

## 间充质干细胞无血清培养基

### MSC NutriStem® XF Medium

一、目的：利用间充质干细胞无血清培养基培养分离脐带间充质干细胞。

二、材料：新生儿脐带

三、主要仪器：医用手术器械，生物安全柜，CO<sub>2</sub>培养箱，6孔培养板，T25培养瓶

四、试剂：

表 1 MSC NutriStem® XF Medium

用途	品牌	货号	名称	规格	保存条件
MSC 培养基	Biological Industries	05-200-1A	MSC NutriStem® XF Basal Medium MSC 无血清基础培养基	500ml	4°C
	Biological Industries	05-201-1U	MSC NutriStem® XF Supplement MSC 无血清添加剂	3ml	-20°C
细胞贴壁	Biological Industries	05-752-1F	MSC Attachment solution (100X) MSC 贴壁试剂	1 ml	4°C
	Biological Industries	PLTGOLD010R	PLTGold® Human Platelet Lysate 血小板裂解物**	10ml	-20°C
	**已知血小板裂解物含有大量的外泌体，用户可依照实验目的选用合适的贴壁试剂。				
细胞传代	Biological Industries	03-079-1A	Recombinant Trypsin-EDTA Solution 重组胰酶-EDTA	500ml	RT
	Biological Industries	03-048-1C	Soybean Trypsin Inhibitor (50X) 大豆胰酶抑制剂	20 ml	-20°C
	Biological Industries	02-023-1A	DPBS (w/o Ca & Mg) DPBS 缓冲液	500 ml	RT
辅助试剂	Biological Industries	05-712-1B	MSC Freezing Solution MSC 冻存液	100 ml	4°C
	Biological Industries	03-031-1B	Penicillin-Streptomycin Solution (100X)青链双抗	100ml	-20°C

#### 技术支持

电话：4008203979 干细胞应用专家 QQ：2335494955

BI 中国市场部：上海逍鹏生物科技有限公司

电话：021-58785545 www.xpbiomed.com



## 五、实验前准备:

### 5.1 完全培养基的准备

5.1.1 冻存的 MSC NutriStem® XF Supplement 在室温或 2-8°C解冻, 避免反复冻融。

5.1.2 配制: MSC NutriStem® XF Basal Medium (培养基): MSC NutriStem® XF Supplement (添加物): 青链双抗=500ml: 3ml: 5ml, 4°C保存, 2周内使用。

**注 1:** 双抗非必须, 建议原代 (P0) 时使用。

**注 2:** 培养基含 L-Glutamine, 贮藏时避免长期照光。

### 5.2 包被培养皿

或跳过此步骤, 直接加 2%血小板裂解物, 促进 MSC 细胞贴壁与生长。

5.2.1 使用 DPBS 溶液 (货号: 02-023-1A), 将 MSC 贴壁试剂稀释 100 倍 (1:100)。

5.2.2 参照表 3, 加入适量的 1X MSC 贴壁试剂涂层培养皿或板。

**表 3 涂层过程中贴壁试剂建议使用量**

培养器皿	表面积 cm <sup>2</sup> /孔或瓶	1X MSC 贴壁试剂使用体积
96 孔板	0.34	0.05~0.1 ml
24 孔板	1.9	0.2~0.4 ml
12 孔板	3.9	0.4~0.8 ml
6 孔板/ 35 cm 培养皿	9.6	1~2 ml
T25 瓶/ 60 cm 培养皿	25	2.5~5 ml
T75 瓶	75	7.5~15 ml

**注 1:** 涂层的培养皿需在无菌条件下 2°C-8°C储存, 需在一周内使用。(标示红色为原厂建

### 技术支持

电话: 4008203979 干细胞应用专家 QQ: 2335494955

BI 中国市场部: 上海逍鹏生物科技有限公司

电话: 021-58785545 www.xpbiomed.com



议使用量，经过实验测试后可减半使用)

