

间充质干细胞无血清培养基套装1
(脐带-原代细胞分离及种子库构建)
使用说明文件 (2021年版)



间充质干细胞无血清培养基套装1（脐带-原代细胞分离及种子库构建）使用说明书

【产品名称】

间充质干细胞无血清培养基套装1（脐带-原代细胞分离及种子库构建）

【规格与保存】

产品货号	产品名称	包装规格	保存条件	保存期限
间充质干细胞无血清培养基基础	NC0103	500mL/瓶	2-8℃，避光保存	12个月
间充质干细胞无血清培养基添加剂1 （脐带-原代细胞分离及种子库构建）	NC0103.S	5 mL/瓶	-20℃，避光保存	12个月
干细胞温和消化酶	NC1004.1	500mL/瓶	2-8℃，避光保存	12个月

【用途与描述】

本培养基可用于多种来源的人类间充质干细胞的原代细胞分离及种子库构建，同时还能保持其多向分化的潜能，如骨髓（BM-hMSC）、脐带（UCM-hMSC）。使用本产品无需添加血清或血清替代物。

本产品化学成分明确、没有添加血清或血清替代物（血小板裂解物）、没有任何动物源的组分。产品批间差异小，所有原料均符合GMP标准。更适合临床研究用途。

【主要组成成份】

氨基酸，维生素、无机盐、人白蛋白，转铁蛋白、胰岛素、微量元素等。

【产品设计原理】

在诸如DMEM、MEM、M199等基础培养基之上，添加了各种氨基酸、维生素、无机盐、人白蛋白，转铁蛋白、胰岛素、微量元素，既能分离原代MSC，又能后期培养MSC，能保持细胞正常的形态与表型，同时，避免添加血清或血清替代物中的某些能够促使干细胞分化的组分，在细胞传代的过程中，维持干细胞的未分化状态。

【产品性能指标】

- 1. 从人类脐带分离原代细胞所需时间
以植块法为例：
可见细胞生长的时间：5-9天。
细胞可收获的时间：12-14天。
上述所指脐带为新鲜脐带，若为水肿的脐带或冷冻保存的脐带组织，可见MSC细胞长出的时间为14天左右，细胞可收获的时间为21天。也会出现不能分离出细胞的情况。
- 2. 细胞传代所需的时间：3-4天（8000cells/cm²）。
- 3. 细胞表型
CD19、CD34和CD45为阴性表达，CD44、CD73、CD90和CD105为阳性表达。
- 4. 细胞形态
细胞为梭形，呈指纹状或旋涡状生长。
- 5. 产品指标
外观:淡黄色澄清透明液体。 pH值：20-25℃，7.2-8.2。 渗透压：280-320mOsm/Kg。 内毒素 < 0.25EU/mL。
无菌:阴性。 支原体：阴性。

【使用前特别提示】

1. 本产品的使用方法与血清培养基及血清替代物培养基相比，确有差别。

敬请用户仔细查看本产品使用说明书后操作，请勿仅以既往经验使用本产品。

与血清培养基及血清替代物培养基相比，对现有操作的某些细节做了规范性的要求（比如对向培养瓶或培养皿加入培养液的操作手法有明确要求）。

2. 本产品中没有添加胰酶抑制剂，不能用于终止胰酶消化。

血清及血清替代物（血小板裂解物）中含抗凝血酶Ⅲ，可以抑制胰酶的消化作用，这是血清能够终止胰酶消化的原因，也是血清培养基中MSC细胞传代时，消化前必须经过PBS清洗（以去除残留血清）的原因。

使用本产品时，推荐使用干细胞温和消化酶（配套产品，货号：NC1004.1）消化细胞，此方法无须抑制剂终止，培养上清稀释后离心去除即可，且10分钟内对细胞无损伤，收获细胞活率高，传代后扩增倍数维持较高水平。避免了细胞消化后胰酶残留的问题。

