

间充质干细胞无血清培养基  
**技术白皮书**

## 目录

一、产品简介.....	P1
二、产品组成.....	P1
三、性能概述.....	P1
四、特色概述.....	P2
五、原代分离工艺.....	P2
六、原代细胞分离数据.....	P2
七、植块法原代分离注意事项.....	P3
八、连续传代工艺（以康宁T-175培养瓶为例）.....	P3
九、连续传代数据.....	P4
十、细胞形态.....	P5
十一、细胞检测.....	P7
十二、无血清和血清培养基的区别.....	P14
十三、常见问题解答.....	P15

## 一、产品简介

本产品专为脐带来源的间充质干细胞特别开发，也可培养骨髓、牙髓、胎盘等来源的间充质干细胞。真正无血清纯因子培养体系，无人源无动物源，更适合干细胞报药与临床实验研究。产品性能优异，一根20cm正常脐带，原代分离可收获细胞 $2.4 \times 10^7$ 个，连续传代至P20依然保持间充质干细胞的表面特征稳定。

本产品已获美国FDA二类医疗器械注册受理，510(K)号：K190983，为国内首家获得FDA二类注册受理的干细胞培养基。此外，针对培养基安全性专门做了培养基生物相容性及毒性实验，性能出众的同时更专注于安全。

## 二、产品组成

产品名称	货号	规格	用途
间充质干细胞无血清培养基基础	NC0103	500mL/瓶	将5mL NC0103.S添加至500mL NC0103基础培养基中，可用于脐带间充质干细胞原代分离及种子库构建
间充质干细胞无血清培养基添加剂1 (脐带-原代细胞分离及种子库构建)	NC0103.S	5mL/瓶	
间充质干细胞无血清培养基添加剂2 (脐带-冻存细胞及高代数细胞传代)	NC0105.S	5mL/瓶	将5mL NC0105.S添加至500mL NC0103基础培养基中，可用于脐带间充质干细胞高代次传代

## 三、性能概述

### 原代 (NC0103+NC0103.S)

一根20cm新鲜脐带可得原代细胞 $2.4 \times 10^7$ 个

5-9天，原代细胞开始爬出

12-14天，可收获原代细胞

### 传代 (NC0103+NC0105.S)

将从脐带中分离到的原代细胞或构建的种子库细胞进行传代培养，可稳定传代至20代。

可收获P3细胞总数 $6480 \times 10^7$ 个。

可收获P10细胞总数 $58032 \times 10^{13}$ 个

可收获P20细胞总数 $424351 \times 10^{20}$ 个

## 四、特色概述

本产品无人源无动物源，纯因子培养体系非血清替代物

使用本产品不需包被培养瓶

使用本产品不需额外添加任何成分

## 五、原代分离工艺（以康宁150mm培养皿为例）

1. 将医用剪刀、组织镊、手术柄、手术刀等器械提前灭菌。
2. 用含 25mg/L 庆大霉素的 DPBS 清洗脐带 3 遍，然后用不含庆大霉素的 DPBS 清洗脐带至清洗液无血色。
3. 使用剪刀将脐带处理成 2cm 大小的组织段，每段组织沿脐带静脉将脐带剪开。
4. 使用组织镊撕去脐带静脉内膜、外皮、两根动脉使华通氏胶充分暴露。
5. 使用手术刀将华通氏胶剪切成边长 3-5mm 的小块，每 2cm 组织段切成的华通氏胶小块接种于一个 150mm 培养皿中使组织块均匀分布，添加 10mL-15mL 完全培养基。
6. 24-48h 后，补充完全培养基至 30mL。
7. 7 天全量换液。
8. 10 天全量换液。
9. 12-14 天收获原代细胞。

使用其它表面积培养皿接种量如下：

培养瓶皿	近似底面积 (cm <sup>2</sup> )	第 0 天加液量 (mL)	第 2 天加液量 (mL)	植入组织块 (块)
60mm 皿	21	2	3	5
100mm 皿	55	5	7	12
T-25 瓶	25	2	3	6
T-75 瓶	75	7	8	15
T-175 瓶	175	15	20	40
T-225 瓶	225	20	25	50

## 六、原代细胞分离数据

一根脐带可用部分大约为 16cm，每铺一个 150mm 培养皿大约需要 2cm 脐带，合计能铺 8 个皿。平均每 150 皿（相当于 T175 瓶）能收获原代细胞 1E6-3E6 个，一根脐带可收获原代细胞 8E6-2.4E7 个。

培养皿编号	培养时间	收获数量	收获总数量	平均每皿收获数量
1	14 天	2.60E+06	2.39E+07	2.98E+06
2		3.20E+06		
3		3.10E+06		
4		2.62E+06		
5		4.46E+06		
6		3.32E+06		
7		2.96E+06		
8		1.60E+06		

## 七、植块法原代分离注意事项

### 1. 组织块过小或过大

组织太小不利于贴壁，组织块要有一定厚度，太薄不易爬出。太大虽然易贴壁，但会影响细胞爬出时间。理想的组织块大小为边长 3-5mm，有一定厚度的组织。

### 2. 组织块排列过密。

每个组织周边应预留细胞生长空间。

### 3. 处理方式不合适

培养液不得过度冲击脐带组织导致组织未成功贴壁；华通氏胶应充分暴露；应去除动脉与华通氏胶外皮。

### 4. 加入培养基过少

过少的培养基不能为 MSC 细胞提供足够的营养物质，以及会使气体交换受阻。

### 5. 未在 7 天时换液

会使培养基中的营养物质消耗殆尽，以及 MSC 细胞的代谢废物积累过多而未能及时去除。

### 6. 脐带样本不合格

脐带离体时间过长(3 天以上)；或者脐带组织保存不当；或者样本水肿、凝血或华通氏胶含量较少等均属于不良样本。

### 7. 培养基使用的问题

培养时添加的抗生素过多；或者使用反复冻融的 MSC 培养基添加剂；或者使用预温次数超过 5 次的完全培养基；或者使用超过有效期的培养基等。

## 八、连续传代工艺（以康宁T-175培养瓶为例）

1. 培养 72h 后，在显微镜下观察培养的 MSC 细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。

### 特别提示：

细胞融合度请勿超过 100%，特别是切勿使局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，会导致细胞严重衰老及分化。再者传代前细胞生长过密（细胞融合度过高），导致细胞消化异常（细胞整片或成片脱落），加之随后的不当操作（用移液器反复吹打成片细胞使其成为单个细胞），此操作所导致的机械损伤会严重损害细胞膜，引发大比例的细胞死亡，特别是这些细胞经冻存后再次使用时。

