

科研级 hMSC 细胞株

操作使用说明

一、产品简介

原代人类间充质干细胞 (hMSC)、间充质干细胞-荧光标记-自主研发, 利用基因编辑技术, 将特定基因片段插入到目的基因组中, 细胞可以高效的表达荧光蛋白或荧光素酶, 所有细胞染色体核型正常、表面因子表达正常 (CD73+/ CD90+/ CD105+, CD14-/ CD34-/ CD45-/ CD79α-/ HLA-DR-), 体内可实现细胞移植后的动物活体成像。适用于各种体外实验、药物筛选和安全性评估、以及疾病动物模型细胞移植医疗等方面的研究和应用。

二、产品信息

表 1: 科研级 hMSC 细胞株* 产品体系

产品信息	货号	规格	说明
UC-MSC (P2)	RC02003-A	1×10 ⁶ /管	脐带来源MSC细胞, 细胞增值稳定。
iMSC-luc-GFP(P2)	RC02011	1×10 ⁶ /管	ROSA26位点插入Luc和GFP基因片段, 核内绿色荧光, 并表达Luciferase
iMSC-Anterase2 (P2)	RC02012	1×10 ⁶ /管	ROSA26位点插入Anterase2 基因片段, 高效表达Anterase2, 并表达Anterase2
ucMSC-luc-GFP(P3)	RC02013	1×10 ⁶ /管	脐带MSC细胞, 随机插入Luc和GFP基因片段, 核内绿色荧光, 并表达Luciferase
ucMSC-Anterase2(P3)	RC02014	1×10 ⁶ /管	脐带MSC细胞, 随机插入Luc和GFP基因片段, 核内绿色荧光, 并表达Luciferase

*本产品仅供科研使用, 不可使用于诊断和治疗等医疗应用。

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 高效冻存液	首宁生物	SN-06-1310
TrypLE Express Enzyme (1X), no phenol red	Thermo Sci.	12604013
T75/T175/T225 细胞培养瓶	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
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、完全培养基配制

- 4.1 在 4℃解冻 NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement (21×), **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 (21×): 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 分离培养 (以脐带组织块法分离原代 MSC 操作为例)

- 5.1 脐带采集: 采集脐带后放入脐带保存液 (**NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium**), 4℃运输, 24 小时之内进行处理。
- 5.2 材料准备: 准备新鲜配置的 **NcMission hMSC 完全培养基**, 无菌培养皿若干 (6-10 个), 医用消毒酒精 1 瓶, 生理盐水 1 瓶, 工具箱 (2 把剪刀、2 把镊子), 和取回的脐带 (置于脐带保存液中) 一起转入生物安全柜。
- 5.3 脐带消毒: 吸弃脐带保存瓶中的脐带保存液, 加入医用消毒酒精 (75%) 完全浸没脐带, 浸泡消毒 2 分钟。
- 5.4 脐带清洗: 取出脐带置于无菌培养皿中, 使用生理盐水清洗 2-3 次, 将残留脐血清洗干净。
- 5.5 脐带剪段: 将脐带剪成约 2-3 cm 小段, 再次使用生理盐水清洗 2-3 次, 将残留脐血清洗干净。
- 5.6 脐带分离: 沿静脉剪开脐带并去除静脉壁, 完全去除静脉壁后脐带会完全展开, 随后去除 2 根动脉, 完全去除静脉和动脉后, 小心分离华通氏胶, 注意避开表皮。
- 5.7 称重: 将分离的华通氏胶转入 50 mL 离心管中, 加入 3-5 滴生理盐水保持湿润, 使用弯头手术剪将华通氏胶剪碎至 2-3 mm³ 大小, 随后称重。
- 5.8 接种: 剪碎的华通氏胶加入 **NcMission hMSC 完全培养基** 重悬, 参照表 3, 接种到培养瓶中, 放入培养箱中 (37℃, 5% CO₂, 饱和湿度) 培养。
- 5.9 第 1 次换液: 接种后第 5 天, 开始有细胞从组织块爬出, 将培养瓶直立倾斜 30 度, 让组织块自然沉降到培养瓶一角, 吸弃上清, 缓慢加入新鲜复温的 **NcMission hMSC 完全培养基**, 轻柔混匀, 放回培养箱继续培养。
- 5.10 第 2 次换液: 接种后第 9-10 天, 爬出细胞状态良好, 开始堆叠生长, 将培养瓶直立倾斜 30 度, 让组织块自然沉降到培养瓶一角, 吸弃上清, 缓慢加入新鲜复温的 **NcMission hMSC 完全培养基**, 轻柔混匀, 放回培养箱继续培养。
- 5.11 传代时机: Day12 左右可传代, 可收集约 2-3×10⁶ cells/T75 (0.5 g 华通氏胶)。
- 5.12 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。加入复温的消化液 (科研级 **0.125% 胰蛋白酶消化液**、临床级 **TrypLE (0.5×)**), 消化液用量参考表 4, 37℃消化 4-5 分钟, 随后加入等体

积酶抑制剂/NcMission hMSC 完全培养基终止消化，收集细胞离心（**200 × g, 5 min**）。

5.13 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**）。

5.14 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（**5000-7000 /cm²**，推荐 **6000 /cm²**）将细胞接种到细胞培养容器中，加入适量（参照表 4）预温的新鲜 **NcMission hMSC 完全培养基**。水平十字摇匀三次，置于 37℃，5% CO₂ 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。

5.15 细胞冻存：如需冻存细胞，步骤 5.13 离心后加入冻存液按照一定密度重悬细胞（例：2×10⁶ /管），转入梯度降温盒，-80℃过夜，隔天转入液氮长期保存。

表 3：组织块法分离原代 MSC 试剂推荐用量

操作步骤	T75 培养瓶	T175 培养瓶	T225 培养瓶
华通氏胶接种量	0.5 g	1 g	1.5 g
接种时培养基用量	10 mL	15 mL	20 mL
第1次换液 (Day5)	13 mL	20 mL	30 mL
第2次换液 (Day9-10)	15 mL	25 mL	35 mL

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（**5000-7000 /cm²**，推荐 **6000 /cm²**）将细胞接种到细胞培养容器中，加入适量（参照表 4）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% CO₂ 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 4：hMSC 传代&培养操作 试剂推荐用量

培养容器	底面积	NcMission完全培养基	胰酶/胰酶抑制剂
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, 加入复温的消化液 (科研级 **0.125%胰蛋白酶消化液**、临床级 **TrypLE (0.5×)**, 消化液用量参考**表 4**), 37°C消化 4-5 分钟, 随后加入等体积**胰酶抑制剂** /**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 (**5000-7000 /cm², 推荐 6000 /cm²**) 将细胞接种到细胞培养容器中, 加入适量 (**参照表 4**) 预温的新鲜 **NcMission hMSC 完全培养基**。水平十字摇匀三次, 置于 37°C, 5% CO₂ 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: 2×10⁶ cells/mL**), 转入梯度降温盒, -80°C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。