【MSC完全培养基准备】

将培养基添加剂室温融化，按1:100比例加入培养基基础中即成为MSC完全培养基，使用前需在室温下预温10-30min，时间不宜过长，切勿强光及紫外照射。

完全培养基2-8℃可避光保存30天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在2周内用完。完全培养基配制完成后，不可多次反复预温（控制在5次以内），可取出适量预温，禁止使用超过30日未使用完的完全培养基。科研小量、多次使用时，建议添加剂融化后立即分装（添加剂出厂后仅允许冻融一次），于-20℃保存，每次配制适量完全培养基，避免培养基的浪费。特别提醒：

如果确实需要分装添加剂，应知晓，会出现分装后的总体积不足5 mL的现象，这是由于在包装瓶壁及瓶盖上以及吸取的枪头有残留导致的，建议最后剩余的一部分添加剂使用原瓶承装，且做好添加剂不足的心理准备。没有特殊情况，强烈不建议分装添加剂。融化培养基添加剂时不可37℃水浴融化，否则会降低添加剂的活性，导致产品性能下降。

【使用环境1：MSC原代细胞分离（人脐带）】

植块法简述（详细操作见此说明书附件）：

1. 用PBS清洗脐带至清洗液无血色，去除脐静脉内膜和动脉。
 2. 用手术剪或手术刀将华通氏胶剪切成小块，接种入培养瓶或培养皿，使组织块均匀分布，不同培养器皿的组织块植入量及培养基添加量见下表将培养皿或培养瓶放置于37℃、5% CO₂、95%湿度的二氧化碳培养箱中。
3. 7天换液。
4. 10天换液。
5. 10-14天，收获MSC细胞。

培养器皿（型号）	近似底面积(cm ²)	第0天加液量(mL)	第2天加液量(mL)	植入组织块（块）
60mm皿	21	2	3	5
100mm皿	55	5	7	12
150mm皿	150	15	15	30
T25	25	2	3	6
T75	75	7	8	15
T175	175	15	20	40
T225	225	20	25	50

【使用环境2：连续培养MSC细胞（以T-75瓶为例）】

1. 培养72h后，在显微镜下观察培养的MSC细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。

特别提示：

细胞融合度请勿超过100%，特别是切勿使局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，会导致细胞严重衰老及分化。再者传代前细胞生长过密（细胞融合度过高），导致细胞消化异常（细胞整片或成片脱落），加之随后的不当操作（用移液器反复吹打成片细胞使其成为单个细胞），此操作所导致的机械损伤会严重损害细胞膜，引发大比例的细胞死亡，特别是这些细胞经冻存后再次使用时。

2. 在超净台中，弃去培养瓶中的培养液，加入10 mL PBS清洗细胞后弃去。

3. 加入2 mL 干细胞温和消化酶**常温下**消化细胞。

4. 在显微镜下观察到细胞全部收缩变圆，且有少量细胞开始流动时（一般2-5分钟），立即加入温和酶使用量2倍体积（4mL）的细胞培养上清或者完全培养基稀释细胞悬液。

特别提示：

使用培养上清液或完全培养基稀释温和消化酶（货号：NC1004.1）对细胞有较好的保护作用，比使用DPBS等缓冲液会多回收10~30%的细胞，而且培养上清液或完全培养基能够更好的保持细胞活性，能一直维持较高的扩增倍数。

5. 用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。

特别提示：

进行该操作时动作一定要温和，因为细胞消化过程中的细胞损伤，更多的是来自于类似吹打与离心的机械损伤。

6. 将细胞悬液转移到15 mL 离心管中，1300 rpm（300g）离心5 min。弃上清，加入2 mL完全培养基重悬细胞，使用台盼蓝染色，或流式细胞仪等方法计数。

