



HUACHEN
华辰生物

StarMedium®-MSC

间充质干细胞化学成分限定培养基

StarMedium®-MSC Chemically Defined Medium For Mesenchymal Stem Cell

使用说明书



3mL
添加物

产品货号

HC-CD03F/HC-CD03R/HC-CD03S

产品介绍

StarMedium®-MSC Chemically Defined Medium For Mesenchymal Stem Cell
间充质干细胞化学成分限定培养基

- 无血清，不含血小板裂解物；

无动物源组分，不含抗生素；

无人源成分，含重组人血白蛋白；

化学成分明确，批间高度一致；
- 高效性，支持MSCs原代和传代培养；

GMP 规范生产，支持药物申报；

更高质量，低内毒素< 0.1EU/ml；

更高的外泌体纯度和产量



规格与保存

产品名称	产品规格	产品货号	保存期限	使用方法
StarMedium 间充质干细胞化学成分限定培养基 (含酚红)	500ml/瓶	HC-CD03R	2-8℃避光 12个月	将 3mL 的 HC-CD03S 解冻后加入 500ml 的 HC-CD03R 或 HC-CD03F 中，再添加 L - 谷氨酰胺 2 mmol/L 配制完全培养基，可用于间充质干细胞的原代细胞分离以及持续传代培养
StarMedium 间充质干细胞化学成分限定培养基 (无酚红)	500ml/瓶	HC-CD03F	2-8℃避光 12个月	
StarMedium培养基添加物	3ml/瓶	HC-CD03S	-20℃避光 12个月	

使用方法

添加物建议在37℃环境解冻，留个小冰晶，加入基础培养基中充分混合均匀，再添加 L - 谷氨酰胺 2 mmol/L，即为完全培养基。完全培养基建议现用现配，1周内用完。如培养时间长，可将添加物分装冻存，按比例现用现配使用，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。

本产品为化学成分限定纯因子培养基，基础配方不含 L - 谷氨酰胺；使用前需额外添加 L - 谷氨酰胺 2 mmol/L后方可用于细胞培养及外泌体富集收获。

主要组成成份

氨基酸、维生素、无机盐、重组人血白蛋白、重组人胰岛素、重组人转铁蛋白等。

产品指标

外观：澄清液体，pH值：7.2-7.4，渗透压：290-350 mOsm/Kg，内毒素< 0.1EU/ml。

建议细胞接种密度

P1-P7: 10000-11000个/cm² | P8-P12: 11000-12000个/cm² | P13以上: 12000-13000个/cm²

细胞传代时间

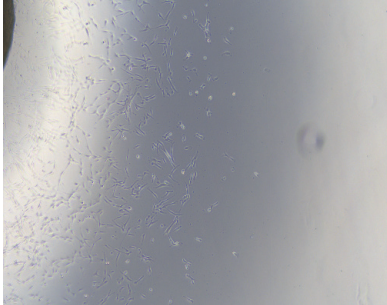
一般为3天（72h±2）左右。不同hMSC生长速度有差异，推荐以细胞汇合度选择准确传代时机，细胞汇合度80-90%左右传代，细胞汇合度过高（> 95%）会影响后续细胞生长。

细胞形态

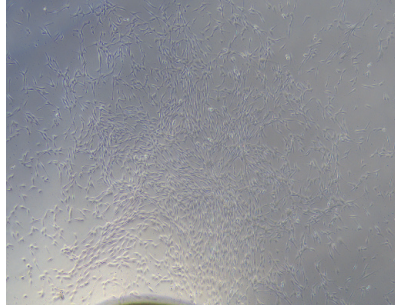
细胞梭形，呈旋涡状生长

▶ 脐带间充质干细胞原代分离培养操作流程 (以组织块贴壁法为例)

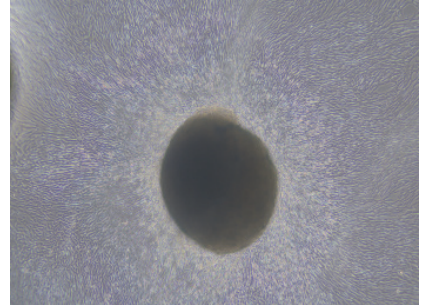
DAY-8



DAY-12



DAY-14



- 01 将脐带放入无菌培养皿中，用DPBS洗涤2~3次。用75%无菌乙醇浸泡10~20秒（也可用含有双抗的DPBS清洗数次，无需乙醇浸泡），立即转移至含有DPBS的培养皿中洗涤两遍。将脐带剪成约2cm~3cm数段，加入DPBS洗涤血渍。
- 02 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，2000rpm，5min进行离心。
- 03 吸去上清，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。将瓶子倒置，使有组织块的一面朝上，向瓶中另一面加入加入6ml完全培养基。盖上瓶盖，保持倒置状态放入37℃，含5%二氧化碳的细胞培养箱培养1-2h。轻轻翻转瓶身，使组织块的一面朝下，并使培养基覆盖所有的组织块，注意不要使组织块漂浮，放入培养箱中继续培养。

