

## 脂肪来源人 MSC 细胞说明书

目录号：SCSP-404

细胞名称：脂肪来源人 MSC 细胞

细胞描述：正常的脂肪来源的人间充质干细胞，具备分化成脂肪、成骨和软骨的能力。据报道，该细胞 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 表达阳性；CD14、CD31、CD34、CD45 表达阴性。

物种：人

组织：脂肪

生物安全等级：BSL-1

细胞来源：2013 年引进

完全培养液配方：见【培养方案】。

冻存日期/代数：详见 冻存管/培养瓶 标识。（建议使用 P10 前细胞进行实验，若传代次数过多，MSC 增殖能力将减弱）

参考传代周期：3-5 天（随传代次数增加，细胞生长会变慢，传代周期将变长）

参考传代比例：1:2-1:3

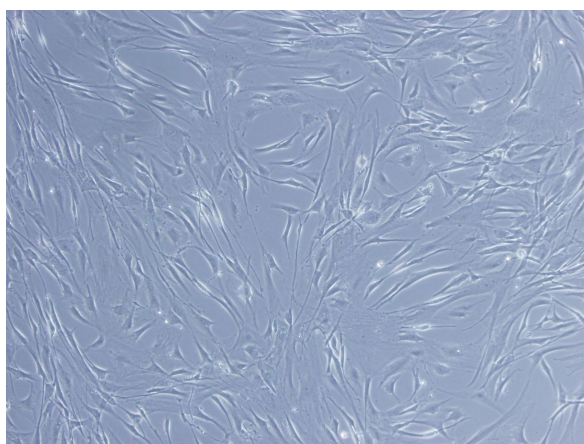
参考换液频率：见【培养方案】。

冻存液配方：见【培养方案】。

细胞形态：纺锤形，成纤维样，贴壁生长

支原体检测结果：阴性

脂肪来源人 MSC 细胞照片：



**参考文献:**

Li Q, et al. Sulforaphane inhibits mammary adipogenesis by targeting adipose mesenchymal stem cells. *Breast Cancer Res Treat* 141(2):317-24, 2013. PubMed: 24002734

Tan KY, et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy* 17(8):1152-65, 2015. PubMed: 26139547

Sahin E, et al. Resveratrol reduces IL-6 and VEGF secretion from co-cultured A549 lung cancer cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tumour Biol* 37(6):7573-82, 2016. PubMed: 26687643

Gattu AK, et al. Determination of mesenchymal stem cell fate by pigment epithelium-derived factor (PEDF) results in increased adiposity and reduced bone mineral content. *FASEB J* 27(11):4384-94, 2013. PubMed: 23887690

Xu H, et al. Electrospun ultrafine fibrous wheat glutenin scaffolds with three-dimensionally random organization and water stability for soft tissue engineering. *J Biotechnol* 184:179-86, 2014. PubMed: 24862198

**备注:**

我库冻存时，每支冻存管约含  $0.5 \times 10^6$  细胞量，体积为  $500 \mu\text{l}$ ，预期存活率 70%，建议复苏至 1 个 T25 培养瓶中。

中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库

**【培养方案】：使用 BI 公司无血清培养液体系**

表 1. 用到的主要试剂

品牌	货号	名称	规格	保存条件
Biological Industries	05-200-1A	NutriStem® MSC XF Basal Medium	500ml	4°C
Biological Industries	05-201-1U	NutriStem® MSC XF Supplement	3 ml	-20°C
Biological Industries	05-752-105	MSC attachment solution 100X MSC贴壁试剂	0.5 ml	4°C
Biological Industries	03-079-1B	Recombinant Trypsin-EDTA Solution 重组胰酶-EDTA	100 ml	-20°C
Biological Industries	03-048-1C	Soybean Trypsin Inhibitor 50X 大豆胰酶抑制剂	20 ml	-20°C
Biological Industries	05-714-1B	NutriFreeZ® D10 Cryopreservation Medium 冷冻液	100 ml	4°C
Biological Industries	02-023-1A	Dulbecco's PBS (w/o Ca & Mg) (也可用其他品牌不含钙镁的 DPBS)	500 ml	RT

