

## 细胞产品手册

OriCell®成人骨髓间充质干细胞  
无血清完全培养基(II型)

产品货号: HUXMA-90062



## 产品介绍

由 OriCell® 团队精心研发推出的 OriCell® 成人骨髓间充质干细胞无血清完全培养基（II 型）套装，包括供给细胞营养的细胞基础培养基、血清替代物等。该产品适用于成人骨髓间充质干细胞无血清条件的培养；可维持成人骨髓间充质干细胞良好的增殖速率，并保持良好的分化能力。

**注意：**本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

## 套装成分

套装成分	货号	体积
OriCell® Basal Medium For Cell Culture OriCell® 细胞基础培养基	BAME-03011	475 mL
OriCell® Supplements For Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Serum Free Culture OriCell® 成人骨髓间充质干细胞无血清培养添加物	HUXMA-04062	25 mL

## 质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过渗透压、pH 检测。
- 通过产品性能检测。

详情见《产品检测报告》。

## 产品稳定性及保存条件

1. 套装内所有成分均需避光保存。
2. 套装内基础培养基需置于 4°C 冰箱保存，保质期为 1 年；培养添加物需置于 -20°C 保存，保质期为 2 年。
3. 配制后的完全培养基，需放置 4°C 保存，保质期为 1 个月；若能保证培养条件稳定，容器密封性能良好，避免冷热交替，则保质期可适当延长，但不得超过 45 天。
4. 所有产品请于保质期内使用；过期的成分可能严重影响培养效果。

## 处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体和操作区域的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 各成分需按照保存条件妥善存放，并尽快使用。
4. 若短期内无法用完整套培养基，应按套装内各成分体积比例分批配制并分装保存。

## 完全培养基的配制

### 所需材料

- OriCell®成人骨髓间充质干细胞无血清完全培养基（II型）套装
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材（移液管、移液器吸头、离心管等）
- 洁净的封口膜
- 铝箔纸等避光材料

**注意：**建议培养器皿中包被可以辅助细胞贴壁的试剂。

### 操作步骤

1. 实验前至少 1~2 h，将 OriCell®成人骨髓间充质干细胞无血清培养添加物（以下简称无血清添加物）放置于 4℃冰箱内完全融化。
2. 使用 75%酒精消毒试剂盒中各管/瓶的开口外壁。
3. 待试剂管上的酒精挥发干净后，无菌打开各个试剂管/瓶。
4. 将无血清添加物加入到 OriCell®细胞基础培养基中，尽可能的将添加物全部加入基础培养基中。

**注意：**建议在无血清添加物首次融化时分装成小支置于-20℃保存，避免反复冻融；添加物中可能会有少量析出，析出物对细胞培养无影响。

5. 拧紧基础培养基瓶盖，轻柔并充分摇匀。
6. 用封口膜密封瓶口，用铝箔纸包裹瓶身，并标注名称、配制日期等信息。

**注意：**1) 完全培养基套装内的所有成分都严格控制无菌，一般情况下我们不建议再次除菌。若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌；

2) 若短期内无法用完整套培养基，建议分批配制；请按照套装内各成分比例，配制所需量；  
剩余的成分必须严格按照各自的保存条件妥善保存，并且不可多次冻融。

3) 请根据自己需求选择是否添加抗生素，如需添加请自购。

## 细胞的培养

### 所需材料

- OriCell®成人骨髓间充质干细胞无血清完全培养基 (II 型) 套装 (以下简称完全培养基)
- OriCell® 无动物蛋白胰酶替代物 (货号: APFD-10001)
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) (货号: PBS-10001)
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材 (移液管、移液器吸头、离心管等)

