



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Osteogenesis Culture Kit (Mouse)

[Catalog No. OGC11]

July 1, 2024

I. Product Overview

There are hematopoietic stem cells and bone marrow stromal cells in bone marrow. Bone marrow stromal cells contain undifferentiated mesenchymal stem cells that can differentiate into a variety of cell types such as osteoblasts chondrocytes adipocytes and so on.

This product contains cryopreserved cells isolated from mouse bone marrow and two types of culture medium. The cells in this product can be grown using Growth Medium, and then can be differentiated into mature osteoblasts, which form calcified nodules, using Osteogenesis Medium.

II. Precautions Before Use

Please make sure to review this manual before using the product.

Product should be used under [aseptic operation]. The biosafety level is [Level 1].

Please use the dedicated medium supplied or sold separately for culturing this product.

III. Product Warranty

We guarantee against growth failure after the start of culture only if cells have been properly stored in liquid nitrogen, and cultured according to the manual using the dedicated medium and reagents.

The warranty period is [within 6 months of receiving the product].

Please note that the warranty does not apply if there have been changes to the medium or the method of use, if cells have been re-frozen cells have been used.

IV. Product Components

Product Name (Components)	Size	Quantity	Storage	Expiration
Mouse Bone Marrow Stromal Cells	1×10 ⁶ cells/vial	1	Liquid nitrogen vapor storage	6 months
Growth Medium	125 mL	1	-20°C (Frozen) 4°C (after thawing)	Labeled on the bottle (when stored at -20°C) 3 months after thawing (when stored at 4°C)
Osteogenesis Medium	250 mL	1		

(This product is shipped with dry ice package. If the product is not to be used immediately upon receipt, please store it in liquid nitrogen.)

V. Cell Origin

Cells are derived from the bone marrow of ICR mice.

VI. Dedicated Media (Serum Containing Media) (sold separately)

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity	Storage	Expiration
Growth Medium	OGCMG	250 mL	1	-20°C (Frozen) 4°C (after thawing)	Labeled on the bottle (when stored at -20°C) 3 months after thawing (when stored at 4°C)
Osteogenesis Medium	OGCMO	250 mL	1		

(Medium main ingredients: α-MEM, serum, antibiotics, others.)

VII. Related Products

Collagen Coating Solution

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity
Collagen Coating Solution	SCO	100 mL	1

Osteocytes Staining Kit

Product Name	Catalog No.	Components	Size	Quantity
Alkaline Phosphatase Staining Kit	AK20	Substrate-containing Buffer	50 mL × 1	1 Set
		Chromogenic Substrate	10 vials (For 5 mL)	
Calcified Nodule Staining Kit	AK21	Buffer (100 ×)	60 mL × 1	1 Set
		Staining Substrate	10 vials (For 10 mL)	

VIII. Instructions For Use

※ This product [is not capable of being subcultured].

IX. Protocol

Collagen Coating

[Requirements]

- Culture vessels
- Collagen coating solution (Cat No.: SCO)
- PBS(-) or HBSS(-)
- Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment

1. Add enough collagen coating solution to cover the surface of the culture vessel (approximately 0.3–0.5 mL/well for a 24-well plate); thereafter, immediately remove the solution. For glass-bottom vessels, let the solution stand overnight before removing it.
2. Wash twice with PBS(-) or HBSS(-), then add PBS(-) or HBSS(-) and let stand for at least one hour before use. If not using immediately, fill the vessel with PBS(-) or HBSS(-) and store at room temperature for several days.

Cell Thawing and Seeding

※ For culturing in 24-well plates.

[Requirements]

- Mouse Bone Marrow Stromal Cells
- Growth Medium
- Osteogenesis Medium
- Collagen-coated 24-well plate
- Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment

1. Remove the cryovial containing the frozen cells from liquid nitrogen storage, and immediately place it in a 37 °C water bath. Quickly thaw the cells (within 90–120 seconds) by gently swirling the vial in the 37 °C water bath until only a small bit of ice remains in the vial.
2. Transfer the vial to a clean bench. Before opening, wipe the outside of the vial with 70% ethanol.
3. Transfer the thawed cell solution to a 15-mL conical tube containing 10 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium. After gentle mixing, centrifuge the solution at 600 ×g for 5 minutes at 4 °C.
4. Remove and discard the supernatant, then add 5 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium and resuspend the cells.
5. Dispense 0.5 mL of cell suspension to each well of 24-well plate, and culture the cells in a 37 °C incubator with 5% CO₂.