7. T75瓶接入15mL完全培养基。按密度8000 cells/cm²接种细胞。

具体做法：

1. 应让培养基沿培养瓶的上表面（细胞生长面的相对面）或侧表面加入，切忌冲到培养瓶底面。

2. 然后将细胞培养瓶轻轻立起来，将细胞悬液直接加到底部，切忌冲到培养瓶底面，再慢慢将培养瓶放平。

特别提示：

a) 请特别注意培养基加入培养瓶的方式。否则容易在培养基冲刷到培养瓶底面位置出现细胞生长空白区域。（详细阐述，详见本说明书的“客户常见问题”）

b) 离心步骤不可去除，干细胞温和消化酶短时间内对细胞无损伤，但切勿超过10分钟。

8. 将培养瓶置于37℃，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。

【使用环境3：复苏培养冻存的MSC细胞（以T-75瓶为例）】

1. 从冰箱中取出完全培养基，在生物安全柜或超净台中吸取适量（如T-75瓶：15mL）完全培养基沿上表面加入细胞培养瓶中，切勿冲到培养瓶底面（细胞生长面），然后慢慢将培养瓶放平，备用，在室温中预温培养基10-30min。

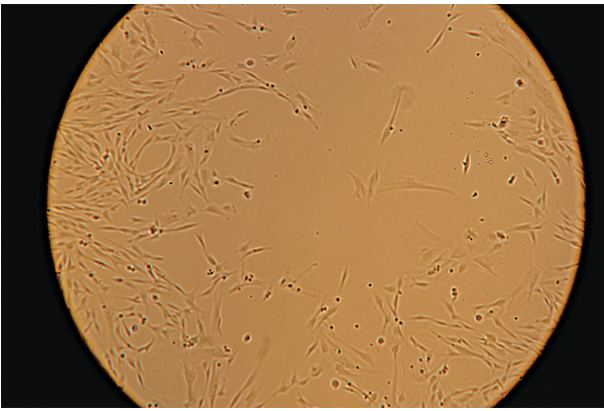
特别提示：

请严格按照此步骤操作，否则可能会出现培养瓶中细胞生长空白区域，即所谓的“生长空洞”。

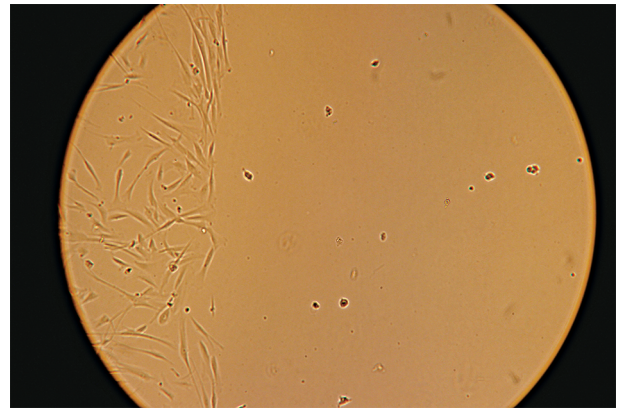
原因在于大多数用户使用的是常规TC处理（Tissue Cultured）的培养瓶或培养皿，培养瓶与其表面亲水基团的结合并不牢固，很容易在液体的冲刷下失去亲水基团，从而导致细胞难以贴壁生长。