▶ 原代促贴壁因子使用方法：

常温解冻后，根据原代接种需要的培养基体积，按照千分之四的比例加入到已配好的完全培养基中（完全培养基配制：500ml基础培养基+3ml添加物+L-谷氨酰胺2mmol/L）。原代促贴壁因子可以反复冻融三次使用。原代促贴壁因子在原代分离培养和换液过程中添加，原代细胞传代后不再添加。

▶ 原代细胞换液

原代细胞换液

- 01 原代细胞培养D2-D3补液4-5ml（原代分离为D0天），以后每隔3-4天全量换液一次，吸去上清，加入新的完全培养基10ml；观察细胞生长情况，注意动作要轻柔避免组织块漂浮。
- 02 一般培养至D16-D18，大多数组织块都长出大片的细胞集落即可进行消化传代。
- 03 注意配好的完全培养基（加入L-谷氨酰胺以后）建议一周内用完，最多不超过2周。及时更换新鲜配制的培养基可以提高细胞的数量和状态。原代细胞培养建议将3ml 添加物进行分装，600μl/支，分装后冻存在-20℃，每次按比例现用现配。

▶ 传代培养（以T75瓶为例）

- 01 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。
- 02 轻轻拍打培养瓶，将大部分组织块拍下，弃去培养上清和组织块（注意拍打力度要轻柔，防止大片细胞脱落，少量贴壁组织块不影响消化），每个T75培养瓶经不含钙镁的DPBS洗涤后吸去洗液，加入胰酶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。

- 03 用移液管轻轻吹打数次，将细胞吹散后用70μm细胞筛网过滤。将细胞悬液300g，10min离心，弃去上清。用完全培养基重悬细胞，300g，10min第二次离心，弃去上清。（原代细胞比较脆弱，需要第二次离心以彻底去除胰酶的影响，后续的传代可以省略第二次离心步骤）
- 04 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10000~11000个/cm²的密度接种细胞（P0可提高至12000~13000个/cm²），混匀后放置于二氧化碳培养箱培养。



特别提示

细胞传代时间

- 一般为3天（72h±2）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，并可能导致细胞老化。
- 用纯因子培养基培养的原代细胞，爬出的时间较晚，建议延后传代的时间，以原代细胞达较高汇合度为指标，否则会出现原代细胞收获数量不足或传代后，P1细胞因贴壁异常而大量死亡的现象。这是因为低密度时原代细胞分泌的胶原、纤连蛋白等ECM蛋白尚未积累，不足以提供必要的贴壁和存活信号。
- StarMedium CD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StarMedium时，初始细胞扩增倍数可能较低，传代后继续培养，细胞的扩增倍数可大幅提高。

