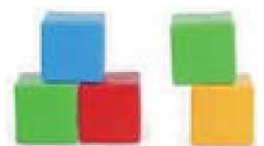


YOCON 友康[®]

用数据取信用户

间充质干细胞无血清培养基套装 3
(脂肪-原代细胞分离及传代培养)
使用说明书 (2021年版)



间充质干细胞无血清培养基套装 3（脂肪-原代细胞分离及传代培养）

使用说明书

【产品名称】

间充质干细胞无血清培养基套装 3（脂肪-原代细胞分离及传代培养）

【用途与描述】

1. 本产品适用于人脂肪来源的 ADSCs 原代分离及传代培养。
2. 本产品使用前不需要包被培养瓶。

【规格与保存】

产品货号	产品名称	包装规格	保存条件	保存期限
NC0103	间充质干细胞无血清培养基基础	500mL/瓶	2-8°C，避光保存	12 个月
NC0104.S	间充质干细胞无血清培养基添加剂 3 （脂肪-原代细胞分离及传代培养）	5mL/瓶	-20°C，避光保存	12 个月
NC1004.1	干细胞温和消化酶	500mL/瓶	2-8°C，避光保存	12 个月

【脂肪干细胞无血清完全培养基准备】

1. 将培养基添加剂（货号：NC0104.S）室温融化，按 1:100 比例加入 NC0103 中即成为 ADSCs 完全培养基，切勿强光及紫外照射。完全培养基 2-8°C 避光可保存 30 天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在 2 周内用完。
2. 完全培养基配制完成后，不可多次（应控制在 5 次内）反复预温，禁止使用配制超过 30 天的完全培养基。科研小量使用时，建议将添加剂融化后立即分装（添加剂出厂后仅允许冻融一次），于 -20°C 保存，每次配制适量完全培养基，可避免培养基的浪费。

注：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承装，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。

3. 融化培养基添加剂时不可 37°C 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：脂肪干细胞的原代分离】

1. 若脂肪含有肿胀液或残留血液，应先1300 rpm（300g）离心5 min，去除下层肿胀液及残留血液；若无相关杂质可直接进入下一步；
2. 将DPBS（含庆大霉素25 mg/L）加入到脂肪组织中，混匀后静置待脂肪组织与DPBS分层，去除下层水层，反复清洗若干次，直至水层无血色。1300 rpm（300g）离心5 min，收取脂肪层，若有较大组织块，可以用灭菌的剪刀剪碎；
2. 在清洗后的脂肪组织中加入等体积的脂肪组织消化酶（如10 mL清洗后的脂肪组织需用10 mL脂肪组织消化酶进行消化），混合均匀，置于水浴恒温振荡器中，37°C，100~120 rpm振荡消化30~60 min（具体消化时间可根据工艺进行调整）；
3. 消化完成后，**用与脂肪组织消化酶等体积的完全培养基稀释细胞悬液**，1300 rpm（300g）离心5 min，用完全培养基重悬SVF细胞（沉淀），然后用70 μm筛网过滤，再次1300 rpm（300g）离心5 min，再次用完全培养基重悬SVF，接种入合适的培养瓶中（如10 mL脂肪组织消化得到的SVF细胞可接种一个T25培养瓶，30 mL脂肪组织消化得到的SVF细胞可接种一个T75培养瓶）；
4. **36~48h后**全量更换完全培养基，以后每72 h换液一次，直至细胞生长至汇合度80~90%进行传代，一般原代分离总共需要6~8天时间。一般每10mL清洗后的脂肪可收获 $4.0\sim 5.0\times 10^6$ 个脂肪干细胞。

【使用环境 2：脂肪干细胞的传代培养（以 T25 瓶为例）】

1. 待细胞长至融合度为80~90%时，收集培养上清液到离心管中，用DPBS清洗一次细胞（**注意不要冲刷及吹打细胞，应控制DPBS与细胞的接触时间在5分钟内，避免细胞损失**），吸弃DPBS；
2. 加入1mL干细胞温和消化酶（货号：NC1004.1），室温条件下，当观察到所有细胞开始收缩变圆（2~5 min），立即加入步骤1中收集的上清液（添加量为消化酶的2~5倍体积），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；

