

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	2°C ~ 8°C*
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium	RP02010-1	500 mL	2°C ~ 8°C
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement	RP02010-2	25 mL	-20°C或-80°C

*将基础培养基和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2°C ~ 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
MSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP02004
0.25% 胰蛋白酶消化液	首宁生物	RP02011
胰蛋白酶抑制剂	首宁生物	RP02012
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°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 (**Basal Medium**), 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 **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°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 **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 $2-3 \times 10^6$ 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°C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 $\geq 90\%$ ；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°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： 2×10^6 /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 (Day 5)	13 mL	20 mL	30 mL
第2次换液 (Day 9-10)	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 **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 (**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°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	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： **2×10^6 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。