- ※ In the case of using other types of culture plate, adjust cell density to 2.5×10^4 cells/ cm^2 . Seeding at a lower cell density than specified will adversely affect cell proliferation.
6. Change the medium in the following day, and every other day thereafter until the cells become confluent.
 - ※ Cells become confluent within 3-4 days.
 7. Once cells become confluent, replace the medium with pre-warmed (37 °C) Osteogenesis Medium to promote the formation of calcified nodules. Replace the medium every 2 or 3 days.
 - ※ Approximately 4-7 days after medium is changed into Osteogenesis Medium, cells whiten.
 - ※ Adipocytes appear from a part of cells.

Cell Subculturing

- ※ This product is not recommended for subculturing as the seeded cells are difficult to detach.

X. Technical Information

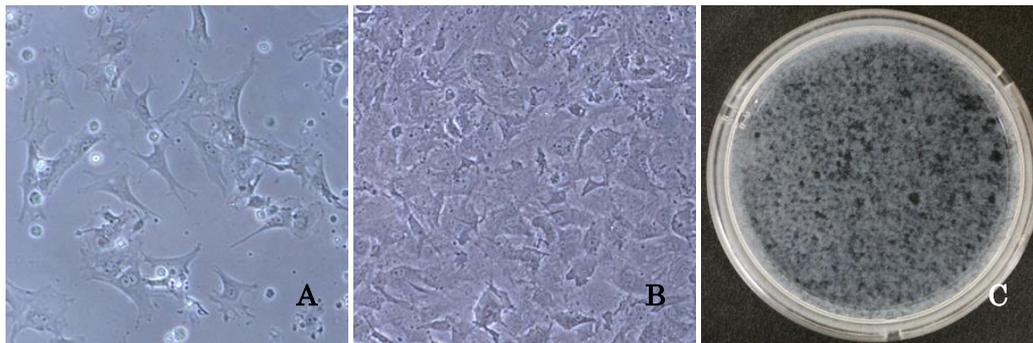


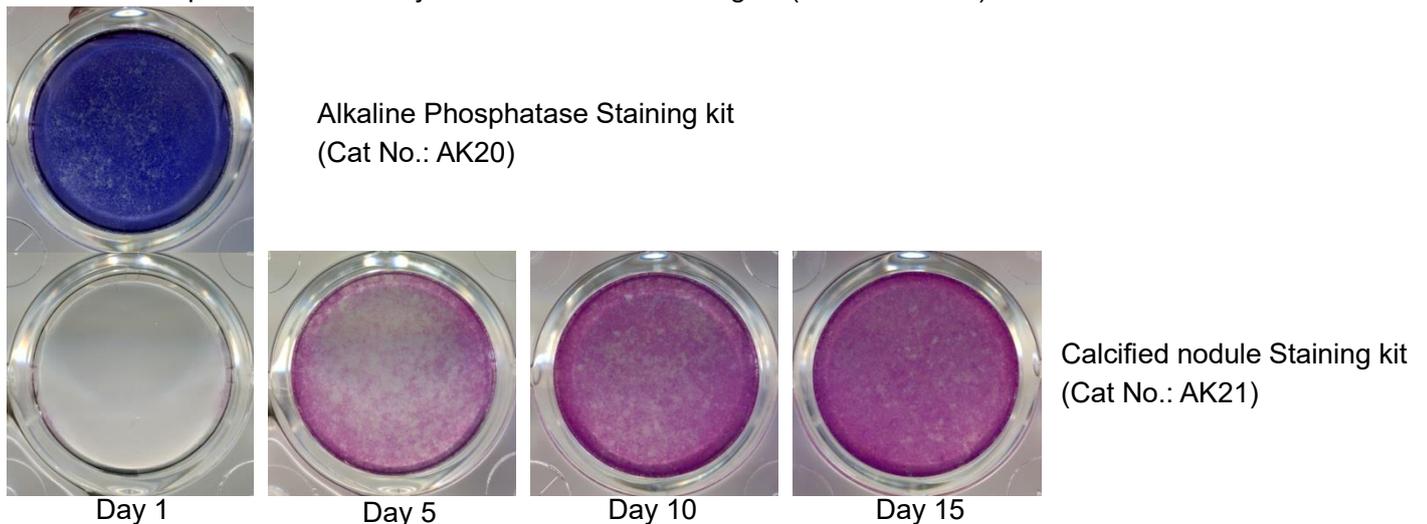
Figure 1: Cell Morphology

A. Cells on the 1st day of culture / B. Confluent / C. Cells on the 3 weeks of culture in osteogenesis medium (cultured in a 35 mm dish)

✧ **Application example**

Cells are cultured according to protocol and subjected to activity staining of alkaline phosphatase or calcified nodules.

