

CytoNiche
华 | 鑫 | 生 | 物

Technical Manual 技术手册

TM017

3D TableTrix[®]
微载体 W 小体系培养
使用手册
——间充质干细胞培养



3D TableTrix®微载体 W 小体系培养使用手册 ——
间充质干细胞培养

若有任何技术问题，请联系技术支持：
techsupp@cytoniche.com
400-012 6688

目 录

1. 序言	2
2. 产品描述	2
3. 实验物料及仪器设备	3
4. 6孔板静态培养操作流程	4
5. 6孔板动态培养操作流程	6
6. 旋转瓶动态培养操作流程	8
7. 细胞观察操作流程	10
8. 微载体裂解操作流程	11
9. 常见问题	13
10. 文件修订记录	14



1. 序言

本手册的目的是提供 3D TableTrix® 微载片小体系培养间充质干细胞(MSCs)的操作方法，为早期筛选和评估不同组织来源和供着来源的干细胞与 3D TableTrix®微载片（微载体）的相容性提供可行性和细胞培养工艺研究。3D TableTrix®微载片（微载体）是北京华鑫生物科技有限公司全球首创的专利产品，由明胶组成提供了天然的细胞黏附位点，避免了额外引入化学物质进行表面修饰。3D TableTrix®微载片（微载体）为全球首个拥有中美双向药用辅料资质的细胞用微载体（DMF:#35481, CDE: F20200000496,F20210000003）。3D FloTrix®细胞培养工艺是一套基于 3D TableTrix®微载片的细胞培养方法，包括一步接种、连续扩增、温和收获等相关细胞培养技术。

2. 产品描述

华鑫生物提供不同标准规格、型号以及级别的 3D TableTrix® 微载片（微载体），请参考表 1，其中 W 系列微载体适用于间充质干细胞培养。对于早期研发阶段，选择小规格的科研级片剂形式的微载片产品将有便于小体系培养的操作。大规格的生产级产品采用封闭系统包装，适用于生物反应器的放大培养，其使用方式和工艺建议参数不在本手册讨论范围。无论是科研级或生产级 3D TableTrix® 微载片（微载体）均适用于实验研究或进一步生产使用，不可直接用于临床。

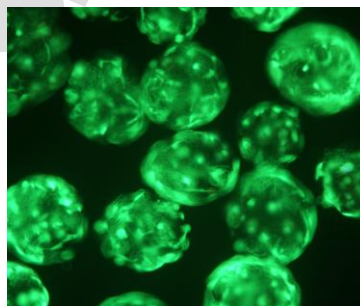
3D TableTrix®微载片是微载体的创新产品形式，每片微载片都是由数万颗弹性三维多孔微载体聚集而成，并会在遇水重新分散成单个微载体，其中无任何额外添加剂，因此不会引入其他物质。微载片的每一片都是重量明确的，且已灭菌，可即开即用；这种创新的微载体片剂形式免去了称量、灭菌等传统微载体所需的繁琐操作，让小体系培养和前期探索性实验更加方便。除此之外，微载片（微载体）还有两大特点，一是多孔，另一个是可降解。多孔的微球如蜂巢般提供细胞立体生长的仿生环境，同时也给细胞充足的生长空间，其>90%的孔隙率更是确保营养成分的充分交换。可降解的特性更是使得 3D TableTrix®微载片（微载体）在细胞传代和收获时显现出独特的优势，通过采用 3D FloTrix® Digest 针对性地将微载体降解成可溶于水中的多肽片段，可将细胞从微载体上完全释放，高效的收获细胞。

3D TableTrix® 微载片（微载体）



*实际产品以实物为准

细胞在微载体上（荧光染色）



微载体裂解过程

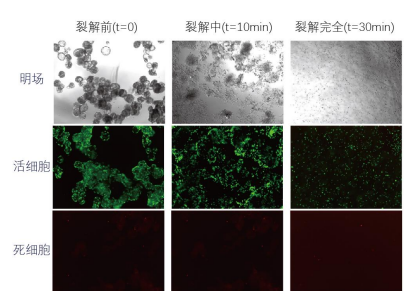


表 1. 3D TableTrix®微载体产品信息

产品名称	适用细胞类型	型号前缀	产品包装
3D TableTrix® 微载片 W (细胞型)	间充质干细胞、贴壁细胞	W01	无菌片剂 (20mg/片) 或 无菌粉末
3D TableTrix® 微载片 W (分泌型)	间充质干细胞、贴壁细胞	W02	无菌片剂 (20mg/片) 或 无菌粉末
3D TableTrix® 微载片 G	HEK293T、贴壁细胞	G02	无菌片剂 (20mg/片) 或 无菌粉末
3D TableTrix® 微载体 V (疫苗用)	VERO、MDCK、MARC-145、贴壁动物细胞、人二倍体细胞等	V01	粉末 (非无菌)