2. 在超净台中，弃去培养瓶中的培养液，加入 10 mL PBS 清洗细胞后弃去。

3. 加入 3 mL 干细胞温和消化酶常温下消化细胞。

4. 在显微镜下观察到细胞全部收缩变圆，且有少量细胞开始流动时（一般 2-5 分钟），立即加入温和酶使用量 2 倍体积（6mL）的细胞培养上清或者完全培养基稀释细胞悬液。

**特别提示:**

使用培养上清液或完全培养基稀释温和消化酶(货号: NC1004.1)对细胞有较好的保护作用,比使用 DPBS 等缓冲液会多回收 10 ~ 30% 的细胞,而且培养上清液或完全培养基能够更好的保持细胞活性,能一直维持较高的扩增倍数。

5. 用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞,并轻轻吹打混匀,使细胞完全分散。

**特别提示:**

进行该操作时动作一定要温和,因为细胞消化过程中的细胞损伤,更多的是来自于类似吹打与离心的机械损伤。

6. 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中,300g 离心 5 min。弃上清,加入 2mL 完全培养基重悬细胞,使用台盼蓝染色,或流式细胞仪等方法计数。

7. T175 瓶加入 35mL 完全培养基。按密度 8000 cells/cm<sup>2</sup> 接种细胞。

**特别提示:**

应让培养基沿培养瓶的上表面(细胞生长面的相对面)或侧表面加入,切忌冲到培养瓶底面,否则容易在培养基冲刷到培养瓶底面位置出现细胞生长空白区域。

离心步骤不可去除,干细胞温和消化酶短时间内对细胞无损伤,但切勿超过 10 分钟。

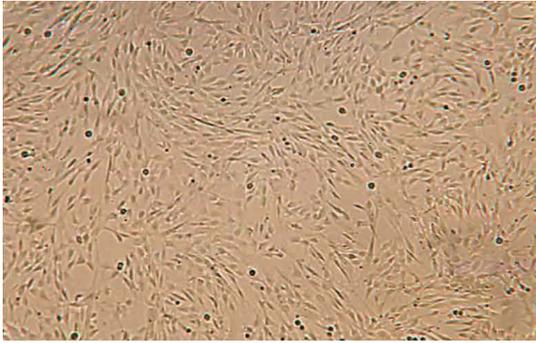
8. 将培养瓶置于 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养。

## 九、连续传代数据

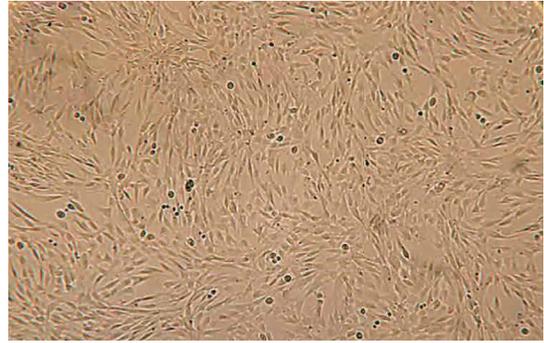
将从脐带中分离到的原代细胞使用原代分离培养基(添加剂货号为 NC0103.S)养出的细胞进行传代培养。在传代无血清培养基(添加剂货号为 NC0105.S)中稳定的传代到 20 代。10 代时可扩增至原代细胞数量的 241.7 亿倍。一根脐带可收获到 58031951290×10<sup>7</sup> 个细胞。大致相当于 580 亿单位 针剂。

代次	接种密度 (个/cm <sup>2</sup> )	时间	汇合度	收获细胞数 (个)/150皿	扩增倍数	总收获细胞数(个)	总扩增倍数
原代	-	12 ~ 14天	-	3.00E06	-	2.4E+07	-
P1	8000	72h	80%~90%	1.85E07	15.45	37 E+07	15
P2				1.58E07	13.13	486 E+07	203
P3				1.60E07	13.31	6480 E+07	2700
P4				1.38E07	11.48	74392 E+07	30997
P5				1.27E07	10.56	785576 E+07	327323
P6	10000			1.62E07	11.57	9089117 E+07	3.79E6
P7				1.24E07	8.84	80347790 E+07	3.35E7
P8				1.53E07	10.91	876594392 E+07	3.65E8
P9				1.08E07	7.68	6732244929 E+07	2.81E9
P10				1.21E07	8.62	58031951290 E+07	2.42E10
P11	12000			1.54E07	8.56	496753503043 E+07	2.07E11
P12				1.27E07	7.03	3492177126395 E+07	1.46E12
P13				1.95E07	10.83	37820278278862 E+07	1.58E13
P14				1.27E07	7.08	267767570214344 E+07	1.12E14
P15				9.77E06	5.43	1453977906263890 E+07	6.06E14
P16	15000			1.26E07	5.62	8171355833203050 E+07	3.40E15
P17				1.16E07	5.15	42082482540995700 E+07	1.75E16
P18				1.22E07	5.42	228087055372197000 E+07	9.50E16
P19				1.03E07	4.56	1040076972497220000 E+07	4.33E17
P20				9.18E06	4.08	4243514047788650000 E+07	1.77E18

