

## 人蜕膜组织间充质干细胞培养无血清套装

### ▼【用途与描述】

本培养基套装（产品货号：DSC2023）可用于蜕膜来源的人类间充质干细胞的原代细胞分离及细胞传代，同时还能保持其多向分化的潜能，使用本产品无需添加血清或血清替代物。本产品化学成分明确，没有任何动物源的组分。产品批间差异小，所有原料均符合 GMP 标准。更适合临床研究用途。

子宫内膜间充质干细胞作为一种特殊的间充质干细胞，来源于子宫内膜组织，可从女性月经血和子宫内膜组织中分离获得，其数量为骨髓来源的 30 倍，具有更强的自我更新能力和增殖能力，分化潜能更接近胚胎干细胞。有研究发现子宫内膜的再生细胞(ERC)不仅具有几乎每 24 小时复制一次的速率，而且它们产生独特生长因子的速率比来自脐带血的干细胞要快上 10 万倍。

### ▼【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、人白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、微量元素等。

### ▼【产品性能指标】

1. 从健康人类蜕膜组织分离原代细胞所需时间

可见细胞生长的时间：7-10 天。细胞可收获的时间：13-15 天。上述所指蜕膜组织为新鲜组织。

2. 细胞传代所需的时间：3-4 天（5000-10000cells/cm<sup>2</sup>/ml）。

3. 细胞表型：CD34 和 CD45 为阴性表达，CD44、CD73、CD90 和 CD105 为阳性表达。

4. 细胞形态：细胞为梭形，呈指纹状或旋涡状生长。

5. 产品指标

外观：基础培养基为淡粉色液体 添加物为黄色液体

pH 值：25℃时，7.0-8.0

渗透压：280-320 mOsm/Kg

内毒素：<0.5EU/mL。

### ▼【使用前特别提示】

本产品的使用方法与血清培养基相比有一定差别。敬请用户仔细查看本产品使用说明书后操作，请勿仅以既往经验使用本产品。本产品培养基中没有添加胰酶抑制剂，培养基及其添加物不能用于终止胰酶消化，需要使用无血清胰蛋白酶终止液消化反应，否则影响使用效果。

*注：血清及血清替代物（血小板裂解物）中含抗凝血酶Ⅲ，可以抑制胰酶的消化作用，这是血清能够终止胰酶消化的原因，也是血清培养基中 MSC 细胞传代时，消化前必须经过 PBS 清洗（以去除残留血清）的原因。*

*对于人间充质干细胞，尤其是利用该体系培养的细胞而言，其消化脱壁的时间应该较短，难以消化脱壁的细胞多数可能不是间充质干细胞，而是单核巨噬细胞等杂细胞。*

### ▼【规格与保存】

序号	产品名称	货号	产品规格	储存条件
1	AM-V Serum Free Medium (人蜕膜组织间充质干细胞无血清基础培养基)	DSC2023-A	450ml	2-8℃
2	人蜕膜组织间充质干细胞无血清添加物	DSC2023-B	50ml	-20℃

本实验内所涉及其他试剂均可另行采购，请联系当地经销商

### ▼【MSC 完全培养基准备】

37°C水浴融化“人蜕膜组织间充质干细胞无血清添加物”，按 10%比例加入“人蜕膜组织间充质干细胞无血清基础培养基”中，充分混合均匀，即为完全培养基。建议完全培养基现用现配，1 周内用完。如培养体系小，建议根据实际使用量将添加物分装冻存使用，避免添加物的反复冻融。

提示：

1. 添加物为非澄清液体请放心使用。
2. 原代细胞培养及细胞传代培养过程中，建议配合使用 MSC 促贴壁试剂（产品货号：SC2013-G-C）。促贴壁试剂在原代细胞培养中可提高细胞爬出效率，在传代过程中提高细胞增殖效率，缩短细胞回收时间，由 5-6 天收获一代提高至 3-4 天收获一代。
3. 传代过程中建议配合使用胰蛋白酶/EDTA 消化液（产品货号：TE2004Y）、无血清胰蛋白酶终止液（产品货号：SC2013-G-E）。提高贴壁细胞消化效率，减少细胞团块产生。

### ▼【MSC 促贴壁试剂的使用】

直接使用 MSC 促贴壁试剂并参考下表以适当用量包被培养板/瓶，轻轻摇动培养皿，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中，37°C 至少孵育 60min（或用保鲜膜包裹涂层的培养皿/瓶 2-8°C过夜），接种前弃去多余的试剂。

培养器皿	表面积 (cm <sup>2</sup> )	促贴壁试剂使用量
12 孔板	4.5	1ml
6 孔板	9.6	2ml
T25 瓶	25	5ml

T75 瓶	75	15ml
T175 瓶	175	20ml
T225 瓶	225	35ml

## 使用说明 / DIRECTIONS

### ● 1 FIRST 蜕膜组织间充质干细胞原代细胞分离 (原代细胞的培养)

#### ▼ 人蜕膜组织 MSC 的分离 —— 子宫内膜组织

##### 1. 实验材料

1.1 材料：离体 2 小时内的健康人子宫内膜组织

1.2 试剂：人蜕膜组织间充质干细胞培养无血清套装 (产品货号：DSC2023)、TBD 脐带/组织保存液 (产品货号：TBD2012UCP)

1.3 仪器：细胞培养瓶、无菌超净工作台、自动 CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱、倒置生物显微镜、无菌不锈钢托盘、无菌镊子、无菌药匙、无菌烧杯、无菌手术剪、移液枪、无菌移液管、无菌枪头、无菌培养瓶