3. 实验材料及仪器设备

3.1. 所需仪器设备及试剂

- 3D TableTrix®微载片 (微载体) W (i.e. W01, W02)
- 3D FloTrix® Digest 裂解冻干粉 (i.e. R001-500)
- MSC 细胞培养基 (e.g. RMZ112 3D FloTrix®间充质干细胞无血清培养基, RMZ99S 添加剂)
- 胰酶 (用于消化 2D 培养细胞种子)
- PBS 缓冲液
- 含钙离子缓冲液 (i.e. HANKS 缓冲液、细胞培养基)
- 台盼蓝 (细胞活性染色、非必需)
- 细胞活死荧光染液 (e.g. R002-100 或其他 Calcein AM/PI 染液)
- 96 孔板 (细胞染色用)
- 非 TC 6 孔板 (用于静态培养)
- 无菌移液器枪头 (200μL, 1mL)
- 无菌一次性移液管 (1mL, 5mL, 10mL)
- 移液器 (200μL, 1mL)
- 电动移液管控制器
- 3D FloTrix® microSPIN 3D 搅拌式细胞培养板 (i.e. R013-05-01, 用于 6 孔板动态培养)
- 125mL 透气内置叶轮培养瓶 (i.e. SF125) 或 125mL 透气内置叶轮一次性反应瓶 (i.e. R009-05-01, 用于动态培养)
- 3D FloTrix® microSPIN 6 通道微型生物反应器 (i.e. FTUS1601, 用于 6 孔板动态培养)
- 3D FloTrix® miniSPIN 生物反应器 (i.e. FTMS1-4, FTMS2-4, FTMS4-4, FTMS-1, 用于动态培养)
- 细胞培养箱 (37°C, 5% CO₂)



- 生物安全柜
- 低速离心机
- 细胞计数仪（或血球计数板）
- 荧光显微镜
- 平头镊子（无菌、非必需）
- 小剪子（无菌，非必需）

4. 6 孔板静态培养操作流程

6 孔板静态培养是一种简单方便地、利用常规实验室仪器设备和耗材就能完成的微载体测试方法，可以检测细胞是否可以有效贴附于微载体表面，以及是否有生长的潜力。由于是静态培养以及属于高密度培养，需要更经常更换培养基以保证物质传输，在某些时候，细胞增殖效率还可能不及动态培养，因此仅做为细胞与微载体兼容性筛选。当细胞增殖不理想时，可能是该细胞无法有效贴附于 W 微载体上，或培养基无法支持细胞在 3D 结构上生长，可考虑更换细胞株（不同患者来源的细胞种子）或培养基。

4.1. 微载片、孔板及细胞准备

4.1.1 生物安全柜进行常规紫外灭菌。以下操作均需无菌条件下进行。

4.1.2 准备微载片：每一个非 TC 6 孔板的孔中倒入或夹入一片微载片或 20mg 微载体，盖上孔板盖子待用，可使用平头镊子辅助夹取微载片。

△ 储存时或接种细胞前，切忌使微载片与任何液体或者水汽接触，以防微载片变质。

4.1.3 计算所需细胞数及细胞悬液体积，推荐接种浓度为 1.0×10^6 个细胞/mL，每片微载片需准备 500 μ L 细胞悬液，即每一片微载片接种数量为 5×10^5 个细胞。

No. of Wells	Microcarrier Tablet/Well	Seeding density /mL	Seeding volume/well (mL)	Total number of cells
6	× 1	× 1.0×10^6	× 0.5	= 3.0×10^6

No. of Wells	Seeding volume/well (mL)	Total volume (mL)
6	× 0.5	= 3.0

△ 该细胞密度为间充质干细胞培养的推荐参考值，用户可根据实验需求和所使用的细胞进行相应调整。

△ 可以根据细胞在二维增殖的情况调整接种密度。若增殖较快（3 天约增殖 10 倍以上），建议使用较低接种密度，即 0.5 至 1.0×10^6 个细胞/mL；若增殖较慢（3 天约增殖 5 倍以下），建议使用较高接种密度，即 1.5 至 2.0×10^6 个细胞/mL。



