

兔骨髓间充质干细胞
成骨诱导分化培养基操作手册

产品规格：200mL

产品货号：PD-022

一、产品描述

兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基专门为兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化而开发，针对兔骨髓间充质干细胞的特性优化分化试剂的配方，可增加兔骨髓间充质干细胞的成骨分化效果。

本产品含血清成分，仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床及其他用途。

二、培养基组成成分

成骨诱导分化培养基：

成分名称	添加体积
成骨分化专用基础培养基 Basal Medium For Stem Cells Osteogenic Differentiation	177 mL
成骨分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For Stem Cells Osteogenic Differentiation	20 mL
兔骨髓间充质干细胞成骨分化添加物 Supplement For RbBMSCs Osteogenic Differentiation	3 mL

注：各成分请根据试剂管上标签标示温度保存。

辅助试剂：

成分名称	添加体积
茜素红S染色液 Alizarin Red S	10 mL
明胶包被液 Gelatin Solution	10 mL

三、操作流程

（一）兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基的准备

- 前言：本品为试剂盒型，使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。
- 准备工作：将血清于4℃解冻至完全融化；将各添加物于室温解冻至完全融化，轻轻摇晃混匀。

注：1） 配制好的完全培养基，需放置4℃避光保存，1个月内用完；

2） 若短期内无法用完全培养基，建议分批配制（首先将试剂按套装内各成分比例分装，建议分装不超过4份，然后取出其中一份按比例配制完培，剩余成分严格按各自条件保存，不可多次冻融）。

- 血清离心：血清中可能会存在白色絮状沉淀物，这通常是胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质析出导致，



属于正常现象，该现象不影响细胞的培养和诱导分化。若您欲去除这些絮状沉淀物，可以将血清分装至无菌离心管内，以400-600 g离心5 min，取上清液使用。但是我们不建议您以过滤的方法去除这些絮状沉淀物，一方面它可能会阻塞您的过滤膜；另一方面，过滤血清这种行为可能会导致血清中部分营养成分的流失。

4. 完培配置：将血清、成骨分化添加物全部加入成骨分化专用基础培养基中，即可使用。

（二）兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化操作指导

● 温馨提示：

1. 试剂准备：此过程需要准备兔骨髓间充质干细胞完全培养基、0.25%胰酶（含EDTA）、1×PBS以及兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基（PD-022）。
2. 明胶包被：明胶包被有助于减少细胞诱导过程中的细胞回缩、飘起、卷边、贴壁不牢等现象。您可以根据自己细胞状态选择是否包被培养器皿。包被操作步骤为“无菌操作，加适量明胶包被液，覆盖孔板底部即可，于超净台或细胞培养箱孵育30 min，吸除明胶包被液，即可用于实验接种”。
3. 温度：成骨诱导过程中，由于细胞处于长满底部的单层膜状态，遇冷会出现收缩，导致实验失败。因此培养基温度变化是导致诱导过程中细胞飘起、卷边的主要影响因素之一。
4. 换液：换液过程对于成骨诱导实验是极其重要的。换液过程经验总结如下，供参考：
 - 1) 换液前建议将本次操作所需的一定量的完全培养基在培养箱或水浴锅内预热至37°C。
 - 2) 显微镜下观察细胞或者换液时间不宜过长（建议控制在10 min以内，待处理细胞较多时建议分批处理）。
 - 3) 换液过程中，培养板下建议垫放一块空培养板（或泡沫板）以隔开冰冷的超净台，防止细胞快速失温。
 - 4) 培养板平放在空培养板上后（减少扰动），不倾斜板子，直接吸除约80%的旧培养基（不建议全部吸除干净，留存约20%左右可保持孔底湿润及保留早期微量钙沉积物）。
 - 5) 将新鲜成骨分化完全培养基沿孔壁缓缓注入，注意不要将液体直接对准细胞表面吹打，防止细胞层脱落，换液后轻放入37°C培养箱中继续培养。

注：若一板内多孔需要换液（如12、24孔板等）时，不建议同时多孔换液（即同时吸除全部孔再同时换入新鲜诱导液），建议逐孔操作或部分孔同时操作（6孔以内）。

● 本成骨诱导操作指导以六孔板为例：

1. 当您的兔骨髓间充质干细胞的融合度达到80-95%时，即可用0.25%胰酶（含EDTA）进行消化。
2. 将消化下来的兔骨髓间充质干细胞进行计数，根据计数结果，按 $2-3 \times 10^4$ cells/cm²的细胞密度接种在六孔板中（根据细胞生长速度，在接种24-72 h后达80-95%即可），每孔加入2 mL的兔骨髓间充质干细胞完全培养基。



3. 将均匀接种好的兔骨髓间充质干细胞置于37°C, 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。
4. 当细胞融合度达到80-95%时, 小心的将孔内完全培养基吸走, 向六孔板中加入2 mL兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基。
5. 每隔48-72 h更换预热的新鲜的成骨诱导分化培养基。
6. 诱导2-4周后, 视细胞的形态变化及生长情况, 根据实验需要可进行鉴定。

(三) 茜素红染色液检测诱导分化效果

● 温馨提示:

成骨诱导实验结束后, 可进行茜素红染色确定诱导效果 (本试剂盒提供茜素红S染色液), 需自行准备4%多聚甲醛溶液、1×PBS溶液。

● 成骨诱导分化结果检测以六孔板为例:

1. 吸弃孔板内的成骨诱导分化完全培养基, 用1×PBS清洗1-2遍。
2. 加入4%多聚甲醛溶液 (覆盖细胞表面即可), 固定细胞30 min。
3. 吸弃4%多聚甲醛溶液, 用1×PBS清洗1-2遍。
4. 以六孔板为例, 每孔加入1 mL茜素红染色液, 室温染色30 min (染色时间可根据实际情况适当延长或缩减)。
5. 吸弃茜素红染色液, 用1×PBS冲洗1-2次, 把背景杂质洗干净, 即可在显微镜下观察诱导和染色效果 (保留少量PBS, 以便拍照)。
6. 结果判读: 钙结节被茜素红染色后呈红色、红偏黄或红偏紫。

四、注意事项

1. 由于成骨诱导分化实验历时较长, 请在配制及使用本产品过程中严格注意无菌操作;
2. 成骨诱导实验过程中, 很难通过镜下观察/白光照片判断是否已经完成诱导, 而孔板一经染色又无法继续诱导。因此建议“实验伊始, 在另外的孔板上多做 (1-3) 份平行实验, 或仅将‘正常诱导组’在另外的孔板上多做 (1-3) 份, 以便诱导后期用茜素红染色来判断正式实验的诱导进度”;
3. 兔骨髓间充质干细胞成骨分化添加物的颜色为白色至黄色, 不影响正常使用;
4. 兔骨髓间充质干细胞成骨分化添加物融化后有轻微白色沉淀, 该成分为L-谷氨酰胺, 可将成骨分化添加物直接添加到基础培养基中, 不影响正常使用。

