

间充质干细胞无异源、无血清培养基说明书

AMCM1/AMCM2 MSCs Xeno-free SFM

1. 产品描述

AMCM1/AMCM2 MSCs Xeno-free SFM 是专门为人胚胎干细胞和诱导多能干细胞来源的 iMSCs 以及不同组织来源的人间充质干细胞的体外扩增而开发的间充质干细胞培养基。是一款完全无血清、无异源性 (Xeno-free) 及只含有低浓度血小板裂解物的间充质干细胞培养基, 能维持人间充质干细胞在长期培养过程的表型特征和多次传代, 同时还能保持三系分化潜能 (成骨、脂肪、软骨), 满足国际细胞治疗学会 (ISCT_2006) 对 MSCs 的要求。其中 AMCM1 主要用于 MSC 传代扩增培养, AMCM2 主要用于原代贴壁扩增培养。

备注: AMCM2 与 AMCM1 相比, 培养的细胞增殖能力更强。

产品	货号	规格	储存条件	保质期	包被细胞基质
AMCM1	JX7502MCM-1	500ml	冷冻避光保存	- 20°C/18 个月	Gelatin 或无
AMCM2	JX7502MCM-2			- 80°C/24 个月	

2. 特点

- 无血清、不含其它任何人源以外成分;
- 不含抗生素;
- 即用型培养基, 无需额外添加物;
- 能够培养不同来源的人间充质干细胞;
- 维持人间充质干细胞的表型特征、长期培养、多次传代 (10 代以上) 以及多向分化潜能。细胞表面因子表达正常 (CD73+/CD90 +/CD105 +, CD11b/CD34-/CD45-/CD19-/HLA- DR-)

3. 注意事项

- 如果观察培养基中有可见的沉淀物, 不能再使用;
- 超过标签上的截止使用日期, 不得再使用;
- 避光保存, 在 2° C 至 8° C 保存 2-3 周;
- 仅供研究使用, 不用于临床诊断和治疗。

4. MSC细胞扩增培养:

4.1 iMSC 细胞复苏扩增培养:

- (1) 需提前铺板基质胶 1 小时以上;
- (2) 将水浴锅预热至 37°C, 将细胞从液氮罐中取出, 待液氮散尽, 用镊子夹住放入水浴锅 (37°C) 中, 但需留意水不能没过管口, 摇晃冻存管加速溶解, 以 1 分钟内全部溶解为宜;
- (3) 在生物安全柜中将复苏好的细胞液转移至装有 5-10ml DMEM/F12 培养基的 15ml 离心管内, 300Xg, 离心 5min, 离心完毕去掉上清;
- (4) 去掉铺板的基质胶, 加入对应孔板培养所需体积的 AMCM1/AMCM2 培养基;
- (5) 离心完毕去掉上清, 用适量 AMCM1/ AMCM2 培养基重悬细胞, 吸取所需数量体积细胞接入到准备好 AMCM1/ AMCM2 培养基的孔板中, 放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱内培养;
- (6) 贴壁细胞复苏 24 小时后观察拍照, 死细胞过多应换液, 每 2-3 天更换一次培养基。

4.2 组织来源的 MSC 细胞分离扩增培养:

4.2.1 脂肪组织来源 MSC 细胞的分离扩增培养:

- (1) 组织处理:

无菌条件下获取脂肪组织, 去除筋膜和血管, 剪碎至 1-3 mm³的小块, 将组织块转移至 50ml 离心管中, 加入 0.1%-0.25% I 型胶原酶 (体积为组织块的 3-5 倍), 37°C 水浴振荡消化 20-60 min, 期间吹打辅助消化。
- (2) 终止消化与离心:

加入含 EDTA 的 PBS 终止消化, 300Xg 离心 10 min, 弃上层油脂和消化液, 保留下层细胞沉淀。用 AMCM2 重悬细胞, 过滤 (70-100 μm 滤网) 去除未消化的组织块。
- (3) 细胞培养:

