

MesenPlify™ 无血清无异种成分人类间充质干细胞扩增培养基

产品代码 C0001

产品说明书

产品描述

MesenPlify™ sXF 是一种**无异源动物成分、无血清**的完整培养基配方，可支持体外培养的原代人类间充质干细胞的分离和增殖，同时保留其多向分化潜能（成骨、成脂、成软骨）和重要细胞表面标记物（CD73、CD90、CD105），如 International Society Cell and Gene Therapy (ISCT) 的最低标准所定义。

MesenPlify™ sXF 经过测试验证，适用于培养多种类型的人类间充质干细胞，包括骨髓源性（BM-MS）、脂肪源性（AD-MS）、脐带源性（UC-MS）和诱导多能干细胞源性（iPSC-MS）。

特性

MesenPlify™ sXF 配方中添加了人源血小板裂解产物（hPL），作为胎牛血清（FBS）的无异源动物成分替代品，常用于细胞存活和扩增。研究表明，与 FBS 相比，hPL 在批次之间具有更好的一致性。

组分

MesenPlify™ sXF 细胞培养基 套装 (# C0001) 包括两个组分:

产品	货号	体积	储存条件	保质期
MesenPlify™ sXF 基础培养基	S0001	470mL	2~8°C	自制造日期起 1 年有效。
MesenPlify™ sXF 补充剂	SU0001	30mL	-20°C 或 -80°C	自制造日期起 1 年有效。

MesenPlify™ sXF 细胞培养基 试用品包括两个组分:

产品	货号	体积	储存条件	保质期
MesenPlify™ sXF 基础培养基样品	S0001-SAM	235mL	2~8°C	自制造日期起 1 年有效。
MesenPlify™ sXF 补充剂样品	SU0001-SAM	15mL	-20°C 或 -80°C	自制造日期起 1 年有效。

*将基础培养基和补充剂混匀配制成完全培养基后，如在 2°C ~ 8°C 中存储，请于 2 周内用完。

*以上任何一个组分均不含抗生素。

所需但未提供的材料

TrypLE Express Enzyme (1X) 重组胰蛋白酶 或 0.25% Trypsin-EDTA (1X) 胰蛋白酶
D-PBS (无 Ca⁺⁺, 无 Mg⁺⁺)
Culture dish and flasks 培养皿和培养瓶
Polypropylene conical tubes 聚丙烯锥形管 等

安全信息

所有人类源性材料 (例如 hMSCs、hPL) 可能会视为潜在传染源。
请阅读产品安全技术说明书 (SDS), 遵循生物安全级别 2 (BSL-2) 的实践方法, 穿戴适当的个人防护装备, 在经过认证的生物安全柜中使用这些材料。

完全培养基配制

(注意: 所有步骤需在生物安全柜中采用无菌技术执行。)

- 在 2-8°C 下 (过夜) 解冻 MesenPlify™ sXF 补充剂。急用时, 也可以在室温下解冻, 并立即使用。 **应避免在 37°C 下解冻。**
(TIPS: 解冻后的补充剂可分装后在 -20°C 下冷冻存储, **分装保存的补充剂应避免多次重复冻融。**例如, 将补充剂分装为 6mL x 5 支, 使用前解冻并与 94mL 基础培养基混合。
- 将 30mL 的 MesenPlify™ sXF 补充剂 加入到 470mL 的 MesenPlify™ sXF 基础培养基 中, 总体积 500mL, 充分混合。
(TIPS: 如有需要使用抗生素, 可以添加到完全培养基最终体积的 1%。)
- 将制备好的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 储存于 2-8°C 的阴凉处, 避光, 最长可保存 2 周。
(TIPS: 也可以将配置好的完全培养基分装, 并在 -20°C 下冷冻存储。 **分装保存的完全培养基应避免反复冻融。**)
特别提示: 按此步骤配制好的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 可直接使用, 无需再次进行无菌化处理。如有需要, 可用 0.2 微米滤膜进行额外的过滤步骤, 但不可以用高温高压的方式灭菌。

使用指南

原代 MSC 分离培养 (以脐带组织块法分离原代 MSC 操作为例)

