

Mesenchymal Stem Cells Serum
-free Medium (GMP Grade) 2.0

GMP 级间充质干细胞 无血清培养基套装 2.0

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



使用前请仔细阅读本操作说明

友康生物科技(北京)股份有限公司

YOCON 友康®

GMP级间充质干细胞无血清培养基2.0套装使用说明书

【产品名称】

GMP 级间充质干细胞无血清培养基 2.0 套装

【规格与保存】

产品名称	产品货号	包装规格	保存条件	保质期限
GMP 级间充质干细胞无血清培养基 2.0	NC0107	500 mL/ 瓶	2-8℃, 避光	12 个月
间充质干细胞无血清培养基添加剂 (GMP 级)	NC0106.5	5 mL/ 瓶	-20℃, 避光	12 个月
GMP 级干细胞温和消化酶	NC1004.1	500 mL/ 瓶	2-8℃, 避光	12 个月

【用途与描述】

本培养基可用于多种来源的人类间充质干细胞的原代细胞分离、种子库构建及连续传代培养, 同时还能保持其多向分化的潜能, 如骨髓 (BM-hMSC)、脐带 (UCM-hMSC)。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、没有添加血清或血清替代物 (血小板裂解物)、没有任何动物源及人源的组分。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。

【主要组成成份】

氨基酸、维生素、无机盐、重组人白蛋白、重组人转铁蛋白、重组人胰岛素、微量元素等。

【产品设计原理】

在诸如 DMEM、MEM、M199 等基础培养基之上, 添加了各种氨基酸、维生素、无机盐、人白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、微量元素, 既能分离原代 MSC, 又能后期培养 MSC, 能保持细胞正常的形态与表型, 同时, 避免添加血清或血清替代物中的某些能够促使干细胞分化的组分, 在细胞传代的过程中, 维持干细胞的未分化状态。

【产品性能指标】

1. 从人类脐带分离原代细胞所需时间

以植块法为例:

可见细胞生长的时间: 5-9 天。

细胞可收获的时间: 12-16 天。

上述所指脐带为新鲜脐带, 若为水肿的脐带或冷冻保存的脐带组织, 可见 MSC 细胞长出的时间为 14 天左右, 细胞可收获的时间为 21 天。也会出现不能分离出细胞的情况。

2. 细胞传代所需的时间：3-4 天（接种密度：8000-15000 cells/cm²）。

注：P1-P5：8000 cells/cm²；P6-P10：10000 cells/cm²；P11-P15：12000 cells/cm²；P16-P20：15000 cells/cm²。

3. 细胞表型

CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 为阴性（< 2%），CD44、CD73、CD90 和 CD105 为阳性（> 95%）。

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

渗透压：280-350 mOsm/Kg；内毒素 <0.25EU/mL；无菌：细菌真菌不得检出；支原体：不得检出；pH 值：25℃时，6.8-7.8；外观：淡黄色 - 黄色澄清透明液体；装量：500 mL/ 瓶。

【使用前特别提示】

1. 本产品的使用方法与血清培养基及血清替代物培养基相比，确有差别。

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。

与血清培养基及血清替代物培养基相比，对现有操作的某些细节做了规范性的要求（比如对向培养瓶或培养皿加入培养液的操作手法有明确要求）。

2. 本产品中没有添加胰酶抑制剂，不能用于终止胰酶消化。

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。

使用本产品时，推荐使用 GMP 级干细胞温和消化酶（配套产品，货号：NC1004.1）消化细胞，此方法无须抑制剂终止，培养上清稀释后离心去除即可，且 10 分钟内对细胞无损伤，收获细胞活率高，传代后扩增倍数维持较高水平，避免了细胞消化后胰酶残留的问题。

【MSC完全培养基准备】

将培养基添加剂室温融化，按 1:100 比例加入培养基基础中即成为 MSC 完全培养基，使用前需在室温下预温 10-30min，时间不宜过长，切勿强光或紫外照射。

完全培养基 2-8℃可避光保存 30 天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在 2 周内用完，培养基中可能有少量白色絮状析出，为正常现象，不影响产品性能。完全培养基配制完成后，不可多次反复预温（控制在 5 次以内），可取出适量预温，禁止使用超过 30 日未使用完的完全培养基。科研少量、多次使用时，建议添加剂融化后立即分装（添加剂出厂后仅允许冻融一次）。

特别提醒：

如果确实需要分装添加剂，应知晓，会出现分装后的总体积不足 5 mL 的现象，这是由于在包装瓶壁及瓶盖上以及吸取的枪头有残留导致的，建议最后剩余的一部分添加剂使用原瓶盛装，且做好添加剂不足的心理准备。没有特殊情况，强烈不建议分装添加剂。融化培养基添加剂时不可 37℃水浴融化，否则会降低添加剂的活性，导致产品性能下降。