## 一. 实验前准备

## 1.1 完全即用型培养基的准备

冻存的 NutriStem® MSC XF Supplement 间充质干细胞无血清添加物需要在室温或 2-8°C 解冻，避免反复冻融及照光。

完全培养基配制：NutriStem®MSC XF Basal Medium (培养基)：NutriStem® MSCXF Supplement (添加物)：青链双抗=500ml : 3 ml : 5 ml，4°C 保存，2周内使用。(注：双抗非必须)

## 1.2 MSC 贴壁试剂包被培养皿

1) 使用无菌的DPBS溶液 (货号: 02-023-1, 不含Ca<sup>2+</sup>and Mg<sup>2+</sup>)，将MSC贴壁试剂稀释100倍(1:100)，用移液管轻轻搅拌混合。

2) 用稀释过的 MSC 贴壁试剂涂层培养皿。

3) 使用合适的量以涂层培养孔或板，使用量参照表2。

4) 轻轻摇动培养皿，用封口膜包裹涂层的培养皿，然后在2-8°C 孵育过夜；或者在CO<sub>2</sub>培养箱(37°C,至少孵育30分钟)。

5) 接种前，用DPBS轻轻冲洗培养皿。

表2.涂层过程中贴壁试剂建议使用量

培养器皿	表面积cm <sup>2</sup> /孔或瓶	稀释100倍后的MSC贴壁试剂使用体积
96孔板	0.34	0.05-0.1ml
24孔板	1.9	0.2-0.4ml
12孔板	3.9	0.4-0.8ml
6孔板/3.5cm培养皿	9.6	1-2ml
T25瓶/60cm培养皿	25	2.5-5ml

T75瓶	75	7.5-15ml
------	----	----------

注：涂层的培养皿需在无菌条件下2℃-8℃储存，需在一周内使用。(标示红色为原厂建议使用量,经过实验测试后可减半使用。)

## 二. 培养方法

### 2.1 MSC 复苏

- 1) 按上述 1.2 步骤包被 T-25 培养瓶或者 6cm 培养皿。
- 2) 将储存在液氮中的冷冻管取出（干冰只供运输途中使用，收到冷冻细胞后应尽快置液氮保存），在 37℃ 水浴中轻轻摇晃冻存管，注意冻存管的盖子和密封圈不要没入水中，以免污染细胞。
- 3) 待冻存管内容物基本上融化，将冻存管管身上的水吸干，并喷洒 75% 酒精。
- 4) 将以下步骤所需物品放入超净台保证无菌操作。在圆锥底 15ml 离心管内加入 5ml 完全培养基。
- 5) 将冻存管盖子打开，细胞悬液全部转移到上述离心管内，轻轻混匀几次。
- 6) 1200rpm，离心 3-5min。
- 7) 吸掉上清液。加入温育好的完全培养液（T-25 5ml, 6cm 培养皿 4ml）轻轻混匀细胞，转移到包被好的培养器皿中。

### 2.2 MSC 传代培养

- 1) 待细胞饱和度达到约 70~80%后进行传代(细胞不能太密集，否则容易分化)，吸弃需传代板孔中的培养基，每孔加适量 DPBS 轻轻冲洗 1 次。
- 2) 根据培养皿适量加入重组胰酶-EDTA (货号：03-079-1)，37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 2~3 min，用吸管吹打培养皿底部，镜下观察细胞完全脱落后。
- 3) 根据重组胰酶-EDTA 使用量加入 10 倍的大豆胰酶抑制剂(货号：03-048-1，用 DPBS 稀释 50 倍)，1200rpm 离心 3~5min。
- 4) 谨慎吸出上清，细胞团块用 3 ml~10 ml 完全培养基悬浮后，混匀细胞悬液。
- 5) 按照 1:3~1:4 的比例进行传代或按照 30000~60000/ml 的细胞密度将细胞接种至 T25 或 T75 培养瓶或其它培养器皿中传代培养,放入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。
- 6) 每 2 天更换一次培养基，培养 3~5 天，待细胞融合度达到 80%左右时，参照操作步骤 1~3 收获细胞。
- 7) 细胞冻存：将离心弃上清后的细胞沉淀悬浮于适量预冷（2~8℃）的 MSC 冷冻液(货号 05-714-1B)中，轻柔地充分吹打混匀后分装至冷冻管。将冷冻管放入程序降温仪并置-80℃冰箱过夜后，转入液氮罐保存。注意，MSC 冻存液应预冷使用，如果分装的冻存管比较多，冻存操作时间长，此冷冻步骤应在冰上进行。