

人间充质干细胞 成软骨诱导分化培养基操作手册

产品规格：200mL

产品货号：BGM-0144

产品描述

BG sciences 人间充质干细胞成软骨诱导分化培养基专门为不同组织来源的间充质干细胞（Human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs）成软骨诱导分化而研发，针对人间充质干细胞的特性优化分化试剂的配方，可增加人间充质干细胞的成软骨分化效果。

本产品不含血清成分，但含其他血清替代物蛋白成分，仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床及其他用途。

培养基组成成分

成分名称	添加体积
人间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基	193 mL
丙酮酸钠 Sodium Pyruvate	200 μ L
ITS supplement	1mL*2
TGF- β 3	1mL*2
抗坏血酸 Ascorbic Acid	600 μ L
脯氨酸 Proline	200 μ L
地塞米松 Dexamethasone	20 μ L
青链霉素 Penicillin-Streptomycin	2 mL

注：各成分请根据试剂管上标签标示温度保存。

操作流程

一、人间充质干细胞成软骨诱导分化培养基的准备

1. 本产品为试剂盒型，使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。
2. 将 TGF- β 3 和青链霉素以外的试剂管取出，用 75% 酒精擦拭各试剂管的开口外壁消毒后放入超净工作台中，静止片刻待酒精挥发。
3. 按上述成分表（TGF- β 3 除外）将添加物逐一添加至人间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基中，此时培养基为半完全培养基，充分混合后做好标识。

注：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，保证培养基的效果。

4. TGF-β3 的制备

- 1) 为了保证 TGF-β3 的效果, 请将试剂进行分装 (分装体积可按实验需要计算, 每次实验取一管使用), 保存在-20°C或更低的温度下; 冻融过的 TGF-β3 请于 6 个月之内使用完毕。
- 2) 吸取 TGF-β3 之前需短暂离心试剂管, 使试剂聚集于管底以便取用。
- 3) 按照比例 (1 mL 半完全培养基中加入 10 μL 的 TGF-β3), 吸取实验所需剂量的 TGF-β3, 加入相应体积的半完全培养基中, 配制成软骨诱导分化培养基, 轻轻混合均匀。

注: 配制好的成软骨诱导分化培养基必须在当天使用。

5. 青链霉素: 若实验室条件良好, 在诱导过程中可不加入此试剂。

二、人间充质干细胞成软骨诱导分化操作指导

1. 当您的间充质干细胞的融合度达到 90%左右时, 即可用 0.25%胰酶进行消化。
2. 细胞消化离心后, 去上清液, 按 $7.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的量加入半完全培养基重悬细胞, 然后 150g 离心 5 分钟;
3. 去上清, 按 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 的量加入软骨诱导分化培养液 (现配现用) 重悬细胞;
4. 吸取 500ul 细胞悬液 (即 2.5×10^5 个细胞) 转入 15ml 离心管中, 150g 离心 5 分钟;

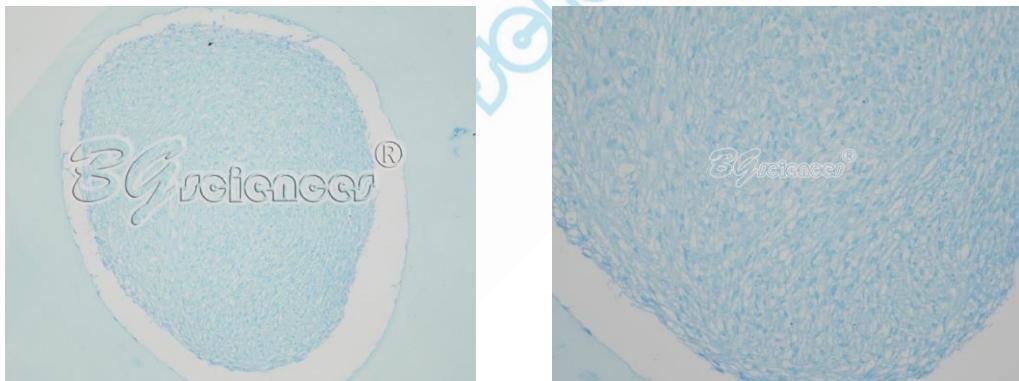
5. 离心后不可摇动或吹打细胞团，小心地将离心管盖拧松，以便于气体交换。放入 37℃，5%CO₂ 中孵育。

注意：24 小时内不要摇动细胞团。

6. 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℃，5%CO₂ 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。（本试剂盒提供阿利辛蓝染液）



间充质干细胞成软骨诱导切片阿利辛蓝染色图

三、阿利辛蓝染色分析

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) 阿利辛蓝染色液浸染30分钟。

- 3) 用自来水冲洗2分钟。
 - 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。

注意事项

1. 因为试剂盒的成分较多，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，对培养基进行 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌。
2. 试剂盒的成分较多，切记 TGF- β 3 必须现配现用，配好的含有 TGF- β 3 的培养基必须当天使用完
3. 地塞米松 Dexamethasone 用无水乙醇配制，易挥发，注意拧紧盖子，按量添加。

推荐产品

产品名称	产品货号	规格
人间充质干细胞成骨诱导分化培养基	BGM-0122	200mL
人间充质干细胞成脂诱导分化培养基	BGM-0133	400mL
人间充质干细胞完全培养基	BGM-0111	500mL