

hMSC 成软骨分化试剂盒-使用说明书

一、产品简介

hMSC 成软骨分化试剂盒具有高效成软骨定向分化能力，可用于人类间充质干细胞向成软骨诱导分化。

二、产品信息

表一：hMSC 成软骨分化试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hMSC成软骨分化试剂盒包含:	RP02014-B	1 Kit	2°C ~ 8°C*
Chondrogenesis Differentiation Basal Medium	RP02014-B-01	80 mL	2°C ~ 8°C
Chondrogenesis Differentiation Supplement	RP02014-B-02	20 mL	-20°C至-80°C

*将基础液和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2°C ~ 8°C中存储，2 周内用完。培养基需避光保存和使用。

三、试剂材料

表二：推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
ncMission hMSC Medium V3.0	首宁生物	RP02010
OriCell 阿利新蓝乳液	OriCell	No.ALCB-10001
4%PFA 溶液	Biosharp	BL539A
1×DPBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Thermo Sci.	14190250
6孔板	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
10 μl/200 μl/1000 μl吸头	Rainin .	N/A

四、试剂准备

(一) hMSC 成软骨分化完全培养基配制

- 在 4°C解冻 Chondrogenesis differentiation Supplement, **不要在 37°C条件下解冻**。
- 在生物安全柜中，使用无菌移液管混匀下列成分配制成 100 mL 分化完全培养基。

Chondrogenesis differentiation Basal Medium: 80 mL

Chondrogenesis differentiation Supplement: 20 mL

- 完全培养基可置于 4°C储存，3 周内使用（避光使用、保存）。

TIPS: 可根据实际用量将 Supplement 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

五、间充质干细胞成软骨分化

(一) 间充质干细胞培养

1. **hMSC 的培养和准备:** 详见 **ncMission hMSC Medium V3.0** 使用说明书。
2. 用 **ncMission hMSC Medium V3.0** 培养间充质干细胞, 将间充质干细胞按 5000-10000/cm² 的密度接种到六孔板中, 水平十字摇匀三次, 置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中, 再次水平十字摇匀三次, 培养。

(二) 间充质干细胞成软骨分化

- 1、颗粒形成: hMSC 汇合度达到 80%左右时:
 - 1): 当细胞达到 80%的汇合度时, 用 1mL/孔 0.5×TryPLE 37°C消化 3min;
 - 2): 配平, 离心收集细胞 (250×g, 5 分钟; 升速 3, 降速 7); 吸弃上清液, 加入 MSC 扩增完全培养基重悬混匀; 计数。
 - 3) 根据计数结果, 取 2×10⁵ 个细胞至 15mL 离心管中, 每组共 2 管。若细胞悬液体积 < 1mL, 可补加 MSC 扩增完全培养基到 1mL, 配平, 室温离心 (300×g, 5 分钟; 升速 3, 降速 7)。
 - 4): 吸弃上清液, 轻弹管底分散细胞沉淀, 加入 1mL/管完全培养基重悬细胞, 配平, 室温离心 (450×g, 10 分钟)
 - 5): 轻轻松开离心管盖子, 在 5%CO₂ 的培养箱中 37°C 孵育 16 小时 (过夜)。
- 2、诱导软骨 (1 天): 用**成软骨分化完全培养基**代替 MSC 扩增完全培养基; 小心的从离心管中吸弃 MSC 扩增完全培养基, 避免抽吸到 MSC 颗粒; 沿壁缓慢加入 2mL/管成软骨培养基, 防止扰乱颗粒。
- 3、持续培养: 持续培养 (10-20 天): 持续培养 10-20 天。每 2 天更换一次**成软骨分化完全培养基**, 2mL/管。过程中要避免抽吸 MSC 颗粒 (持续培养 14 天足以诱导软骨快速形成)。
- 4、固定、脱水、染色、显微拍照:
 - 1) 固定、脱水: 吸弃培养基, 2mL/管加入 DPBS 洗涤样本颗粒; 吸弃 DPBS; 2mL/管加入 4%PFA 溶液在 25°C下固定 10 分钟。
 - 2) 冷冻切片: 将 MSC 颗粒用包埋剂包埋, 厚度调节为 10μm 进行切片 (样品包埋后可保存于-80°C冷冻 2 个月)。
 - 3) 清洗样本: 将载玻片浸泡于 DPBS 中, 清洗 2 次, 每次摇床晃洗 10min, 转速设为 0。
 - 4) 染色: 充分晾干水分后, 每个切片样本滴加 OriCell 阿利新蓝乳液, 染液全部覆盖样本 (或每个切片滴加 50μL 染色液), 将载玻片置于湿盒中, 放入 37°C干燥箱中染色 30min。
 - 5) 清洗、拍照: 流水缓慢滴洗载玻片 3min, 充分晾干水分后, 显微镜观察、拍照。注: 清洗时水流缓慢且不能直冲样本防止样本脱落或不成型。