

## CelCradle™ 干细胞培养操作手册

### 内容

材料 .....	2
方法 .....	3
载体包被(推荐) .....	3
接种准备 .....	3
接种 .....	3
培养扩增 .....	4
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
细胞收集技巧 .....	5
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 (结果) .....	8
活细胞染色 .....	8
苏木精染色 (不同培养时间) .....	9
高汇合度的细胞 .....	10
细胞增殖 .....	10
葡萄糖消耗水平 .....	11
pH 监控 .....	11

## 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) 或其他培养基类型
- CelCradle 平台 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell) 或 CelCradle™ 500AP
- Celfeeder 泵 / 其他蠕动泵
- 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(推荐)

- 取一个 CelCradle 500A 培养瓶至生物安全柜中
- 用纤连蛋白或细胞促贴壁试剂(BI, 05-752-1)包被载体, 37 °C 静置 30 分钟
- 吸除包被液
- 用 250 ml PBS 缓冲液润洗载体 (如果需要)
- 继续接种步骤

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™ 500A 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)。
- 将细胞培养液与载体混合。
- 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。
- 旋转培养瓶使细胞均匀分布在载体上。
- 将培养瓶倒置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中。
- 孵育 2-4 h, 每隔 30 分钟轻轻旋转培养瓶, 让细胞充分附着。
- 孵育 3 h 后, 从培养瓶中取出 10ml 培养液, 对溶液中未贴附的细胞 (悬浮细胞) 进行计数。
- 离心收集未贴附的细胞, 然后重悬细胞回算贴附率。
- 每隔 1 h, 重复 7-8 步骤, 监测贴附率。
- 当贴附率超过 90% 以上, 停止监测。

注意: MSCs 孵育 2 h, 贴附率就达到 90% 以上, 孵育 3 h 细胞贴附率高达 98%, 建议孵育时间不超过 3 h。

贴附时间 (h)	1	2	2.5-3
MSC 贴附率	90	95	>98

## 培养扩增

1. 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载体的1 L 灌流瓶(取决于培养基用量和细胞培养时间)
- b. 将装有载体的灌流瓶与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)

## 细胞增殖监控 (参见附录A)

每天监测剩余葡萄糖含量和 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。

我们建议每天检查葡萄糖、细胞染色和细胞计数，或在进行初步试验时每隔一天检查一次。

- a. 取 2 ml 培养液：pH 和葡萄糖检测
- b. 取 1 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 2 片载体：用胰蛋白酶消化收集细胞，并对活细胞进行计数 (参考细胞收集操作步骤)
- d. 更换新鲜培养液：
  - a. 葡萄糖浓度 < 1 g/L——可补充葡萄糖，使葡萄糖保持在 1.5-2 g/l，以确保足够的供给
  - b. pH < 7.00
  - c. 或每 2-3 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，不要像所有的 MSCs 那样过度培养细胞)

小贴士：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，细胞将会显示为健康的网状结构 (附录 B)。

## 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预热的消化液，盖上白色密闭盖。

5. 上下翻转培养瓶使载体与消化液充分混合，将培养瓶倒置于37°C二氧化碳培养箱中孵育15-30分钟。
6. 弃消化液。
7. 将0.1%胰蛋白酶抑制剂（或10%血清）加入至100 ml新鲜培养基中。
8. 将这100 ml培养基加入至培养瓶中，盖上白色密闭盖。
9. 使用以下两种方法中的一种或两种方法来洗脱细胞：
  - a. 方法一：
    - i. 用手轻轻拍打瓶身3分钟。拍打过程中旋转瓶身。
    - ii. 倒转培养瓶。旋转洗脱载体上的细胞。
    - iii. 轻敲瓶子。旋转到下一个角度之前，每个角度都要轻拍20-30次。
    - iv. 旋转并拍击每个角3次。
    - v. 将含有细胞的溶液倒入离心管中。
    - vi. 向培养瓶中加入100 ml完全培养基。
    - vii. 重复敲瓶并收集细胞（i - vi）的步骤。清洗4-5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：2.5 min，转速 400 rpm
10. 离心收集所有细胞，检测细胞浓度和活力。
11. 取载体样品检测细胞收获效率。