3. 将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中，1300 rpm（300g）离心 5 min；弃上清，加入 1 mL 培养基重悬细胞，计细胞数；
4. 在新的 T25 瓶中加入 5 mL 的完全培养基，切勿冲击细胞培养底面。根据计得的细胞数，按 8000 cells/cm² 接入培养瓶中（T25 需要 2×10⁵ 个细胞），置于 37°C，5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

注：在脂肪干细胞的传代培养过程中，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，使用 DPBS 等缓冲液会损失 30~50% 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。

【使用环境 3：冻存 ADSCs（以 T25 瓶为例）】

1. 待细胞长至融合度为 80~90% 时，收集培养上清液到离心管中，用 DPBS 清洗一次细胞（**注意不要冲刷及吹打细胞，应控制 DPBS 与细胞的接触时间在 5 分钟内，避免细胞损失**），吸弃 DPBS；
2. 用干细胞温和消化酶消化待冻存的细胞，室温条件下，当观察到所有细胞开始收缩变圆（2~5 min），立即加入步骤 1 中收集的上清液（添加量为消化酶的 2~5 倍体积），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；
3. 取样计数；
4. 1300 rpm 离心 5 min，弃上清；
5. 根据细胞计数情况，缓慢加入适量预冷的无血清冻存液，调整至合适的细胞密度；
6. 轻轻地重悬细胞，将重悬均匀的细胞转移到无菌的冻存管（需提前做好标记）中，旋紧冻存管盖；
7. 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：推荐使用 Yocon 无血清细胞冻存液（货号 NC1001.1），不需要程序降温步骤，可直接将细胞放于 -80°C 冰箱。
8. 12h 后将细胞从 -80°C 冰箱转移至液氮中长期保存。

【使用环境 4：复苏 ADSCs（以 T25 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T25瓶： 5 mL)完全培养基加入到培养瓶中，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；
2. 从液氮中取出冻存的ADSCs, 迅速将冻存管放入37°C水浴并振荡, 以快速融化；
3. 在生物安全柜或超净台中, 将解冻后的细胞悬液转移至加有10 mL完全培养基的离心管中；
4. 1300 rpm（300g）离心5 min，弃上清，加入1 mL完全培养基重悬细胞，细胞计数，按8000 cells/cm²接入培养瓶中，添加时切忌冲到培养底面；
5. 混匀后，将培养瓶置于37°C，5% CO₂，饱和湿度的细胞培养箱中培养。
6. 24 h后更换培养基，将培养瓶置于37°C，5% CO₂，饱和湿度的细胞培养箱中继续培养。

注：如果使用的是友康的无血清细胞冻存液（货号：NC1001.1），则无需换液。

【原代分离及连续传代数据】

使用 T25 瓶培养,原代分离每组需要 10 mL 脂肪。后期接种密度均为 8000 cells/cm²。

代次	组别	所需脂肪量	收获细胞数	生长天数 (天)
P0	组 1	10 mL	7.19E+06	7
	组 2	10 mL	5.10E+06	7
	组 3	10 mL	4.27E+06	7
	组 4	10 mL	4.75E+06	6

代次	组别	接种密度 (cells/cm ²)	收获细胞数	扩增倍数 (倍)	生长天数 (天)
P1	组 1	8000	3.17E+06	15.85	3
	组 2		3.38E+06	16.92	3
	组 3		2.81E+06	14.03	3
	组 4		3.02E+06	15.09	3
P2	组 1		3.53E+06	17.67	3
	组 2		3.50E+06	17.51	3
	组 3		3.52E+06	17.59	3
	组 4		4.02E+06	20.12	3
P3	组 1		2.62E+06	13.09	3
	组 2		2.67E+06	13.35	3
	组 3		2.69E+06	13.44	3
	组 4		2.69E+06	13.46	3
P4	组 1		3.69E+06	18.47	3
	组 2		4.00E+06	19.99	3
	组 3		3.81E+06	19.06	3
	组 4		4.01E+06	20.07	3
P5	组 1		3.08E+06	15.39	3
	组 2		2.65E+06	13.27	3
	组 3		2.61E+06	13.05	3
	组 4		3.05E+06	15.24	3
P6	组 1	2.30E+06	11.52	3	
	组 2	2.52E+06	12.61	3	
	组 3	2.26E+06	11.30	3	
	组 4	2.75E+06	13.73	3	
P7	组 1	2.57E+06	12.85	3	
	组 2	2.37E+06	11.84	3	
	组 3	2.75E+06	13.75	3	
	组 4	2.83E+06	14.13	3	
P8	组 1	2.20E+06	11.00	3	
	组 2	2.59E+06	12.93	3	
	组 3	2.55E+06	12.76	3	
	组 4	2.77E+06	13.87	3	