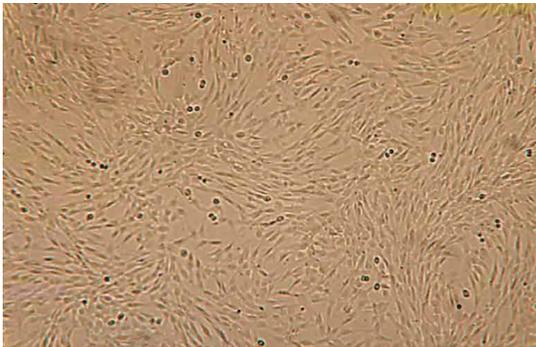
## 十、细胞形态



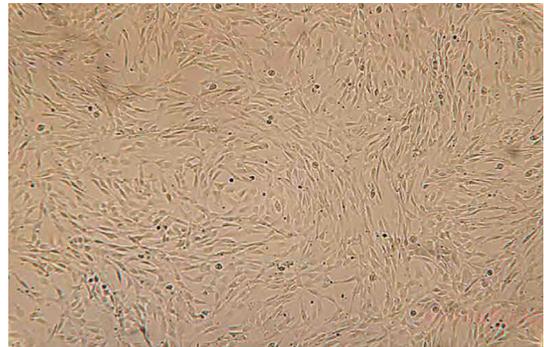
P1



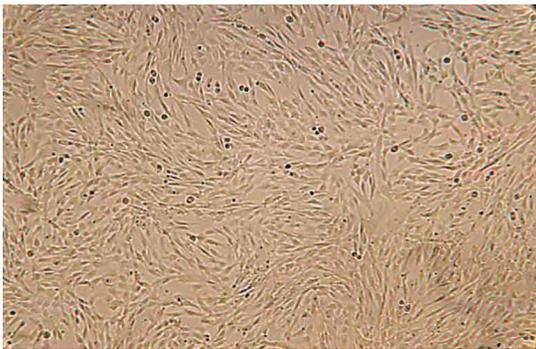
P2



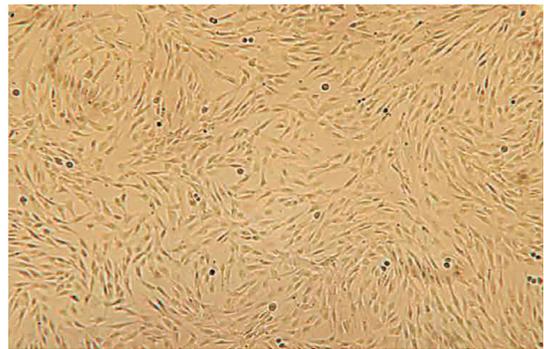
P3



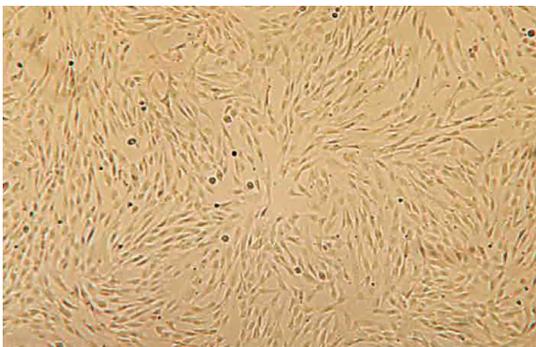
P4



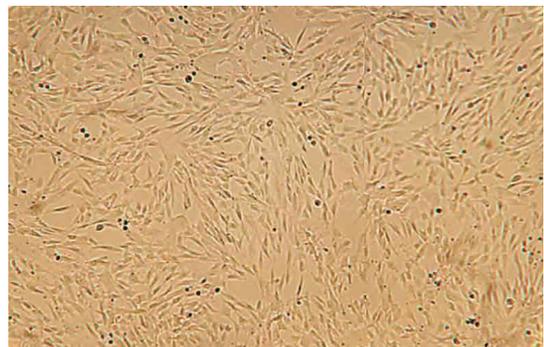
P5



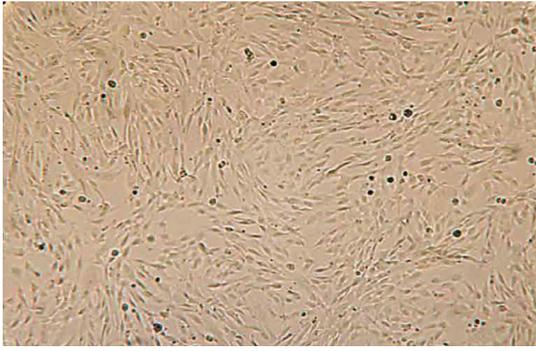
P6



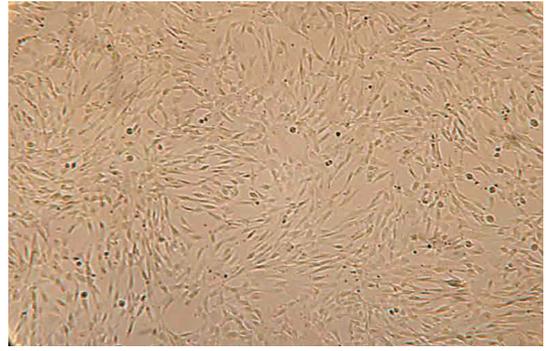
P7



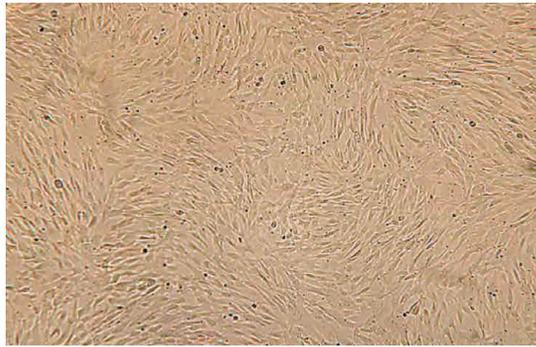
P8



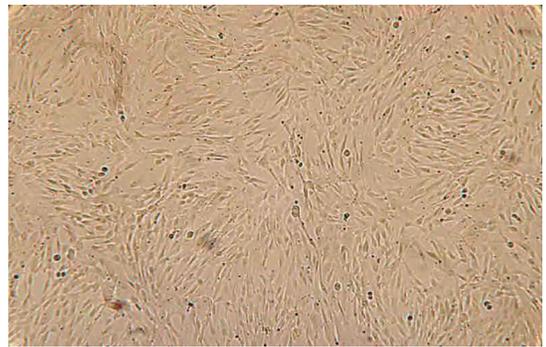
P9



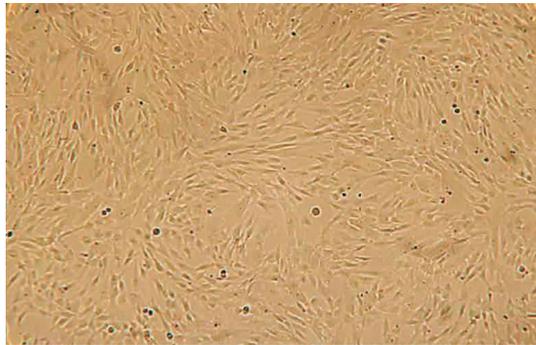
P10



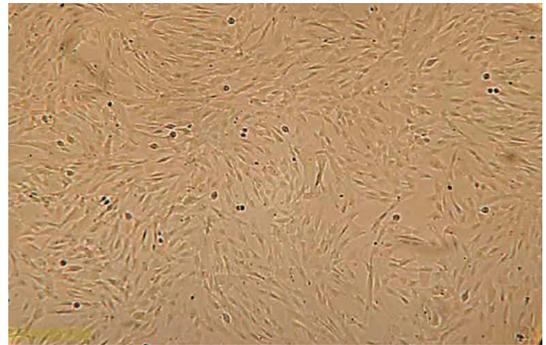
P11



