

CelCradle™ 干细胞培养操作手册

内容

材料	2
方法	3
载体包被(无血清培养时推荐包被).....	3
接种准备	3
接种	3
培养扩增	3
选择灌流培养 (CelCradle™ 500AP).....	4
细胞增殖监控 (参见附录 A).....	4
细胞收获	4
附录 A.....	6
细胞染色	6
活细胞荧光染色	6
固定细胞非荧光染色	6
细胞小规模扩增培养日常监控.....	6
酶消化法	6
葡萄糖消耗量监控 (使用 GlucCell 或其他生化分析仪).....	7
pH 监控	7
附录 B.....	8
CelCradle 细胞收获	8
附录 C (结果)	9
活细胞染色	9
苏木精染色	10
台盼蓝染色	10
细胞收获前后载体染色	11
高汇合度的细胞	11
细胞增殖	12
葡萄糖消耗水平	12
pH 监控	13

材料

- MSC 促贴壁试剂 (Biological Industries, 05-752-1) / 其他包被试剂
- PBS 不含 Mg^{2+}/Ca^{2+}
- MSC (间充质干细胞)
- 完全培养基- MSC NutriStem® XF 培养基 (Biological Industries, 05-200-1A-KT) 或其他培养基
- CelCradle 平台 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell) 或 CelCradle™ 500AP
- Celfeeder 泵
- Celshaker 手腕摇床
- GlucCell 葡萄糖检测系统 (检测仪及检测试纸条)
- pH 计
- 长镊子
- 细胞过滤器
- 台盼蓝/苏木精染色剂
- 荧光素二乙酸酯 (FDA) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- 碘化丙啶 (PI) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- 消化液 (0.05 % 胰蛋白酶-EDTA/胰酶替代物/胶原酶/ Accumax™ 细胞消化酶)

方法

载体包被(无血清培养时推荐包被)

- 取一个 CelCradle 培养瓶 (CC-500A 或 CC-500AP) 至生物安全柜中
- 用 120 ml 纤连蛋白或细胞促贴壁包被液(BI, 05-752-1)包被载体, 37 °C 静置 30 分钟
- 吸除包被液
- 用 120 ml PBS 缓冲液润洗载体两次
- 继续进行接种步骤

注意: 包被步骤请按生产商提供的操作说明书操作

接种准备

接种一个 CelCradle 培养瓶需要准备 5 个 T-175 方瓶的细胞培养液 (含 $2-3 \times 10^7$ 个细胞)。

接种

- 准备 120 mL 新鲜预热的细胞培养液, 内含有 $2-3 \times 10^7$ 个干细胞 (确保 pH 在 7.2-7.4 之间, 可添加 15 mM HEPES 确保在接种时 pH 的稳定性)。
- 用移液管均匀地将细胞培养液覆盖在载体上。
- 将蓝色通气盖放在无菌培养皿中保存, 确保蓝色通气盖子严格无菌, 以便后续使用。
- 使用白色密闭盖盖紧细胞培养瓶。
- 倒转培养瓶使载体全部落在底部的盖子上, 确保载体完全浸没在细胞悬液中。
- 确保倒置, 同时旋转培养瓶使细胞均匀分布在载体上。
- 将培养瓶倒置于 CO₂ 培养箱中, 37°C, 5% CO₂ 培养(根据细胞种类设置对应培养条件)。
- 孵育 3 h, 期间每隔 30 分钟轻轻旋转培养瓶, 让细胞充分附着。(注: 须轻轻地执行这一步, 因为部分已经附着的细胞可能会因剧烈的运动从载体上分离出来。)
- 孵育 3 h 后, 无菌操作从 CelCradle 培养瓶中取出 10ml 培养液。
- 离心收集未贴附的细胞, 将细胞重悬于适当的体积中进行细胞计数, 以确定未附着细胞的数量。然后计算贴附率。

$$\text{贴附率} = \frac{\text{接种细胞总数} - \text{未贴附细胞总数}}{\text{接种细胞总数}} * 100\%$$

- 当贴附率超过 90% 以上, 则进行下一步骤。

注意: 孵育时间长短取决于所用培养基、血清和是否包被载体。MSCs 孵育 2 h, 贴附率就达到 90% 以上。我们建议无论贴附率如何, 4 小时后停止孵育, 并进入培养和扩增阶段。

