

细胞保存液说明书（TBD698）

【产品名称】细胞保存液

【产品货号】TBD698

【包装规格】100ml/瓶

【储存条件】-20℃避光保存，有效期 12 个月，无菌条件下启封后置-20℃保存，有效期 6 个月。

【产品介绍】本产品不含血清含 DMSO

【样本要求】人间充质干细胞，PBMC（单个核细胞）、CBMC（脐血单个核细胞）、NK、CIK 等免疫细胞冻存专用

【使用方法】**人间充质干细胞冻存步骤参考“使用方法 1”**

PBMC（单个核细胞）、CBMC（脐血单个核细胞）、NK、CIK 等免疫细胞冻存步骤参考“使用方法 2”

使用方法 1（即用型）：适用于人间充质干细胞冻存

使用前请确保本产品温度为 4℃，或客户所需环境温度下：

一. 冻存

1. 人间充质干细胞培养至汇合度 80%，弃去上清，加入 20mlPBS 洗涤一次。加入胰蛋白酶/EDTA 消化液（货号：TE2004Y）（T75 瓶加 3ml），使胰蛋白酶浸没细胞层，可用手轻拍培养瓶侧，干细胞大部分变圆脱落时，立马加入等体积无血清胰蛋白酶终止液（SC2013-G-E）。注意：胰蛋白酶作用时间严格控制，切不可消化过度，并及时加入胰蛋白酶终止液。
2. 细胞悬液在室温以 400g 离心力，离心 10 分钟。
3. 轻轻吸走上清液，注意不要扰动细胞团。

4. 用血清学吸管以 1mL 的细胞保存液重悬细胞，打散细胞团时用 2mL 的血清学吸管将 1mL 的细胞转移到标记好的冻存管中。

5. 推荐使用程序降温方法，每分钟降低 1 度，随后可以在-196℃液氮长期保存。不推荐在-80℃长期保存。

程序降温盒使用方法：： -20℃保存 2 个小时，然后-80℃中保存 2 个小时，随后可以在-196℃液氮中长期保存。

二. 复苏

解冻后，应立即铺板在预先包被好的培养皿中。

开始之前，提前准备好以下材料：试管，恢复至室温的培养基，预先包被的培养板，确保整个解冻复苏程序可以在最短的时间内完成。

注意：不要在 37℃水浴中加热培养基。

1. 取出冻存管，在 37℃水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管，直到剩余少量细胞还处于结冰状态。

2. 水浴中取出冻存管，用 70%的酒精或异丙醇擦拭除菌。

3. 用 2mL 的血清移液管将细胞悬液转移到一个 15mL 的锥形试管。

4. 根据后续应用需求，逐滴加入 5-7mL 的医用级注射生理盐水或预热的培养基到 15mL 的离心管中，加入的同时轻轻混匀。

5. 室温以 300g 离心力，离心 5 分钟。

6. 吸出培养基，使细胞沉淀完好无损。使用 2mL 血清移液管轻轻将细胞沉淀重悬于 1-2mL 的医用级注射生理盐水或培养基中。用于后续实验操作。

使用方法 2（非即用型）：适用于 PBMC（单个核细胞）、CBMC（脐血单个核细胞）、NK、CIK 等免疫细胞冻存

使用前请确保本产品温度为 4℃，或客户所需环境温度下：

一. 冻存

1. 本冻存方案细胞保存液（产品货号：TBD698）为非即用型方法，使用前需加入 20%灭活自体血浆。

2. TBD698 完全冻存液配制方法：

灭活后血浆与细胞保存液（产品货号：TBD698）按照 1:4 比例充分混合后即可使用（例：取 8ml 细胞保存液加入 2ml 灭活自体血浆，共计 10ml 完全冻存液），注意全程无菌操作（建议使用细胞冻存袋）。

3. 细胞冻存密度为 1000 万-2500 万个 PBMC/ml，密度超出 2500 万/ml 则不利于细胞冻存。

4. 使用程序降温方法：将调整好密度的冻存管或冻存袋装入程序降温盒或程序降温仪中，每分钟降低 1 度，随后可以在-196℃液氮长期保存。不推荐在-80℃长期保存。

程序降温盒使用方法：：-20℃保存 2 个小时，随后-80℃中保存 2 个小时，最后可以在-196℃液氮中长期保存。

二.复苏

7. 取出冻存管，在 37℃水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管，直到剩余少量细胞还处于结冰状态。

8. 水浴中取出冻存管，用 70%的酒精或异丙醇擦拭除菌。

9. 用 2mL 的血清移液管将细胞悬液转移到一个 15mL 的锥形试管。

10. 根据后续应用需求，逐滴加入 5-7mL 的医用级注射生理盐水或预热的培养基到 15mL 的离心管中，加入的同时轻轻混匀。

11. 室温以 300g 离心力，离心 5 分钟。

12. 吸出培养基，使细胞沉淀完好无损。使用 2mL 血清移液管轻轻将细胞沉淀重悬于 1-2mL 的医用级注射生理盐水或培养基中。用于后续实验操作。

【注意事项】

1. 严禁使用过期产品。
2. 使用后须立即放回-20℃至 10℃无菌保存。
3. 本品无对人体有害物质，接触皮肤清水清洗即可，如进入人眼，需用大量清水冲洗，如果仍有不适需及时就医。
4. 产品使用后按医疗废物处理。

细胞保存液使用提示：

一. “程序降温冻存”与“非程序降温冻存”的差异

1. “程序降温”与“非程序降温”指的是两种冻存细胞的方法。
2. “程序降温”指使用特定的设备或技术来控制细胞样品的降温过程，例如使用“程序降温盒”或“程序降温仪”可以精确控制降温速率和温度，适合需要长期冻存的细胞（5 年以上）。
3. “非程序降温”指不需要按照特定的程序进行降温，而是采用更灵活的方式，如直接放置于 -80°C 冰箱保存，此方法同样适合需要长期冻存的细胞（5 年以上）。
4. 相同种属细胞、相同冻存细胞密度、使用同一款冻存液、同一时间进行细胞冻存操作，满足以上几点要求后，分别进行“程序降温”与“非程序降温”冻存相同时间，其复苏后细胞活率相差 5%~10%。例如：“程序降温”冻存细胞一年，复苏后活细胞率为 90%，“非程序降温”则为 80%~85%。
5. 两种冻存方法的细胞复苏活率，与冻存细胞的种属、冻存密度、及冻存液产品有直接关系。

二. 细胞保存液使用中的安全注意事项

1. 细胞保存液并非医用级静脉注射产品，其渗透压大于 2000mOsmol/kg，直接使用会导致内皮细胞脱落，引发血管栓塞。因此细胞保存液禁止用于注射，或混合注射产品后注射。
2. 细胞复苏后必须使用医用级注射用生理盐水洗涤三次后方可使用，洗涤过程中需加入医用级注射用人血白蛋白（1g-5g/100ml 医用级注射用生理盐水），有助于稳定细胞流体力学状态，防止细胞结团及细胞机械性损伤。