

# 3D StarPore™ 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™ 微载体是明胶成分柔性多孔结构设计，粒径大小在 150-300 μm 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。除此之外，微载体还有几大优点，一是多孔，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，孔隙率大于 90%。二是可以进行温和消化，专用裂解液 10 分钟内消化完成。三是显微镜可明场观察，方便跟踪细胞生长情况。四是更圆润、更均一、更高效，支持球转球扩大工艺。

3D StarPore™ 微载体可以实现球转球扩大培养，无需进行消化。放大培养时只需向原培养体系添加新球和新培养基即可，避免了微球消化再接种的步骤，可以获得更快的细胞扩增速度和更小的细胞损伤。

### 二、旋转瓶动态培养操作流程

#### 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（或血球计数板）等。

##### 1.2 试剂

本实验需要用到的试剂包括干细胞培养基、微载体、裂解液、葡萄糖检测仪（可选）、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。

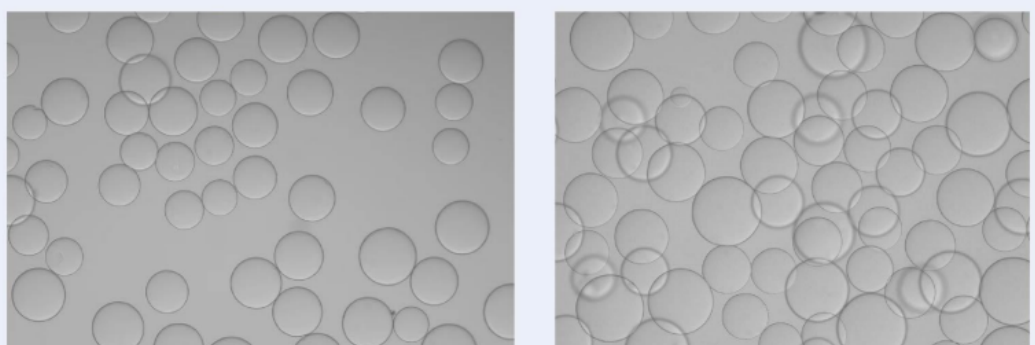
#### 2. 3D 细胞培养操作过程（以 200mg 微载体为例）

##### 2.1 微载体水合溶胀

取一瓶 200mg 微载体（已辐照灭菌），转移到 50ml 离心管中，加入 30ml 完全培养基，盖上盖子，并摇晃均匀。为了更好地进行水合溶胀微载体，建议提前一天加入溶解完全培养基，并 4℃ 过夜水合。

第二天，将充分水合后的微载体，摇晃或者颠倒混匀，静置 5-10min 后，吸去上清，注意不要吸到微载体。加入完全培养基，定容至 40ml，转移至 250ml 培养瓶，再用 10ml 完全培养基洗涤微载体瓶后转移到培养瓶。

水合后的微载体，见下二图。



水合后的微载体

## 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  $1 \times 10^7/200\text{mg}/100\text{ml}$  (微载体 2g/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 2 遍再进行接种。可过  $70 \mu\text{m}$  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,同时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 40rpm 搅拌 15min,静止 2h 一次;②搅拌 10min,静置 2h,重复以上循环 10 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 5rpm。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 50ml 完全培养基,搅拌速度调至 45rpm 进行恒速搅拌培养。

48-72h:搅拌速度调至 55rpm 进行恒速搅拌培养。72h 培养结束进行全量换液。可在 72 小时培养结束进行球转球操作,直接转至操作“2.10”。

72-96h:搅拌速度调至 60rpm 进行恒速搅拌培养(备选)。

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 40-75rpm 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,将反应器放置在培养箱内,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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。或者进行下一步的球转球操作。