##### 2. 实验方法

2.1 临床无菌取蜕膜组织，浸泡于生理盐水 (每毫升含 25U 肝素钠) 或组织保存液中。

2.2 超净台内取出蜕膜组织，用 PBS (产品货号：PB2004Y) 充分洗涤残留的血液。反复清洗，弃上清。

2.3 将组织块剪碎约 1mm<sup>3</sup> 的体积。

2.4 以含 250 ~ 350μg/ml 胶原酶Ⅲ的 PBS 缓冲液为消化液，将所述消化液与人子宫内膜组织按照 2 ~ 4 :

1 的体积比混合放入 37°C 中，水浴震荡大约 60min-90min，直至组织块被消化成粘稠状态（根据消化状态可适当调整时间）。抽取消化产物上清液，获得单细胞悬液。

2.6 将所述单细胞悬液以 200 目细胞滤网过滤，补加 PBS 至 45ml，400g 10min 离心获得细胞团块。

2.7 弃去上清液，在所述细胞团块中加入 5ml 完全培养基充分吹打混匀。取少量细胞悬液进行计数，最后将细胞调整至密度为  $1.5-2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup>/ml 接种至 T25（或其他规格）细胞培养瓶中，拧松瓶盖置于 37°C、饱和湿度、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，72h 后倾倒除去未贴壁细胞，换新鲜培养液，而后每 72h 换液，直至细胞长至 90% 汇合。

*注意：观察当瓶中底部已出现贴壁细胞，则去除上清中的组织块或非贴壁细胞（可把这步中的上清倒进一个新瓶中继续培养），原瓶换上新鲜的完全培养基。*

## ▼ 人蜕膜组织 MSC 的分离 —— 经血

### 1. 实验材料

1.1 材料：离体 4 小时内的健康女性经期中第二天到第三天的经血（无菌）。采集女性的经血时对女性外阴清洁消毒，使用高压灭菌的月事杯采集经血，从采集源头减少污染几率，保持经血中细胞活性；

1.2 试剂：人蜕膜组织间充质干细胞培养无血清套装（产品货号：DSC2023）；

1.3 仪器：细胞培养瓶、无菌超净工作台、自动 CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱、倒置生物显微镜、无菌不锈钢托盘、无菌镊子、无菌药匙、无菌烧杯、无菌手术剪、移液枪、无菌移液管、无菌枪头、无菌培养瓶；

### 2. 实验方法

2.1 将 10-15ml 无菌健康女性经血转移至一支 50ml 无菌离心管中，加入 1ml 抗凝剂摇匀，再补加 PBS

至 25ml 充分混匀稀释；

2.2 取出 1 支 50ml 高效离心管，加入 15ml 样本密度分离液，200g 离心 1min，确保离心后隔片下充满分离液，隔片上有 0.5-1cm 高度分离液。小心将 25ml 抗凝经血缓慢沿管壁加至分离液界面上，确保血液及分离液之间有明显界面（每管可加 15-25ml 血液，若超过 25ml，则分管）。600g，离心 30min（也可根据实际情况进行调节），注意慢升慢降。

离心后可观察从上至下分为 4 层，淡黄色血浆层，白色环状细胞层，分离液层，红细胞层。

2.3 小心吸取白色环状细胞层，补加 PBS 至 40ml，300g 离心 10min，弃上清，获得细胞沉淀。

2.4 弃去上清液，在所述细胞沉淀中加入 5ml 完全培养基充分吹打混匀。取少量细胞悬液进行计数，最后将细胞调整至密度为  $1.5-2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup>/ml 密度接种至 T25（或其他规格）细胞培养瓶中，拧松瓶盖置于 37°C、饱和湿度、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，72h 后倾倒除去未贴壁细胞，换新鲜培养液，而后每 72h 换液，直至细胞长至 90% 汇合。

## ● 2 SECOND 蜕膜组织间充质干细胞传代培养

1. 吸去旧培养液，将瓶内剩余的组织块去净后，根据培养瓶规格适当加入 1-5ml 胰蛋白酶/EDTA 消化液（产品货号：TE2004Y）置 37°C 培养箱中消化 1-2 分钟，或室温消化 3-5 分钟，显微镜下观察到绝大部分细胞变圆，极少量细胞贴壁仍呈纺锤形，极少量细胞已经悬浮即可终止消化。

**注意：**对于人间充质干细胞，尤其是利用该体系培养的细胞而言，其消化脱壁的时间应该较短，难以消化脱壁的细胞多数可能不是间充质干细胞，而是单核巨噬细胞等杂细胞。

2. 立即加入与胰酶替代物等体积无血清胰蛋白酶终止液（产品货号：SC2013-G-E），用吸管吸取液体，

反复吹打培养器瓶底壁，使细胞彻底脱离瓶皿底壁。

3. 吸出培养瓶内所有液体，水平离心（250g，10分钟），弃去上清液。

4. 用2-3ml完全培养基重悬细胞。

5. 将细胞调整至密度为5000-10000个/cm<sup>2</sup>/ml接种至T175细胞培养瓶中，加入40ml完全培养基，放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱中，拧松瓶盖培养72小时，培养期间无需换液补液。

**注意：**不可让间充质干细胞完全融合或过度融合，否则将会导致以下问题：

(1) 细胞生长接触抑制；

(2) 消化后细胞成片脱落，悬液中出现团块；

(3) 干细胞自发分化。这些问题将严重影响细胞的生长状态。

6. 培养72-96小时后可收获10<sup>7</sup>个细胞。