

产品说明书

人胎盘间充质干细胞无血清基础培养基

产品货号: H9047

产品规格: 450 mL

储存条件

2°C-8°C储存, 有效期见外包装。

产品介绍

胎盘间充质干细胞的无血清培养基除了包括 DMEM 基础培养基外, 还包括如下组分: 维生素 H、谷胱甘肽、重组人胰岛素、人血清白蛋白、转铁蛋白、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、干细胞生长因子、人干细胞因子和厚朴酚。本无血清培养基具有安全性高, 可以显著提高胎盘间充质干细胞的增殖能力的优点, 而且在培养过程中的可以较好的保持胎盘间充质干细胞的细胞形态和其干细胞特性。

使用方法

实验准备

完全培养基配制:

1. 添加剂处理: 2-8°C溶解添加剂, 时间约为过夜。添加剂融化后轻轻充分摇匀, 分装或直接按比例添加到基础培养基中, 分装后添加剂立即存储于-20 °C至-80°C, 避免反复冻融。注意: 刚融化的培养基添加剂可能会有溶解不充分, 出现类似沉淀物, 请务必充分混匀, 以保证添加的均匀度。
 2. 完全培养基配制: 将添加剂以 10%比例加入到基础培养基中, 充分混匀, 即配制成人胎盘间充质干细胞完全培养基。完全培养基在 2-8°C可稳定储存 2-3 周, 超过 3 周的完全培养基请谨慎使用。
- 注意: 混合成人胎盘间充质干细胞培养基后必须充分混匀, 2-8°C保存。整个过程确保无菌操作, 各试剂开封前以 75%

酒精擦拭表面。完全培养基使用前务必室温复温至少 30 分钟, 该操作适用于下列所有用到完全培养基的步骤。

自备试剂:

- 消化液 (0.25%Trypsin-0.04%EDTA 或其他)
- 无钙镁的磷酸盐缓冲液 (DPBS)
- 细胞冻存液

操作方法

原代细胞培养 (羊水、全血、全骨髓培养发法、酶消化法):

1. 该部分以单细胞悬液为操作起始。单细胞获取方式包括但不限于使用胰酶、胶原酶、分散酶等酶消化法从脂肪、脐带、羊膜、皮肤等组织获得; 使用离心法直接从羊水、全血、全骨髓获得。
2. 原代接种: 以上方法获得的细胞沉淀, 漩涡震荡使其分散为单个细胞, 加入适量的完全培养基, 充分混匀。200 g 离心 5-10 分钟。弃去上清, 漩涡震荡使沉淀分散为单个细胞, 加入适量的完全培养基, 充分混匀。按照一定的细胞密度接种与培养器皿中。37°C、5%CO₂、饱和湿度静置培养 48 小时。该时间段内请勿移动培养器皿, 也无需观察。48 小时后观察细胞, 根据情况选择半量或全量更换新鲜完全培养基。
3. 换液培养: 后每 48 小时更换新鲜培养基。观察细胞, 弃去原培养上清。若悬浮细胞较多, 则可用 DPBS 轻轻洗涤细胞 1-2 次。添加新鲜完全培养基继续培养。
4. 传代: 原代细胞传代以克隆大小和克隆中心细胞密度为标准。若克隆中心细胞密度较大, 则不论整个培养器皿是否长满均应进行传代操作。弃去培养上清, 加入适量的 DPBS, 轻轻晃动后弃去 DPBS, 重复洗涤 2-3 次。加入适量的 0.25%



胰蛋白酶消化液室温消化 2 分钟，加入 2 倍体积的完全培养基终止消化。用移液管、吸管或移液枪头等轻轻吹打细胞，使细胞从培养皿表面脱落。

注意：足量的胰酶消化，室温消化不宜超过 2 分钟，吹打细胞时也不宜力量过大，轻轻吹打即可，不脱落细胞直接丢弃。

5. 冻存：参照下述“hMSC 细胞冻存”。

原代细胞培养（组织块法）：

1. 该部分以组织块作为起始。组织块包括但不限于脐带、羊膜、皮肤等来源的切成 1-3 mm³ 大小的组织块。

2. 原代接种：用缓冲液清洗过的组织块，用适量的完全培养基悬浮，300 目无菌滤网过滤或 200 g 离心 5-10 分钟，收集组织块。用适量的完全培养基重新悬浮组织块，均匀接种于培养器皿中，37℃、5%CO₂、饱和湿度静置培养。48 小时内最好不要对培养器皿进行任何移动。

