

# 间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒

## 产品描述

本产品为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°C, 1 Year
诱导分化添加剂 II	1mL / 2mL	-20°C, 1 Year
优质胎牛血清	10mL / 20mL	-20°C, 1 Year
细胞基础培养基	84mL / 168mL	4°C, 1 Year
甲苯胺蓝染色液	5mL / 10mL	RT（室温），1 Year

- 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°C，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

表一

- 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10uL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%CO<sub>2</sub>，饱和湿度的培养箱中培养。（细胞接种详情参考表二）

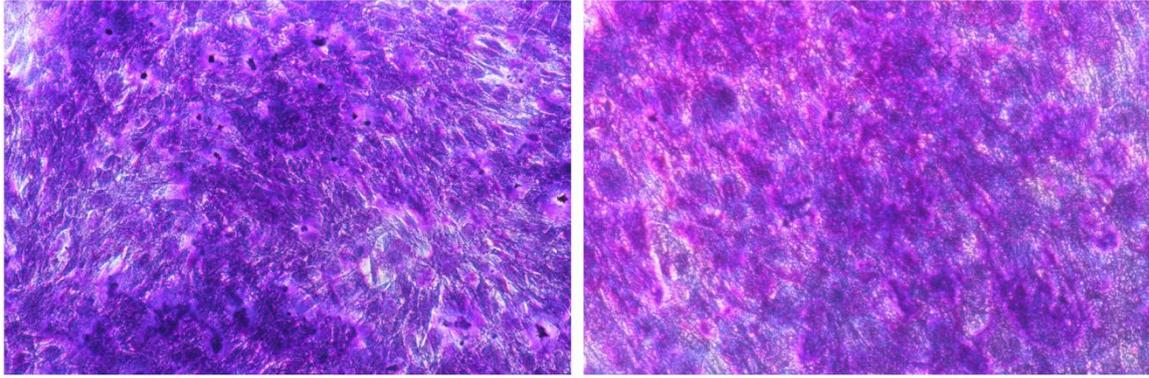
培养器皿	底面积	细胞量	培养液体积
24孔培养板	2cm/孔	2×10 <sup>5</sup> cell/孔	1mL/孔
12孔培养板	4.5cm/孔	4.5×10 <sup>5</sup> cell/孔	2mL/孔
6孔培养板	9.6cm/孔	9.6×10 <sup>5</sup> cell/孔	2mL/孔
T25培养瓶	25cm	25×10 <sup>5</sup> cell	5mL
6cm培养皿	21cm	21×10 <sup>5</sup> cell	5mL
10cm培养皿	55cm	55×10 <sup>5</sup> cell	10mL

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

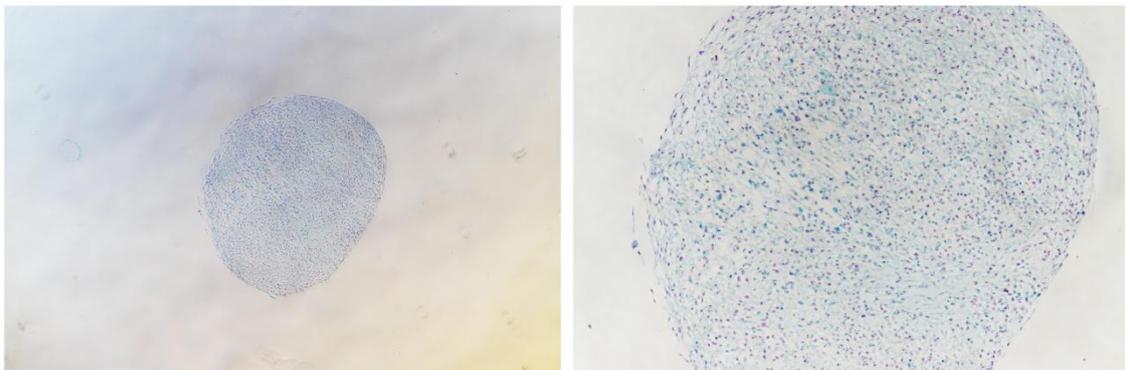
- ①细胞诱导分化结束后，小心吸弃细胞培养上清，1×PBS润洗1~2次，室温固定30 min。（细胞固定液为4%中性甲醛溶液等，体积参考表二）
- ②吸弃细胞固定液，1×PBS润洗2次。沿孔壁缓慢加入甲苯胺蓝染色液，染液体积请参考表二，室温染色30min。（注意：染色液底部可能会有沉淀，吸取时尽量不要触及底部。若染色后有沉淀，1×PBS洗去即可。）
- ③吸出染色液，1×PBS润洗，去掉浮色。显微镜下观察细胞染色效果，背景呈淡蓝色，成软骨细胞呈紫红色。（注意：染色液可重复使用，建议收集。）



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， $20^{\circ}\text{C}$ ， $250 \times g$ 离心4min。
- ②弃上清，每管加入0.5mL预混液，重悬细胞沉淀。 $20^{\circ}\text{C}$ ， $150 \times g$ 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， $20^{\circ}\text{C}$ ， $150 \times g$ 离心5min。
- ④将离心管树立放置于 $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\% \text{CO}_2$ ，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

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

## 相关产品

- 间充质干细胞
- 原代间充质干细胞无血清培养体系
- PBS缓冲液