

# 3D StarPore® Max 微载体 间充质干细胞培养说明书

## 一、产品描述

华辰生物 3D StarPore® Max 微载体是明胶成分柔性多孔结构设计，粒径大小在 200-350  $\mu\text{m}$  之间。不同规格的产品都是重量明确的，且已灭菌，可即开即用。

3D StarPore® Max 微载体有如下优点：

- ① 多孔结构，提供细胞立体生长的仿生环境，同时也给细胞充足的生长空间。
- ② 可利用比表面积大，孔隙率大于 90%。
- ③ 可进行温和消化，专用裂解液 20 分钟左右消化完全。
- ④ 可支持高密度接种，单位载体可以收获更多的细胞。
- ⑤ 可耐受高剪切力，多孔结构保护细胞免受剪切力影响。

## 二、StarSpan mini 生物反应器动态培养操作流程

### 1. 微载体与细胞准备

#### 1.1 实验设备

本实验需要用到的主要设备包括生物反应器、显微镜、离心机、水浴锅、恒温培养箱、生物安全柜、细胞计数仪等。

#### 1.2 试剂

本实验需要用到的试剂包括干细胞无血清培养基、微载体、裂解液、葡萄糖检测仪、台盼蓝、DPBS 缓冲液、胰酶（用于消化 2D 培养细胞种子）等。

#### 1.3 其他用品

本实验还需要用到一些其他用品，如培养瓶、移液管、一次性无菌手套等。

### 2. 3D 细胞培养操作过程（以 200mg 微载体为例）

#### 2.1 微载体水合溶胀

取一瓶 200mg 微载体（已辐照灭菌），加入 30ml 完全培养基，盖上盖子，并摇晃均匀。为了更好地进行微载体水合溶胀，建议提前一天加入完全培养基浸润，并 4°C 过夜水合。

第二天，将充分水合后的微载体，摇晃并转移至 250ml 培养瓶，再用 20ml 完全培养基少量多次洗涤微载体瓶后，转移到培养瓶。

#### 2.2 细胞悬液制备

根据正常的细胞传代操作处理，消化好备用细胞悬液 35ml，按  $1 \times 10^7 / 200\text{mg}/200\text{ml}$ （微载体 1g/L）细胞量进行接种。

注意使用 TrypLE Express 酶（推荐）消化后，需用 DPBS 清洗 1-2 遍再进行接种。过 70  $\mu\text{m}$  筛网后再计数，保证单细胞悬液的均一性。

建议选用比较温和的胰酶，例如 Gibco TrypLE™ Express 酶（重组，1X），用 DPBS 进行 1:1 稀释，配制成胰酶工作液后使用。

#### 2.3 接种准备

补液 15ml，确保接种当天总培养体积为 100ml，以增强接种效果。

## 2.4 细胞接种

250ml 培养瓶接种总体积为 100ml, 使微载体均匀悬浮即可。

这个体积可以使微载体在反应器内保持悬浮状态, 使细胞能够均匀地接种到微载体上。

## 2.5 细胞贴壁

细胞贴壁转停参数, 可按如下条件设置:

0-24h: 设置转停参数:

① 55rpm 搅拌 5min, 静止 25 分钟 一次; 重复以上循环 48 次。转停工艺共计 24h。

可根据细胞特性进行实验测试调整参数, 如有微载体沉积现象, 可以每次调高 5-10rpm。一般来说, 接种时间为 24 小时, 但具体时间可以根据实际情况进行微调整。

## 2.6 细胞培养

细胞培养工艺参数, 可按如下条件设置:

24-48h: 接种 24h 后, 补充 100ml 完全培养基, 搅拌速度调至 65rpm 进行恒速搅拌培养。

48-72h: 搅拌速度调至 75rpm 进行恒速搅拌培养。72h 培养结束进行全量换液。

72-96h: 搅拌速度调至 80rpm 进行恒速搅拌培养。

注意点:

① 观察微载体悬浮情况:

每天观察微载体在反应器中的悬浮情况, 注意微载体的溶胀和悬浮密度。根据观察结果, 调整搅拌速度和时间, 使微载体达到最佳悬浮状态。

② 调整搅拌速度

根据细胞类型和培养需求, 调整搅拌速度和时间。一般来说, 搅拌速度控制在 50-90rpm 范围内, 搅拌时间根据具体实验需求而定。

③ 记录观察结果

记录每天观察到的微载体悬浮情况、搅拌速度和时间等信息, 以便指导后续操作细节。

## 2.7 接种、补加培养基、取样计数等操作步骤

① 接种细胞

将消化好的细胞悬液与微载体接种到反应器中, 确保微载体被充分接种。接种后, 将反应器放置在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 进行适当的搅拌和静置。

② 补加/换液完全培养基

在培养过程中, 根据培养基的营养消耗情况, 及时补加新的培养基。补加培养基时, 将培养瓶放置在生物安全柜静置, 等微载体全部沉降到底部后, 吸取上层培养基弃去, 再补加新鲜完全培养基。

一般情况下, 推荐 72h 进行全量换液。若细胞代谢能力较强, 应适当调整换液补液频率。

具体操作是: 停止搅拌静置约 5-10 分钟, 待微载体沉降后, 用电动移液器吸出上清, 并补足新鲜培养基。注意: 所有的补/换液操作, 完全培养基应提前预热, 防止对细胞的刺激, 产生有可能的从微载体上脱落的情况。

③ 取样计数

从培养瓶中均匀取出 2-10ml 微载体悬液进行计数、明场观察或荧光染色等操作。取样时, 注意控制取样的时间和位置, 确保取样的代表性和准确性。一般推荐 Day3 取样计数、细胞全收获, 或者 Day4 取样计数、细胞全收获。

