

兔骨髓间充质干细胞 成软骨诱导分化培养基操作手册

产品规格：100mL/200mL
产品货号：PD-023

一、产品描述

兔骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基专门为兔骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化而开发，针对兔骨髓间充质干细胞的特性优化分化试剂的配方，可增加兔骨髓间充质干细胞的成软骨分化效果。

本产品含血清成分，仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床及其他用途。

二、培养基组成成分

成软骨诱导分化培养基：

| 成分名称 | 100 mL 添加体积 | 200 mL 添加体积 |
|--|----------------|----------------|
| 成软骨分化专用基础培养基 Basal Medium For Stem Cells Chondrogenic Differentiation | 87.6 mL | 175.2 mL |
| 成软骨分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For Stem Cells Chondrogenic Differentiation | 10 mL | 20 mL |
| 兔骨髓间充质干细胞成软骨分化添加物 Supplement For RbBMSCs Chondrogenic Differentiation | 2.4 mL | 2.4 mL×2 |

注：各成分请根据试剂管上标签标示温度保存。

辅助试剂：

| 成分名称 | 100 mL 添加体积 | 200 mL 添加体积 |
|-------------------------------------|----------------|----------------|
| 阿尔新兰染色液 Alcian Blue 8GX Solution | 10 mL | 10 mL×2 |
| 明胶包被液 Gelatin Solution | 10 mL | 10 mL×2 |

三、操作流程

（一）兔骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化培养基的准备

1. 前言：本品为试剂盒型，使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。
2. 准备工作：将血清于4℃解冻至完全融化；将添加物于室温解冻至完全融化，轻轻摇晃混匀。
3. 血清离心：血清中可能会存在白色絮状沉淀物，这通常是胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质析出导致，属于正常现象，该现象不影响细胞的培养和诱导分化。若您欲去除这些絮状沉淀物，可以将血清分装至无菌离心管内，以400-600 g离心5 min，取上清液使用。但是我们不建议您以过滤的方法去除这些絮状沉淀物，一方面它可能会阻塞您的过滤膜；另一方面，过滤血清这种行为可能会导致血清中部分营



营养成分的流失。

4. 配置【血清-添加物】：将血清、添加物混合摇匀，分装为若干份冻存于-20℃，现用现取。
5. 完培配置：将1体积【血清-添加物】添加到7体积基础培养基中，混匀做标识，即可使用。

注：配制好的成软骨诱导分化完全培养基必须在当天使用。

（二）兔骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化操作指导

1. 当您的兔骨髓间充质干细胞的融合度达到80-90%时，即可用0.25%胰酶进行消化。
2. 将消化下来的兔骨髓间充质干细胞进行计数，确定细胞浓度。
3. 取 $3-4 \times 10^5$ 个待诱导细胞转移到15 mL离心管中，20℃，250×g离心4 min。
4. 吸去上清，加入0.5 mL成软骨诱导分化完全培养基，重悬上一步离心所得沉淀，20℃，150×g离心5 min。
5. 重复【步骤4】清洗细胞一次。
6. 弃上清后，加入0.5 mL成软骨诱导分化完全培养基重悬，20℃，150×g离心5 min，不弃上清。
7. 离心后不可摇动或吹打细胞团，小心地将离心管盖拧松，以便于气体交换。放入37℃，5% CO₂中孵育。

注：48小时内不要摇动离心管，保持离心管静置。

8. 48 h后每2-3天换新鲜的软骨分化诱导液，每管0.5 mL，换液后轻弹细胞团使其能脱壁漂浮。
9. 拧松管盖，放入37℃，5% CO₂中继续诱导；诱导过程中，细胞团直径会有所增大，表面会变得光滑呈胶质。

注：为了使细胞更容易聚拢成球，可选择底部更圆的离心管。

10. 持续诱导20-30天后，可对软骨球进行中性甲醛固定和石蜡包埋切片，切片后根据实验需要可进行染色鉴定。（本试剂盒提供阿尔辛蓝染液Alcian Blue 8GX Solution）

注：阿尔辛蓝染液Alcian Blue 8GX Solution又名阿利新蓝染液。

（三）阿尔新兰染色分析

1. 固定：中性甲醛固定，石蜡包埋切片。
2. 染色步骤：
 - 1) 石蜡切片脱蜡至水，蒸馏水冲洗。（不要直接冲洗组织，以防脱片，破坏组织）；
 - 2) 阿尔辛蓝染色液浸染30 min；
 - 3) 用自来水冲洗2 min；
 - 4) 蒸馏水终止染色；
 - 5) 显微镜下观察染色程度，拍照。
3. 结果判读：软骨、酸性粘液物质呈蓝色。

四、注意事项

1. 因为培养基的成分较多，请在配制过程中严格注意无菌操作；
2. 成软骨分化添加物中含细胞生长因子，务必现配现用，配好的完全培养基必须当天用完。