**注 2：**包被期间，注意包被液不可以干掉！

**注 3：**若使用预包被培养瓶（Corning 的 CellBind 系列，或 NEST TC 处理系列），步骤 5.2 的包被可略过。

**5.2.3** 轻轻摇动培养皿，确认贴壁试剂均匀分布在培养皿表面后，用封口膜包裹涂层的培养皿。

**5.2.4** 在 2-8°C 孵育过夜；或者在 CO<sub>2</sub> 培养箱，37°C，至少孵育 30 分钟。

**5.2.5** 接种前，吸除贴壁试剂，再用 DPBS 轻轻冲洗培养皿，即可接种细胞。

### 5.3 制备 1X 大豆胰酶抑制剂

**5.3.1** 使用无菌的 DPBS，将 50X 大豆胰酶抑制剂（03-048-1C）稀释成 1X。

## 六、使用范例：

### 6.1 UC-MSC 原代培养（组织块法）

**6.1.1** 无菌条件下取新鲜脐带，用 DPBS 漂洗净血迹

\* 一般脐带取得非无菌环境，可以稍微用 75% 酒精润洗。

**6.1.2** 置 10cm 培养皿中，剪成 1~2cm 脐段，剔除血管，用 DPBS 洗净血迹，再剪成 1mm<sup>3</sup> 组织块。（图 1）

**6.1.3** 用无菌滴管吸取少量细小组织块均匀散布在 6 孔板 2 个孔中。

**6.1.4** 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 30min，以使组织块粘贴在培养皿壁上。

**6.1.5** 向每孔滴加 0.8ml 完全培养基（注意沿孔壁小心滴加，勿使冲动组织块）。

### 技术支持

电话：4008203979 干细胞应用专家 QQ：2335494955

BI 中国市场部：上海逍鹏生物科技有限公司

电话：021-58785545 www.xpbiomed.com



**6.1.6** 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育过夜, 次日 (D1) 每孔再补加 1ml 完全培养基。

**6.1.7** 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 继续培养, 5 天 (D6) 后半量换液 (此时一般看不到细胞, 但最快 3 天就可看到细胞从组织边沿爬出)。

**6.1.8** 再过 5 天后半量换液 (此时一般会有细胞爬出, 但最晚可到 14 天会出现细胞从组织边沿爬出) (图 2、图 3)。

**6.1.9** 每 2 天换一次培养液, 继续培养 2~4 天, 待细胞融合度 (Confluency) 达到约 80% 后传代培养(图 4)。

**注 1:** 组织块培养的关键是要保障组织块始终贴壁, 换液动作要尽可能轻微, 避免冲动组织块。培养基加量不能太多, 以免组织块漂浮。

**注 2:** 为增加成功率, 从原代分离脐带和脂肪间充质干细胞, 培养基可加 2.5% 的人 AB 血清(人 AB 型血清必须除菌过滤, 且 HbsAG 及 HCV/HIV 抗体阴性)。

## 6.2 UC-MSc 原代培养 (消化法)

MSC NutriStem® XF Medium 也能有效地培养消化法取得的原代细胞, 操做方式可依各实验室的实验步骤, 或参考上海逍鹏 MSC ACF Tissue Digestive Mix (货号: C35010010) 的使用说明。

