

PRIME-XV MSC Expansion XSFM

货号 #	产品名	规格
91149	PRIME-XV MSC Expansion XSFM	250 mL and 1 L liquid

预期用途

本产品仅供研究或进一步生产使用。本产品不用于注射或诊断程序。本产品用于诊断或其他临床用途的安全性和有效性尚未确定。

产品描述

PRIME-XV MSC Expansion XSFM 是一种不含血清和异源蛋白的完全培养基，专门用于纯化的人间充质干细胞的维持和扩增。本产品不含抗生素。PRIME-XV MSC Expansion XSFM 用于在无血清和无异源培养条件下维持和扩增纯化或富集的人间充质干/基质细胞（MSCs）。该培养基即开即用。也可根据需要添加细胞因子/生长因子。

运输

本产品与干冰一起装输。收到后，请立即按照以下建议的温度保存。

质量保证

所有质量控制测试结果都会在具体批次的分析证书(COA)上报告，该证书可在<https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us> 查询或按要求提供。

储存说明和稳定性

收到培养基后，请将其存放在-10°C 或以下的手动除霜冰箱中。未开封的培养基在-10°C 或以下的手动除霜冰箱中保存时，自标签上标明的生产日期起可稳定保存 24 个月。PRIME-XV MSC Expansion XSFM 可等分并在 -10°C 或以下温度条件下存放于手动除霜冰箱中，最长可保存3个月。准备使用时，将此培养基在2-8°C下避光解冻过夜。PRIME-XV MSC Expansion XSFM 应在 2-8°C避光保存一周内使用。超过未开封保质期的使用未经验证，请勿使用。应避免反复冻融。

注意事项

由于来自不同供体的人类间充质干细胞之间存在差异，结果可能会有所不同。
本产品的成分来源符合 EP 5.2.12 “用于生产细胞和基因治疗药物产品的生物原料”的规定。本产品所含成分取自人血浆，符合美国药典（USP）和欧洲药典（EP）等级，按照《药品生产质量管理规范》（GMP）生产，并已使用美国食品及药物管理局（FDA）许可的试剂盒进行检测，发现 HIV-1/2、乙型肝炎表面抗原（HBsAg）和丙型肝炎病毒（HCV）抗体呈阴性。

但是，由于没有任何检测方法能完全保证源于人类的产品不具有传染性，因此在处理所有源于人类的材料时，应采用通用预防措施，将其视为具有潜在传染性的材料。

使用指南

在二维培养容器中扩增MSC的方案

以下方案经过优化，可用于在二维培养容器中扩增来自脂肪、骨髓和脐带的人类间充质干细胞（hMSCs）。

包被程序

注意：要在 PRIME-XV MSC Expansion XSFM 中培养MSCs，组织培养板或培养瓶必须预先涂上细胞附着基质。强烈建议使用Cellnest（货号1063967）涂覆培养表面以保持一致性。也可使用其他类型的基质（PRIME-XV人类纤连蛋白，货号31002），基质蛋白的类型和数量取决于每位研究人员的实验设计。

1. 配制0.5% Cellnest溶液。将5 mL无菌水轻轻加入瓶中冻干的Cellnest (货号1063967)，使浓度为5 mg/mL。
2. 重新盖上小瓶盖，将0.5% Cellnest溶液在37°C下孵育10分钟，使Cellnest完全溶解。
3. 0.5% Cellnest溶液通过0.22 µm再生纤维素或PES过滤膜过滤以确保无菌，并将过滤后的溶液放入新的无菌15ml离心管中。请使用小直径过滤器(13mm)，以尽量减少过滤过程中的体积损失(例如Nalgene, 货号7 20-1320)。0.5% Cellnest溶液可在2-8°C下保存6个月或在-20°C下保存12个月。
4. 将0.5%的原液在PBS (货号9 236)中稀释至最终浓度为20 µg/cm²。请参考下表了解各培养容器的使用参数。

Culture Vessel	Finale Volume (mL)	PBS (mL)	Filter sterile 0.5% Cellnest (uL)	Cellnest per cm ²	[Cellnest] ug/ml	[Cellnest] mM
6-well (9.6 cm ² per well)	2.0	1.96	38.4	20	96	1.9
6-well plate (57.6 cm ² per plate)	12.0	11.77	230.4	20	96	1.9
T-25 Flask (25 cm ² per flask)	5.2	5.10	100.0	20	96	1.9
T-75 Flask (75 cm ² per flask)	15.5	15.20	300.0	20	97	1.9

