

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	*
Chondrogenesis Differentiation Basal Medium	RP02014-B-01	80 mL	2-8 °C
Chondrogenesis Differentiation Supplement	RP02014-B-02	20 mL	-80°C 至 -20°C

*将基础液和添加物混匀配置成完全培养基，可在2-8°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 Ca2+/Mg2+	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

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

Chondrogenesis Differentiation Basal Medium: 80 mL

Chondrogenesis Differentiation Supplement: 20 mL

3. 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) 间充质干细胞准备

1. 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 $5000-10000 / \text{cm}^2$ 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:
 - 1.1 当细胞达到80%的汇合度时, 用1 mL/孔 $0.5 \times$ TryPLE 37°C消化 3 min;
 - 1.2 配平, 离心收集细胞 ($250 \times g$, 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。
 - 1.3 根据计数结果, 取 2×10^5 个细胞至15 mL离心管中, 每组共2管。若细胞悬液体积 < 1 mL, 可补加MSC扩增完全培养基到 1 mL, 配平, 室温离心 ($300 \times g$, 5 分钟; 升速 3, 降速 7)。
 - 1.4 吸弃上清液, 轻弹管底分散细胞沉淀, 加入1 mL/管完全培养基重悬细胞, 配平, 室温离心 ($450 \times g$, 10分钟)
 - 1.5 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2 mL/管成软骨培养基, 防止扰乱粒。

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**, 2 mL/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:
 - 4.1 固定、脱水: 吸弃培养基, 2 mL/管加入 DPBS 洗涤样本颗粒; 吸弃DPBS; 2 mL/管加入 4%PFA 溶液在25°C下固定 10 分钟。
 - 4.2 冷冻切片: 将 MSC 颗粒用包埋剂包埋, 厚度调节为10 μm 进行切片 (样品包埋后可保存于-80°C 冷冻2个月) 。
 - 4.3 清洗样本: 将载玻片浸泡于 DPBS 中, 清洗2次, 每次摇床晃洗10 min, 转速设为 0。
 - 4.4 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50 μL 染色液), 将载玻片置于湿盒中, 放入37°C干燥箱中染色30 min。
 - 4.5 清洗、拍照: 流水缓慢滴洗载玻片3 min, 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。