

# ExCell Bio

## OptiVitro MSC 增生无血清培养基

### User Manual

产品货号： ME000-N015  
ME000-N015S



## 产品概述

OptiVidro 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 增生无血清培养基, 是一种为人间充质干细胞 (human mesenchymal stem cells, hMSCs) 和人骨髓间充质干细胞 (human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, hBM-MSCs), 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 OptiVidro 间充质干细胞增生无血清培养基, 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潜能。

此产品不含抗生素。

## 产品规格及储存条件

产品名称	货号	规格	存储条件	效期 <sup>a</sup>
OptiVidro MSC增生无血清培养基	ME000-N015	1 kit	—	—
OptiVidro MSC增生无血清基础培养基	ME000-N015 (1 of 2)	1 × 500 mL	2- 8°C 避光保存	6 months
OptiVidro MSC增生无血清添加组分	ME000-N015 (2 of 2)	1 × 80 mL	-5至-20°C 避光保存	12 months
OptiVidro MSC增生无血清培养基 (试用装) <sup>b</sup>	ME000-N015S	100 mL	-5至-20°C 避光保存	6 months

<sup>a</sup> 效期从制造日期开始计算

<sup>b</sup> 试用装已预混, 可解冻后直接使用

## 产品应用与使用限制

为了达到理想的细胞培养效果, OptiVidro 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。在 MSCs 培养时, 需要预先包被细胞培养板, 通常使用重组人纤维连接蛋白或细胞外基质蛋白 (ECM) 进行包被, 重组人纤维连接蛋白和细胞外基质 (ECM) 蛋白的种类与用量, 根据每个研究者的实验设计进行确定。

本品 OptiVidro MSC 增生无血清培养基, 仅供科学研究使用, 不用于临床疾病诊断。此产品在疾病诊断和其他临床应用的安全性和功效未确定。

请在产品有效期内使用。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。

## 产品信息: 稳定性与存储

OptiVidro MSC 增生无血清添加组分, 需存储于 -5 °C 至 -20 °C 存储条件下 (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。

OptiVtro MSC 增生无血清基础培养基，2-8℃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，在 2-8℃环境过夜解冻 OptiVtro MSC 增生无血清添加组分（解冻后的添加组分可能会略显浑浊）。解冻后请立即使用，或者进行分装（如分装 8-16 mL/支），分装后的试剂可在-20℃环境储存三个月，或暂存于 2-8℃环境，并在一个月内用完。请避免反复冻融，并且在产品有效期内使用。
- OptiVtro MSC 增生无血清培养基（由 OptiVtro MSC 增生无血清基础培养基和 OptiVtro MSC 增生无血清添加组分混合后形成），2-8℃避光条件下储存，建议两周内使用完毕。
- OptiVtro MSC 增生无血清培养基（试用装）为完全培养基，可解冻后直接使用。

## 安全信息

此产品含有从人血浆分离的人源物质成分，这些成分经过艾滋病病毒（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。

## 实验材料和试剂

### 1. 实验设备及材料

人骨髓间充质干细胞（human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, hBM-MSCs）；  
重组人纤连蛋白；  
盘尼西林和链霉素（100X）（非必需）；  
胰蛋白酶，或者胰酶替代物等等效的产品；  
胰蛋白酶抑制剂；  
PBS 1X；  
75 cm<sup>2</sup> 细胞组织培养皿/瓶；  
15 ml 离心管；  
移液管；  
移液枪和枪头；  
37.5℃5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱；  
离心机；  
血球计数板，或细胞计数仪；  
倒置显微镜；