现在已有新一代的专门匹配无血清培养基的培养瓶，亲水基团与瓶表面的结合更为牢固。对应的，价格也更高。

用户采用经过我们验证的“避免冲刷”的培养液加入方式，可取得与应用昂贵的新一代培养瓶相同的培养效果。并且无需预先包被培养瓶。



湖泊状的空白区域



河流状的空白区域

2. 从液氮中取出冻存的MSC细胞，迅速将冻存管放入37°C水浴快速融解。

特别提示：

需要快速溶解的原因是一般的冻存液中都有添加DMSO，在常温环境下，DMSO对细胞是有毒害的，此步骤用时越少越好。

3. 在生物安全柜或超净台中，将解冻后的1mL细胞悬液缓慢加入10 mL 冷的完全培养基中。
4. 1000 rpm（180g）离心5 min，弃上清，加入2 mL完全培养基重悬细胞，台盼蓝染色计数，按密度8000 cells/cm²将细胞接种至1)步骤中的培养瓶中，添加时，将培养瓶立起来，直接加到底部，切忌冲到培养瓶底面。
5. 混匀后，将培养瓶置于二氧化碳培养箱中培养，培养条件37°C，5%CO₂。
6. 24 h后，更换新鲜的、室温预温的完全培养基。如果使用的是Yocon无血清细胞冻存液（货号：NC1001.1），则不需换液。

特别提示：

1. 无论冻存前使用的是血清培养基、血清替代物培养基，还是无血清培养基，冻存后的细胞均可直接在无血清培养基中正常培养，但冻存前严重受损的细胞除外。
2. 细胞接种密度，是指活细胞的密度。
3. 建议用户在接种细胞前，进行细胞计数。如果确实不进行细胞计数，又观察到细胞接种后表面漂浮大量的细胞，则24h后更换培养液，培养时间应适当延长，若细胞密度过低（低于5000 cells/cm²），可能会出现细胞长不起来的现象。

【使用环境4：MSC细胞冻存】

- 1) 用干细胞温和消化酶消化待冻存的细胞，离心、重悬后进行细胞计数。
- 2) 1300 rpm (300g) 离心5 min，去除上清。
- 3) 根据细胞计数情况，缓慢加入适量冷的无血清冻存液（无血清冻存液可即拿即用或置于冰袋备用），调整细胞密度在 $1 \times 10^6 - 2.5 \times 10^7$ cells/mL。
- 4) 轻轻地重悬细胞，将重悬均匀的细胞按等份加入到灭菌的冻存管（需提前做好标记）中，旋紧冻存管盖。
- 5) 迅速将冻存管放入程序降温盒中，然后将冻存盒直接放入-80℃冰箱。

注：如果使用Yocon无血清细胞冻存液(货号 NC1001.1)，则不需要程序降温步骤，可直接将细胞放于-80℃冰箱。

也适用于传统冻存程序，即程序性降温，效果可能会稍优于直接将细胞放于-80℃冰箱。

- 6) 12 h后将细胞从-80℃冰箱转移至液氮中长期保存。

【用户经常提问的问题与解决方案】

1. 在培养瓶中可见长河状或湖泊状的细胞生长空白区域，是什么原因？该如何解决？

答：原因是现有TC处理的培养瓶的表面亲水基团结合不牢固。这个问题在某些品牌的培养瓶中较为突出，某些品牌的培养瓶则极少发现。

解决方法：通过改变加入培养液的方式来解决。

2. 我现在有很多冻存的细胞，这些细胞原来在血清中培养。不知是否可以直接转入无血清培养基？

答：可以直接转入无血清培养基培养，不过要使用原培养基终止消化。

但用户应该注意到一个问题，由于血清培养基MSC贴壁较紧，胰酶消化时间较长，很多用户存在细胞受损严重的问题，因此，在接种前请先进行细胞计数。按活细胞数量接种。

3. 我现在使用血清培养MSC细胞，现在换用无血清培养基，接种密度是否会有不同？

答：无血清培养基的接种密度P5前为8000 cells/cm²，P5后为10000 cells/cm²。

4. 为什么你们的培养基加入了添加剂后，只允许用30天？

答：培养基添加剂中主要组分为重组蛋白，仅在-20℃可长期稳定保存。因此，添加至培养基基础液后，建议在2周内用完。一直处于4℃保存环境下，超出2周培养基仍可使用，但性能会有下降。超出4周，禁止使用。