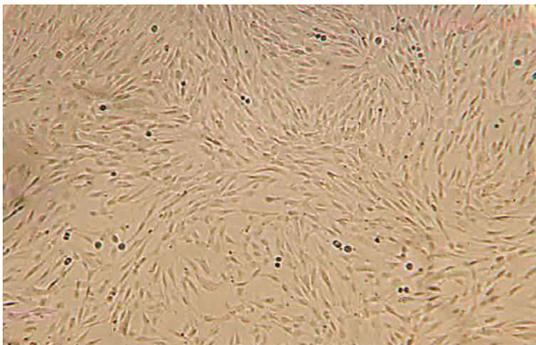
P12



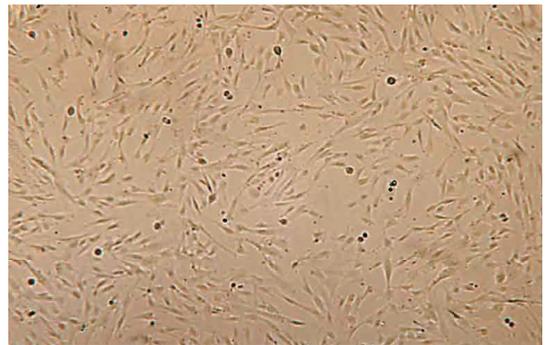
P13



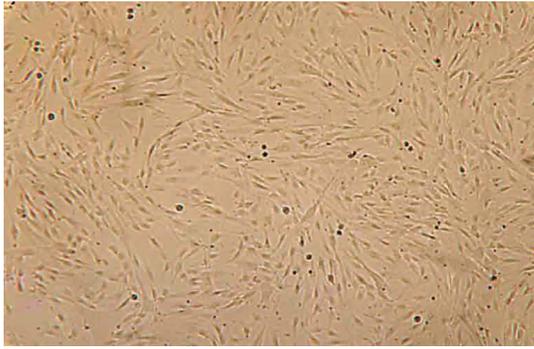
P14



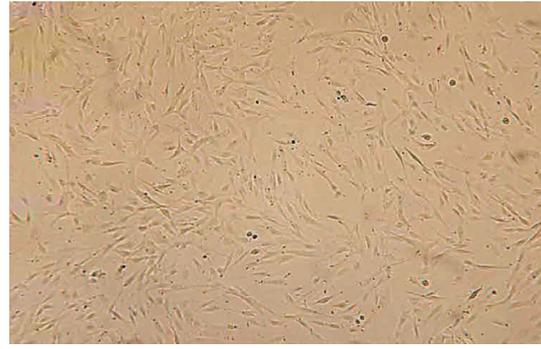
P15



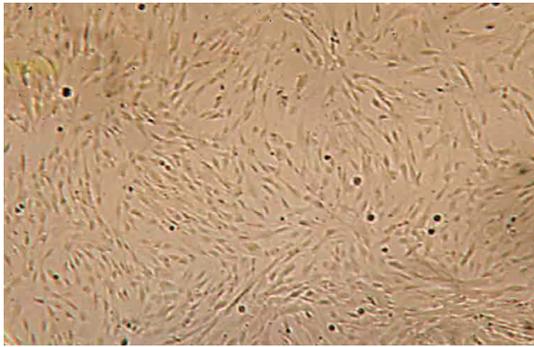
P16



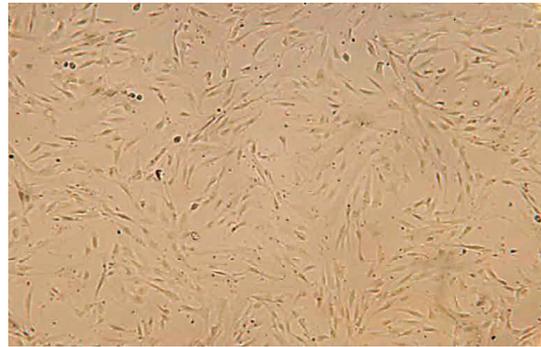
P17



P18



P19

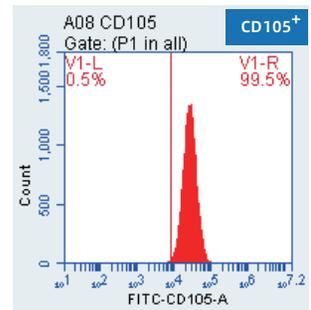
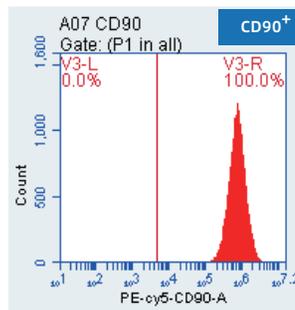
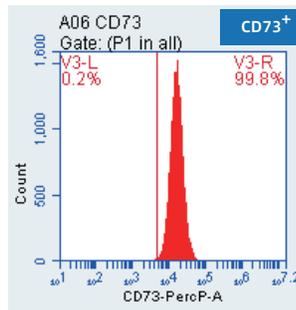
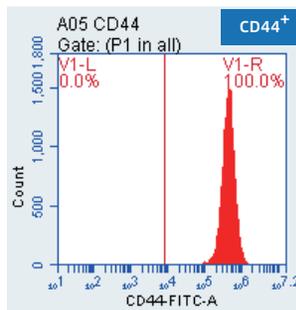
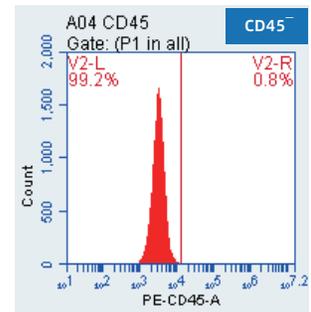
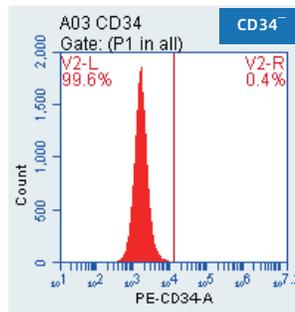
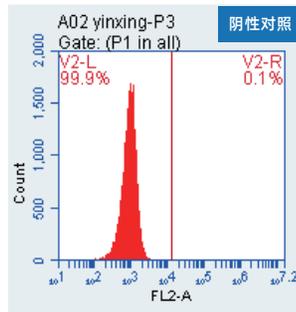