水浴锅；

## 2. 试剂及培养基准备

**注意：请在无菌环境下操作**

### ● 完全培养基的准备

准备 OptiVidro MSC 增生无血清基础培养基和 OptiVidro MSC 增生无血清添加组分。

### ● OptiVidro MSC 增生无血清培养基

在使用 OptiVidro MSC 增生无血清添加组分前，预先在 2-8 °C 环境过夜解冻，或室温解冻；

取 OptiVidro MSC 增生无血清添加组分 80mL 加入到 OptiVidro MSC 增生无血清基础培养基 500mL 中，配制成 580mL OptiVidro MSC 增生无血清培养基；

**提示：**如有需要，盘尼西林和链霉素可以 1：100 稀释后加入到 OptiVidro MSC 增生无血清培养基。

## 3. 培养条件

**培养基：**OptiVidro MSC 增生无血清培养基

**细胞系：**人间充质干细胞或骨髓间充质干细胞

**培养类型：**贴壁培养

**培养器皿：**底层纤连蛋白包被培养瓶

**温度范围：**37 °C-38 °C

**培养环境：**在 37°C-38°C 的潮湿空气中培养，确保适当的空气交换，尽量减少培养物在光照下暴露。

**提示：**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。

## 1 2 3 **操作方法**

### 一、间充质干细胞复苏

1. 在接种细胞前，用重组人纤连蛋白包被 T75 培养瓶：用 PBS 缓慢的将纤连蛋白稀释至 5.0ug/mL。向 T75 培养瓶中加入 6mL 纤连蛋白溶液，在 2-8 °C 孵育过夜，或室温下孵育 3 个小时，或 37°C 孵育 45 分钟以上；
2. 从液氮中取出冻存的细胞（人骨髓间充质干细胞），迅速转移至 37 °C 水浴，摇动冻存管解冻细胞，直至剩余微量的冰块；

**提示：** 摇动时避免水浴浸没冻存管盖；尽量缩短解冻时间；避免冻存管内冻存液溶解后升温。

3. 将冻存管表面充分消毒后，转移至无菌操作环境内，开启细胞冻存管；
4. 将细胞悬液缓慢加入到含有 5-10mL 的 OptiVidro MSC 增生无血清培养基的离心管中（约 3-5 滴/5 秒），轻柔混匀；
5. 室温下 100-200g 离心 5 分钟，弃上清；
6. 用 10mL 提前温浴（37 °C 的 OptiVidro MSC 增生无血清培养基重悬细胞，对细胞悬液进行细胞计数；

## 二、间充质干细胞培养

1. 在接种细胞前，用重组人纤连蛋白包被 T75 培养瓶：用 PBS 缓慢的将纤连蛋白稀释至 5.0ug/mL。向 T75 培养瓶中加入 6mL 纤连蛋白溶液，在 2-8 °C 孵育过夜，或室温下孵育 3 个小时，或 37°C 孵育 45 分钟以上；
2. 在室温下预热适量的 OptiVidro MSC 增生无血清培养基，每个培养瓶需要 15-20mL 的培养基；
3. 将  $3.0-3.75 \times 10^5$  的细胞用 15-20mL 预热的 MSC 增生完全培养基重悬；

**提示：** 如果使用不同尺寸的组织培养器，接种浓度大约为  $4000-5000/cm^2/0.2-0.3mL$  培养基。

4. 从培养瓶中轻轻吸去纤连蛋白溶液，缓慢地将细胞悬液添加到 T75 培养瓶中，小心加入避免刮伤表面涂层；
5. 将细胞放在 37-38°C，5%二氧化碳，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 15-20mL 新鲜预热的 OptiVito MSC 增生无血清培养基；

**提示：** 将培养基添加到培养瓶的底部以免损伤细胞。

6. 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。

## 三、间充质干细胞传代培养

1. 在细胞传代培养前，用重组人纤连蛋白包被 T75 培养瓶：用 PBS 缓慢的将纤连蛋白稀释至 5.0ug/mL。向 T75 培养瓶中加入 6mL 纤连蛋白溶液，在 2-8 °C 孵育过夜，或室温下孵育 3 个小时，或 37°C 孵育 45 分钟以上；
2. 根据预估的细胞量，每个接种培养瓶提前预热 30 mL 的 OptiVidro MSC 增生无血清培养基，3mL 的胰蛋白酶消化液，3mL 胰蛋白酶消化终止液；

