



# hyperSteMed™ novaStem-MSC 间充质干细胞无血清培养基使用说明书



使用前请仔细阅读说明书

# 产品介绍

## hyperSteMed™ novastem-MSC Serum-Free Medium For Mesenchymal Stem Cell

### 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，单个代次扩增倍数可达20倍以上；
- ✓ GMP level，注射用水配制，内毒素<0.1EU/ml；
- ✓ 自主化研发与生产体系，供货稳定，性价比高。



### 【规格与保存】

产品名称	产品规格	产品货号	用途简介	保存期限
间充质干细胞无血清培养基（含酚红）	500ml/瓶	HC-UC02R		2-8°C避光，12个月
间充质干细胞无血清培养基（无酚红）	500ml/瓶	HC-UC02F	将25ml的HC-UC02S解冻后加入500ml的HC-UC02R	2-8°C避光，12个月
间充质干细胞无血清培养基添加物（含酚红）	25ml/瓶	HC-UC02S	或HC-UC02F中，配制完全培养基，可用于间充质	-20°C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	HC-UC02S	干细胞的原代细胞分离以及持续传代培养	-20°C避光，12个月

### 【使用方法】

添加物建议在37°C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10-30min，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：290-330 mOsm/Kg，内毒素 $<0.1$ EU/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/cm<sup>2</sup>； P8-P10: 7000-8000个/cm<sup>2</sup>； P11-P13: 8000-9000个/cm<sup>2</sup>； P14以上：9000-10000个/cm<sup>2</sup>。

### 【细胞传代时间】

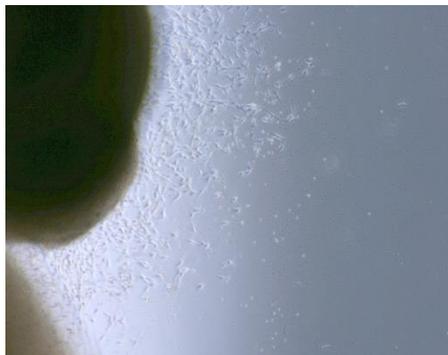
一般为3天（72h）左右。不同hMSC生长速度有差异，推荐以细胞汇合度选择准确传代时机，细胞汇合度80-90%左右传代，细胞汇合度过高（ $>95\%$ ）会影响后续细胞生长。

### 【细胞形态】

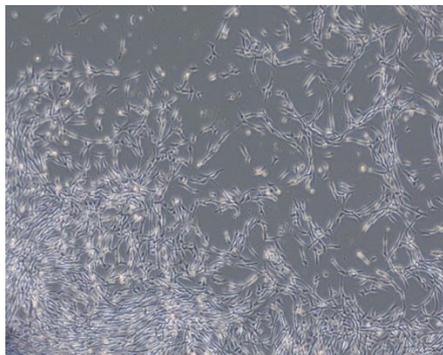
细胞梭形，呈旋涡状生长

## 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3mm<sup>3</sup>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 hyperSteMed™ novastem-MSc 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3~5min，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/cm<sup>2</sup>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。
- ✓ hyperSteMed™培养基无需包被，用量0.2mL/cm<sup>2</sup>，连续培养3天无需换液。其他培养体系转换到hyperSteMed™时，初始细胞扩增倍数可能较低。可使用原培养基和hyperSteMed™ 1:1混合后复苏接种，培养1代后再完全转换到hyperSteMed™体系。

