

YOCON 友康®

用数据取信用户

间充质干细胞无血清培养基套装2
(脐带-冻存细胞及高代数细胞传代)

使用说明文件 (2021年版)



间充质干细胞无血清培养基套装2（脐带-冻存细胞及高代数细胞传代）使用说明书

【产品名称】

间充质干细胞无血清培养基套装2（脐带-冻存细胞及高代数细胞传代）

【规格与保存】

产品货号	产品名称	包装规格	保存条件	保存期限
间充质干细胞无血清培养基基础	NC0103	500mL/瓶	2-8℃，避光保存	12个月
间充质干细胞无血清培养基添加剂2 (脐带-冻存细胞及高代数细胞传代)	NC0105.S	5 mL/瓶	-20℃，避光保存	12个月
干细胞温和消化酶	NC1004.1	500mL/瓶	2-8℃，避光保存	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增殖培养，同时还能保持其多向分化的潜能，如骨髓（BM-hMSC）、脐带（UCM-hMSC），**不可用于组织块法分离脐带原代细胞**。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、人白蛋白、转铁蛋白、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. 细胞传代所需的时间：3-4天（8000或10000 cells/cm²）。
2. 细胞表型
CD19、CD34和CD45为阴性表达，CD44、CD73、CD90和CD105为阳性表达。
3. 细胞形态
细胞为梭形，呈指纹状或旋涡状生长。
4. 产品指标
外观：淡黄色液体，pH值：25℃时，7.0-7.4，渗透压：280-320 mOsm/Kg，内毒素<0.25EU/mL。

【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，切勿强光及紫外照射。

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。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），于-20℃保存，每次配制适量完全培养基，避免培养基的浪费。

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5 mL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℃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：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10 mL PBS清洗细胞后弃去。

3. 加入2 mL 干细胞温和消化酶**常温下**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2-5分钟），立即加入温和酶使用量2倍体积（4mL）的细胞培养上清液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。

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15 mL 离心管中，1300 rpm（300g）离心5 min。弃上清，加入2 mL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. T75瓶接入15mL完全培养基。按密度8000 cells/cm²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）或侧表面加入，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“客户常问问题”）

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°C，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。

【使用环境2：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。

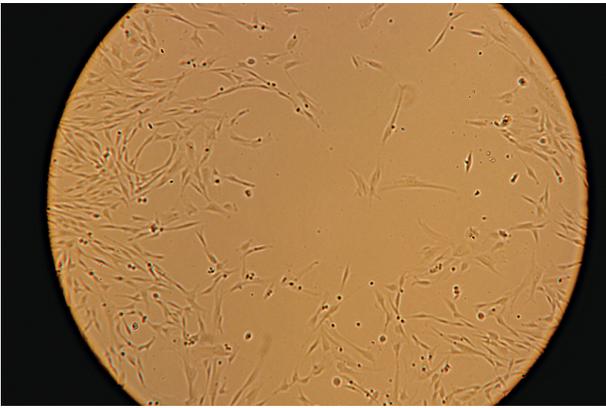
特别提示：

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”。

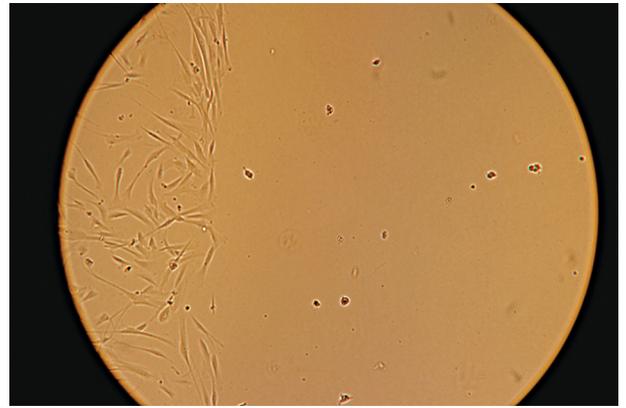
原因在于大多数用户使用的是常规TC处理（Tissue Cultured）的培养瓶或培养皿，培养瓶与其表面亲水基团的结合并不牢固，很容易在液体的冲刷下失去亲水基团，从而导致细胞难以贴壁生长。

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。



湖泊状的空白区域



河流状的空白区域

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细胞悬液缓慢加入10 mL 冷的完全培养基中。
4. 1000 rpm（180g）离心5 min，弃上清，加入2 mL完全培养基重悬细胞，台盼蓝染色计数，按密度8000 cells/cm²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%CO₂。
6. 24 h后，更换新鲜的、室温预温的完全培养基。如果使用的是Yocon无血清细胞冻存液（货号：NC1001.1），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/cm²），可能会出现细胞长不起来的现象。

【使用环境3：MSC细胞冻存】

- 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。
- 2) 1300 rpm (300g) 离心5 min，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灭菌的冻存管（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Yocon无血清细胞冻存液(货号 NC1001.1)，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) 12 h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，这些细胞原来在血清中培养。不知是否可以直接转入无血清培养基？

答：一般可以直接转入无血清培养基培养，需要测试下，如果确实不行，可以先使用原先的培养基复苏后，再转入此无血清培养基中。在传代时，要使用原先的传代流程，最后使用原培养基终止消化，离心去除消化酶后，再接种到此无血清培养基中。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8000 cells/cm²，P5后为10000 cells/cm²。

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。一直处于4°C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°C）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？

