hMSC 骨芽細胞分化キット
取扱説明書

一、製品概要

hMSC骨芽細胞分化キットは、骨芽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骨芽細胞への分化誘導に使用できます。

二、製品情報

表1：hMSC 骨芽細胞分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hMSC骨芽細胞分化キットの内容物：	**RP02014-C**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
Osteogenic differentiation Basal Medium	RP02014-C-1	80 mL	2℃～8℃
Osteogenic differentiation Supplement	RP02014-C-2	20 mL	-20℃至-80℃

***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℃で保存し、2 週間以内に使用可能です。**

三、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	Shownin	RP02010
アリザリンレッド染色液2% Alizarin Red S	Sciencell	0223
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
1.5/2 mL凍結保存管	Thermo Sci.	N/A
10 μl/200 μl/1000 μlピペットチップ	Rainin .	N/A

四、試薬の準備

（一）hMSC 骨芽細胞分化キットの調製

1. Osteogenic 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て100mLの分化完全培地を調製します。

Osteogenic differentiation Basal Medium : 80 mL

Osteogenic differentiation Supplement : 20 mL

3. 完全培地は4℃で保存し、2 週間以内に使用可能です。

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。

（三）アリザリンレッド使用液の調製

1、 アリザリンレッド保存液は含有量が2%、常温保存します。使用寸前にアリザリンレッド保存液：脱イオン水＝1：20の割合で 0.1%の使用液に希釈し、使用液は黄褐色で澄んだ液体です。

五、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化

（一）间充质干细胞培养

1. **hMSCの培養：**詳細は「**ncMission hMSC Medium** 取扱説明書」を参照してください。
2. **ncMission hMSC Medium** 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% CO・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）間葉系幹細胞の骨芽細胞分化

1、 hMSCのコンフルエンシーが約85%に達した時点で分化を開始します。上清を除去し、実験群と対照群を設定します。実験群に**hMSC骨芽細胞分化完全培地**を添加し、対照群に**ncMission hMSC Medium**を添加します。

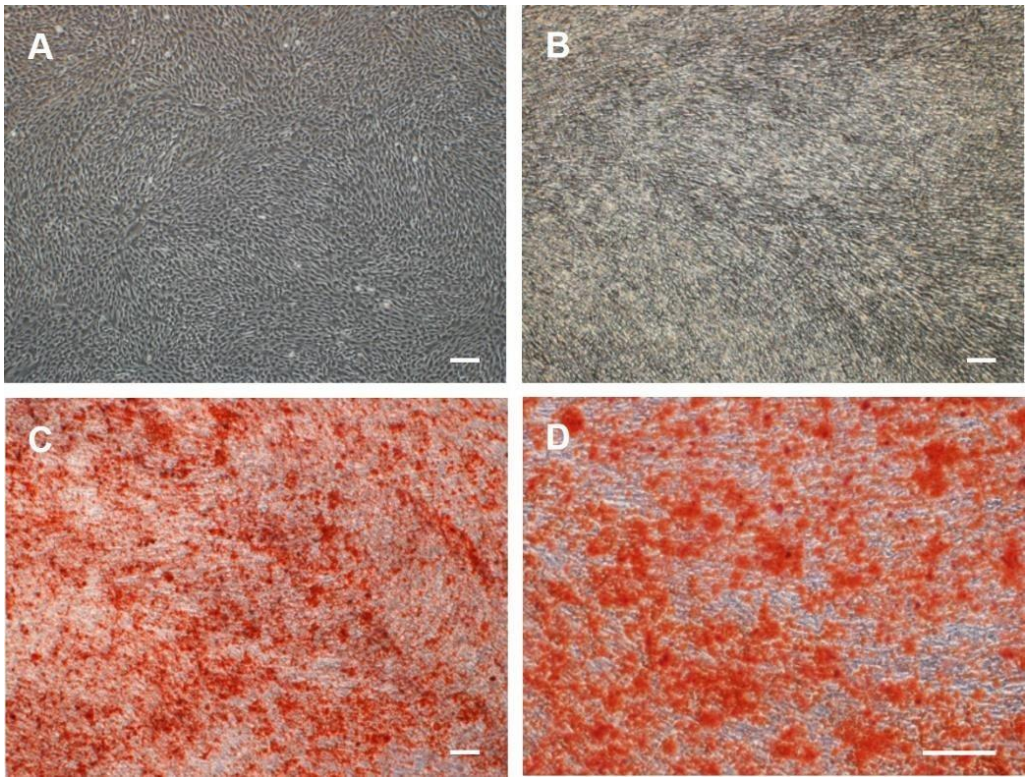
TIPS：hMSCの骨芽細胞への分化過程における細胞の剥離や浮遊を防ぐために、培養プレートをMatrigelでコーティングすることを推奨します。

（Matrigelの取扱方法：https://www.shownin.com/video.html）。

2、 3～4日ごとに培地を交換し（1ウェルあたり2～3 mL）、21日目まで連続培養を行います。

3、 21日目に上清液を除去し**、固定液（4%パラホルムアルデヒド）**を添加し、30分間固定します。

4、分化群と対照群の上清を除去し、適量の**アリザリンレッド染色液**を添加し、室温・遮光条件下で20～60分間インキュベートしてから染色液を除去し、生理食塩水またはDPBSで背景色がなくなるまで洗浄します。洗浄後、各ウェルに生理食塩水またはDPBSを入れ、顕微鏡下で観察・撮影します。



hMSC 骨芽細胞分化キットを用いた分化過程における細胞形態　スケールバー：200 um

AとB：分化1日目と21日目の細胞形態　CとD：分化21日目に顕微鏡下における染色結果