5. 将稀释后的涂层溶液加入所需的培养容器中。
6. 按下列条件之一孵育。如果在2-8°C下过夜，培养容器必须用Parafilm®密封，以避免变干。建议在使用当天或使用前一天对培养容器包被。
 - a. 37±2°C下1小时
 - b. 在15-30°C下放置3小时
 - c. 2-8°C过夜
7. 在加入细胞之前，从培养容器中抽吸并丢弃Cellnest溶液。

冷冻保存的人MSCs的复苏

1. 按照包被方案，用稀释的Cellnest在PBS中预包被组织培养容器至最终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。
2. 预热PRIME-XV MSC Expansion XSFM至37°C。
3. 在37°C水浴中迅速复苏冻存的细胞。
4. 用移液管将冻存管内液体全部移入15ml锥形管中。以大约每10秒3-5滴的速度，小心地加入5至10ml预热的 PRIME-XV MSC Expansion XSFM，每次加入后轻轻摇晃锥形管。
5. 将锥形管内全部溶液转移到Cellnest包被的组织培养容器中。
6. 在37°C, 5% CO_2 ，加湿的环境中培养细胞。
7. 复苏后24小时，吸出培养基，补充预热的 PRIME-XV MSC Expansion XSFM。
8. 每两天，吸出并丢弃已使用培养基，补充预热的 PRIME-XV MSC Expansion XSFM 培养细胞。
9. 当细胞达到70-80%汇合时传代。请不要培养至细胞完全汇合或过度汇合。次优条件下的传代培养可能会影响产品性能。

在PRIME-XV MSC ExpansionXSFM中传代培养人MSCS

1. 按照包被方案，将组织培养容器用PBS稀释后的Cellnest预包被，终浓度为20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。
2. 预热PRIME-XV MSC Expansion XSFM至37°C。
3. 从T75瓶(例如)中吸出培养基，每个T75瓶用10ml PBS (FISI，货号9240)轻轻冲洗细胞一次。
4. 在每个T75瓶中加入5ml室温TrypLE Express，并向各个方向倾斜，使TrypLE Express均匀地分散在细胞上。
5. 在37°C, 5% CO_2 培养箱中培养细胞。通过在显微镜下观察细胞，定期监测细胞脱离情况。细胞会开始变圆并分离。轻拍培养瓶的侧面以帮助细胞分离，然后将培养瓶放回培养箱。重复上述过程，直到至少90%的细胞完全分离。这个过程大约需要5到10分钟。
6. 向培养瓶中加入5ml PRIME-XV MSC Expansion XSFM。使培养基分布在培养瓶的整个生长表面，使细胞分散，然后将培养瓶内混合物转移到15ml的锥形管中。
7. 以400xg离心细胞5分钟。吸去上清液。
8. 将细胞沉淀重悬于少量预热的PRIME-XV MSC Expansion XSFM中，用细胞计数仪计数。
9. 对每个包被的T75瓶，将4.5 - 5.5 $\times 10^5$ 细胞重悬到20ml预热的PRIME-XV MSC Expansion XSFM中。
注:建议在2维预包被培养容器中以约 6000 cells/ cm^2 /0.2-0.3 mL 密度接种细胞。
10. 轻轻地从培养瓶中吸出涂层溶液，慢慢地将细胞悬浮液加入T75瓶中。吸掉溶液时，避免刮伤涂层表面。在37°C和5% CO_2 的湿润环境中培养细胞。

11. 吸出并丢弃已使用培养基，每2天用预热过的 PRIME-XV MSC Expansion XSFM 补充。

QUANTUM生物反应器中MSCs扩增方案

1L瓶中的PRIME-XV MSC XSFM 91149可无菌转移到Quantum兼容袋中，并用于在Quantum中进行hMSC扩增。在7天内进行一次典型的MSC扩增需要5L培养基。由于91149解冻后的保质期较短，因此必须在开始扩增前不超过一天解冻并准备Quantum兼容袋。不建议重新冷冻装袋后的培养基。如果在装袋之前使用过滤器，培养基功能可能会受到负面影响。袋装培养基的无菌性是实现更佳细胞扩增的关键。

第1天准备细胞扩增设置和包被生物反应器

注意: Quantum 细胞扩增系统操作手册 (QCESOM) 涉及将细胞、培养基或废液袋连接到管路上。可使用与 Pellethane（热塑性聚 氨酯）兼容的无菌管焊接机进行连接。正确的操作和处理方法，请参阅相应的焊接机使用手册。以下方案使用的是 Terumo BCT 的 TSCD-Q 无菌管焊接器。相应的手册《TSCD-Q 无菌管焊接机系统操作手册》（TSTWSOM）包含安全的操作方法。

