

Serum-free Medium for  
Mesenchymal Stem Cells (GMP grade)

# 间充质干细胞无血清培养基 (GMP 级) 套装

## 使用说明文件

— Instruction manual —



YOCON

使用前请仔细阅读本操作说明

友康生物科技（北京）股份有限公司

**YOCON 友康®**

## 间充质干细胞无血清培养基（GMP级）套装使用说明书

### 【产品名称】

间充质干细胞无血清培养基（GMP级）套装

### 【规格与保存】

产品名称	产品货号	包装规格	保存条件	保质期限
间充质干细胞无血清基础培养基（GMP级）	NC0106	500 mL/ 瓶	2-8°C，避光	12 个月
间充质干细胞无血清培养基添加剂（GMP级）	NC0106.S	5 mL/ 瓶	-20°C，避光	12 个月
GMP级干细胞温和消化酶	NC1004.1	500 mL/ 瓶	2-8°C，避光	12 个月

### 【用途与描述】

本培养基可用于多种来源的人类间充质干细胞的原代细胞分离、种子库构建及连续传代培养，同时还能保持其多向分化的潜能，如骨髓（BM-hMSC）、脐带（UCM-hMSC）。使用本产品无需添加血清或血清替代物。

本产品化学成分明确、没有添加血清或血清替代物（血小板裂解物）、没有任何动物源及人源的组分。产品批间差异小，所有原料均符合 GMP 标准，更适合临床研究用途。

### 【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、重组人白蛋白、重组人转铁蛋白、重组人胰岛素、微量元素等。

### 【产品设计原理】

在诸如 DMEM、MEM、M199 等基础培养基之上，添加了各种氨基酸、维生素、无机盐、人白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、微量元素，既能分离原代 MSC，又能后期培养 MSC，能保持细胞正常的形态与表型，同时，避免添加血清或血清替代物中的某些能够促使干细胞分化的组分，在细胞传代的过程中，维持干细胞的未分化状态。

## 【产品性能指标】

### 1. 从人类脐带分离原代细胞所需时间

以植块法为例：

可见细胞生长的时间：5-9 天。

细胞可收获的时间：12-15 天。

上述所指脐带为新鲜脐带，若为水肿的脐带或冷冻保存的脐带组织，可见 MSC 细胞长出的时间为 14 天左右，细胞可收获的时间为 21 天。也会出现不能分离出细胞的情况。

### 2. 细胞传代所需的时间：3-4 天（接种密度：10000-20000 cells/cm<sup>2</sup>）。

### 3. 细胞表型

CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 为阴性（< 2%），CD44、CD73、CD90 和 CD105 为阳性（> 95%）。

### 4. 细胞形态

细胞为梭形，呈指纹状或漩涡状生长。

### 5. 产品指标

渗透压：280-350 mOsm/Kg；内毒素 <0.25EU/mL；无菌：细菌真菌不得检出；支原体：不得检出；pH：6.8-7.8；外观：淡黄色 - 黄色澄清透明液体；装量：500mL/ 瓶。

## 【使用前特别提示】

### 1. 本产品的使用方法与血清培养基及血清替代物培养基相比，确有差别。

敬请用户仔细查看本产品使用说明书后操作，请勿仅以既往经验使用本产品。

与血清培养基及血清替代物培养基相比，对现有操作的某些细节做了规范性的要求（比如对向培养瓶或培养皿加入培养液的操作手法有明确要求）。

### 2. 本产品中没有添加胰酶抑制剂，不能用于终止胰酶消化。

血清及血清替代物（血小板裂解物）中含抗凝血酶 III，可以抑制胰酶的消化作用，这是血清能够终止胰酶消化的原因，也是血清培养基中 MSC 细胞传代时，消化前必须经过 PBS 清洗（以去除残留血清）的原因。

使用本产品时，推荐使用 GMP 级的干细胞温和消化酶（配套产品，货号：NC1004.1）消化细胞，此方法无须抑制剂终止，培养上清稀释后离心去除即可，且 10 分钟内对细胞无损伤，收获细胞活率高，传代后扩增倍数维持较高水平，避免了细胞消化后胰酶残留的问题。

