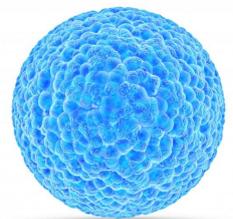


人脂肪干细胞无血清培养基（无酚红）  
hASC Medium (no phenol red)



## 人脂肪干细胞无血清培养基 (无酚红)

### 一、产品基本信息

产品名称	Applied Cell® 人脂肪干细胞无血清培养基 (无酚红)
货号	AC-1001042 (PRF)
规格	基础培养基 450mL, 添加剂 50mL
运输保存条件	基础培养基 2-8°C, 添加剂 -20°C至-80°C; 混合后 2-8°C
使用范围	脂肪组织来源的脂肪干细胞扩增与传代培养
保质期	12个月

### 二、产品简介

**人脂肪干细胞无血清培养基**是埃泽思生物 (Applied Cell®) 自主研发的一款无外源动物成分的人脂肪干细胞培养基。可应用于人脂肪组织来源的**人脂肪干细胞**的扩增与传代培养, 并保持其多向分化潜能。本产品内毒素水平远低于中国药典标准, 生产过程遵循 **ISO9001** 体系, 并符合 **GMP** 指导原则。

**人脂肪干细胞无血清培养基**主要成分: 氨基酸, 维生素、无机盐、白蛋白, 转铁蛋白、胰岛素、微量元素, 细胞因子等。

### 三、产品特性

- 无外源动物蛋白成分, 大大降低各类病毒、霉菌和支原体等的污染风险。
- 全程无血清生产, 极大降低批次间差异。
- 培养过程无需包被培养板。
- 扩增效率高, 24h 左右增殖翻倍, 节省培养时间。
- 内毒素 <0.06EU/ml, 远低于中国药典水平。

### 四、产品内容

组分	规格	数量	运输
人脂肪干细胞无血清基础培养基	450mL	1 瓶	冰袋
人脂肪干细胞无血清添加剂	50mL	1 瓶	干冰

## 五、相关产品

无血清细胞冻存液（治疗级）（Applied Cell®: Cat. no.AC-1001006）

人脐带间充质干细胞（Applied Cell®: Cat. no.AC-2001003）

人脂肪间充质干细胞（Applied Cell®: Cat. no.AC-2001004）

细胞消化液（Applied Cell®: Cat. no. AC-1001024）

## 六、实验准备

### 人脂肪干细胞无血清培养基配制

1. 37℃快速解冻**人脂肪干细胞无血清添加剂**，快速溶解时不易破坏添加剂中营养物质，时间大致为10min。待添加剂融化后摇匀，分装或直接按比例添加到基础培养基中，分装后添加剂立即储存于-20℃至-80℃，避免反复冻融。
2. 将添加剂以10%比例加入到**人脂肪干细胞无血清基础培养基**中，混匀，即为**人脂肪干细胞无血清培养基（AC-1001042PRF）**。混合后培养基可在2-8℃稳定储存2-3周，不建议使用已配制超过3周的培养基。
3. **人脂肪干细胞无血清培养基**可直接应用于**人脂肪组织来源的脂肪干细胞**扩增与传代培养。

## 七、操作方法(以下步骤皆应在无菌条件下操作)

### 人脂肪干细胞的分离方法

1. 清洗脂肪组织提取物  
新鲜脂肪组织放入4℃预冷的**脐带脂肪保存液（AC-1001016）**中，并快速运输到实验室进行细胞分离，充分的清洗脂肪组织提取物，去掉大部分红细胞和淋巴细胞。
  - 1.1. 将约10-20mL的脂肪组织提取物放到一个无菌50mL离心管中；
  - 1.2. 静置一段时间直到脂肪组织与血液分层；
  - 1.3. 用一个巴氏吸管移走血液；
  - 1.4. 加入相同的体积的含有双抗的PBS，盖紧盖子；
  - 1.5. 剧烈摇晃5-10S
  - 1.6. 将50mL离心管放到台面上使脂肪组织飘在PBS上面。根据样品的不同，这大概需要1-5min。
  - 1.7. 用一个巴氏吸管小心的去除PBS；
  - 1.8. 重复以上的清洗步骤3次（步骤3.4-3.7）
  - 1.9. 最后一次的清洗液体应是清澈的。如果液体仍是红色的，重复步骤3.4-3.7再次清洗。