培养扩增

- 向培养瓶中补充新鲜的完全培养基至 500 ml, 盖上蓝色通气盖。

2. 将培养瓶放至CelCradle平台，设置运行参数，启动程序进行细胞培养。
 - i. Up: 1.0 mm/s, Top Holding: 10 s
 - ii. Down: 1.0 mm/s, Bottom Holding: 30 s

选择灌流培养 (CelCradle™ 500AP)

如果选择灌流培养装置CelCradle™ 500AP，需准备：

- a. 含1 L培养液的1 L 灌流瓶(取决于培养基用量和细胞培养时间)
- b. 将装有培养基的灌流瓶与CelCradle™ 500 AP和泵相连接
- c. 设置相应的运行程序：
 - i. 灌流体积(1999ml)
 - ii. 运行时间及天数(每天从第三天开始)
 - iii. 循环频率（例如：24个循环/天）

注：使用时请参考泵的操作手册

细胞增殖监控 (参见附录A)

建议每天监测培养基剩余葡萄糖含量和 pH 值，判断是否需要更换培养基或者补充葡萄糖及碳酸氢钠，尤其是初次摸索试验。

- a. 取 3 ml 培养液：pH 和葡萄糖检测
- b. 取 3 片载体：根据荧光素二乙酸酯（FDA）、碘化丙啶（PI）和 Hoechst 染色的标准操作步骤分别对活/死细胞进行染色
- c. 取 10 片载体：用蛋白酶消化收集细胞，并对活细胞进行计数（参考下一步的细胞收集操作步骤）
- d. 更换新鲜培养液：
 - a. 葡萄糖浓度过低
 - b. pH < 7.00
 - c. 或每 3 天一次（如果葡萄糖和酸碱度稳定，则遵循 2D 培养方法）
- e. 当细胞在第 5-7 天达到最大汇合度时收集细胞（但是，不要像 T-方瓶的 MSCs 那样过度培养细胞）

注：细胞的生长速度和增长量与细胞代数、培养基和血清的使用密切相关。可参考现有文献，了解更多有效的 MSCs 基础培养基类型和血清类型。

注：葡萄糖消耗量或计算细胞总数可作为汇合度的判断依据。或者，当细胞高度融合时，细胞会从载体边缘突出，呈现健康的网状结构（附录 C）。

细胞收获

1. 使用CelCradle™过滤器排尽培养瓶中的培养液。
2. 用500 ml PBS润洗两次。
3. 弃尽PBS。
4. 加入120-150 ml预热的酶液，盖上白色密闭盖。

5. 倒置培养瓶使载体与酶液充分混合，将培养瓶倒置于37°C二氧化碳培养箱中孵育15-30分钟。
6. 收集酶液至洁净无菌烧杯中（若只含少量细胞也可以丢弃）。
7. 加入120 ml酶抑制剂液（大豆蛋白抑制剂/含血清培养基）至培养瓶中，盖上白色密闭盖。
注：旧培养基(含血清)可用作酶抑制剂，高效利用。
8. 倒置培养瓶，使载体全部掉落至白色密闭盖上。
9. 使用以下两种方法中的一种或两种方法来洗脱细胞（物理收集）：
 - a. 方法一（参考附录B）：
 - i. 倒置培养瓶，用手掌用力拍打瓶身40下。
 - ii. 拍打过程中旋转瓶身90度，共旋转4次，旋转到下一个角度之前，每个角度都要拍打40下。
 - iii. 重复一次（一共：4个角 x 2次）



- b. 方法二：
 - i. 或者，将培养瓶固定在CelShaker手式摇床中并开始震动摇晃
 - ii. 持续时间：3 min，转速 400 rpm

10. 将含细胞的溶液收集至洁净无菌烧杯中。
11. 加120 ml培养基至培养瓶中。
12. 重复步骤8至11，至少洗脱3次
13. 离心收集所有细胞，检测细胞浓度和活力。
14. 对已经洗脱细胞的载体进行荧光染色(二乙酸荧光素)，检查收获效率。

