



细胞产品手册

OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化试剂盒

产品货号：CLATD-90041

产品介绍

由 OriCell®研发团队精心研制的 OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化试剂盒，包含适合 ATDC-5 细胞生长的基础培养基和诱导细胞分化所需的多种添加物。

本产品适用于 ATDC-5 细胞的成软骨诱导分化。大量细胞培养数据验证，本产品可稳定、高效诱导上述细胞分化为软骨细胞。

注意：本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

试剂盒成分

试剂盒成分	货号	体积
OriCell® Basal Medium For Cell Culture OriCell®细胞基础培养基	BHDM-03011	97 mL
OriCell® Supplement For ATDC-5 Cells Chondrogenic Differentiation I OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化添加物 I	CLATD-04041-1	2 mL
OriCell® Supplement For ATDC-5 Cells Chondrogenic Differentiation II OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化添加物 II	CLATD-04041-2	1 mL
Alcian Blue 8GX Solution 阿利新蓝 (pH=2.2)	ALCB-10001	5 mL

质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过渗透压、pH 检测。
- 通过产品性能检测。

详情见《产品检测报告》。

处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体和操作区域的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 各成分需按照保存条件妥善存放，并尽快使用。
4. 若短期内无法用完整套培养基，应按套装内各成分体积比例分批配制并分装保存。

产品稳定性及保存条件

1. 套装内所有成分均需避光保存。
2. 套装内基础培养基需置于 4℃冰箱保存，保质期为 1 年；其他成分需置于-20℃保存，保质期为 2 年。
3. 配制后的完全培养基，需放置 4℃保存，保质期为 1 个月；若能保证培养条件稳定，容器密封性能良好，避免冷热交替，则保质期可适当延长，但不得超过 45 天。
4. 所有产品请于保质期内使用；过期的成分可能严重影响培养效果。

预混液的配制

所需材料

- OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化试剂盒
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材（移液管、移液器吸头、离心管等）
- 洁净的封口膜
- 铝箔纸等避光材料

操作步骤

1. 配制前至少 30 min，将试剂盒中 OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化添加物 I（以下简称添加物 I）放置于 4℃冰箱内，直至完全融化。
2. 上下颠倒或轻弹试剂管以混匀试剂。
3. 用 75%医用酒精仔细擦拭所有成分外包装。在超净台内打开包装。
4. 将添加物 I 全部加入 OriCell®细胞基础培养基（以下简称基础培养基）中。
5. 取少量基础培养基，洗涤添加物 I 试剂管，尽可能将所有成分全部加入基础培养基中。
6. 拧紧基础培养基瓶盖，将配制好的预混液轻柔并充分摇匀。
7. 用封口膜密封瓶口，用铝箔纸包裹瓶身，并标注名称、配制日期等信息。

特别提醒

- 若短期内无法用完全部培养基，我们建议分批配制；请按照套装内各成分比例，配制所需量；但剩余的成分必须严格按照各自的保存条件妥善保存，并且不可多次冻融。
- OriCell®ATDC-5 细胞成软骨诱导分化试剂盒内的所有成分都严格控制无菌，一般情况下我们不建议再次除菌。若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。
- 配制完成的成软骨诱导分化培养基，请分装为小份，避免整瓶培养基反复温浴和冷藏交替。

诱导分化操作规程

所需材料

- OriCell® ATDC-5 细胞成软骨诱导分化试剂盒
- 4%多聚甲醛溶液或 10%福尔马林溶液

操作步骤

1. 将 $3\sim4\times10^5$ 个待诱导细胞转移到 15 mL 离心管中，20°C，250×g 离心 4 min。
2. 吸去上清。加入 0.5~1 mL 成软骨诱导分化预混液，重悬上一步离心所得沉淀，20°C，150×g 离心 5 min。
3. 重复步骤 2，再次清洗细胞。
4. OriCell® ATDC-5 细胞成软骨诱导分化添加物 II（以下简称添加物 II）的添加，按照比例（1 mL 成软骨诱导分化预混液中加入 10 μ L 添加物 II），吸取实验所需剂量的添加物 II，加入相应体积的预混液中配制成成软骨诱导分化完全培养基，轻柔吹打混匀。

