

# 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— / CD79a—/ 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 °C        |
| NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement   | RP02010-2 | 25 mL  | -80°C 或 -20°C |

\*将基础培养基和添加物混匀配置成完全培养基, 可在 2-8 °C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 °C解冻 NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement, 不要在 37 °C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 °C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 °C 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<sup>3</sup>大小。

5.3 用 0.1% II 型胶原酶 37°C 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  $2 \times 10^4$  cells/mL, 接种于 T25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 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°C的**TrypLE**, 消化液用量参考表 4, 37°C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  $\mu\text{m}$  细胞筛过滤一次，取样计数：细胞活率应  $\geq 90\%$ ；  
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 /cm<sup>2</sup>**) 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 °C，5% CO<sub>2</sub> 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： $2 \times 10^6$  /管)，转入梯度降温盒，-80 °C 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 °C。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 °C 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 /cm<sup>2</sup>**) 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 °C，5% CO<sub>2</sub> 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 <sup>2</sup> /孔 | 2 mL/孔               | 1 mL/孔 |
| T75 培养瓶  | 75 cm <sup>2</sup>     | 15 mL                | 4 mL   |
| T175 培养瓶 | 175 cm <sup>2</sup>    | 25 mL                | 8 mL   |
| T225 培养瓶 | 225 cm <sup>2</sup>    | 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 °C 的**TrypLE** (消化液用量参考表 3), 37 °C 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<sup>2</sup>**) 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°C, 5% CO<sub>2</sub> 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<sup>6</sup> 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。