4.1.4 准备细胞：根据常规操作，将细胞从培养皿或培养瓶中消化，离心去除胰酶后，用完全培养基重悬至所需浓度。

△ 胰酶必须去除充分，否则存在接种后逐渐将微载体溶解。

△ 细胞应该为单悬状态，尽量确保无细胞团块或聚集，否则接种可能不均匀。

4.2. 细胞接种及培养

4.2.1 接种细胞：将上述细胞悬液混匀，吸取 500 μ L 后均匀滴加于微载片上；细胞悬液全部浸入微载片需约 10-20 秒。


△ 滴加细胞悬液时，可分 6-8 次滴加于微载片正反两面以达到均匀滴加效果。完全吸收后微载体片应膨胀分散。

△ 若使用的细胞需要基质辅助贴壁，可尝试直接将所需基质混入细胞悬液中，再滴加于微载片上。

4.2.2 补液：使用移液管沿着孔壁加入 2 mL 完全培养基。添加培养基时应当避免培养基直接冲刷微载体。添加培养基后可用移液管轻轻搅动微载体，使其均匀分布。

△ 切忌用移液管或移液器吹打微载体，剧烈吹打会导致细胞脱落。可使用巴氏滴管替代移液管。

4.2.3 培养：补加培养基后，放入细胞培养箱中培养。

 **数据记录：2h 时，取 200 μ L 微载体细胞悬液，进行细胞荧光染色，记录 2h 贴壁观察数据。操作参考步骤 4.3。**

4.2.4 补液：16-24 小时后，每孔补充至 8mL 培养基。

△ 可按照细胞代谢能力、倍增时间、换液频率等因素调整所添加的培养基体积。

4.2.5 换液：按照培养需求进行换液时，应待微载体全部沉降于孔底后，小心弃除培养基，避免微载体损失，再加入新鲜培养基。


△ 一般情况下，推荐 72h 至少要进行>80%的换液。若细胞代谢能力较强，应适当调整换液补液频率。

4.3. 细胞观察

4.3.1 取样：将微载体和培养基吹打混匀后，吸取少量（建议 25 - 50 μ L）微载体和培养基的混合液（微载体悬液）于 96 孔板中或离心管中。

△ 使用移液枪时，避免微载体吸取过程中吸取不畅通或剪切力过大，影响细胞活性。

4.3.2 染色观察：请参考第 10 页 7.细胞观察操作流程。

 **数据记录：当对一种细胞或者一种培养基进行第一次的微载体培养时，进行细胞接种后 2h（即步骤 4.2.3）、24h、72h、96h 进行取样染色，记录细胞染色结果。**


4.4. 细胞收获及计数

4.4.1 裂解微载体：将非 TC6 孔板孔中所有液体和微载体吸出，加入到 15mL 离心管中，若孔内仍有残留微载体，用完全培养基或 PBS 冲洗，并将冲洗液一同加入到离心管中，静置，待微载体沉降后，弃除上清，将微载体完全裂解（请参考第 11 页 8.微载体裂解操作流程）。

4.4.2 收集细胞：待微载体全部裂解后，收集细胞悬液，离心 1000-1500 rpm，5 min。



4.4.3 洗涤和重悬：弃上清，加入等量 PBS 重悬细胞，再次离心 1000-1500 rpm，5 min；重复一次后弃上清，将细胞重悬至适当浓度用于后续实验。

 **数据记录：当对一种细胞或者一种培养基进行第一次的微载体培养时，应该在细胞接种后 24h、72h、96h 分别取 1-2 个孔进行细胞收获后计数，记录细胞计数结果。**

5. 6 孔板动态培养操作流程

6 孔板动态培养是一种简单方便地、高效节约地进行动态的细胞培养。使用 3D FloTrix® microSPIN 3D 搅拌式细胞培养板以及 3D FloTrix® microSPIN 6 通道微型生物反应器可以快速筛选、优化细胞、微载体或培养基以及培养工艺，为后续采用搅拌式反应器的放大培养工艺进行可行性研究。动态培养可以更好的保证体系中营养物质的混匀，理论上能获得更好的细胞培养效果。但有些细胞对剪切力较为敏感，或者与微载体的贴附能力偏弱时，可能进行搅拌式反应器培养效果不佳。因此使用 6 孔板动态培养是衔接 6 孔板静态培养和动态搅拌式反应器培养的一种培养体系，可以更容易地评估动态培养工艺的可行性。当动态培养效果不佳时，可通过调整接种密度、搅拌转速、搅拌模式等参数进行优化。

5.1. 微载片、孔板及细胞准备

5.1.1 生物安全柜进行常规紫外灭菌。以下操作均需无菌条件下进行。

5.1.2 准备孔板：准备 1 个 3D 搅拌式细胞培养板及 1 个无菌的普通 6 孔板：在生物安全柜中打开，将 3D 搅拌式细胞培养板带搅拌桨的盖子垂直提起后，转移放入事先准备好的无菌普通 6 孔板中暂存。后续对 3D 搅拌式细胞培养板的操作均采用此方式打开和暂存带搅拌桨的盖子。

5.1.3 准备微载片：每一个 3D 搅拌式细胞培养板的孔中倒入或夹入一片微载片或 20mg 微载体，盖上不带搅拌桨的普通 6 孔板盖子待用，可使用平头镊子辅助夹取微载片。

△ 储存时或接种细胞前，切忌使微载片与任何液体或者水汽接触，以防微载片变质。

5.1.4 计算所需细胞数及细胞悬液体积，推荐接种浓度为 6.25×10^4 个细胞/mL，每片微载片需准备 8mL 细胞悬液，即每一片微载片接种数量为 5×10^5 个细胞。

No. of Wells	Microcarrier Tablet/Well	Seeding density /mL	Seeding volume/well (mL)	Total number of cells
6	x 1	x 6.25×10^4	x 8	= 3.0×10^6