## 细胞收集技巧

在初始步骤中，用PBS洗涤这一步骤是很重要的，确保所有血清和非活细胞被洗掉。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。这一步骤可以通过首先去除不存活的细胞来提高收获的存活率。如果存活率可以接受，可以在第二轮实验时直接收集细胞。

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。

当细胞在3D BioNOC™ II载体上产生胶原和ECM时，解离酶（如中性蛋白酶和胶原酶）可以更有效地收集干细胞。

## 附录 A

### 细胞染色

#### 活细胞荧光染色

1. 从 CelCradle 中无菌取样 1-2 片 BioNOC™ II 载体，并转移到 24 孔板
2. 向孔板中加入 500  $\mu$ l 培养基。在培养基中按以下最终浓度添加染料：1  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher, H3570)、1  $\mu$ M 荧光素二乙酸酯 (FDA, Thermo Fisher, C34852) 和 1  $\mu$ g/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% CO<sub>2</sub>) 中孵育载体 30 分钟，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，然后用 99.5% 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 H&E 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，如台盼蓝。

使用荧光染料染色，以便更好地观察采集后遗留在载体上的细胞。避免使用有色染料。

### 细胞小规模扩增培养日常监控

#### 酶消化法

酶消化试剂：Accumax，胰蛋白酶 0.25%，重组胰蛋白酶，胶原酶

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. 重复步骤 2 四次。
4. 酶解：
  - i. 胰蛋白酶/重组胰蛋白酶：(大多数细胞类型)
    - 加 1 ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA，37°C 孵育 10-15 min。加 1 ml 中和液。
  - ii. 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，您也可以使用首选的解离试剂/方法。
  - iii. 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 CaCl<sub>2</sub> 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)。

## CelCradle™ 操作手册 (MSCs)

5. 用手指/金属棒轻拍离心管 10-20 次。
6. 将溶液转移到 15 ml 收集管中。
7. 加 1 ml PBS，并上下翻转收集管几次，以均匀冲洗载体。重复步骤 5 和 6。
8. 重复步骤 7 至少三次（用 PBS 收集 4 次）。
9. 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。

**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 毫升培养基，用 GlucCell 仪测量葡萄糖含量。
2. 在 T<sub>N</sub> (Glucose T<sub>N</sub>) 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 T<sub>0</sub>) 作为基线。
4. 葡萄糖消耗量:  $\text{Glucose T}_0 - \text{Glucose T}_N$

