

MSC 无血清培养基

间充质干细胞无血清培养基

MSC NutriStem® XF Medium

产品说明书:

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, CO₂ 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	05-752-1H	MSC Attachment solution (100X)	1 ml	4°C

			MSC 贴壁试剂		
	Biological Industries	05-760-1-15	NutriCoat™ Attachment solution (500X) NutriCoat™贴壁试剂	1.5ml	RT
	Biological Industries	PLTGOLD010 R	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	05-713-1B	NutriFreez® D10 Cryopreservation Medium D10 冻存液	100 ml	4°C
	Biological Industries	03-031-1B	Penicillin-Streptomycin Solution (100X)青链双抗	100ml	-20°C

	Vivacell	C35010010	MSC ACF Tissue Digestive Mix 高效原代干细胞分离液	100m	-20°C
--	----------	-----------	---	------	-------

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。

如果使用 05-752-1H, 参考如下步骤:

5.2.1 使用 DPBS 溶液 (BI, Cat# 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 (05-752-1)

培养器皿	表面积 cm ² /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!

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 CO₂ 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。

如果使用 05-760-1-15, 参考如下步骤:

5.2.1 使用生理盐水, 将 NutriCoat™ 促贴壁试剂稀释 500 倍 (1:500)。

5.2.2 参照表 4, 加入适量的 1X NutriCoat™ 促贴壁试剂涂层培养皿或板。

表 4 涂层过程中贴壁试剂建议使用量 (05-760-1-15)

培养器皿	表面积 cm ² /孔 或瓶	1X NutriCoat™ 促贴壁试剂使用体积
96 孔板	0.34	0.1 ml
24 孔板	1.9	0.5 ml

12 孔板	3.9	1 ml
6 孔板	9.6	2.5 ml
T25 瓶	25	6.5 ml
T75 瓶	75	19 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。

注 2: 包被期间, 注意包被液不可以干掉!

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 CO₂ 培养箱, 37°C, 至少孵育 1 小时。

5.2.5 接种前, 吸除贴壁试剂, 用 DPBS 轻轻冲洗培养皿 (或不需要清洗), 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。

注 1: 抑制重组胰酶消化建议方法: 第一种使用大豆胰酶抑制剂; 第二种使用 PBS/DPBS 清洗 (2 倍重组胰酶量) 吹打, 离心去上清; 第三种使用维持培养基抑制。

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

注 1: 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 1mm³ 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%CO₂ 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)。

6.1.6 37°C, 5% CO₂ 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% CO₂ 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 2.0 % PLTGold® 血小板裂解物。

6.2 UC-MSc 原代培养 (消化法)

MSC NutriStem® 无血清培养基也能有效地培养消化法取得的原代细胞, 操做方式如下:

6.2.1 将脐带用 DPBS 漂洗干净, 剪成 1-50px,后剔除血管。

注 1: 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 3-5mm³后, 移入 50ml 离心管, 再加入的分离液。

注 1: 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。

注 2: 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) 。

注 1: 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。

注 1: 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。

注 2: 若是脂肪组织，没有粘稠的情形，以常规的 200-300 xg 离心即可。

注 3: 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。

注 1: 消化后的原代细胞，建议培养时接种密度提高到 10,000/cm² 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% CO₂ 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。

6.3.5 按照所需的比例进行传代或按照 5000-6000cells/cm² 的细胞密度将细胞接种至培养器皿中，放入 37°C, 5% CO₂ 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 ($0.5\sim 1\times 10^6$ cells/ml) D10 无血清 冻存液(货号: 05-713-1) 中, 装入冻存管, $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30min, -80°C 冰箱放置 24h, 转入液氮罐冻存。

注 1: 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

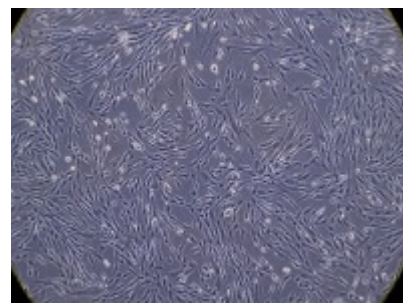


图 4 传代时机成熟