No. of Wells	Seeding volume/well (mL)	Total volume (mL)
6	× 8	= 48

△ 该细胞密度为间充质干细胞培养的推荐参考值，用户可根据实验需求和所使用的细胞进行相应调整。

△ 可以根据细胞在二维增殖的情况调整接种密度。若增殖较快（3天约增殖10倍以上），建议使用较低接种密度，即 1.0 至 2.5×10^6 个细胞/mL；若增殖较慢（3天约增殖5倍以下），建议使用较高接种密度，即 3.0 至 5.0×10^6 个细胞/mL。

5.1.5 准备细胞：根据常规操作，将细胞从培养皿或培养瓶中消化，离心去除胰酶后，用完全培养基重悬至所需浓度。

△ 胰酶必须去除充分，否则存在接种后逐渐将微载体溶解。

△ 细胞应该为单悬状态，尽量确保无细胞团块或聚集，否则接种可能不均匀。

5.2. 细胞接种及培养

5.2.1 接种细胞：将上述细胞悬液混匀，取 8mL 加入每个有微载片或微载体的搅拌式细胞培养板的孔中，盖上带有搅拌桨的盖子。

5.2.2 细胞培养：将 3D 搅拌式细胞培养板放在事先已放入细胞培养箱中的 3D FloTrix® microSPIN 6 通道微型生物反应器主机限位支架上。在控制系统上设置搅拌参数：步骤 1：25 rpm, 5 min；步骤 2：0 rpm, 120 min，循环次数：12 次，完成后设定值：40 rpm。

5.2.3 换液：按照培养需求进行换液。换液时，注意打开和暂存搅拌式细胞培养板的方式应按步骤 5.1.2 方式进行。待微载体全部沉降于孔底后，小心弃除培养基，避免微载体损失，再加入新鲜培养基。


△ 一般情况下，推荐 72h 至少要进行 >80% 的换液。若细胞代谢能力较强，应适当调整换液补液频率。

5.3. 细胞观察

5.3.1 取样：将微载体和培养基吹打混匀后，吸取少量（建议 25 - 50μL）微载体和培养基的混合液（微载体悬液）于 96 孔板中或离心管中。

△ 使用移液枪时，避免微载体吸取过程中吸取不畅通或剪切力过大，影响细胞活性。

5.3.2 染色观察：请参考第 10 页 7. 细胞观察操作流程。

 **数据记录：当对一种细胞或者一种培养基进行第一次的微载体培养时，进行细胞接种后 2h、24h、72h、96h 进行取样染色，记录细胞染色结果。**


5.4. 细胞收获

5.4.1 裂解微载体：将孔中所有液体和微载体吸出，加入到 15mL 离心管中，若孔内仍有残留微载体，用完全培养基或 PBS 冲洗，并将冲洗液一同加入到离心管中，静置，待微载体沉降后，弃除上清，将微载体完全裂解（请参考第 11 页 8. 微载体裂解操作流程）。

5.4.2 收集细胞：待微载体全部裂解后，收集细胞悬液，离心 1000-1500 rpm, 5 min。



5.4.3 洗涤和重悬：弃上清，加入等量 PBS 重悬细胞，再次离心 1000-1500 rpm，5 min；重复一次后弃上清，将细胞重悬至适当浓度用于后续实验。

 **数据记录：当对一种细胞或者一种培养基进行第一次的微载体培养时，应该在细胞接种后 24h、72h、96h 分别取 1-2 个孔进行计数，记录细胞计数结果。**

6. 旋转瓶动态培养操作流程

旋转瓶培养是动态培养的一种常见模式。其培养体积根据所选用的旋转瓶大小有关，常见有 125mL、250mL 及 500mL (最大工作体积) 的旋转培养瓶。旋转瓶培养比使用 3D FloTrix® microSPIN 3D 搅拌式细胞培养板能够进行更大体积的培养，获得更多细胞以进行更多深入的细胞质量研究或者做为更大体系的育种培养。如 6 孔板动态培养一样，旋转瓶动态培养为后续采用搅拌式反应器的放大培养工艺进行可行性研究。当动态培养效果不佳时，可通过调整接种密度、搅拌转速、搅拌模式等参数进行优化。

以下实验推荐使用华鑫生物 3D FloTrix® miniSPIN 生物反应器 (i.e. FTMS1-4, FTMS2-4, FTMS4-4, FTMS-1) 配合 125mL 透气内置叶轮培养瓶 (SF125) 完成。选择其他容积的培养瓶时应该相应调整微载体数量、细胞数量和试剂用量等参数。

6.1. 3D FloTrix® miniSPIN 生物反应器及透气内置叶轮培养瓶准备

6.1.1 按 3D FloTrix® miniSPIN 生物反应器产品说明书安装调试，置入细胞培养箱中待用。

6.1.2 将 125mL 透气内置叶轮培养瓶 (以下简称 SF125 培养瓶) 按产品说明书进行安装调试，进行高压灭菌，烘干，待降至室温备用，请确保培养瓶在接种细胞前保持无菌状态。