## 2. 脂肪组织消化

用人脂肪干细胞分离液 (AC-1001013) 处理脂肪组织

- 2.1. 在处理开始前 10min,37°C预热人类脂肪干细胞分离液;
- 2.2. 加入与清洗过的脂肪组织等体积的人类脂肪干细胞分离液至 50mL 离心管;
- 2.3. 剧烈旋转摇动 50mL 离心管 5-10s
- 2.4. 放到 37°C培养箱中摇动孵育 1-2h, 每 15min 人工剧烈摇晃 5-10s
- 2.5. 处理结束后, 处理后的脂肪组织应呈现粥样的形态, (如果消化 1h 后消化效果不完全, 延长消化时间到 2h, 具体根据消化程度确定)。

## 3. 分离基质血管部分

- 3.1. 将人脂肪干细胞分离液处理后的脂肪组织室温 200g 离心 5min, 脂肪组织出现分层, 参考图 1。

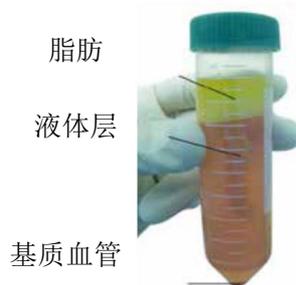


图1脂肪间充质干细胞分离液消化后的脂肪组织。可以看到三层, 脂肪层 (adipose portion), 液体层, 基质血管部分 (StromalVascular Fraction,SVF)

- 3.2. 用巴氏吸管吸掉上层漂浮的脂肪层和中间液体层。留 5mL 底部液体,将 SVF 团留在管底(吸液时要注意, 细胞团是凝胶状的, 贴附不牢, 容易被吸掉)。

3.3. 用 10mL 人脂肪干细胞无血清培养基 (AC-1001042PRF) 重悬细胞团;

3.4. 室温 300 ×g 离心 5min;

3.5. 去掉上清, 留 5mL 底部的基质细胞和人脂肪干细胞无血清培养基混合液;

3.6. 重复 3.3-3.5 步骤;

3.7. 室温 300 ×g 离心 5min;

## 4. 重悬 SVF, 接种

4.1. 用 4mL 人脂肪干细胞无血清培养基重悬新鲜分离的细胞, 并计数;

4.2. 将细胞接种到培养板或培养瓶中, 接种的细胞密度为  $1 \times 10^6$  个, 可接种到 1 个 T25 的培养瓶中或 6 孔板的 2 个孔中, 轻轻摇动使细胞平均分布到培养瓶或培养皿表面, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养;

4.3. 接种 24h 后, 换液去除未贴壁的细胞;

4.4. 每天在显微镜下观察细胞;

4.5. 细胞通常需要 3-5 天变成纤维状细胞, 并开始分裂;

- 4.6. 每 2 天换液，细胞通常在培养 5-7 天后达到 80-90%汇合度；可以传代或冻存，此时的细胞为 P0 代；
5. 脂肪间充质干细胞传代  
培养 5-7 天后细胞达到 80-90%汇合度时（参考图 2），可以予以传代或冻存。



图 2 脂肪间充质干细胞

- 5.1. 吸掉培养瓶或培养皿中的培养基，用 PBS 清洗一次，加入适量**细胞消化液 (AC-1001024)** 覆盖皿底，37°C 孵育 2-3min，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离皿/瓶底，停止消化。轻轻敲打皿边待细胞呈细沙状脱落时迅速加入 2 倍体积的**人脂肪干细胞无血清培养基**，用移液枪扇形吹打使细胞脱落下来，并轻轻吹打成单细胞，将细胞悬液收集到 15mL 离心管中。  
注意：吹打时不能有气泡
- 5.2. 室温 300×g 离心 5min；
- 5.3. 弃上清，加入人类间充质干细胞培养基，重悬细胞，按照 1:3-1:6 的比例传代。也可以计数，接种密度为；
- 5.4.  $2-3 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>。均匀铺在培养皿/瓶中，置于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

