

# 大鼠间充质干细胞成骨诱导分化与染色试剂盒

## 使用说明书

规格：200mL/Kit

### 产品内容

大鼠间充质干细胞成骨诱导分化与染色试剂盒	
DMEM 低糖基础培养基	175mL
特级胎牛血清	20mL
成骨诱导添加物	5mL
茜素红染色液	10mL
0.1%明胶溶液	10mL

### 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 能够分化为成骨细胞，沉积并矿化胞外基质蛋白，这是新生骨骼所必需的。分化成骨后会矿化形成钙结节且有钙分泌，可以利用茜素红 S (Alizarin Red S) 染色检视分化的成骨细胞。不同的细胞来源（类型、年龄、代数）所得到的分化效果会有差异。

大鼠间充质干细胞成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茜素红染色液。本产品可用于大鼠骨髓、脂肪、牙髓等组织来源的间充质干细胞的成骨诱导分化与染色。

### 特点优势

诱导分化程序简单便捷

成骨诱导效率高

### 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。

## 完全培养基的配制方法

1. 配制前将特级胎牛血清及成骨诱导添加物放置于 4℃ 冰箱内完全融化。

**注意：**融化后的血清中可能出现絮状物，其主要成分为析出的血纤蛋白，这不会影响产品使用效果；如絮状物较多，可离心去除（不建议过滤，过滤会造成部分营养物质丢失）。

2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。

3. 将血清和成骨诱导添加物全部加入 DMEM 低糖培养基中。

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。

## 明胶包被培养器皿表面

1. 为了避免诱导过程中细胞漂浮，建议对成骨诱导使用的培养器皿表面进行明胶包被。

2. 取能覆盖整个培养皿/板底面量的 0.1% 明胶入到培养皿/板中，如 6 孔板中加 2mL/孔。

3. 摇匀液体使其覆盖整个培养皿/板的底面。

4. 将铺有 0.1% 明胶的培养皿/板室温放置（生物安全柜或超净工作台中）至少 30min 以上。

5. 吸弃明胶，待培养皿/板晾干后，1×PBS 洗 2 次，即可用于接种细胞。

**注意：**包被明胶的培养皿/板在无菌和明胶不蒸干的条件下，可以在 4℃ 保存两周。

## 成骨诱导分化操作规程（以 6 孔板为例）

1. 当 MSC 融合度达到 80-90% 时，消化细胞并计数；

2. 将细胞按照  $1 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种在包被 0.1% 明胶的六孔板中，每孔加入 2 mL 正常培养用完全培养基。

3. 将细胞置于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。

4. 当细胞汇合度达到 60%-70% 时，吸弃上清，PBS 洗 2 次，每孔加入 2 mL 大鼠间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基；

5. 每 3 天全换液大鼠间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基（使用前需预热至 37℃）；

6. 诱导 2-4 周后，视细胞的形态变化及生长情况，用茜素红染液进行染色。

**注意：**为防止成骨细胞脱落，建议成骨过程中出现大量钙结节之后，换液形式变为每两天一次半量换液。

## 茜素红染色（以 6 孔板为例）

1. 诱导成骨分化结束后，吸弃上清，PBS 清洗 1-2 遍，每孔加入 2 mL 4%多聚甲醛溶液，固定 30 min；
2. 将 4%多聚甲醛吸净，PBS 清洗 2 遍。每孔中加入 1 mL 茜素红染液，染色 5-10min；3. 吸净茜素红染液，PBS 清洗 2-3 遍。
3. 每孔加入 1mL PBS，倒置显微镜下观察成骨染色效果。
4. 显微镜下可观察到成骨分化细胞形成大量染成红色的钙结节，呈现典型的成骨分化。

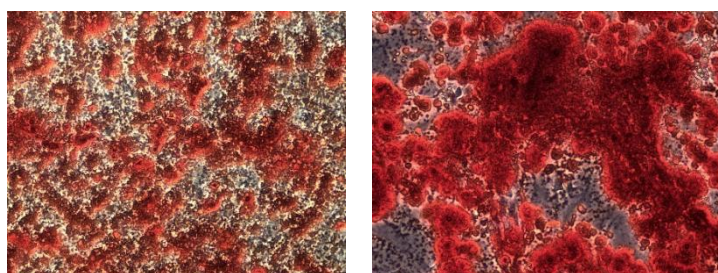


图1

图2

图1：大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化茜素红染色效果

图2：大鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导分化茜素红染色效果

## 保存条件

试剂名称	保存条件	有效期
DMEM 低糖基础培养基	2-8℃	1 年
特级胎牛血清	-20℃	6 年
成骨诱导添加物	-20℃	1 年
大鼠间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基	2-8℃	1 个月
茜素红染色液	2-8℃	1 年
0.1%明胶溶液	2-8℃	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。