6.2. 微载片 (微载体) 及细胞准备

6.2.1 生物安全柜紫外灭菌。以下操作均需在无菌条件下进行。

6.2.2 微载片 (微载体) 准备：以 1.33 mg/mL 微载体密度为例，将 5 片微载片 (100mg 微载体) 投入 SF125 培养瓶中，加入 10mL 培养基，轻轻晃动使微载片分散于培养基中，待用。

Microcarrier Density (mg/mL)		Culture Volume(mL)		No. of Spinner Flask	=	Amount of Microcarriers (mg)
1.33	×	75	×	1	=	100

△ 微载体密度可调整为 1-2.5 mg/mL。

△ 若细胞贴附效果较差，可提前 12-24 小时在离心管中将微载体分散于培养基中，4°C 暂存。使用时将重悬好的微载体再转入培养瓶中。

6.2.3 计算所需细胞数及细胞悬液体积，推荐接种浓度为 5×10^4 个细胞/mL，接种体积为 50mL。



No. of Spinner Flask	Seeding density /mL	Seeding volume (mL)	Total number of cells
1	$\times 5 \times 10^4$	$\times 50$	$= 2.5 \times 10^6$

No. of Spinner Flask	Seeding volume (mL)	Microcarrier resuspension volume (mL)	Cell resuspension volume (mL)
1	$\times (50$	$- 10)$	$= 40$

△ 建议接种时细胞与微载片（微载体）比例为 $2-20 \times 10^5$ /片或 $1-10 \times 10^4$ /mg。

6.2.4 准备细胞：根据常规操作，将细胞从培养皿或培养瓶中消化，离心去除胰酶后，用完全培养基将所需细胞数量重悬至以上计算的所需重悬体积，即 2.5×10^6 细胞重悬于 40mL 中。

△ 胰酶必须去除充分，否则存在接种后逐渐将微载体溶解。

△ 细胞应该为单悬状态，尽量确保无细胞团块或聚集，否者接种可能不均匀。

6.3. 细胞接种及培养

6.3.1 细胞接入瓶中：将细胞悬液加入含有分散后微载片（微载体）的 SF125 培养瓶中，即得到总体积 50mL。

6.3.2 细胞贴壁：将 SF125 培养瓶放在事先已放入细胞培养箱中的 3D FloTriX® miniSPIN 4 通道生物反应器的主机上。在控制系统上设置搅拌参数：步骤 1：35 rpm, 5 min; 步骤 2：0 rpm, 120 min, 循环次数：12 次。

6.3.3 细胞培养：在接种 24h 后，补充 25mL 完全培养基继续培养。将反应器搅拌速度调整成恒速搅拌 40 rpm。

△ 培养过程中，若微载体出现沉积现象，可以逐步调高桩数以确保所有微载体能够均匀悬浮于溶液中，每次尝试调高 5 rpm。

6.3.4 换液：按照培养需求进行换液。换液时，将 SF125 培养瓶放入生物安全柜中静置，待微载体全部沉降于底部后，小心弃除培养基，避免微载体损失，再加入新鲜培养基。

△ 一般情况下，推荐 72h 至少要进行 >80% 的换液。若细胞代谢能力较强，应适当调整换液补液频率。

6.4. 细胞观察及计数


6.4.1 取样：将 SF125 培养瓶放入生物安全柜中，打开侧盖后，一手摇晃瓶身使微载体均匀悬浮，一手采用移液管取出 1-2mL 微载体和培养基的混合液（微载体悬液）于离心管中。取 50-100 μ L 转入 96 孔板中用于染色观察。其余用于计数。

△ 使用移液枪时，避免微载体吸取过程中吸取不畅通或剪切力过大，影响细胞活性。

6.4.2 染色观察：请参考第 10 页 7.细胞观察操作流程。

6.4.3 细胞计数：请参考第 11 页 8.微载体裂解操作流程进行微载体裂解后，进行细胞计数。



 **数据记录：**当对一种细胞或者一种培养基进行第一次的微载体培养时，进行细胞接种后 2h、24h、72h、96h 进行取样染色及计数，记录细胞染色和计数结果。采用台盼蓝染色计数可简单检测细胞活率。

△ 计数时若发现细胞团比较多，可将细胞离心后，进行 PBS 清洗 1-2 次，一般可将细胞团打开。

△ 建议每次计数至少取 3 个样以保证取样代表性。每个样本取样时不少于 1mL。


△ 取样时，将 SF125 培养瓶放在 FTMS-1 上进行取样可能更准确。由于微载体沉降较快，若移液管打到搅拌桨无法顺畅搅动将对取样准确性有影响。

6.5. 细胞收获

6.5.1 裂解微载体：将 SF125 培养瓶放入生物安全柜中，打开侧盖后，待微载体全部沉降，使用移液管弃除 30mL 上清。然后将剩余微载体悬液转移至 50mL 离心管中，待微载体全部沉降，使用移液管弃除上清至剩下 7.5mL，加入 7.5mL 2mg/mL 的 3D FloTrix® Digest 裂解液。放在 37°C 水浴锅中或细胞培养箱中，将微载体完全裂解（请参考第 11 页 8.微载体裂解操作流程）。