## 【MSC完全培养基准备】

将培养基添加剂室温融化，按 1:100 比例加入培养基基础中即成为 MSC 完全培养基，使用前需在室温下预温 10-30min，时间不宜过长，切勿强光或紫外照射。

完全培养基 2-8℃可避光保存 30 天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在 2 周内用完，培养基中可能有少量白色絮状析出，为正常现象，不影响产品性能。完全培养基配制完成后，不可多次反复预温（控制在 5 次以内），可取出适量预温，禁止使用超过 30 日未使用完的完全培养基。科研小量、多次使用时，建议添加剂融化后立即分装（添加剂出厂后仅允许冻融一次）。

**特别提醒：**

如果确实需要分装添加剂，应知晓，会出现分装后的总体积不足 5mL 的现象，这是由于在包装瓶壁及瓶盖上以及吸取的枪头有残留导致的，建议最后剩余的一部分添加剂使用原瓶承装，且做好添加剂不足的心理准备。没有特殊情况，强烈不建议分装添加剂。融化培养基添加剂时不可 37°C 水浴融化，否则会降低添加剂的活性，导致产品性能下降。

**【使用环境1：MSC原代细胞分离（人脐带）】**

植块法简述：

1. 用 PBS 清洗脐带至清洗液无血色，去除脐静脉内膜和动脉。
  2. 用手术剪或手术刀将华通氏胶剪切成小块，接种入培养瓶或培养皿，使组织块均匀分布，不同培养器皿的组织块植入量及培养基添加量 见下表，将培养皿或培养瓶放置于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度的二氧化碳培养箱中。
- 3.7 天换液。
- 4.10 天换液。
- 5.10-15 天，收获 MSC 细胞。

培养器皿 (型号)	近似底面积 (cm <sup>2</sup> )	第 0 天加液量 (mL)	第 2 天加液量 (mL)	植入组织块 (块)
60mm 皿	21	2	3	7
100mm 皿	55	5	7	15
150mm 皿	150	15	15	35
T-25	25	2	3	8
T-75	75	7	8	20
T-175	175	15	20	45
T-225	225	20	25	55

**【使用环境2：连续培养MSC细胞（以T-75瓶为例）】**

1. 培养 72h 后，在显微镜下观察培养的 MSC 细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。

**特别提示：**

细胞融合度请勿超过 100%，特别是切勿使局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，会导致细胞严重衰老及分化。再者，传代前细胞生长过密（细胞融合度过高），导致细胞消化异常（细胞整片或成片脱落），加之随后的不当操作（用移液器反

复吹打成片细胞使其成为单个细胞)，此操作所导致的机械损伤会严重损害细胞膜，引发大比例的细胞死亡，特别是这些细胞经冻存后再次使用时。

2. 在超净台中，弃去培养瓶中的培养液，加入 10mL PBS 清洗细胞后弃去。

3. 加入 2mL 干细胞温和消化酶常温下（25℃）消化细胞。

4. 在显微镜下观察到细胞全部收缩变圆，且有少量细胞开始流动时（一般 3-5 分钟），立即加入温和酶使用量 2 倍体积（4mL）的细胞培养上清或者完全培养基稀释细胞悬液。

**特别提示：**

使用培养上清液或完全培养基稀释 GMP 级的干细胞温和消化酶（货号：NC1004.1）对细胞有较好的保护作用，比使用 DPBS 等缓冲液会多回收 10 ~ 30% 的细胞，而且培养上清液或完全培养基能够更好的保持细胞活性，能一直维持较高的扩增倍数。

室温及温和酶温度对消化时间有很大影响，夏季室温较高，消化时间为 3min 左右，而冬季室温较低，消化时间会相对延长 2-3min。25℃时，消化时间介于 3-5min。