- 1. 复苏细胞后，在 37 ° C 和 5% CO₂ 条件下，将细胞放入培养瓶和完全培养基中过夜。
- 2. 加载细胞扩增设备（QCESOM 7-2）。
- 3. 将装有 PBS 的袋子连接到清洗管路（TSTWSOM 3-2）上。
- 4. 预充细胞扩增设备 (QCESOM 7-11).
- 5. 分离管路（QCESOM 7-12）
- 6. 用 PBS 和 5 mg 纤连蛋白配制 100 ml 包被溶液。
 - a. 将包被溶液和至少 40 ml 空气装入入口袋，并连接到试剂管路上。
 - b. 设置并运行包被生物反应器程序（QCESOM 8-8）。使用以下设置。

Step 1		Step 2		Step 3	
IC inlet	Reagent	Wash		None	
IC inlet rate (mL/min)	10	10		0	
IC circ. rate (mL/min)	100	100		20	
EC inlet	None	None		Wash	
EC inlet rate (mL/min)	0	0		0.1	
EC circ. rate (mL/min)	30	30		30	
Outlet	EC outlet	EC outlet		EC outlet	
Rocker	Stationary (0°)	Stationary (0°)		Stationary (0°)	
Stop condition	Empty bag	IC Volume (22 mL)		Manual (overnight)	

第0天:准备 IC培养基和接入细胞

7. 将PRIME-XV MSC XSFM培养基袋连接到IC管路并运行IC/EC冲洗(QCESOM章节9-5)。使用以下设置:

Step 1	
IC inlet	IC media
IC inlet rate (mL/min)	100
IC circ. rate (mL/min)	-17
EC inlet	IC media
EC inlet rate (mL/min)	148
EC circ. rate (mL/min)	-1.7
Outlet	IC & EC outlet
Rocker	In motion (-90°, 180°, 1 sec)
Stop condition	Exchange (2.5 IC, 2.5 EC)

8. 用铝箔覆盖整个培养基袋子，以防止光线照射。打开供气开关，调节培养基(QCESOM第8-6节)。使用以下设置:

	Step 1	Step 2
IC inlet	None	None
IC inlet rate (mL/min)	0	0
IC circ. rate (mL/min)	100	100
EC inlet	IC media	IC media
EC inlet rate (mL/min)	0.1	0.1
EC circ. rate (mL/min)	250	30
Outlet	EC outlet	EC outlet
Rocker	Stationary (0°)	Stationary (0°)
Stop condition	Time (10 min)	Manual (50-230 min)

- 9. 从培养瓶中分离细胞，进行细胞计数，并保存样本用于流式细胞检测。
- 10. 将25x10⁶个细胞，100ml IC培养基和至少40ml空气装入细胞进样袋中，并连接到管路上。
- 11. 确保适当的袋子连接到相应的管路上(IC培养基，细胞, 冲洗)，并用新袋子替换废液袋。
 - a. 在整个培养过程中，根据需要更换废液袋和IC培养基袋，在更换过程中暂停程序。
- 12. 从EC取样口抽取培养基样本，以获取基线代谢物读数(QCESOM章节5-7)。

13. 设置并运行细胞接种与循环混合程序（QCESOM章节10-9）。使用以下设置:

Step 1		Step 2		Step 3	
IC inlet	Cell	IC media		None	
IC inlet rate (mL/min)	25	25		0	
IC circ. rate (mL/min)	150	150		200	
EC inlet	None	None		None	
EC inlet rate (mL/min)	0	0		0	
EC circ. rate (mL/min)	30	30		30	
Outlet	EC outlet	EC outlet		EC outlet	
Rocker	In motion (-90°, 180°, 1 sec)	In motion (-90°, 180°, 1 sec)		In motion (-90°, 180°, 1 sec)	
Stop condition	Empty bag	IC volume (47 mL)		Time (2 min)	

14. 设置并运行细胞贴壁程序(QCESOM章节10-7)。使用以下设置:

Step 1	
IC inlet	None
IC inlet rate (mL/min)	0
IC circ. rate (mL/min)	0
EC inlet	IC media
EC inlet rate (mL/min)	0.1
EC circ. rate (mL/min)	30
Outlet	EC outlet
Rocker	Stationary (0°)
Stop condition	Manual (1440 min)

