



KEL Biotech Inc

产品说明书

# 人脐带间充质干细胞成软骨分化试剂盒

货号：KEM-200009

仅供科研使用

Version 1.0

## 人脐带间充质干细胞成软骨分化试剂盒

仅供科研使用

### 产品信息

产品名称：人脐带间充质干细胞成软骨分化试剂盒

货号：KCM-200009

批号：见包装

试剂清单：

序号	名称	数量	货号
A	人脐带间充质干细胞成软骨分化基础培养基	2	KCM-200009-A
B	双抗	2	KCM-200009-B
C	抗坏血酸	2	KCM-200009-C
D	丙酮酸钠	2	KCM-200009-D
E	地塞米松	2	KCM-200009-E
F	脯氨酸	2	KCM-200009-F
G	ITS+Premix	2	KCM-200009-G
H	TGF- $\beta$ 3	2	KCM-200009-H
I	阿利新蓝染色液	1	KCM-200009-I

存储与有效期：

A、G、I液于 2-8℃避光保存，其余溶液于-20℃（或更低温度）避光保存。所有组分均需要避免反复冻融及复温，I液有效期为 6 个月，其他组分在所需要的温度下有效期为 1 年。预混液于 2-8℃保存，有效期为 1 个月，完全培养基现配现用。

### 产品介绍

人脐带间充质干细胞（hUMSC）具有多向分化的潜能，体外在一定条件下可以诱导分化为脐带细胞、成骨细胞、成软骨细胞。2006 年国际细胞治疗协会（ISCT）

确定此三项检测指标是 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。

为方便科研用户鉴定 hUMSC 的分化能力，麒盟干细胞研究中心精心优化 hUMSC 成软骨诱导分化试剂盒，其中包括成软骨诱导培养体系和鉴定所需要的染色液，让用户可以稳定有效地鉴定 hUMSC 的分化潜能。该试剂盒提供的实验方法为常规鉴定方法，用于鉴定 hUMSC 是否具有成骨分化能力。除此以外，试剂盒的诱导培养基还可用于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、免疫组化检测等。但若用于免疫荧光检测需注意自发荧光或固定方法问题。

本产品仅适用于科研。

## 操作方法

### 实验准备

试剂配制：

预混液：室温融化 B-F 溶液各 1 支，将融化的 B-F 溶液与 G 溶液 1 支加入 A 液中，晃动培养基使其充分混匀，配制成软骨分化培养基预混液。

**注意：**溶液溶解后旋涡混匀、1000g 短时离心以使溶液集中于管底。将管内溶液加入 A 液后，吸取 A 液洗涤溶液瓶两次，将洗涤液加入 A 液中。所有液体混合成预混液必须充分混匀，2-8℃保存。

**TGF-β3 分装：**室温溶解 H 液，根据每次换液需要的试剂量分装成小份，-20℃或更低温度保存。

**诱导完全培养基：**按照当次所需要的诱导液总量取相应的预混液与离心管中，加入相应量的 TGF-β3，充分混匀制成诱导完全培养基，此液现配现用。1 ml 预混液需添加 TGF-β3 的量为 10 μl。

**注意：**H 液可以根据需要分装成不同小份，-20℃或更低温度保存，每次使用时按照当

次使用的量配制诱导完全培养基，完全培养基必须现配现用。整个过程需无菌操作，适当以 75%酒精擦拭表面。

✧ 自备试剂：

- 消化液（0.25%Trypsin-0.04%EDTA）
- 磷酸盐缓冲液（DPBS）
- hUMSC 完全培养基
- 4%中性多聚甲醛溶液

**注意：**若 hUMSC 完全培养基不含血清，则需要准备胰酶抑制剂。hUMSC 消化极易过度，

建议稀释消化液一倍，且严格控制消化时间。

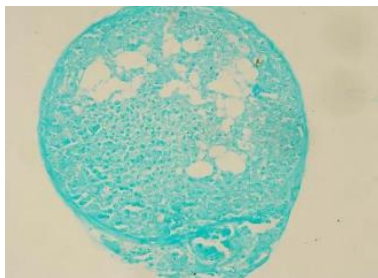
**操作步骤**

1. 准备所需诱导分化的 hUMSC，当细胞融合达 85%左右时，用消化液消化细胞，细胞沉淀用成软骨诱导预混液重悬。
2. 150 g 离心 5 min，沉淀以预混液重悬，细胞密度约  $1 \times 10^6$  cells/ml，再次离心，弃上清。
3. 沉淀以成软骨诱导完全培养基重新悬浮，调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  cells/ml。
4. 分别取 500  $\mu$ l 细胞悬液接种于 15 ml 离心管中，150 g 离心 5 min。

**注意：**成软骨诱导时每管细胞的总数在  $5 \times 10^4$  至  $3 \times 10^5$  之间，细胞数过少形成的软骨团块可能较小，细胞数过多则倾向于分开成块。正常情况下可形成 1 mm<sup>3</sup>的团块。

- 5 旋松离心管盖，将离心管轻轻置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。  
*注意：24 h 内避免摇动细胞沉淀，以确保形成个团块。离心管需使用聚丙烯材质无菌管。*
- 6 诱导培养 24 h 后，轻轻拨动离心管底，使细胞沉淀团块悬浮，重新放回培养箱继续培养。  
*注意：细胞团块重新悬浮的时间因细胞而定，基本在 24-48h 之间，以细胞团周围有聚拢现象时为准。*
- 7 每 2 天更换新鲜完全诱导培养基。换液时轻轻吸取旧培养基，每管加新鲜配制的成软骨分化完全培养基 500 μl。  
*注意：换液时动作轻柔，以免吸出软骨团块；诱导液必须经过 37℃ 复温，否则影响诱导效果。在诱导培养 2-3 周后会出现大量细胞外基质，富含软骨蛋白多糖和 II 型胶原。*
- 8 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/管室温固定细胞 1 小时。  
*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，若采用自己拟定的检测方法则后续方案需要自己拟定。*
9. 弃去固定液，DPBS 洗 2 次，脱水、石蜡包埋后切片。  
*注意：脱水包埋可以用擦镜纸包裹后使用自动脱水机脱水、包埋，也可以在原离心管中逐级更换脱水、透蜡的液体，手工包埋。过程中一定注意团块不要丢失。*
10. 阿利新蓝染色：将切片进行脱蜡和复水，阿利新蓝染液染色 30 min，流水冲洗 5 min，脱水、透明、中性树脂胶封片，显微镜下观察、拍照。  
*注意：染色和制片过程中避免干片，干片后会导致组织形态发生变化，影响观察、拍照效果。根据需要可以选择苏木素复染。*
11. **结果判定：**按照程序操作完毕，低倍镜下观察可见蓝色着色，该蓝色染色的为酸性粘多糖，说明实验所用的 hUMSC 具有成软骨能力。否则，所使用的 hUMSC 无成软骨能力。

结果展示:



相关产品:

名称	货号
人脐带间充质干细胞成骨分化试剂盒	KCM-200007
人脐带间充质干细胞成脂分化试剂盒	KCM-200008