5. 用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。

**特别提示：**

进行该操作时动作一定要温和，因为细胞消化过程中的细胞损伤，更多的是来自于类似吹打与离心的机械损伤。

6. 将细胞悬液转移到 15mL 离心管中，1300rpm（300g）离心 5 min。弃上清，加入 2mL 完全培养基重悬细胞，使用台盼蓝染色，或流式细胞仪等方法计数。

7. T-75 瓶接入 15mL 完全培养基。按密度 10000 cells/cm<sup>2</sup> 接种细胞。

**具体做法：**

1) 应让培养基沿培养瓶的上表面（细胞生长面的相对面）或侧面加入，切忌冲到培养瓶底面。

2) 然后将细胞培养瓶轻轻立起来，将细胞悬液直接加到底部，切忌冲到培养瓶底面，再慢慢将培养瓶放平。

**特别提示：**

a) 请特别注意培养基加入培养瓶的方式，否则容易在培养基冲刷到培养瓶底面位置出现细胞生长空白区域。

（详细阐述，详见本说明书的“客户常见问题”）

b) 离心步骤不可去除，干细胞温和消化酶短时间内对细胞无损伤，但切勿超过 10 分钟。

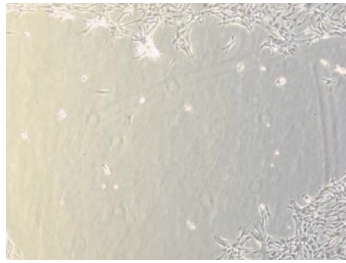
8. 将培养瓶置于 37℃，5%CO<sub>2</sub>，饱和湿度条件下培养。

### 【使用环境3：复苏培养冻存的MSC细胞（以T-75瓶为例）】

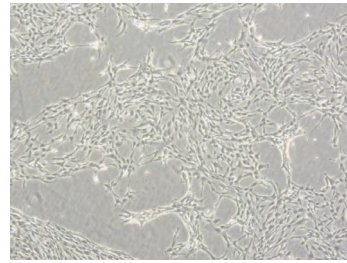
1. 从冰箱中取出完全培养基，在生物安全柜或超净台中吸取适量（如 T-75 瓶：15mL）完全培养基沿上表面加入细胞培养瓶中，切勿冲到培养瓶底面（细胞生长面），然后慢慢将培养瓶放平，备用，在室温中预温培养基 10-30min。

#### 特别提示：

请严格按照此步骤操作，否则可能会出现培养瓶中细胞生长空白区域，即所谓的“生长空洞”。



湖泊状的空白区域



河流状的空白区域

原因在于大多数用户使用的是常规 TC 处理（Tissue Cultured）的培养瓶或培养皿，培养瓶与其表面亲水基团的结合并不牢固，很容易在液体的冲刷下失去亲水基团，从而导致细胞难以贴壁生长。

现在已有新一代的专门匹配无血清培养基的培养瓶，亲水基团与瓶表面的结合更为牢固。对应的，价格也更高。

用户采用经过我们验证的“避免冲刷”的培养液加入方式，可取得与应用昂贵的新一代培养瓶相同的培养效果。并且无需预先包被培养瓶。

2. 从液氮中取出冻存的 MSC 细胞，迅速将冻存管放入 37°C 水浴快速融解。

#### 特别提示：

需要快速溶解的原因是一般的冻存液中都有添加 DMSO，在常温环境下，DMSO 对细胞是有毒害的，此步骤用时越少越好。

3. 在生物安全柜或超净台中，将解冻后的 1mL 细胞悬液加入 10mL 冷的完全培养基中。

4. 1000rpm（180g）离心 5min，弃上清，加入 2mL 完全培养基重悬细胞，台盼蓝染色计数，按密度 10000 cells/cm<sup>2</sup> 将细胞接种至 1) 步骤中的培养瓶中，添加时，将培养瓶立起来，直接加到底部，切忌冲到培养瓶底面。

5. 混匀后，将培养瓶置于二氧化碳培养箱中培养，培养条件 37°C，5%CO<sub>2</sub>。

6. 24h 后，更换新鲜的、室温预温的完全培养基。如果使用的是友康无血清细胞冻存液（货号 NC1001.1，此冻存液需 2-8°C 储存）或 GMP 级玻璃化细胞冻存液（货号 NC1011，此冻存液常温储存），则不需换液。