准备材料

- 培养基: 新鲜配置的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 (加 1% 双抗)。
- 培养皿: 准备多个 15cm 皿进行细胞培养。
- 消毒剂: 医用消毒酒精 (75%)。
- 洗涤液: 生理盐水 (无菌, 加 1% 双抗)。
- 工具盒: 包括剪刀、镊子、手术刀、移液器、离心管 (50 mL) 等。
- 脐带样本: 新鲜的脐带 泡在含有 1% 双抗的 PBS 里 4°C 保存运输 (最好在获得后尽快处理)。

消毒处理

1. 吸弃脐带保存液。
2. 使用 75% 的医用消毒酒精完全浸没脐带，浸泡 2 分钟以确保消毒效果。

清洗脐带

1. 用无菌生理盐水清洗脐带 2-3 次，确保彻底去除残留的脐血。
2. 每次清洗后均应用无菌的工具保持脐带在无菌环境中。

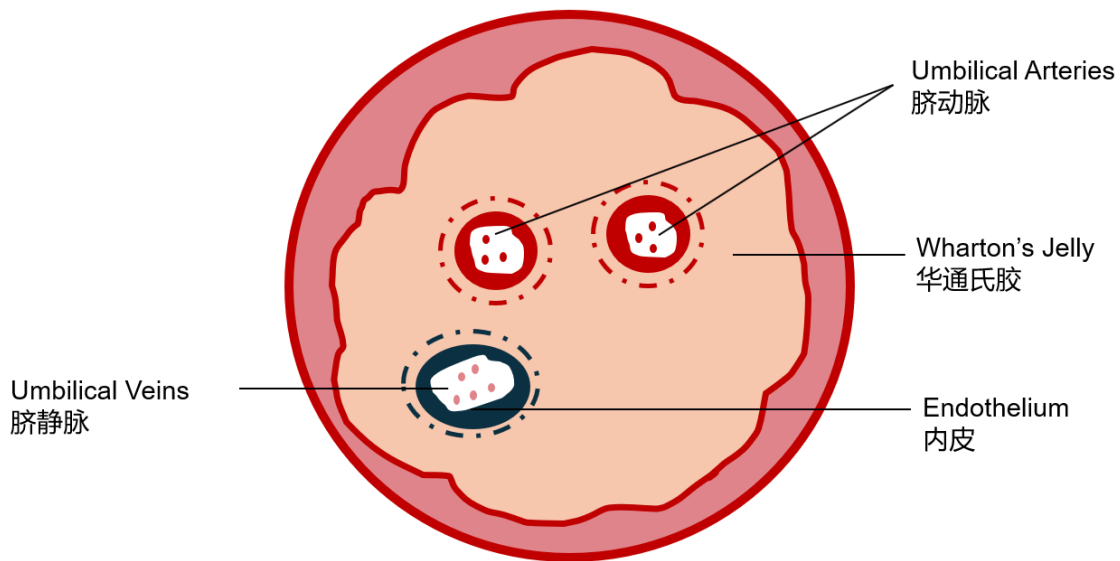
剪切处理

1. 将脐带剪成约 2-3 cm 的小段。
2. 用无菌生理盐水再清洗 2-3 次，确保去除残留的脐血。

分离华通氏胶

1. 沿静脉剪开脐带，尽量去除 2 条静脉壁与 1 条动脉壁。
2. 轻轻分离华通氏胶，注意避免损伤表皮，使用弯头手术剪将华通氏胶至 2-3 mm³ 大小的组织方块，**胶质面向下**，平铺在 150mm 细胞培养皿上，每皿 10-12 片方块。

Cross Section of Umbilical Cord
脐带横切面示意图



细胞培养

1. 由组织块正上方缓慢滴加 37°C 复温的 MesenPlify™ sXF 完全培养基，每个皿滴加 15mL 左右，注意不要让组织块飘起来。
2. 放入 37°C、5% CO₂ 和 饱和湿度的培养箱中培养。

