脐带间充质干细胞无血清培养套装说明书

【产品名称】

通用名称：脐带间充质干细胞无血清培养套装

英文名称：Serum-Free culture Kit for Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

【产品概述】

脐带间充质干细胞无血清培养套装是一款无血清、无异源成分的人脐带间充质干细胞培养产品。可用于脐带间充质干细胞的原代培养及多次传代，同时还能保持其多向分化的潜能，如分化为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的能力， 使用时无须添加血清或血清替代物。

【产品规格与保存】

产品名称	产品货号	规格	储存条件	有效期
脐带间充质干细胞 无血清基础培养基	PMK-M006B	500ml/瓶	2℃~8℃， 避光保存	12 个月
脐带间充质干细胞 无血清培养基添加剂	PMK-M006S	25ml/瓶	-20℃， 避光保存	12 个月

培养基添加剂可置于室温或 2℃~8℃解冻、摇匀，静置 5min，待溶液溶解均匀后进行使用或分装。反复冻融不超过 2 次，分装后可在-20℃保存。

将脐带间充质干细胞无血清培养基添加剂加入脐带间充质干细胞无血清基础培养基中，配制成脐带间充质干细胞无血清完全培养基。配制后， 应存储于2℃~8℃环境下，避光保存，并在 2 周内使用完毕。

【产品性能指标】

项目		企业内控标准
性状		淡黄色的液体
细菌内毒素		小于0.25EU/ml
支原体		阴性
无菌		应符合规定
培养效力	细胞形态	贴壁生长，伸展呈长梭形，形态均一
	细胞活率	应大于等于90%
	倍增倍数	应大于等于8倍（P3、P4）

【操作方法】

1.培养基的配制

取 500ml 脐带间充质干细胞无血清基础培养基，加入 25ml 脐带间充质干细胞无血清培养基添加剂，混合均匀即为脐带间充质干细胞无血清完全培养基；

注：如有需要，使用者可按照比例配制所需用量。

2.人脐带间充质干细胞原代细胞分离与培养

（1）取出脐带，将脐带外表面消毒并清洗去除血迹，剪成约 2cm~4cm 的小块，去除动静脉，制成边长 5mm~10mm 的小块，置于培养基瓶中排列整齐，每瓶铺入组织块数量建议如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶
组织块数量	15-20	30-40	35-50

注：需要区分脐带外表皮侧和华通胶侧，保证华通胶侧贴在培养瓶底部。

（2）将培养瓶翻转，置于 CO_2 培养箱中，37℃静置 60min。

（3）将培养瓶取出，向培养瓶中缓慢加入一定体积脐带间充质干细胞无血清完全培养基，放入 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。不同培养瓶建议添加培养基体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
添加体积（ml）	15	30	35	45

（4）第 7 天，每个培养瓶补加新鲜的一定体积脐带间充质干细胞无血清完全培养基。不同培养瓶建议添加培养基体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
添加体积（ml）	5	10	12	15

（5）补液后每 3 天进行半换液，吸出一半体积培养基弃掉，再加入等体积新鲜的脐带间充质干细胞无血清完全培养基。不同培养瓶建议吸出/添加培养基体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
吸出/添加体积（ml）	10	20	24	30

（6）第 13 天开始，观察组织块，如组织块周围细胞融合度达到 90%，可收获细胞，否则继续每 3 天进行半换液至组织块周围细胞融合度达到 90%。

3.脐带间充质干细胞传代培养与冻存

（1）将脐带间充质干细胞无血清完全培养基平衡至室温。

（2）清洗：取出细胞，吸出培养瓶中的培养基弃掉，每个培养瓶用一定体积 PBS 润洗细胞一次。不同培养瓶建议添加 PBS 体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
PBS体积（ml）	10-15	20-30	25-35	30-45

（3）消化：加入一定体积消化液，使消化液浸润整个细胞生长表面后，置于 CO_2 培养箱中，37℃消化 2min~6min，镜检观察，约 80%以上细胞回缩变圆并脱落时，加入**两倍体积**脐带间充质干细胞无血清完全培养基终止消化，吹打使细胞分散成单细胞，进行细胞计数。不同培养瓶建议添加消化液体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
消化液体积（ml）	3	6	7	9

注：若大部分细胞回缩变圆但不脱落，可轻轻拍打瓶壁使其脱落。若细胞不脱落，可延长消化时间。

（4）收集：300g，5min 离心收集细胞沉淀，弃掉上清。

（5）传代/冻存：若进行传代操作，用脐带间充质干细胞无血清完全培养基重悬细胞，按照合适的接种密度将细胞接种到已加入平衡至室温的一定体积脐带间充质干细胞完全培养基的培养瓶中，放入 37℃、5%CO_2 培养箱中继续培养。

建议传代密度：

细胞代次	P1-P5	P6-P10	P10以上
接种密度(cell/cm^2）	6000	8000	10000

建议培养基用量：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
添加体积（ml）	15-20	30-40	35-50	45-60

若冻存细胞，则将步骤（4）中收集的细胞沉淀，按冻存密度加入适量细胞冻存液轻柔吹打重悬细胞并混匀，转移至细胞冻存管中，冻存管置于程序降温盒中，-80℃过夜，24h 后转移至液氮中进行长期保存。

4.脐带间充质干细胞复苏

（1）将脐带间充质干细胞无血清完全培养基平衡至室温，每个培养瓶加入一定体积脐带间充质干细胞无血清完全培养基。不同培养瓶建议添加培养基体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
培养基体积（ml）	15	30	35	45

（2）取出冻存的细胞，置入 37℃水浴锅中快速解冻。

（3）立即吸取解冻后的细胞悬液转移 1ml 至 15ml 离心管中，逐滴加入4ml 脐带间充质干细胞无血清完全培养基，混匀后计数。

（4）根据计数结果，按照合适的接种密度将细胞接种到已加入一定体积脐带间充质干细胞无血清完全培养基的细胞培养容器中。

注：若细胞冻存液中不含 DMSO，可将细胞直接加入一定体积脐带间充质

干细胞无血清完全培养基中，且不用在第二天换液。

（5）将细胞放在 37℃， 5% CO_2 培养箱中培养。

（6）12h~24h 后，待细胞正常贴壁，弃去培养上清，加入新鲜的、已平衡至室温的一定体积脐带间充质干细胞无血清完全培养基。根据细胞生长情况， 每 3 天换液至细胞融合度达到 80%~90%。不同培养瓶建议添加培养基体积如下：

培养体系	T75瓶	T150瓶	T175瓶	T225瓶
培养基体积（ml）	15-20	30-40	35-50	45-60

【注意事项】

1.本产品不含抗生素，不建议添加抗生素。如果必须添加抗生素， 则应优化培养条件。

2.本产品含有人血小板裂解物。

3.本产品不含有酚红，不含有血清及异源成分，如有需要可额外添加。

4.为了达到理想的细胞培养效果，本产品可以直接使用，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。

5.本产品培养细胞的效果可能因细胞来源、储存条件、样本质量、操作者经验而有所差异。

6.本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断和治疗。此产品在临床诊断和治疗应用中的安全性和功效尚未确定。

7.产品应在指定的储存条件下存放，并在有效期内使用。