#### 特别提示：

1. 无论冻存前使用的是血清培养基、血清替代物培养基，还是无血清培养基，冻存后的细胞均可直接在无血清培养基中正常培养，但冻存前严重受损的细胞除外。

2. 细胞接种密度，是指活细胞的密度。

3. 建议用户在接种细胞前，进行细胞计数。如果确实不进行细胞计数，又观察到细胞接种后表面漂浮大量的细胞，则 24h 后更换培养液，培养时间应适当延长，若细胞密度过低（低于 5000 cells/cm<sup>2</sup>），可能会出现细胞长不起来的现象。

## 【使用环境4：MSC冻存】

1. 用干细胞温和消化酶消化待冻存的细胞，离心、重悬后进行细胞计数。

### 特别提示：

冻存前需延长培养1天，即培养4天，可大大提高复苏时的细胞回收率及细胞活率，否则复苏时可能会出现大量(20-50%)细胞死亡。

2. 1300rpm (300g) 离心 5min，去除上清。

3. 根据细胞计数情况，缓慢加入适量冷的无血清冻存液（无血清冻存液可即拿即用或置于冰袋备用），调整细胞密度在  $1 \times 10^6$ - $2.5 \times 10^7$  cells/mL。

4. 轻轻地重悬细胞，将重悬均匀的细胞按等份加入到无菌的冻存管（需提前做好标记）中，旋紧冻存管盖。

5. 迅速将冻存管放入程序降温盒中，然后将冻存盒直接放入 -80°C 冰箱。

注：如果使用友康无血清细胞冻存液（货号 NC1001.1，此冻存液需 2-8°C 储存）或 GMP 级玻璃化细胞冻存液（货号 NC1011，此冻存液常温储存），则不需要程序降温步骤，可直接将细胞放于 -80°C 冰箱。也适用于传统冻存程序，即程序性降温，效果可能会稍优于直接将细胞放于 -80°C 冰箱。

6. 12h 后将细胞从 -80°C 冰箱转移至液氮中长期保存。

## 【用户经常提问的问题与解决方案】

1. 在培养瓶中可见长河状或湖泊状的细胞生长空白区域，是什么原因？该如何解决？

答：原因是现有 TC 处理的培养瓶的表面亲水基团结合不牢固。这个问题在某些品牌的培养瓶中较为突出，某些品牌的培养瓶则极少发现。

解决方法：通过改变加入培养液的方式来解决。

2. 我现在有很多冻存的细胞，这些细胞原来在别的培养基中培养。不知是否可以直接转入无血清培养基？

答：可以直接转入无血清培养基培养，不过要使用原培养基终止消化。

但用户应该注意到一个问题，由于血清培养基 MSC 贴壁较紧，胰酶消化时间较长，很多用户存在细胞受损严重的问题，因此，在接种前请先进行细胞计数。按活细胞数量接种。

3. 我现在使用血清培养 MSC 细胞，现在换用无血清培养基，接种密度是否会有不同？

答：无血清培养基的接种密度 P5 前为 10000 cells/cm<sup>2</sup>，P5 后为 12000 cells/cm<sup>2</sup>，P10 后为 15000 cells/cm<sup>2</sup>，P16 后为 20000 cells/cm<sup>2</sup>。

