



TBD

www.tbdscience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

天津灏洋华科生物科技有限公司

人脐带间充质干细胞成软骨分化试剂盒

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：TBD20190003

批号：见包装

试剂清单：

序号	名称	数量	货号	装量
A	人脐带间充质干细胞成软骨分化基础培养基	2	TBD20190003-A	100ml
B	双抗	2	TBD20190003-B	1ml
C	抗坏血酸	2	TBD20190003-C	300ul
D	丙酮酸钠	2	TBD20190003-D	1ml
E	地塞米松	2	TBD20190003-E	10ul
F	脯氨酸	2	TBD20190003-F	100ul
G	ITS+Premix	2	TBD20190003-G	1ml
H	TGF-β3	2	TBD20190003-H	1ml
I	阿利新蓝染色液	1	TBD20190003-I	10ml

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成骨细胞、脂肪细胞、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分化能力，我公司精心优化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 是否具有成软骨分化能力。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等问题。

本产品仅适用于科研。



天津市灏洋生物制品科技有限责任公司 天津灏洋华科生物科技有限公司
天津滨海高新区华苑产业区（环外）海泰华科一路 15 号润丰科技 3 幢 5 层
技术服务 Tel: 15822121119 15822691119 13920701119 ◆ Fax:022-58921250
◆ QQ:2768676807 ◆ www.tbdscience.com ◆ E-mail:gx15822121119@163.com

灏洋生物 TBDscience



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, 1000 g 瞬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 °C 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 °C 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 °C 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 150g离心5min, 沉淀以预混液重悬, 细胞密度约 1×10^6 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 5×10^5 cells/mL。

4 分别取 500 μL 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 5×10^4 至 3×10^5 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^3 的团块。

5 旋松离心管盖, 将离心管轻轻置于 37 °C、5% CO₂ 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 24-48 h 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。

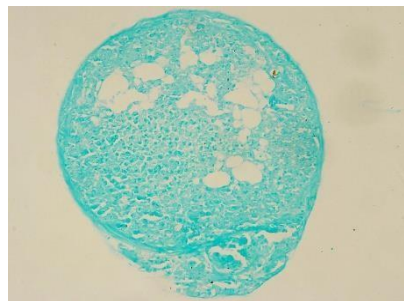
注意：脱水包埋可以用擦镜纸包裹后使用自动脱水机脱水、包埋，也可以在原离心管中逐级更换脱水、透蜡的液体，手工包埋。过程中一定要注意团块不要丢失。

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，该蓝色着色的为酸性粘多糖，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	TBD20190002
人脐带间充质干细胞成脂分化试剂盒	TBD20190004

