

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—/ 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™ 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	*
NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）基础培养基	SN-00-0003	500 mL	2-8 °C
NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）无血清添加物	SN-02-0031	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™ 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
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
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、完全培养基配制

4.1 在 4°C解冻 NcMission™ M30 MSC扩增培养基（无酚红） 无血清添加物（21×）， 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™ 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 °C储存，2 周内使用。

Tips: 可根据实际用量将 无血清添加物 分装后冷冻保存。例如将 无血清添加物分装5 mL×5 支。使用前解冻5 mL 无血清添加物 与100 mL 基础培养基混合，配成完全培养基，2 周内使用。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扩增培养基（无酚红）基础培养基），4°C运输，24 小时之内进行处理。

5.2 材料准备：准备新鲜配置的 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 mm³大小，随后称重。

5.8 接种：剪碎的华通氏胶加入 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°C，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 完全培养基，轻柔均匀，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 完全培养基，轻柔均匀，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 hMSC 温和消化液（消化液用量参考表 4），37°C 消化 4-5 分钟，随后加入等体积 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 完全培养基 重悬细胞。按照合适的密度（5000-7000 /cm²，推荐 6000 /cm²）将细胞接种到培养容器中，加入适量（参照表 4）预温的新鲜 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。

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°C 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°C。提前取出适量 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 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 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) 将细胞接种到培养容器中，加入适量 (参照表 4) 恢复至室温的新鲜 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。

表 4: hMSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器	底面积	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 **完全培养基**、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°C 消化 4-5 分钟，随后加入等体积 **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 **完全培养基** 重悬细胞。按照合适的密度 (**5000-7000 /cm²**，推荐 **6000 /cm²**) 将细胞接种到培养容器中，加入适量 (**参照表 4**) 预温的新鲜 **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™ M30 MSC扩增培养基（无酚红）**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（无酚红），一代后可适应新的体系。