

# 人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基

产品名称	目录号	产品规格	储存条件	保质期
人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基	SP06021	1 Kit	基培 2-8°C 补料 -20°C	12 个月

## 1 产品说明:

人脂肪间充质干细胞 (hBMSCs) 是该培养基的主要适用细胞类型。这些干细胞来源于人脂肪组织, 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。成骨诱导分化培养基的设计旨在促使这些干细胞朝向成骨细胞的方向分化, 为骨组织工程、骨生物学和相关领域的研究提供有力的支持。通过使用这种培养基, 研究人员可以模拟和促进脂肪间充质干细胞向骨细胞的分化过程, 为理解骨组织发育和再生提供一个有用的工具。

## 2 使用说明:

### 套装成分:

成分名称	添加体积	储存条件
人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化基础培养基	177 mL	2-8°C避光保存
成骨诱导分化专用 FBS	20 mL	-20°C避光保存
人脂肪间充质干细胞成骨分化补料	3 mL	-20°C避光保存
茜素红 S 染色液	10 mL	2-8°C避光保存
明胶包被液	10 mL	2-8°C避光保存

### 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

- 前言: 本品为试剂盒型, 使用前需将试剂盒内相关成分试剂混匀 (基础培养基+专用FBS+分化添加物)。
- 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, 轻轻摇晃混匀。

注: 1) 配制好的完全培养基, 需放置4°C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)。

3. 血清离心: 血清中可能会存在白色絮状沉淀物, 这通常是胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质析出导致, 属于正常现象, 该现象不影响细胞的培养和诱导分化。若您欲去除这些絮状沉淀物, 可以将血清分装至无菌离心管内, 以400-600 g离心5 min, 取上清液使用。

但是我们不建议您以过滤的方法去除这些絮状沉淀物，一方面它可能会阻塞您的过滤膜；另一方面，过滤血清这种行为可能会导致血清中部分营养成分的流失。

4. 完培配置：将血清、成骨分化添加物全部加入成骨分化专用基础培养基中，即可使用。

## 二、人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化操作指导

### 注意事项：

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、0.1% 明胶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：若培养过程中容易发生干细胞漂浮或干细胞回缩等现象，可在接种干细胞进行诱导之前对培养板进行 0.1% 明胶（本试剂盒不提供明胶）的包被处理。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°C，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，换液时建议沿孔板侧壁轻柔缓慢得注入，不可将液体打到细胞表面。

### 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（含EDTA）进行消化，并计数。

2. 细胞接种：根据计数结果，按  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 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 °C，5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。

3. 待细胞融合度达到 80%~90% 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。

### 茜素红染色液的使用

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（自行准备）、1×PBS 溶液。

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 1mL 4% 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。

注意：成骨诱导实验过程中，很难通过镜下观察/白光照片判断是否已经完成诱导，而孔板一经染色又无法继续诱导。因此建议，实验开始，在另外的孔板上多做1-3份平行实验，或仅将‘正常诱导组’在另外的孔板上多做1-3份，以便诱导后期用茜素红染色来判断正式实验的诱导进度。

## 3 注意和声明：

- 1、在操作过程中，请确保无菌条件；
- 2、本产品补料融化后有轻微白色沉淀，该成分为L-谷氨酰胺，不影响正常使用；
- 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、仅用于研究和进一步生产，不得直接用于人或动物；
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