P20

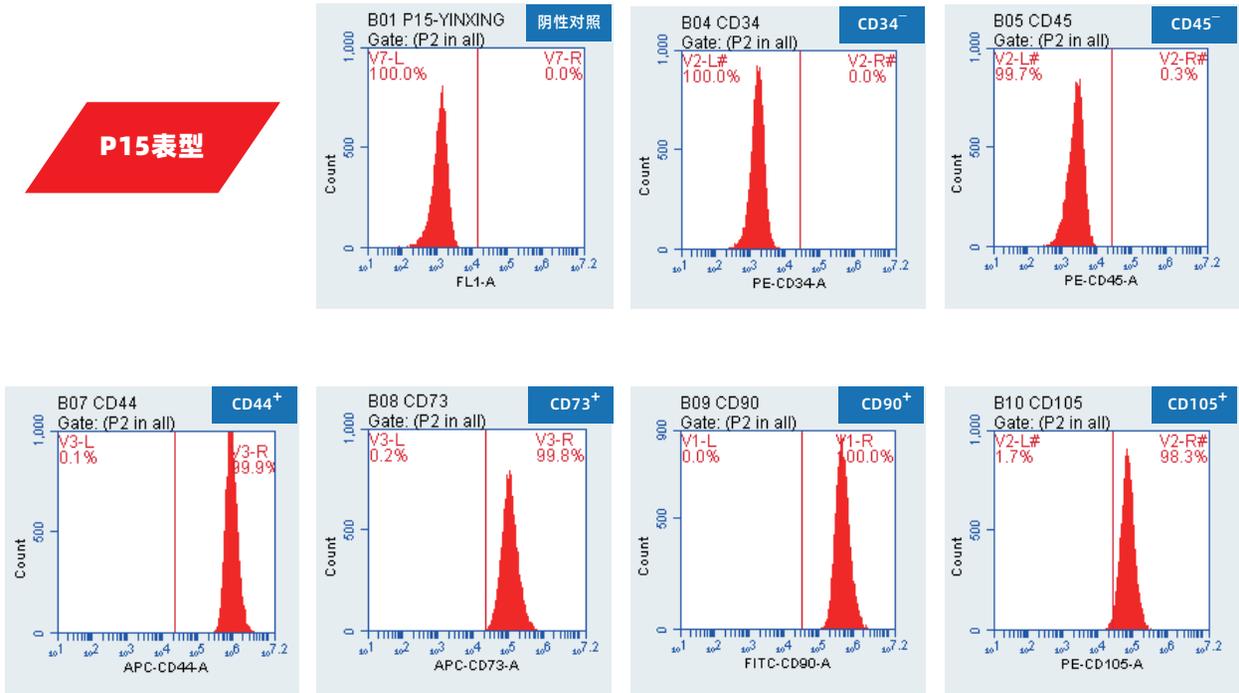
## 十一、细胞检测

### 1. 表面标志物鉴定

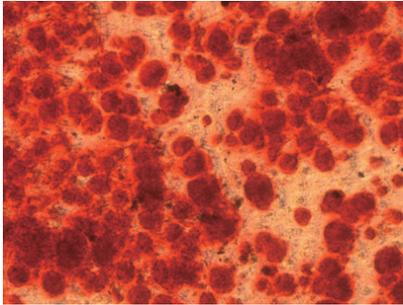
**P3表型**



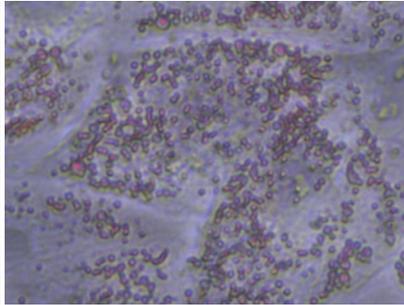
**P15表型**



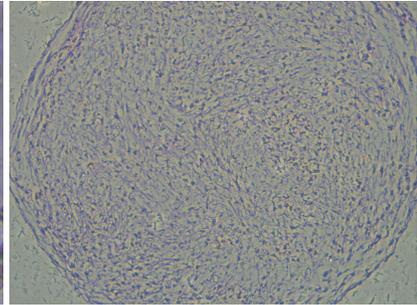
**2.三系分化**



诱导成骨分化结果



诱导成脂分化结果



诱导成软骨分化结果

**3.软琼脂克隆实验**

**实验背景**

生物制剂的安全性检测通常需要观察有无致瘤性，致瘤性检测包括体内和体外致瘤试验两部分。软琼脂培养法是体外检测转化细胞和肿瘤细胞致瘤性最为常用的方法，也是 WHO 及美国 FDA 的建议之一。

**实验原理**

本实验利用肿瘤细胞系在半固体培养基中具有较强的细胞克隆形成能力，而非肿瘤细胞系不具备或仅有极低的细胞克隆能力来鉴定脐带间充质干细胞（UCMSCs）的致瘤潜能。

**检测方法**

- 1、60mm 平皿皿底预铺置 0.7% 琼脂过夜凝固；
- 2、取 P10 UCMSCs (P8 质控细胞株复苏传代至 P10) 与 Hela 细胞悬液，镜下计数备用；
- 3、分别用友康高代次传代培养基和含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基配制终浓度为 0.35% 低熔点琼脂糖的混合液

与上述细胞悬液混匀（每皿 100 个细胞），迅速加入 60mm 平皿中，培养箱中过夜凝固，其中血清培养的 UCMSCs 与 HeLa 使用含 10%FBS 培养基，友康培养的 UCMSCs 使用友康高代次传代培养基；

