

间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒

产品描述

本产品为我司团队精心优化的间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒，可增强间充质干细胞向成软骨细胞分化的能力。

本产品仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床、家庭及其他用途。

产品组成成分及保存

试剂名称	体积（100mL 规格/200mL 规格）	保存条件
诱导分化添加剂 I	5mL / 10mL	-20℃，1 Year
诱导分化添加剂 II	1mL / 2mL	-20℃，1 Year
优质胎牛血清	10mL / 20mL	-20℃，1 Year
细胞基础培养基	84mL / 168mL	4℃，1 Year
甲苯胺蓝染色液	5mL / 10mL	RT（室温），1 Year

Ø 注意：

1. 为保证产品的有效性，请避免反复冻融。
2. 诱导分化添加剂 II 须现用现配，加入培养基后，须在 12 小时内用完，否则可能影响实验效果。
3. 配制好的诱导分化预混液（不含诱导分化添加剂 II）保存于 2-8℃，有效期为 2 周。

产品使用说明（2D/3D 培养）

1. 成软骨诱导分化培养基的配制

①室温条件下融化添加剂及血清。（注意：若添加剂或血清中有沉淀物，属正常现象，无须过滤，避免成分丢失。）

②配制诱导分化预混液：以下简称预混液。根据实验用量，于无菌操作台中配制。建议每次配制 50mL，先加细胞基础培养基和胎牛血清，再加诱导分化添加剂。（配制比例见表一）



试剂成分	配制比例	50mL 配制体系
诱导分化添加剂 I	5%	2.5mL
优质胎牛血清	10%	5mL
细胞基础培养基	85%	42.5mL

③配制诱导分化完全培养基：根据实验用量，按照 1%的比例向预混液中添加诱导分化添加剂 II，如每 1mL 预混液添加 10 μ L 诱导分化添加剂 II。（注意：诱导分化添加剂 II 须现用现加，配制完成的诱导分化完全培养基 12h 内使用完，否则将失效。）

2. 2D 成软骨诱导分化实验步骤

①建议取第 3~5 代、纯度达 90%以上、状态良好的间充质干细胞，将其消化下来，离心收集，使用含 10%FBS 的培养基调整细胞密度，均匀铺于培养瓶/板中。将接种好的细胞置于 37℃，5%CO₂，饱和湿度的培养箱中培养。（细胞接种详情参考表二）

培养器皿	底面积	细胞量	培养液体积
24 孔培养板	2cm ² /孔	2×10 ⁵ cell/孔	1mL/孔
12 孔培养板	4.5cm ² /孔	4.5×10 ⁵ cell/孔	2mL/孔
6 孔培养板	9.6cm ² /孔	9.6×10 ⁵ cell/孔	2mL/孔
T25 培养瓶	25cm ²	25×10 ⁵ cell	5mL
6cm 培养皿	21cm ²	21×10 ⁵ cell	5mL
10cm 培养皿	55cm ²	55×10 ⁵ cell	10mL

表二

②待细胞汇合度达 80%~100%时，即可进行诱导分化。

③小心吸弃细胞培养上清，沿孔壁缓慢加入提前配制好的诱导分化完全培养基，置于 37℃恒温细胞培养箱中培养。（**注意：完全培养基加入细胞前需提前置于 37℃预热。**）

④每 2day~3day 换用新鲜的诱导分化完全培养基。换液时，若细胞培养上清颜色变为澄清的黄色，是由于细胞量较大，培养基消耗较快导致的，请及时调整为每日换液。（**注意：完全培养基加入前需提前置于 37℃预热。**）

⑤细胞诱导 3 周后，即可进行甲苯胺蓝染色鉴定。

3. 2D 成软骨细胞甲苯胺蓝染色分析

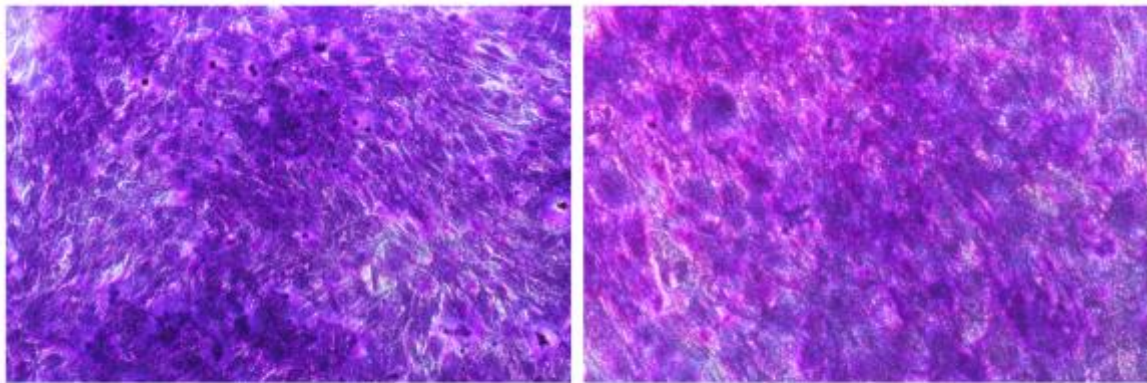
网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



