

干细胞扩增试剂盒 (91-02-0187-H)

【产品介绍】

间充质干细胞无血清培养基

可用于多种来源的间充质干细胞的原代细胞分离及传代培养，如脐带（hUCMSCs）、脂肪（hADSCs）、骨髓（hBMSCs）等，并保持细胞多向分化的潜能；

无血清，无任何动物源组分，不含抗生素，性能稳定，批间差异小；

高细胞扩增率，连续培养到 P3 获得的细胞量是市场同类型产品的 5 倍以上；

自主化研发与生产体系，供货稳定，性价比高。

产品名称	产品规格	用途简介	保存期限
间充质干细胞无血清培养基（无酚红）	500mL/瓶	将 25mL 的间充质干细胞无血清培养基添加物（无酚红）解冻后加入 500mL 的间充质干细胞无血清培养基（无酚红）中，配制成完全培养基，可用于间充质干细胞的原代细胞分离以及持续传代培养	2-8℃避光，12 个月
间充质干细胞无血清培养基添加物（无酚红）	25mL/瓶		-20℃避光，12 个月

【使用方法】

添加物建议在 37℃环境下解冻，加入基础培养基中充分混合均匀，即为完全培养基。完全培养基建议现用现配，2 周内用完（每次取用尽量减少暴露空气中的时间，取用后及时封口，避免 pH 快速升高）。如培养体系小，可根据实际用量将添加物分装冻存，按比例配制使用，避免反复冻融。完全培养基使用前需

在室温下预温 10-30 min，时间不宜过长，避免强光及紫外照射。

【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、重组人转铁蛋白、重组人胰岛素、微量元素等。

【产品指标】

外观（完全培养基）：淡黄色液体，pH 值：7.2-7.4，渗透压：290-330mOsm/Kg，内毒素＜0.5EU/mL

【细胞表型】

CD73、CD90、CD105、HLA-ABC 阳性；CD14、CD19、CD34、CD45、HLA-DRDPDQ 阴性。

【建议细胞接种密度】

P1-P7:6000-7000 个/cm²；P8-P10:7000-8000 个/cm²；P11-P13:8000-9000 个/cm²；P14 以上：9000-10000 个/cm²。

【细胞传代时间】

一般为 3 天（72h）左右。不同 hMSC 生长速度有差异，推荐以细胞汇合度选择准确传代时机，细胞汇合度 80-90%左右传代，细胞汇合度过高（>95%）会影响后续细胞生长。

【细胞形态】

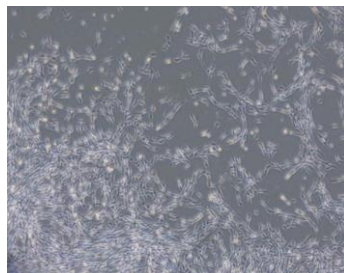
细胞梭形，呈旋涡状生长

脐带间充质干细胞原代培养(以组织块贴壁法为例)

D7



D10



D12



- 1.将脐带放入无菌培养皿中，用生理盐水洗涤 2~3 次。用 75%无菌乙醇浸泡 10~20 秒，立即转移至含有生理盐水的培养皿中洗涤两遍。将脐带剪成约 2cm~3cm 数段，加入生理盐水洗涤血渍。
- 2.按血管螺旋走式剔除脐带的两条动脉，一条静脉。用组织镊分离位于羊膜与血管之间的华通氏胶，转移至 50mL 离心管中，加入 1mL 配制好的完全培养基，用无菌手术剪将胶体剪成 3mm³ 左右的组织块。向离心管中加入完全培养基，选择离心程序 2000rpm，5min 进行离心。
- 3.每个 T75 培养瓶中接种约 0.5g 组织块，使其均匀分布于培养瓶底部。37°C 细胞培养箱培养 1-2h 后轻轻加入 6-8mL 细胞培养基，注意不要使组织块漂浮。
- 4.D2-D3 补充培养基 5mL；D7-D10 天换液，弃去上清，加入新培养基 10-15mL；D12-D14 天观察细胞扩增情况，进行消化传代。
- 5.细胞最早爬出时间 5-7 天，镜下可以观察到少量零散细胞。
- 6.使用间充质干细胞无血清培养基时组织块贴壁效率高，贴壁的组织块多，收获的细胞数也更多。

传代培养（以 T75 瓶为例）

- 1.细胞培养约 72h，取出细胞观察。细胞汇合度 80-90%，可进行传代操作。
- 2.消化：弃去培养上清，每个 T75 培养瓶经生理盐水洗涤，加入胰酶工作液 2mL 消化 2~5min，显微镜下观察细胞大部分脱落，加入 4mL 完全培养基终止消化。将细胞悬液 1000rpm，10min 离心，弃去上清。
- 3.用完全培养基重悬，细胞计数仪计数。根据计数结果补加完全培养基调整细胞密度，按照 6000~7000 个/cm² 的密度接种细胞，混匀后放置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养，培养温度 37°C±0.5°C，二氧化碳体积分数为：5%±0.2%。

特别提示：

【细胞传代时间】

一般为 3 天（72h）左右。不同 hMSC 生长速度有差异，推荐以细胞汇合度选择准确传代时机，细胞汇合度 80-90%左右传代，细胞汇合度过高(>95%) 会影响后续细胞生长，并可能导致细胞的老化和分化。

培养基无需包被，用量 0.2mL/cm²，连续培养 3 天无需换液。其他培养体系转换到时，初始细胞扩增倍数可能较低。可使用原培养基和 1:1 混合后复苏接种，培养 1 代后再完全转换到体系。

