استئوپلاس (محیط تمایزی استئوژنزیس)

فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-1102

توصیـف محصـول

استئوپلاس یک محیط آماده مصرف است که برای تمایز استئوژنزیس سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) بخصوص سلول های بنیادی مزانشیمی انسان در سیستم برون تنی تولید شده است. هنگامی که طبق دستورالعمل استفاده شود، این محیط باعث تمایز این سلول های بنیادی به سلول های استئوژنیک (سلول های تولید کننده استخوان) می شود. این محیط حاوی تمام معرف های لازم برای القاء مسیرهای استئوژنز در سلول های بنیادی مزانشیمی برای تولید استئوسیت می باشد.

اطلاعات مهم

- استئوپلاس در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد تا ۱ ماه پایدار است. برای نگهداری درازمدت، باید محیط را در مقادیر کوچک الیکوت و فریز کنید. با این حال، انجماد میزان تمایز را کاهش می دهد.
- محیط را فریز و ذوب مکرر نکنید.
- این محیط با گلوتامکس غنی شده است.
- محیط باید شفاف و قرمز رنگ باشد. در صورت تغییر رنگ، از محیط 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 فسفر و منیزیم با شماره کاتالوگ BI-1401 اضافه کنید. تک لایه سلولی را به آرامی شستشو دهید.

۳- PBS فاقد فسفر و منیزیم را بردارید، به مقدار کافی از تریپسین پیش گرم شده (BI-1603 یا BI-1604) را به فلاسک اضافه کنید و بطور کامل سطح کشت را پوشش دهید. به مدت ۵ تا ۸ دقیقه یا تا زمانی که سلول ها به طور کامل جدا شوند در ۳۶ تا ۳۸ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. استفاده بیش از حد از تریپسین منجر به کاهش بقا و توسعه سلول های بنیادی مزانشیمی می شود.

۴- سلول های جدا شده را به آرامی به داخل یک محلول سلولی تکی پیپت کنید و با میکروسکوپ معکوس بررسی و تایید کنید.

۵- سوسپانسیون سلولی را از فلاسک خارج و به یک لوله سانتریفوژ منتقل کنید.

۶- سلول ها را در 100g به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و رسوب بدهید.

۷- میزان حیات و نیز تراکم کلی سلول ها را با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو (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 سانتی گراد در مجاورت رطوبت و ۴-۶ درصد CO_2 برای حداقل ۲ ساعت تا حداکثر ۴ روز انکوبه کنید. پلیت ها را در پاساژ فلاسک T25 با تعداد تقریبا $1X10^4$ سلول در سانتی متر مربع برای سلول های با پاساژ کم یا $2X10^4$ 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
- ۰/۵ 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. یا فقط با هم ادغام شوند، کل محیط کشت را برداشته و چاهک های تکرار شده را با محیط استئوپلاس (BI-1102) از پیش گرم شده و با محیط کنترل جایگزین کرده و انکوباسیون را ادامه دهید. سلول های بنیادی مزانشیمی همچنانکه در شرایط استئوژنیک 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 استئوپلاس، می تواند فرایند استئوژنز را افزایش دهد.

۲. پس از دوره های اختصاصی کشت، کشت های استئوژنیک را می توان با رنگ آلیزارین (BI-1801) 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 کریستال انباشته می کنند. اگر به نظر می رسد کشت تمایز یافته است اما پس از ۲ هفته هنوز کریستال ها کوچک هستند، کشت را باید با محیط تازه استئوپلاس غنی کرده و برای ۴ روز دیگر به انکوباسیون را ادامه داد (در کل ۲۱ روز در شرایط استئوژنیک). پس از ۶ روز انکوباسیون در محیط تمایزی، کریستال های کلسیم 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 Alzarin Red 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. J Bone Miner Res. 2008 Dec 8. miR-196a Regulates Proliferation and Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Adipose Tissue. Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS.
2. Life Sci. 2008 Dec 19;83(25-26):851-8. ICAT participates in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell. Kim YJ, Kim JT, Bae YC, Suh KT, Jung JS.

ارجاعات

3. 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.
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 & Developmen tal Biology-Animal 51.4 (2015): 408-414.
5. Allahverdi, Amir, et al. "Differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells by using a lentiviral vector carrying PDX1." Cell Journal (Yakhteh) 17.2 (2015): 231.
6. Alizadeh, Effat, et al. "Up regulation of liver enriched transcription factors HNF4a and HNF6 and liver specific microRNA (miR 122) by inhibition of Let 7b in mesenchymal stem cells." Chemical biology & drug design 85.3 (2015): 268-279.
7. Arezoumand, Khatereh Saei, et al. "The emu oil emulsified in egg lecithin and butylated hydroxytoluene enhanced the proliferation, stemness gene expression, and in vitro wound healing of adipose-derived stem cells." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 54.3 (2018): 205-216.
8. 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.
9. Taghikani, Mohammad, and Fatemeh Eskandari. "Differentiation of Human MSCs Into Nsulin Producing Cells by Using Lentiviral Vector Carrying PDX-1."