آدیپوپلاس (محیط تمایزی آدیپوژنز)

فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-1101

توصیـف محصـول

آدیپوپلاس یـک محیـط آمـاده بـه مصـرف اسـت که بـرای تمایـز آدیپوژنـز سـلول هـای بنیـادی مزانشـیمی (MSC) بخصوص سـلول هـای بنیادی مزانشـیمی انسـان در سیسـتم in vitro تولید شـده اسـت. پس از حدود ۳ هفته سـلول های تمایز یافته را می توان برای سـنتز لیپید با رنگ آمیزی Oil-Red-O بررسـی کرد. آدیپوپلاس یک ابـزار تحقیقاتـی بسـیار خـوب بـرای مطالعـه اختـلالات آدیپوسـیت، آدیپوژنـز، و بیماریهـای متابولیـک مرتبـط بـا آدیپوسـیت اسـت. ایـن محیـط حـاوی تمـام معرف های لازم برای القاء مسیرهای آدیپوژنز در سـلول های بنیادی مزانشـیمی برای تولید آدیپوسـیت ها می باشـد.

اطلاعات مهم

- آدیپوپلاس در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد تا یک ماه پایدار است. برای نگهداری درازمدت، باید محیط را در مقادیر کم الیکوت و فریز کنید. با این حال، فریز کردن، درصد تمایز را کاهش می دهد.
- محیط را فریز و ذوب مجدد نکنید.
- این محیط حاوی گلوتامکس است.
- رنگ محیط باید قرمز شفاف باشد. در صورت تغییر رنگ، از آن استفاده نکنید.

پاسـاژ دادن و آماده سازی سـلول های بنیادی مزانشیمی

۱- تک لایه سلولی از کشت های پایه که در محیط کشت استاندارد گسترش یافته را بررسی و مشاهده کنید تا از کانفلونسی فاز رشد mid-log (۸۰-۶۰ درصد) مطمئن شوید (توصیه می شود از محیط DMEM با شماره کاتالوگ BI-1004 که دارای مکمل 10% FBS با شماره کاتالوگ BI-1201 است استفاده شود). محیط و سلول های شناور را از فلاسک کشت برداشته و دور بریزید. اجازه ندهید که سلول های بنیادی مزانشیمی پاساژ داده شده به طور کامل کانفلوانت شوند، زیرا می تواند قابلیت مولتی پتانسیل آنها را کاهش دهد.

۲- به میزان ۱۰-۵ میلی لیتر PBS فاقد فسـفر و منیزیم با شـماره کاتالوگ BI-1401 اضافه کنید. تک لایه سـلولی را به آرامی شستشـو دهید.

۳- سـپس PBS فاقد فسـفر و منیزیم را بردارید، به مقدار کافی از تریپسـین پیش گرم شـده (BI-1603 یا BI-1604) را به فلاسـک اضافه کنید و بطور کامل سـطح کشـت را پوشـش دهید. به مدت ۵ تا ۸ دقیقه یا تا زمانی که سـلول ها به طور کامل جدا شـوند در ۳۶ تا ۳۸ درجه سـانتیگراد انکوبه کنید. اسـتفاده بیش از حد از تریپسـین منجر به کاهش بقا و توسـعه سـلول های بنیادی مزانشـیمی می شـود.

۴- سـلول های جدا شـده را به آرامی به داخل یک محلول سـلولی تکی پیپت کنید و با میکروسـکوپ معکوس بررسـی و تایید کنید.

۵- سوسپانسـیون سـلولی را از فلاسـک خارج و به یک لوله سـانتریفوژ منتقل کنید.

۶- سـلول ها را در ۱۰۰Kg به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه سـانتریفوژ کرده و رسـوب بدهید.

۷- میـزان حیـات و نیـز تراکم کلی سـلول ها را با اسـتفاده از رنگ آمیزی تریپان بلـو (BI-1803) تعیین کنید.

۸- دوباره رسوب را در یک حجم مناسب از محیط رشد سلول های بنیادی مزانشیمی که از قبل گرم شده است حل کنید (DMEM + 10% FBS توصیه می شود).

۹- سلول ها را در محیط رشد سلول های بنیادی مزانشیمی در ۳۶ تا ۳۸ درجه سانتي گراد در مجاورت رطوبت و ۴-۶ درصد CO_2 براي حداقل ۲ ساعت تا حداکثر ۴ روز انکوبه کنید. پلیت ها را در پاساژ فلاسک T25 با تعداد تقریبا 1×10^4 سلول در سانتی متر مربع برای سلول های با پاساژ کم یا 2×10^4 سلول در سانتی متر مربع در مورد سلول های با پاساژ زیاد، در محیط رشد استاندارد تلقیح کنید (DMEM + 10% FBS توصیه می شود). سلول های بنیادی مزانشیمی که بطور مستمر پاساژ داده شده اند، بعد از پاساژ ۱۰، بتدریج توانایی مالتی پتانسیل خود را از دست خواهد داد. یکی از مقادیر و پلیت های زیر را استفاده کنید:

- ۲ میلی لیتر محیط رشد در هر چاهک برای پلیت های ۲ چاهک، یا
- ۱ میلی لیتر در هر چاهک برای پلیت های ۱۲ چاهک، یا
- ۵/۰ میلی لیتر در هر چاهک برای پلیت های ۲۴ چاهک، یا
- ۲۰۰ میکرولیتر برای پلیت های ۴۸ چاهک.

