

製品コード MK430

研究用

Takara

骨芽細胞分化試薬
Osteoblast-Inducer Reagent
(for animal cell)

説明書

v201609

骨芽細胞 (Osteoblasts) は、間葉系幹細胞から分化した骨形成を担う細胞で、骨吸収を担う破骨細胞 (Osteoclasts)、骨細胞などとともに骨組織を構成しています。骨組織は、これらの細胞群がバランスよく働くことにより、骨の強度・弾性を維持しています。

本製品には、骨芽細胞分化誘導試薬としてヒドロコルチゾン、 β -グリセロフォスフェート、アスコルビン酸が含まれています。これらの試薬を培地に添加することにより、骨髄由来細胞・脂肪由来幹細胞 (間葉系幹細胞) を効率よく骨芽細胞に分化させることができます。

I. 製品内容

培地 500 ml 分	
(1) Ascorbic Acid	5 ml
(2) Hydrocortisone	1 ml
(3) β -Glycerophosphate	5 ml \times 2

II. 保存

− 20℃

III. 培養に必要な試薬および器具

- ・RPMI 1640 培地・グルタミン含有
- ・非働化済みウシ胎児血清
- ・抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン)・滅菌済みピペット
- ・接着細胞用培養ディッシュ、マルチプレート
- ・消毒用 70%エタノール

IV. 使用方法

1. 培地調製

添加試薬は自然解凍または 37℃のインキュベーターで解凍してください。

- (1) 培地と添加試薬のボトルの表面に 70%エタノールを噴霧または 70%エタノール綿で拭いて殺菌する。
- (2) クリーンベンチ内で各細胞に適した培地に添加試薬 (1) Ascorbic Acid、(2) Hydrocortisone、(3) β -Glycerophosphate をそれぞれ 1% (v/v)/0.2% (v/v)/2% (v/v) になるように添加する。

例) 100 ml の骨芽細胞分化培地を調製する場合

(1) Ascorbic Acid	1 ml
(2) Hydrocortisone	200 μ l
(3) β -Glycerophosphate	2 ml

※添加試薬を加えた培地は 4℃で約 2 ヶ月保存可能です。

2. 分化誘導

<マウス/ラット/ウサギ骨髄細胞の場合>

- (1) 骨芽細胞分化培地を調製する。
- (2) 細胞を撒き込んで 3～7 日間培養した後 [顕微鏡観察により細胞が培養容器底面に接着伸展していることが認められたら]、培地を除去し、骨芽細胞分化培地に交換する。
- (3) 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 14～21 日間培養する。
- (4) 7～14 日に 1 回の割合で培地の全量交換を行う。

< MC3T3-E1 [マウス頭蓋冠由来] 細胞の場合 >

- (1) 骨芽細胞分化培地を調製する。
- (2) 細胞を撒き込んで1～3日間培養した後[顕微鏡観察により細胞が培養容器底面に接着伸展していることが認められたら]、培地を除去し、骨芽細胞分化培地に交換する。
- (3) 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で10～21日間培養する。
- (4) 3～7日に1回の割合で培地の全量交換を行う。

※ 分化誘導による細胞形態の変化などの比較対照として骨芽細胞分化試薬を添加していない細胞も用意するとよい。

V. 使用例

1. 細胞染色

MC3T3-E1 [マウス頭蓋冠由来] 細胞を培養し、分化培地として添加試薬 A. (1) Ascorbic Acid を加えた培地、B. (1) Ascorbic Acid と B. (2) Hydrocortisone を加えた培地、C. (1) Ascorbic Acid と C. (3) β -Glycerophosphate を加えた培地、D. (1) Ascorbic Acid と D. (2) Hydrocortisone と D. (3) β -Glycerophosphate を加えた培地を用いて分化誘導後3日目に TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300) でアルカリ性ホスファターゼ染色を行った。