P9	组 1	8000	2.22E+06	11.08	3
	组 2		2.71E+06	13.57	3
	组 3		2.69E+06	13.45	3
	组 4		2.29E+06	11.43	3
P10	组 1		1.54E+06	7.70	3
	组 2		1.61E+06	8.07	3
	组 3		1.78E+06	8.88	3
	组 4		2.63E+06	13.16	3
P11	组 1		2.51E+06	12.55	3
	组 2		1.56E+06	7.81	3
	组 3		1.78E+06	8.91	3
	组 4		2.10E+06	10.50	3
P12	组 1		1.23E+06	6.16	3
	组 2		1.43E+06	7.13	3
	组 3		1.61E+06	8.06	3
	组 4		1.99E+06	9.95	3
P13	组 1		2.08E+06	10.40	3
	组 2		1.23E+06	6.16	3
	组 3		1.05E+06	5.23	3
	组 4		1.77E+06	8.85	3
P14	组 1	1.22E+06	6.11	3	
	组 2	1.43E+06	7.15	3	
	组 3	1.78E+06	8.9	3	
	组 4	1.10E+06	5.55	3	
P15	组 1	1.19E+06	5.95	3	
	组 2	1.43E+06	7.13	3	
	组 3	1.56E+06	7.84	3	
	组 4	1.68E+06	8.40	3	
P16	组 1	1.48E+06	7.40	3	
	组 2	1.22E+06	6.11	3	
	组 3	1.33E+06	6.63	3	
	组 4	1.91E+06	9.56	3	
P17	组 1	1.30E+06	6.50	3	
	组 2	1.45E+06	7.27	3	
	组 3	1.56E+06	7.79	3	
	组 4	1.54E+06	7.68	3	
P18	组 1	1.77E+06	8.84	4	
	组 2	1.44E+06	7.22	4	
	组 3	1.73E+06	8.63	4	
	组 4	1.41E+06	7.03	4	
P19	组 1	1.58E+06	7.90	4	
	组 2	1.49E+06	7.44	4	
	组 3	1.39E+06	6.95	4	

	组 4		1.47E+06	7.37	4
P20	组 1	8000	1.15E+06	5.77	4
	组 2		1.26E+06	6.31	4
	组 3		1.11E+06	5.53	4
	组 4		1.51E+06	7.57	4

【冻存细胞复苏后连续传代数据】

复苏标准质控 P2 细胞株，使用 T25 瓶培养，接种密度均为 8000 cells/cm²。

代次	接种密度 (cells/cm ²)	收获细胞数	扩增倍数 (倍)	生长天数 (天)
P3	8000	3.14E+06	15.68	3
P4		2.74E+06	13.72	3
P5		4.36E+06	21.82	3
P6		2.96E+06	14.81	3
P7		2.12E+06	10.62	3
P8		2.12E+06	10.59	3
P9		1.82E+06	9.09	3
P10		1.42E+06	7.08	3
P11		1.68E+06	8.39	3
P12		1.58E+06	7.90	3
P13		1.85E+06	9.25	3
P14		1.04E+06	5.22	3
P15		1.67E+06	8.34	3
P16		1.21E+06	6.05	3
P17		1.68E+06	8.40	3
P18		1.07E+06	5.33	4
P19		1.52E+06	7.60	4
P20	1.47E+06	7.33	4	



生产企业：

友康生物科技（北京）有限公司

地址：北京市海淀区丰贤中路7号A座三层、B座一层

电话：010-5871165

网址：www.yocon.com.cn

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

文件版本号：2021-V1.0



友康生物微信公众号