3. 换液：48 小时后进行半量或全量更换新鲜完全培养基，具体视情况而定。每 2 天更换新鲜培养液。组织块周围有密度较高的细胞时，可以选择去除组织块。

4. 传代：参照上述“传代”方法。

5. 冻存：参照下述“hMSC 细胞冻存”。

hMSC 细胞传代培养（非原代）：

1. 在显微镜下观察细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。

2. 弃去培养上清，加入 DPBS 溶液清洗 1 次，加入细胞消化液使其完全覆盖培养器皿底部。

3. 室温孵育 1 分钟，轻轻拍打培养器皿，显微镜下观察大部分细胞从培养器皿底部脱落后立即停止消化。

4. 加入消化液 2 倍体积的人间充质干细胞完全培养基，用移液器轻轻吹打培养器皿地面未完全脱离的细胞，使细胞完全脱落并均匀分散。

5. 将细胞悬液转移到离心管中，200 g 离心 5 分钟。

6. 弃上清，加入完全培养基，重悬细胞，计数。1: 3-1: 6 比例传代，均匀铺在培养器皿中，置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

hMSC 细胞复苏：

1. 从液氮中取出冻存的 hMSC 细胞，迅速将冻存管/冻存袋放入复苏装置或 37℃水浴快速融化。

2. 将解冻后的细胞悬液缓慢加入适量完全培养基（冻存体积与培养基的体积比为 1: 5-1: 10）。

3. 200 g 离心 5 分钟，弃去上清，加入适量的完全培养基重悬细胞。

4. 将细胞均匀铺到培养器皿中，摇动培养器皿使细胞均匀分布，37℃、5%CO₂、饱和湿度培养，24 小时后观察细胞状态。

5. 24 小时后更换新鲜完全培养基继续培养，以后每 2 天更换新鲜完全培养基。

注意：细胞传代所需的时间：2-4 天。hMSC 消化极易过度，建议稀释 0.25%胰酶消化液一倍，且严格控制消化时间。

hMSC 细胞冻存

1. 细胞达到 90%汇合度，弃去原有培养基，DPBS 清洗 1 次。

2. 加入细胞消化液使其完全覆盖培养器皿底部，室温孵育 1 分钟，轻轻拍打培养器皿，显微镜下观察大部分细胞从培养器皿底部脱落后立即停止消化。

3. 加入消化液 2 倍体积的人间充质干细胞完全培养基，用移液器轻轻吹打培养器皿地面未完全脱离的细胞，使细胞完全脱落并均匀分散。

4. 将细胞悬液转移到离心管中，200 g 离心 5 分钟，弃去上清。

5. 加入适量细胞冻存液，调整细胞冻存密度在

1×10⁶ cells/cm² 左右，每支冻存管分装 0.5-1 mL，使用冻存袋冻存请自行根据需要选择冻存方案。

6. 程序降温仪冻存，或放入冻存盒然后置于-80℃或直接放入-80℃，24 小时后转入液氮中长期保存。

注意：此处消化液为胰酶消化液。细胞冻存方法有多种，此处介绍的冻存方法为含有 DMSO 的冻存方式。其他冻存方式请根据需要自行选择。

注意事项

以上所有操作均在无菌细胞培养室进行，细胞开放操作要在生物安全柜内进行；培养器皿包括培养皿、培养瓶、培养板、细胞工厂等，请根据实验需要自行选择；hMSC 切忌消化过



度，过度的消化会导致细胞快速老化，且失去部分或全部分化能力；实验室具体可操作的传代次数请自行分析判断，并建议以分化能力进行判别；该培养基仅用于 hMSC 细胞培养，操作规程仅作为参考。

