

MSC-T4 培养基实验验证报告

一、实验目的

通过与其他培养基进行细胞的传代培养对照实验，判断 MSC-T4 培养基性能。

二、实验材料

1. 仪器与设备：二氧化碳培养箱、离心机、移液枪、电动移液器、超净工作台、自动细胞计数仪、显微镜。
2. (1) 通用试剂：生理盐水、温和消化酶。
(2) 完全培养基配制方案
 - 1) MSC-T4 基础培养基+5%HELIOS;
 - 2) 某国外基础培养基 1+5%血小板裂解物;
 - 3) 某国外基础培养基 2+5%自带因子。
3. 耗材：康宁 T75 瓶、康宁 T175 瓶、15ml 离心管、50mL 离心管、1mL 枪头、10ul 枪头、10mL 移液管、计数板。
4. 种子细胞：P1 脐带间充质干细胞（冻存）。

三、实验方法

(1) 实验方法

1. 细胞复苏后，接种到 T75 瓶中，传代时接种到 T175 瓶中；
2. 加入培养基量：15ml/T75、25ml/T175；
3. 复苏后（P2）接种密度为 5000/cm²，根据收获数量，决定传代密度。本次验证实验中 P2 传 P3 的密度为 4000/cm²，P3 传 P4 的密度为 2500/cm²（其他两种培养基为 3000/cm²）；
4. 每代培养 4 天（96 小时）。

(2) 实验步骤

- (1) 把在 4℃解冻的因子分装 10ml 离心管中，每管 5ml。把近期使用的两代完全培养基的因子量放入 4℃冰箱保存，其余冻于-20 度冰箱。
- (2) 每种完全培养基配制 50ml。分别取出 15ml，每种完全培养基加入一个 T75 瓶中，暂时放入二氧化碳培养箱预热。
- (3) 细胞接种培养：
 - 1) 往 15ml 离心管装入生理盐水，37 度预热；
 - 2) 复苏的细胞复完全溶解后，加入到 1)的 15ml 离心管中，混匀后取出少量计数，余下部分分装到 3 个 15ml 离心管中离心；
 - 3) 去掉上清后，从事先在培养箱预热的每管 T75 瓶中分别取出 1ml 培养基，加入各个离心管中，重悬细胞；
 - 4) 按 5000/cm² 密度抽取重悬液，加入对应培养基的培养瓶中，摇匀后至于二氧化碳培养箱中培养；
 - 5) 培养两天、三天、四天对各个培养基培养的细胞进行拍照（10x）；
 - 6) 培养四天后进行传代。

- (4) 第一次传代培养（7月1日）：
- 1) 细胞消化计数
 - 2) 根据计数结果，每种培养基传代密度为 4000/cm²。
 - 3) 培养两天、三天、四天对各个培养基培养的细胞进行拍照（10x）（培养 4 天拍照的倍数为 5 倍）；
 - 4) 培养四天后进行传代。
- (5) 第二次传代培养（7月5日）
- 1) 参照第一次传代方法；
 - 2) 根据计数结果，MSC-T4 培养基传代密度为 2500/cm²（其他两种培养基为 3000/cm²）；
 - 3) 培养两天、三天、四天对各个培养基培养的细胞进行拍照（10x）；
 - 4) 培养四天后进行收获（7月9日）。

四 实验结果

- (1) 细胞接种数量及收获情况（表 1）

表 1 每代细胞接种及细胞生长情况

P1到P2			
项目	某国外基础培养基1+5%因子	某国外基础培养基2+5%自带因子	MSC-T4基础培养基+5%HELIOS
培养瓶规格	T75	T75	T75
接种密度/cm ²	5000	5000	5000
接种数量	0.38	0.38	0.38
收获量 (x10 ⁶)	7.85	6.83	7.87
增殖倍数	20.93	18.21	20.99
倍增时间 (h)	21.88	22.93	21.86
P2到P3			
培养瓶规格	T175	T175	T175
接种密度/cm ²	4000	4000	4000
接种数量	0.70	0.70	0.70
收获量 (x10 ⁶)	23.10	14.80	14.80
增殖倍数	33.00	21.14	21.14
倍增时间(h)	19.03	21.81	21.81
P3到P4			
培养瓶规格	T175	T175	T175
接种密度/cm ²	3000	3000	2500
接种数量	0.53	0.53	0.44
收获量 (x10 ⁶)	8.78	10.60	11.60
增殖倍数	16.72	20.19	26.51
倍增时间(h)	23.62	22.14	20.30

