

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 ~~5%0.5%~~5%-10%，羟乙基淀粉（130/0.4）1%-10%，甘油 ~~20%5%~~20%-30%，无血清培养基 25%-~~29.1%70%~~29.1%，血清替代物 ~~0.8%0.5%~~0.8%-1%，人血白蛋白 ~~23.25%20%~~23.25%-40%，维生素 C 0.05%-~~0.5%4%~~0.5%，维生素 E 0.2%-~~0.6%4%~~0.6%，非必须氨基酸 0.5%-3%，以上质量百分含量总量为 100%；

无血清培养基为 Lonza UltraCULTURE™；血清替代物为 Pall Ultrosor™~~—~~；

所述的间充质干细胞通用无血清冻存液的制备方法，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 5%-10%，羟乙基淀粉（130/0.4）1%-10%，甘油 20%-30%，无血清培养基 25%-29.1%，血清替代物 0.8%-1%，人血白蛋白 23.25%-40%，维生素 C 0.05%-0.5%，维生素 E 0.2%-0.6%，非必须氨基酸 0.5%-3%，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；

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。

2、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 5%-10%，羟乙基淀粉（130/0.4）1%-10%，甘油 20%-30%，无血清培养基 25%-29.1%，血清替代物 0.8%-1%，人血白蛋白 23.25%-40%，维生素 C 0.05%-0.5%，维生素 E 0.2%-0.6%，非必须氨基酸 0.5%-3%~~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%，~~
以上质量百分含量总量为 100%；

5 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；

步骤 4、盖上血清方瓶瓶盖，封口膜瓶盖密封；

10 步骤 5、制备好的冻存液，置于 2-8℃医用冰箱冷藏。

3、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：

15 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；

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；

20 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；

25 步骤 6、深低温液氮冻存：转入-196℃气相液氮罐长期保存。

4、根据权利要求 3 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。

5、根据权利要求 3 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。

6、根据权利要求 3 所述的冻存方法，其特征在于，收集的细胞的终密度 1×10^6 - 2×10^7 /ml。