NcMission™ hMSC Medium V3.0
使用说明书

一、产品简介

NcMission™ hMSC Medium V3.0 是一种适用于原代人类间充质干细胞（Human Mesenchymal Stem Cell, hMSC），**无血清，无动物源成分**的完全培养基。hMSC 在本培养基中可以稳定增殖，同时细胞表面因子表达正常（CD73 + / CD90 + / CD105 +，CD14—/ CD34— / CD45— / CD79α—/ HLA-DR—）、保持三系分化潜能（成骨分化、软骨分化、脂肪分化）完备等特性。

二、产品信息

表 1： NcMission™ hMSC Medium V3.0 产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
NcMission™ hMSC Medium V3.0-包含：	**RP02010**	**1 Kit**	*
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium	RP02010-1	500 mL	2-8 ℃
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement	RP02010-2	25 mL	-80℃ 或 -20℃

***将基础培养基和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2-8 ℃中存储，2 周内用完。**

三、试剂材料

表 2：试剂&材料

试剂&材料	品牌（e.g.）	货号（e.g.）
NcMission™ hMSC Medium V3.0	首宁生物	RP02010
hMSC Cryopreservation Medium	首宁生物	SN-06-1310
TrypLE Express Enzyme (1X), no phenol red	Thermo Sci.	12604013
T75/T175/T225培养瓶	Thermo Sci.	156499/159910/159934
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL冻存管	Thermo Sci.	N/A
10 μL/200 μL/1000 μL吸头	Rainin .	N/A

四、完全培养基配制

4.1 在 4 ℃解冻 NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement，**不要在 37 ℃条件下解冻**。

4.2 在生物安全柜中，使用无菌移液管混匀下列两种成份配制完全培养基。

NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium：500 mL

NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement：25 mL

4.3 完全培养基可置于 2-8 ℃储存，2 周内使用。

Tips：可根据实际用量将Supplement 分装后冷冻保存。例如将 Supplement 分装 5 mL × 5 支。使用前解冻 5 mL Supplement 与 100 mL Basal Medium 混合，配成完全培养基，2 周内使用。

Supplement 冻融总次数不能超过 2 次。

五、原代 MSC 分离（以脂肪组织分离原代MSC 操作为例）

5.1 脂肪采集：按照诊所要求采集脂肪组织，4 ℃ 运输，24 小时之内进行处理。

5.2 无菌条件下吸取脂肪抽提物，用 DPBS（或生理盐水）冲洗数次，去除吸脂手术所用药物及血细胞至无血色，将组织用无菌眼科剪刀和镊子清理干净后剪成约 1-2 mm^3 大小。

5.3 用 0.1% II 型胶原酶 37℃ 震荡消化 45-60 min，800 × g 离心处理10 min；上层为未消化的脂肪组织及油脂，小心将吸管伸至下层吸取含细胞的消化液，用70 μm细胞筛过滤；滤出液体 600 × g 离心处理 8 min；弃去上清，细胞沉淀用 2 倍体积DPBS（或生理盐水）悬浮，600 × g 处理离心 5 min ；同样条件重复离心洗涤细胞沉淀 1 次。

5.4 加入**NcMission hMSC 完全培养基，**调整细胞密度为 2 × 10^4 cells/mL，接种于 T25 cm^2 的培养瓶中，置于 37 ℃，5% CO_2 的培养箱中培养。

5.5 48 h 后更换新培养基，此后每 3 天换一次液；观察生长情况并记录，培养细胞达 90% 汇合度时，进行传代培养。

5.6 细胞消化：吸去培养上清和组织块，加入生理盐水清洗 1 次吸弃，加入预温到 37℃的**TrypLE**，消化液用量参考表 4，37℃消化 5-7 分钟**（中途请勿移动）**，随后加入等体积**NcMission hMSC 完全培养基（或生理盐水）**终止消化，收集细胞离心（200 × g，5 min）。

5.7 细胞计数：加入 5-10 mL 生理盐水重悬细胞，100 μm 细胞筛过滤一次，取样计数：细胞活率应 ≥ 90%；离心收集细胞（**200 × g，5 min**）。

