

产品货号	产品规格	储存条件	运输条件	有效期
SP04112-0400	400 mL	按标签所示温度保存，避光储存	冰袋冷藏运输	一年

## 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基

### 操作手册

#### 产品说明：

小鼠骨髓间充质干细胞（mBMSCs）成脂诱导分化培养基主要适用于小鼠骨髓间充质干细胞。这些干细胞源自小鼠的骨髓组织，具有多能干细胞的特性，可以向多个细胞系分化，包括成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等。

成脂诱导分化培养基的设计旨在促使这些小鼠骨髓间充质干细胞朝向脂肪细胞的方向分化。这对于研究脂肪组织发育、代谢调节以及与肥胖相关的机制具有重要意义。通过使用成脂诱导分化培养基，研究人员可以模拟和促进小鼠骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化过程，为相关领域的实验研究提供支持。

#### 产品成分：

##### 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基A液：

成分名称	添加体积
小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基A	177 mL
FBS	20 mL
添加物A1	2.8 mL
添加物A2	200 $\mu$ L

##### 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基B液：

成分名称	添加体积
小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基B	177.2 mL
FBS	20 mL
添加物B1	2.8 mL

其他辅助试剂：明胶包被液(10ml) 油红O染色液(10ml)

#### 注意：

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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、小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基的准备

- 本品为试剂盒型，使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。（请勿将A液与B液混淆）
- 准备工作：将血清于4°C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A①、B混匀；A②短暂离心，使试剂能全部收集至管底。
- A液配置：按顺序将FBS、A1、A2先后加入到基础培养基A中；混匀做标识，即可使用。
- B液配置：按顺序将FBS、B先后加入到基础培养基B中；混匀做标识，即可使用。

**注：步骤3、4中无菌吸取试剂管中的试剂成分，将枪头伸至培养基液面下方快速注入，轻微吹打洗涤枪头。再吸取少量培养基洗涤试剂管，尽可能将所有组分完整地加到基础培养基中，可以更好得保证培养基的效果。**

## 二、小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化操作指导

### 注意事项：

1. 试剂准备：此过程需要准备小鼠骨髓间充质干细胞完全培养基、0.25%胰酶、1×PBS以及小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基。
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。操作步骤为：加适量明胶包被液，覆盖孔板底部即可，于超净台或细胞培养箱孵育30min，吸除明胶包被液，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：同时操作孔数不可过多（建议6孔以内），换液时建议沿孔板侧壁轻柔缓慢得注入。

### 本成脂诱导操作指导以六孔板为例：

1. 当您的小鼠骨髓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。
2. 将消化下来的小鼠骨髓间充质干细胞进行计数，根据计数结果，按 $2\sim3\times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种在六孔板中，每孔加入2 mL的小鼠骨髓间充质干细胞完全培养基。
3. 将均匀接种好的小鼠骨髓间充质干细胞置于37℃，5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。
4. 当细胞融合度达到100%时（细胞过饱和有利于激发干细胞的成脂潜能），小心的将孔内完全培养基吸走，向六孔板中加入2 mL小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基A液完全培养基。
5. A液诱导2~3天后，吸走六孔板的诱导完全培养基，每孔加入2 mL小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基B液完全培养基维持1天。

注：A液诱导时长2~3天均可，诱导期间细胞出现形态变化为正常现象；“A 2天+B 1天”的方案对细胞的刺激更温和，新手使用较为稳妥；“A 3天+ B 1天”的方案对细胞的刺激更强，在细胞状态优秀、操作者经验丰富的情况下可以加快实验进程。

6. A、B两种培养基交替诱导3~5次后，当观察到干细胞内出现明显的、足够多的脂滴后，可用B液继续培养3~6天（每2~3天换液一次），至直脂滴变得足够大和饱满，即可结束诱导，根据实验需求对细胞进行染色和后续鉴定。

## 三、油红 O 染色液的使用

1. 当您的成脂诱导实验结束后，可进行油红O染色确定诱导效果（本试剂盒提供饱和油红O染色液，需配制成工作液后使用）。
2. 吸走孔板里的成脂诱导分化完全培养基，用1×PBS 冲洗1~2遍。
3. 加入4%中性甲醛溶液（覆盖细胞表面即可），对细胞固定30分钟。
4. 细胞固定期间，可配制油红O工作液（饱和油红O溶液：蒸馏水=3:2，混匀后用中性滤纸或尼龙材质滤膜过滤除去杂质）。
5. 吸走4%中性甲醛溶液，用1×PBS冲洗1~2遍。
6. 以六孔板为例，每孔加入1mL油红O工作液，室温染色30分钟。
7. 吸走油红O工作液，用1×PBS冲洗1~2次，把背景杂质洗干净，即可在显微镜下观察诱导和染色效果。

### 注意事项

1. 因为培养基的成分较多，请在配制过程中严格注意无菌操作；若担心混匀过程中出现不良操作，请在混匀试剂后，对完全培养基进行0.22μm的滤膜过滤除菌。
2. A、B交替诱导是为了减轻A液中试剂对干细胞的影响，如果您的干细胞状态较好可在前7天先只使用A液进行刺激诱导（中途每2~3天更换新鲜A液），待脂滴快速出现后，再进行两种培养基交替诱导的操作。