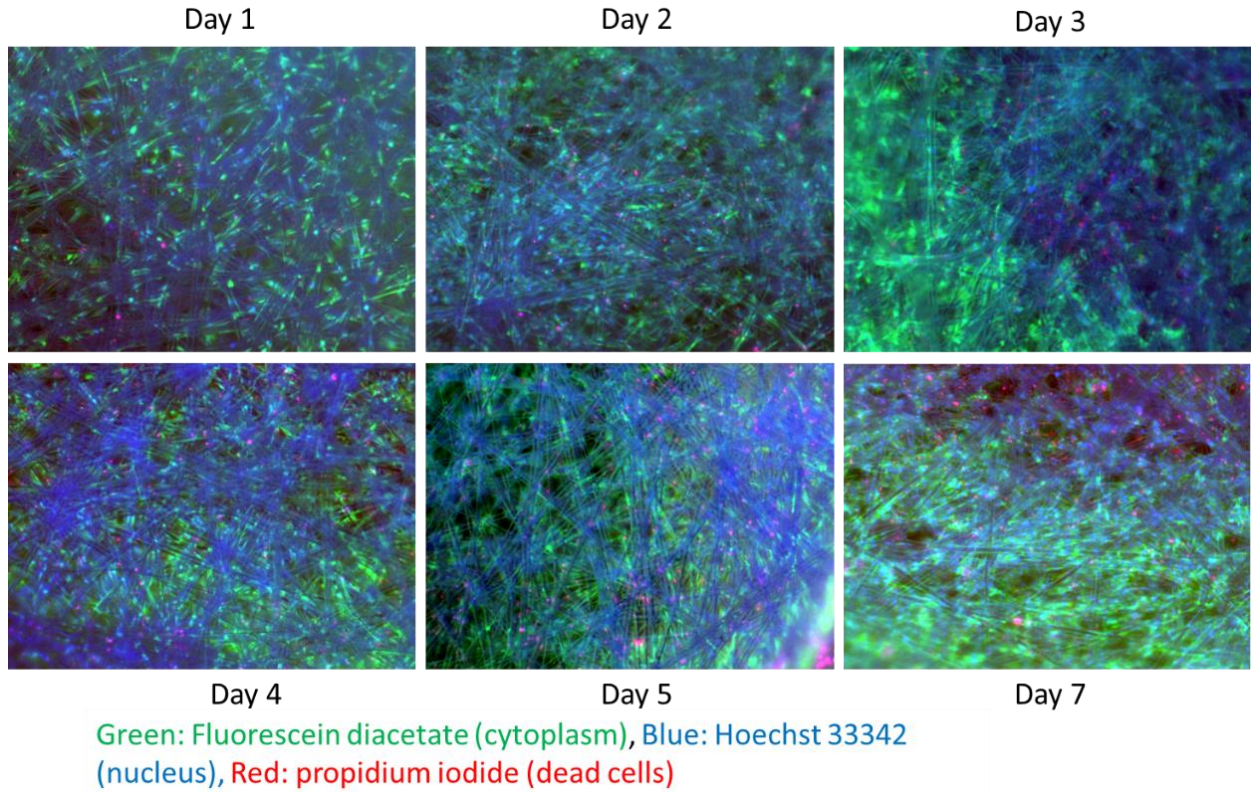
**pH 监控**

1. 从 CelCradle 中取出 2 毫升培养基，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。

