

OriCell®

## 细胞产品手册

# OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP

产品货号：HUXMA-01201

*We help you discover life*



## 产品介绍

骨髓间充质干细胞是一类存在于骨髓基质中的多能干细胞。因其具有强大的增值能力和免疫调节功能，被广泛应用于组织工程、细胞治疗和基因治疗领域。

成人骨髓间充质干细胞作为一个研究热点被广泛应用于再生医学和组织工程，特别是在骨、心血管和神经系统等疾病领域。

OriCell®成人骨髓间充质干细胞提取自健康的成人骨髓，贴壁培养后使用带有 RFP 基因的慢病毒转导，使细胞稳定表达 RFP。拥有强大的增殖和多向分化能力，可作为细胞模型应用于增殖、衰老、免疫、分化和移植研究。

**注意：**本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

## 产品信息

产品名称	OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP
货号	HUXMA-01201
规格	1×10 <sup>6</sup> 个/管 或 1×10 <sup>6</sup> 个/瓶
冻存代次	P5
保存条件	液氮 (-196°C)

OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP 在倒置相差显微镜下的形态及荧光率



## 质量控制

---

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>80%。
- 通过细胞周期检测，倍增周期<72 h。
- 通过流式检测，CD29、CD44、CD73、CD105 为阳性 (>70%)；CD34、CD45、CD11b 为阴性 (<5%)。
- 具有良好的分化能力，可经诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等。

详情见《产品检测报告》。

## 处理原则

---

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合贴壁细胞生长的培养容器，且不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。
4. 骨髓间充质干细胞在体外增殖能力有限，且不能长期保持分化潜能。基于丰富的细胞培养经验和性能优异的培养体系，OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP 可在体外传代 5 次以上依然保持各项指标合格。但我们始终建议尽可能使用较低代次细胞进行科研工作。
5. 通常成人骨髓间充质干细胞/RFP 接种密度为 $(2.5\sim 4) \times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup>。该细胞的生长与供体自身特性和后续培养体系的关系极大。我们建议根据各批次、各代次实际生长情况按比例传代培养。

**注意：**本产品冻存液中含有 DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。

## 细胞的复苏和培养

### 所需材料

- OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP
- OriCell®成人骨髓间充质干细胞完全培养基（货号：HUXMA-90011，以下简称完全培养基）

### 操作步骤

**注意：**收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80℃，让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37℃预热。
2. 完全培养基温浴到 37℃。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
4. 从-80℃冰箱中取出细胞，放入 37℃水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

**注意：**1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染；

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。

5. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
7. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
8. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。

**注意：**请以公式  $a=\omega^2r$  ( $a$ :向心加速度； $\omega$ :旋转角速度， $\omega=\pi n/30$ ； $r$ :转子半径) 计算相应转速。

9. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
10. 将细胞接种到 1 个 T25 培养瓶或底面积相当的培养容器中。加入足量完全培养基，1 个 T25 培养瓶中

培养基总量不少于 5 mL。

11. 摇匀细胞，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

**注意：**接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。

12. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

**注意：**若发现较多漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。

13. 之后，每 2 天更换一次完全培养基，直到细胞生长至 90%汇合，即需传代。

## 细胞的传代

### 所需材料

- OriCell® 0.25% Trypsin-0.04% EDTA (货号: TEDTA-10001, 以下简称胰酶)
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) (货号: PBS-10001, 以下简称 PBS)
- OriCell® 成人骨髓间充质干细胞完全培养基 (货号: HUXMA-90011)

### 操作步骤

1. 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37°C。
2. 吸去培养容器中的培养基。
3. 用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤细胞 2 次, 注意动作轻柔, 清洗全面。吸去 PBS。
4. 加入胰酶 (T25 培养瓶加入约 1.5 mL, T75 培养瓶加入约 3 mL), 迅速铺匀, 保证充分接触细胞表面。
5. 显微镜下观察消化情况, 约 70%~80% 细胞收缩变圆后, 轻拍培养容器外壁, 使细胞脱离培养表面。
6. 立即加入完全培养基 (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL), 随即轻摇培养容器, 使培养基和胰酶迅速混匀, 终止消化。
7. 使用吸管或移液管吸取细胞悬液, 吹打培养容器底面数次, 尽可能将细胞都吹打下来。

**注意:** 吹打动作不可剧烈, 避免产生大量气泡, 否则可能损伤和损失细胞。

8. 将细胞悬液转移至离心管中。用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤容器 1 次, 收集残留细胞。
9. 收集的所有细胞悬液以 250×g 离心 4 min。
10. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基, 轻柔吹打细胞沉淀, 充分吹散、混匀。
11. 将细胞按(2.5~4) × 10<sup>4</sup> 个活细胞/cm<sup>2</sup> 接种至适宜的培养容器内。

**注意:** 培养成人骨髓间充质干细胞/RFP 对于细胞密度有较高的要求, 我们建议有条件且计数效率较

高的情况下，进行手工计数，以期获得精准的细胞浓度指导接种；在没有精确计数条件的情况下，按照适宜比例传代是更好的方法。通常 OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP 传代比例为 1:3，72 h 内生长至可传代汇合度。请根据细胞实际生长情况调整传代比例。

12. 摇匀细胞，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。
13. 传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液。
14. 待细胞生长至 90%汇合，即需传代或冻存。

**注意：**正常情况下 OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP 每代生长时间不超过 72 h，中途不需要换液。

频繁换液会破坏构建起的细胞微环境。

## 细胞的冻存

---

### 所需材料

- OriCell®通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）
- OriCell®通用血清型程序冻存液（货号：CYRO-10001）

### 操作步骤

1. 若选用 OriCell®通用血清型程序冻存液，请在操作前将程序降温盒放入 4°C 冰箱内预冷。
2. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。
3. 细胞消化请参考 OriCell®成人骨髓间充质干细胞/RFP 的传代操作步骤 1~9。
4. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞。
5. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

**注意：**在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4°C 冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。

6. 若选用 OriCell®通用血清型程序冻存液，将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入 -80°C 冰箱中。若选用 OriCell®通用无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入 -80°C 冰箱中。

**注意：**细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4 h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。

7. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。

**注意：**细胞不可长期保存在 -80°C 冰箱中。我们建议在 -80°C 冰箱中的保存时间不要超过 48 h。



赛业（广州）生物科技有限公司保留OriCell®细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。