

# ExCell Bio

## OptiVitro<sup>®</sup> MSC 增生无血清培养基说明书

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 ME000-N023

ME000-N023S



## 产品概述

OptiVibro® 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 增生无血清培养基, 是一种为纯化的人间充质干细胞 (human mesenchymal stem cells, hMSCs), 在无血清、无异源成分条件下培养、扩增而进行定制、优化的完全培养基。使用 MSC 增生无血清培养基, 可以维持间充质干细胞长时间培养及多次传代, 同时能够较好地维持其多种分化潜能, 如分化为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的能力。

## 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>OptiVibro® MSC增生无血清培养基</b>	ME000-N023	1 kit	—	—
MSC增生无血清基础培养基	BA0213	500 mL	2- 8°C 避光保存	9个月
MSC增生无血清添加组分	BA0021	5 mL	-20°C 避光保存	12个月
<b>OptiVibro® MSC增生无血清培养基 (试用装)</b>	ME000-N023S	1 kit	—	—
MSC增生无血清基础培养基	BA0213S	100 mL	2- 8°C 避光保存	9个月
MSC增生无血清添加组分	BA0021S	1 mL	-20°C 避光保存	12个月
<b>关联产品信息: OptiVibro® 重组胰酶消化液RF01</b>				
重组胰酶消化液RF01	RF000-N031	200mL	2- 8°C 避光保存	18个月

## 产品应用与使用限制

为了达到理想的细胞培养效果, MSC 增生无血清培养基可以直接使用, 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因子。

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。

此产品不含抗生素, 如有需要可额外添加。

产品需在有效期内使用。

## | 稳定性与存储

MSC 增生无血清添加组分，需存储于-20°C以下环境（建议存储于非自动除霜冰箱，维持试剂处于冷冻状态，并且维持较小温度波动），在产品有效期内可以保持产品性能稳定。

MSC 增生无血清基础培养基，2-8°C避光条件下储存，在产品有效期内可以保持产品性能稳定。

- 使用前，MSC 增生无血清添加组分室温解冻，解冻后进行观察，溶液澄清后进行使用，或者进行分装（如分装 1 mL/支），分装后的试剂可在-20°C环境储存 6 个月，或暂存于 2-8°C环境，并在 1 个月内用完。请避免反复冻融，并且在产品有效期内使用。
- MSC 增生无血清培养基（由 MSC 增生无血清基础培养基和 MSC 增生无血清添加组分混合后形成），在 2-8°C避光条件下储存，建议 2 周内使用完毕。

## | 实验材料和试剂

### 1. 实验设备及材料（自备）

人脐带间充质干细胞（human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs）；重组胰酶消化液 RF01（ExCell Bio, RF000-N031）；PBS 溶液；T-75 细胞/组织培养瓶；15 mL 离心管；移液管；移液枪和枪头；二氧化碳细胞培养箱；离心机；细胞计数器，或血球计数板；倒置显微镜；水浴锅等。

### 2. 培养基的准备

准备 MSC 增生无血清基础培养基和 MSC 增生无血清添加组分。

在使用 MSC 增生无血清添加组分前，预先室温解冻，解冻后进行观察，溶液澄清后进行使用。

MSC 增生无血清添加组分吸吹混匀后，取 5 mL，加入到 500mL 的 MSC 增生无血清基础培养基中，配制成 MSC 增生无血清培养基。

**注意：**如有需要，可向 MSC 增生无血清培养基内添加盘尼西林和链霉素等抗生素；以下的详细介绍适用于 T-75 培养瓶培养，可根据实际培养容器调整所需液体体积。

## | 操作方法

### 一、间充质干细胞培养

1. 在室温下预平衡适量的 MSC 增生无血清培养基，每个培养瓶需要 25-30 mL 的培养基；
2. 新鲜复苏收集，或通过传代培养消化收集脐带间充质干细胞，根据细胞数量，按照每  $6.0-7.5 \times 10^5$  细胞加入 10 mL 预平衡的 MSC 增生完全培养基重悬（复苏细胞为其他培养体系冻存细胞，首次复苏，建议使用 1:1 混合培养基，即 本品无血清培养基 : 冻存前使用培养基 = 1:1）；

**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/cm<sup>2</sup>，72-96h 传代；或高密度 8000-10000/cm<sup>2</sup>，48-72h 传代；培养基用量 0.2-0.3mL/cm<sup>2</sup>，即 15-23mL 每 T-75 培养瓶；每 48-72h 进行换液。

3. 将细胞放在 37-38°C，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度的环境中培养。每 2-3 天更换培养瓶中的培养基，并加入 15-20 mL 新鲜预平衡的 MSC 增生无血清培养基；

**注意：**换液时，将培养基添加到培养瓶的底部，避免直接吹打细胞培养表面，以免损伤细胞。

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。

## 二、间充质干细胞传代培养

根据预估的细胞量，室温预平衡试剂，每个培养瓶预计需要 20-30 mL 的 MSC 增生无血清培养基，20mL PBS 缓冲液，6mL 的细胞温和消化酶。

1. 清洗：吸去培养瓶中的培养基，每个 T-75 培养瓶用 6-10 mL 的 PBS 润洗细胞一次；
2. 消化：加入 4ml 重组胰酶消化液 RF01（ExCell Bio，RF000-N031），摇动皿底，使消化液浸润整个细胞生长表面后，37°C消化 3-6min，镜检观察，约 80-90%细胞收缩变圆时，加入 4ml 基础培养基或 PBS 溶液重悬细胞，吹散后计数（或接种前计数）；

**注意：**如使用培养瓶，消化后轻拍瓶壁，使细胞脱落，如消化不彻底，继续放入 37°C消化 1-2min。

3. 收集：300g，5min 离心收集细胞；
4. 清洗：加入 5mL PBS 溶液吹打重悬细胞，300g，5min 离心，弃上清，收集细胞（**推荐步骤，可避免细胞消化后残留消化液对无血清体系下细胞贴壁产生影响**）；

**注意：**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：**请勿将细胞长时间静置于操作管内，操作时间过长，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 6.0-7.5×10<sup>5</sup> 每瓶的细胞量，将细胞悬液接种于多个 T-75 培养瓶中，补加完全培养基至每瓶 15-20 mL；
6. 培养：将细胞放在 37-38°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 Bio，CS041-0001）中置于 -80°C过夜，24h 后转至液氮中进行长期保存。

## I 安全信息

此产品含有人血白蛋白成分，使用材料为符合国家批准的可临床应用的原材料，有明确的来源、批号及质量报告。人源材料经过艾滋病病毒（HIV-1/2）抗体、乙肝表面抗原（HBsAg）抗体和丙肝病毒（HCV）检测，检测结果呈阴性。然而，此培养基仍然应该作为潜在的传染源来对待，使用时严格遵守安全实验手册，并穿戴防护设备，避免直接接触。过度接触此培养基的短期与长期影响未知。