

人脐带间充质干细胞无血清培养基（无酚红）
hUCMSC Serum Free Medium (Phenol Red Free)



人脐带间充质干细胞无血清培养基（无酚红）

一、产品基本信息

产品名称	Applied Cell® 人脐带间充质干细胞无血清培养基
货号	AC-1001043 (PRF)
规格	基础培养基 450mL, 添加剂 50mL
运输保存条件	基础培养基 2-8°C, 添加剂-20°C至-80°C; 混合后 2-8°C
使用范围	人脐带来源的干细胞原代分离、扩增与传代培养
保质期	12个月

二、产品简介

人脐带间充质干细胞无血清培养基是埃泽思生物（Applied Cell®）自主研发的一款无外源动物成分的人间充质干细胞培养基。可应用于人脐带组织来源的干细胞的原代分离、扩增与传代培养，并保持其多向分化潜能。本产品内毒素水平远低于中国药典标准，生产过程遵循 ISO9001 体系并符合 GMP 指导原则。

人脐带间充质干细胞无血清培养基主要成分：氨基酸，维生素、无机盐、白蛋白，转铁蛋白、胰岛素、微量元素，细胞因子等。

三、产品特性

- 无外源动物蛋白成分，大大降低各类病毒、霉菌和支原体等的污染风险。
- 全程无血清生产，极大降低批次间差异。
- 可用于原代分离，且培养过程无需包被培养板。
- 扩增效率高，24h 左右增殖翻倍，节省培养时间。
- 内毒素 <0.06EU/ml，远低于中国药典水平

四、产品内容

组分	规格	数量	运输
人脐带间充质干细胞无血清基础培养基	450mL	1 瓶	冰袋
人脐带间充质干细胞无血清添加剂	50mL	1 瓶	干冰

五、相关产品

无血清细胞冻存液（治疗级）（Applied Cell®: Cat. no.AC-1001006）

人脐带间充质干细胞（Applied Cell®: Cat. no.AC-2001003）

细胞消化液（Applied Cell®: Cat. no. AC-1001024）

六、实验准备

人脐带间充质干细胞无血清培养基配制

1. **37°C快速解冻人脐带间充质干细胞无血清添加剂**，快速溶解时不易破坏添加剂中营养物质，时间大致为 10min。待添加剂融化后摇匀，分装或直接按比例添加到基础培养基中，分装后添加剂立即储存于 **-20°C至-80°C**，避免反复冻融。
2. 将添加剂以 10%比例加入到**人脐带间充质干细胞无血清基础培养基**中，混匀，即为**人脐带间充质干细胞无血清培养基（AC-1001043PRF）**。混合后培养基可在 **2-8°C** 稳定储存 **2-3** 周，不建议使用已配制超过 **3** 周的培养基。
3. **人脐带间充质干细胞无血清培养基**可直接应用于人类脐带组织来源的干细胞的原代分离、扩增与传代培养。
4. 预先高温高压灭菌处理剪刀，镊子等实验器械。
5. 预先紫外灭菌超净台/安全柜等实验环境。

七、操作方法(以下步骤皆应在无菌条件下操作)

1. 人脐带间充质干细胞原代分离（贴壁法）

脐带简介：脐带包括脐带血、华通氏胶、两根动脉、一根静脉，所有这些结构被脐带上皮（内衬膜）包裹。脐带是间充质干细胞的主要来源，其中华通氏胶只含有间充质干细胞一种干细胞，是最常用来分离培养间充质干细胞的结构。而内衬膜则含有至少两种干细胞：间充质干细胞和上皮干细胞，这两种干细胞也是细胞治疗的主要来源。

以下方法为从华通氏胶中分离高纯度的间充质干细胞详细步骤：

- 1.1. 无菌收集长度约 10cm 的脐带，迅速将脐带放到含**人脐带脂肪保存液（AC-1001016）**的 50mL 离心管中。在 4°C 条件下快速运到实验室，在 4h 内处理完成全部过程。
- 1.2. 将脐带置于生物安全柜中冰盒里放置的直径 10cm 培养皿中。用预冷的 PBS 多次清洗脐带，去除残留的血液即止。以下分离组织块的过程确保全程脐带浸泡在预冷 PBS 中保持湿润。
- 1.3. 使用剪刀径向剖开脐带，将血管以及周围的华通氏胶暴露出来。
- 1.4. 用解剖刀将华通氏胶与血管分离，用镊子夹住血管，整条剥离，中间白色部分即华通氏胶（具体人类脐带结构参见图 1）。