4、次日每孔分别加入 5mL 完全培养基，以后每 3 天换液；

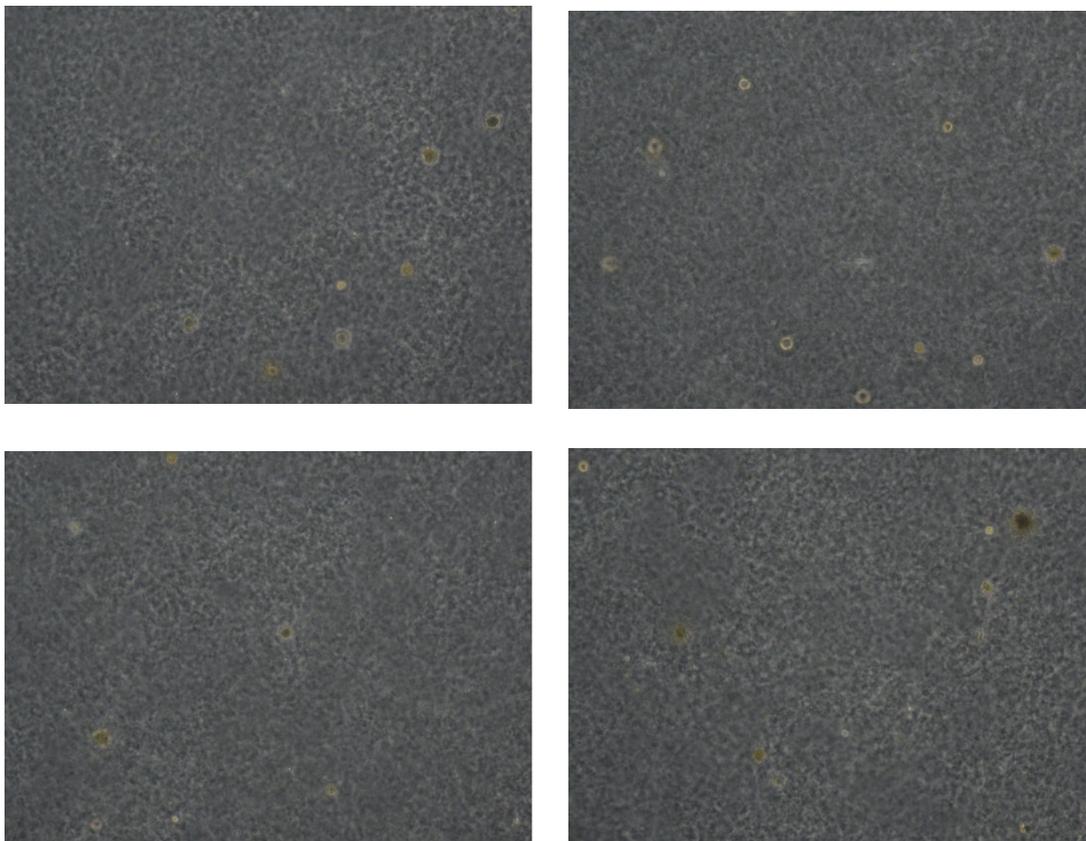
5、3 周后，倒置显微镜下随机取 8 个视野观察是否有细胞数大于 20 的克隆团，计数并计算平均值。

### 实验结果

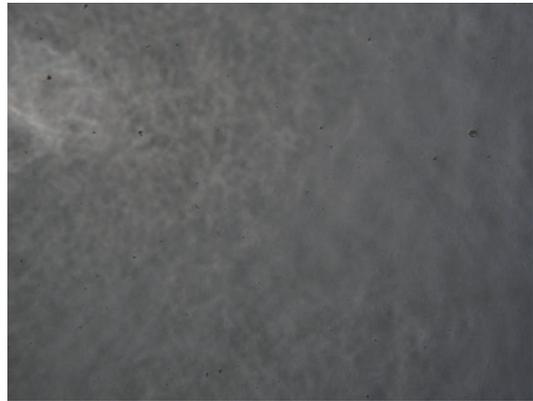
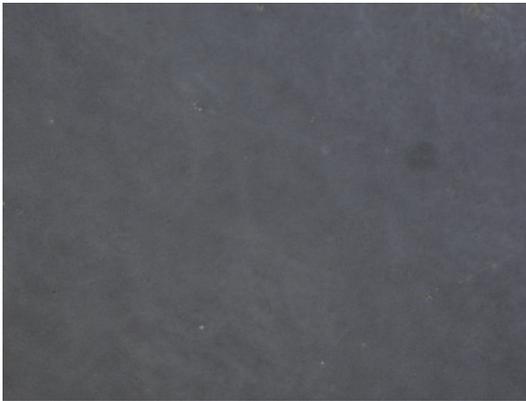
组别	细胞数大于 20 的克隆团数平均值
FBS-Hela 组	7
Yocon-MSK 组	0
FBS-MSK 组	0

### 镜下照片

FBS-Hela 组



FBS-MSD 组



友康 -MSD 组



**实验结论**

该实验计数克隆中细胞数目大于 20 的克隆数，在第 21 d 时，接种的 HeLa 细胞系中有大量克隆球形成，与此相对照，所有 UCMSCs 组未有克隆形成。上述结果显示与 HeLa 细胞系较强的阻力介质克隆形成能力比较，两种培养基养出的 UCMSCs 均不具备形成肿瘤能力。

**4. 人间充质干细胞对 T 细胞增殖的抑制效果****实验目的**

检测人间充质干细胞对 T 细胞增殖的抑制效果

**实验设置**

组别	细胞	培养基
1	T 细胞 +MSC	10%FBS 培养基 + 植物凝集素
2	T 细胞	10%FBS 培养基 + 植物凝集素
3	T 细胞	10%FBS 培养基

**检测方法****(1) T 细胞分离**

利用淋巴细胞分离液，分离脐带血单核细胞 (PBMC)，用适量无菌磷酸盐缓冲液使用水平离心机离心洗涤 2 次；使用磁珠分选试剂盒说明书分离 T 细胞。

**(2) T 细胞染色**

细胞计数，并调整悬液活细胞浓度。然后进行 CFSE 标记，根据 CFSE 产品说明书进行。

**(3) T 细胞与人间充质干细胞共培养****(4) T 细胞增殖**

按  $1 \times 10^6$  细胞 /mL 接种培养，并用 2-5ug/mL 的植物凝集素刺激 T 细胞增殖，设立未用植物凝集素刺激的 T 细胞培养作为对照，培养 96h。

**(5) 人间充质干细胞抑制 T 细胞增殖**

利用消化酶消化人间充质干细胞并制备成单细胞悬液，计数。人间充质干细胞按  $2 \times 10^5$  细胞 /mL 接种，细胞贴壁后，将 T 细胞按 5:1(T 细胞 : 人间充质干细胞) 的比例进行共培养，并用 2-5ug/mL 的植物凝集素刺激 T 细胞增殖，培养 96h。

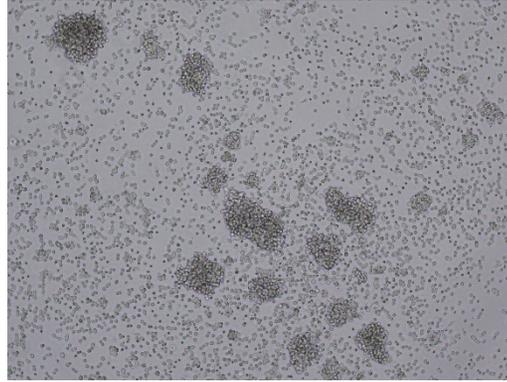
**(6) T 细胞收集并检测**

收集培养后的 T 细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，通过 40um 滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

