

# 人间充质干细胞成软骨诱导分化与染色试剂盒

## 使用说明书

规格：100mL/Kit

### 产品内容

人间充质干细胞成软骨诱导分化与染色试剂盒	
DMEM 高糖基础培养基	97mL
成软骨诱导添加物	2mL
TGF- $\beta$ 3	1mL
阿利辛蓝染色液	5mL

### 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。

人间充质干细胞成软骨诱导分化与染色试剂盒包括成骨诱导培养体系所有成分以及鉴定所用的阿利辛蓝染色液。本产品可用于人类骨髓、脐带、脂肪、牙髓等组织来源的间充质干细胞的成软骨诱导分化与染色。

### 特点优势

诱导分化程序简单便捷

成软骨诱导效率高

### 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。

**声明：**本产品供科学研究和生产使用，用于组织和细胞的体外培养；禁止临床使用。

## 非完全培养基的配制

1. 配制前将成软骨诱导添加物放置于 4℃ 冰箱内完全融化。
2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。
3. 将成软骨诱导添加物全部加入 DMEM 高糖培养基中。
4. 轻轻颠倒摇晃配制好的成骨诱导分化完全培养基，使其混合均匀。

**特别建议：**如短时间内无法使用完全部的培养基，建议按照上述配方比例分批配制；剩余成分可以分装为合格规格，按各自保存条件储存，切勿反复冻融。

## 成软骨诱导分化完全培养基的配制

1. 配制前将 TGF-β3 放置于 4℃ 冰箱内完全融化(如收到货已溶解，则直接进行下一步)。
2. TGF-β3 分装及保存：将 TGF-β3 小量分装，-20℃ 及以下温度保存，并于 12 个月之内使用完毕。
3. 按照每 1 mL 非完全培养基混合液中加入 10μL TGF-β3 的比例无菌吸取实验所需剂量的 TGF-β3，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。

## 成软骨诱导分化操作规程

1. 当 MSC 融合度达到 80-90% 时，消化细胞并计数；
2. 取  $3\sim 4 \times 10^5$  个细胞到 15 mL 离心管中， $250 \times g$ （约 1100rpm），离心 4 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， $150 \times g$ （约 800rpm），离心 5min；
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， $150 \times g$ （约 800rpm），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<sup>2</sup> 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。

### 软骨球切片染色（本步骤以石蜡切片染色为例）

1. 固定。诱导形成的软骨球用 1×PBS 清洗后，浸泡于 4%多聚甲醛溶液，固定 30 min 以上。
2. 脱水。固定好的软骨球使用梯度浓度酒精脱水，方式如下，每一阶段 30 min。  
50%酒精 → 70%酒精 → 80%酒精 → 95%酒精 → 无水酒精。  
**注意：1）脱水必须在有盖的容器中进行，防止吸收空气中的水分；**  
**2）软骨球不要在酒精中浸泡太久，易碎裂；**  
**3）在更换酒精时，可吸出低浓度酒精，再加入高浓度酒精。避免移动增加软骨球碎裂的风险。**
3. 透明。因酒精和石蜡不相溶，所以脱水后需经二甲苯过渡。方式如下：
  - (1) 二甲苯和无水酒精按体积比 1:1 混匀。将软骨球浸泡其中 2 h。
  - (2) 将软骨球浸泡在纯二甲苯中 1.5 h。
  - (3) 更换新的二甲苯，继续浸泡 1 h。**注意：1）透明必须在有盖的容器中进行，防止吸收空气中的水分；**  
**2）透明过程中，如果软骨球周围出现白色雾状气泡，说明其中水未被脱净。应重新放回酒精中脱水再透明。**
4. 浸蜡。为了除去软骨球中的透明剂，使石蜡渗透到内部以便包埋，需要浸蜡处理。
  - (1) 二甲苯和石蜡按体积比 1:1 混匀。将软骨球浸泡其中，再一起放置于 40℃烘箱中 40 min。
  - (2) 将软骨球浸泡在纯石蜡中，放置于 55℃烘箱中 30 min。
5. 包埋。将软骨球取出，置于模具中。倒入石蜡，静置冷却。待石蜡充分冷却成形，取出，

修整蜡块。

6. 切片。连续切片，每片厚度 3  $\mu\text{m}$ 。
7. 粘片。将软骨球切片用粘贴剂粘附于载玻片上，在 35 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干。
8. 脱腊。
  - (1) 纯二甲苯浸泡切片 15 min，更换新的二甲苯浸泡切片 10 min。
  - (2) 二甲苯和无水酒精按体积比 1:1 混匀。浸泡切片 10 min。
  - (3) 依次使用 95%、85%、70%、50%酒精浸泡切片 10 min，晾干。
9. 染色。
  - (1) 在晾干的切片上滴加阿利辛蓝，37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 1 h。
  - (2) 用自来水冲洗载玻片 5 min，晾干。
10. 显微镜下观察阿利辛蓝染色效果。阿利辛蓝染色部分显示的是软骨组织中的内酸性粘多糖。

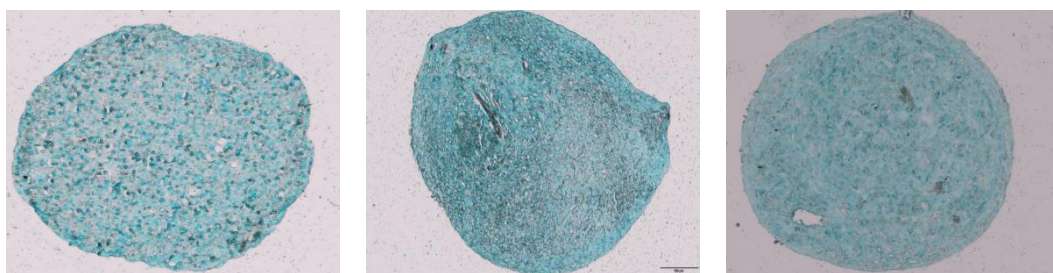


图1

图2

图3

图1：人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化阿利辛蓝染色效果

图2：人脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化阿利辛蓝染色效果

图3：人脐带间充质干细胞成软骨诱导分化阿利辛蓝染色效果

## 保存条件

试剂名称	保存条件	有效期
DMEM 高糖基础培养基	2-8 $^{\circ}\text{C}$	1 年
TGF- $\beta$ 3	-20 $^{\circ}\text{C}$	1 年
成骨诱导添加物	-20 $^{\circ}\text{C}$	1 年
人间充质干细胞成软骨诱导分化完全培养基	2-8 $^{\circ}\text{C}$	12 小时
阿利辛蓝染色液	2-8 $^{\circ}\text{C}$	1 年

## 注意事项

- 1、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；若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。
- 2、本产品发货时使用冰袋运输，若收到货后暂时不使用，请按照保存条件将各组分保存。
- 3、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。