

## MSC培养基KIT使用说明

### ❖ 实验准备:

1. 包被液配制: 将包被剂加入到无菌DPBS中, 配制成0.5% (体积比) 包被工作液, 充分混匀。
2. 培养载体包被: 根据培养载体面积, 按 $0.1\text{ml}/\text{cm}^2$ 加入包被液, 轻摇使包被液均匀铺满瓶底。将其水平放置于 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光静置, 包被12-18小时后即可使用 (包被完成后,  $4^{\circ}\text{C}$ 条件下可存放一周)。如紧急使用, 可在 $37^{\circ}\text{C}$ 下静置包被2小时后即可使用。
3. 增强剂配制: 在500ml MSC无血清培养基中加入30ml增强剂用于细胞培养,  $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存, 1个月内用完。

### ❖ 操作流程:

#### A. 原代细胞培养:

将经消化处理的原代细胞按  $20000\text{cells}/\text{cm}^2$  接种到包被剂包被好的T75培养瓶中。向 T75 中加入25ml无血清培养基, 放入 $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 培养箱每隔3天换一次液, 待瓶内细胞融合度达70-80%, 即可消化收集细胞 (400xg 离心5分钟)。

#### B. 传代细胞培养:

传代细胞按 $8000-12000\text{ cells}/\text{m}^2$ 接种到包被剂包被好的T175 (或T75) 培养瓶中, 加入25ml (T75加入15ml)无血清培养液。

放入  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 中间无需换液, 待细胞融合度达到80%-90% 即可传代。

### ❖ 冷冻和复苏:

冻存培养的细胞需按 $1 \times 10^6-1 \times 10^7\text{cells}/\text{ml}$ 将细胞重悬到 MSC 冻存液中, 然后进行程序降温至 $-80^{\circ}\text{C}$ 次日保存至 $-196^{\circ}\text{C}$ 液氮中 (注意: 部分冻存液无程序降温)。

液氮冻存的细胞在 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中快速融化至含少量冰水混合物, 再吸入50ml离心管内, 沿管缓慢加入10-20ml无血清培养液, 边加边轻轻混匀管内液体。

室温下, 400xg 离心5min, 弃上清, 加入适量无血清培养液调整细胞密度。

最后按活细胞数 $8000-12000\text{ cells}/\text{cm}^2$ 接种到预包被好的 T175 (或T75) 培养瓶 (微载体接种度为:  $6000-8000\text{ cells}/\text{cm}^2$ ), 加入25ml (T75加入15ml) 无血清培养液。

放入 $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 培养箱内培养 (中间不用换液), 待细胞融合度达到80%-90% 即可传代。

**注意事项: 本试剂仅供研究之用**