

NcMission™ hMSC Medium V3.0

操作使用说明

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
hMSC Cryopreservation Medium	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 μ L/200 μ L/1000 μ L 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 分离培养（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 mm³ 大小。

5.3 用 0.1% II 型胶原酶 37°C 震荡消化 45-60min, 800×g 离心处理 10min; 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 μ m 细胞筛过滤; 滤出液体 600×g 离心处理 8min; 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 5min; 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 2×10^4 cells/ml, 接种于 T25 cm² 的培养瓶中, 置于 37°C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。

5.5 48h 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 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）。
- 5.8 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/cm²）将细胞接种到细胞培养容器中，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% 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。
- 5.9 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：2×10⁶/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/cm²）将细胞接种到细胞培养容器中，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% 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 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 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，加入预温到37℃的**TrypLE**（消化液用量参考**表 3**），37℃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/cm²**）将细胞接种到细胞培养容器中，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℃，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：2×10⁶cells/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。