NcMission™ M30 MSC 扩增培养基（无酚红）使用说明书

一、产品简介

NcMission™ M30 MSC 扩增培养基（无酚红）是安徽首宁生物科技有限公司原研的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™ M30 MSC 扩增培养基（无酚红）产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）包含：	**SN-02-0030**	**1 Kit**	**2℃ ~ 8℃***
NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）基础培养基	SN-00-0003	500 mL	2℃ ~ 8℃
NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）无血清添加物	SN-02-0031	25 mL	-20℃或-80℃

***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™ M30 MSC 扩增培养基（无酚红）	首宁生物	SN-02-0030
hMSC 高效冻存液	首宁生物	SN-06-1310
hMSC 温和消化液	首宁生物	SN-02-0040
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™ M30 MSC扩增培养基（无酚红） 无血清添加物（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™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）基础培养基：500 mL

NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红） 无血清添加物：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 MSC 无血清添加物分装后冷冻保存。例如将 MSC 无血清添加物分装5 mL×5 支。使用前解冻5 mL MSC 无血清添加物与100 mL MSC 基础培养基混合，配成完全培养基，2 周内使用。MSC 无血清添加物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™ M30 MSC 基础培养基**），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™ M30 MSC 扩增培养基**，无菌培养皿若干（6-10个），医用消毒酒精 1 瓶，生理盐水 1 瓶，工具盒（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 mm^3大小，随后称重。

5.8 接种：剪碎的华通氏胶加入 **NcMission™ M30 MSC 扩增培养基**重悬，参照**表 3**，接种到培养瓶中，放入培养箱中（37℃，5% CO_2，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™ M30 MSC 扩增培养基**，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™ M30 MSC 扩增培养基**，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 2-3×10^6cells/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 hMSC 温和消化液（消化液用量参考**表 4**），37℃消化 4-5 分钟，随后加入等体积**NcMission™ M30 MSC 扩增培养基**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™ M30 MSC 扩增培养基**重悬细胞。按照合适的密度（**5000-7000/cm^2，推荐 6000/cm^2**）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™ M30 MSC 扩增培养基**。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。

5.15 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：2×10^6/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™ M30 MSC 扩增培养基**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™ M30 MSC 扩增培养基**， 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™ M30 MSC 扩增培养基**重悬细胞，精确计数。

6.4 按照合适的接种密度（**5000-7000/cm^2，推荐 6000/cm^2**）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™ M30 MSC 扩增培养基**。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 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 提前取出 **NcMission™ M30 MSC 扩增培养基**、hMSC 温和消化液恢复至室温；

7.3 吸弃培养基，使用 DPBS（不含钙镁）清洗 1 遍，加入复温的 hMSC 温和消化液（消化液用量参考**表 4**），37℃消化 4-5 分钟，随后加入等体积 **NcMission™ M30 MSC 扩增培养基**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™ M30 MSC 扩增培养基**重悬细胞。按照合适的密度（**5000-7000/cm^2，推荐 6000/cm^2**）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™ M30 MSC 扩增培养基**。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：2×10^6cells/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™ M30 MSC 扩增培养基**时，建议**原培养基进行复苏或传代**，随后在 Day1 更换成 **NcMission™ M30 MSC 扩增培养基**，一代后可适应新的体系。