产品说明书

间充质干细胞无血清培养基（外泌体倍增型） 产品说明书

【产品名称】

间充质干细胞无血清培养基（外泌体倍增型）

货号： HU5190004A、HU5190005A

规格： 470mL+30mL/套、94mL+6mL套

【产品介绍】

本产品是一款高外泌体分泌量的间充质干细胞无血清培养基。本产品可用于人脂肪、脐带、骨髓、牙髓等组织的间充质干细胞的原代细胞分离及细胞传代培养，同时还能保持多向分化的潜能。使用本产品在相同培养条件下，外泌体获得量是市售同类产品的2倍多。本产品使用无化学限定的异源性成分，成分组成明确，完全消除了基于血清/动物源性的成分，更适合于间充质干细胞和外泌体的临床研究用途。

【主要成分】

氨基酸、细胞生长因子、胰岛素、转铁蛋白、白蛋白、微量元素、维生素、无机盐等。

【产品性能指标】

1. 酶消化法分离人脂肪间充质干细胞原代细胞需约3-4天；
2. 细胞传代时间：以8000-10000个细胞/cm2密度接种，3-4天；
3. 细胞表型CD34和CD45位阴性表达（＜2%），CD44、CD73、CD90和CD105为阳性表达（＞95%）；
4. 细胞形态：细胞为梭型，呈指纹状或旋涡状。

【产品指标】

1. 外观：基础培养基为淡黄色液体，添加剂为黄色液体。
2. pH值：7.2 - 7.5
3. 渗透压：280-310 mOSM
4. 内毒素： ＜0.5 EU/ml

【完全培养基的配制】

基础培养基4℃保存，添加剂-20℃保存。配制完全培养基时，取添加剂在室温复温解冻，添加到配套的基础培养基中，根据实际需求选择是否添加青链霉素，混匀。添加剂须避免反复冻融，完全培养基现配现用，4℃保存，一周内用完。

【人脂肪间充质干细胞原代分离】

①用75%的乙醇对人脂肪采集瓶外壁进行消毒；并转移至超净工作台内，用移液管（或直接倒）将脂肪组织吸至新的50ml离心管，加入适量PBS清洗，500 g离心5分钟；

②离心后底层沉淀为血杂质，脂肪组织漂浮在最上层，再用移液管（或直接倒）将脂肪组织吸至新的50ml离心管，加入适量PBS清洗，500g离心5分钟；

③重复步骤3再清洗一次脂肪组织；

④离心结束后将脂肪组织吸至新的50ml离心管，根据脂肪组织的体积，按以下配比：4ml脂肪+3ml(4mg/ml)胶原酶I+5ml PBS加入胶原酶I和PBS，将离心管放置恒温振荡仪恒温振荡150 rpm/min，1小时后，500 g离心5分钟，弃上清，取沉淀；

⑤加适量PBS清洗沉淀，500 g离心5分钟，弃上清，再重复清洗1次；

⑥加适量PBS清洗沉淀，将细胞悬液过70 μm细胞筛，500 g离心5分钟，弃上清；

⑦加适量本产品培养基重悬计数，据细胞数8000-10000个细胞/cm2接种于T75细胞培瓶内置于37℃，5% CO2培养箱内进行培养；

⑧次日更换培养基；

⑨3-4天后，细胞融合度达到80%~90%时进行传代；

【细胞传代培养】

①细胞融合度达到80%~90%时，吸弃培养上清液，PBS洗2次，加入适量干细胞温和消化液浸润皿底消化细胞，置于37℃培养箱中约1-2 min，显微镜下观察到绝大部分细胞变圆，极少量细胞贴壁仍呈纺锤形，极少量细胞已经悬浮即可终止消化；

②加入5倍体积本产品培养基稀释消化液，收集细胞并转移至离心管中，1300 rpm离心5 min；

③弃上清，用本产品培养基重悬细胞，根据细胞数8000-10000个细胞/cm2接种于T75细胞培养瓶中，培养基添加总体积20ml，平面十字振动培养瓶使细胞均匀分布；

④置于37℃，5% CO2、饱和湿度培养箱中继续培养。

【外泌体提取（超高速离心法）】

①细胞融合度达到90%~100%时，收集细胞培养上清液；

②上清液4℃， 2000 g，离心20 min，弃沉淀，收集上清液；

③步骤（2）的上清液，4℃， 12000 g，离心30 min，弃沉淀，收集上清液；

④步骤（3）的上清液,4℃，100000 g，离心70 min，弃上清，根据实际需求用PBS溶解沉淀，收集外泌体。