4. 为什么你们的培养基加入了添加剂后，只允许用 30 天？

答：培养基添加剂中主要组分为重组蛋白，仅在 -20°C 可长期稳定保存。因此，添加至培养基基础液后，建议在 2 周内用完。



一直于 4℃保存环境下，超出 2 周培养基仍可使用，但性能会有下降。超出 4 周，禁止使用。  
但反复预温（室温或 37℃）的完全培养基性能会急剧下降。

5. 无血清培养基是否可以从冻存的脐带组织分离原代细胞？

答：可以。

但培养的周期较新鲜的脐带组织长 7 天左右。一般需要 21 天。

并且要求在 14 天时，更换新鲜培养液，否则会引起细胞贴壁效果不佳，生长效果不佳的现象。

原因在于培养基中的许多组分，均为热不稳定组分，长时间置于高温环境下（37℃），将导致蛋白活性降低。

6. 细胞周期的标准是什么？

答：广东省干细胞与再生医学协会团体标准 - 人脐带间充质干细胞质量检定标准（T/SRA 003-2019）：取对数生长期 P5 细胞，接种于 10cm 培养皿中，培养 48h，细胞融合度约 50%-60%，收集细胞，采用流式细胞术通过流式细胞仪进行细胞周期测定。S 期和 G2/M 期比例合计应在 40%- 50% 左右。

深圳市细胞治疗技术协会团体标准 - 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范（SZTT/SSCT 002-2018）：产品的 G0/G1 期细胞含量应大于 80% 且小于 90%，G2-M 期≥ 5%。

7. 端粒酶活性检测标准是什么？

答：广东省干细胞与再生医学协会团体标准 - 人脐带间充质干细胞质量检定标准（T/SRA 003-2019）：采用逆转录 real-time PCR 方法通过 PCR 仪检测其是否表达端粒酶催化亚基基因 hTERT。hTERT 是端粒酶的核心，只表达于端粒酶阳性细胞，并且是端粒酶的限速因子，其 mRNA 表达水平直接决定端粒酶的活性程度。采用实时定量荧光 PCR 的方法检测脐带间充质干细胞应无端粒酶（或非常微弱）表达。

深圳市细胞治疗技术协会团体标准 - 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范（SZTT/SSCT 002-2018）：产品的两代次细胞端粒酶活性差异≤ 10%。

代次	培养器皿	流式圈门	每皿收获细胞数	扩增倍数	接种密度 /cm <sup>2</sup>	培养天数
P0	150mm 皿	73.27%	2.06E+06	/	35 块组织 / 皿	14-16 天
P1		68.05%	1.50E+07	10.00	10000	3 天
P2		85.64%	1.38E+07	9.21		
P3		79.40%	1.40E+07	9.32		
P4		80.14%	1.30E+07	8.65		
P5		70.93%	1.22E+07	8.12		

代次	培养器皿	流式圈门	每皿收获细胞数	扩增倍数	接种密度 /cm <sup>2</sup>	培养天数
P6	150mm 皿	68.88%	1.14E+07	7.63	12000	3 天
P7		83.66%	1.15E+07	7.67		
P8		75.02%	1.09E+07	7.27		
P9		77.99%	9.86E+06	6.57		
P10		69.33%	8.85E+06	5.90	15000	
P11		67.85%	1.08E+07	4.82		
P12		70.87%	1.59E+07	7.07		
P13		77.31%	1.37E+07	6.07		

#### 说明：

1、连续传代数据均是源于流式细胞仪计数，接种密度为 10000-15000 cells/cm<sup>2</sup>，表中数据均为多次培养的平均值，单次培养的性能可能会优于此表。

2、细胞收获时的细胞融合度不宜超过 100%，当细胞融合度过高，特别是局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，这样会导致细胞严重衰老及分化，同时容易出现细胞接触抑制，影响后续传代效果。

3、细胞消化时，一定要按照说明书的消化方式进行，强烈建议采用干细胞温和消化酶，这样能够很好的避免因消化过度而影响细胞后续传代。

4、培养基生产厂家在长期使用无血清培养时，明确哪些品牌的细胞培养瓶可以使用，哪些品牌的细胞培养瓶不宜使用，所以关于细胞培养瓶的使用，详细情况可跟培养基生产厂家咨询，厂家会给出最好的建议。

**YOCON 友康<sup>®</sup>**

文件版本号：2023 -V1.1

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康生物科技（北京）股份有限公司

地址：北京市海淀区丰贤中路7号A座三层、B座一层

电话：010-58711655 400-001-1266

网站：[www.yocon.cn](http://www.yocon.cn)