1.5. 用剪刀将华通氏胶剪成 0.5-1cm 见方的薄片组织块，尽量不要太厚。最后剩余的脐带上皮（内衬膜）组织 弃除。

注意：组织块尽量接近片状，增大与培养皿接触面积，提高细胞爬出率

1.6. 每个直径 10cm 的培养皿中放置 10-15 个组织块，加入 6mL 完全培养基。置于 37°C，5%CO₂ 培养箱中培养 不同原代分离体系初始组织块数量以及细胞爬出率见表 1。

注意：①为促进组织块贴壁，培养基不能加太多，否则组织块容易漂起

②为促进组织块贴壁，72 小时内不能摇晃培养皿，72 小时第一次换液也是同理。

培养皿直径	初始组织块数量	细胞爬出组织块数量	细胞爬出率
10cm	16.9	11.8	69.8%

表 1 脐带组织块粘壁数据 (平均数据)

1.7. 每 72 小时换液。一般 5-7 天可以看见贴壁组织块附近有细胞爬出，12-15 天细胞汇合度达到 70% 以上，即可准备传代。

1.8. 细胞传代时，用枪头吸掉组织块以及原有培养基，加入 5mlPBS 清洗一次。每个直径 10ml，的培养皿中加入 5ml 的**细胞消化液 (AC-1001024)**，摇匀覆盖皿底，37°C 恒温箱 2-3min 或室温 3-5min 孵育。

1.9. 显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离皿底，轻轻敲打皿底，细胞呈细沙状脱落，加入同体积完全培养基，用移液枪扇形吹打使细胞完全脱落下来，将细胞悬液收集到 15mL 离心管中，300×g 离心 5min。

1.10. 用完全培养基重悬、计数，此时的细胞称为 P0 代。相关代次预期收获细胞量请参考表 2。

1.11. 根据本公司统计数据，10cm 长的脐带，约可以收获 1.24×10^7 个 P0 代细胞，一根脐带长度大约 20cm，约可以收获 2.5×10^7 个 P0 代细胞。

1.12. 根据本公司检测，按 1:8 传代，细胞形态在 P10 代内不发生变化。P10 代以上细胞没有实际应用意义，暂不检测。

1.13. 脐带两端的组织原代分离效率有较大差异，近胎盘端分离效率要高于近胎儿端 10-30%。

	P0	P1	P2	P3	P4	P5
细胞数量	1.2×10^7	9.6×10^7	7.7×10^8	6.2×10^9	5.0×10^{10}	4.0×10^{11}

表 2 10cm 长的脐带 P0-P5 代预计收获细胞数量 (1:8 传代)

2. 人脐带间充质干细胞传代培养

2.1. 在显微镜下观察细胞，细胞汇合度达到 90%，即可准备传代；

2.2. 吸掉培养瓶/皿中的培养基，用 PBS 清洗一次，加入适量的**细胞消化液 (AC-1001024)** 覆盖瓶/皿底，37°C 恒温箱 2-3min 或室温 3-5min 孵育。

- 2.3. 显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离瓶/皿底，轻轻敲打瓶/皿底，细胞呈细沙状脱落，加入等倍体积的完全培养基，用移液枪扇形吹打使细胞脱落下来，并轻轻吹打成单细胞，将细胞悬液收集到适当的离心管中，室温 300×g 离心 5min。
- 2.4. 弃上清，加入适量完全培养基，重悬细胞，按照比例进行传代或计数后按照 1.1-1.45×10⁴ 个/cm² 密度进行接种。均匀铺在培养皿/瓶中，置于 37°C，5%CO₂ 条件下培养。相关数据请见表 3。

注意：细胞规模生产建议 1:5-1:8 传代，一般 72 小时可以达到 90%以上汇合度。

	清洗 PBS 体积	消化液体积	培养基体积	接种细胞数量
10cm dish	5ml	5ml	10ml	6.0-8.0×10 ⁵
T25 培养瓶	3ml	3ml	5ml	2.7-3.7×10 ⁵
T75 培养瓶	8ml	8ml	15ml	0.8-1.1×10 ⁶
T175 培养瓶	18ml	18ml	35ml	2.0-3.0×10 ⁶