**检测结果**



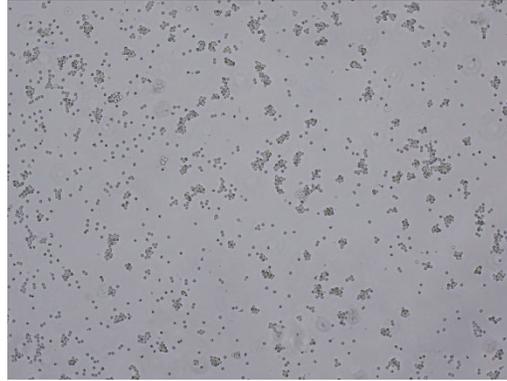
不含 MSC+PHA 组



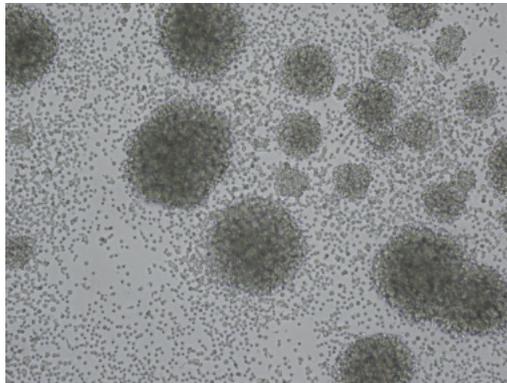
含 MSC+PHA 组



不含 MSC 无 PHA 组



不含 MSC+PHA 组



含 MSC+PHA 组



不含 MSC 无 PHA 组

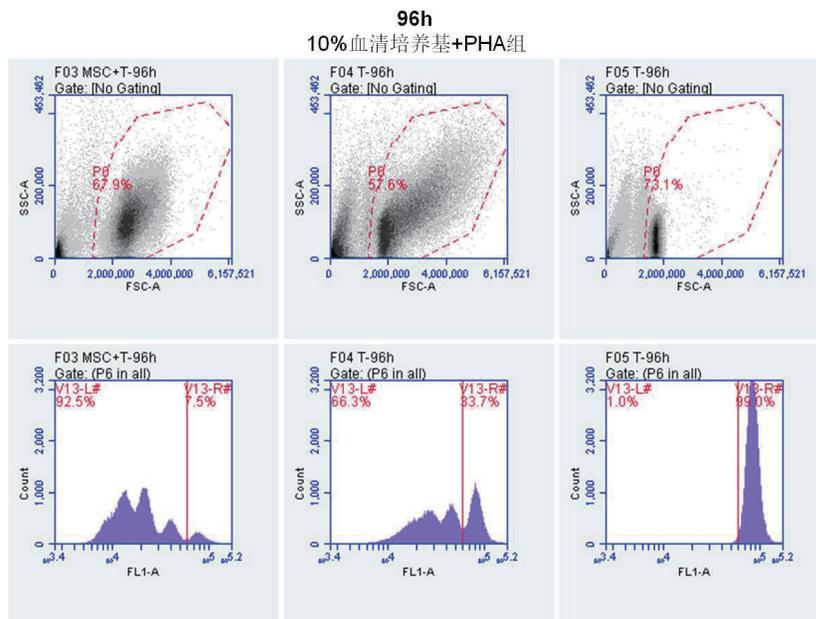


镜下观察，可看出含 MSC 组对 T 细胞扩增有明显的抑制作用。

细胞计数结果

培养时间	分组		圈门	细胞数	增殖量
96h	10%FBS	T 细胞	81.13%	2.10E+06	1.02E+05
		T 细胞 + 植物凝集素	60.57%	3.48E+06	1.48E+06
		T 细胞 +MSC+ 植物凝集素	71.43%	2.33E+06	3.29E+05

CFSE 染色的荧光检测结果如下所示



实验结论

从镜下观察及计数结果看，MSC 能明显抑制 T 细胞的扩增。

## 十二、无血清和血清培养基的区别

培养基类型	血清培养基	血清替代物培养基	无血清培养基
是否有明确配方	否	否	是
是否无动物源	否	否	是
产品批间差	大	大	极小
接种密度 /cm <sup>2</sup>	5000-10000	5000-10000	8000-10000
生长时间	72h	72h	72h
胰酶浓度及消化时间	0.25% 3min	0.25% 3min	温和消化酶 2-5min
终止消化方式	完全培养基	完全培养基	无需终止，培养上清或完全培养基稀释

备注：

无血清培养基培养的 MSC 细胞，在消化时推荐使用干细胞温和消化酶（友康产品，货号：NC1004.1）替代传统的猪胰酶或牛胰酶。

- 1、温和酶为基因重组酶，无动物源组分，适合临床应用用途。
- 2、温和酶对细胞损伤小，收获细胞的活率高于传统胰酶，可确保传代后扩增倍数能维持较高水平。
- 3、消化所需时间为 2-5 分钟，但消化时间在 10 分钟内，对细胞基本无损伤。消除了用户粗放操作导致的严重后果。
- 4、消化后无需昂贵的抑制剂终止消化，仅需 2 倍体积的培养上清液或完全培养基稀释后，离心去除即可，无额外物质引入。

## 十三、常见问题解答

### 1. 如何判断脐带的质量符合标准？

- (1) 脐带无大范围凝血，为乳白色，未发生水肿等病变，华通氏胶部分含量丰富等。
- (2) 鉴别脐带胖瘦，太瘦的脐带很难剥离出合适大小的华通氏胶，甚至剥不出华通氏胶；水肿的脐带建议弃置，该脐带很难爬出质量合格的干细胞；
- (3) 严重凝血或被血渗入的脐带建议弃置，能爬出细胞，但血细胞很多，会阻碍干细胞爬出及生长，导致收获原代数量较少；
- (4) 是否为新鲜脐带，保存时间越久，越难爬出（3 天以上的脐带建议弃置）；
- (5) 保存时，过高的抗生素浓度会抑制干细胞的爬出；
- (6) 脐带是否通过安检 CT 机器，例如地铁安检等，会影响干细胞的爬出。
- (7) 应始终保持脐带及华通氏胶块湿润（可用完全培养基润湿），否则会影响细胞爬出。

### 2. 手工剪碎的组织块，多大最为适宜？为什么？

边长 3-5mm 左右为适宜，较剪成肉泥状简便些，较 1mm 左右相比之后的操作可更粗放些，且 3-5mm 在保证能接种一定数量的皿或瓶的同时可减少组织处理时对细胞的损伤，更好的保留细胞的活性。友康长期试验表明 3-5mm 边长，正常贴壁的组织块 6 天即可看见细胞爬出，是最有效率的操作方法。

### 3. 在分离原代细胞的 14 天的过程中，需要换液吗？为什么？

- (1) 在 37°C 环境下，培养基里的某些成分会发生缓慢降解，当时间过长时，低于细胞所需含量，会影响细胞生长；
- (2) 细胞生长会消耗养分，同时排出代谢废物。前 7 天细胞生长较少，营养消耗及代谢废物积累都较慢，可以不换液，但 7 天后会有越来越多的细胞爬出生长增殖，营养消耗及代谢废物积累都会大幅加快，所以 7 天时要换液，以保证营养充足及微环境适合细胞生长增殖，之后每 3 天换一次液。不及时换液，会导致细胞状态差，且细胞增殖慢。