注：如果洗脱后载体上仍然还有许多细胞，需要额外的收获步骤优化。相关建议的解决方案，请参阅下一节。

注：在初始步骤中，用PBS洗涤这一步骤是很重要的，确保所有血清和死细胞被洗掉。在这一步骤中，一些细胞会脱落，但它们中的大多数是不能存活的细胞。这一步骤可以通过去除死细胞来提高收获的存活率。

注：充分的酶消化时间是细胞成功收获的关键。大多数细胞能在不改变生存能力的情况下，耐受胰蛋白酶-EDTA 30分钟以上。高细胞密度将需要更多的解离酶和消化时间。与胰蛋白酶相比，Accumax™细胞消化酶（Innovative Cell Technologies, San Diego, CA）可以在不损害细胞的情况下延长消化时间。

注：当细胞在3D BioNOC™ II载体上产生胶原和ECM时，蛋白解离酶（如中性蛋白酶和胶原酶）可以更有效地收获干细胞和原代细胞。

附录 A

细胞染色

活细胞荧光染色

1. 从 CelCradle 中无菌取样 3 片 BioNOC™ II 载体，并转移到 24 孔板
2. 向孔板中加入 1 ml 培养基。在培养基中按以下最终浓度添加染料：1 µg/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher, H3570) 和 1 µg/ml 碘化丙烷 (PI, Sigma Aldrich P4170)。
3. 将孔板放入二氧化碳培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中孵育载体 20-30 分钟
4. 再加入终浓度为 1 µg/ml 荧光素二乙酸酯 (FDA, Thermo Fisher, C34852) 然后在荧光显微镜下观看载体细胞 (Hoechst 33342 为蓝色, FDA 为绿色, PI 为红色)

注：其他类型的荧光染料也可用于细胞染色。如钙黄绿、吖啶橙、细胞跟踪器等

固定细胞非荧光染色

1. 从 CelCradle 中无菌取样 1-2 片 BioNOC™ II 载体
2. 用乙醇固定细胞。用 70% 乙醇固定 5 分钟。
3. 用去离子水或 PBS 洗去乙醇，冲洗两次。
4. 用苏木精或台盼蓝染色 5-10 分钟。
5. 用去离子水冲洗掉多余的染料。
6. 用明场显微镜观察载体上的细胞。

注：可使用其他类型的染料。荧光染料可以更好地观察细胞在载体中的残留情况，因为当收获后残留的细胞较少，可见染料不能提供清晰的视野。

细胞小规模扩增培养日常监控

酶消化法

延长胰蛋白酶的孵育时间会导致细胞损伤，所以我们建议使用一种比胰蛋白酶更温和的酶。下面是几种使用不同酶的例子。

1. 从 CelCradle 中取出 3 片载体转移到 1.5 ml 离心管中。
2. 用 1 ml PBS 润洗载体，吸去 PBS。
3. 多次重复步骤 2。
4. 酶解：
 - i. 胰蛋白酶
 - 加 1 ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA，37°C 孵育 15-30 min。
 - ii. TrypLE Express: (大多数细胞类型)
 - 加 1 ml TrypLE Express，37°C 孵育 15-30 min。
 - iii. Accumax/ Accutase: (适用于干细胞)
 - 加 1 ml Accumax/ Accutase，室温孵育 15 - 30 min。(培养时间取决于细胞密度，我们建议进行 15 分钟、20 分钟、30 分钟的时间优化)。Accumax 建议用在 3D 培养的细胞。但是，您也可以使用您首选的消化酶/方法。
 - iv. 胶原酶: (适用于干细胞)
 - 用 PBS 稀释 I 型胶原酶 (Thermo Scientific, Cat 17101)，配置含有 100 units /ml 胶原酶和 5 mM CaCl₂ 的酶解溶液。

- 加入 1 ml 胶原酶解液，孵育 15 - 30 min。(请根据需要，优化消化时间)。
5. 将酶液转移到 15 ml 收集管。将 1 ml 中和液加至装有载体的离心管。
 6. 用手指/金属棒轻拍 1.5 ml 离心管 40 次。
 7. 将溶液转移到 15 ml 收集管中。
 8. 加 1 ml PBS，并上下翻转离心管几次，以均匀冲洗载体。重复步骤 5 和 6。
 9. 重复步骤 7 至少三次（用 PBS 收集 4 次）。
 10. 离心收集细胞，并用少量缓冲液重悬细胞，用于细胞计数。计算每片载体含有的平均细胞数。
- 注：根据细胞的融合程度，收获过程可能需要调整以达到最佳状态。

