

# ExCell Bio

## MSC 无血清培养基 MH02 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

### User Manual

Catalog Number    MH000-N022  
                              MH000-N021  
                              MH000-N021S



## 产品概述

MSC 无血清培养基 MH02 (MSC Serum-free Medium MH02), 是一种为人间充质干细胞在无血清、无异源成分、无酚红条件下进行细胞原代分离、传代扩增而设计的培养基, 需要添加血清替代物混合成完全培养基后使用。本产品可支持植块法、消化法等多种方法的 MSC 原代分离, 并可以维持 MSC 长时间及多次传代培养, 同时能够较好地保持其表面标志物稳定。

## 产品规格及储存条件

产品名称	货号	规格	存储条件	有效期
<b>MSC无血清培养基MH02</b>	MH000-N022	1000 mL kit	—	—
含: MSC无血清基础培养基MH01	BA0302	1000 mL kit	2- 8 °C 遮光	12个月
MSC无血清培养基添加组分MH02	BA0322	1 mL	-20 °C 遮光	12个月
<b>MSC无血清培养基MH02</b>	MH000-N021	500 mL kit	—	—
含: MSC无血清基础培养基MH01	BA0301	500 mL	2- 8 °C 遮光	12个月
MSC无血清培养基添加组分MH02	BA0321	0.5 mL	-20 °C 遮光	12个月
<b>MSC无血清培养基MH02 (试用装)</b>	MH000-N021S	100 mL kit	—	—
含: MSC无血清培养基MH01 (试用装)	BA0301S	100 mL kit	2- 8 °C 遮光	12个月
MSC无血清培养基添加组分MH02 (试用装)	BA0321S	0.1 mL	-20 °C 遮光	12个月
<b>关联产品: 重组胰酶消化液RF01</b>	RF000-N031	200 mL	2- 8 °C 遮光	18个月

## 产品应用与使用限制

1. 本品仅供科学研究及商业化生产, 不适用于临床诊断和治疗。
2. 为了达到理想的细胞培养效果, 本品可以添加血替后直接使用, 也可以根据细胞类型或研究需求, 额外添加需要的细胞生长因子或激素等。

3. 实验结果可能因人间充质干细胞/前体细胞供体细胞系的不同而可能会出现一定的差异。
4. 本产品不含有酚红成分，不含有血清及异源体成分，不含有抗生素，如有需要可额外添加。
5. 产品需要在有效期内使用。

## I 产品存储与运输

### MSC 无血清基础培养基 MH02:

1. 产品存储过程中需要遮光，避免日光灯或其他灯光照射，在冰箱或仓库储存需要使用有色包装袋。
2. 在产品有效期内可以保持产品性能稳定。
3. 运输说明：产品运输过程中需要遮光运输，避免日光灯或其他灯光照射对产品的外观产生影响导致外观变色。
4. 产品在使用过程中，需要进行转运至洁净区内时，转移过程需要进行清洁灭菌，灭菌方式只能采用消毒剂擦拭灭菌，不能使用紫外辐照灭菌。

注意：在经过带有紫外辐照灭菌的传递窗时，需要主动关闭传递窗内的紫外灯。

### MSC 无血清培养基添加组分 MH02:

1. 需存储于-20 °C环境，产品存储过程中需要遮光，避免日光灯或其他灯光照射，在冰箱或仓库储存需要使用有色包装袋，在产品有效期内可以保持产品性能稳定。
2. 运输说明：干冰运输，用户收货时需检查包装盒内是否有干冰，如收货状态异常，请尽快联系销售方。
3. 使用前，添加组分室温解冻、混匀后进行使用或分装，反复冻融不超过 3 次，分装后的试剂可在-20 °C保存 3 个月，或暂存于 2-8 °C环境，并在 2 周内用完。

## | 实验材料和试剂

### 实验设备及材料 (自备)

人间充质干细胞、人血小板裂解物、重组胰酶消化液 RF01 (ExCell Bio, RF000-N031) ;

DPBS 溶液、细胞/组织培养瓶、离心管、移液管、移液枪和枪头;

二氧化碳细胞培养箱、离心机、细胞计数仪、倒置显微镜、水浴锅等。

### 培养基的配制

1. 将 0.5 mL MSC 无血清培养基添加组分 MH02 室温放置 5-10 min 直至完全溶解, 添加入 500 mL MSC 无血清基础培养基 MH01 内, 再加入 10 mL 人血小板裂解物, 混合均匀后室温静置 5 min 即为 MSC 无血清扩增完全培养基。