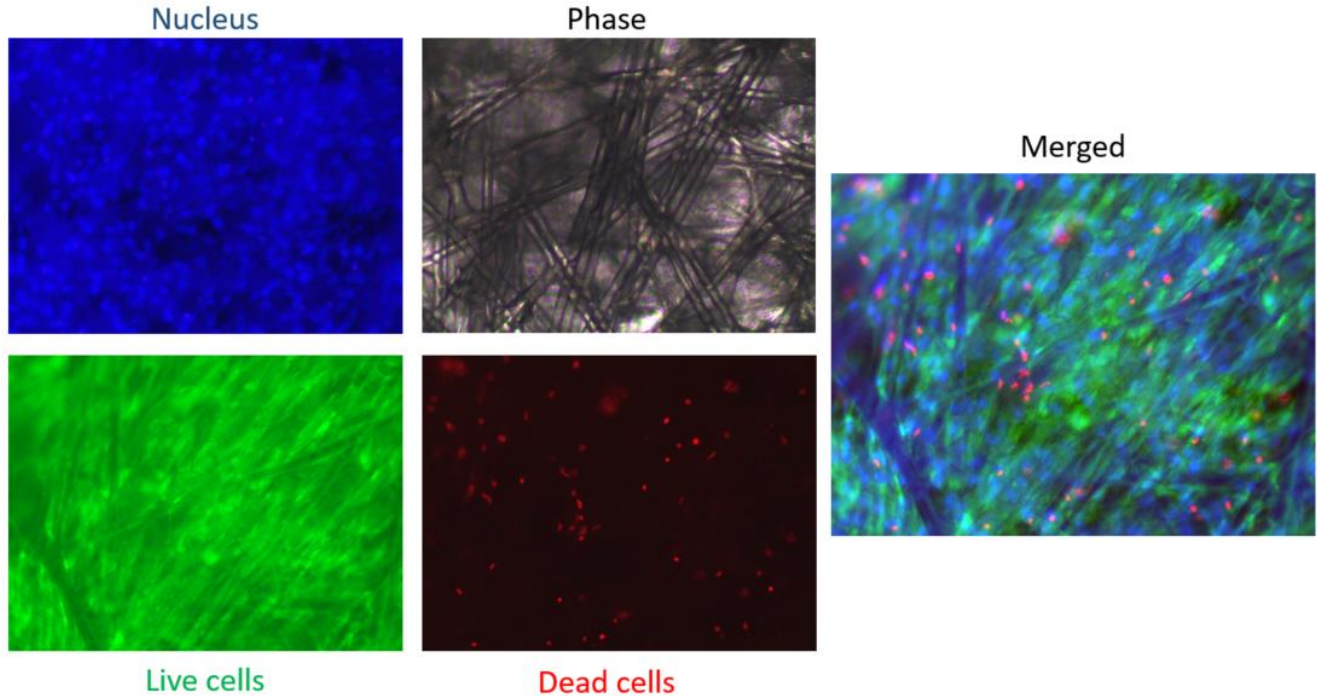


## 附录 B (结果)

### 活细胞染色

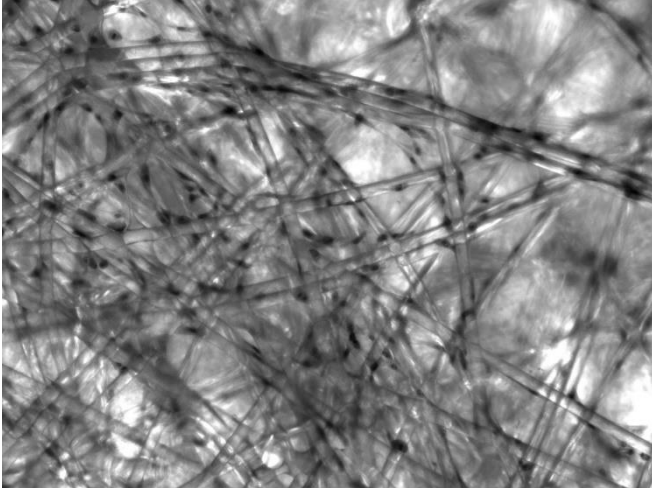