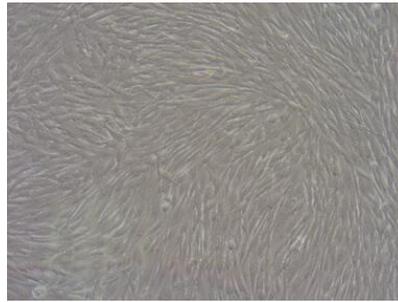
### hASC 细胞传代培养

1. 在显微镜下观察细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。
2. 在超净台/安全柜中，吸掉原有培养基，加入 PBS 溶液清洗一次，加入**细胞消化液 (AC-1001024)** 使之完全覆盖皿/瓶底。
3. 室温孵育 4-5 分钟或 37°C 孵育 2-4 分钟，显微镜下观察大部分细胞脱离皿底即停止消化。
4. 加入消化液 2 倍体积的**人脂肪干细胞无血清培养基**，用移液器轻轻敲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。
5. 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1200rpm 离心 3 min。
6. 弃上清，加入**人脂肪干细胞无血清培养基**，重悬细胞，计数。1: 3-1: 4 比例传代，或按  $1-2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 传代，均匀铺在培养皿/瓶中，置于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。  
注意：细胞传代所需的时间：2-4 天。5 代及之前的细胞，生长速度较快。5 代以后的细胞，生长速度稍缓。

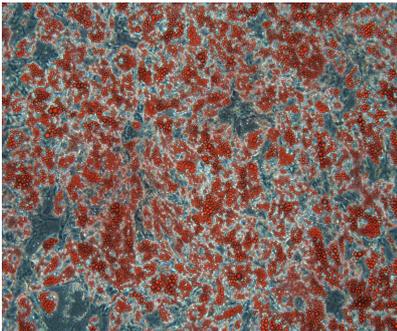
### hASC 细胞冻存

1. 细胞达到 90%汇合度，吸掉原有培养基，PBS 清洗一次。
2. 加入**细胞消化液 (AC-1001024)** 使之完全覆盖皿/瓶底，室温孵育 4-5min 或 37°C孵育 2-4min 分钟，显微镜下观察大部分细胞脱离皿底即停止消化。
3. 加入消化液 2 倍体积的**人脂肪干细胞无血清培养基**，用移液枪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。
4. 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1200 rpm 离心 3 min，吸掉上清。
5. 加入适量**无血清细胞冻存液 (治疗级) (AC-1001006)**，调整细胞冻存密度在  $1 \times 10^6$  cells/mL 左右，每支冻存管分装 1.5-2ml。
6. 直接放入 -80°C，24h 后转入液氮中长期保存。

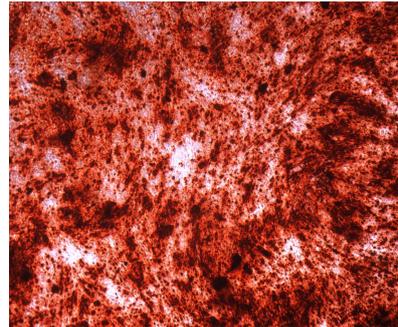
### 细胞形态图



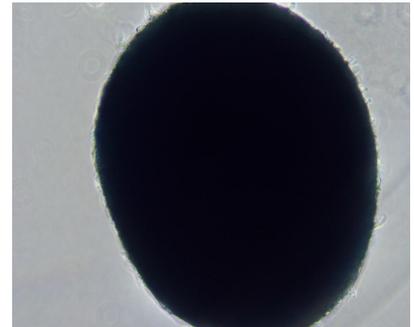
脂肪干细胞形态



脂肪生成



成骨生成



软骨生成

## 八、质量控制

检验项目 Test Categories	参考数据 Reference Data
外观 Physical Appearance	无色液体 Colorless Liquid
澄清度 Clarity	澄清 Clear
pH 值 pH Value	7.0-7.4
渗透压 Osmolality	270-340 (mosm/KgH <sub>2</sub> O)
细菌内毒素 Endotoxin	小于 0.06 EU/ml
无菌 Sterility	无菌 Sterility
支原体 Mycoplasma	0.11um 过滤, 支原体试验为阴性 The mycoplasma test was negative after 0.11um filtration
细胞生长试验 Cell Growth Test	细胞为梭形, 呈指纹状或螺旋状生长 The cells are spindle - shaped, fingerlike or spiral

### 生产企业:

上海埃泽思生物科技有限公司

地址: 上海市宝山区园丰路 69 号联东粤浦科技园 1 号楼 401 室

埃泽思 (福建) 生物科技有限公司

地址: 福建省福州市长乐区金滨路 458 号福建省精准医学产业创新中心

邮箱: service@appliedcell.cn

电话: 021-59541913

网址: www.appliedcell.cn

ISO9001 质量体系认证企业

医疗器械生产备案企业,

欧盟 CE 认证企业

文件版本号:

B202201