葡萄糖消耗量监控 (使用GlucCell或其他生化分析仪)

1. 从 CelCradle 中取出 2 ml 培养基，用 GlucCell 仪测量葡萄糖含量。
2. 在 T_N (Glucose T_N)模式下进行葡萄糖测量。
3. 当更换新鲜培养基时，测量对照培养基（Glucose T₀）作为基线。
4. 葡萄糖消耗量：Glucose T₀- Glucose T_N

pH 监控

1. 从 CelCradle 中取出 2 ml 培养基，用于 pH 检测。
2. 从 CelCradle 取出后立即检测，以免因环境影响造成误差。

附录 B

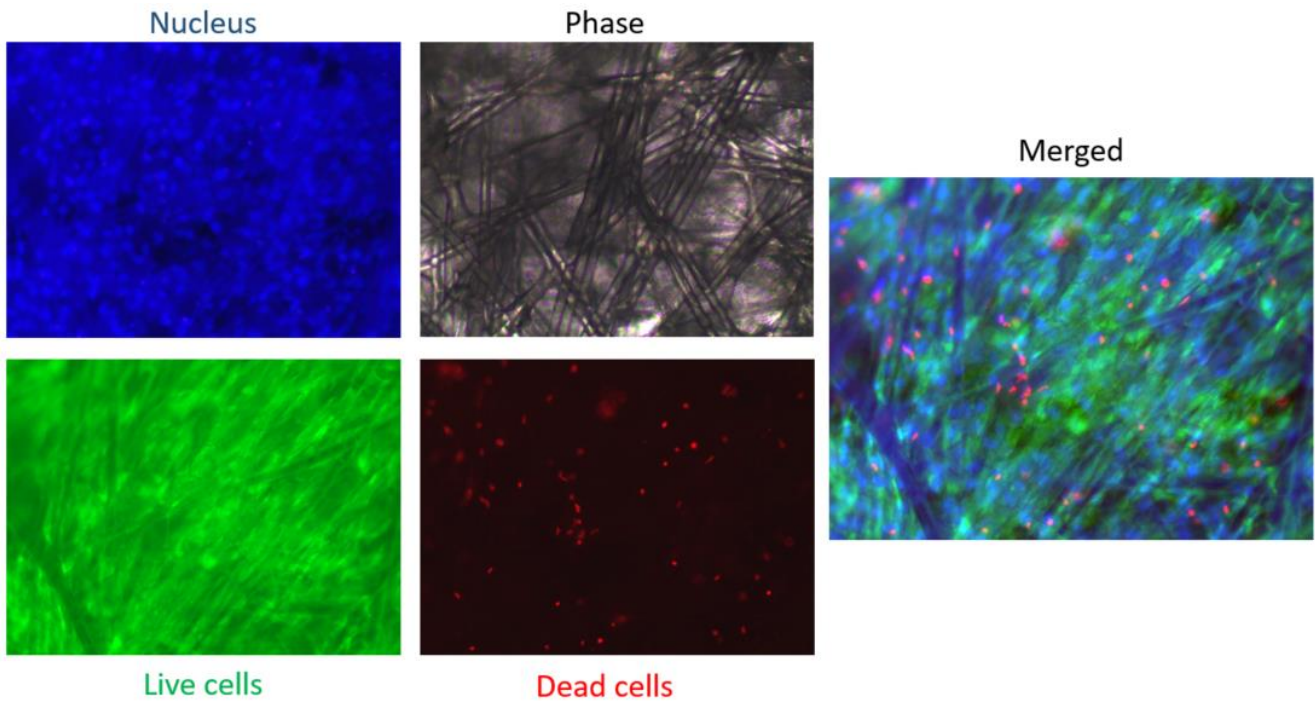
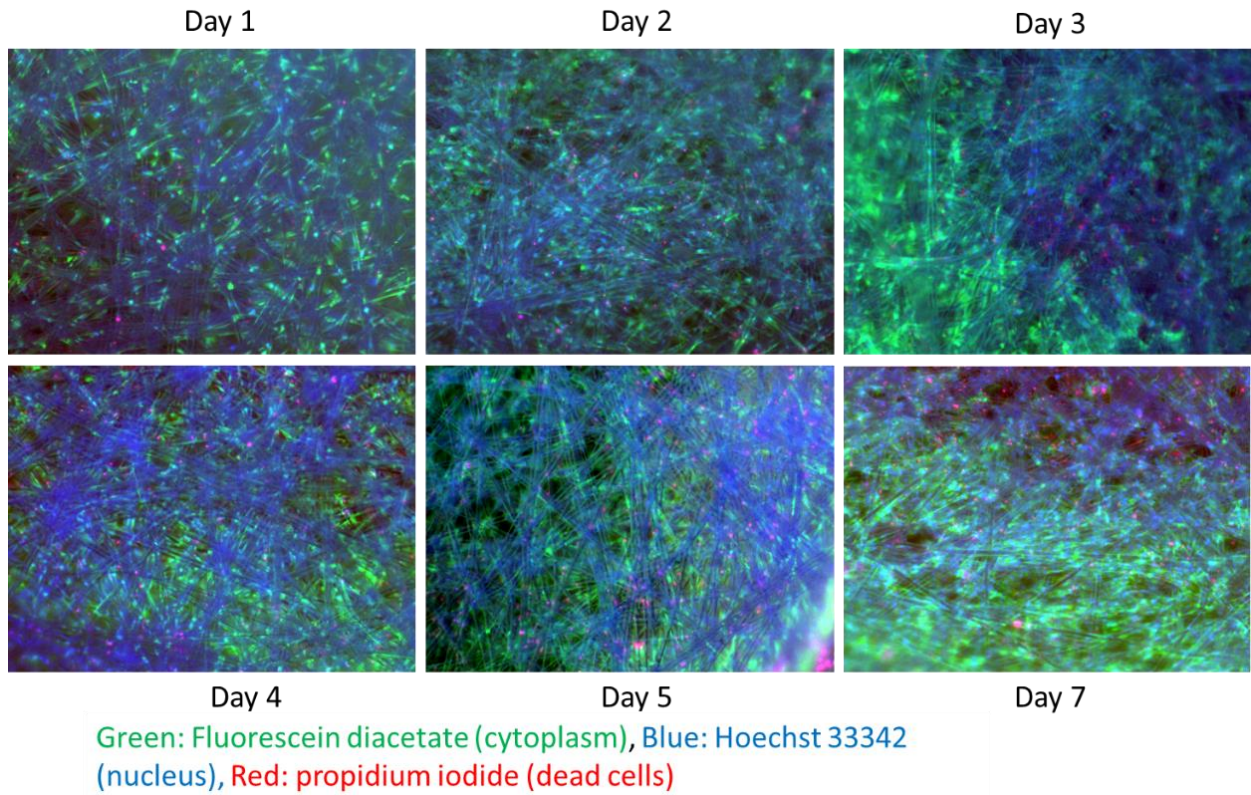
CelCradle细胞收获