第一天:开始培养

15. 从培养瓶中分离细胞，进行细胞计数，并保存样本用于流式细胞检测。

Feed (Days 1-7)	
IC inlet	IC media
IC inlet rate (mL/min)	0.1 - Variable
IC circ. rate (mL/min)	20
EC inlet	None
EC inlet rate (mL/min)	0
EC circ. rate (mL/min)	30
Outlet	IC outlet
Rocker	Stationary (0°)
Stop condition	Manual

16. 每天从EC取样口收集培养基样本用于代谢物分析，并记录这些样本的采集时间(QCESOM章节5-7)。根据需要调整IC进样率，以维持培养中适当的葡萄糖和乳酸水平，随时关注培养基消耗和废液袋填充率。在培养期间一直如此。

收获和分析细胞

17. 准备一个装有200ml胰蛋白酶溶液和40ml空气的进样袋。连接到试剂管路。

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5
IC inlet	Wash	Reagent	Wash	None	EC media
IC inlet rate (mL/min)	100	50	50	0	400
IC circ. rate (mL/min)	-17	300	300	300	-70
EC inlet	Wash	None	None	None	EC media
EC inlet rate (mL/min)	148	0	0	0	60
EC circ. rate (mL/min)	-1.7	30	30	30	30
Outlet	IC & EC outlet	EC outlet	EC outlet	EC outlet	Harvest
Rocker	In motion (-90°, 180°, 1	In motion (-90°, 180°, 1	In motion (-90°, 180°, 1	In motion (-90°, 180°, 1	In motion (-90°, 180°, 1
Stop condition	Exchange (2.5 IC, 2.5 EC)	Empty bag	IC volume (22 mL)	Time (8* min)	IC Volume (378 mL)

*使用0.25%胰蛋白酶所需的时间。使用TrypLE™时，建议使用20分钟。

19. 分离细胞收获袋，进行细胞计数、收获后培养基上清分析和流式细胞检测。

数据

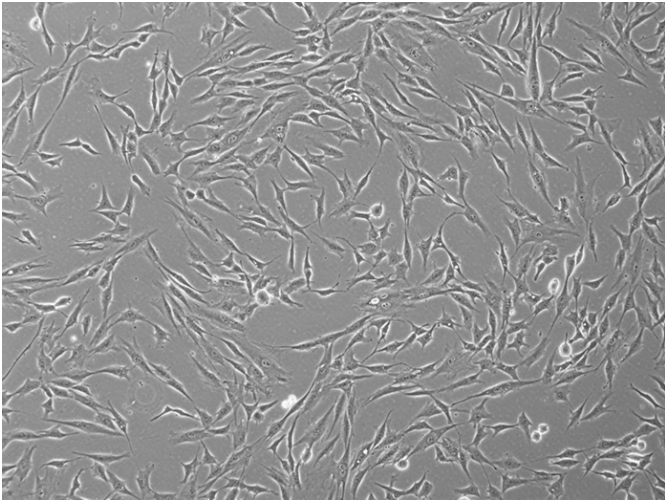


图1.在PRIME-XV人纤连蛋白上用PRIME-XV MSC ExpansionXSFM培养的人脂肪来源间充质干细胞的形态。以6,000 cells/cm²的密度接种MSCs，在PRIME-XV MSC Expansion XSFM 中长时间传代后观察形态。图像为传代后 3 - 4 天观察到的细胞贴壁和细胞形态。图像以10倍的放大倍率拍摄。

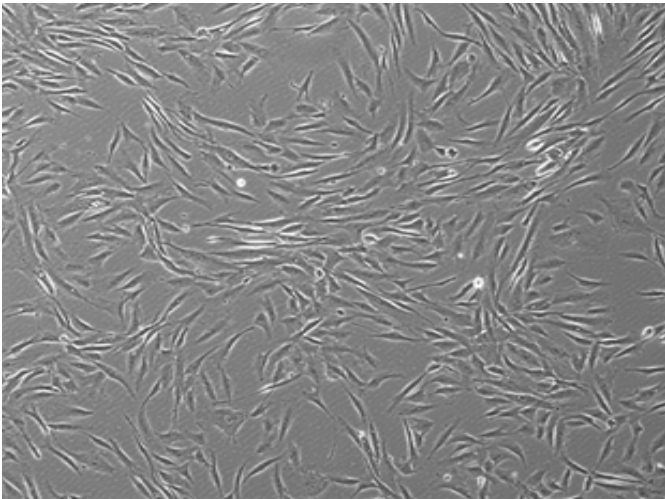


图2. 在 PRIME-XV 人纤连蛋白上用PRIME-XV MSC Expansion XSFM培养的人骨髓来源间充质干细胞的形态。以6,000 cells/cm²的密度接种MSCs，在PRIME-XV MSC Expansion XSFM 中长时间传代后观察形态。图像为传代后 3 - 4 天观察到的细胞贴壁和细胞形态。图像以10倍的放大倍率拍摄。