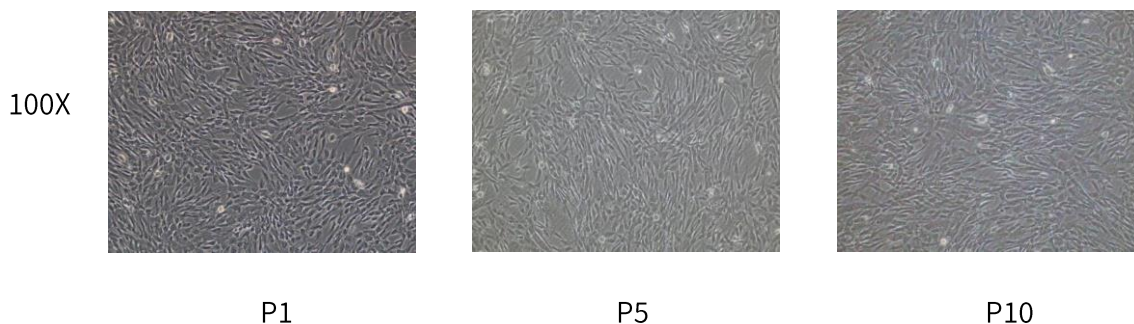
【细胞消化】

建议选用比较温和的胰酶，例如 GibcoTrypLE™Express 酶（重组，1×）。用 PBS1:1 稀释，配制成胰酶工作液后使用。消化时间约 3 分钟，一般不超过 5 分钟。消化 1-2 分钟后，可轻轻拍打培养容器，观察到大多数细胞脱落时即可用胰酶工作液 2 倍以上体积的完全培养基终止消化。消化后的细胞严禁多次吹打，以免对细胞造成机械损伤。

【接种培养】

细胞接种时，应让培养基沿培养瓶的上表面或侧表面加入，切忌冲到培养瓶底面，否则可能导致细胞贴壁不均匀。接种后注意将细胞混匀，放入培养箱后注意放平，防止细胞生长不均匀，局部过密或过少，影响细胞的状态。

传代细胞图示



与市场同类型产品相比，具有更高的扩增效率和更高的传代次数

传代分析

代次	接种密度 (个/cm ²)	时间	收获细胞数 (个)	扩增倍数	总收获细胞数 (个)
P0	——	10-14 天	1.00E+06	——	2.00E+07
P1	7000	72h	2.06E+07	16.80	3.36E+08
P2	7000		2.07E+07	16.90	5.68E+09
P3	7000		2.11E+07	17.25	9.80E+10
P4	7000		2.23E+07	18.20	1.78E+12
P5	7000		2.22E+07	18.15	3.24E+13
P6	7000		1.68E+07	13.74	4.45E+14
P7	7000		1.52E+07	12.40	5.51E+15
P8	8000		1.53E+07	10.96	6.04E+16
P9	8000		1.51E+07	10.80	6.53E+17
P10	8000		1.45E+07	10.36	6.76E+18

相同的接种密度和培养时间条件下，XinBio 体系 P1-P5 平均倍增次数为 17.46 倍；以一份 20cm 长的脐带为例，可分离约 10g 华通氏胶组织，P0 代可获得 2.0×10^7 细胞，P3 代理论可获得 9.8×10^{10} 的细胞；按照常规使用剂量单份 5×10^7 制备成产品，可制成 1960 份。

冻存

【细胞冻存】

- 1.用胰酶工作液消化待冻存的细胞，用完全培养基终止消化。
- 2.1000rpm 离心 10min，去除上清。用培养基重悬计数。
- 3.根据细胞计数情况，用完全培养基稀释细胞至一定密度（冻存密度的 2 倍），再缓慢加入等体积的提前预冷的无血清冻存液。

4.轻轻混匀，将细胞分装至冻存管或冻存袋中，用程序降温盒或程序降温仪进行冻存。

特别提示：

建议 DMSO 终浓度 10%。可以在细胞消化前先配制 DMSO：完全培养基=1:9（体积比）的冻存液，2-8℃预冷保存。待冻存细胞用完全培养基混匀后，缓缓加入等体积的冻存液，混匀后分装。

建议间充质干细胞的冻存密度为 1×10^6 - 2×10^7 cells/mL。

常温下 DMSO 对细胞有毒性，因此冻存液配制好后应预冷后使用。细胞分装时间不宜过长，如不能及时冻存，可先 2-8℃暂存。

复苏

【细胞复苏】

1.向离心管中加入配制好的 2-8℃预冷的完全培养基备用。从液氮罐中取出冻存管，立即投入 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 温水中轻轻晃动融解，直至留有一小块冰晶。

2.将细胞转移至含有预冷的完全培养基的离心管中， 4°C , 1000rpm 离心 10min，弃去上清。

3.用完全培养基重悬细胞，混匀计数。根据计数结果，按照 $6000 \sim 7000$ cells/cm² 的密度接种细胞，混匀后放置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养，培养温度 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，二氧化碳体积分数为： $5\% \pm 0.2\%$ 。

特别提示：

常温下 DMSO 对细胞有毒性，因此细胞不必完全融解，等细胞大部分融解，留有一小块冰晶时就可以进行下一步操作；离心在 4°C 进行，培养基提前预冷，可以提高细胞活率。

通常情况下细胞复苏后第二天无需换液。若细胞活率很低，第二天可见大量细胞漂浮的情况下可以更换新鲜的室温下预温的完全培养基。