### 4. 用血清培养基、替代物培养基或其他品牌的无血清培养基分离的细胞能直接转入此培养基中培养吗？

可以不经驯化，直接转入此培养基中培养，但要确保转入前的细胞活率在 90% 以上，而且状态良好，没有出现细胞拉丝、培养过密等细胞老化现象。

若转入前细胞因生长过密出现接触抑制或消化过度等问题，转入后可能会出现明显细胞转体系不适应的情况。

### 5. 为什么用血清 + 培养基的接种密度为 5000？而你们的要 8000？

含血清培养基营养较丰富，各类因子均含有，所以可以低密度接种，但无血清培养基使用的都是人工合成的，即提纯的物质及重组蛋白，只添加了必需的物质，因此，无血清培养基需要提高接种密度，来增强细胞之间的联络，使细胞群体可以更好的生长。当然靠前代数的细胞，无血清培养基也是可以低密度接种的，有时可能会多长 1-2 天时间，但不能保证所有的样本均能正常生长。

### 6. 使用前需要包被培养瓶吗？

不需要，培养基中添加有促贴壁组分，可以有效地使细胞良好贴壁，不过使用预包被培养瓶不会对细胞生长有不利影响，但可能会增加消化所需的时间。

#### 7. 配制成完全培养基后，对保存条件有什么要求吗？

(1) 完全培养基 2-8℃避光保存，此条件下可保存三周，但是由于蛋白在溶液中易降解，所以最好在 2 周内用完。禁止使用超过 30 日未使用完的完全培养基。

请勿强光及紫外照射。

(2) 使用培养基时，不可 37℃水浴预温。

(3) 同一瓶培养基切勿多次取出预温，应控制在 5 次以内，最好用多少取多少。可将培养基加入培养瓶或皿中预温，剩余培养基尽快放入避光冰箱中保存。

#### 8. MSC 无血清培养基，是否含酚红？如果不含酚红，如何判断营养消耗？有什么质检标准？

答：我公司产品配方经优化设计，在规定的培养时间内营养足够细胞使用，客户可以检测一下培养后上清中的葡萄糖及氨基酸含量，经我们反复测试，这些均有富余。一般情况下，培养三天后传代或换液，完全可满足营养需求。

#### 9. 建议接种密度多少？是否需要随细胞代数的变化而调整？

建议接种密度为 8000 cells/cm<sup>2</sup>，5 代以后可适当增加至 10000 cells/cm<sup>2</sup>。

#### 10. 为什么细胞融合度不可过高？

细胞生长过密，会出现接触抑制，继而细胞活性会受到影响，导致后续传代细胞生长缓慢或扩增倍数较低；并且细胞生长过密容易引发分化，细胞高密度生长是向软骨分化的必要条件之一。

#### 11. 用干细胞温和消化酶消化细胞的时候，细胞成片脱落，应该怎么做呢？

消化时，细胞成片脱落，说明细胞融合度 >100%，甚至堆叠在一起，可以适当延长消化时间，建议当细胞融合度达到 90% 的时候就进行传代。还有一种情况，可能细胞融合度并不是很高，可能也会出现细胞成片脱落，就是消化时一直在摇培养瓶，细胞之间还没有消化开，但是此时细胞已从底面脱离，这种由于操作导致的，可以在加酶后 1 分钟内摇晃培养瓶，之后静置，特别是细胞开始收缩后，一定要静置消化，3-5 分钟时镜下观察，或者一直放在镜下观察，待细胞分散成单个后，停止消化，时间控制在 5min 左右。前期在镜下观察，待稳定后可以根据时间及直接观察判断停止消化。

#### 12. 在 MSC 细胞培养的过程中，可不可以添加抗生素来预防细菌污染？

可以添加，但是如果是用于细胞治疗，添加抗生素会有致敏的风险。

#### 13. MSC 细胞传代后发现拉丝现象，是什么原因造成的？

(1) 某些物质（比如某些刺激因子，或金属元素等）浓度过高会导致细胞拉丝；

(2) 细胞消化过度，导致细胞损伤，会出现细胞拉丝；

(3) 细胞连续传代过程中，酶消化、各种机械损伤、复制性损伤等累积，靠后代数细胞会出现此现象；

(4) 一些促贴壁物质有时会导致细胞拉丝；

(5) 某些样本自身的原因导致；

(6) 密度过低可能会出现此现象，稀疏时，细胞两极朝向不规律，细胞之间往往通过突起相连接，出现致密的贴壁细胞层时，细胞的两极有规律地排列成束状或漩涡状，有时候无血清培养基接种密度过低会导致细胞长不起来，细胞会逐渐伸长。

**14. 客户使用友康培养基重悬的 MSC，在室温下放置 2、4、6、8 小时后，活率由 95% 下降至 70%，是什么原因导致的？**

在非培养条件（不适宜温度及未贴壁状态）下，培养基中缺少细胞保护成分，必须添加某些组分，且在合适的存放条件（4℃）下才能维持细胞活率。

**15. 客户培养的 MSC 会出现聚团的现象，是怎么回事？**

一方面是某些品牌的培养瓶 TC 处理的表面亲水基团结合不牢固，有些区域的亲水基团会脱落，使用无血清培养基时，会导致此区域细胞无法贴壁，这部分细胞会向旁边的贴壁细胞靠拢，于是形成了聚团现象；另一方面是某些细胞自身受损，导致的不贴壁。

**16. 为何用你们的冻存液复苏 MSC 活率没有宣传中的这么高，或者复苏后有絮状物？**

1 离心出来的细胞要立刻冻存，在超净台上放置的时间越长活率越低。2 控制细胞冻存密度在  $1E6-2.5E7/mL$  之间，不要超过  $3E7/mL$ 。3 水浴解冻时间越快越好，最好不超过 2 分钟，防止常温 DMSO 对细胞有毒性 4 解冻后与冻存体积 1:10 加入完全培养基，不要用生理盐水或 PBS 复苏细胞。5 有条件情况下尽量做程序降温。6 冻存的细胞应放置在 -80 度 12h 后转入液氮，不可小于 12h 直接放入液氮。



脐带间充质干细胞原代分离视频

**YOCON 友康<sup>®</sup>**

**友康生物科技（北京）股份有限公司**

总部地址：北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

网站：[www.yocon.com.cn](http://www.yocon.com.cn)



友康生物公众号



友康生物小程序