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。

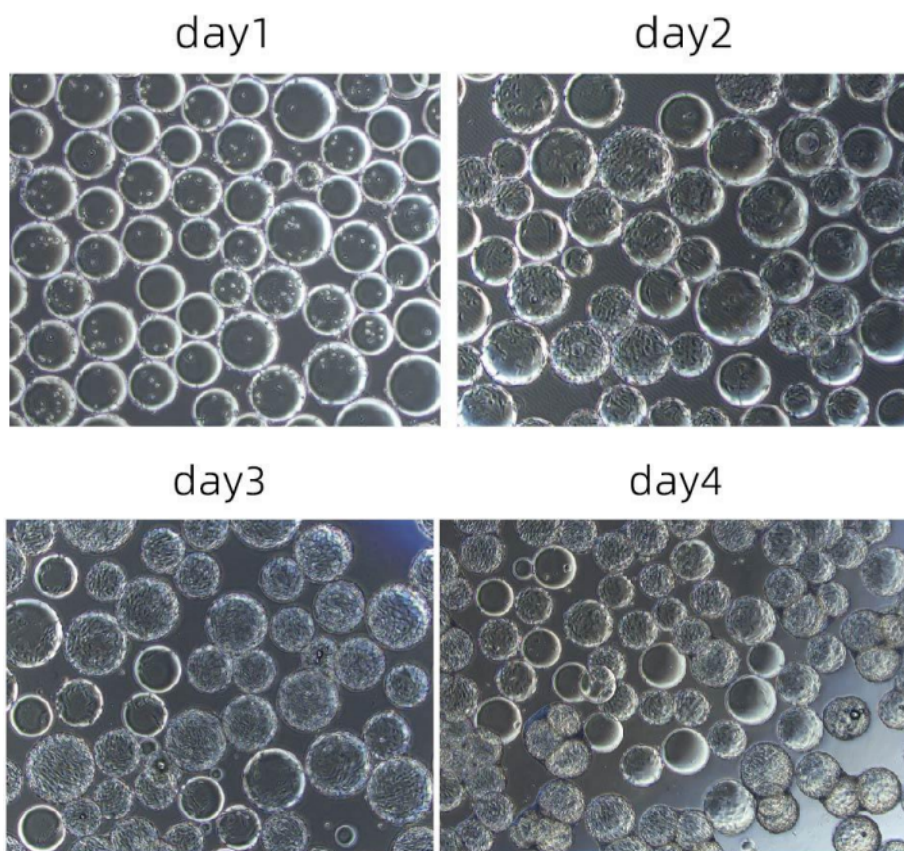
### ③取样计数

从培养瓶中均匀取出 1-10ml 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，通过明场显微镜可以直观地观察、反映细胞的活性和数量。

明场下，脐带间充质干细胞/微载体在培养第 1-4 天，细胞在微载体上的生长情况，见下示意图（4X）：



## 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 96 孔板每孔 100  $\mu$ L 或者 24 孔板每孔 200  $\mu$ L 的比例进行染色操作。

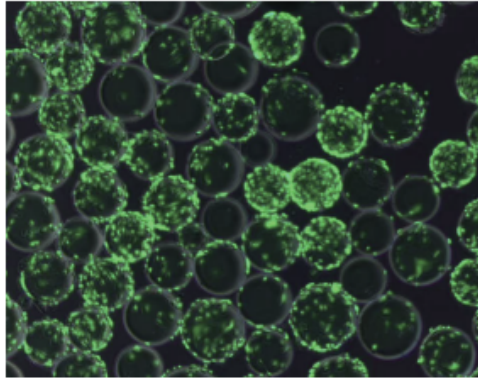
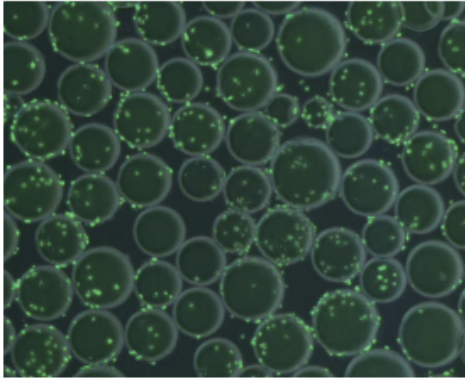
荧光下，脐带间充质干细胞/微载体在培养第 1-4 天，细胞在微载体上的荧光情况，见