细胞收获详细操作步骤见以下视频 (<https://www.youtube.com/watch?v=u0GCUHF14Vk>)



附录 C (结果)

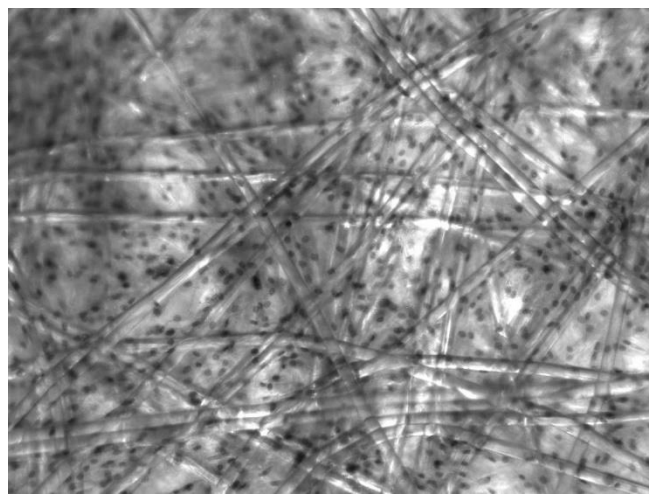
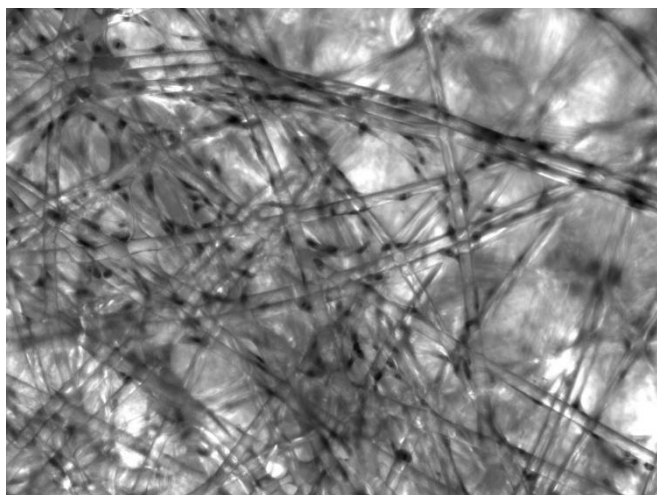
活细胞染色