6.5.2 收集细胞：待微载体全部裂解后，收集细胞悬液，离心 1000-1500 rpm，5 min。

6.5.3 洗涤和重悬：弃上清，加入等量 PBS 重悬细胞，再次离心 1000-1500 rpm，5 min；重复一次后弃上清，将细胞重悬至适当浓度用于后续实验。

 **数据记录：**记录细胞收获数量结果。计算细胞增殖倍数时应考虑培养过程中取样计数导致培养体积的减少和部分细胞的损失。

7. 细胞观察操作流程

由于微载体为不透光多孔微珠，明场/白光条件下无法具体观察细胞，可通过荧光染色（荧光标记的细胞无需染色）的方法进行观察。

7.1. 取样：吸取少量（建议 25 - 50μL）微载体和培养基的混合液（微载体悬液）于 96 孔板中或离心管中，待用。

△ 使用移液枪时，避免微载体吸取过程中吸取不畅通或剪切力过大，影响细胞活性。

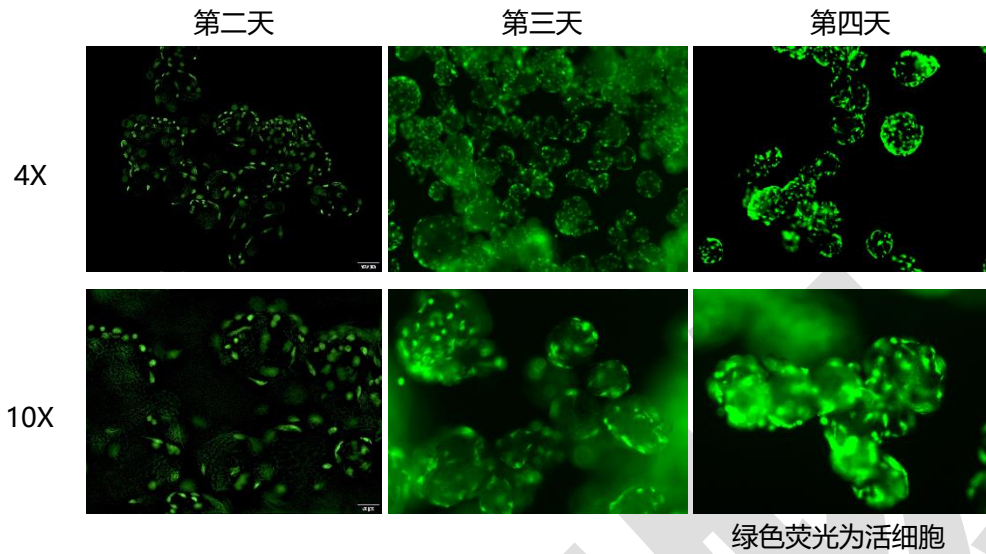
7.2. 细胞染色前处理：将取出的微载体悬液静置 1-2 min（或通过离心 1000-1500 rpm，2-5 min），待微载体沉入孔底后，弃掉上清，注意此时不要将微载体吸走。

7.3. 细胞染色：根据所选用的细胞活死荧光染料(如 AO/PI 或 Calcein-AM/PI 染料)或活细胞核染料（如 Hoechst 33342）进行染液配置以及染色。每个样品加入 100 μL 染色工作液，用枪尖轻轻混匀，按染料厂家说明书进行染色。

△ 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。

7.4. 观察：待微载体沉降后或离心沉淀后，吸走染色液，每孔加入 100 μL PBS。若使用离心管染色，将微载体悬液从离心管中转移至 96 孔板中，在荧光显微镜下观察细胞形态、密度、死活等参数。





上图展示初始接种密度为 3×10^5 个脂肪间充质干细胞/片微载体在培养第 2-4 天的染色结果，采用 Calcein-AM/PI 染色。

△ 细胞活死荧光染液配置及染色过程均需避光。

△ 绿色荧光观察活细胞，红色荧光观察死细胞，白光/明场观察微载体。

8. 微载体裂解操作流程

3D FloTrix® Digest 裂解冻干粉可以高效裂解微载体，每 mg 微载体推荐使用 0.15-0.3mg 裂解冻干粉。其中其活性作用的成分需要有钙离子的辅助，因此配置裂解液的缓冲液应该选择含有 1mM 以上钙离子的溶液，推荐选用培养基或者 HBSS。3D FloTrix® Digest 裂解液推荐的最终工作浓度是 1-2mg/mL，推荐现配现用。若采取母液配置，可选择用含钙离子的 HBSS 配置成 5-10mg/mL 母液后，迅速冻存， -20°C 保存。循环冻融将损害裂解液溶液的活性。

