

hMSC 軟骨細胞分化キット

目次 # RP02014-B 1 Kit

製品概要

hMSC 軟骨細胞分化キットは、軟骨細胞への高効率な分化誘導能力を持ち、ヒト間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導に使用できます。

製品情報

表 1：hMSC 軟骨細胞分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hMSC軟骨細胞分化キットの内容物：	RP02014-B	1 Kit	2-8 °C*
Chondrogenesis Differentiation Basal Medium	RP02014-B-01	80 mL	2-8 °C
Chondrogenesis Differentiation Supplement	RP02014-B-02	20 mL	-80 °Cから -20 °C

*基礎液と添加物をよく混和して完全培地を調製します。調製後は2-8 °Cで保存し、2 週間以内に使用可能です。培地は遮光保存・使用してください。

試薬と材料

表 2：推奨試薬&材料

試薬&材料	ブランド (e.g.)	品番 (e.g.)
NcMission™ hMSC Medium V3.0	Shownin	RP02010
OriCell アルシアンブルー染色液	OriCell	No.ALCB-10001
4%PFA 溶液	Biosharp	BL539A
1 × DPBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Thermo Sci.	14190250
6ウェルプレート	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mLピペット	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL遠心管	Thermo Sci.	N/A
10 µL/200 µL/1000 µLピペットチップ	Rainin .	N/A

試薬の準備

(一) hMSC 軟骨細胞分化キットの調製

1. Chondrogenesis Differentiation Supplementは4℃で解凍します。37℃で解凍しないでください。
2. バイオセーフティキャビネット内で滅菌済みピペットを使用し、下記の成分を均一に混和して

100mL

の分化完全培地を調製します。

Chondrogenesis Differentiation Basal Medium : 80 mL

Chondrogenesis Differentiation Supplement : 20 mL

3. 4℃で完全培地を保存し、3週間以内に使用可能です（遮光保存・使用）。

Tips : 実際の使用量に応じて、Supplementを分注して凍結保存することが可能です。凍結・解凍は合計で2回までとします。

間葉系幹細胞の軟骨細胞分化

(一) 間葉系幹細胞の培養

1. hMSCの培養と準備：詳細は「NcMission™ hMSC Medium V3.0 取扱説明書」を参照してください。
2. NcMission™ hMSC Medium V3.0 を用いて間葉系幹細胞を培養します。間葉系幹細胞を 5000～10000 cells/cm² の密度で6ウェルプレートに播種し、水平方向に十字振りを3回実施後、37℃・5% CO₂・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再度水平方向に十字振りを3回行い、培養します。

(二) 間葉系幹細胞の軟骨細胞分化

1. ペレット形成：hMSCが約80%コンフルエンスに達した場合：
 - 1.1. 細胞が80%コンフルエンスに達したら、1 mL/ウェルで0.5 × TryPLEを加え、37℃で3分間消化します。
 - 1.2. バランスをとり、遠心（250 × g、5分間；昇速3、降速7）して細胞を回収します。上清液を除去し、MSC増幅完全培地を加えて懸濁します。細胞数を計測します。
 - 1.3. 計測結果に基づき、2 × 10⁵個の細胞を15 mL遠心管に分注します（各グループ2本）。細胞懸濁液の量が1 mL未満の場合は、MSC増幅完全培地を1 mLに追加し、バランスをとって室温で遠心（300 × g、5分間；昇速3、降速7）します。
 - 1.4. 上清液を吸引除去し、管底を軽く叩いて細胞ペレットを分散させた後、1 mL/管の完全培地を加えて細胞を懸濁します。バランスをとり、室温で遠心（450 × g、10分間）します。
 - 1.5. 遠心管の蓋を穏やかに緩め、5% CO₂のインキュベーター内で37℃で16時間（一晚）インキュベートします。

2. 軟骨誘導（1日間）：MSC増幅完全培地を**軟骨細胞分化完全培地**に置き換えます。遠心管から慎重に MSC増幅完全培地を吸引除去し（MSCペレットを吸引しないように注意）、管壁に沿ってゆっくりと軟骨分化培地を2 mL/管で添加します（ペレットを乱さないようにする）。
3. 継続培養（10～20日間）：10～20日間培養を継続します。**軟骨細胞分化完全培地**を2 mL/管で2日ごとに交換します。MSCペレットを吸引しないように注意します（14日間の培養で急速な軟骨形成が誘導される）。
4. 固定・脱水・染色・顕微鏡撮影：
 - 4.1. 固定・脱水：培地を吸引除去し、2 mL/管の DPBS を加えてサンプルペレットを洗浄します。DPBS を吸引除去後、2 mL/管の 4% PFA 溶液を加え、25 °Cで 10 分間固定します。
 - 4.2. 切片凍結：MSC ペレットを包埋剤で包埋し、10 μ M の厚さで切片を作成します（サンプルは包埋後に-80 °Cで 2 か月間保存可能）。
 - 4.3. サンプル洗浄：スライドガラスを DPBS に浸し、2 回振とう洗浄します（各 10 分間、速度 0）。
 - 4.4. 染色：水分を十分に乾燥させた後、各切片に OriCell アルシアンブルー染色液を滴下し、サンプル全体を覆います（または各切片に 50 μ L の染色液を滴下）。湿潤ボックスにスライドガラスを入れ、37 °Cの乾燥箱で 30 分間染色します。
 - 4.5. 洗浄・撮影：流水でスライドガラスをゆっくり 3 分間洗浄し、水分を十分に乾燥させた後、顕微鏡で観察・撮影します。注：洗浄時はサンプルの脱落や形状崩れを防ぐために水流を弱くし、サンプルに直接当てないでください。