The activity of alkaline phosphatase is detected by Alkaline Phosphatase Staining kit (Cat No.: AK20) and the calcium deposit is detected by Calcified nodule Staining kit (Cat No.: AK21).



XI. References

- 1) SL Cheng *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134(1) p277-286 (1994)
- 2) Ohgushi *et al.* In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 32(3) p333-340 (1996)



凍結初代細胞製品

骨形成培養キット(マウス)

【Osteogenesis Culture kit (Mouse), Code No. OGC11】

2024年7月1日改訂

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

I. 製品概要

骨髄には造血細胞とそれを支持する骨髄間質細胞に分けることができます。この骨髄間質細胞の一部には未分化な間葉系幹細胞も含まれており、骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞などに分化誘導することができます。

本キットは、マウス骨髄から精製した細胞群と2種類の培養メディウムを組み合わせた細胞培養キットです。増殖メディウムで増殖させた細胞を骨形成メディウムで骨芽細胞へと分化誘導しカルシウム沈着させることができます。

II. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には付属又は別売りの専用メディウムをご使用下さい。

III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。

保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。

メディウムや使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

品名	容量	本数	保存方法	有効期限
マウス骨髄間質細胞	1 × 10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保存	6ヶ月
増殖メディウム	125 mL	1本	-20℃保存 (解凍後は4℃保存)	ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は3ヶ月 (4℃保存)
骨形成メディウム	250 mL	1本		

※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください

V. 細胞の由来

ICRマウスの骨髄から分離させた細胞群

VI. 専用メディアウムの単品販売リスト

品名	品番	容量	本数	保存方法	有効期限
増殖メディアウム	OGCMG	250 mL	1 本	-20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトル記載 (-20℃保存) 解凍後は 3 か月 (4℃保管)
骨形成メディアウム	OGCMO	250 mL	1 本		

(培地の主成分：α-MEM、血清、抗生剤、その他)

VII. 関連製品

コラーゲンコート用溶液

品名	品番	容量	本数
コラーゲンコート用溶液 (ウシ由来 I 型コラーゲン)	SCO	100 mL	1 本

骨染色キット

品名	品番	構成	容量	本数
アルカリホスファターゼ染色キット	AK20	基質緩衝液	50 mL	1 本
		発色基質	5 mL 用	10 本
石灰化染色キット	AK21	緩衝液 (100 倍濃縮)	60 mL	1 本
		染色基質	10 mL 用	10 本

VIII. 操作方法

※ 本製品は【継代不可】です。

コラーゲンコート方法

【準備するもの】

- ・ ご使用になる培養容器
- ・ コラーゲンコート用溶液 (品番：SCO)
- ・ PBS(-)または HBSS(-)

1. 使用する培養容器にコラーゲンコート用溶液 (品番：SCO) が覆われる程度加え (24well プレートで 0.3~0.5 mL/well)、すぐに溶液を除去します。なお、ガラス底の培養容器の場合は、溶液を入れた状態で一晩静置した後、溶液を除去してください。
2. PBS(-)または HBSS(-)で 2 回洗浄後、PBS(-)または HBSS(-)を加えて、1 時間以上静置してからご使用してください。ただちに使用しない場合は、PBS(-)または HBSS(-)を満たして、室温で数日間保管可能です。

細胞解凍・播種

※下記は、24well プレートで培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・ 増殖メディアウム
- ・ 骨形成メディアウム
- ・ 24well プレート (コラーゲンコート用溶液でコーティングしたもの)
- ・ 滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 凍結細胞を含むクライオチューブを液体窒素から取り出し、すぐに 37 °C のウォーターバスで温めます。クライオチューブ内にほんの少しの氷が残るまで、37 °C のウォーターバス内でクライオチューブを静かに旋回させ、細胞を急速に解凍します (90~120 秒間)。
2. 解凍した細胞液を含むクライオチューブをクリーンベンチ内に移動させます。開封前にクライオチューブの外側を 70%エタノールで清拭します。
3. 解凍した細胞液を、37 °C に保温した増殖メディウム 10 mL が入っている 15 mL コニカルチューブに移します。穏やかに混合した後、4°C、600 ×g で 5 分間遠心してください。
4. 上清を吸引除去し、37 °C に保温した増殖メディウム 5 mL を加え、細胞を懸濁させてください。
5. 細胞懸濁液を 1 ウェルあたり 0.5 mL 播種し、5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養してください。

