



弗元（上海）生物科技有限公司
www.fuyuanbio.com

产品说明书

人间充质干细胞成软骨诱导试剂盒

货号：FY200008

仅用于科学研究

Version 1.3



人间充质干细胞成软骨诱导试剂盒

仅用于科学研究

产品信息

产品名称：人间充质干细胞成软骨诱导试剂盒

货号：FY200008

批号：见包装

试剂清单：

序号	名称	数量	货号	存储
A	人间充质干细胞成软骨诱导基础培养基	100 ml ×1	FY200008-A	2-8 °C
B	成软骨诱导添加物 B	200 μl ×1	FY200008-B	-20 °C
C	成软骨诱导添加物 C	10 μl ×1	FY200008-C	-20 °C
D	成软骨诱导添加物 D	100 μl ×5	FY200008-D	-20 °C
E	阿利新蓝染色液	5 ml ×1	FY200008-E	2-8 °C

存储与有效期：

组分 A、E 于 2-8 °C 避光保存，组分 B、C、D 于 -20 °C 避光保存。所有组分均须避免反复冻融及复温，各组分在所需要的温度下有效期为 1 年，配制完成的预混液于 2-8 °C 保存，有效期 1 个月，完全培养基现配现用，2-8 °C 保存不超过 72 小时。

适用细胞：

人骨髓间充质干细胞、人脂肪间充质干细胞、人脐带间充质干细胞、人羊膜间充质干细胞、人牙髓间充质干细胞、人脐带血间充质干细胞，其他组织来源的人间充质干细胞。

产品介绍

间充质干细胞（MSC）具有多向分化的潜能，体外在一定条件下可以诱导分



化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞。2006 年国际细胞治疗协会 (ISCT) 确定此三项检测指标是 MSC 鉴定的必检项目, 目前以 MSC 为基础的研究报道均会对该三个指标进行鉴定。在多种组织来源和制作方法的 MSC 药品质量控制中, 成骨、成脂、成软骨也是必检指标。

为满足科研和制药对 MSC 分化能力的鉴定, 弗元生物结合多年 MSC 研究经验优化 MSC 诱导试剂盒, 在稳定性、易用性上大幅改进, 采用了独创的小包装。该试剂盒的设计用途, 首先, 用于鉴定人 MSC 是否具有成骨分化能力, 满足 MSC 质量控制的要求。其次, 在再生医学和组织工程研究中, 诱导培养基也可作为除支架以外的培养体系。另外, 诱导培养基还可用于研究诱导分化过程中的其他检测, 如 mRNA 检测、lncRNA 检测、microRNA 检测、蛋白表达检测、胶原含量检测、免疫组化检测等。

本产品仅适用于科学研究。

操作方法

实验准备

◆ 试剂配制:

预混液: 室温融化添加物 B 和添加物 C, 将融化后加入 A 液, 充分混匀, 配制成软骨分化培养基预混液。

注意: 添加物解冻后旋涡混匀、1000g 短时离心以使溶液集中于管底。将管内溶液加入 A 液后, 吸取 A 液洗涤溶液瓶两次, 将洗涤液加入 A 液中。预混液必须充分混匀, 2-8 °C 保存。

诱导完全培养基: 取 10 ml 预混液置于 15 ml 离心管中, 加入一支添加物 D, 充分混匀制成诱导完全培养基, 此液现配现用。1 ml 预混液需加入添加物 D 的量为 10 μ l。

注意: 诱导完全培养基现配现用, 2-8 °C 放置不得超过 72 小时。整个过程须确保无菌操作, 各试剂开封前以 75% 酒精擦拭表面。



◆ 自备试剂:

- 消化液 (0.25%Trypsin-0.04%EDTA 或其他)
- 磷酸盐缓冲液 (DPBS)
- MSC 完全培养基
- 4%中性多聚甲醛溶液

注意: 若 MSC 完全培养基不含血清, 则需要准备胰酶抑制剂。MSC 消化极易过度, 建议稀释 0.25%胰酶消化液一倍, 且严格控制消化时间。

操作步骤

1. 准备所需诱导分化的 MSC, 当细胞融合达 85%左右时, 用消化液消化细胞, 细胞沉淀用成软骨诱导预混液重悬。
2. 220 g 离心 5 分钟, 沉淀以预混液重悬, 细胞密度约 2×10^6 cells/ml, 再次离心, 弃上清。
3. 沉淀以成软骨诱导完全培养基重新悬浮, 调整细胞密度为 2×10^6 cells/ml。
4. 分别取 500 μ l 细胞悬液接种于 15 ml 离心管中, 220 g 离心 5 分钟。