换液：每 2-3 天换液一次

1. 每日观察是否有细胞从组织块爬出。
2. 换液时，将培养瓶倾斜，同时避免组织块滑动，小心吸弃上清液。
3. 慢慢加入 37°C 复温的 MesenPlify™ sXF 完全培养基，滴加培养基的手法与上述相同。
4. 将细胞培养皿放回培养箱继续培养。

5. 正常换液培养，直到观察到组织块周围有梭形细胞爬出时，使用灭菌后的镊子夹除组织块，此时如果再次换液，MesenPlify™ sXF 完全培养基的用量可改为 18-20mL/皿。

传代：在接种后第 12 天左右

1. 观察细胞的生长状况，当细胞汇合度达到约 80%时，可进行消化传代。
2. 传代时细胞的接种密度为 6000/cm²，请依据所需的细胞量，选择合适大小的细胞培养皿。（具体操作步骤可参考下文“hMSCs 的传代培养”）

注意事项- 所有操作都应在无菌条件下进行，避免任何非无菌材料的接触。

冷冻保存的 hMSCs 的复苏

1. 将 MesenPlify™ sXF 完全培养基提前恢复至室温或 37°C。
2. 将 hMSCs 冻存管放置在 37°C 的水浴中迅速解冻，直到观察到剩余的少量冰晶即将消失。
3. 将冻存管内的细胞悬液转移到一个 15 或 50mL 锥形管中，缓慢地滴加 10mL MesenPlify™ sXF 完全培养基，轻柔混匀。
4. 以 300 x g 的速度在室温下离心 5 分钟收集细胞。
5. 弃去上清液以去除二甲基亚砜(DMSO)保护剂。
6. 用 1mL MesenPlify™ sXF 完全培养基重新悬浮细胞。
7. 进行细胞计数。（注意：如果细胞密度超过细胞计数器的推荐范围，可能需要在培养基中进一步稀释样品。）
8. 按照较高的接种密度（5,000-7,000/cm²）将细胞接种到细胞培养容器中，使用 MesenPlify™ sXF 完全培养基补充至适当体积。（TIPS：当细胞刚从冻存中复苏时，建议使用高的接种密度）
9. 在 37°C、5% CO₂ 和 饱和湿度的培养箱中培养细胞。
10. 每隔 3-4 天使用预热至 37°C 的 MesenPlify™ sXF 完全培养基进行换液，或传代（当细胞汇合度达到 70-80%时，具体操作步骤可参考下文“hMSCs 的传代培养”）。

hMSCs 的传代培养

1. 检查 hMSCs 是否达到 70-80%的汇合度。注意不要让 hMSCs 达到 100%的汇合度，否则细胞可能会出现分化的迹象。
2. 将 MesenPlify™ sXF 完全培养基提前恢复至室温或 37°C。
3. 用 10mL 的不含 Ca⁺⁺、不含 Mg⁺⁺的 DPBS（不包含在套装中）轻轻洗涤细胞一次。
4. 添加复温的 **0.125%胰蛋白酶消化液**（稀释为 0.5x 使用）或**重组胰蛋白酶消化液 TrypLE (1x)**（不包含在套装中），以覆盖整个组织培养瓶的表面。
5. 轻轻旋转培养瓶，使胰蛋白酶均匀分布在表面上。
6. 放在 37°C 培养箱中 2-7 分钟。
(TIPS: 初次使用 MesenPlify™ sXF 完全培养基应摸索合适的消化时间，若细胞刚从 FBS 培养基中转过来，可能需要 5-7 分钟。若细胞已完全适应无血清培养，消化时间可能缩短至 2-4 分钟。