但反复预温（室温或37℃）的完全培养基性能会急剧下降。

5. 无血清培养基是否可以从冻存的脐带组织分离原代细胞？

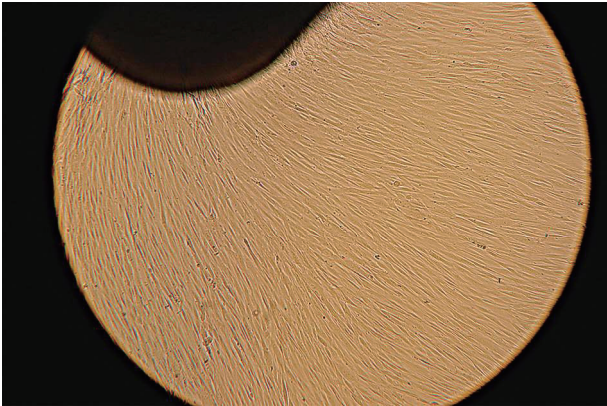
答：可以。

但培养的周期较新鲜的脐带组织长7天左右。一般需要21天。

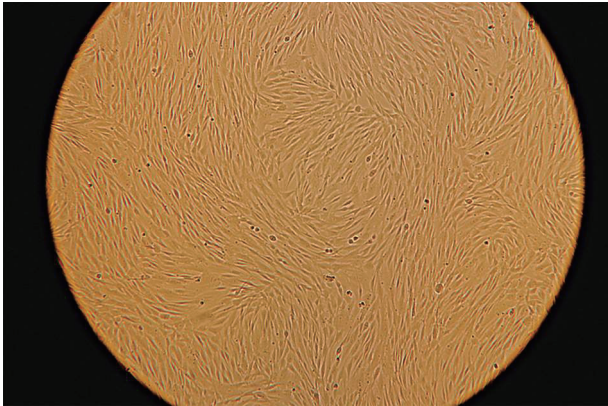
并且要求在14天时，更换新鲜培养液，否则会引起细胞贴壁效果不佳，生长效果不佳的现象。

