

Mesenchymal Stem Cell Supplement Mix

Instructions for use

Catalog Number : mlyC001

1. 简介

本文件描述了mlyC001在间充质干细胞中用于细胞无血清扩增的推荐使用说明。该添加剂需搭配基础培养基使用，可大幅降低间充质干细胞培养时血清使用量，但仍能维持间充质干细胞增殖及保持干性。

2. 试剂清单与配置

名称	形态	存储	保质期	适配体系
MSC Supplement Mix	冻干粉	-20℃	1 年	适配于 500mL 培养体系
Recombinant Human Fibronectin	冻干粉	2-8℃	3 年	工作浓度 1μg/ml

◆自备试剂

间充质干细胞无血清基础培养基

血清替代物

细胞消化液（0.25% Trypsin-0.04% EDTA 或其他）

细胞冻存液

无钙镁离子的磷酸盐缓冲液（DPBS）

3. 操作方法

◆间充质干细胞完全培养基配置：

1、室温条件下复温无血清基础培养基（自备）和解冻培养基添加剂（MSC Supplement Mix 用5ml 无血清基础培养基（自备）溶解后使用），5ml MSC Supplement Mix 可配制成500ml 完全培养基，需额外添加1%血清（即490ml 无血清基础培养基+5ml MSC Supplement Mix 以及5ml 血清替代物，配制成500ml 完全培养基）；

2、完全培养基可在2-8℃稳定储存2-3周，超过3周的培养基请谨慎使用。

提示：可根据实际用量将MSC Supplement Mix 复溶后的液体，分装后冷冻保存，分装后的添加剂立即存储于-20℃及以下，避免反复冻融超过2次。

◆复苏MSCs：

1、将水浴锅预热至37℃，提前取出包被液和适量间充质干细胞无血清完全培养基室温条件下复温

2、提前将包被液（Recombinant Human Fibronectin 推荐用无菌水配制成1μg/ml 制备而成）按照0.2mL/cm² 比例铺满培养瓶或板底，室温包被2小时或者37摄氏度包被至少1小时

3、从液氮中取出冻存的细胞，迅速将冻存管放入复苏装置或37℃水浴锅中快速解冻

4、立即吸取细胞悬液至15mL 离心管中，逐滴加入5-10mL 复温的完全培养基。200g 离心5分钟，弃去上清，加入2-4mL 间充质干细胞无血清完全培养基重悬细胞，精确计数。

5、接种前将包被液吸弃，然后立即添加合适密度的细胞悬液至培养瓶/板，推荐培养基添加体积为0.2mL/cm²。置于培养箱中持续培养，每两天更换新鲜完全培养基。

注意：包被液吸出后需要尽快添加细胞悬液，避免培养瓶/板上包被液干燥；细胞悬液推荐接种密度为6000-8000 个/cm²

◆传代培养MSCs：

1、显微镜下观察细胞，细胞汇合度80-90%即可传代，应避免细胞密度过大，影响细胞状态。

2、提前将包被液按照 $0.2\text{mL}/\text{cm}^2$ 比例铺满培养瓶或板底， 室温包被2 小时或者37 摄氏度包被至少 1 小时

3、弃去细胞上清，加入不含钙镁离子的DPBS 清洗 1 次，加入细胞消化液，使其完全覆盖培养器皿底部。

4、37℃消化 1-2 分钟，轻轻拍打培养器皿，显微镜下观察大部分细胞从底部分散脱落立即停止消化。

5、加入消化液2 倍体积的间充质干细胞完全培养基，移液器轻轻吹打培养器皿表面未完全脱离的细胞，使细胞完全脱落并均匀分散。

6、将细胞悬液转至离心管中，200g 离心 5 分钟，弃去上清，加入2-4mL 间充质干细胞无血清完全培养基重悬细胞，精确计数。

7、接种前将包被液吸弃，然后立即添加合适密度的细胞悬液至培养瓶/板，推荐培养基添加体积为 $0.2\text{mL}/\text{cm}^2$ 。置于培养箱中持续培养，每两天更换新鲜完全培养基，细胞汇合度 80-90%即可传代。

注意：此处消化液为胰酶消化，消化不可超过2 分钟，吹打细胞时轻轻吹打，力度不宜过大，不脱落细胞直接丢弃。

◆冻存MSCs:

1、显微镜下观察细胞，细胞汇合度 80-90%即可进行操作

2、弃去细胞上清，加入不含钙镁离子的DPBS 清洗 1 次，加入细胞消化液，使其完全覆盖培养器皿底部。

3、37℃消化 1-2 分钟，轻轻拍打培养器皿，显微镜下观察大部分细胞从底部分散脱落立即停止消化。

4、加入消化液2 倍体积的间充质干细胞完全培养基，移液器轻轻吹打培养器皿表面未完全脱离的细胞，使细胞脱落并均匀分散。

5、将细胞悬液转至离心管中，200g 离心 5 分钟，弃去上清，加入适量细胞冻存液重悬细胞，精确计数，细胞冻存液调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \text{cells}/\text{mL}$ 左右，每支冻存管分装 1mL，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，或放入梯度冻存盒中然后置于-80℃，24 小时后转入液氮中长期保存。

4. 注意事项

以上所有操作均在无菌细胞培养室进行，细胞开放操作在生物安全柜中进行；培养器皿包括培养皿、培养瓶、培养板、细胞工厂等，请根据实验需求选择合适容器；细胞传代次数不能过高，并建议以分化能力进行判别间充质干细胞是否失去干性。