- 细胞在无血清培养基中较容易消化脱落，此为正常现象，**应注意避免消化过度**的情况发生，**推荐使用重组胰蛋白酶消化液 TrypLE (1x)**，若采用胰蛋白酶消化液，可稀释到 **0.125% (0.5x)** 使用)
- 使用相差显微镜检查细胞是否已脱落，轻轻敲击培养瓶的侧面以帮助脱落。
 - 一旦细胞脱落并自由漂浮，将 MesenPlify™ sXF 完全培养基 添加到消化液体积的 3 倍，以终止消化。
 - 将细胞悬液收集到一个 50mL 锥形管中。
 - 以 300 x g 的速度在室温下离心 5 分钟。
 - 弃去上清液以去除胰蛋白酶。
 - 用 1mL MesenPlify™ sXF 完全培养基 重新悬浮细胞。
 - 进行细胞计数。(TIPS: 如果细胞密度超过细胞计数器的推荐范围，可能需要在培养基中进一步稀释样品。)
 - 计算所需的培养基体积，根据实验需要或视细胞状态，以常规的接种密度 (3000-5000/cm²) 或较高接种密度 (5000-7000/cm²) 将细胞接种到新的细胞培养器皿中。
 - 使用 MesenPlify™ sXF 完全培养基 补充至适当体积 (可参考下表)。
 - 在 37°C、5% CO₂ 和 饱和湿度的培养箱中培养细胞。
 - 每隔 3-4 天使用预热至 37°C 的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 进行换液，或传代 (当细胞汇合度达到 70-80%时)。

表 1. hMSC 传代和培养操作推荐用量

培养器皿	底面积	MesenPlify™ sXF 完整培养基	胰蛋白酶用量
6 孔板	9.6cm ² /孔	2mL/孔	0.5mL/孔
T75 培养瓶	75cm ²	15mL	3mL
150mm 培养皿	145cm ²	30mL	5mL

hMSCs 的冷冻保存

- 通过添加 20% 二甲基亚砜 (DMSO, 套装中未提供) 制备 2x 的冷冻保存液。
(TIPS: 假设最终需要的细胞冻存体积为 1mL, 先准备 500uL 的 2x 冷冻保存液, 配制方法是将 100uL 的 100% DMSO 加入到 400uL 的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 中)
- 将细胞复温至室温的 MesenPlify™ sXF 完全培养基 中悬浮, 使细胞的浓度为常规细胞浓度的两倍 (例如 2 x 10⁶ /mL)。
- 将步骤 1 中制备的 2x 冷冻保存液, 以 1:1 的体积, 缓慢地滴加到细胞悬浮液中, 然后用移液管轻轻混合。(此时, 冷冻液的浓度被稀释为 1x, 即 DMSO 的最终浓度为 10%, 细胞浓度为 1 x 10⁶ /mL)
- 将混合好的细胞悬液, 转移到预冷到 2- 8°C 的细胞冻存管中。
- 转入梯度降温盒, -80°C 过夜, 隔天转入液氮长期保存。
(TIPS: 也可以购买其他商品化的 hMSCs 冷冻保存液进行冻存, 操作步骤参见其说明书进行)

hMSC 的特性分析

可以使用流式细胞术、集落形成单位 (CFU) 分析以及多向分化分析对培养的 hMSCs 进行特性分析。详情请参考指南手册获取信息 (Guide Book: Human Mesenchymal Stem Cells)。

将 hMSC 适应到 MesenPlify™ sXF 培养基的过程

如果正在使用其他品牌培养基，可以直接切换到 MesenPlify™ sXF 体系，一般情况下无需进行预处理。当细胞刚从冻存中复苏时，也可先用原培养基进行复苏，随后在 Day1 更换为 MesenPlify™ sXF 完全培养基，后续即可正常使用 MesenPlify™ sXF 完全培养基 培养或传代。

保证

仅供研究使用 (RUO)，或用于进一步制造。

不适用于人类或动物诊断或治疗用途。

产品按照 ISO 13408 和 ISO 9001 相关的质量管理体系进行制造。

免责声明：尽管 InnoCellular 已采取一切合理措施确保所提供信息的准确性和正确性，但不提供关于此类信息准确性的任何保证。InnoCellular 保证其产品符合产品说明书中的建议并在产品保质期内使用时符合适用标准，如 CoA 所记录。如果出现保证违约情况，InnoCellular 的唯一责任是根据客户的及时通知，自行决定替换相关产品或其部分。在合理努力修复或替换产品无效的情况下，InnoCellular 将全额退还所支付的产品金额。

需要注意的是，InnoCellular 不对由于使用 InnoCellular 产品导致的任何客户经济损失、财产损失等间接、附带、特殊或其他损害负责。