下示意图（4X）：

采用 Calcein-AM/PI 染色：

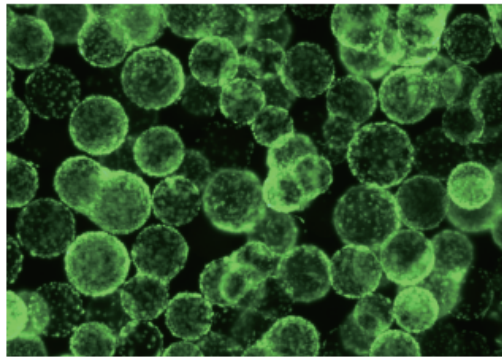
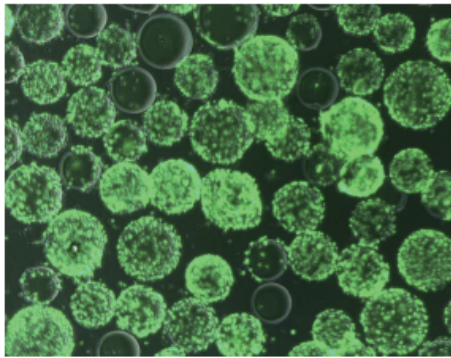
day 1

day 2



day 3

day 4



## 2.10 微载体球转球扩大培养操作说明

### ①球转球时间点选择：

微载体细胞融合度达到 80%以上，可以选择 72h $\pm$ 2h；或者 96h $\pm$ 2h。具体根据细胞类型和培养需求而定。

### ②球转球操作：

取原微载体悬浮液 30ml，加入 70ml 预热的含有 160mg 新微载体（提前水合溶胀）的新鲜培养基，60 rpm 旋转 15min，停 2h；再 60 rpm 旋转 10min，停 2 小时，重复 10 次。共计 24h。