**提示 1：胰酶消化液：** 可用 PBS 配制成含 0.05% 胰蛋白酶及 0.04% EDTA 的消化液；或用 PBS 配制成含 0.25% 胰蛋白酶；或使用同等效力的胰蛋白酶替代物作为消化液；

**提示 2:** 胰蛋白酶消化终止液: 用含钙镁的 PBS 缓冲液配制, 胰酶抑制剂溶液中胰酶抑制剂浓度与消化液内胰蛋白酶浓度相同;

3. 吸去培养瓶中的培养基, 每个培养瓶用 6-10mL 的 PBS 润洗细胞一次;

**提示:** 清洗时不要将 PBS 直接吹打在细胞表面, 以免损伤细胞

4. 加入 3mL 胰蛋白酶消化液 (含 0.05%胰蛋白酶和 0.04%EDTA), 轻轻摇动培养瓶, 使胰蛋白酶均匀的分布在细胞上;

5. 在显微镜下观察细胞, 监测细胞消化情况, 90%以上细胞变圆和开始分离时进行下一步操作;

6. 加入 3mL 胰蛋白酶消化终止液, 摇动培养瓶使消化液与终止液混匀;

7. 将 5mL OptiVito MSC 增生无血清培养基添加到培养瓶中, 吹打培养瓶细胞整个生长表面, 使细胞完全脱离;

8. 将细胞转移到 15mL 离心管中, 300g 离心 5 分钟, 弃去上清;

9. 用少量提前预热的 OptiVito MSC 完全培养基重悬细胞, 并用血球计数板计数;

10. 按照  $3.0-3.75 \times 10^5$  每瓶的细胞量, 将细胞悬液接种于多个用纤维连接蛋白包被好的 T75 培养瓶中, 补加培养液至每瓶 15-20mL;

7. 将细胞放在 37-38°C, 5%二氧化碳, 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 15-20mL 新鲜预热的 OptiVito MSC 增生无血清培养基。

#### 四、间充质干细胞冻存

1. 在细胞冻存前, 室温预平衡所需培养基、PBS 缓冲液、消化液、消化终止液;

2. 原代或传代细胞扩增至铺满瓶底 80%-90%时, 或根据实验需要, 进行细胞冻存;

3. 吸去培养瓶中的培养基, 每个培养瓶用 6-10mL 的 PBS 润洗细胞一次;

**提示:** 清洗时不要将 PBS 直接吹打在细胞表面, 以免损伤细胞

4. 加入 3mL 胰蛋白酶消化液 (含 0.05%胰蛋白酶和 0.04%EDTA), 轻轻摇动培养瓶, 使胰蛋白酶均匀的分布在细胞上;

5. 在显微镜下观察细胞, 监测细胞消化情况, 90%以上细胞变圆和开始分离时进行下一步操作;

6. 加入 3mL 胰蛋白酶消化终止液, 摇动培养瓶使消化液与终止液混匀;

7. 将 5mL OptiVito MSC 增生无血清培养基添加到培养瓶中, 吹打培养瓶细胞整个生长表面, 使细胞完全脱离;

8. 将细胞转移到 15mL 离心管中, 300g 离心 5 分钟, 弃去上清;