### 细胞复苏

1. 准备好基础培养基, 温育到 37°C。
2. 在 15 mL 离心管中加入 9 mL 的完全培养基。
3. 从液氮中取出冻存的成人骨髓间充质干细胞, 放入-80°C冰箱约 3~5 min。
4. 在-80°C放置 2~3 min 后, 取出冻存细胞, 将冻存管迅速放入 37°C温水中, 快速晃动令管内含物尽快融化。仔细观察, 待冻存管内含物完全融化后取出

**注意:** 1) 融化过程必须晃动冻存管, 保证冻存液融化迅速、均匀;

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染;

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时, 即停止水浴。继续晃动冻存管, 至冰晶融化。

5. 用 75%的酒精消毒冻存管口的外壁。
6. 在超净台中打开冻存管, 用吸管将细胞冻存悬液移入装有 9 mL 完全培养基的 15 mL 离心管中。注意这一过程不要有气泡产生。
7. 为了减少细胞损失, 往冻存管中加入 1 mL 完全培养基, 清洗冻存管, 用吸管将这 1 mL 的细胞悬液吸入离心管中, 再用吸管将离心管中的细胞轻轻的吹打混匀。
8. 将细胞悬液经 250xg, 离心 5 min。
9. 尽量去除上清液, 向细胞沉淀物加入 2~3 mL 的完全培养基 (已预热到 37°C), 轻轻吹打均匀。
10. 将细胞按  $2\sim3\times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup> 的密度接种到培养瓶中。
11. 加入足量的完全培养基, 轻轻摇晃细胞培养瓶使细胞均匀分布。
12. 在 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
13. 复苏后的第二天, 给复苏的细胞换用新鲜的完全培养基 (已预热到 37°C)。
14. 之后, 每两天给细胞换新鲜的完全培养基直到细胞达 80%-90%的汇合度。

## 细胞传代

1. 将完全培养基、1×PBS、胰酶替代物预热至 37°C。
2. 吸去培养液，用 1×PBS（T25 培养瓶加入约 3 mL，T75 培养瓶加入约 6 mL）洗涤细胞 1 次。注意不要损害贴壁的细胞。
3. 吸去 1×PBS，加入胰酶替代物（T25 加入约 1 mL，T75 加入约 2~3 mL），轻轻旋转，使胰酶替代物覆盖培养器皿表面，消化，显微镜下观察到约 70%~80%左右的细胞变圆后，用手轻拍培养器皿的壁使细胞脱壁。

**注意：**由于不同实验室所使用的消化液效价不同，消化时间可能会略有不同，具体时间应以显微镜下观察到的情况为准；如使用普通胰酶，建议使用浓度为 0.05%。

4. 立即加入三倍体积的 1×PBS 稀释消化。
5. 用吸管吸取液体，轻轻地反复吹打培养器皿底壁，使细胞彻底脱离瓶皿底壁。吹打时动作不宜太猛，不要产生气泡。
6. 将细胞悬液转移到 15 mL 的离心管中；250 $\times$ g，离心 5 min。
7. 小心弃去上清液，加入 2 mL 完全培养基重悬细胞。
8. 按照 2~3 $\times$ 10<sup>4</sup> 个活细胞/cm<sup>2</sup> 的密度来接种细胞，或者按照 1:2~1:3 的比例来接种细胞。
9. 接种到包被辅助贴壁试剂的培养瓶中培养。
10. 加入适量的完全培养基，把细胞放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**注意：**1) 换液时机：

- ① 传代后发现有很多死细胞，应该予以换液；
  - ② 当成人骨髓间充质干细胞的完全培养基 pH 值变酸时（培养液的颜色变黄），而且此时细胞仍未可以传代，则应该予以换液；
  - ③ 一般来说，成人骨髓间充质干细胞的换液间隔为 2~3 天。
- 2) 传代时机：当成人骨髓间充质干细胞达到 80%~90%汇合度时，就应该进行传代。不可让成人骨髓间充质干细胞汇合度过高，否则会发生接触抑制。这将严重影响细胞的生长状态。

赛业（广州）生物科技有限公司保留 OriCell® 细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。