弗元（上海）生物科技有限公司
www.fuyuanbio.com

产品说明书

# 人间充质干细胞成脂诱导试剂盒

货号：FY200007

仅用于科学研究

Version 1.3

# 人间充质干细胞成脂诱导试剂盒

仅用于科学研究

## 产品信息

产品名称：人间充质干细胞成脂诱导试剂盒

货号：FY200007

批号：见包装

试剂清单：

| 序号 | 名称 | 数量 | 货号 | 存储 |
|---|---|---|---|---|
| **A** | 人间充质干细胞成脂诱导基础培养基 | 90 ml ×1 | FY200007-A | 2-8 ℃ |
| **B** | 成脂诱导添加物 B | 5 ml ×1 | FY200007-B | -20 ℃ |
| **C** | 成脂诱导添加物 C | 5 ml ×1 | FY200007-C | -20 ℃ |
| **D** | 包被溶液 | 10 ml ×1 | FY200007-D | 2-8 ℃ |
| **E** | 油红 O 染色液（储液） | 5 ml ×1 | FY200007-E | 2-8 ℃ |

存储与有效期：

组分 A、D、E 于 2-8 ℃避光保存，组分 B、C 于-20 ℃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，配制完成的完全培养基于 2-8 ℃保存，有效期 1 个月。

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



网址：www.fuyuanbio.com
邮箱：fuyuanbio@fuyuanbio.com

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 是否具有成脂分化能力，满足 MSC 质量控制的要求。其次，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、油脂定量检测、免疫组化检测等。再者，该产品诱导 MSC 分化为的脂肪细胞多为多泡脂肪细胞样，当脂肪滴融合过大时容易脱壁，难见单泡脂肪细胞样。用于脂肪研究可斟酌使用本产品。

本产品仅适用于科学研究。

## 操作方法

### 实验准备

◆ 试剂配制：

**诱导液 B：** 2-8℃过夜融化添加物 B 液，B 液使用前须 37℃复温 30 分钟，充分混匀。将基础培养基 A 液平均分成 2 份，各 45 ml，加入添加物 B 液配制成完全诱导培养基 B，充分混匀。

**诱导液 C：** 2-8℃过夜融化添加物 C 液，加入基础培养基 A 液的另一份 45 ml，配制成完全诱导培养基 C，充分混匀。

***注意：****添加物 B 液必须充分复温，内容物充分解冻为透明无沉淀。混合成诱导完全培养基后必须充分混匀，2-8 ℃保存。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。*

**油红 O 染液（工作液）：** 取油红 O 储液，与蒸馏水以 3：2 的比例混合均匀，中性滤纸过滤，即配制成了油红 O 染液（工作液）。油红 O 染色工作液现配



网址：www.fuyuanbio.com
邮箱：fuyuanbio@fuyuanbio.com

现用。

◆ 培养皿处理：

加适量包被溶液 D 液到培养器皿中，轻轻摇动使其覆盖整个培养器皿底面，室温静置 30-60 分钟。弃去溶液，室温晾干。

***注意：****包被液 C 使用前必须进行室温复温。建议使用六孔板，每孔加 D 液 1 ml，使用其他培养器皿时需考虑实验结果的稳定性。整个过程需在超净工作台中操作，避免污染。*

◆ 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，并用 MSC 完全培养基重悬。
2. 按照 $3\times10^4$ cells/$cm^2$ 的密度将细胞接种于已包被处理的六孔板中，每孔 MSC 完全培养基 2 ml，37℃、5%$CO_2$ 培养箱中培养。

