

复苏:

1. 将人脂肪间充质干细胞冻存管从液氮中取出，置于 37°C 水浴中使之迅速融解，取出后拿到超净台内用 75% 酒精擦拭冻存管旋口处及外壁，防止污染。
2. 将冻存管内细胞悬液转移至含 3-4 ml 人间充质干细胞 (hMSC) 完全培养液的 15 ml 离心管内，以 1000 rpm，离心 5 min。
3. 离心后将上清液吸除，另加入新鲜的人间充质干细胞完全培养液 2 ml，吹打悬浮。
4. 轻轻吹打，制成单细胞悬液，尽量避免气泡。
5. 按照人脂肪间充质干细胞说明书中建议复苏培养体系转移至一个 T25 培养瓶中培养，加入培养液 6 ml。
6. 放入 37°C 培养箱内培养。
7. 复苏第二天观察，如死细胞较多，更换新鲜的人间充质干细胞完全培养液，可以使细胞生长的更好。

传代:

备注 1: 由于人间充质干细胞完全培养液是低血清培养液，需要提前取少量人间充质干细胞完全培养液，额外加入 **10% FBS**，作为胰酶消化终止液使用。

备注 2: 细胞不能太密集，否则容易分化。

1. 待细胞长到 70%-80% 满时进行传代 (见备注 2)，一般 3-5 天，具体视细胞生长情况而定。
2. 吸除废液。
3. 用 PBS (不含钙镁离子) 轻轻冲洗一遍。
4. 加入 1-2 ml 的 0.05% 胰酶 (含 EDTA) 至培养瓶，轻轻晃动，使胰酶覆盖底面，置于 37°C 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察，直至细胞层全部脱落 (一般需要 1-2 min)。
6. 加 2 ml 胰酶消化终止液 (即备注 1 中: 额外加入 **10% FBS** 的人间充质干细胞完全培养液) 终止消化。
7. 1000 rpm 离心 5 min，去上清，加入人间充质干细胞完全培养液 2 ml。
8. 多次轻轻吹打细胞，制成单细胞悬液。
9. 按照 1:2-1:3 的比例进行传代。
10. 放入 37°C 培养箱内培养。

冻存:

1. 按传代的方法将细胞消化下来，制成细胞悬液。
2. 以 1000 rpm，离心 5 min，弃上清，逐滴加入已经预冷的冻存液，悬浮细胞。
3. 按每支冻存管内加入 500 μ l 细胞悬液分装到冻存管内，标记细胞名称、代数、冻存日期等基本信息。

4. 将冻存管置于程序降温盒内，-80°C过夜，转入液氮。

冻存液配方：人间充质干细胞完全培养液 60%，FBS 30%，DMSO 10%