



成软骨诱导分化培养基使用说明书

产品介绍

间充质干细胞成软骨诱导分化培养基适用于不同来源的间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)，如脂肪(ADSCs)、脐带(UC-MSCs)、骨髓(BMSCs)。该培养基基于ISCT 2025年最新共识标准对“干细胞”术语的严格定义，专为满足其干性评估所需的三向分化实验中成软骨诱导分化而设计。在成软骨诱导分化培养基作用下，MSCs 被诱导成为软骨细胞，使用阿利新蓝染色显示软骨组织中的内酸性粘多糖表达呈蓝色，评估 MSCs 成软骨分化能力，亦可通过蓝色着色的深浅及细胞分布（与对照组相比，更加集中，聚集），反映诱导的情况。

试剂盒组成

套装名称	套装货号	组分信息	组分货号	规格	保存温度	保质期
成软骨诱导分化培养基套装	KC060701	间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基	KC060701-A	90mL	2-8℃	12个月
		间充质干细胞成软骨诱导分化添加剂	KC060701-B	10mL	-20℃	12个月
		阿利新蓝染色液	KC060701-C	10mL	2-8℃	12个月
		明胶溶液	KC060701-D	10mL	2-8℃	12个月

成软骨诱导完全培养基配制和保存

1. 配制前至少6h，将套装中的成软骨诱导分化添加剂（以下简称添加剂）放置于2-8℃冰箱内完全融化。
2. 将间充质干细胞成软骨诱导分化添加剂加入到间充质干细胞成软骨诱导分化基础培养基，尽可能将添加剂瓶中所有成分全部加入基础培养基中，拧紧基础培养基瓶盖，轻柔摇匀，标注名称和配制日期等信息，配制为成软骨诱导分化完全培养基。

（注意：配制好的成软骨诱导完全培养基需放置于2-8℃保存，保质期为1个月，所有试剂请于保质期内使用，过期成分可能影响诱导培养效果。若短期内无法用完全培养基，可按照套装内各成分体积比例配制所需量，剩余成分严格按照各自保存条件妥善保存，避免多次冻融。）

成软骨诱导分化实验步骤（二维或三维诱导分化，任选其一）

一、二维诱导分化

注意：1) 本操作步骤以12孔板为例，请根据实际情况选择合适的培养容器；

2) 诱导完全培养基使用前可放置室温平衡30分钟。

1. 12孔板中每孔加入0.5mL明胶溶液，完全覆盖孔板底部，37℃处理不低于30分钟。接种细胞前，吸出孔板内多余明胶溶液，不需清洗孔板（现用现吸，孔板勿干）。
2. 按照5000-8000cells/cm² 的密度，将 MSCs 接种于步骤1中处理的12孔细胞培养板，MSCs 完全培养基1mL/孔，37℃、5%CO₂培养箱中培养。
3. 当细胞融合达到80%-90%时，弃去培养上清，每孔沿孔壁缓缓加入配制好的成软骨诱导分化完全培养基1mL，对照组细胞培养孔加入1mL对照培养基，37℃、5%CO₂培养箱中培养。
4. 诱导组每隔2~3天更换新鲜的成软骨诱导分化完全培养基，对照组更换等体积的对照培养基，37℃、5%CO₂培养箱中继续培养。
5. 诱导2~3周后，显微镜下观察，相比于对照组，诱导组细胞失去成纤维状、生长致密时，结束诱导培养，进行阿利新蓝染色。



6.诱导培养结束后，弃去培养上清，用1×PBS 洗涤细胞2-3次，每孔加入1mL 4%中性多聚甲醛溶液，室温固定细胞30分钟（通风橱内进行）。

7.弃去固定液，1×PBS 洗涤2-3次，每孔加入0.5mL阿利新蓝染色液，室温染色30分钟。

8.弃去阿利新蓝染色液，1×PBS 洗涤2-3次，充分洗去多余的染色液。

9.每孔加入1×1mL PBS，显微镜下观察阿利新蓝染色效果并拍照。

二、三维诱导分化

1.消化收集 MSCs 计数，用 MSCs 完全培养基将细胞浓度调整至 $4-8 \times 10^5$ cells /mL。

2.吸取0.5mL细胞悬液转移至15mL离心管中，室温，400g 离心5分钟。

3.离心后，拧松离心管盖以便于气体交换，不需吸掉上清，直接将其正置于37℃，5%CO₂培养箱中培养。

4.当细胞团出现聚拢现象时（一般为1~2天，视细胞具体生长情况而定），轻弹离心管底部，使细胞球脱离管底悬浮于液体中。

（注意：24h内，细胞团未出现聚拢现象之前，不要晃动离心管。）

5.小心吸弃培养上清，诱导组更换为0.5mL成软骨诱导分化完全培养基，对照组加入等体积的对照培养基，轻弹离心管底部使细胞球脱离管底悬浮在液体中。拧松离心管盖，正置于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养。

6.诱导组每隔2~3天换用新鲜的成软骨诱导完全培养基，同时对照组加入等体积的对照培养基，37℃、5%CO₂培养箱中继续培养；诱导过程中，细胞团直径会有所增大，表面会变得光滑呈胶质。

注意：1）吸弃培养上清时，不要吸出软骨球；

2）每次更换培养基后，都需轻弹离心管底部使细胞球脱离管底悬浮在液体中，拧松离心管盖。

7.诱导3~4周后，肉眼观察，诱导组管内形成直径1-2mm，表面光滑胶质状态的软骨球时，结束诱导培养，进行切片染色。

8.培养结束后，弃去培养上清，用1×PBS 洗涤细胞 2-3次，每管加入1mL 4%中性多聚甲醛溶液，室温固定细胞30分钟（通风橱内进行）。

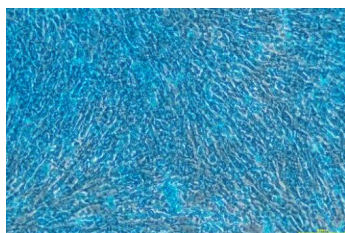
9.弃去固定液，1×PBS 洗涤2-3次，软骨球包埋后冰冻切片，厚度5μm。

10.冰冻切片用0.1mL阿利新蓝染色液，室温染色30分钟。

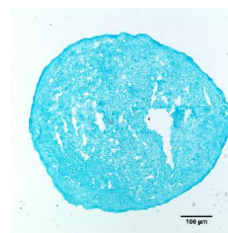
11.弃去阿利新蓝染色液，1×PBS 洗涤2-3次，充分洗去多余的染色液，甘油或中性树脂封片后，显微镜下观察阿利新蓝染色效果并拍照。

结果分析

镜下观察可见大面积蓝色着色点，阿利新蓝染色部分显示的是软骨组织中的内酸性粘多糖，说明 MSCs 具有成软骨能力。



二维，人 ADSCs, 20×



三维，人 ADSCs, 20×

注意事项

1. 由于诱导培养时间较长，细胞初始接种密度不宜过高，避免诱导分化过程中细胞脱落（二维）或细胞球过大（三维）。
2. 本试剂盒仅用于科研。
3. 如与皮肤、粘膜接触，请立即用自来水冲洗。