注意: 每管细胞的总数在 5×10^5 至 1×10^6 之间, 一般以 1 个 T25 细胞培养瓶接种一个软骨球为佳, 细胞数过少形成的软骨团块较小, 细胞数过多则可能会分开成块。正常情况下可形成 1-2 mm^3 的团块。离心以细胞聚团为准, 可适当调整。离心力过大, 软骨球不易悬浮, 离心力过小则可能形成软骨球效果不佳。

5. 旋松离心管盖, 将离心管轻轻竖直置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中静置培养。
注意: 24 小时内避免摇动细胞沉淀, 以确保形成个团块。离心管需使用聚丙烯材质无菌管。
6. 诱导培养 24 小时后, 轻轻拨动离心管底, 使细胞沉淀团块悬浮, 重新放回培养箱继续培养。

注意: 细胞团块重新悬浮的时间因细胞而定, 基本在 24-48 小时之间, 以细胞团周围有聚拢现象时为准。若细胞团块贴壁较牢固, 可用移液器轻轻吹动使其悬浮, 注意不要吹散团块。



7. 每 2 天更换新鲜完全诱导培养基。换液时轻轻吸去旧培养基，每管加新鲜配制的成软骨分化完全培养基 500 μ l。

注意：换液时动作轻柔，以免吸出细胞团块；诱导完全培养基必须经过复温，否则影响诱导效果。在诱导培养 2-3 周后会出现大量细胞外基质，富含软骨蛋白多糖和 II 型胶原。

8. 诱导培养 14-20 天，弃去培养上清，DPBS 洗细胞两次，4%中性多聚甲醛溶液 2 ml/管室温固定细胞 1 小时。

注意：培养结束时或中途可以选择其他检测方法，如基因表达检测等，若采用自己拟定的检测方法则后续方案需要自己拟定。一般软骨球诱导致密后能进行染色处理，时间在 14-20 天左右，时间过久可能导致团块内部出现空泡，甚至团块裂开，具体时间请以自己细胞的特性自行确定。

9. 弃去固定液，DPBS 洗 2 次，脱水、石蜡包埋后切片。

注意：脱水包埋可以用擦镜纸包裹后使用自动脱水机脱水、包埋，也可以在原离心管中逐级更换脱水、透蜡的液体，手工包埋。过程中一定要注意团块不要丢失。

10. 阿利新蓝染色：将切片进行脱蜡和复水，阿利新蓝染液染色 30 分钟，流水冲洗 5 分钟，脱水、透明、中性树脂封片，显微镜下观察、拍照。

注意：染色和制片过程中避免干片或失水，干片或缺水后会导致组织形态发生变化，影响观察、拍照效果。根据需要可以选择细胞核复染，不建议苏木素复染，可以使用核固红复染。

11. **结果判定：**按照程序操作完毕，低倍镜下观察可见蓝色着色，该蓝色染色的为酸性粘多糖，说明实验所用的 MSC 具有成软骨能力。否则，所使用的 MSC 无成软骨能力。

注意：该鉴定方法和判定标准为定性实验标准，可根据具体情况设置其他判定方法和标准。以上提供的是包埋切片染色的方案，若实验室条件限制，可选择直接对团块进行染色，方法见 B9、B10、B11。若试剂盒用于组织工程软骨诱导，可作为除支架材料以外的诱导液使用。

B9. 弃去固定液，DPBS 洗团块 2 次。

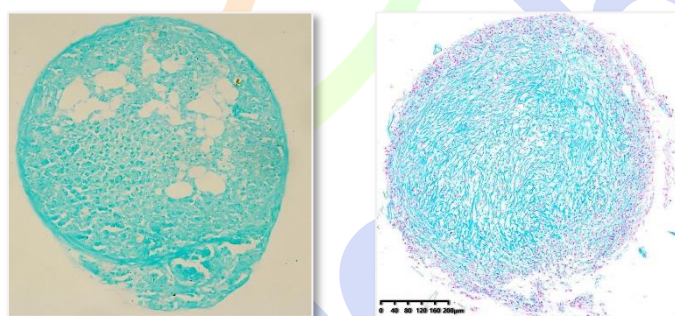


B10. 阿利新蓝染色：向团块中加 500 μ l 阿利新蓝染液染色 30 分钟。弃染色液，加纯水 5 ml 摇动清洗 5 分钟/次，反复洗 5 次。

注意：染色液中的团块不易看清，务必小心吸去上清，避免样本丢失。样本始终需要保持在液体中，避免失水导致形态改变。

B11. **结果判定：**按照程序操作完毕，低倍镜下观察可见深蓝色着色，该蓝色染色的为酸性粘多糖，说明实验所用的 MSC 具有成软骨能力。否则，所使用的 MSC 无成软骨能力。

结果展示



相关产品

名称	货号
人间充质干细胞无血清培养基	RC200101
细胞冻存液 II	RC200106
间充质干细胞消化液	RC200108
人间充质干细胞成骨诱导试剂盒	FY200006
人间充质干细胞成脂诱导试剂盒	FY200007

