

# 人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基

产品名称	目录号	产品规格	储存条件	保质期
人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基	SP06013	1 Kit	基培 2-8°C 补料 -20°C	12 个月

## 1 产品说明:

人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基是专门为人类骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) 研究设计的培养基, 旨在引导这些干细胞向软骨细胞分化。该培养基包含了经过精心调配的成分, 如特定的生长因子和激素, 以模拟体内环境, 为研究人员提供一个有效的工具, 以深入研究人类骨髓间充质干细胞在形成软骨细胞过程中的分化机制。人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基的应用场景涵盖了多个领域, 包括深入了解人类软骨组织的发育过程、研究相关疾病模型, 以及进行药物筛选和治疗研究。科研人员可以利用这种培养基推动对人类骨髓间充质干细胞行为的深入研究, 为软骨组织的发育、疾病治疗等方面的研究提供支持。选择适当的培养基对于实验成功和获得可靠研究结果至关重要, 而该培养基为这一过程提供了可靠的基础。

## 2 使用说明:

### 套装成分:

成分名称	100mL 体积	200mL 体积	储存条件
人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基	87.6	175.2 mL	2-8°C避光保存
成软骨诱导分化专用 FBS	10 mL	20 mL	-20°C避光保存
人骨髓间充质干细胞成软骨分化补料	2.4 mL	2.4 mL×2	-20°C避光保存
阿尔新兰染色液	10 mL	10 mL	2-8°C避光保存
明胶包被液	10 mL	10 mL	2-8°C避光保存

### 操作流程:

#### 一、人骨髓间充质干细胞成软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部培养基, 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、成软骨分化添加物全部加入成软骨分化专用基础培养基中, 即可使用。

## 二、人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化操作指导

### 注意事项:

1. 试剂准备: 此过程需要准备人骨髓间充质干细胞完全培养基、0.25% 胰酶(含EDTA)、1×PBS、0.1% 明胶以及人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基。

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。

### 本成软骨诱导操作指导以六孔板为例:

1. 当您的人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. 将消化下来的人骨髓间充质干细胞进行计数, 根据计数结果, 按  $7.5 \times 10^5$  cells/mL 的量加入成软骨诱导完全培养基重悬细胞, 然后 150g 离心 5 分钟;
3. 弃上清, 按  $5.0 \times 10^5$  cells/mL 的量加入成软骨诱导分化完全培养基(现配现用), 重悬细胞。
4. 吸取500uL细胞悬液(即  $2.5 \times 10^5$  个细胞)转入 15mL离心管中, 150g 离心 5 分钟;
5. 离心后不可摇动或吹打细胞团, 小心地将离心管盖拧松, 以便于气体交换。放入 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 中孵育。

注: 48 小时内不要摇动离心管, 保持离心管静置。

6. 48h 后每 2~3 天换新鲜的软骨分化诱导液, 每管 0.5mL, 换液后轻弹细胞团使其能脱壁漂浮。

7. 拧松管盖, 放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 中继续诱导; 诱导过程中, 细胞团直径会有所增大, 表面会变得光滑呈胶质。

注: 为了使细胞更容易聚拢成球, 可选择底部更圆的离心管。

8. 持续诱导 20~30 天后, 可对软骨球进行中性甲醛固定和石蜡包埋切片, 切片后根据实验需要可进行染色鉴定。

### 阿尔新兰染色分析

1. 固定: 中性甲醛固定, 石蜡包埋切片。
2. 染色步骤:
  - 1) 石蜡切片脱蜡至水, 蒸馏水冲洗。(不要直接冲洗组织, 以防脱片, 破坏组织);
  - 2) 阿尔新蓝染色液浸染30 min;
  - 3) 用自来水冲洗2 min;
  - 4) 蒸馏水终止染色;
  - 5) 显微镜下观察染色程度, 拍照。
3. 结果判读: 软骨、酸性粘液物质呈蓝色。



### 3 注意和声明:

- 1、在操作过程中，请确保无菌条件；
- 2、成软骨分化添加物中含细胞生长因子，务必现配现用，配好的完全培养基必须当天用完；
- 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。