苏木精染色

Day 1

Day 3



台盼蓝染色

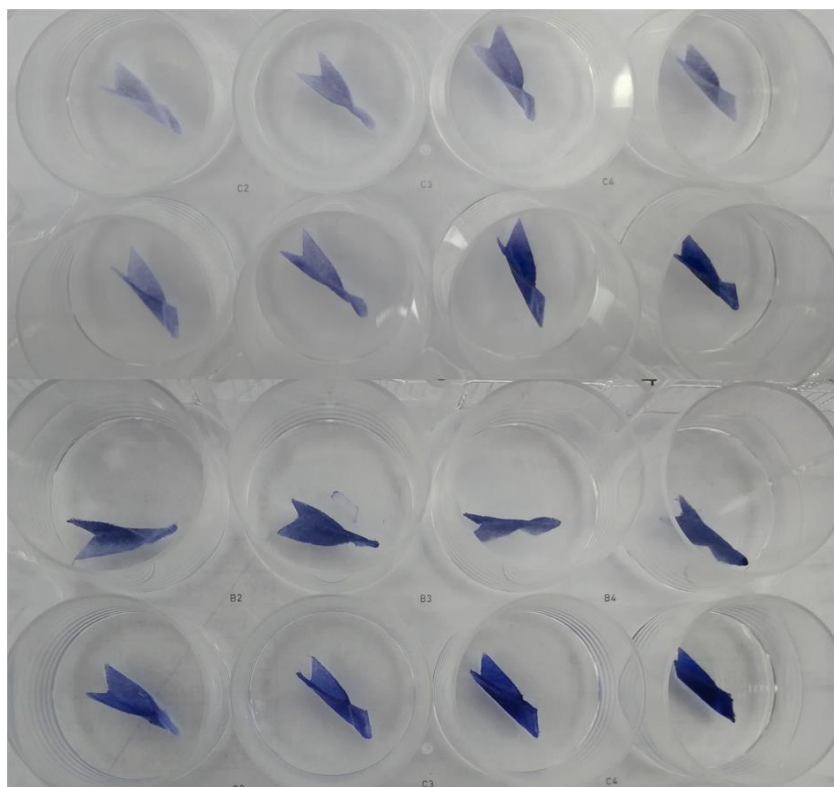
Cells/carrier 5k 10k 20k 33k

Day 4

Day 6

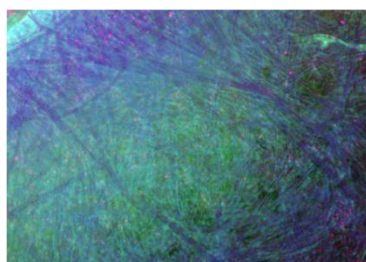
Day 7

Day 12

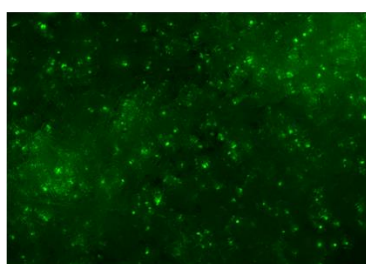


细胞收获前后载体染色

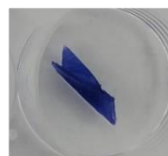
Harvesting (%)	80.3
Viability (%)	97.9



Before harvesting



After harvesting

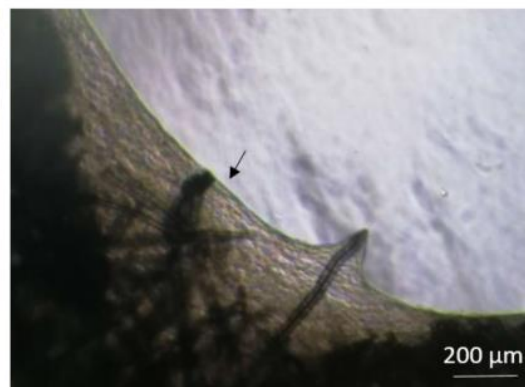
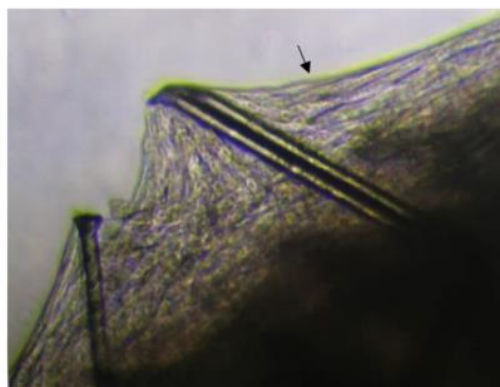
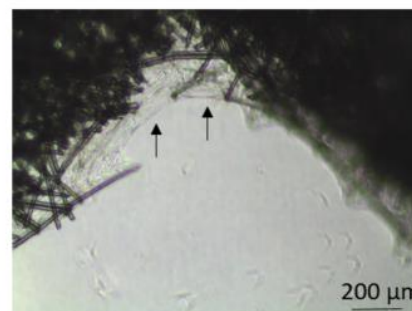
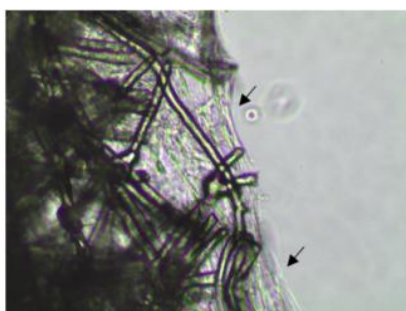
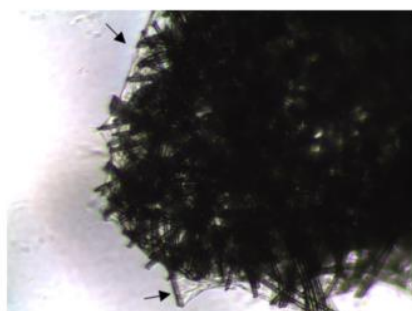