※他の培養容器に播種する場合、細胞密度を 2.5×10^4 cells/cm² になるように播種してください。この細胞密度より低く播種した場合は、細胞増殖に悪く影響を及ぼしますので注意してください。

6. 翌日、保温した増殖メディウムで培地交換し、その後はコンフルエントになるまで 1 日おきに培地交換してください。

※細胞を播種してから 3~4 日後にコンフルエントになります。

7. 細胞がコンフルエントになったら、骨形成メディウムに交換し骨形成を促進させます。

保温した骨形成メディウムを 1 ウェルあたり 0.5 mL 培地交換し、それ以降は 2 日ないし 3 日おきに培地交換してください。

※骨形成メディウムに交換してから 4~7 日目ごろから細胞層が白くなります。

※一部の細胞から分化した脂肪細胞も出現します。

細胞継代

※ 本製品は播種後の細胞が剥がれにくいいため、継代培養はお勧めできません。

IX. 技術情報

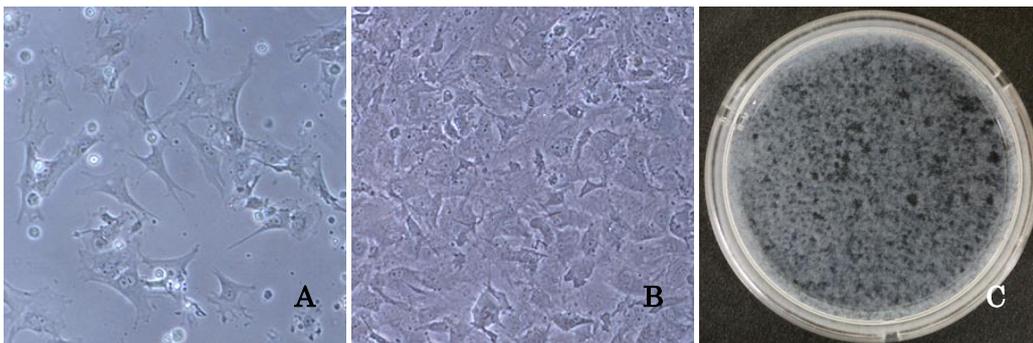


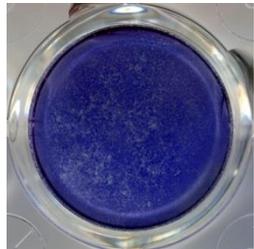
図 1. 細胞形態

A. 播種翌日 / B. コンフルエント / C. 骨形成メディウムで 3 週間培養させた細胞 (35 mm Dish で培養)

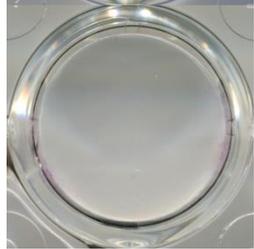
◇ 培養例

プロトコールに従って 24well プレートで培養し、骨形成メディウムで培養した細胞をアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム沈着について検出させました。

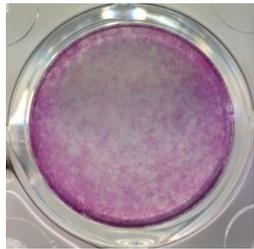
アルカリホスファターゼ活性を視覚化させるためにアルカリホスファターゼ染色キット(品番:AK20)、カルシウム沈着した部位を染色させるために石灰化染色キット(品番:AK21)を用いて染色した結果、下図のように培養日数が経つにつれてカルシウム沈着が進んでいることがわかりました。



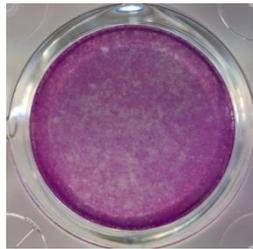
アルカリホスファターゼ染色キット
(品番:AK20)



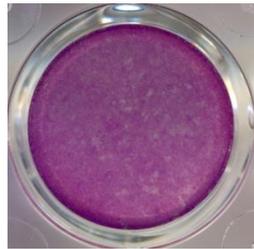
1 日目



5 日目



10 日目



15 日目

石灰化染色キット
(品番:AK21)

X. 参考文献

- 1) SL Cheng *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134(1) p277-286 (1994).
- 2) Ohgushi *et al.* In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 32(3) p333-340 (1996).