9. 加入少量 PBS 溶液重悬细胞，并用血球计数板（或细胞计数仪）计数；
10. 300g 离心 5 分钟，弃去上清；
11. 用移液器吹打细胞悬液，使细胞分散，并用血球计数板计数；
12. 加入适量细胞冻存液（如 OptiVibro 无血清细胞冻存液，货号：VUC00-N011）重悬细胞，使悬液中细胞达到所需细胞浓度（如  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ）；
13. 迅速将细胞转移入  $2-8^{\circ}\text{C}$  预冷的细胞冻存管内，盖紧瓶塞，将冻存细胞转至  $2-8^{\circ}\text{C}$  预冷的程序化冻存盒（如 ExCell Bio，货号：CS041-0001，降温  $1^{\circ}\text{C}$  每分钟）内；
14. 迅速将细胞连同冻存盒转移入  $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$  冰箱；
15. 过夜或 24h 后将细胞转移入液氮内（或  $-125^{\circ}\text{C}$  至  $-200^{\circ}\text{C}$  环境内）长期保存。

数据实例

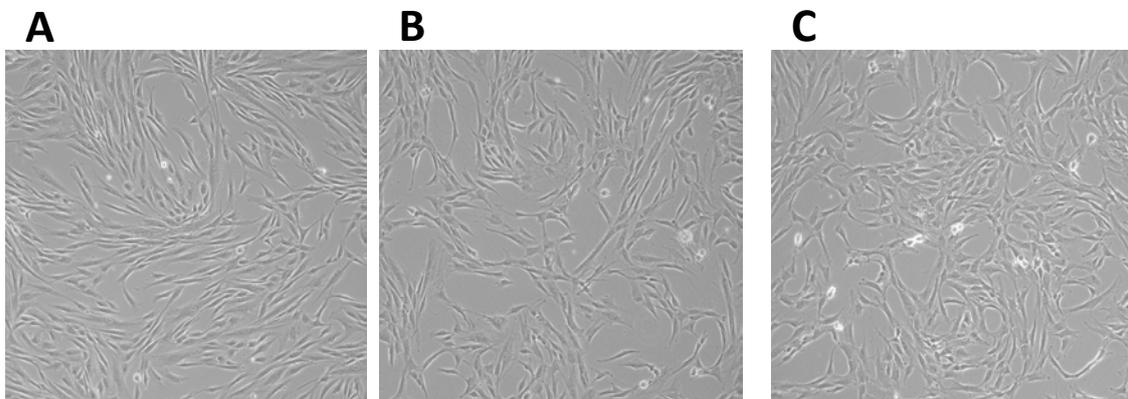


图 1 OptiVidro MSC 增生无血清培养基连续培养人骨髓间充质干细胞（hBM-MSCs）的形态特征。hBM-MSCs 在 OptiVidro MSC 完全培养基 A，商业化竞品 B，及传统血清培养基 C 的条件下，连续传代 3 次以上，观察细胞形态特征。图片于 10X 物镜下拍摄。