【使用环境1：MSC原代细胞分离（人脐带）】

植块法简述：

1. 用 PBS 清洗脐带至清洗液无血色，去除脐静脉内膜和动脉。
2. 用手术剪或手术刀将华通氏胶剪切成小块，接种入培养瓶或培养皿，使组织块均匀分布，不同培养器皿的组织块植入量及培养基添加量见下表，将培养皿或培养瓶放置于 37 °C、5% CO₂、95% 湿度的二氧化碳培养箱中。
3. 7 天换液。
4. 10 天换液。
5. 12-16 天，收获 MSC 细胞。

培养器皿（型号）	近似底面积 (cm ²)	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	7
100mm 皿	55	5	7	15
150mm 皿	150	15	15	35
T25	25	2	3	8
T75	75	7	8	20
T175	175	15	20	45
T225	225	20	25	55

【使用环境2：连续培养MSC细胞（以T-75瓶为例）】

1. 培养 72h 后，在显微镜下观察培养的 MSC，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 2 mL 干细胞温和消化酶常温下（25°C）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 3-5 分钟），立即加入温和酶使用量 2 倍体积（4mL）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 GMP 级干细胞温和消化酶（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。

室内温度及温和酶温度对消化时间有很大影响，夏季室内温度较高，消化时间为 3 min 左右，而冬季室内温度较低，消化时间会相对延长 2-3 min。25℃时，消化时间介于 3-5 min。

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，1300 rpm (300g) 离心 5 min。弃上清，加入 2 mL 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. T75 瓶加入 15mL 完全培养基。按密度 8000-15000 cells/cm² 接种细胞 (P1-P5: 8000 cells/cm²; P6-P10: 10000 cells/cm²; P11-P15: 12000 cells/cm²; P16-P20: 15000 cells/cm²)。

具体做法：

1) 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。

2) 然后将细胞培养瓶轻轻立起来，将细胞悬液直接加到底部，切忌冲到培养瓶底面，再慢慢将培养瓶放平。

特别提示：

a) 请特别注意培养基加入培养瓶的方式，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。

(详细阐述，详见本说明书的“客户常见问题”)

b) 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。

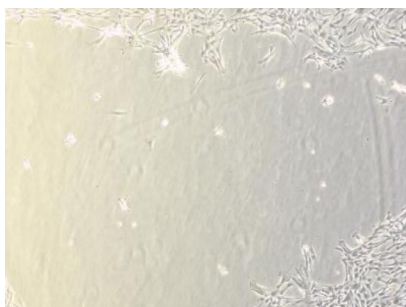
8. 将培养瓶置于 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养。

【使用环境3：复苏培养冻存的MSC细胞（以T-75瓶为例）】

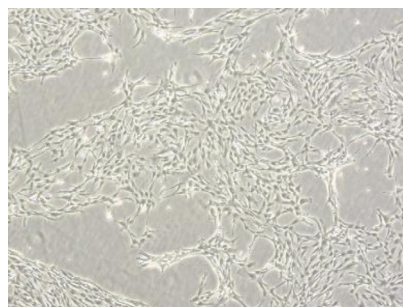
1. 从冰箱中取出完全培养基，在生物安全柜或超净台中吸取适量 (如 T-75 瓶: 15mL) 完全培养基沿上表面加入细胞培养瓶中，切勿冲到培养瓶底面 (细胞生长面)，然后慢慢将培养瓶放平，备用，在室温中预温培养基 10-30min。

特别提示：

请严格按照此步骤操作，否则可能会出现培养瓶中细胞生长空白区域，即所谓的“生长空洞”。



湖泊状的空白区域



河流状的空白区域

原因在于大多数用户使用的是常规 TC 处理 (Tissue Cultured) 的培养瓶或培养皿，培养瓶与其表面亲水基团的结合并不牢固，很容易在液体的冲刷下失去亲水基团，从而导致细胞难以贴壁生长。

现在已有新一代的专门匹配无血清培养基的培养瓶，亲水基团与瓶表面的结合更为牢固。对应的，价格也更高。

用户采用经过我们验证的“避免冲刷”的培养液加入方式，可取得与应用昂贵的新一代培养瓶相同的培养效果。并且无需预先包被培养瓶。

2. 从液氮中取出冻存的 MSC 细胞，迅速将冻存管放入 37°C 水浴快速融解。

特别提示：

需要快速溶解的原因是一般的冻存液中都有添加 DMSO，在常温环境下，DMSO 对细胞是有毒害的，此步骤用时越少越好。

3. 在生物安全柜或超净台中，将解冻后的 1 mL 细胞悬液加入 10 mL 冷的完全培养基中。

4. 1000 rpm (180g) 离心 5 min，弃上清，加入 2 mL 完全培养基重悬细胞，台盼蓝染色计数，按密度 8000-15000 cells/cm² (P1-P5: 8000 cells/cm²; P6-P10: 10000 cells/cm²; P11-P15: 12000 cells/cm²; P16-P20: 15000 cells/cm²) 将细胞接种至 1. 步骤中的培养瓶中，添加时，将培养瓶立起来，直接加到底部，切忌冲到培养瓶底部。