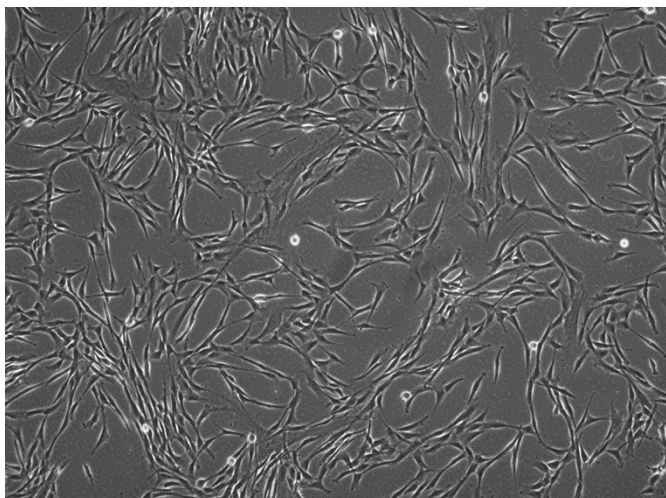


图3.在PRIME-XV 人纤连蛋白上用PRIME-XV MSC Expansion XSFM培养的人脐带来源间充质干细胞的形态。以6,000 cells/cm²的密度接种MSCs，在PRIME-XV MSC Expansion XSFM 中长时间传代后观察形态。图像为传代后3-4天观察到的细胞贴壁和细胞形态。图像以10倍的放大倍率拍摄。

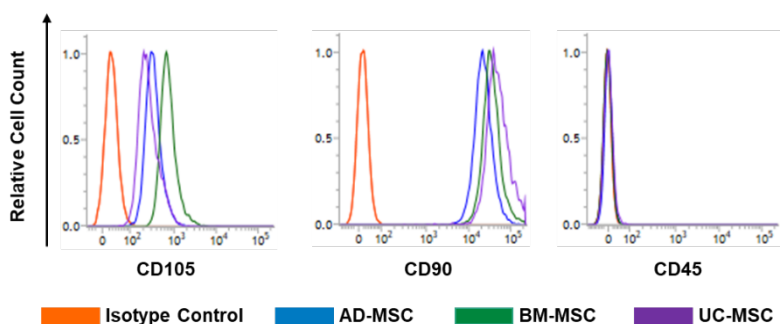


图4.在PRIME-XV MSC EXPANSION XSFM中扩增的人类脂肪(AD-MSC)、骨髓来源MSCs (BM-MSC)和脐带来源MSCs (UC-MSC)的表型分析。MSCs扩增三代。使用流式细胞术进行表型分析。细胞CD105和CD90细胞表面标记物呈现阳性，CD45表达呈阴性。每个抗体含同型匹配对照组。

相关产品

货号 #	产品名	规格
91140	PRIME-XV FreezIS DMSO-Free	10 mL, and 100 mL liquid
91139	PRIME-XV FreezIS	10 mL, and 100 mL liquid
91137	PRIME-XV Adipogenic Differentiation SFM	100 mL liquid
91138	PRIME-XV Chondrogenic Differentiation XSFM	100 mL liquid
91135	PRIME-XV MSC Expansion SFM	250 mL and 1 L liquid
31002	PRIME-XV Human Fibronectin	1 mg liquid
91149DC	PRIME-XV MSC XSFM Dual Component with Phenol Red	Kit of 5L MSC basal and 10ml frozen supplement in bag
91214DC	PRIME-XV MSC XSFM Dual Component without Phenol Red	Kit of 5L MSC basal and 10ml frozen supplement in bag

技术支持

联系我们

如需更多信息或帮助，请联系：

- Email: biopharma@fujifilm.com
- 电话: 021-5010 6000 转生命科学事业部

网站资源

请访问网站 fujifilmbiosciences.fujifilm.com，获取技术资源和信息，包括：

- 安全数据表 (SDS)
- 分析证书 (CoA) (如有)
- 常见问题
- 产品资料
- 各国家/地区的办事处地址和联系信息

富士胶片(中国)投资有限公司

公司地址：上海市浦东新区平家桥路100弄6号7号楼601单元
网址：<https://fujifilmbiosciences.fujifilm.com/us>
销售咨询：021-5010 6000 转生命科学事业部