   ***注意：****细胞密度为该试剂盒的标准密度，可根据实验室情况进行调整，调整依据参照所检测 MSC 正常传代的密度的 2 倍接种，培养 24 小时后添加诱导培养完全培养基；或接种密度低，待细胞生长至下一步要求的密度后进行诱导。*

3. 当细胞融合达 90%时，弃去培养上清，每孔添加诱导液 B 2 ml/孔，37℃、5%$CO_2$ 培养。

   ***注意：****成脂诱导后细胞易脱壁，换液时完全培养基必须经室温复温 30 分钟。添加培养基时动作要轻柔，沿培养器皿侧壁缓缓加入，避免吹起细胞。细胞起始诱导融合度对诱导效果十分关键，必须确保细胞生长至足够密时再进行诱导。*



网址：www.fuyuanbio.com
邮箱：fuyuanbio@fuyuanbio.com

4. 诱导培养 72 小时后弃去原培养上清，添加诱导液 C 2 ml/孔，37℃、5%$CO_2$ 继续培养。
5. 继续诱导培养 24 小时后弃去原培养基，添加诱导液 B 2 ml/孔，37℃、5%$CO_2$ 继续培养。
6. 重复步骤 4、5 约 3-5 次，待细胞内出现明显脂滴时更换为诱导液 C 继续培养。
7. ***注意：****一般在培养 4 天左右高倍镜下能看到细胞浆内有较多数量的圆形亮泡，5-9 天融合为较大的亮泡，这些结构围绕在细胞核周围，较大的与细胞核大小相当。状态较好的细胞 10 天内可结束培养过程，若 10 天后仍未见脂滴结构，请注意分析操作步骤与其他原因。*
8. 每 2 天更换新鲜诱导液 C，继续培养至脂滴足够大时培养结束。

   ***注意：****换液时诱导液必须经过复温，否则影响诱导效果和可能导致细胞脱壁。根据实验需要选择培养结束时间，若成脂面积过大或脂滴过大导致连成片则不利于结果的呈现，建议提前终止。不同实验室 MSC 诱导时出现脂滴的时间不尽相同，若大面积出现脂滴较早，则可提前更换为诱导液 C。*
9. 诱导培养结束时，弃去培养上清，DPBS 洗细胞两次，4%中性多聚甲醛溶液 2 ml/孔室温固定细胞 20 分钟。

   ***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，若采用自己的检测方法则后续方案需要自己拟定。*
10. 弃去固定液，DPBS 洗 2 次，加入油红 O 染液（工作液）1 ml/孔染色 15 分钟。

    ***注意：****该步骤适用于鉴定成脂能力，若出现脂滴（脂肪细胞）则会呈现红色着色。若需要得到美观的图片，则染色时间需自己掌握。*
11. 弃去油红 O 染液（工作液），DPBS 洗 3 次，添加新鲜 DPBS。

    ***注意：****油红 O 染色必须配制成染色工作液，否则无法着色；染色工作液现配现用。染色后肉眼可见孔内明显染红。染色过程中一定要避免组织细胞被风干，风干会影响显微观察效果。*



网址：www.fuyuanbio.com
邮箱：fuyuanbio@fuyuanbio.com

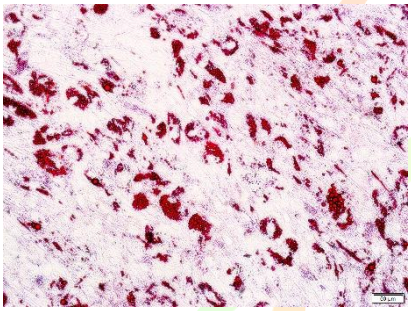
12. 显微镜下观察并拍照。

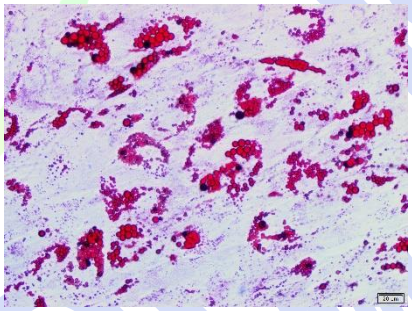
*注意：拍照一般选用高倍镜，请根据需要确认选择。*

13. **结果判定：**按照程序操作完毕，低倍镜下观察可见大面积红色着色点，20 倍和 40 倍镜下可观察到红色球形在细胞内的情况，此红色着色球为脂滴，说明实验所用的 MSC 具有成脂能力。否则，所使用的 MSC 无成脂能力。

*注意：该判定标准仅进行定性分析，若需要进行定量分析，需要自行制定方案。*

**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 |
| 人间充质干细胞成软骨诱导试剂盒 | FY200008 |



网址：www.fuyuanbio.com
邮箱：fuyuanbio@fuyuanbio.com