接种于基质胶预包被的培养皿中, 37°C、5% CO₂ 条件下静置培养, 48 小时后首次换液去除未贴壁细胞, 后续每 2-3 天换液。
- (4) 注意事项: 消化时间需优化, 过长可能损伤细胞活性。

离心前预冷离心机至 4°C, 有助于油脂与细胞沉淀分层。

4.2.2 骨髓来源 MSC 细胞的分离扩增培养:

- (1) 骨髓采集:

无菌条件下穿刺采集骨髓液, 用含肝素的 PBS 稀释抗凝血 (1:1 比例), 避免凝固。
- (2) 密度梯度离心:

采用 Ficoll-Paque (1.077 g/mL) 或 Percoll (1.073 g/mL) 分离液, 将稀释的骨髓液缓慢加至分离液上层, 1200 Xg 离心 20~30 min。吸取中间单核细胞层 (白色云雾状), 用 PBS 洗涤后离心 (300×g, 8 min)。

（3）细胞接种与培养：

用 AMCM2 重悬细胞，接种密度为 1×10^6 /mL，接种于基质胶预包被的培养皿中，72 小时后首次换液去除未贴壁细胞，后续每 3 天换液。

贴壁筛选法：直接将骨髓液接种于基质胶预包被的培养皿中，通过换液逐步去除未贴壁的造血细胞，保留贴壁的 MSCs。

（4）注意事项：

新鲜样本需及时处理，避免细胞降解。

密度梯度离心需避免扰动分层界面，影响纯度。

（5）4.2.3 脐带来源 MSC 细胞的分离扩增培养：

（1）脐带预处理：

无菌条件下清洗脐带（含双抗的 PBS），去除血污和羊膜，将脐带剪碎至糜状，或用 0.5% I 型胶原酶（体积为组织块的 3-5 倍）37℃水浴振荡消化 30-60 min，期间吹打辅助消化。

（2）终止消化与离心：

加入含 EDTA 的 PBS 终止消化，300Xg 离心 10 min，弃消化液，保留下层细胞沉淀。用 AMCM2 重悬细胞，过滤（70-100 μm 滤网）去除未消化的组织块。

（3）细胞培养：

接种于基质胶预包被的培养皿中，37℃、5% CO₂条件下静置培养，48 小时后首次换液去除未贴壁细胞，后续每 2-3 天换液。

组织块种植法：

将 1-2mm³的脐带组织块均匀铺于基质胶预包被，含有 AMCM2 的培养皿中，每皿 20-25 块，静置培养。每 24 小时补加 1mL 培养基，72 小时后全量换液，观察贴壁细胞克隆形成（通常需 5-10 天）。

（4）注意事项：

避免过度消化，以免损伤细胞活性。

组织块种植法需保持培养皿静置，防止移动影响贴壁。

5. 传代:

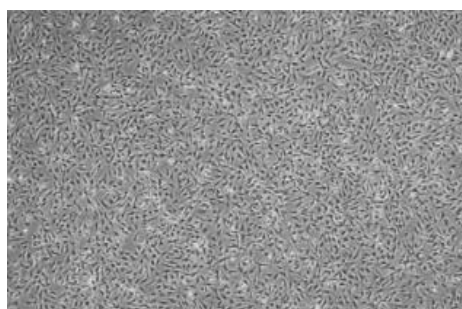
- (1) 提前铺板 (10cm 皿): 10ml/皿基质胶包被至少 1h;
- (2) 取出细胞观察汇合度, 是否正常, 有无污染并拍照, 吸弃培养基, 加 3ml 的消化液消化;
- (3) 将细胞放在培养箱放置 3min, 然后取出观察是否细胞大部分变圆发亮、起飘脱落。如果没有, 则继续消化; 如果脱落 80%以上, 向培养皿中加入消化液等体积培养基终止消化, 用巴氏吸管轻轻吹打 3~5 次, 将细胞转移到离心管中, 离心机 $300\times g$, 5min;
- (4) 去掉离心上清, 加适量 AMCM1/ AMCM2 培养基重悬细胞;
- (5) 去掉铺板的基质胶, 加入 12ml/皿 AMCM1/ AMCM2 培养基, 再将细胞悬液加入 10cm 皿中, 摇匀培养, 显微镜下观察, 放回培养箱 37°C , CO_2 浓度: 5%; 传代比例根据细胞具体情况而定。正常是 1:4~1:6 传代;

