

权 利 要 求 书

1、一种间充质干细胞通用无血清冻存液，其特征在于，按照体积百分比由以下组分构成：复方右旋糖酐 40 注射液 0.5%-10%，羟乙基淀粉(130/0.4) 1%-10%，甘油 5%-30%，无血清培养基 25%-70%，血清替代物 0.5%-1%，
5 人血白蛋白 20%-40%，维生素 C 0.05%-1%，维生素 E 0.2%-1%，非必须氨基酸 0.5%-3%，以上质量百分含量总量为 100%。

~~2、根据权利要求 1 所述的间充质干细胞通用无血清冻存液，其特征在于，无血清培养基为 Lonza UltraCULTURE™；血清替代物为 Pall Ultrosor™。~~

32、一种间充质干细胞通用无血清冻存液的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、在正常工作的生物安全柜中，按照体积百分比称量以下组分：复方右旋糖酐 40 注射液 0.5%-10%，羟乙基淀粉(130/0.4) 1%-10%，甘油 5%-30%，无血清培养基 25%-70%，血清替代物 0.5%-1%，人血白蛋白 20%-40%，维生素 C 0.05%-1%，维生素 E 0.2%-1%，非必须氨基酸 0.5%-3%，
15 以上质量百分含量总量为 100%；

步骤 2、在正常工作的生物安全柜中，空气净化 LED 灯变绿，准备无菌无热源血清方瓶，依次加入各组成成分充分搅拌混匀；

步骤 3、采用 0.2um 过滤器，对上述混匀后的混合液进行无菌过滤到新的无菌无热源血清方瓶中，并取样进行微生物、内毒素、支原体检测均为阴性为合格；
20

步骤 4、盖上血清方瓶瓶盖，封口膜瓶盖密封；

步骤 5、制备好的冻存液，置于 2-8℃ 医用冰箱冷藏。

43、一种间充质干细胞通用无血清冻存液的冻存方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、细胞收集：准备冻存的间充质干细胞生长密度超过 80-85%以上，PBS 缓冲液清洗 1-2 遍，加入胰蛋白酶刚好铺满细胞培养瓶底面为宜，消化至贴壁的间充质干细胞脱落 80%后，加入新的无血清培养基终止消化，用血清移液管转移入离心管中；
25

步骤 2、细胞活性计数：离心前，将离心管中的细胞液充分混匀取少量用

血球计数板进行细胞活性计数，计算细胞总量；

步骤 3、离心收集细胞：将离心管配平进行离心，离心后保留沉淀物弃上清液收集细胞；

步骤 4、加入细胞冻存液：收集的细胞沉淀加入间充质干细胞通用无血清冻存液,用血清移液管充分混匀，分装入 2ml 的冻存管，密封标注；

步骤 5、程序降温：分装好的细胞冻存管，放入程序降温仪梯度降温或程序降温盒-80℃冰箱过夜；

步骤 6、深低温液氮冻存：转入-196℃气相液氮罐长期保存。

54、根据权利要求 43 所述的冻存方法，其特征在于，胰蛋白酶的质量百分含量为 0.125% - 0.25%，消化时间为 1 - 2 min。

65、根据权利要求 43 所述的冻存方法，其特征在于，离心转速为 1000-1200rpm/min，离心时间为 5 分钟。

76、根据权利要求 43 所述的冻存方法，其特征在于，收集的细胞的终密度 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^7 / \text{ml}$ 。