2. 各种培养基培养的细胞以及各代次细胞的形态及状态 (图1、图2、图3)

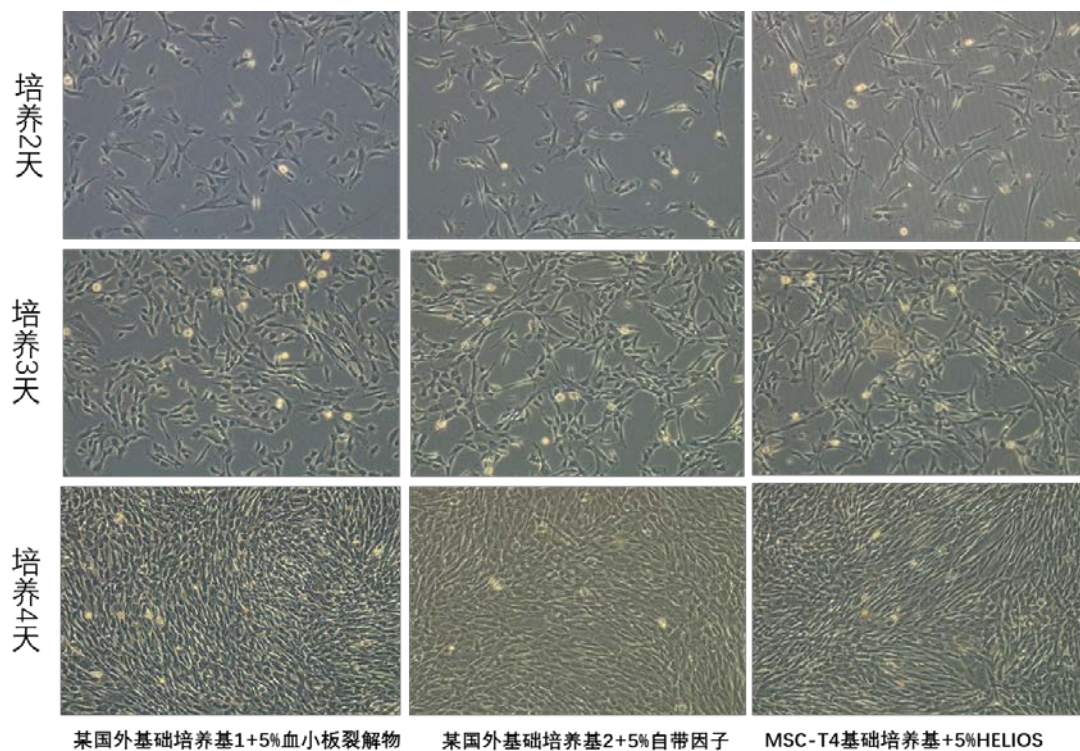


图1 冻存细胞从 P1 复苏到 P2

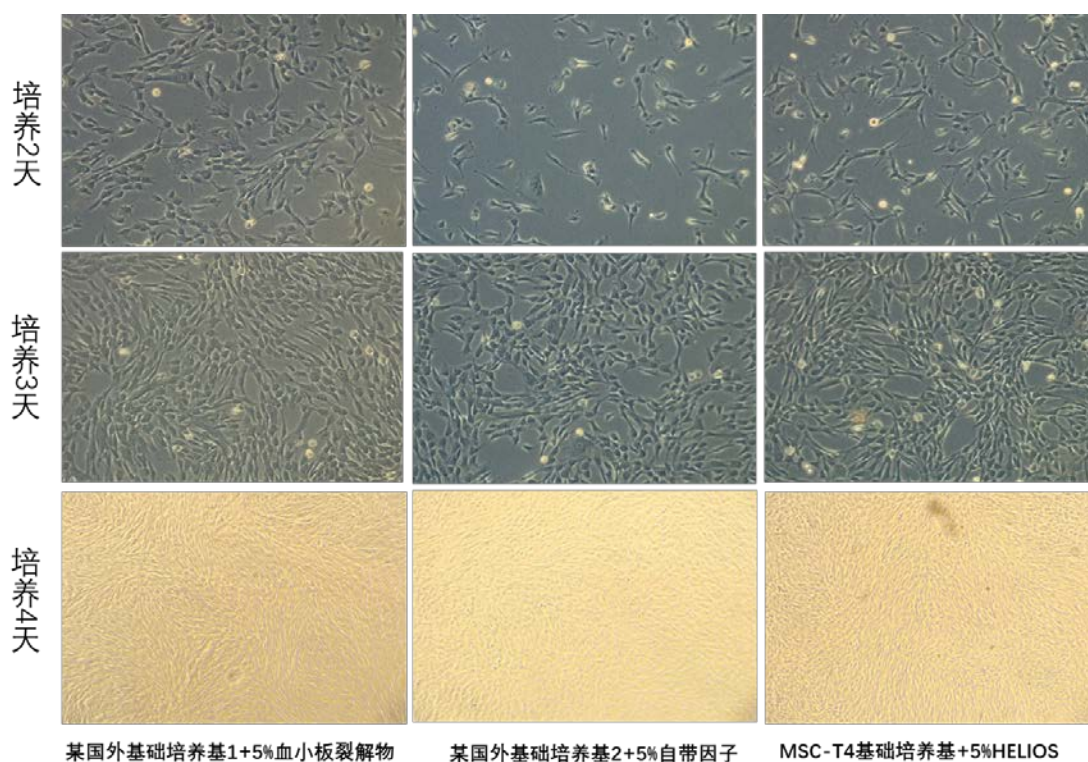


图2 细胞从 P2 传代到 P3 (培养4天的照片, 由于失误, 拍成5倍)

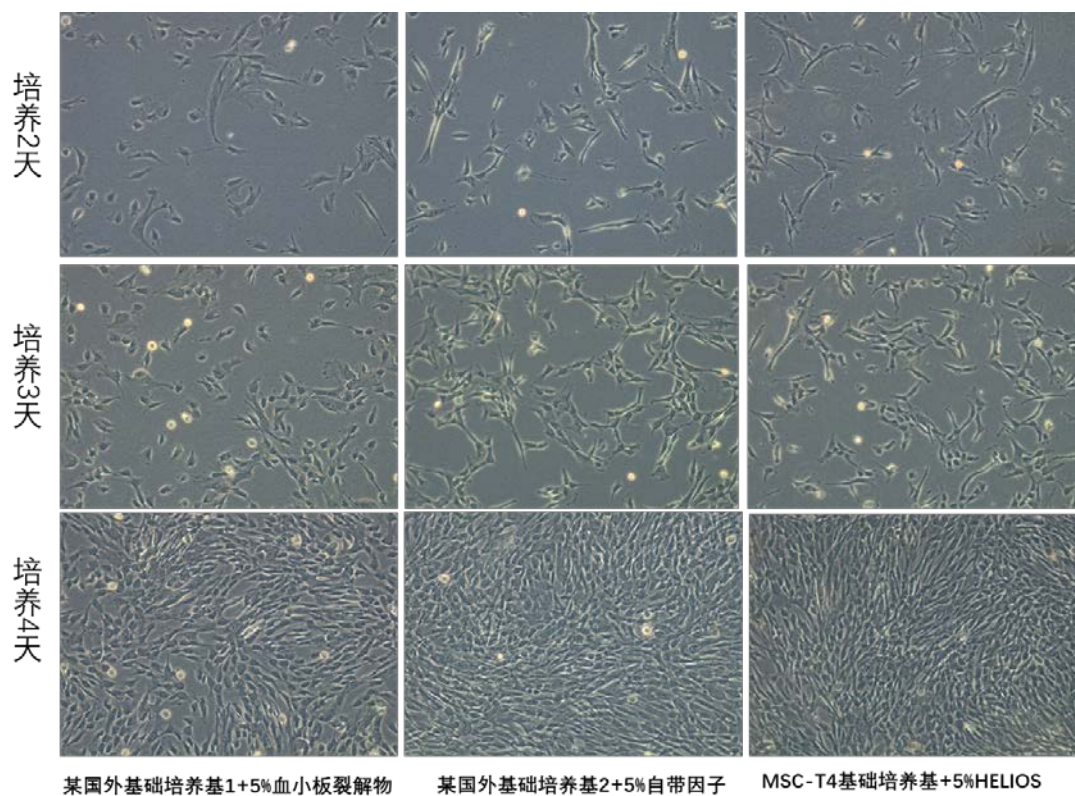


图 3 细胞从 P3 传代到 P4

五 结论

1. 三种培养基培养的细胞增殖速度都很快，而且细胞的形态、状态很好。
2. 在 P1 到 P2 以及 P2 到 P3 时，其他两种培养基培养出来细胞的数量要多于 MSC-T4 培养基，但是 P3 传到 P4 时，其他两种培养的培养细胞倍增时间有增加的趋势（增殖速度变慢），而 MSC-T4 培养基培养的细胞倍增时间没有增加，说明 MSC-T4 培养细胞的稳定性很好。