仅供科研使用 版本号：A 版

人脐带间充质干细胞

成软骨诱导分化培养基（即用型）

【货号】 BC-ZY-M-004

【规格】 100mL

【产品组分】

试剂盒组分	规格	保存条件	有效期
成软骨诱导分化培养基	100mL	2-8℃	3 个月
成软骨诱导液	1mL	-20℃	12 个月
阿利新蓝染色液	5mL	2-8℃	12 个月

使用前需将成软骨诱导液加入诱导分化培养基中，建议现用现配，当天用完。

【产品简介】

本品为人脐带间充质干细胞专用成软骨诱导分化培养基，根据脐带间充质干细胞独特生物学特性，优化诱导分化试剂配比与培养体系，调控细胞定向分化进程，有效提升人脐带间充质干细胞软骨诱导分化效率、分化稳定性及成熟程度，软骨形成效果优异，重复性好。

【使用方法】

一、成软骨诱导分化（平面操作）

1.诱导分化

取对数生长期细胞，胰酶消化计数后，采用成软骨诱导分化培养基重悬细胞，离心调整细胞浓度至 1.0~2.0×10^7 cells/mL。

吸取 20 μL 细胞悬液（约 2.0-4.0×10⁵个细胞）悬滴于 24 孔板中央，置于 37℃、5% CO_2培养箱静置 2-3 h，使细胞稳定贴壁。待细胞贴壁后每孔补充 1 mL 成软骨诱导培养基，常规培养；每 2-3 d 更换新鲜诱导液，持续诱导 21-28 d，观察细胞形态变化。

2.染色鉴定

细胞固定弃去孔内培养液，1×PBS 轻柔洗涤细胞 1 次；加入 4% 中性甲醛完全覆盖孔底，室温固定 15-30 min。固定完成后弃去固定液，1×PBS 洗涤细胞 2 次。

向孔内加入适量阿利新蓝染色液，室温避光孵育染色 15-30 min。染色结束后弃去染液，PBS 漂洗 2 次，保留少量 PBS 浸润细胞，防止样本干燥干裂。

诱导评估显微镜下采集染色图像，分析软骨分化效果。分化阳性细胞胞外酸性粘多糖可被特异性染为蓝绿色，以此评价成软骨分化程度。

二、成软骨诱导分化操作（三维培养）

1.诱导分化

取对数生长期细胞消化计数，吸取 3×10⁵个细胞移入 15 mL 离心管，250 g 离心 4 min。弃上清后加入 0.5 mL 成软骨诱导预混液重悬细胞，150 g 离心 5 min；轻柔弃上清，再次加入 0.5 mL 成软骨诱导液重悬细胞，150 g 离心 5 min。离心管盖微微拧松，置于 37℃、5% CO_2恒温培养环境静置培养。

培养 24 h 后观察细胞团聚集状态，轻柔拨动管底使细胞团脱离管壁，完全浸没于诱导培养基中。持续培养 21 -28 d 左右，每 2-3 d 更换一次新鲜无菌诱导液，根据细胞球形态、圆润光滑程度确定诱导终止时间，后续开展染色检测。

2.染色鉴定

将软骨球转移至 EP 管，PBS 清洗 2 次，加入适量 4% 中性甲醛溶液充分固定组织样本。石蜡包埋切片固定后的软骨球常规脱水透明，经石蜡包埋后制作连续病理切片。

石蜡切片依次脱蜡、梯度脱水，加入阿利新蓝染液室温染色 15- 30 min；自来水冲洗 2 min，蒸馏水漂洗 1 次终止染色。

诱导评估光学显微镜下观察染色结果并采集图像。

【注意事项】

1.本产品仅用于科研或进一步研究使用，不用于诊断和治疗；

2. 完全培养基注意避光冷藏保存，必须在保质期内用完。