5. 混匀后，将培养瓶置于二氧化碳培养箱中培养，培养条件 37°C，5%CO₂。

6. 24 h 后，更换新鲜的、室温预温的完全培养基。如果使用的是 Yocon 无血清细胞冻存液 (货号 NC1001.1，此冻存液需 2-8°C 储存) 或 GMP 级细胞冻存液 (货号 NC1010，此冻存液常温储存)，则不需换液。

特别提示：

1. 无论冻存前使用的是血清培养基、血清替代物培养基，还是无血清培养基，冻存后的细胞均可直接在无血清培养基中正常培养，但冻存前严重受损的细胞除外。

2. 细胞接种密度，是指活细胞的密度。

3. 建议用户在接种细胞前，进行细胞计数。如果确实不进行细胞计数，又观察到细胞接种后表面漂浮大量的细胞，则 24h 后更换培养液，培养时间应适当延长，若细胞密度过低 (低于 5000 cells/cm²)，可能会出现细胞长不起来的现象。

【使用环境4：MSC冻存】

1. 用干细胞温和消化酶消化待冻存的细胞，离心、重悬后进行细胞计数。

2. 1300 rpm (300g) 离心 5 min，去除上清。

3. 根据细胞计数情况，缓慢加入适量冷的无血清冻存液 (无血清冻存液可即拿即用或置于冰袋备用)，调整细胞密度在 1×10⁶-2.5×10⁷ cells/mL。

4. 轻轻地重悬细胞，将重悬均匀的细胞按等份加入到无菌的冻存管 (需提前做好标记) 中，旋紧冻存管盖。

5. 迅速将冻存管放入程序降温盒中，然后将冻存盒直接放入 -80°C 冰箱。

注：如果使用 Yocon 无血清细胞冻存液 (货号 NC1001.1，此冻存液需 2-8°C 储存) 或 GMP 级细胞冻存液 (货号 NC1010，此冻存液常温储存)，则不需要程序降温步骤，可直接将细胞放于 -80°C 冰箱。

也适用于传统冻存程序，即程序性降温，效果可能会稍优于直接将细胞放于 -80°C 冰箱。

6. 12 h 后将细胞从 -80°C 冰箱转移至液氮中长期保存。

【用户经常提问的问题与解决方案】

1. 在培养瓶中可见长河状或湖泊状的细胞生长空白区域，是什么原因？该如何解决？

答：原因是现有 TC 处理的培养瓶的表面亲水基团结合不牢固。这个问题在某些品牌的培养瓶中较为突出，某些品牌的培养瓶则极少发现。

解决方法：通过改变加入培养液的方式来解决。

2. 我现在有很多冻存的细胞，这些细胞原来在别的培养基中培养。不知是否可以直接转入无血清培养基？

答：可以直接转入无血清培养基培养，不过要使用原培养基终止消化。

但用户应该注意到一个问题，由于血清培养基 MSC 贴壁较紧，胰酶消化时间较长，很多用户存在细胞受损严重的问题，因此，在接种前请先进行细胞计数，按活细胞数量接种。

3. 我现在使用血清培养 MSC 细胞，现在换用无血清培养基，接种密度是否会有不同？

答：此无血清培养基的接种密度 P1-P5: 8000 cells/cm²; P6-P10: 10000 cells/cm²; P11-P15: 12000 cells/cm²; P16-P20: 15000 cells/cm²。

4. 为什么你们的培养基加入了添加剂后，只允许用 30 天？

答：培养基添加剂中主要组分为重组蛋白，仅在 -20℃可长期稳定保存。因此，添加至培养基基础液后，建议在 2 周内用完。一直处于 4℃保存环境下，超出 2 周培养基仍可使用，但性能会有下降。超出 4 周，禁止使用。但反复预温（室温或 37℃）的完全培养基性能会急剧下降。

5. 细胞周期的标准是什么？

答：广东省干细胞与再生医学协会团体标准 - 人脐带间充质干细胞质量检定标准（T/SRA 003-2019）：取对数生长期 P5 细胞，接种于 10 cm 培养皿中，培养 48h，细胞融合度约 50%-60%，收集细胞，采用流式细胞术通过流式细胞仪进行细胞周期测定。S 期和 G2/M 期比例合计应在 40%- 50% 左右。