原因在于培养基中的许多组分，均为热不稳定组分，长时间置于高温环境下（37℃），将导致蛋白活性降低。

【本无血清培养基生长的MSC细胞形态】

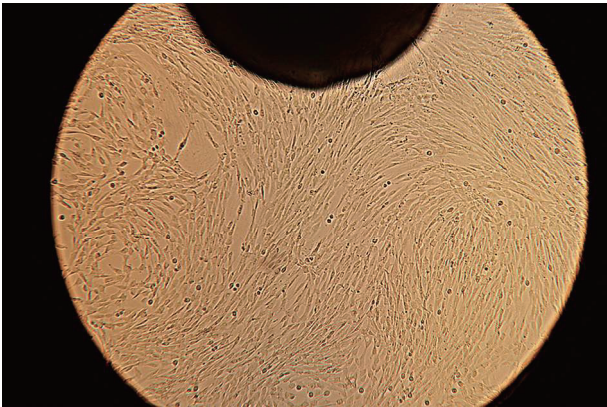


无血清原代细胞

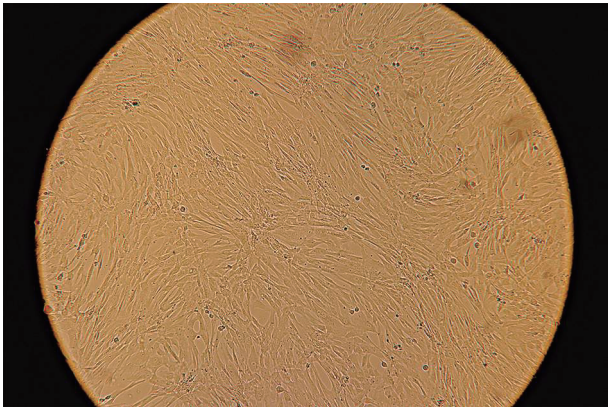


无血清3代细胞

【血清培养环境下的MSC细胞形态】



血清原代细胞



血清3代细胞

【从冻存P2细胞复苏开始连续传代数据】

使用T25瓶复苏冻存的P2细胞（质控标准细胞株），接种密度为8000或10000 cells/cm²，连续使用T25瓶培养细胞，使用流式细胞仪计数。数据记录如下

代次	培养器皿	接种密度（cells/cm ² ）	培养基体积（mL）	收获细胞数	扩增倍数	生长时间（小时）
P3	T25	8000	5	1.83E+06	9.15	72
P4				1.93E+06	9.65	72
P5				1.91E+06	9.55	72
P6		10000		1.40E+06	5.60	72
P7				1.30E+06	5.20	72
P8				1.11E+06	4.44	72
P9				1.33E+06	5.32	96
P10				7.04E+05	2.82	72

【从原代细胞开始连续传代数据】

代次	来源	培养皿	分组	细胞数	生长天数（天）
P0	19.5.9号脐带 （12 cm）	150皿	1	1.02E+07	14
			2	7.46E+06	
			3	5.35E+06	
			4	7.71E+06	
			5	7.58E+06	
			6	6.35E+06	
总计			6	4.47E+07	14

代次	培养器皿	接种密度（cells/cm ² ）	培养基体积（mL）	接种细胞数	收获细胞数	扩增倍数	生长时间
P0	150mm皿	2cm脐带/皿	30	/	3.00E+06	/	12-14天
P1	T25	8000	5	2.00E+05	3.72E+06	18.60	72小时
	150mm皿		30	1.20E+06	2.09E+07	17.45	72小时
P2	T25		5	2.00E+05	3.25E+06	16.25	72小时
	150mm皿		30	1.20E+06	1.78E+07	14.81	72小时
P3	T25		5	2.00E+05	3.18E+06	15.91	72小时
	150mm皿		30	1.20E+06	1.84E+07	15.31	72小时
P4	T25		5	2.00E+05	2.42E+06	12.12	72小时
	150mm皿		30	1.20E+06	1.38E+07	11.48	72小时
P5	T25		5	2.00E+05	1.94E+06	9.70	72小时
	150mm皿		30	1.20E+06	1.05E+07	8.71	72小时
P6	T25	10000	5	2.50E+05	2.47E+06	9.86	72小时
	150mm皿		30	1.50E+06	9.35E+06	6.23	72小时
P7	T25		5	2.50E+05	2.42E+06	9.68	72小时
	150mm皿		30	1.50E+06	8.84E+06	5.89	72小时
P8	T25		5	2.50E+05	1.56E+06	6.23	72小时
	150mm皿		30	1.50E+06	6.99E+06	4.66	72小时
P9	T25		5	2.50E+05	1.47E+06	5.86	72小时
	150mm皿		30	1.50E+06	8.29E+06	5.53	72小时
P10	T25		5	2.50E+05	1.06E+06	4.25	72小时
	150mm皿		30	1.50E+06	5.36E+06	3.57	72小时

说明：

- 1、连续传代数据均是源于流式细胞仪计数，接种密度为8000或10000 cells/cm²，表中数据均为多次培养的平均值，单次培养的性能可能会优于此表。
- 2、细胞收获时的细胞融合度不宜超过100%，当细胞融合度过高，特别是局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，这样会导致细胞严重衰老及分化，同时容易出现细胞接触抑制，影响后续传代效果。
- 3、细胞消化时，一定要按照说明书的消化方式进行，强烈建议采用干细胞温和消化酶，这样能够很好的避免因消化过度而影响细胞后续传代。
- 4、培养基生产家在长期使用无血清培养时，明确哪些品牌的细胞培养瓶可以使用，哪些品牌的细胞培养瓶不宜使用，所以关于细胞培养瓶的使用，详细情况可跟培养基生产厂家咨询，厂家会给出最好的建议。



生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

文件版本号：

2021 -V1.0



友康生物微信公众号