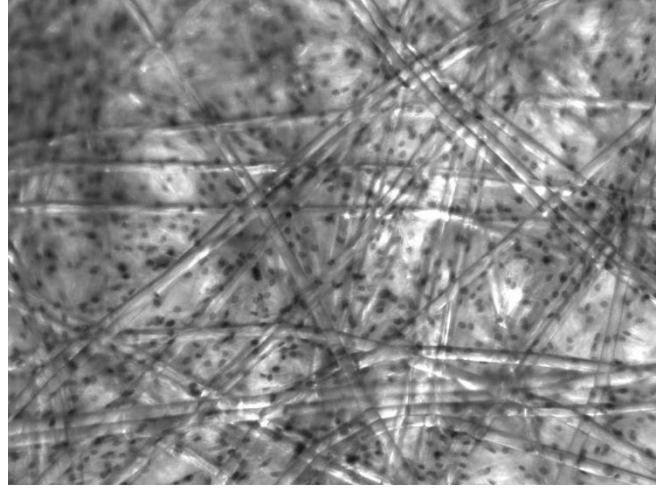


### 苏木精染色 (不同培养时间)

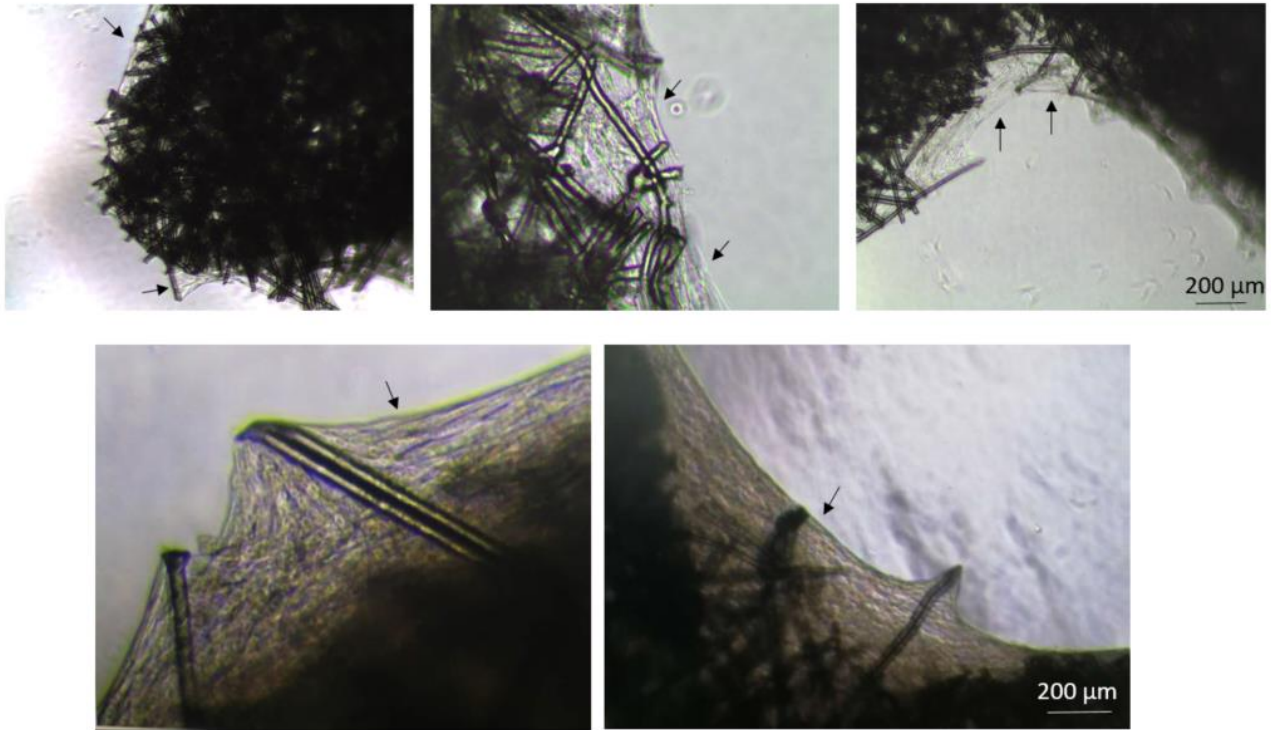
Day 1



