

在 PLGA 支架上的黏附、生长状况；X 线摄像及组织切片染色等观察异位成骨情况。

1. 材 料

1.1 主要仪器及材料:

自动平衡离心机	上海医用分析仪器厂
台式离心机	EPPENDOF (德国)
低温台式离心机	EPPENDOF (日本)
凝胶成像及分析系统	BIO-RAD (美国)
紫外分光光度仪	岛津 (日本)
紫外投射仪	UVITEC (英国)
电泳系统	BIO-RAD (美国)
超净工作台	THERMO (美国)
电子恒温摇床	THERMO (美国)
电子分析天平	METTLER TOLEDO (瑞典)
JTT-5 架盘药物天平	上海医用激光仪器厂
恒温水箱	上海跃进医疗器械厂
加样器	EPPENDOF (德国)
移液器	SOCOREX (瑞士)
DELTA 320pH 计	METTLER TOLEDO (瑞典)
超低温冰箱	THERMO (美国)
医用冰箱	SANYO (日本)
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
倒置荧光相差显微镜	NIKON (日本)
电子显微摄像系统	NIKON (日本)
液氮容器	成都金凤液氮容器公司
压力蒸汽消毒器	HTRAYAMA (日本)
电热鼓风干燥箱	上海福玛实验设备有限公司
CO ₂ 孵箱	BIO-RAD (美国)

Milli-Q Biocel 超纯水系统..... Millipore (美国)
 制冰机..... SCOTSMAN(美国)
 流式细胞仪.....BECTON DICKINSON (美国)
 酶标仪..... TECAN (奥地利)
 扫描电镜.....AMRAY(美国)
 切缝包, 骨穿针, 肝素, 等常规药品及材料。

1.2 菌株及质粒:

菌株: E.coli DH5 α (本实验室保存);
 质粒: pcDNABMP-9 (重庆医科大学附属儿童医院康权博士构建并惠赠);
 pIRES2-EGFP 质粒 (重庆医科大学康权博士馈赠);

1.3 主要试剂及配制:

1.3.1 主要试剂:

DMEM/F-12 培养基	GIBCO (美国)
特级胎牛血清	TBD (杭州四季青公司)
青霉素	华北制药股份有限公司
链霉素	华北制药股份有限公司
HEPES	SIGMA (美国)
限制性内切酶 Nhe I、Xho I	NEB (美国)
GenExtract TM 质粒中量抽提无内毒素试剂盒	道普生物科技 (北京)
胰蛋白酶	SIGMA (美国)
DMSO	华美公司
Lipofectamine TM 2000	INVITROGEN(美国)
ALP 测定试剂盒	建成生物工程研究所(南京)
PLGA 材料	岱罡科技有限公司 (济南)
其它常规试剂等。	

1.3.2 试剂配制:

•细胞培养相关试剂

①DMEM-F12 培养液配制

取 1000ml 消毒过的大烧杯，注入约 800ml 的消毒过的三蒸水，首先加 DMEM/F12 培养基一包，溶解后，再加 5.0 g 碳酸氢钠，加入 HEPES10.0 g，加入葡萄糖 3.0g，加入青霉素 10 万 u(终浓度 100u/ml)，链霉素 6.5 万 u(终浓度 100u/ml)，定容至 1000ml 后调 PH 值 (7.0~7.2)，在超净台上抽滤除菌，并分装至 11 个 100ml 盐水瓶中，盖好瓶塞，用牛皮纸扎口，放在-20℃冰箱中保存备用。每次使用取出一瓶，无菌条件下加入已分装的灭活胎牛血清 10ml 后使用。解冻后的培养液用后置于 4℃保存。

②血清

将冻存的 100ml 优等特级胎牛血清先置于室温下 3h 使其自然融化，然后置于 56℃水浴 30min 灭活补体；消毒 25ml 血清瓶 5 个，无菌条件下分装后-20℃冰箱保存备用。

③胰蛋白酶

称取胰蛋白酶 0.25g，然后再用消毒好的 PBS 液 100ml 溶解后抽滤，在无菌台上分装在消毒后的 25ml 血清瓶内，放于-20℃冰箱冻存。

④PBS (pH7.0~7.4):

取 NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 无水 Na₂HPO₄1.2g, KH₂PO₄0.2g, 调 pH 值 (7.0~7.4), 三蒸水定容至 1 L, 抽滤分装至 10 个 100ml 盐水瓶中，盖好瓶塞，用牛皮纸扎口，120℃，20 min 消毒，常温保存备用。

•DH5α 细菌培养相关:

①LB 液体培养基的配制

取精解蛋白胨 5.0g，酵母浸出粉 2.5g，氯化钠 5.0g，溶于 500ml 三蒸水，用 5mmolNaOH 调 PH 值 7.0；分装为 100ml 后 120℃，20 min 消毒；恒温水箱冷却至 60℃，加入所需抗生素 (kan, 终浓度为 50μg/l)，再直接室温冷却；所有培养基 4℃保存备用。

②LB 固体培养基的配制及平板制作

称取 1.5g 琼脂粉 (Agar)，加入到上面所配置的 100mlLB 液体培养基中，溶解摇匀；120℃，20min 消毒；立即置于 60℃恒温水箱降温，半小时后；加入所需抗生素卡那霉素 (Kan)，轻轻摇匀；准备好 φ10 cm 塑料平板于消毒之超净台上；

从水箱取出液态 LB 固体培养基后，尽快转移至超净台，小心倒入预备各平板中，厚度约 3mm 左右；Agar 凝固后立即倒扣平板，防止盖上之冷凝水污染培养基；3h 后用消毒纸巾小心抹去底盖冷凝水；扣好板盖，封口胶双层密封后 4℃ 保存备用；

③ 抗生素配配制

卡那霉素 (Kan): 三蒸水配制 10mg/ml 工作液； ϕ 220nm 滤纸过滤后避光保存；(使用前) 取 5ml (50mg) 加入 1000ml LB medium (或 LB Agar) 中；最终工作液浓度：50 μ g/ml。

• 电泳相关试剂

① TAE 的配制 (1L 工作液):

Tris 乙酸 7.56g + EDTA 0.372g, 三蒸水定容至 1 L 备用；

② GSB 的配制:

0.25% 溴酚蓝 (0.25g) + 40% 蔗糖 (40g), 三蒸水定容至 100ml 备用。

1.4 实验动物:

2~3 月龄新西兰大白兔。

2. 方 法

2.1 MSCs 的准备:

2.1.1 MSCs 的分离、培养:

新西兰大白兔全麻，侧卧位，双后肢自然伸直、交叉，暴露下面后肢内侧胫骨平台，备皮，碘酒、75%酒精常规消毒，铺洞巾(洞巾孔洞应控制在 1cm 左右，以利于减少污染)，使用 20ml 的无菌注射器吸取 0.1~0.2 毫升含 1000 单位的肝素化生理盐水(使针道内壁肝素化，防止吸取粘稠骨髓时出现针道内的溶血)，于胫骨平台穿刺吸取骨髓。穿刺针首先快速穿透皮肤进针 0.5~0.8cm 后，可感到明显落空感，匀速抽取骨髓血。同法穿刺对侧，共可得骨髓血 5ml 左右，压迫止血。

以培养液稀释骨髓血，1000rpm 离心 8~10min 洗涤 2 次，以 6ml 培养液重新悬浮。将重悬骨髓液转入 50ml 的无菌玻璃培养瓶中，转入 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。24~48h 首次换液，以后隔天换液一次，细胞生长状态，细胞铺满瓶底后胰酶消化，按照 7 \times 10⁴/ml 密度传代。