

# 人间充质干细胞成脂诱导分化与染色试剂盒

## 使用说明书

规格：300mL/Kit

### 产品内容

人间充质干细胞成脂诱导分化与染色试剂盒		
成脂诱导 A 液	DMEM 低糖基础培养基	175mL
	特级胎牛血清	20mL
	成脂诱导添加物	5mL
	IBMX	200μL
成脂诱导 B 液	DMEM 低糖基础培养基	90mL
	特级胎牛血清	10mL
	Insulin	200μL
其他成分	油红 O 染色液	5mL
	0.1%明胶溶液	10mL

### 产品简介

间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSC）是中胚层来源的多能干细胞，具有高度自我更新能力和多项分化潜能，体外在一定的条件下可以被诱导分化成骨细胞、成脂细胞、成软骨细胞。2006 年国际细胞治疗协会（ISCT）将此三项检测指标确定为 MSC 鉴定的必检项目，以 MSC 为基础的研究报道均会对此三项指标进行鉴定。

在成脂分化作用下，MSC 会先后诱导分化为前成脂细胞（preadipocytes）和脂肪细胞（adipocytes），后者聚集着大大小小的脂肪滴（lipid droplets）。油红 O 在脂肪中的溶解度大于其在染液中的溶解度，因而使脂肪着色，呈现红色或橘红色。被染色的脂肪滴数量和深度会受到多种因素的影响，例如细胞类型、细胞代数、分化时间和培养条件等。

人间充质干细胞成脂诱导分化与染色试剂盒包括成脂诱导培养体系所有成分以及鉴定所用的油红 O 染色液。本产品可用于人类骨髓、脐带、脂肪、牙髓等组织来源的间充质干细胞的成脂诱导分化与染色。

### 特点优势

诱导分化程序简单便捷

成脂诱导效率高

## 质量控制

本产品已经过无菌检测、pH 测试、渗透压检测、内毒素检测。

**声明：**本产品供科学研究和生产使用，用于组织和细胞的体外培养；禁止临床使用。

## 完全培养基 A 液的配制方法

1. 配制前将特级胎牛血清及成脂诱导添加物放置于 4℃ 冰箱内完全融化。IBMX 放置室温中解冻。

**注意：**融化后的血清中可能出现絮状物，其主要成分为析出的血纤蛋白，这不会影响产品使用效果；如絮状物较多，可离心去除（不建议过滤，过滤会造成部分营养物质丢失）。

2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。

3. 将血清、成脂诱导添加物和 IBMX 全部加入 DMEM 低糖培养基中（DMEM 需先 37℃ 水浴锅预热，否则 IBMX 会预冷析出）。

4. 轻轻颠倒摇晃配制好的成脂诱导分化完全培养基，使其混合均匀。

**特别建议：**如短时间内无法使用完全部的培养基，建议按照上述配方比例分批配制；剩余成分可以分装为合格规格，按各自保存条件储存，切勿反复冻融。

## 完全培养基 B 液的配制方法

1. 配制前将特级胎牛血清及 Insulin 放置于 4℃ 冰箱内完全融化。

**注意：**融化后的血清中可能出现絮状物，其主要成分为析出的血纤蛋白，这不会影响产品使用效果；如絮状物较多，可离心去除（不建议过滤，过滤会造成部分营养物质丢失）。

2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。

3. 将血清和 Insulin 全部加入 DMEM 低糖培养基中。

4. 轻轻颠倒摇晃配制好的成脂诱导分化完全培养基，使其混合均匀。

## 明胶包被培养器皿表面

1. 为了避免诱导过程中细胞漂浮，建议对成脂诱导使用的培养器皿表面进行明胶包被。

2. 取能覆盖整个培养皿/板底面量的 0.1% 明胶入到培养皿/板中，如 6 孔板中加 2mL/孔。

3. 摇匀液体使其覆盖整个培养皿/板的底面。

4. 将铺有 0.1%明胶的培养皿/板室温放置（生物安全柜或超净工作台）至少 30min 以上。
5. 吸弃明胶，待培养皿/板晾干后，1×PBS 洗 2 次，即可用于接种细胞。