表 3 不同体系建议细胞接种数量及加液量

3. 人脐带间充质干细胞冻存

- 3.1. 同步骤 2.1;
- 3.2. 同步骤 2.2;
- 3.3. 同步骤 2.3;
- 3.4. 弃上清，用 4°C 保存的**无血清细胞冻存液（治疗级）（AC-1001006）**重悬细胞，取部分细胞计数。
注意：无血清细胞冻存液即拿即用，用完之后尽快放回 4°C 冰箱，以防室温放置太久，影响质量。
- 3.5. 计数后用**无血清细胞冻存液（治疗级）（AC-1001006）**调节细胞密度至建议冻存密度 1-5×10⁶ 个/mL，每支冻存管（需提前做好标记）分装 1.5-2mL，直接放入 -80°C 冰箱快速冻存。
- 3.6. -80°C 放置过夜后转移至液氮长期保存。

4. 人脐带间充质干细胞复苏

- 4.1. 从液氮中取出冻存的 hUMSC，37°C 水浴快速融解。
- 4.2. 在生物安全柜或超净台中，先在 15mL 离心管中加入 5 mL 37°C 预热的完全培养基，将解冻后的细胞悬液缓慢滴加到离心管中。
- 4.3. 300×g 离心 3min，吸掉上清，加入适量完全培养基重悬细胞至建议接种浓度（参考表 3）。
- 4.4. 将细胞悬液均匀滴加到培养瓶/皿中，水平十字振动培养瓶/皿使细胞均匀。置于 37°C，5% CO₂ 条件下培养 24 小时后观察细胞复苏状态。
- 4.5. 细胞无异常即可同时更换新鲜的完全培养基继续培养。
- 4.6. 初次换液后每 48-72 小时更换培养液直至传代。

八、人脐带间充质干细胞模式图

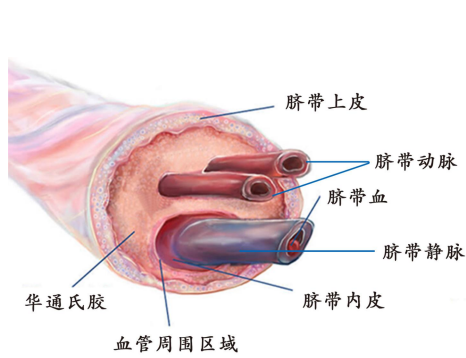


图 1 人脐带结构模式图

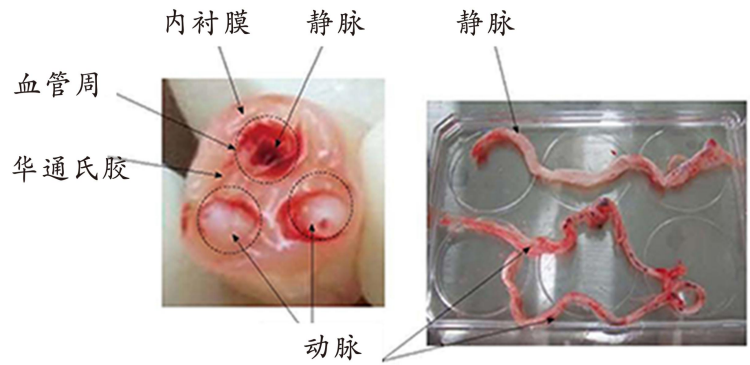
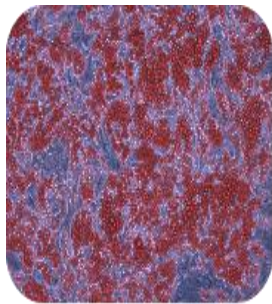


