

# Technical Bulletin

---

ヒト幹細胞の骨格筋様細胞分化誘導カクテル

**Quick RNA cocktail**

**Quick-Muscle™**

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS KGTQR01.



[www.promega.com](http://www.promega.com)

## Quick RNA cocktail

# Quick-Muscle™

製品マニュアルは弊社のウェブサイトでもご入手頂けます ([www.promega.co.jp/lit/quickrna.html](http://www.promega.co.jp/lit/quickrna.html))。最新バージョンについてはウェブサイトをご覧ください。製品の技術的なお問い合わせは [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com) までお寄せください。

I. はじめに .....	1
II. 製品容量と保存 .....	2
III. プロトコール .....	2
A. 細胞の準備 (1 日目) .....	2
B. RNA トランスフェクション① (2 日目) .....	2
C. RNA トランスフェクション②③ (3 日目) .....	3
D. RNA トランスフェクション④⑤ (4 日目) .....	3
E. 分化の確認 (6 日目) .....	4

### I. はじめに

Quick RNA カクテルシリーズは ES 細胞や iPS 細胞の分化を促進する各種 RNA の混合カクテルで、未分化のヒト ES/iPS に本製品をトランスフェクションすることにより標準法よりも高効率、迅速に目的の細胞に分化させることができます。

### 特長

- ・ 優れた分化効率 (従来法に比べ 12 倍)
- ・ 迅速に分化 (4 日)
- ・ 別売の各種遺伝子の RNA 溶液で分化実験をデザイン可能

## II. 製品容量と保存

### 容量

製品名	サイズ	カタログ番号
Quick-Muscle™	1 セット	KGTQR01

Quick-Muscle™ 1 セットにはヒト ES/iPS 細胞を 6 ウェルプレート of 1 ウェル分 (2.5 ~ 3.0 x 10<sup>5</sup> cells/ ウェル) または 24 ウェルプレートで 4 ウェル分 (6 ~ 7 x 10<sup>4</sup> cells/ ウェル) で分化させるのに十分な量の試薬が含まれます。

### 内容

- ・ Quick-Muscle™ Solution A [10 µl] × 2 本
  - ・ Quick-Muscle™ Solution B [10 µl] × 3 本
- ※各 Solution の RNA 濃度は 4 µg/10 µl

### 保存方法

- ・ Quick-Muscle™ は -80°C で保存してください (約 1 年間の保存が可能)。

## III. プロトコール

### A. 細胞の準備 (1 日目)

細胞培養基質 (例: iMatrix-511 [Nippi]) をコートしたプレートにシングルセルにしたヒト ES/iPS 細胞を播種します (6 ウェルプレートの場合: 2.5 ~ 3.0 x 10<sup>5</sup> cells/ ウェル、4 ウェルプレートの場合: 6 ~ 7 x 10<sup>4</sup> cells/ ウェル)。

※培地は ROCK 阻害剤含む標準的な未分化維持培地 (例: StemFit® AK03 培地 [味の素]) を使用。

※ ROCK 阻害剤の終濃度は 10 µmol/L (例: Y-27632 [WAKO])

### B. RNA トランスフェクション① (2 日目)

1. 未分化維持培地を各ウェル 2 ml (6 ウェルプレートの場合) または 500 µl (24 ウェルプレートの場合) の標準的な細胞培養培地 (例: α MEM, 5 % KSR (Knockout serum replacement [Life Technologies]), 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 mM glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol, penicillin/streptomycin (50 U/50 µg/ml)) に交換します。

※ RNA トランスフェクションの効率は細胞密度に依存するため、トランスフェクション時には低い細胞密度 (未分化維持培地から細胞培養培地への交換後は細胞密度が 2 割程度、最後のトランスフェクション時には 7 ~ 8 割程度) が望ましい。

2. 4～5 時間後に 1 回目の RNA トランスフェクションを行います。
  - \* トランスフェクションについては各トランスフェクション試薬のマニュアルに従ってください (以下はトランスフェクション例)。
    - ・ Opti-MEM<sup>®</sup> (Life Technologies) を室温に戻す。
    - ・ ヒト ES・iPS 細胞に適したトランスフェクション試薬を準備。
    - ・ Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution を氷上で溶かす。
    - ・ 1 つの 1.5 ml チューブを準備する。
  - \* 以下はすべて室温で行います。
    - ・ Opti-MEM<sup>®</sup> を 1 つの 1.5 ml チューブに 200  $\mu$ l 分注し、トランスフェクション試薬を入れて静置する (TF 溶液 1)。
    - ・ TF 試薬 1 と混和する直前に、Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution A (10  $\mu$ l) 1 本に Opti-MEM<sup>®</sup> を 200  $\mu$ l 分注する (TF 溶液 2)。
    - ・ TF 溶液 1 を TF 溶液 2 に入れる (混和の方法についてはご利用のトランスフェクション試薬に従う)
    - ・ インキュベータからプレートを取り出し、上記の混合液を各ウェル内の培地の上から全量 (6 ウェルプレートの場合) または 1/4 量 (24 ウェルプレートの場合) を滴下する。
    - ・ 細かく揺らして均一に混ぜたあと、インキュベータに戻す。
    - ・ 2～3 時間後に B18R 含有細胞培養培地に交換します。
      - \* B18R を入れない場合、細胞の生存率が著しく低下する。
      - \* B18R の終濃度は 250 ng/mL (例: B18R [eBioscience])
      - \* コントロールとして Emerald mRNA を使用した場合、翌日には 7～8 割の細胞で明瞭に蛍光が観察される。

### C. RNA トランスフェクション②③ (3 日目)

1. B18R 含有細胞培養培地に交換します。
2. 1 時間後に 2 回目の RNA トランスフェクション (Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution A) および培地交換を前回同様に行います。
3. 5～6 時間後に 3 回目の RNA トランスフェクション (Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution B) および培地交換を前回同様に行います。

### D. RNA トランスフェクション④⑤ (4 日目)

1. B18R 含有細胞培養培地に交換します。
2. 1 時間後に 4 回目の RNA トランスフェクション (Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution B) および培地交換を前回同様に行います。
3. 5～6 時間後に 5 回目の RNA トランスフェクション (Quick-Muscle<sup>™</sup> Solution B) および培地交換を前回同様に行います。

## E. 分化の確認 (6日目)

骨格筋細胞様の形態変化を示し、数日間観察することができます。

※免疫染色で3割から6割の細胞が Myosin heavy chain 陽性となる。

Quick シリーズの各種遺伝子合成 RNA については以下をご覧ください。

[www.promega.co.jp/QuickRNA/](http://www.promega.co.jp/QuickRNA/)

應義塾大学の知的財産を元に Elixirgen 社 (米国メリーランド州) よりライセンスを受けた製品です。



プロメガ株式会社

東京都中央区日本橋大伝馬町 14-15  
TEL: 03-3669-7981 FAX: 03-3669-7982



[www.promega.com](http://www.promega.com)