8.1. 计算所需的裂解冻干粉。以每 mg 微载体使用 0.15mg 裂解冻干粉为例：

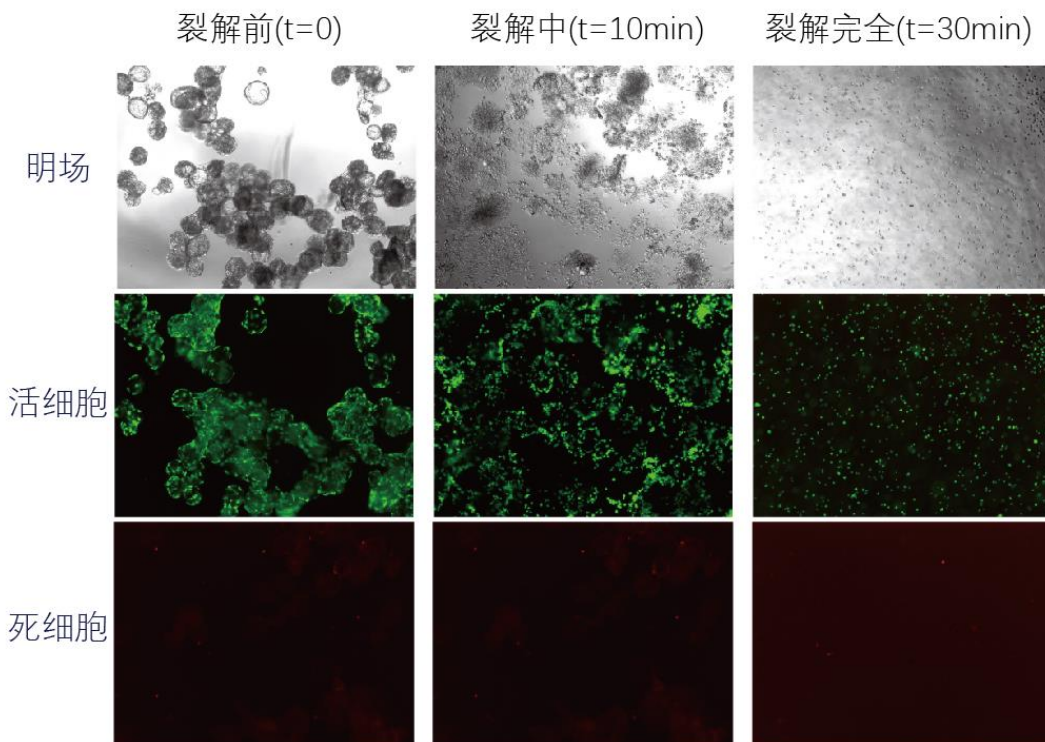
Amount of Microcarriers (mg)		Digest/mg Microcarrier (mg)		3D FloTrix® Digest (mg)
100	×	0.15	=	15

计算所需的缓冲液，以母液为 2mg/mL 为例：

Amount of Digest (mg)		Digest concentration (mg/mL)		Buffer (mL)
15	÷	2	=	7.5



- 8.2. 称取冻干粉：3D FloTrix® Digest 裂解液冻干粉开盖前将其快速离心，使冻干粉离心至管底。按所需体积和浓度称取 3D FloTrix® Digest 裂解液冻干粉，转入离心管中。
- 8.3. 配置裂解液：加入含钙离子的缓冲液，比如培养基或 HBSS，完全溶解后形成 2mg/mL 裂解液，在生物安全柜中使用 0.22μm 滤膜过滤至无菌离心管中备用。
- 8.4. 裂解微载体：
- 8.4.1 离心或静置使微载体沉降后，弃除部分上清。
- 8.4.2 微载体裂解：加入与残留上清体积相同的 3D FloTrix® Digest 裂解液，使裂解液最终工作浓度为 1mg/mL。轻轻混匀后，置于细胞培养箱中或 37°C 水浴锅中 15-30 min；每隔 5-10 min 观察并吹打混匀，使微载体得以充分溶解。
- △ 若 30 min 后仍有微载体残余（肉眼或镜下观测仍有颗粒物），可适当延长裂解时间。建议总时长不超过 60 min。
- △ 可以选择在旋转瓶中进行裂解，将旋转瓶放在 3D FloTrix® miniSPIN 4 通道生物反应器主机上在 37°C 持续搅拌。采用此方式可能需要更多裂解液因为需要确保至少有一半的搅拌桨接触到液面。



上图展示在收获细胞时，微载体裂解、消失以及释放细胞的过程中细胞仍保持较好活力。

- 8.4.3 洗涤和重悬：待微载体全部裂解后，将细胞悬液离心 1000-1500 rpm，5 min；弃上清，加入等量 PBS 重悬细胞，再次离心 1000-1500 rpm，5 min；重复一次；将细胞重悬至适当浓度用于后续实验。