**6.2.1** 将脐带用 DPBS 漂洗干净, 剪成 1-2cm, 后剔除血管。

\* 一般脐带取得非无菌环境, 可以稍微用 75% 酒精润洗。

**6.2.2** 将组织剪成 3-5mm<sup>3</sup> 后, 移入 50ml 离心管, 再加入的分离液。

\* 一条长度 10 公分的脐带建议加入 10ml 的分离液; 或者组织块 : 分离液 (vol) = 1:1。

\*\* 视情况而定, 可自行在分离液中添加 1% 青链双抗 (BI, Cat# 03-031-1B)。

**6.2.3** 把 50ml 离心管横放在 37 度细胞培养箱, 过夜反应 (16 小时)。

### 技术支持

电话: 4008203979 干细胞应用专家 QQ: 2335494955

BI 中国市场部: 上海逍鹏生物科技有限公司

电话: 021-58785545 www.xpbiomed.com



\* 若总反应体积较大，也可持续旋转混合。

**6.2.4** 加入和分离液等体积的 0.05%EDTA (BI, Cat#03-015-1B) 终止反应后，1500 xg 离心 5 分钟，去除上清。

\* 溶液比较浓稠，小心不要影响下层的细胞;建议留下 5ml 左右的溶液。

\*\* 若是脂肪组织，没有粘稠的情形，以常规的 200-300 xg 离心即可。

\*\*\* 没有 EDTA, 可使用无钙镁 DPBS 取代; 此时建议后面步骤 6 多重复 2-3 次，以确实去除酵素。

**6.2.5** 以和分离液等体积的无钙镁 DPBS 重悬细胞后，500 xg 离心 5 分钟，去除上清。

**6.2.6** 再次以和分离液等体积的无钙镁 DPBS 重悬细胞后，250 xg 离心 5 分钟，去除上清。

**6.2.7** 用适量的培养基重悬细胞后，即可按常规细胞培养方法接种 P0 代细胞培养。

\* 消化后的原代细胞，建议培养时接种密度提高到 10,000/cm<sup>2</sup> 以上; 传代后即可按常规的接种密度培养。

### 6.3 UC-MSC 传代培养与冻存

**6.3.1** 待细胞融和度达到约 80%后进行传代 (细胞不能太密集，否则容易分化)，吸弃传代板孔中的培养基，每孔加适量 DPBS 轻轻冲洗 1 次。

**6.3.2** 根据培养皿适量加入重组胰酶-EDTA (货号: 03-079-1A, T25 建议使用 1ml)，在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 3~5 min (可轻拍培养瓶帮助细胞脱落)。

**6.3.3** 显微镜下观察细胞完全脱落后，使用 5-10ml 稀释大豆胰酶抑制剂 (SBTI, 货号: 03-048-1, 1X)，1000rpm 离心 3~5min。

**6.3.4** 谨慎吸出上清，细胞团块用适当体积的完全培养基悬浮后，混匀细胞悬液。

#### 技术支持

电话: 4008203979 干细胞应用专家 QQ: 2335494955

BI 中国市场部: 上海逍鹏生物科技有限公司

电话: 021-58785545 www.xpbiomed.com



**6.3.5** 按照所需的比例进行传代或按照 5000-6000cells/cm<sup>2</sup> 的细胞密度将细胞接种至培养器皿中，放入 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

**6.3.6** 每 2-3 天更换一次培养基，待细胞融合度达到 80%左右时，参照操作步骤 6.3.1~6.3.5 做细胞传代；或者参照操作步骤 6.3.1~6.3.3 收获细胞冻存。

**6.3.7** 细胞冻存：将细胞团块悬浮于适量 (0.5~1×10<sup>6</sup>cells/ml) MSC 冻存液 (货号：05-712-1D) 中，装入冻存管，2~8°C冰箱放置 30min，-80°C冰箱放置 24h，转入液氮罐冻存。

**注：**本方法仅供参考，用户可根据自身经验做合理调整。

附图：(如下是组织块法，建议客户可以尝试消化法)



图 1 剔除脐带 3 根动静脉血管



图 2 细胞从组织块边沿爬出

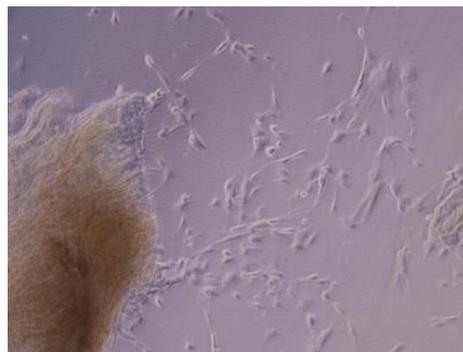


图 3 细胞快速增殖

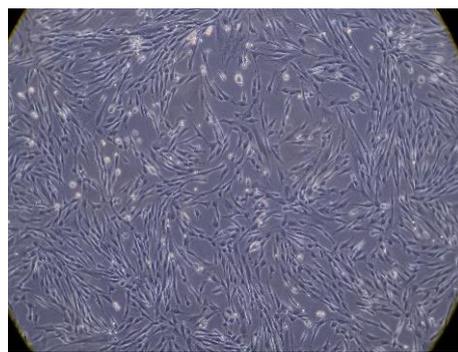


图 4 传代时机成熟

### 技术支持

电话：4008203979 干细胞应用专家 QQ：2335494955

BI 中国市场部：上海道鹏生物科技有限公司

电话：021-58785545 www.xpbiomed.com