- A. (1) Ascorbic Acid
- B. (1) Ascorbic Acid + (2) Hydrocortisone
- C. (1) Ascorbic Acid + (3) β -Glycerophosphate
- D. (1) Ascorbic Acid + (2) Hydrocortisone + (3) β -Glycerophosphate

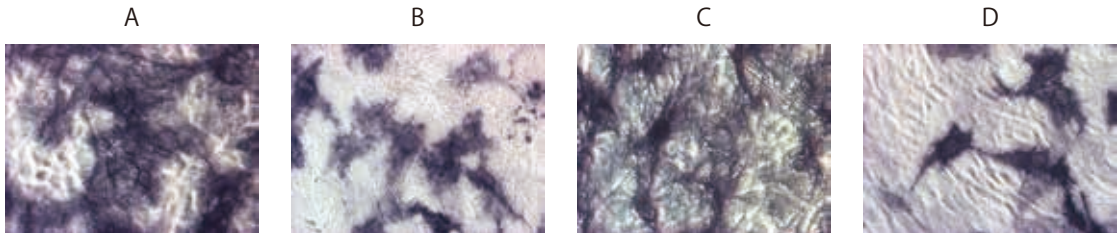


図1. マウス頭蓋冠由来細胞のアルカリホスファターゼ活性染色

2. 培養上清中のオステオカルシンの測定

正常ラット骨髄細胞 [8週齢・オス] を 1×10^6 cells/well (24 well plate 使用) 撒き込んで4日間培養後、添加試薬 (1) Ascorbic Acid と (2) Hydrocortisone と (3) β -Glycerophosphate を加えた培地を用いて分化誘導した (分化開始日を day 0 とする)。経時的に培養上清を採取し、培養上清に含まれるオステオカルシンを ELISA により測定した。同時に TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300) でアルカリ性ホスファターゼ染色を行った。

- 【1】：骨芽細胞分化培地 (10% FCS/RPMI1640 + Ascorbic acid + Hydrocortisone + β -Glycerophosphate)
- 【2】：基本培地 (10% FCS/RPMI1640 + Ascorbic acid)

オステオカルシンの測定

[A450 測定値]

	Blank (培地)	day 1	2	3	7	10	15	21	28
【1】	0.055	0.058	0.054	0.057	0.071	0.638	3.412	4.062	4.012
【2】	0.057	0.055	0.058	0.061	0.083	0.070	0.057	0.065	0.062

オステオカルシンの測定には、Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126) を使用した。
骨芽細胞より分泌されるタンパク質であるオステオカルシンが、分化誘導により培養上清中に検出された。

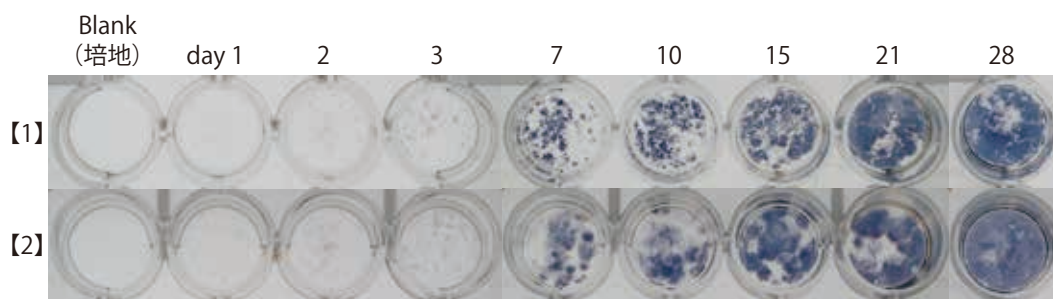


図 2. 正常ラット骨髄細胞のアルカリホスファターゼ活性染色

VI. 関連製品

TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)
TRACP & ALP Assay Kit (製品コード MK301)
Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (Precoated) (製品コード MK111)
Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Precoated) (製品コード MK127)
Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Precoated) (製品コード MK126)
[脂肪細胞分化 / 維持試薬]
AdipolInducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK429)

VII. 使用上の注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社