24h 后，补充预热的新鲜培养基 50ml。

24-48h，65rpm 恒速搅拌培养；48h 培养结束，静置 5-10 分钟，半量换液；

48-72h，70rpm 恒速搅拌培养；72h 培养结束，静置 5-10 分钟，半量换液；或培养结束，细胞收获。

72-96h，75rpm 恒速搅拌培养；培养结束，细胞收获。

或者按需求等比例放大，进行球转球操作和细胞收获。

## 3. 裂解计数与细胞收获说明

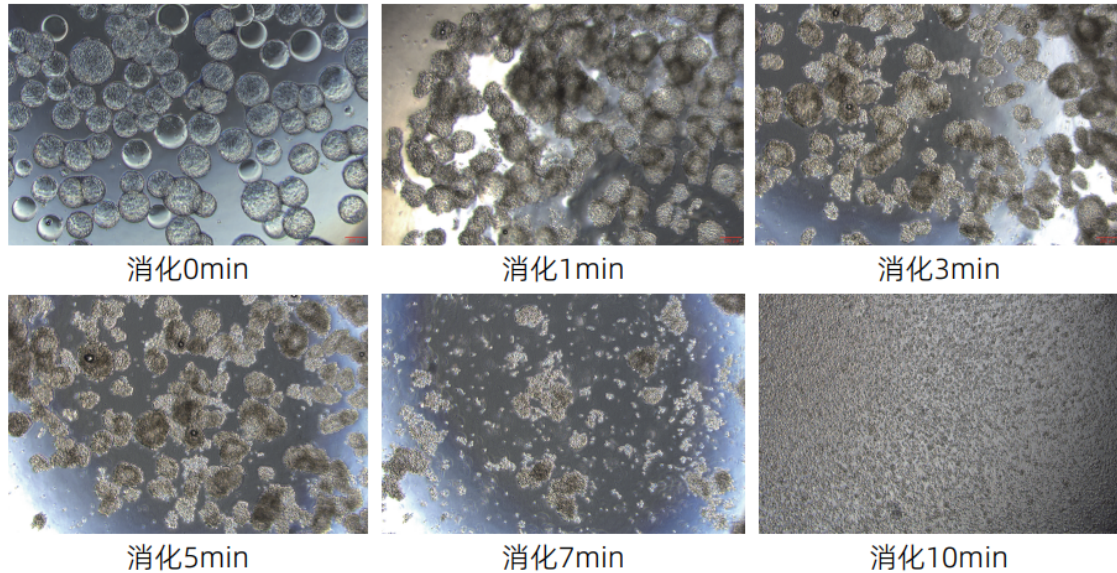
### 3.1 裂解液使用方法

在反应器上取样（需将反应器主机拿至生物安全柜中），或者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。

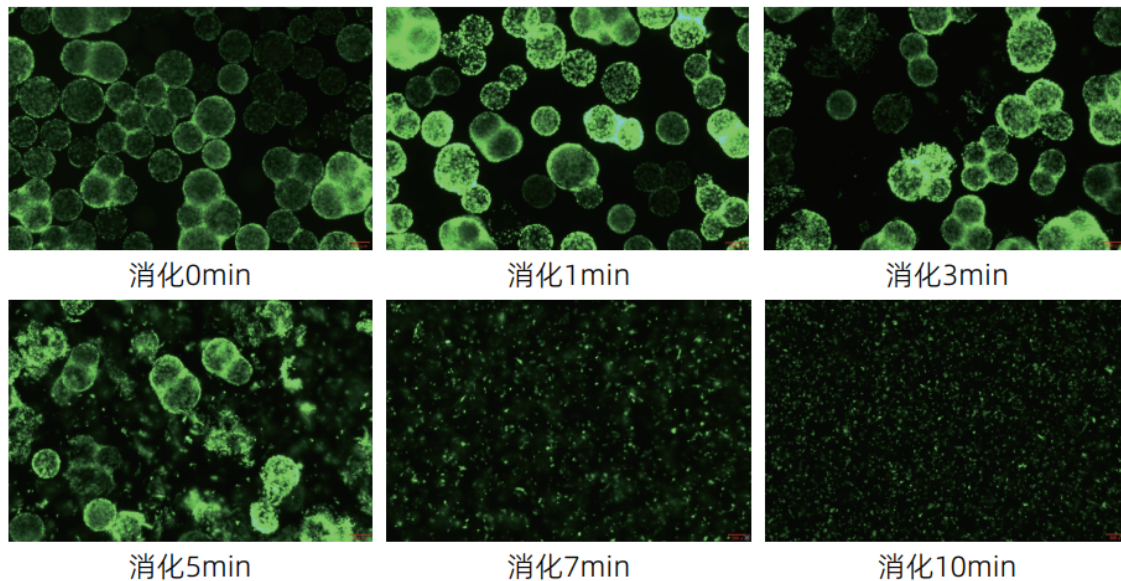
取微载体悬浮样品，每个样品 2-10ml（若取样操作没问题，可以只取一个样），静置 5-10 分钟，去上清，至少 2 倍体积的 DPBS 清洗一次，静置后去上清，每个样品加入微载体等

体积裂解液（华辰生物 3D StarPore 专用裂解液），混匀，室温裂解 10min，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。

明场下，脐带间充质干细胞/微载体在培养第 4 天，微载体的裂解情况，见下示意图(4X)：



荧光下，脐带间充质干细胞/微载体在培养第 4 天，微载体的裂解情况，见下示意图(4X)：



### 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 洗涤两次，加入微载体等量体积的裂解液。放置进行裂解，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 分钟左右观察微载体全部裂解，加入等量完全培养基，终止消化收集细胞悬液，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。