**注意：**包被明胶的培养皿/板在无菌和明胶不蒸干的条件下，可以在 4℃ 保存两周。

### 成脂诱导分化操作规程（以 6 孔板为例）

1. 当 MSC 融合度达到 80-90%时，消化细胞并计数；
2. 将细胞按照  $1 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种在包被 0.1%明胶的六孔板中，每孔加入 2 mL 正常培养用完全培养基。
3. 将细胞置于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。
4. 当细胞汇合度达到 100%时，吸弃上清，PBS 洗 2 次，每孔加入 2 mL 人间充质干细胞成脂诱导分化完全培养基 A 液；
5. 诱导培养 3 天后，吸去六孔板中的 A 液，加入 2 mL 人间充质干细胞成脂诱导分化培养基 B 液；
6. 诱导培养 1 天后，吸去 B 液，换回 A 液继续诱导。
7. 重复以上 A 液和 B 液“3+1”交替程序 3-5 次后（12-20 天），继续用 B 液维持培养 4-7 天直到脂滴变得足够大、圆。B 液维持培养期间，每隔 2-3 天需要换用新鲜的 B 液

### 油红 O 染色（以 6 孔板为例）

1. 诱导成脂分化结束后，吸弃上清，PBS 清洗 1-2 遍，每孔加入 2 mL 4%多聚甲醛溶液，固定 30 min；
2. 油红 O 染色工作液配制方法：饱和油红 O 染液：蒸馏水=3:2，混匀后用中性滤纸过滤即可（或者混匀后 1100rpm 离心 4min，使用上清）。
3. 将 4%多聚甲醛吸净，PBS 清洗 2 遍。每孔中加入 1 mL 油红 O 染液，室温染色 30min；
4. 吸净油红 O 染液，PBS 清洗 2-3 遍。
5. 每孔加入 1mL PBS，倒置显微镜下观察成脂染色效果。

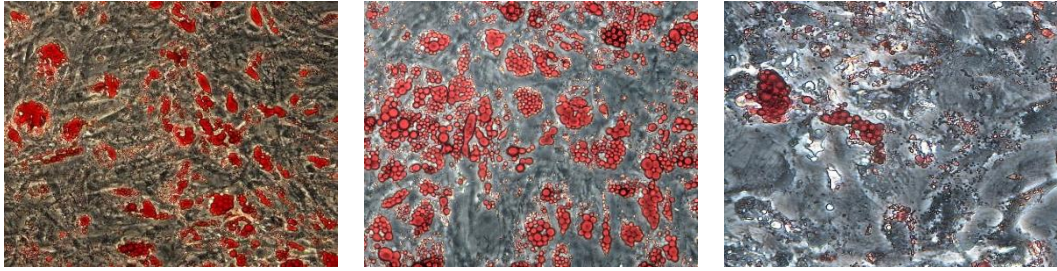


图1

图2

图3

图1：人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化油红O染色效果

图2：人脂肪间充质干细胞成脂诱导分化油红O染色效果

图3：人脐带间充质干细胞成脂诱导分化油红O染色效果

### 保存条件

试剂名称	保存条件	有效期
DMEM 低糖基础培养基	2-8℃	1年
特级胎牛血清	-20℃	6年
成脂诱导添加物	-20℃	1年
IBMX	-20℃	1年
Insulin	-20℃	1年
人间充质干细胞成脂诱导分化完全培养基 A 液	2-8℃	1个月
人间充质干细胞成脂诱导分化完全培养基 B 液	2-8℃	1个月
油红 O 染色液	2-8℃	1年
0.1%明胶溶液	2-8℃	1年

### 注意事项

- 1、本产品所有组分均为无菌包装，在使用过程中请注意无菌操作，避免微生物污染；若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。
- 2、本产品发货时使用冰袋运输，若收到货后暂时不使用，请按照保存条件将各组分保存。
- 3、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。