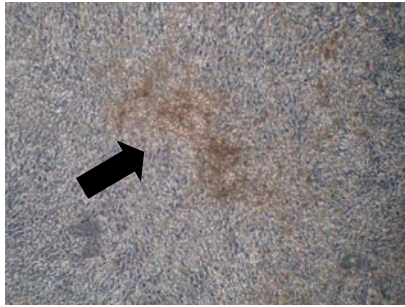


- ② 炭酸ガスインキュベーター内(37°C、5%CO₂)にて14~21日間培養を行う。途中、3回/週で培地の全量交換を行うことが望ましい。

注意 1) 骨芽細胞分化用サプリメントは増殖用培地とよく混合して用いること。予め培地と混合してから培地交換を行うことが望ましい。

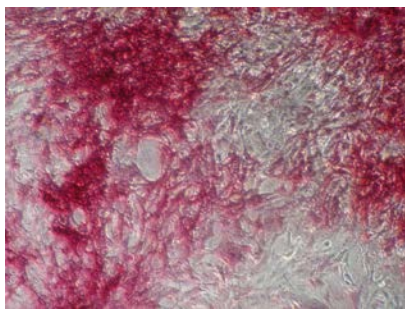
注意 2) 分化誘導による細胞形態あるいは細胞外基質の沈着に関する変化を観察するために、骨芽細胞分化用サブプリメントを添加しない、分化誘導(一)群を対照におくことが望ましい。

参考 1) 骨芽細胞に分化誘導後の顕微鏡写真(×40)



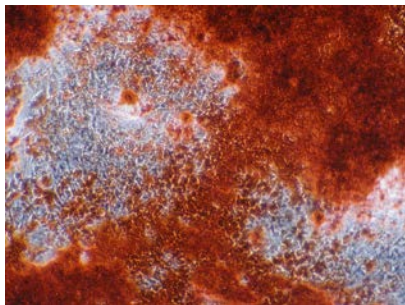
矢印は骨基質の沈着部分(石灰化現象)を示す。

参考 2) 骨芽細胞に分化誘導後の ALP 活性染色 (Naphtol AS-MX Phosphate)



赤色部分は細胞表面の ALP 活性部位を示す。

参考 3) 骨芽細胞に分化誘導後のカルシウム染色 (Alizarin Red)



赤色に染色されている部分は骨基質の沈着部分を示す。

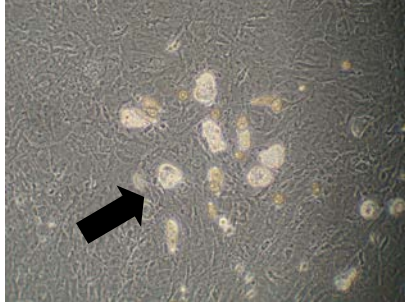
■ ラット骨髄由来間葉系細胞から脂肪細胞への分化 ■

- ① (播種翌日) 顕微鏡観察により、当該細胞の培養容器底面に対する接着及び進展が認められたら(図1参照)、培地を全て吸引除去し、5%(v/v)となるように脂肪細胞分化用サブプリメント(注文Cat.No.: DSKE300)を添加した増殖用培地を加える。
- ② 炭酸ガスインキュベーター内(37℃、5%CO₂)にて14~21日間培養を行う。途中、3回/週で培地の全量交換を行うことが望ましい。

注意 1) 脂肪細胞分化用サブプリメントは増殖培地とよく混合して用いること。予め培地と混合してから培地交換を行うことが望ましい。

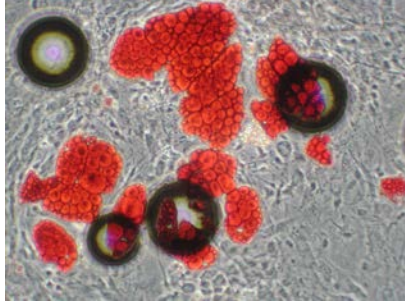
注意 2) 分化誘導による細胞形態あるいは脂肪球の形成に関する変化を観察するために、脂肪細胞分化用サブプリメントを添加しない、分化誘導(一)群を対照におくことが望ましい。

参考 1) 脂肪細胞に分化誘導後の顕微鏡写真 (× 40)



矢印は脂肪球の形成部分を示す。

参考 2) 脂肪細胞に分化誘導後の Oil-Red O 染色 (× 100)



赤色に染色されている部分は脂肪球を

大日本住友製薬グループ
DS ファーマバイオメディカル株式会社

〒533-0031
大阪府大阪市東淀川区西淡路 6 丁目 4 番 111 号
延原倉庫(株)内
TEL:06-6990-8051 FAX:06-6325-6058
URL: <http://www.dspbio.co.jp/>