

## 人间充质干细胞成软骨诱导分化与染色试剂盒

产品编号：PWL082 规格：200mL/Kit

### 产品内容

序号	产品组成	PWL082
A	人间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基	194mL
B	地塞米松	20uL
C	抗坏血酸	400uL
D	丙酮酸钠	200uL
E	L-脯氨酸	200uL
F	ITS 添加物	2mL
G	TGF-β3	200uL
H	染色液 A	10mL
I	染色液 B	10mL
	说明书	1 份

### 产品简介

间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSC）是中胚层来源的多能干细胞，具有高度自我更新能力和多项分化潜能，体外在一定的条件下可以被诱导分化成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞。2006年国际细胞治疗协会（ISCT）将此三项检测指标确定为MSC鉴定的必检项目，以MSC为基础的研究报道均会对此三项指标进行鉴定。

MSC被诱导分化成软骨细胞是一个受多种因素控制的复杂过程，受多种细胞因子和激素的调控。MeilunCell®人间充质干细胞成软骨诱导分化与染色试剂盒包括成软骨诱导培养体系所有成分以及鉴定所用的阿利新蓝染色液，提供了一种稳定有效的将人类间充质干细胞诱导分化成软骨的方法。

本产品可用于人类骨髓、脐带、脂肪等组织来源的间充质干细胞的成软骨诱导分化与染色，兼容诱导分化过程中的其他检测，如mRNA检测、蛋白表达检测、免疫组化检测等。

### 产品特点

- 诱导分化程序简单便捷。
- 诱导成软骨细胞效率高。
- 提供从诱导培养到染色鉴定全套试剂。

## 使用方法

### （一）成软骨诱导分化非完全培养基的配制

1. 用75%乙醇擦拭消毒试剂盒中各管表面。
2. 将试剂B~F全部加入人间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基A中，轻摇试剂瓶混合均匀，制备成软骨诱导分化非完全培养基混合液。（可以吸取少量基础培养基A润洗各管1-2次，尽量将所有组分全部加入到基础培养基中。）
3. TGF- $\beta$ 3分装及保存：将TGF- $\beta$ 3小量分装，-20℃及以下温度保存，并于6个月之内使用完毕。

### （二）成软骨诱导分化完全培养基的配制

按照每1 mL非完全培养基混合液中加入1 $\mu$ L TGF- $\beta$ 3的比例无菌吸取实验所需剂量的TGF- $\beta$ 3，加入到相应体积的非完全培养基混合液中，配制成软骨诱导分化完全培养基，轻轻颠倒摇晃使其混合均匀。

**注意：配制好的成软骨诱导分化完全培养基必须在12小时之内使用。**

### （三）成软骨诱导分化操作规程

1. 当MSC汇合度达80-90%时，消化细胞并计数；
2. 取3~4 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞到15 mL离心管中，250 $\times$ g，离心5 min；
3. 吸弃上清，加入0.5 mL成软骨诱导分化非完全培养基混合液重悬细胞沉淀，150 $\times$ g，离心5 min；
4. 重复步骤3，再次清洗细胞；
5. 吸弃上清，加入0.5 mL成软骨诱导分化完全培养基重悬细胞沉淀，150 $\times$ g，离心5 min；
6. 离心后拧松离心管盖便于气体交换。置于37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养；

**注意：最后一次离心后不需要吸掉上清液并重悬细胞，且24h内不要随意晃动离心管。**

7. 当细胞团在离心管底部呈球形的团状时（一般为24 h或48 h后，实际视细胞生长情况而定），轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中；
8. 自接种时间开始计算，每隔2-3天更换0.5mL新鲜的成软骨诱导分化完全培养基培养；

**注意：小心操作，不要吸出细胞球。**

9. 换液之后，轻轻的摇动离心管或轻弹离心管底部使细胞球脱离管底悬浮在液体中，稍加拧松离心管盖，放入37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。
10. 一般持续诱导21-28天后，可将软骨球制作成冷冻切片或经福尔马林固定后制作成石蜡切片，最后进行阿利辛蓝染色。

### （三）软骨球石蜡切片的阿利新蓝染色

1. 清洗：固定后的软骨球用PBS清洗2次；
2. 切片：软骨球经石蜡包埋后切片；
3. 脱蜡和脱水；
4. 染色液A染色3min；
5. 直接更换染色液B染色30min；

- 流水冲洗5min;
- 无水乙醇脱水两次，5min/次;
- 二甲苯透明两次，5min/次，中性树胶封片。
- 显微镜下观察阿利辛蓝染色效果，阿利辛蓝染色部分显示硫酸软骨素和硫酸胶质等蛋白的存在，呈现典型的成软骨分化（图1）。

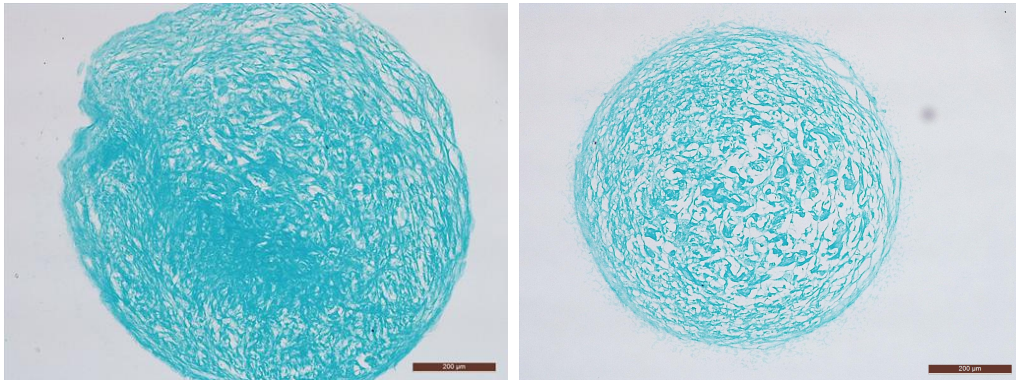


图1 人间充质干细胞成软骨诱导分化阿利新蓝染色效果

## 保存条件

所有产品均需避光保存，请避免反复冻融相关产品，保存条件及有效期如下：

试剂名称	保存条件	有效期
人间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基	2-8℃	1年
地塞米松	-20℃	1年
抗坏血酸	-20℃	1年
丙酮酸钠	2-8℃	1年
L-脯氨酸	-20℃	1年
ITS 添加物	2-8℃	1年
TGF-β3	-20℃	半年
染色液 A	2-8℃	1年
染色液 B	2-8℃	1年
人间充质干细胞成软骨诱导分化非完全培养基	2-8℃	1个月
人间充质干细胞成软骨诱导分化完全培养基	2-8℃	12小时

## 质量控制

本产品已经过无菌检测、pH测试、渗透压检测、内毒素检测。

## 注意事项

- 本产品所有组分均为无菌包装，在使用过程中请注意无菌操作，避免微生物污染。
- 诱导培养期间请将离心管盖拧松，保持透气，同时避免污染，小心操作。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。