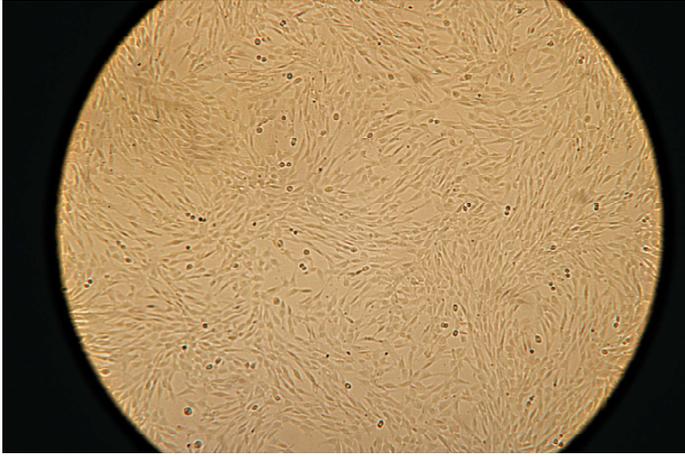
答：可以。

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。

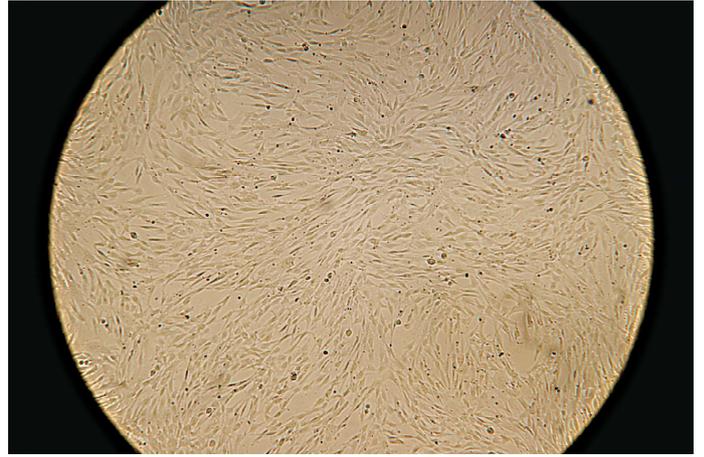
并且要求在14天时，更换新鲜培养液，否则会引起细胞贴壁效果不佳，生长效果不佳的现象。

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°C），将导致蛋白活性降低。

【本无血清培养基生长的MSC细胞形态】



无血清3代细胞



无血清15代细胞

【从冻存P0细胞复苏开始连续传代数据】

使用T25瓶复苏冻存的P0细胞（质控标准细胞株同源），接种密度为8000或10000 cells/cm²，连续使用T25瓶培养细胞，使用流式细胞仪计数。数据记录如下

代次	培养器皿	接种密度 (cells/cm ²)	培养基体积 (mL)	收获细胞数	扩增倍数	生长时间 (小时)	
P1	T25	8000	5	2.64E+06	13.22	72	
P2				2.53E+06	12.63	72	
P3				2.24E+06	11.2	72	
P4				2.09E+06	10.47	72	
P5				2.34E+06	11.7	72	
P6				2.97E+06	11.86	72	
P7		2.67E+06		10.68	72		
P8		2.57E+06		10.26	72		
P9		2.87E+06		11.46	72		
P10		10000		10000	3.05E+06	12.21	72
P11					3.24E+06	12.95	72
P12					2.78E+06	11.12	72
P13					2.72E+06	10.87	72
P14					1.77E+06	7.08	72
P15					1.36E+06	5.43	72
P16					1.41E+06	5.62	72
P17					1.29E+06	5.15	72
P18					1.36E+06	5.42	72
P19					1.14E+06	4.56	72
P20					1.02E+06	4.08	72

说明：P13以后延长半天到一天时间收获细胞可以维持较高的扩增倍数，或者适当提高细胞接种密度，也可以3天收获更多的细胞。

【从P1细胞开始连续传代数据】

代次	培养基	培养器皿	培养皿数	收获细胞数
P0	间充质干细胞无血清培养基套装1	150	2	1.22E+07

说明:

原代分离使用的培养基为间充质干细胞无血清培养基套装1（脐带-原代细胞分离及种子库构建），非本产品。

代次	培养器皿	接种密度 (cells/cm ²)	培养基体积 (mL)	收获细胞数	扩增倍数	生长时间 (小时)
P1	150皿	8000	30	1.47E+07	12.25	72
P2				1.52E+07	12.71	72
P3				1.60E+07	13.29	72
P4				1.49E+07	12.45	72
P5				1.62E+07	13.50	72
P6				1.76E+07	11.75	72
P7		10000		2.43E+07	16.17	72
P8				1.71E+07	11.42	72
P9				1.88E+07	12.50	72
P10				1.77E+07	11.79	72
P11				1.40E+07	9.31	72
P12				1.40E+07	9.31	72
P13	1.23E+07		8.20	72		
P14	1.75E+07		11.66	96		
P15	1.44E+07		9.62	96		
P16	1.14E+07		7.62	96		
P17	1.13E+07	7.54	96			
P18	1.07E+07	7.12	96			
P19	1.22E+07	8.15	96			
P20	9.36E+06	6.24	96			

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8000或10000 cells/cm²，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或不及此表。
- 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。



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

网址：www.yocon.com.cn

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

文件版本号:

2021 -V1.0



友康生物微信公众号