

## ncMission hMSC Medium V3.0

### 一、产品简介

**ncMission hMSC Medium** 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- / CD79 $\alpha$ - / 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 产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
ncMission hMSC Medium 套装包含:	RP02010	1 Kit	2°C ~ 8°C*
ncMissoin Basal Medium	RP02010-1	500 mL	2°C ~ 8°C
ncMissoin Supplement (21 $\times$ )	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	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 $\mu$ l/200 $\mu$ l/1000 $\mu$ l 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 Supplement (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 Basal Medium: 500 mL**

**ncMission Supplement (21×): 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 (**ncMission 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 mm<sup>3</sup> 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% CO<sub>2</sub>, 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 2-3×10<sup>6</sup> 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 ≥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/cm<sup>2</sup>**，**推荐 6000/cm<sup>2</sup>**）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% 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。

5.15 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<sup>6</sup>/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 **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/cm<sup>2</sup>**，**推荐 6000/cm<sup>2</sup>**）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% 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 4: hMSC 传代&amp;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 <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/cm<sup>2</sup>**, 推荐 **6000/cm<sup>2</sup>**) 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% 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 时, 建议**原培养基进行复苏或传代**, 随后在 Day1 更换成 ncMission hMSC Medium, 一代后可适应新的体系。