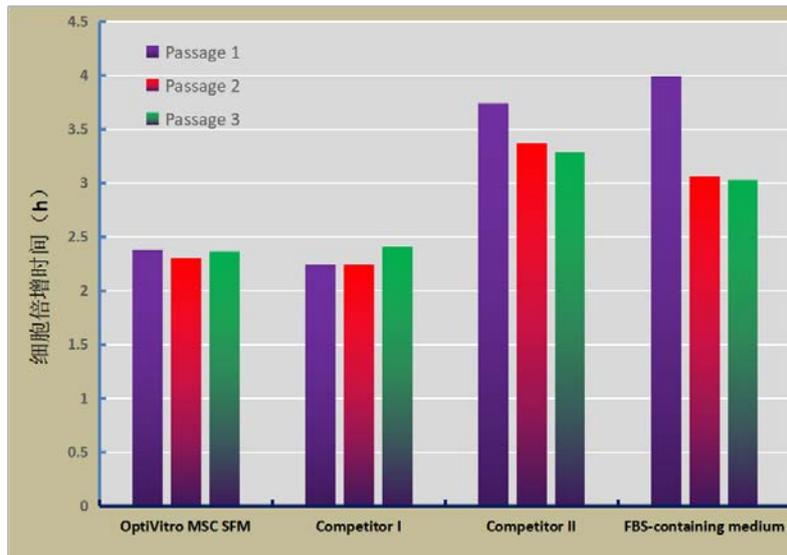
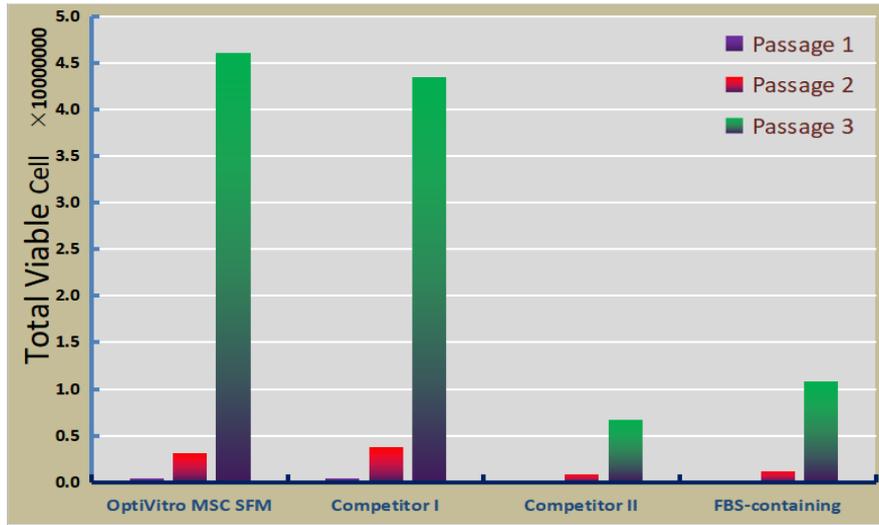
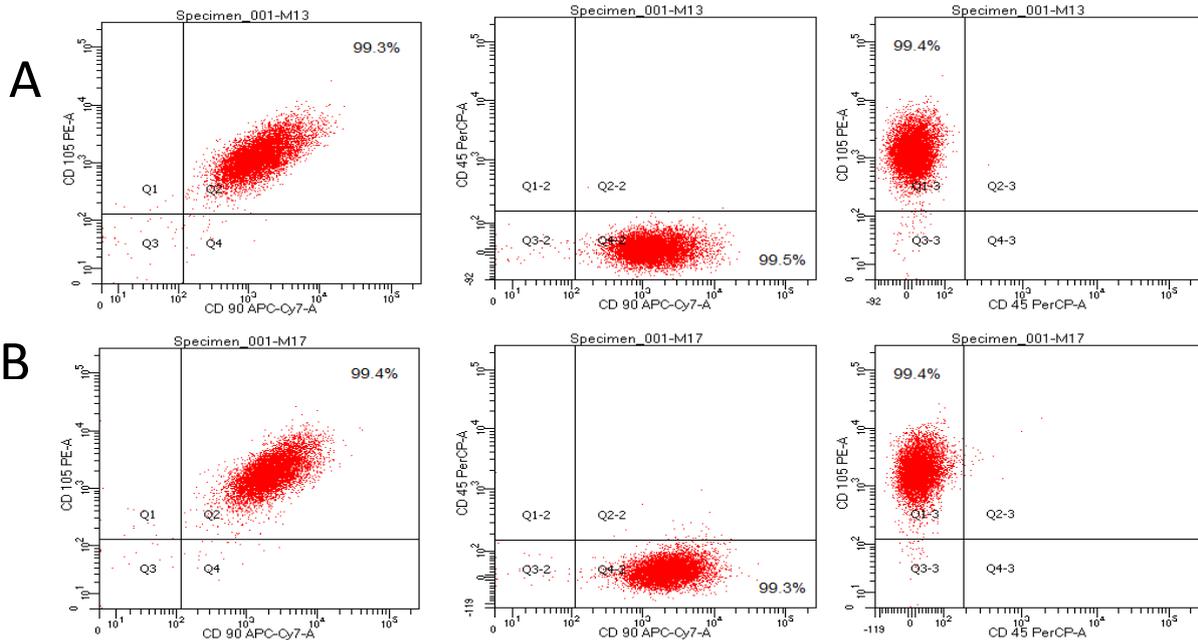


