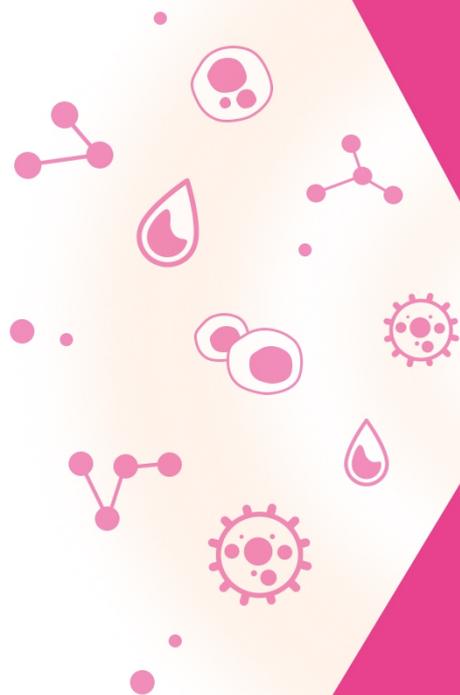


OriCell®

## 细胞产品手册

# OriCell® 人骨髓间充质干细胞 成软骨诱导分化试剂盒

产品货号: HUXMX-90041



*We help you discover life*

## 产品介绍

由 OriCell® 研发团队精心研制的 OriCell® 人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒，包含适合人骨髓间质充干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。

本产品适用于胎儿骨髓间充质干细胞、成人骨髓间充质干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组织。

**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 Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation I OriCell® 人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化添加物 I	HUXMX-04041-1	2 mL
OriCell® Supplement For Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation II OriCell® 人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化添加物 II	HUXMX-04041-2	1 mL
Alcian Blue 8GX Solution 阿利辛蓝 (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°C 冰箱保存，保质期为 1 年；其他成分需置于 -20°C 保存，保质期为 2 年。
3. 配制后的完全培养基，需放置 4°C 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®人骨髓间充质干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®人骨髓间充质干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°C 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®人骨髓间充质干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®人骨髓间充质干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  $3\sim 4 \times 10^5$  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 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®人骨髓间充质干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 μL 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 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%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 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 mL。

**注意：**1) 小心操作，不要吸出软骨球；

2) 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℃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℃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®人骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化阿利辛蓝染色效果**

赛业（广州）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（广州）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。