图 2 人脐带结构解剖图

九、人脐带间充质干细胞形态图以及分化检测



脐带干细胞形态图



脂肪生成

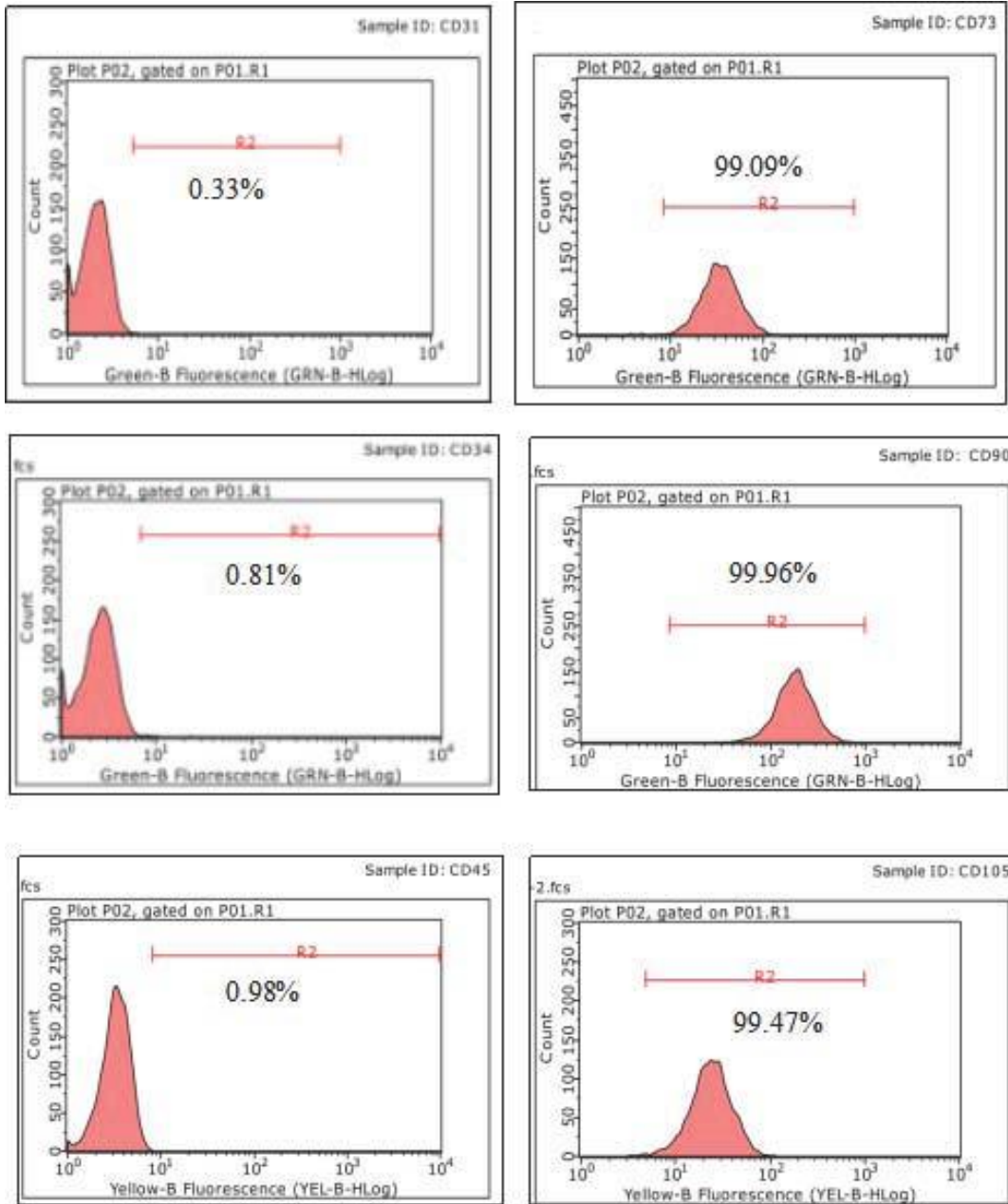


成骨生成



软骨生成

十、人脐带间充质干细胞流式检测



十一、质量控制

检验项目	参考数据
外观 Physical APPEARANCE	无色液体 Colorless liquid
澄清度	澄清
pH 值	7.0-7.4
渗透压	270-340
细菌内毒素	小于 0.06 EU/ml
无菌	无菌
支原体	0.11um 过滤, 支原体试验为阴性
细胞生长试验	细胞为梭形, 呈指纹状或螺旋状生长

生产企业:

上海埃泽思生物科技有限公司

地址: 上海市宝山区园丰路 69 号联东粤浦科技园 1 号楼 401 室

埃泽思 (福建) 生物科技有限公司

地址: 福建省福州市长乐区金滨路 458 号福建省精准医学产业创新中心

邮箱: service@appliedcell.cn

电话: 021-59541913

网址: www.appliedcell.cn

ISO9001 质量体系认证企业

医疗器械生产备案企业,

欧盟 CE 认证企业

文件版本号:

B202201