图 2 OptiVidro MSC 增生无血清培养基培养人骨髓间充质干细胞（hBM-MSCs）增殖效果。hBM-MSCs 在 OptiVidro MSC 完全培养基，商业化 MSC 无血清培养基竞品 I 和商业化 MSC 无血清培养基竞品 II，及传统血清培养基的条件下，连续传代 3 次以上，统计每代倍增时间。细胞传代培养以 5000/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 6 孔板孔，每样本 2-3 复孔。



**图 3** OptiVtro MSC 增生无血清培养基培养人骨髓间充质干细胞 (hBM-MSCs) 连续传代 3 次累积增殖效果。hBM-MSCs 在 OptiVtro MSC 无血清培养基, 商业化 MSC 无血清培养基竞品 I 和商业化 MSC 无血清培养基竞品 II, 及传统血清培养基的条件下, 连续传代 3 次以上, 统计每代细胞平均数, 计算获得细胞增殖累积数。细胞传代培养均以 5000/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 6 孔板孔, 每样本 2-3 复孔。



**图 4** OptiVtro MSC 增生无血清培养基培养人骨髓间充质干细胞流式检测。人骨髓间充质干细胞在 OptiVtro MSC 增生无血清培养基 A 和传统血清培养基 B 培养条件下, 连续传代 3 次以上检测细胞表面标志物。细胞免疫染色阳性抗体: APC/Cy7 anti-human CD90; PE anti-human CD105; 阴性抗体 PerCP anti-human CD45。同时以 IgG1 同型对照抗体作为参照。用 BD 流式细胞仪进行细胞标志物分析。

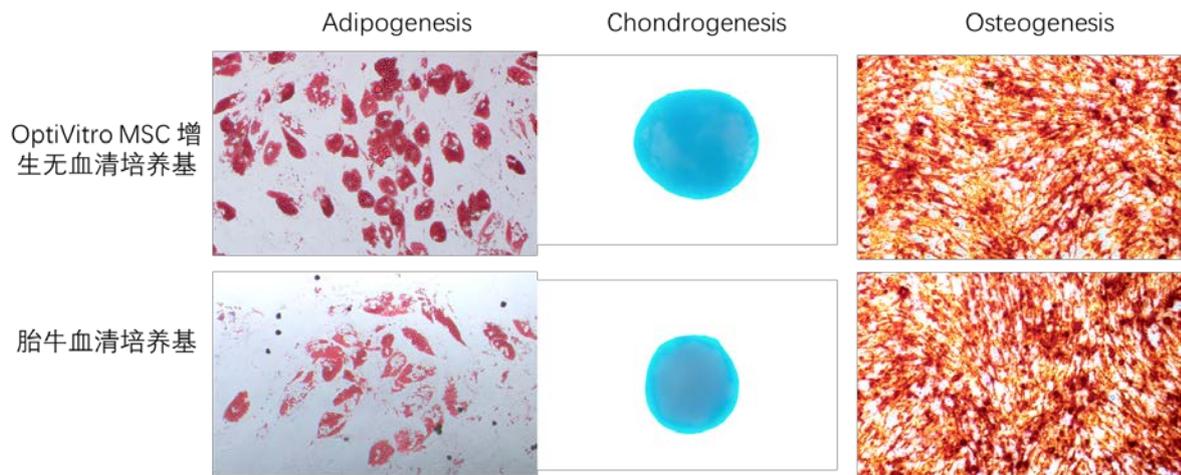


图5 OptiVidro MSC增生无血清培养基培养hBM-MSCs细胞分化潜测试。



备注

N/A