深圳市细胞治疗技术协会团体标准 - 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范（SZTT/SSCT 002-2018）：产品的 G0/G1 期细胞含量应大于 80% 且小于 90%，G2-M 期≥ 5%。

6. 端粒酶活性检测标准是什么？

答：广东省干细胞与再生医学协会团体标准 - 人脐带间充质干细胞质量检定标准（T/SRA 003-2019）：采用逆转录 real-time PCR 方法通过 PCR 仪检测其是否表达端粒酶催化亚基基因 hTERT。hTERT 是端粒酶的核心，只表达于端粒酶阳性细胞，并且是端粒酶的限速因子，其 mRNA 表达水平直接决定端粒酶的活性程度。采用实时定量荧光 PCR 的方法检测脐带间充质干细胞应无端粒酶（或非常微弱）表达。

深圳市细胞治疗技术协会团体标准 - 临床研究用人脐带来源间充质干细胞制剂规范（SZTT/SSCT 002-2018）：产品的两代次细胞端粒酶活性差异≤ 10%。

【数据展示】

复苏冻存 P2 细胞并连续传代培养

代次	培养器皿	每皿收获细胞数	扩增倍数	接种密度 /cm ²	培养天数
P3	150mm 皿	1.50E+07	12.52	8000	3 天
P4		1.68E+07	14.00		
P5		1.59E+07	13.22		
P6		1.33E+07	11.07	10000	
P7		1.34E+07	11.13		

脐带原代 MSC 分离并连续传代

代次	培养器皿	每皿收获细胞数	扩增倍数	接种密度 /cm ²	培养天数
P0	150mm 皿	3.68E+06	/	35 块组织 / 皿	14-16 天
P1		1.50E+07	10.00	8000	3 天
P2		1.36E+07	11.29		
P3		1.53E+07	12.75		
P4		1.39E+07	11.55		
P5		1.21E+07	10.08		
P6		1.54E+07	10.28	10000	
P7		1.75E+07	11.64		
P8		1.50E+07	10.00		
P9		1.73E+07	11.56		
P10		1.45E+07	9.64		

说明：

1、连续传代数据均是源于细胞计数仪计数，接种密度为 8000-10000 cells/cm²，表中数据均为多次培养的平均值，单次培养的性能可能会优于展示数据。

2、细胞收获时的细胞融合度不宜超过 100%，当细胞融合度过高，特别是局部过密，导致叠层生长，甚至聚集成球，这样会导致细胞严重衰老及分化，同时容易出现细胞接触抑制，影响后续传代效果。

3、细胞消化时，一定要按照说明书的消化方式进行，强烈建议采用干细胞温和消化酶，这样能够很好的避免因消化过度而影响细胞后续传代。

4、培养基生产厂家在长期使用无血清培养时，明确哪些品牌的细胞培养瓶可以使用，哪些品牌的细胞培养瓶不宜使用，所以关于细胞培养瓶的使用，详细情况可跟培养基生产厂家咨询，厂家会给出最好的建议。

NC0107 培养基用于细胞工厂生产外泌体

复苏 P2 细胞，并连续传代至 P3 细胞时接种至细胞工厂，15 天共收获外泌体 2.52E+12 个。

收获外泌体总量计算

取样时间点	外泌体浓度（个 /mL）	外泌体收获数量（个）	培养基体积（mL）
第 3 天	3.53E+09	4.24E+11	120
第 6 天	5.36E+09	6.43E+11	120
第 9 天	4.76E+09	5.71E+11	120
第 12 天	5.46E+09	6.55E+11	120
第 15 天	1.91E+09	2.29E+11	120
合计		2.52E+12	600

NC0107 培养基用于微载体 3D 培养细胞收获外泌体

周期 15 天，500mL 培养基，共收获外泌体 3.50E+12 个。

收获外泌体总量计算

取样时间点	外泌体浓度（个 /mL）	外泌体收获数量（个）	培养基体积（mL）
第 3 天	6.19E+09	6.19E+11	100
第 6 天	9.26E+09	9.26E+11	100
第 9 天	7.92E+09	7.92E+11	100
第 12 天	6.06E+09	6.06E+11	100
第 15 天	5.54E+09	5.54E+11	100
合计		3.50E+12	500



文件版本号：2025 -V1.0.0

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

友康生物科技（北京）股份有限公司
友康厚德生物制品（北京）有限公司

研发生产基地：北京市密云区科技路6号

总部地址：北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号

华东分区：上海市普陀区真如街道天汇广场706室

华中分区：武汉市东湖高新技术开发区光谷大道58号光谷总部国际2栋1210

华南分区：广东省广州市海珠区新港东路1068号中洲中心北塔901

联系电话：0086-400-001-1266 0086-010-58711655

官方网站：www.yocon.cn



友康生物公众号