## 2.8 明场观察

将取样的微载体悬液放置在载玻片或培养孔板中，通过明场显微镜观察微载体情况。

## 2.9 荧光观察

将取样的微载体悬液，经染色处理后，放置在载玻片或培养孔板中，通过荧光显微镜可以观察、反映细胞在微载体上的生长和分布情况，以及细胞数量。

取样：吸取少量微载体和培养基的混合液（微载体悬液）于孔板中或离心管中，静置约五分钟。

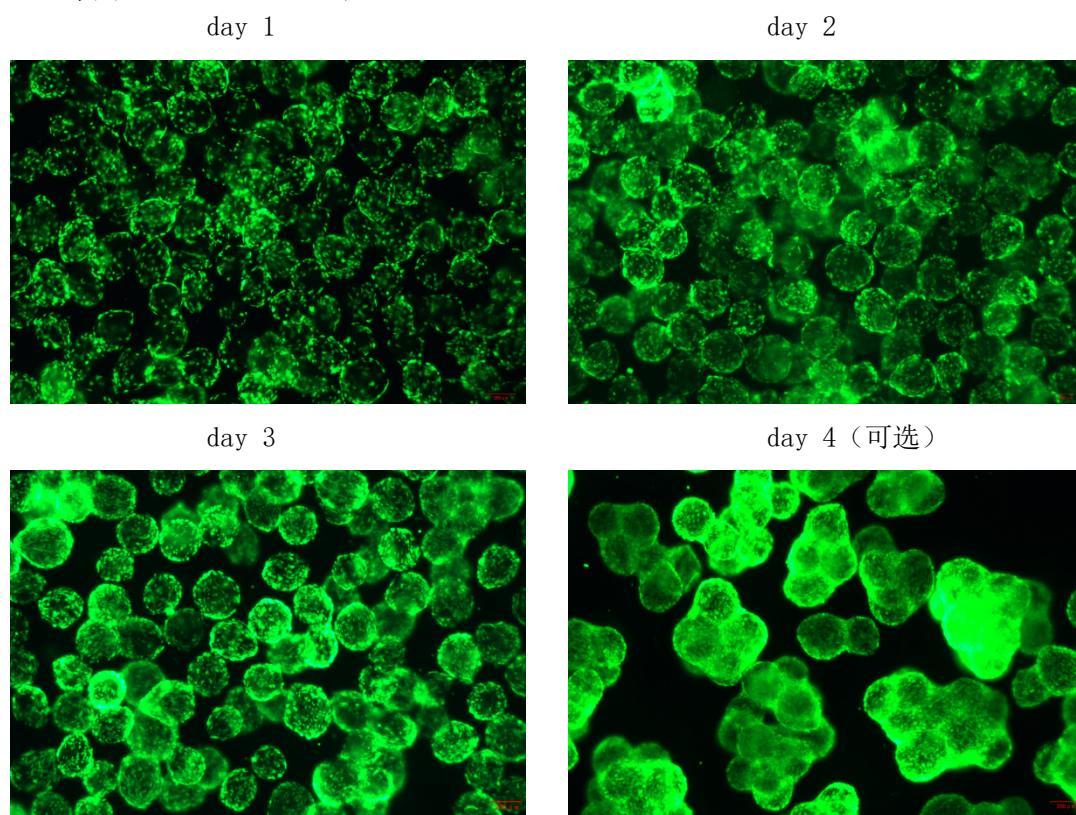
染色前处理：小心吸除上清，加入 PBS 洗一次。静置后去除 PBS。

细胞染色：根据所选用的细胞死活荧光染料（如 AO/PI 或 Calcein-AM/PI 染料）进行染液配制以及染色。

优先推荐 Calcein-AM/PI 染料，微载体产生的染色干扰对 Calcein-AM/PI 较小，染色结果更稳定。按照 48 孔板每孔 200  $\mu$ L 或者 24 孔板每孔 400  $\mu$ L 的比例进行染色操作。

荧光下，脐带间充质干细胞/微载体在培养第 1-4 天，细胞在微载体上的荧光情况，见下示意图（4X）：

采用 Calcein-AM/PI 染色：



## 3. 裂解计数与细胞收获说明

### 3.1 裂解液使用方法

在能充分摇匀的情况下取样，确保微载体均匀悬浮的状态下准确取样计数。

取微载体悬浮样品，每个样品 2-10ml（若取样操作没问题，可以只取一个样），静止 5-10 分钟，去上清，至少 2 倍体积的 DPBS 清洗一次，静置后去上清，每个样品加入微载体裂解液（华辰生物 3D StarPore 专用裂解液），按 200mg 微载体细胞、培养三天加入约 20ml 裂解液的体积比例，混匀，**室温**裂解 10-30min，在裂解后期，轻柔晃动离心管，或用移液器

轻轻吹打悬液，加速微载体裂解。完成后加入等体积完全培养基终止反应，然后离心清洗，进行计数操作。

### 3.2 细胞收获时的裂解微载体

待微载体完全沉降，使用移液管吸取弃去上清液，将剩余微载体悬液转移到 50ml 离心管，再次等微载体沉降，吸取弃去微载体上方上清液。PBS 洗涤一到两次，同样按比例加入微载体裂解液。**室温下**进行裂解，5 分钟后可以晃动，或用移液器轻轻吹打悬液，加速微载体裂解。

### 3.3 收获细胞

10-30 分钟左右观察微载体全部裂解，1500 rpm，10min 离心。

### 3.4 洗涤与重悬细胞

弃去上清，加入等量的 DPBS 重悬细胞，以 1000rpm，10min 再次离心。重复洗涤一次，细胞过筛后用于获得细胞产物。