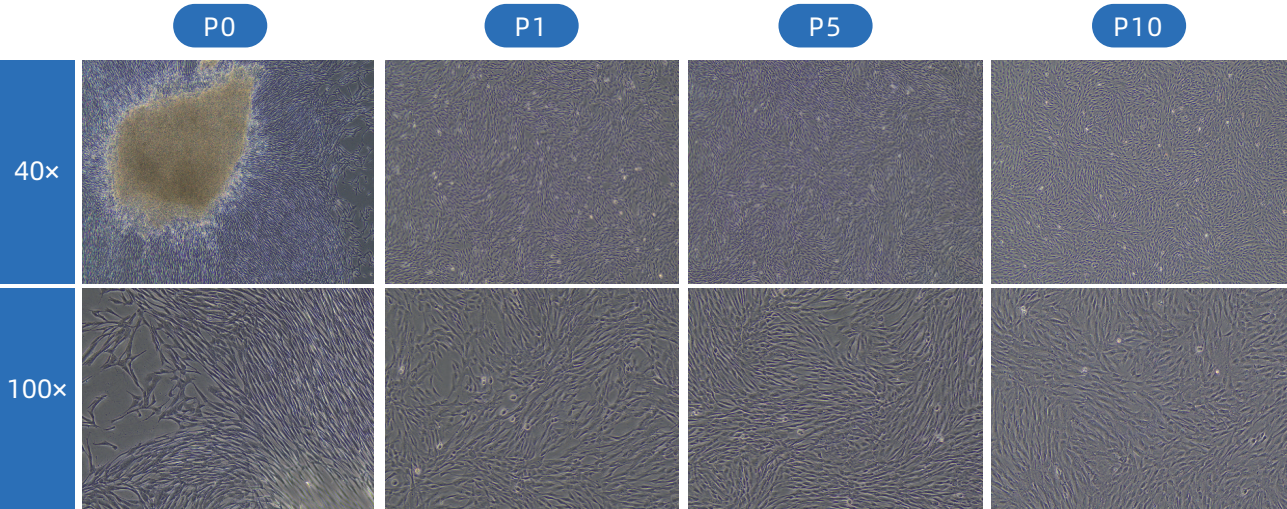
细胞消化

- 建议选用比较温和的胰酶，例如华辰生物TrypSure™重组胰酶细胞消化液（无酚红，1×）。消化时间约3-5分钟，一般不超过10分钟。消化3-4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。
- 原代细胞比较脆弱，更需要温和的消化，且传代时需要两次清洗离心，以彻底去除残留的消化酶。许多原代细胞在脱离其他细胞和细胞外基质(ECM)后，会因失去附着而触发程序性细胞死亡。温和的消化酶，可控的消化时间和残留酶的去除是维持细胞活力的关键。

接种培养

- 细胞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



► 传代分析

StarMedium间充质干细胞化学成分限定培养基连续传代（72h）					
代次	接种密度个/cm ²	培养容器	收获细胞数（个/瓶）	扩增倍数	总扩增倍数
P0	-	T75	6.00E+05	-	-
P1	10000	T175	1.89E+07	10.8	10.8
P2	10000	T175	2.21E+07	12.6	136.08
P3	10000	T175	2.36E+07	13.5	1837.08
P4	10000	T175	2.17E+07	12.4	22779.792
P5	10000	T175	1.98E+07	11.3	257411.6496
P6	10000	T175	1.70E+07	9.7	2496893.001
P7	10000	T175	1.56E+07	8.9	22222347.71
P8	11000	T175	1.50E+07	7.8	173334312.1
P9	11000	T175	1.27E+07	6.6	1144006460
P10	11000	T175	1.14E+07	5.9	6749638115

StarMedium间充质干细胞化学成分限定培养基连续传代（96h）					
代次	接种密度个/cm ²	培养容器	收获细胞数（个/瓶）	扩增倍数	总扩增倍数
P0	-	T75	6.00E+05	-	-
P1	5000	T175	2.22E+07	25.4	25.4
P2	5000	T175	2.67E+07	30.5	774.7
P3	5000	T175	2.51E+07	28.7	22233.89
P4	5000	T175	2.35E+07	26.8	595868.252
P5	5000	T175	1.77E+07	20.2	12036538.69
P6	5000	T175	1.53E+07	17.5	210639427.1
P7	5000	T175	1.37E+07	15.6	3285975062
P8	6000	T175	1.35E+07	12.9	42389078306
P9	6000	T175	1.10E+07	10.5	4.45085E+11
P10	6000	T175	9.56E+06	9.1	4.05028E+12

StarMedium CD培养基可选择72h和96h两种传代体系

- 01 StarMedium CD 72h传代体系P1-P5平均扩增倍数为12.1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1.0E+07细胞，P3代理论可获得1.8E+10的细胞；按照常规使用剂量单份5E+7制备成产品，可制成约367份。
- 02 StarMedium CD 96h传代体系P1-P5平均扩增倍数为26.3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1.0E+07细胞，P3代理论可获得2.2E+11的细胞；按照常规使用剂量单份5E+7制备成产品，可制成约4400份。

► 冻存

细胞冻存

- 01 用胰酶工作液消化待冻存的细胞，用完全培养基终止消化。
- 02 300g 离心10min，去除上清。用培养基重悬计数。
- 03 重悬细胞过筛，300g离心10min，去除上清。根据细胞计数情况，缓慢加入提前4℃预冷的无血清冻存液，如华辰无血清细胞冻存液（HCCryo-GMP 03）至所需浓度。
- 04 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。

SPECIAL NOTE



特别提示

- 建议间充质干细胞的冻存密度为 $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ 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

- 01 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℃±0.5℃温水中轻轻晃动融解，直至留有一小块冰晶。
- 02 将细胞转移至含有预冷的完全培养基的离心管中，4℃，300g离心10min，弃去上清。
- 03 用完全培养基重悬细胞，混匀计数。根据计数结果，按照11000~12000cells/cm²的密度接种细胞，混匀后放置于二氧化碳培养箱培养。

SPECIAL NOTE



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℃进行，培养基提前预冷，轻柔吹打，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。

助力全球生命科学实验室

推动科学研究和发现的边界

华辰生物——是您专业的选择!

苏州华辰生物科技有限公司

Suzhou Huachen Biotechnology Co.,ltd

电话: 400-965-9800

网址: www.huachenbiotech.com

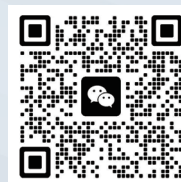
地址: 苏州工业园区星湖街328号创意产业园A3-504-1单元



华辰公众号



华辰订阅号



联系微信号