6. 冻存:

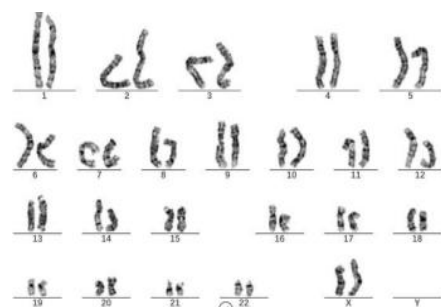
- (1) 取出需要冻存细胞, 观察是否正常, 有无污染并拍照, 加适量消化液消化;
- (2) 将细胞放在培养箱放置 5~10min 左右, 然后取出观察细胞是否单个且大部分都脱落。如果没有, 则继续消化, 轻轻拍打, 如果脱落 90%以上, 则将细胞转移到离心瓶中, 加 1~2 倍的培养基终止消化, 离心机 $300\times g$, 5min;
- (3) 去掉离心管上清, 加适量冻存液重悬细胞, 待所有细胞收集汇总后台盼蓝计数分管冻存, 100~200 万细胞/1ml 冻存液/管;
- (5) 未及时分管冻存细胞暂放 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 分装到冻存管的细胞 -80°C 冰箱程序降温放置 24 h, 转入液氮罐冻存。

7. 图示及鉴定结果

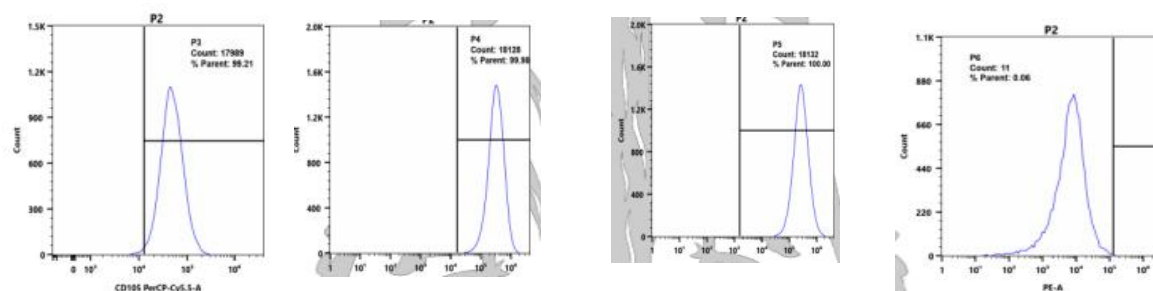
A



B



C

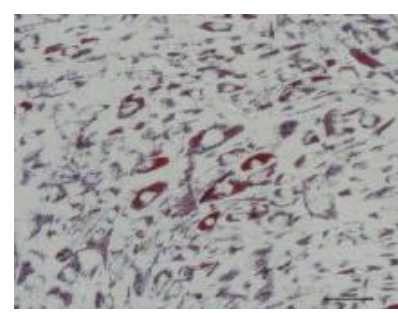


D

成骨分化

软骨分化

脂肪分化



A. 图示为 AMCM1 连续培养的 hESC-iMSCs 图，标尺：100 μm。

B. 图示为连续多代次培养的 hESC-iMSCs 核型检测：遗传物质稳定，核型正常。

C. 图示为 hESC-iMSCs 表面标志物流式检测：高表达 CD105、CD90、CD73 等 MSCs 阳性 Markers；基本不表达 CD45、CD34、CD11b、CD19 以及 HLA-DR 等 MSC 阴性 Markers。

D. 图示为 hESC-iMSCs 三系分化能力检测：iMSC 分化为成骨细胞，软骨细胞和脂肪细胞。

官方网址：<http://www.genscion.com.cn>

订货热线：4006169114、020-84224925

Email: whiga22@126.com