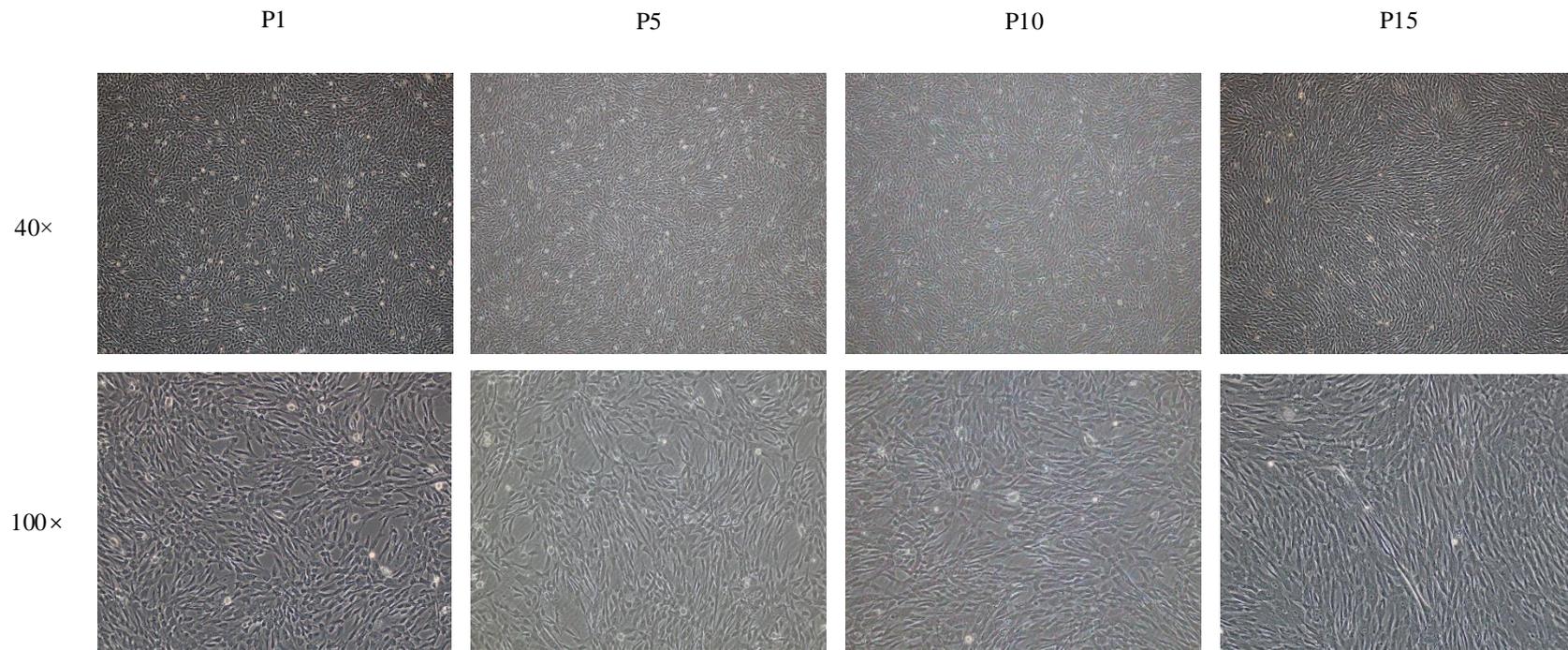
#### 【细胞消化】

建议选用比较温和的胰酶，例如Gibco TrypLE™ Express 酶（重组，1×），用PBS 1:1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3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 <sup>2</sup>	时间	培养容器	收获细胞数 (个/瓶)	扩增倍数	总细胞数	总扩增倍数
P0	-	10-14天	T75	1.00E+06	-	2.00E+07	-
P1	7000	72h	T175	2.28E+07	18.6	3.72E+08	18.6
P2	7000	72h	T175	2.50E+07	20.4	7.59E+09	379.44
P3	7000	72h	T175	2.76E+07	22.5	1.71E+11	8537.4
P4	7000	72h	T175	2.79E+07	22.8	3.89E+12	194652.72
P5	7000	72h	T175	2.36E+07	19.3	7.51E+13	3756797.5
P6	7000	72h	T175	2.22E+07	18.1	1.36E+15	67998034.7
P7	7000	72h	T175	2.00E+07	16.3	2.22E+16	1108367965
P8	8000	72h	T175	2.10E+07	15.0	3.33E+17	1.6626E+10
P9	8000	72h	T175	1.93E+07	13.8	4.59E+18	2.2943E+11
P10	8000	72h	T175	1.74E+07	12.4	5.69E+19	2.845E+12
P11	9000	72h	T175	1.61E+07	10.2	5.80E+20	2.9019E+13
P12	9000	72h	T175	1.54E+07	9.8	5.69E+21	2.8438E+14
P13	9000	72h	T175	1.28E+07	8.1	4.61E+22	2.3035E+15
P14	10000	72h	T175	1.14E+07	6.5	2.99E+23	1.4973E+16
P15	10000	72h	T175	1.02E+07	5.8	1.74E+24	8.6842E+16

**novastem-MS**C体系P1-P5平均扩增倍数为20.7倍；

以10份脐带平均统计，如分离约10g华通氏胶组织，P0代可获得2.00E+07细胞，P3代理论可获得1.71E+11的细胞；

按照常规使用剂量单份5E+7制备成产品，可制成3420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5%。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 $1 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  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°C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°C±0.5°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7000~8000cells/cm<sup>2</sup>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:**

- ✓ 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。