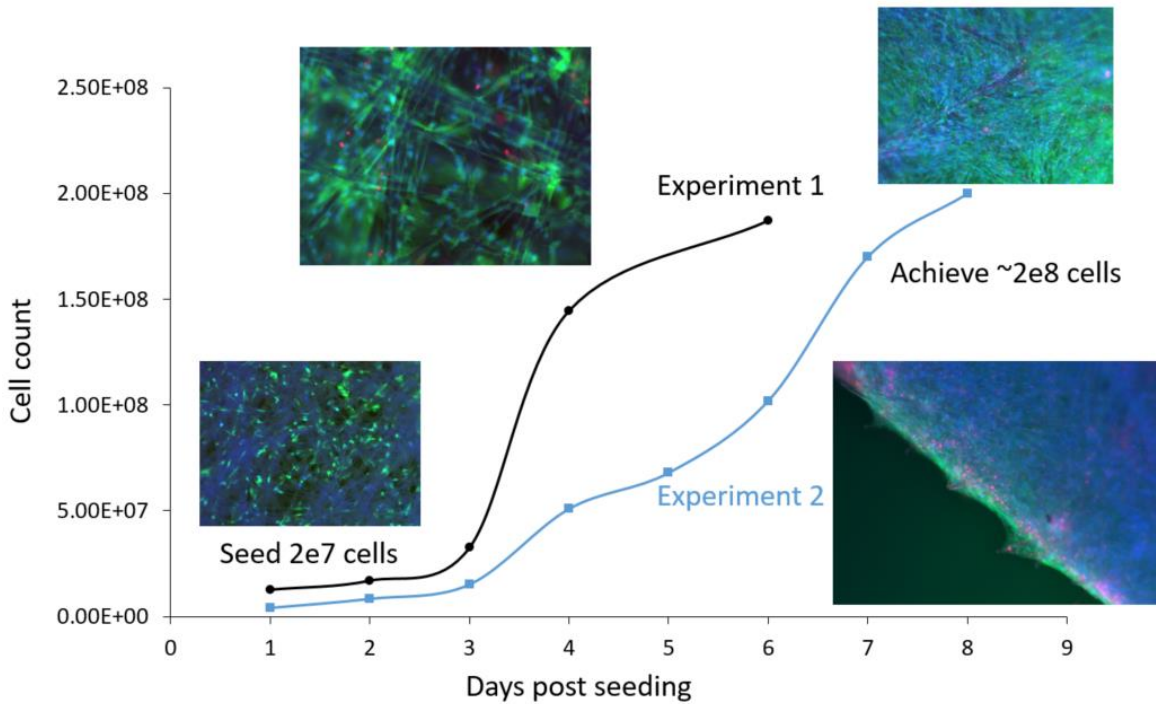
Day 3



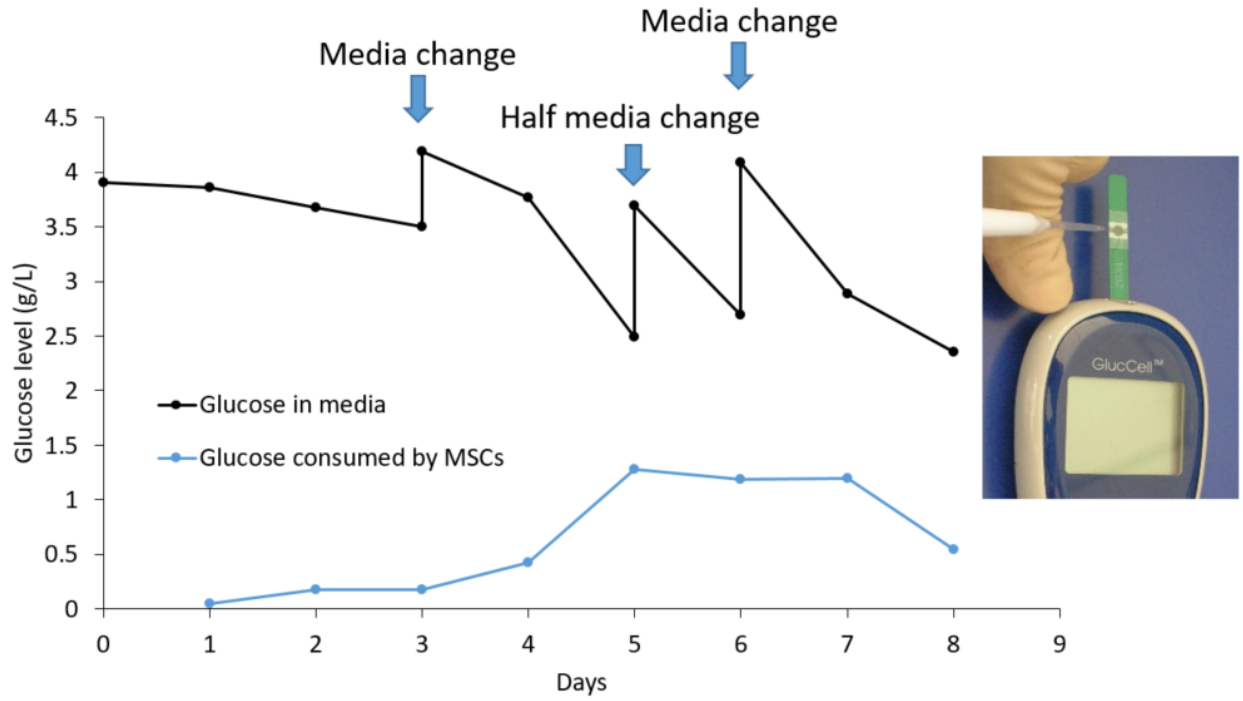
高汇合度的细胞



细胞增殖



**葡萄糖消耗水平**



**pH 监控**