Before harvesting

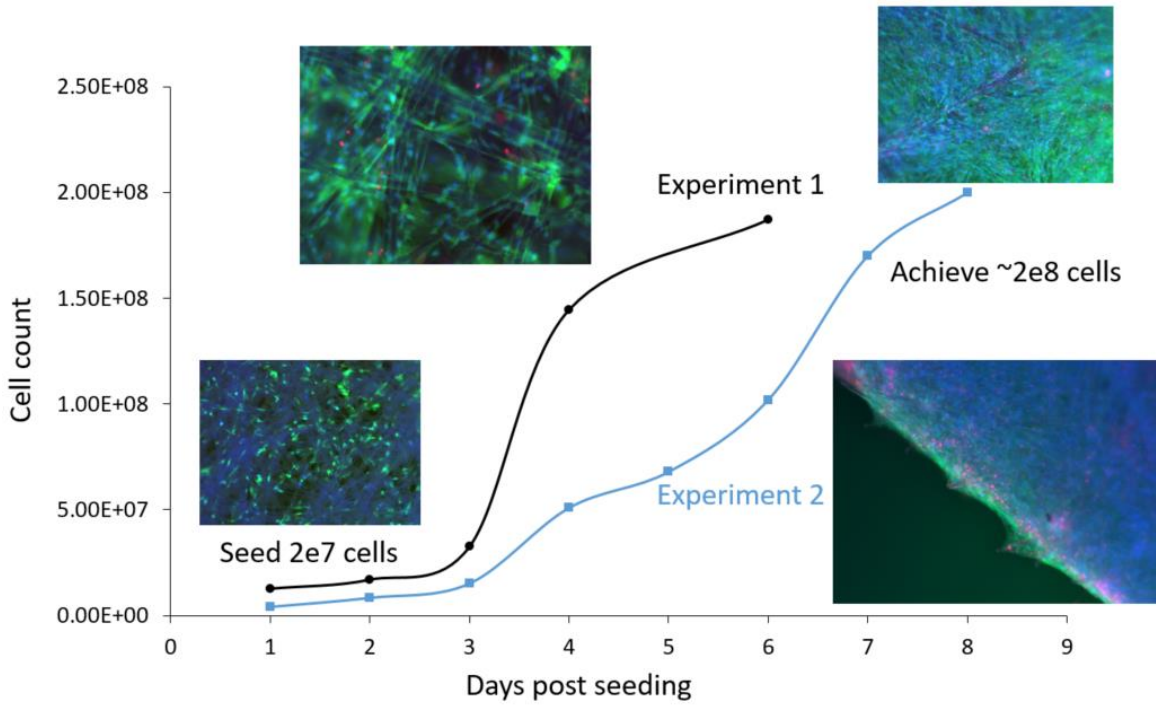


After harvesting

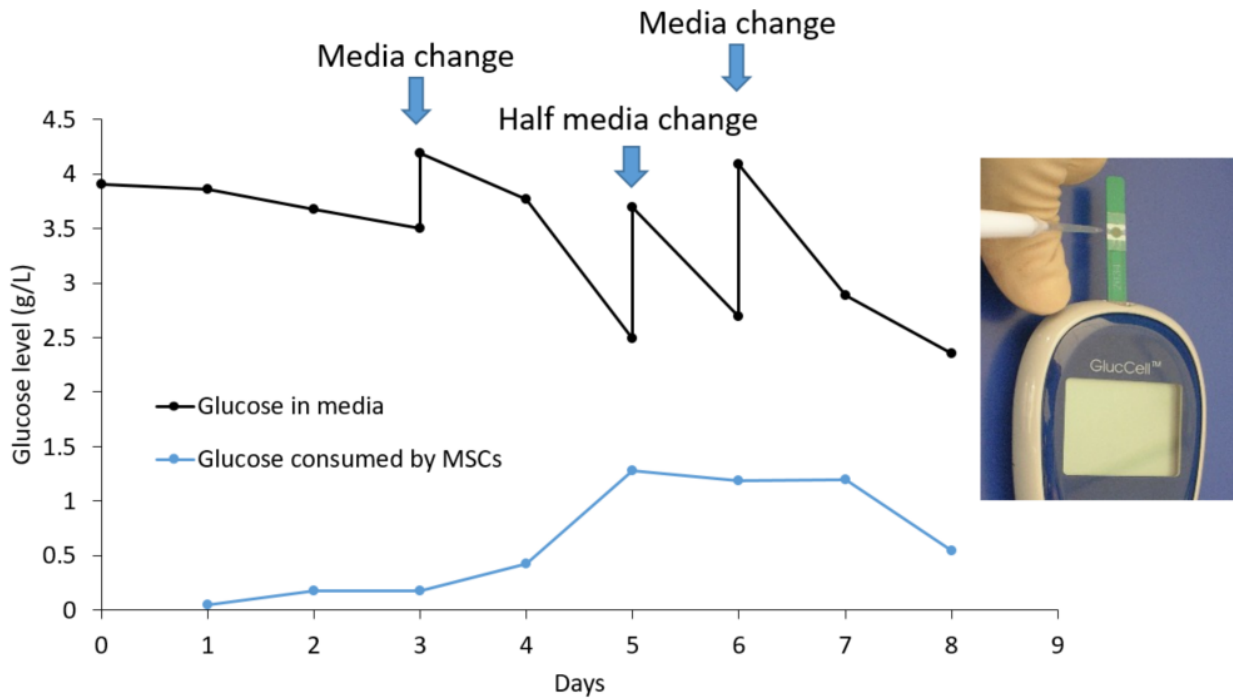
高汇合度的细胞



细胞增殖



葡萄糖消耗水平



pH 监控