**注意:** 如果使用本培养基进行间充质干细胞原代提取, 建议人血小板裂解物的添加量从 2%调整至 5%, 以 500 mL MSC 无血清扩增完全培养基配制为例, 将 0.5 mL MSC 无血清培养基添加组分 MH02, 添加入 500 mL MSC 无血清基础培养基 MH01 内, 再加入 25 mL 人血小板裂解物, 混合均匀后使用。

2. MSC 扩增完全培养基配制后, 可存储于 2-8°C 环境, 避免阳光直射、灯光照射与紫外照射, 在冰箱储存建议使用有色包装袋, 避免其他灯光照射, 并在 2 周内使用完毕。

## | 操作方法

### 间充质干细胞培养

1. 取出适量的 MSC 无血清扩增完全培养基, 在室温下放置 30-60 min 使其恢复至室温, 每个 T-175 培养瓶需要 35-53 mL 的培养基;
2. 复苏或传代收集脐带间充质干细胞, 根据细胞数量用 MSC 无血清扩增完全培养基重悬细胞至  $1-5 \times 10^6$  cells/mL, 按工艺需求评估接种密度, 接种培养。

**注意：**如果使用不同尺寸的组织培养器，推荐接种密度为低密度 3000-5000 cells/cm<sup>2</sup>，72-96 h 传代；或高密度 8000-10000 cells/cm<sup>2</sup>，48-72 h 传代；培养基用量 0.2-0.3 mL/cm<sup>2</sup>，即 35-53 mL 每 T-175 培养瓶。

3. 将细胞放在 37 °C，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度的环境中培养。
4. 细胞扩增至铺满瓶底 80-90%时，进行传代培养，不要让细胞扩增超过 90%或完全铺满瓶底。

### 间充质干细胞传代培养

根据预估的细胞量，取出适量的 MSC 无血清扩增完全培养基，在室温下放置 30-60 min 使其恢复至室温，每个 T-175 培养瓶预计需要 45-63 mL 的 MSC 扩增完全培养基，20 mL PBS 缓冲液，10 mL 消化液。

1. 清洗：吸去培养瓶中的培养基，每个 T-175 培养瓶用 10 mL 的 PBS 润洗细胞一次；
2. 消化：加入 6-10 mL 消化液，摇动皿底，使消化液浸润整个细胞生长表面后，37 °C 消化 3-5 min，摇动拍打瓶壁，在显微镜下观察，约 80%以上细胞脱落时，加入等体积 MSC 无血清扩增完全培养基或 PBS 溶液稀释消化液，吹打使细胞分散成单细胞，进行细胞计数；

**注意 1：**如使用培养瓶，消化后轻拍瓶壁，细胞脱落，如消化不彻底，继续消化 1-2 min。

**注意 2：**如细胞生长过密，消化时细胞可能成片脱落。如遇此情况，需增加吹打次数使细胞分散成单细胞，或离心后以更小体积重悬从而确保细胞沉淀分散成单细胞。

3. 收集：300g，5 min 离心收集细胞沉淀；
4. 清洗：加入 10 mL PBS 溶液吹打重悬细胞，300g，5 min 离心，弃上清，收集细胞沉淀；

**注意 1：**植块法分离的原代间充质干细胞，首次传代时（P0 到 P1），无血清培养基体系下细胞贴壁易受消化液影响，消化后需要用 PBS 清洗细胞。

**注意 2：**请勿将细胞长时间静置于操作管内，操作时间过长（培养基内放置 15 min 以上），部分细胞会粘附于操作管壁上，造成丢失。

5. 接种：用完全培养基重悬细胞，按照  $1.40\text{--}1.75 \times 10^6$  cells/瓶 T-175 的细胞量（或按 1:7 的比例传代），将细胞悬液接种于多个 T-175 培养瓶中，补加完全培养基至每瓶 35-53 mL；

**注意：**若接种密度过高或培养时间过长，可能出现细胞生长过密引起细胞结团的现象。

6. 培养：将细胞放在 37 °C，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度的环境中培养；

7. 冻存：步骤 4 结束后，加入细胞冻存液轻柔吹打重悬细胞，（注意：冻存液即用即拿，及时放回冷藏冰箱），转移至细胞冻存管中做好标记，冻存管置于程序降温盒（ExCell，CS041-0001）中置于 -80°C 过夜，24 h 后转至液氮中进行长期保存。