

产品货号	产品规格	储存条件	运输条件	有效期
SP04021-0200	200mL	按标签所示温度保存，避光储存	冰袋+干冰	一年

人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基

操作手册

产品说明：

该培养基主要适用于培养和诱导人脂肪间充质干细胞（hASCs）进行成骨分化。这些干细胞是从人体脂肪组织中分离得到的多能干细胞，具有向多个细胞系分化的潜能。通过使用成骨诱导培养基，研究人员可以促使这些干细胞分化成具有骨细胞特征的细胞，为骨组织工程和骨相关疾病的研究提供有力的工具。

产品成分：

人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基组成成分：

成分名称	成分规格
人脂肪间充质干细胞诱导分化基础培养基	177 mL
FBS	20mL
人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化添加物	3mL
茜素红S染色液	10mL
明胶包被液	10mL

注意：

- 1、在操作过程中，请确保培养细胞的无菌条件，以防止细胞的污染。
- 2、本产品含有血清和双抗，如无特别需要不用额外再添加血清和双抗，可以直接使用。
- 3、为保持本产品的最佳使用效果，不宜将其长时间放置于室温或较高的温度环境中。
- 4、遵循实验室安全操作规程，使用个人防护设备，并在必要时采取相应的生物安全级别。
- 5、本产品含血清成分，仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床及其他用途。

操作流程：

一、人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基的准备

- 1.前言：本品为试剂盒型，使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。
- 2.准备工作：将血清于4℃解冻至完全融化；将各添加物于室温解冻至完全融化，轻轻摇晃混匀。

温馨提示：

- ①配制好的完全培养基，需放置4℃避光保存，1个月内用完；
- ②若短期内无法用完全培养基，建议分批配制(首先将试剂按套装内各成分比例分装，建议分装不超过4份，然后取出其中一份按比例配制完培，剩余成分严格按各自条件保存，不可多次冻融)。

二、人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化操作指导

- 1.试剂准备：此过程需要准备人脂肪间充质干细胞完全培养基、0.25%胰酶(含EDTA)、1×PBS以及人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基。

2.明胶包被: 明胶包被有助于减少细胞诱导过程中的细胞回缩、飘起、卷边、贴壁不牢等现象。您可以根据自己细胞状态选择是否包被培养器皿。以六孔板为例, 操作步骤为: 加适量明胶包被液, 覆盖六孔板底部即可, 于超净台或细胞培养箱孵育30min, 吸除明胶包被液, 在生物安全柜中自然风干30min, 即可用于实验接种。

3.温度: 细胞培养基温度变化是引发细胞诱导过程中的飘起、卷边的主要影响因素。因此诱导培养基在换液前一定要预热至37℃, 在外观察细胞时间不可过长(建议10分钟以内)。

4.换液: 换液过程对于成骨诱导实验是极其重要的。换液过程经验总结如下, 供参考:

①换液前建议将本次操作所需的一定量的完全培养基在培养箱或水浴锅内预热至37℃。

②显微镜下观察细胞或者换液时间不宜过长(建议控制在10min以内, 待处理细胞较多时建议分批处理)。

③换液过程中, 培养板下建议垫放一块空培养板(或泡沫板)以隔开冰冷的超净台, 防止细胞快速失温。

④培养板平放时应减少震动, 不倾斜板子, 直接吸除约80%的旧培养基(不建议全部吸除干净, 留存约20%左右可保持孔底湿润及保留早期微量钙沉积物)。

⑤将新鲜成骨分化完全培养基沿孔壁缓缓注入, 注意不要将液体直接对准细胞表面吹打, 防止细胞层脱落, 换液后轻放入37℃培养箱中继续培养。

⑥若使用12、24孔板, 建议同时操作换液(同时吸除旧培养基再同时换入新鲜诱导液)不超过6孔。

本成骨诱导操作指导以六孔板为例:

1.细胞计数: 当待测人脂肪间充质干细胞的融合度达到80~90%时, 即可用0.25%胰酶进行消化, 并计数。

2.细胞接种: 根据计数结果, 按 2×10^4 cells/cm²的细胞密度接种于6孔板, 每孔加入2mL的人脂肪间充质干细胞完全培养基, 置于37℃, 5%CO₂的培养箱中进行培养。

3.待细胞融合度达到70%~80%时, 小心弃去孔内完全培养基后, 每孔加入2mL配制好的人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基。

4.每隔3天左右进行换液, 换液前, 需将人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基预热至室温以上。(注意: 成骨诱导过程中, 换液时注意不要把液体打到细胞表面, 防止细胞层脱落。)

5.诱导2~4周后, 观察细胞的形态变化及生长情况, 用茜素红进行染色。

三、茜素红S染色液的使用

1.试剂准备: 此过程需准备茜素红S染色液、4%中性甲醛溶液、1×PBS溶液。

2.当成骨诱导实验结束后, 可进行茜素红染色确定诱导效果。吸走孔板里的成骨诱导分化完全培养基, 用1×PBS润洗1~2次。

2.于6孔板中每孔加入1mL4%中性甲醛溶液, 固定细胞30分钟。

3.弃去4%中性甲醛溶液, 加入1×PBS润洗1~2次。

4.每孔加入1mL茜素红染色液, 室温染色20~30分钟(染色时间可以根据实际情况适当延长或缩减)。

5.弃去茜素红染色液, 用1×PBS润洗2~3次, 把背景杂质洗净, 即可在显微镜下观察诱导和染色效果。

6.结果判读: 钙结节被茜素红染色后呈红色、红偏黄或红偏紫。