

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.S	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，6.8-8.2；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。

【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℃、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。

特别提示：

如果原代细胞较少，可适当延后细胞收获时间，以原代细胞达较高汇合度为指标，否则会出现原代细胞收获数量不足或细胞难以消化，传代后，P1 细胞因贴壁异常而大量死亡的现象。

其内在机理为：低密度时 MSC 分泌的胶原、纤连蛋白等 ECM 蛋白尚未积累，不足以提供必要的贴壁和存活信号；贴壁至高密度时，MSC 通过细胞-细胞接触互相提供生长因子和抗凋亡信号，维持 PI3K/Akt 等存活通路；细胞密集生长几天，细胞覆盖大部分底面后，让 ECM 层和黏附分子充分沉积，此时用相同酶消化，只需较短时间即可使细胞群落松散，消化仅松散连接，细胞仍保留足够的整合素与 ECM 结合，从而实现顺利转移与再贴壁。

收获 P0 细胞操作（以 T75 瓶为例）：

- (1) 在超净台中，去除培养瓶中的培养液及组织块，加入 10 mL PBS 清洗细胞后弃去。
- (2) 加入 2 mL 干细胞温和消化酶常温下（25℃）消化细胞。
- (3) 在显微镜下观察到细胞大部分收缩变圆，且有细胞开始流动时（5 分钟），立即加入 5 倍温和酶使用体积（10 mL）的细胞培养上清或者完全培养基稀释细胞悬液。
- (4) 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，尽量使细胞分散。
- (5) 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1300 rpm（300g）离心 5 min。
- (6) 弃上清，加入 10 mL 完全培养基重悬细胞，1300 rpm（300g）离心 5 min。
- (7) 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。
- (8) T75 瓶加入 15mL 完全培养基。按密度 8000 cells/cm² 接种细胞，将培养瓶置于 37℃，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。

特别提示：

二次清洗离心主要是为了彻底去除残留的消化酶，许多原代细胞类型在脱离其他细胞和细胞外基质 (ECM) 后，会因失去附着而触发一种程序性细胞死亡，称为 anoikis。原代细胞的脆弱性是其体外培养成功的一大挑战，因此从组织收集、运输到酶解、再到细胞悬液制备，每一步都至关重要。可控的消化时间和残留酶的去除是维持细胞高活力、减少应激诱导的细胞死亡（如 anoikis）的关键。这不仅仅是简单的操作细节，它反映了对原代细胞在脱离体内微环境后生物学特性的深刻理解和尊重。任何环节的疏忽都可能导致细胞损伤或死亡。

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℃）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），立即加入至少 2 倍温和酶使用体积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。

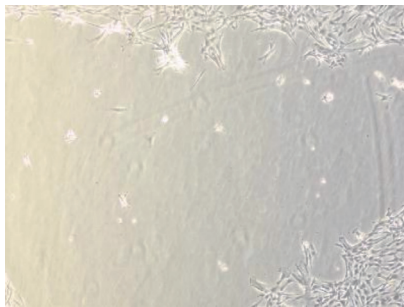
8. 将培养瓶置于 37°C，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。

【使用环境3：复苏培养冻存的MSC细胞（以T-75瓶为例）】

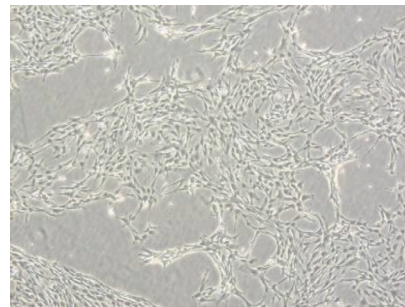
1. 从冰箱中取出完全培养基，在生物安全柜或超净台中吸取适量（如 T-75 瓶：15mL）完全培养基沿上表面加入细胞培养瓶中，切勿冲到培养瓶底面（细胞生长面），然后慢慢将培养瓶放平，备用，在室温中预温培养基 10-30min。

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 1mL 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，切忌冲到培养瓶底面。

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 1×10⁶-2.5×10⁷cells/ 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 /cm²	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 -V1.0.2

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