

## 人骨髓间充质干细胞 成脂诱导分化培养基操作手册

产品规格：400mL

产品货号：PD-016

### 一、产品描述

人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基专门为人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化而开发，针对人骨髓间充质干细胞的特性优化分化试剂的配方，可增加人骨髓间充质干细胞的成脂分化效果。

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

#### 成脂诱导分化培养基A液：

成分名称	添加体积
成脂分化专用基础培养基A Basal Medium For Stem Cells Adipogenic Differentiation A	177 mL
成脂分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For Stem Cells Adipogenic Differentiation	20 mL
人骨髓间充质干细胞成脂分化添加物A① Supplement For hBMSCs Adipogenic Differentiation A①	2.8 mL
人骨髓间充质干细胞成脂分化添加物A② Supplement For hBMSCs Adipogenic Differentiation A②	200 μL

#### 成脂诱导分化培养基B液：

成分名称	添加体积
成脂分化专用基础培养基B Basal Medium For Stem Cells Adipogenic Differentiation B	177.2 mL
成脂分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For Stem Cells Adipogenic Differentiation	20 mL
人骨髓间充质干细胞成脂分化添加物B Supplement For hBMSCs Adipogenic Differentiation B	2.8 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
油红O染色液 Oil Red O Solution	10 mL
明胶包被液 Gelatin Solution	10 mL



### 三、操作流程

#### (一) 人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基的准备

1. 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。（**请勿将A液与B液混淆**）
2. 准备工作：将血清于4°C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A①、B混匀；A②短暂离心，使试剂能全部收集至管底。
3. 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. A液配置：按顺序将FBS（两支FBS无区别）、A①、A②先后加入到基础培养基A中；混匀做标识，即可使用。
5. B液配置：按顺序将FBS（两支FBS无区别）、B先后加入到基础培养基B中；混匀做标识，即可使用。

**注：1）配制好的完全培养基，需放置4°C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）。**

**3）步骤3、4中无菌吸取试剂管中的试剂成分，将枪头伸至培养基液面下方快速注入，轻微吹打洗涤枪头。A②液添加的时候注意需更换新的无液体的枪头吸取A②液添加到基础液体培养基中，不可向A②液中加入基础培养基，会产生沉淀，尽可能将所有组分完整地加到基础培养基中，可以更好得保证培养基的效果。**

#### (二) 人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化操作指导

##### ● 温馨提示：

1. 试剂准备：此过程需要准备人骨髓间充质干细胞完全培养基、0.25%胰酶、1×PBS 以及人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基（PD-016）。
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。操作步骤为“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：细胞培养基温度变化是引发细胞诱导过程中的飘起、卷边的主要影响因素。因此诱导培养基在换液前一定要预热至37°C，在外观察细胞时间不可过长（建议10 min以内）。
4. 换液：同时操作孔数不可过多（建议6孔以内），换液时建议沿孔板侧壁轻柔缓慢得注入。

##### ● 本成脂诱导操作指导以六孔板为例：

1. 当您的人骨髓间充质干细胞的融合度达到80-90%时，即可用0.25%胰酶进行消化。
2. 将消化下来的人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/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种在六孔板中，每孔加入2 mL的人骨髓间充质干细胞完全培养基。
3. 将均匀接种好的人骨髓间充质干细胞置于37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。



- 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人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基A液完全培养基。
- A液诱导2-3天后，吸走六孔板的诱导完全培养基，每孔加入2 mL人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基B液完全培养基维持1天。

**注：A液诱导时长2-3天均可，诱导期间细胞出现形态变化为正常现象；“A 2天+B 1天”的方案对细胞的刺激更温和，新手使用较为稳妥；“A 3天+ B 1天”的方案对细胞的刺激更强，在细胞状态优秀、操作者经验丰富的情况下可以加快实验进程。**

- A、B两种培养基交替诱导3-5次后，当观察到干细胞内出现明显的、足够多的脂滴后，可用B液继续培养3-6天（每2-3天换液一次），至直脂滴变得足够大和饱满，即可结束诱导，根据实验需求对细胞进行染色和后续鉴定。

### （三）油红O染色液的使用

- 当您的成脂诱导实验结束后，可进行油红O染色确定诱导效果（本试剂盒提供饱和油红O染色液，**需配制工作液后使用**）。
- 吸走孔板里的成脂诱导分化完全培养基，用1×PBS冲洗1-2遍。
- 加入4%中性甲醛溶液（覆盖细胞表面即可），对细胞固定30 min。
- 细胞固定期间，可配制油红O工作液（饱和油红O溶液：蒸馏水=3:2，混匀后用中性滤纸或尼龙材质滤膜过滤除去杂质）。
- 吸走4%中性甲醛溶液，用1×PBS冲洗1-2遍。
- 以六孔板为例，每孔加入1 mL油红O工作液，室温染色30 min。
- 吸走油红O工作液，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。

## 四、注意事项

- 因为培养基的成分较多，请在配制过程中严格注意无菌操作；
- A、B交替诱导是为了减轻A液中试剂对干细胞的影响，如果您的干细胞状态较好可在前7天先只使用A液进行刺激诱导（中途每2-3天更换新鲜A液），待脂滴快速出现后，再进行两种培养基交替诱导的操作。

