

## hMSC 成骨分化试剂盒

## 使用说明书

## 一、产品简介

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

## 二、产品信息

表一：hMSC 成骨分化试剂盒产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hMSC成骨分化试剂盒包含:	RP02014-C	1 Kit	*
Osteogenic Differentiation Basal Medium	RP02014-C-1	80 mL	2-8 °C
Osteogenic Differentiation Supplement	RP02014-C-2	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。

## 三、试剂材料

表二：推荐试剂&amp;材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
NcMission™ hMSC Medium V3.0	首宁生物	RP02010
茜素红染液 2% Alizarin Red S	Sciencell	0223
1 × DPBS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Thermo Sci.	14190250
6孔板	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL冻存管	Thermo Sci.	N/A
10 µL/200 µL/1000 µL吸头	Rainin .	N/A

## 四、试剂准备

## (一) hMSC 成骨分化试剂盒配制

- 在 4°C解冻 Osteogenic Differentiation Supplement，不要在 37°C条件下解冻。
- 在生物安全柜中，使用无菌移液管配制 100 mL 分化完全培养基。

**Osteogenic Differentiation Basal Medium: 80 mL**

**Osteogenic Differentiation Supplement: 20 mL**

- 完全培养基可置于 4°C储存，2 周内使用。

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

### (三) 茜素红工作液的配制

1. 茜素红储存液含量为 2%，常温保存。临用时，按茜素红储存液：去离子水=1:20
2. 比例稀释为 0.1%的工作液，工作液应为黄褐色的澄清液体。

## 五、间充质干细胞成骨分化

### (一) 间充质干细胞准备

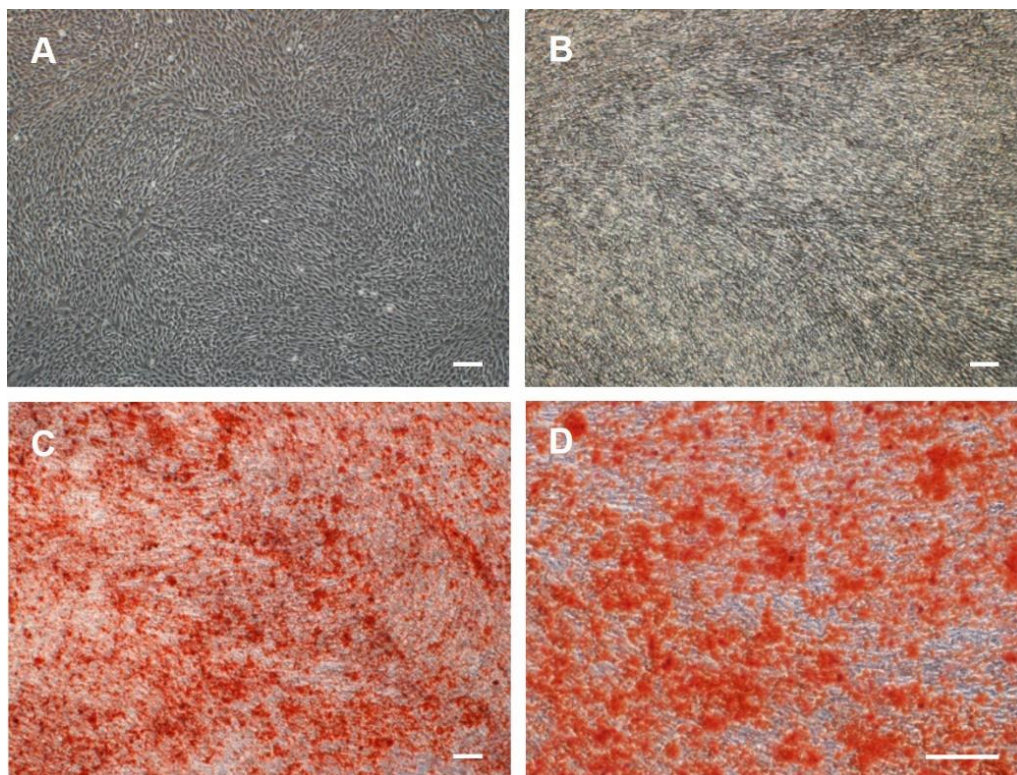
1. 详见 **NcMission™ hMSC Medium V3.0** 使用说明书。
2. 用 **NcMission™ hMSC Medium V3.0** 培养间充质干细胞，将间充质干细胞按 5000-10000 /cm<sup>2</sup> 的密度接种到六孔板中，水平十字摇匀三次，置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次，培养。

### (二) 间充质干细胞成骨分化

1. hMSC 汇合度在 85%左右时，开启分化：吸去上清，设置实验组和对照组。实验组加入 **hMSC 成骨分化完全培养基**；对照组加入 **NcMission™ hMSC Medium V3.0**。

**Tips:** 为了防止 hMSC 成骨分化过程中，出现细胞卷边、漂起等现象，建议使用 Matrigel 包被培养板。(Matrigel 使用方法：<https://www.shownin.com/video.html>)。

2. 每 3-4 天换液一次，每次 2-3 mL/孔，连续培养至第 21 天。
3. 第 21 天，吸弃上清液，加入**固定液（4%多聚甲醛）**固定 30 分钟。
4. 将分化组和对照组吸去上清，加入合适体积的**茜素红工作液**，室温避光孵育 20~60 分钟，然后吸去染液，用生理盐水或 DPBS 洗涤至未见背景色，每孔再加入生理盐水或 DPBS 浸润，显微镜下观察，拍照。



hMSC 成骨分化试剂盒分化过程中细胞形态图示。标尺：200 μm。

A、B 分别为分化第 1、21 天时的细胞形态图示；C、D 为分化第 21 天镜下染色结果图示。