نکته

برای آزمون اسپکتروفتومتری، سه چاهک را برای بلانک خالی بگذارید و سه چاهک از هر سویه ASC باید در محیط غیرالقا شده تست شود.

تمایز آدیپوژنز

۱. هر روز سلول ها را بررسی کنید تا از وجود کانفلونسی فاز رشد mid-log (۸۰-۶۰ درصد) مطمئن شوید، کل محیط کشت را برداشته و چاهک های تکرار شده را با محیط آدیپوپلاس (BI-1101) از پیش گرم شده و با محیط کنترل جایگزین کرده و انکوباسیون را ادامه دهید. سلول های بنیادی مزانشیمی همچنانکه در شرایط آدیپوژنیک تمایز می یابند به گسترش محدود خود ادامه می دهند، هر ۳ تا ۴ روز، کشت ها را دوباره غنی کنید. گسترش سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط رشد برای ۲-۴ روز قبل از غنی کردن مجدد محیط آدیپوپلاس، می تواند فرایند آدیپوژنز را افزایش دهد.

۲. پس از دوره های اختصاصی کشت، کشت های آدیپوژنیک را می توان با رنگ Oil Red O (BI-1802) پروسس کرد، از ۱۴-۷ روز، برای آنالیز بیان ژن، یا تشخیص پروتئین استفاده کرد.

توجه: برخی از سویه های سلولی ممکن است به رشد خود ادامه دهند و در این شرایط به تراکم بیش از حد (نقطه ای که تک لایه سلولی کلامپ یا کنده شود) برسند.

توجه: برخی از کشت ها نسبت به سایرین، با سرعت کمتری چربی انباشته می کنند. اگر به نظر می رسد کشت تمایز یافته است اما پس از ۲ هفته هنوز وزیکول های چربی در محیط آدیپوپلاس کوچک هستند، کشت را باید با محیط تازه آدیپوپلاس غنی کرده و برای ۴ روز دیگر به انکوباسیون را ادامه داد (در کل ۲۱ روز در شرایط آدیپوژنیک). پس از ۶ روز انکوباسیون با محیط تمایزی، قطرات چربی قابل رویت خواهد بود.

۳. سلول ها را یکبار با PBS فاقد کلسیم منیزیم سرد شستشو دهید. اگر از اسلایدهای کشت ۲ چاهکی استفاده می شود، محیط را خارج کنید و ۲ میلی لیتر PBS فاقد کلسیم منیزیم سرد برای هر چاهک، یا ۱ میلی لیتر برای هر پلیت های ۱۲ چاهکی و ۲۴ چاهکی اضافه کنید (از این حجم ها در تمام مراحل زیر استفاده کنید).

۴. محلول شستشو را بردارید و محلول فرمالدهید/کلسیم را برای حداقل ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، یا حداکثر ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد اضافه کنید. اگر رنگ آمیزی Oil-Red-O تا این زمان انجام نشده است، فیکساتیو را بردارید، با PBS سرد جایگزین کرده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای حداکثر یک هفته نگهداری کنید تا آماده رنگ آمیزی بماند.

منابع

1. Lillie, R.D. and Ashburn, L.L. 1943. Super-saturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degenerations not shown by Herxheimer technique. Arch. Pathol. 36: 432.
2. Moscatello, D.K. Cell culture media, kits, and methods of use. U.S. Patent Application 11542863, filed 10/04/2006; U.S. Provisional Patent Application No. 60/723,804, filed 10/06/2005.
3. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., and Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411):143-147.
4. Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J-G., and Prockop, D.J. 2002. Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 20:530-541.
5. Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1980. Lipids. In Theory and Practice of Histotechnology, Second Edition, Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B., Eds., Battelle Press, Columbus, OH. Pp202213.

ارجاعات

1. Alizadeh, Effat, et al. "Upregulation of MiR 122 via trichostatin a treatments in hepatocyte like cells derived from mesenchymal stem cells." Chemical biology & drug design 87.2 (2016): 296-305.
2. Abolhassani, S., K. Yavari, and J. Mohammadnejad. "Investigation of Isolating of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood and Labeling them with 99m Technetium." Int J Stem Cell Res Transplant 4.6 (2016): 190-194.
3. Jalilzadeh-Tabrizi, Sepideh, et al. "A Biomimetic Emu Oil-Blended Electrospun Nanofibrous Mat for Maintaining Stemness of Adipose Tissue-Derived Stem Cells." Biopreservation and biobanking 16.2 (2018): 66-76.
4. Fayazi, Mehri, Mojdeh Salehnia, and Saeideh Ziaei. "Differentiation of human CD146-positive endometrial stem cells to adipogenic-, osteogenic-, neural progenitor-, and glial-like cells." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 51.4 (2015): 408-414.
5. Davoodian, Nahid, et al. "MicroRNA 122 overexpression promotes hepatic differentiation of human adipose tissue derived stem cells." Journal of cellular biochemistry 115.9 (2014): 1582-1593.
6. Alizadeh, Effat, et al. "The effect of dimethyl sulfoxide on hepatic differentiation of mesenchymal stem cells." Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 44.1 (2016): 157-164.
7. Dayer, Dian, et al. "Sonic hedgehog pathway suppression and reactivation accelerates differentiation of rat adipose-derived mesenchymal stromal cells toward insulin-producing cells." Cytotherapy 19.8 (2017): 937-946.
8. Taghikani, Mohammad, and Fatemeh Eskandari. "Differentiation of Human MSCs Into Nsulin Producing Cells by Using Lentiviral Vector Carrying PDX-1."