注意：1) 吸取添加物 II 之前需短暂离心试剂管，使试剂聚集于管底以便取用；

2) 务必将添加物 II 分装保存在-20°C以下，避免反复冻融，可保存 12 个月；

3) 加入添加物 II 的成软骨诱导分化完全培养基务必现配现用，4°C保存不可超过 12 h。

5. 将步骤 3 所得细胞沉淀用 0.5~1 mL 成软骨诱导分化完全培养基重悬，20°C，150×g 离心 5 min。
6. 拧松离心管盖以便于气体交换。将其竖立放置于 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

注意：1) 此步骤不需要吸去上清或重悬细胞；

2) 24 h 之内不要晃动离心管。

7. 当细胞团出现聚团现象时（一般为 24 h 或 48 h 后，视实际情况而定），轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中。
8. 自接种开始计算，每隔 2~3 d 给细胞换用新鲜的成软骨诱导分化完全培养基，每管约 0.5~1 mL。

注意：1) 小心操作，不要吸出软骨球；

2) 软骨球容易粘连离心管底，每次更换培养基后，都需轻弹离心管，使软骨球脱离管底悬浮在液体中；

3) 每次更换培养基后，务必拧松离心管盖再放入培养箱中。

9. 持续诱导，直至管内形成直径 1.5~2 mm 的软骨球，即可准备切片染色。

软骨球切片染色

所需材料

- 诱导形成的软骨球
- 4%多聚甲醛溶液或 10%福尔马林溶液
- 无水酒精、二甲苯、石蜡
- 阿利辛蓝

操作步骤

注意：本步骤以石蜡切片染色为例。若使用冰冻切片，请遵照切片机使用规程。

1. 固定。诱导形成的软骨球用 1×PBS 清洗后，浸泡于 4%多聚甲醛溶液（或 10%福尔马林溶液），固定 30 min 以上。

注意：固定液需现配现用。

2. 脱水。固定好的软骨球使用梯度浓度酒精脱水，方式如下，每一阶段 30 min。

50%酒精 → 70%酒精 → 80%酒精 → 95%酒精 → 无水酒精

注意：1) 脱水必须在有盖的容器中进行，防止吸收空气中的水分；

2) 软骨球不要在酒精中浸泡太久，易碎裂；

3) 在更换酒精时，可吸出低浓度酒精，再加入高浓度酒精。避免移动增加软骨球碎裂的风险。

3. 透明。因酒精和石蜡不相溶，所以脱水后需经二甲苯过渡。方式如下：

① 二甲苯和无水酒精按体积比 1:1 混匀。将软骨球浸泡其中 2 h。

② 将软骨球浸泡在纯二甲苯中 1.5 h。

③ 更换新的二甲苯，继续浸泡 1 h。

注意：1) 透明必须在有盖的容器中进行，防止吸收空气中的水分；

2) 透明过程中，如果软骨球周围出现白色雾状气泡，说明其中水未被脱净。应重新放回酒精中脱水再透明。

4. 浸蜡。为了除去软骨球中的透明剂，使石蜡渗透到内部以便包埋，需要浸蜡处理。

① 二甲苯和石蜡按体积比 1:1 混匀。将软骨球浸泡其中，再一起放置于 40℃烘箱中 40 min。

② 将软骨球浸泡在纯石蜡中，放置于 55℃烘箱中 30 min。

注意：1) 浸蜡尽量保持在较低温度中进行，石蜡不凝固即可；

2) 温度要恒定，不可忽高忽低。

5. 包埋。将软骨球取出，置于模具中。倒入石蜡，静置冷却。待石蜡充分冷却成形，取出，修整蜡块。
6. 切片。连续切片，每片厚度 3 μm 。
7. 粘片。将软骨球切片用粘贴剂粘附于载玻片上，在 35 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干。
8. 脱蜡。
 - ① 纯二甲苯浸泡切片 15 min，更换新的二甲苯浸泡切片 10 min。
 - ② 二甲苯和无水酒精按体积比 1:1 混匀。浸泡切片 10 min。
 - ③ 依次使用 95%、85%、70%、50%酒精浸泡切片 10 min，晾干。
9. 染色。
 - ① 在晾干的切片上滴加阿利辛蓝，37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 1 h。
 - ② 用自来水冲洗载玻片 5 min，晾干。
10. 显微镜下观察阿利辛蓝染色效果。阿利辛蓝染色部分显示的是软骨组织中的内酸性粘多糖。

OriCell[®]ATDC-5细胞成软骨诱导分化阿利辛蓝染色效果



赛业（苏州）生物科技有限公司保留OriCell[®]细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（苏州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。