5.8 细胞接种：加入 5 mL **NcMission hMSC 完全培养基**重悬细胞。按照合适的密度（**6000-8000 /cm²**）将细胞接种到培养容器中，加入适量（**参照表 3**）预温的新鲜 **NcMission hMSC 完全培养基**。水平十字摇匀三次，置于 37 ℃，5% CO_2 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次，培养。连续培养 3 天，细胞汇合度 **80-85%** 可选择传代。

5.9 细胞冻存：如需冻存细胞，**步骤 5.6** 离心后加入冻存液按照一定密度重悬细胞（例：2×10^6 /管），转入梯度降温盒，-80 ℃ 过夜，隔天转入液氮长期保存。

六、复苏 hMSC（以 T75 培养瓶操作为例，操作程序同样适用于其他培养容器）

6.1 将水浴锅预热至 37 ℃。提前取出适量 **NcMission hMSC 完全培养基**恢复至室温。

6.2 取出冻存的细胞，置于干冰上运至细胞间。干冰中取出细胞，置入 37 ℃水浴锅中摇晃解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失（剩余绿豆大小冰晶）时取出。

6.3 立即吸取细胞悬液至 15 mL 离心管中，逐滴加入 10 mL 恢复至室温的 **NcMission hMSC 完全培养基**，轻柔混匀。离心（**200 × g，5 min**）收集细胞，随后吸去上清，加入 5 mL **NcMission hMSC 完全培养基**重悬细胞，精确计数。

6.4 按照合适的接种密度（**6000-8000 /cm²**）将细胞接种到培养容器中，加入适量（**参照表 3**）恢复至室温的新鲜 **NcMission hMSC 完全培养基**。水平十字摇匀三次，置于 37 ℃，5% CO_2 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次，培养。连续培养 3 天，细胞汇合度 **80-85%** 可选择传代。

表 3：hMSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器	底面积	NcMission hMSC 完全培养基	TrypLE
6孔板	9.6 cm^2/孔	2 mL/孔	1 mL/孔
T75 培养瓶	75 cm^2	15 mL	4 mL
T175 培养瓶	175 cm^2	25 mL	8 mL
T225 培养瓶	225 cm^2	35 mL	10 mL

七、传代&冻存 hMSC（以 T75 培养瓶操作为例，操作程序同样适用于其他培养容器）

7.1 传代时机的选择：不同的hMSC 生长速度有差异，推荐以细胞汇合度选择准确传代时机，细胞汇合度 **80-85%** 左右即可传代。

7.2 提前 30 min 取出 **NcMission hMSC 完全培养基**、细胞消化液（**科研级培养：胰蛋白酶溶液**+**胰蛋白酶抑制剂；临床级培养：TrypLE）**恢复至室温，

7.3 吸弃培养基，使用DPBS（不含钙镁）清洗 1 遍，加入预温到 37 ℃ 的**TrypLE**（消化液用量参考**表 3**），37 ℃ 消化 5-7 分钟**（中途请勿移动）**，随后加入等体积**NcMission hMSC 完全培养基**终止消化，收集细胞离心（**200 × g，5 min**）。

7.4 加入 5 mL 生理盐水重悬细胞，100 μm 细胞筛过滤一次，取样计数：细胞活率应 ≥90%；离心收集细胞（**200 × g，5 min**）。

7.5 加入 5 mL **NcMission hMSC 完全培养基**重悬细胞。按照合适的密度（**6000-8000 /cm^2**）将细胞接种到培养容器中，加入适量（**参照表 3**）预温的新鲜 **NcMission hMSC 完全培养基**。水平十字摇匀三次，置于 37℃，5% CO_2 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次，培养。连续培养 3 天，细胞汇合度 **80-85%** 可选择传代。

7.6 细胞冻存：如需冻存细胞，**步骤 7.3** 后加入冻存液按照一定密度重悬细胞（**例：2×10^6 cells/mL**），转入梯度降温盒，-80 ℃ 过夜，隔天转入液氮长期保存。

八、其它培养体系中hMSC更换为NcMission培养条件的适应

体系转换到NcMission™ hMSC Medium V3.0 时，建议**原培养基进行复苏或传代**，随后在Day1 更换成 NcMission™ hMSC Medium V3.0，一代后可适应新的体系。