- ①细胞诱导分化结束后，小心吸弃细胞培养上清，1×PBS 润洗 1~2 次，室温固定 30 min。（细胞固定液为 4%中性甲醛溶液等，体积参考表二）
- ②吸弃细胞固定液，1×PBS 润洗 2 次。沿孔壁缓慢加入甲苯胺蓝染色液，染液体积请参考表二，室温染色 30min。（注意：染色液底部可能会有沉淀，吸取时尽量不要触及底部。若染色后有沉淀，1×PBS 洗去即可。）
- ③吸出染色液，1×PBS 润洗，去掉浮色。显微镜下观察细胞染色效果，背景呈淡蓝色，成软骨细胞呈紫红色。（注意：染色液可重复使用，建议收集。）

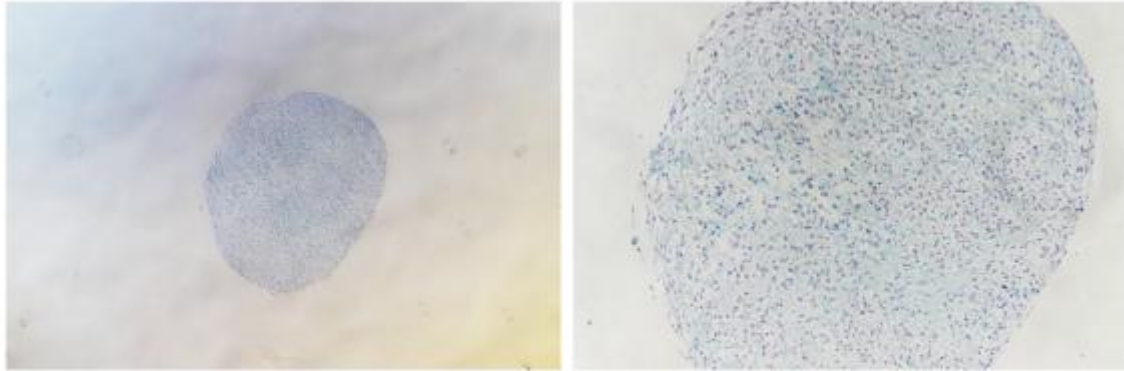


2D成软骨细胞甲苯胺蓝染色（图片仅供参考）
左图：100倍；右图：200倍

4. 3D 成软骨诱导分化实验步骤

- ①建议取第 3~5 代、纯度达 90%以上、状态良好的间充质干细胞，将其消化下来，计数。调整细胞浓度，按照每管 $3 \sim 4 \times 10^5$ cell 将细胞转移至 15mL 离心管中，20℃，250×g 离心 4min。
- ②弃上清，每管加入 0.5mL 预混液，重悬细胞沉淀。20℃，150×g 离心 5min。
- ③弃上清，每管加入 0.5mL 成软骨诱导分化完全培养基重悬细胞沉淀，20℃，150×g 离心 5min。
- ④将离心管树立放置于 37℃，5%CO₂，饱和湿度的培养箱中培养，拧松离心管盖以便于气体交换。（注意：此步骤无需重悬细胞，且 24h 内不可晃动离心管。）
- ⑤约 24h~48h 后，细胞出现聚团现象，轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮于培养液中。
- ⑥每 2~3day 换用新鲜的诱导分化完全培养基，持续诱导三周后，即可将培养液更换为固定液（4%中性甲醛），将软骨球固定，后续进行切片染色鉴定实验。





3D成软骨球石蜡切片-阿利辛蓝染色 (图片仅供参考)
左图: 40倍; 右图: 100倍

质量控制

- ü 无菌检测 (细菌、真菌和支原体检测)
- ü pH 测试
- ü 渗透压检测
- ü 内毒素