9. 常见问题

问题	解答及建议
1. 在荧光显微镜下观察，细胞为什么没有均匀接种到微载体上？	<ul style="list-style-type: none"> ■ 静态培养时，推荐以微载片（微载体）饱和体积接种细胞悬液，即 200μL 细胞悬液，细胞悬液全部浸入微载片需约 10-20 秒，完全吸收后微载体片上应无多余细胞悬液流出。体积过多会造成细胞损失，体积过少会造成接种不均匀。种植的细胞数可根据实验需求进行调整，建议每片微载体接种范围在 2-10\times10⁵ 个细胞。 ■ 动态培养时，可以通过提高接种的搅拌转速、缩短间歇的时间可以提高细胞接种均匀度。 ■ 提前使用培养基浸泡微载体有利于细胞接种。
2. 为什么静态培养过程中有很多细胞游离在微载体外，或有较多死细胞？	<ul style="list-style-type: none"> ■ 细胞接种时，一定要微载体将所有细胞悬液充分吸收，加入细胞悬液后，保证微载体处于湿润状态（左右摆动孔板，没有多余液体流动即可）。 ■ 补加培养基时，不要对微载体直冲，应避开微载体，顺着孔壁加入后，用枪头轻轻搅拌均匀，不要用枪头或滴管进行吹打。待培养 1-2 天后方可使用粗口枪头（剪掉尖头）、滴管或血清管轻柔吹打混匀。 ■ 孔间一定要均匀滴加少量的 PBS，以确保细胞在贴壁时间内，周围环境保持湿润。
3. 为什么培养基颜色变黄？如何更换培养基？	<ul style="list-style-type: none"> ■ 培养过程中，观察培养基颜色变化（若使用酚红指示剂），并结合培养时长、换液频率和细胞活死荧光染色结果判断细胞生长情况。若培养基颜色稍微偏黄，细胞属于正常生长状态；若培养基颜色依然为正常培养基颜色或变深，说明细胞可能没有生长。 ■ 培养过程中，根据细胞生长情况适时更换培养基。培养周期后期应提高换液频率以支撑细胞增殖。每次换液推荐半体积换液，即弃除少量培养液（以约 50% 为宜），补充等量新鲜培养基；培养



基去除时，应待微载体全部沉降于孔底或培养容器底部，方可小心吸出液体，避免微载体损失。

4. 为什么微载体会出现连成片、成团等聚集现象且吹打不能分散？

- 培养过程中，应经常观察微载体情况，如出现微载体连成片、成团等聚集现象且吹打不能分散，则表明微载体已超出其细胞负荷量，应该尽快结合细胞活死染色结果进行判断。若已达到细胞负荷限度，建议立即裂解微载体，收获细胞。团块将限制营养物质传输从而影响细胞状态与增殖。团块也会对后续微载体裂解造成影响。如按推荐密度接种仍在3天内出现聚集情况，建议降低接种细胞数。

5. 裂解细胞时，为什么裂解30min后仍有未裂解完全的微载体？

- 微载体聚团或者承载太多细胞时，裂解效率会降低。
- 裂解液温度较低，需要时间升温至37°C以激活裂解液中的酶。
- 可以适当延长裂解时间，建议最多延长至60min。
- 移液管轻轻吹打混匀有助于加快裂解。
- 提高裂解液的工作浓度至1.5-2mg/mL。
- 可在裂解前，用生理盐水/PBS清洗含细胞的微载体1-2次，再进行裂解可提高裂解效率，减少细胞团。

10. 文件修订记录

版本号	修订日期	描述
V2304	2023/04/06	1. 替换原文件 TM002 3D FloTrix™ 细胞培养工艺手册。
V2307	2023/07/01	简化静态培养时的细胞接种方法： 1. 细胞密度从 2.5×10^6 /mL 调整至 1.0×10^6 /mL，接种体积从 200 μ L 调整至 500 μ L，但细胞接种总数未变。 2. 从接种后等待 2 小时再补液改成接种后立刻补液 2mL，16-24 小时后再补液至 8mL。

©2023-2024 北京华鑫生物技术有限公司保留所有权利。



根据版权法，未经北京华鑫生物技术有限公司书面同意，不得复制本手册的全部或部分內容。
北京华鑫生物有限公司已尽一切努力确保本手册中的信息准确无误，不对印刷或文书错误负责。
3D TableTrix® 和 FloTrix®是北京华鑫生物技术有限公司的商标。
此处提及的其他产品名称是其各自公司的商标。
产品可能被专利保护，或者可能有某些限制。
所有价格和规格如有变更，恕不另行通知。
产品声明可能会发生变化。
有关更多信息，请联系客户服务部。

© 2023-2024 Beijing CytoNiche Biotechnology Co., Ltd. All Rights Reserved.
Under the copyright laws, this manual may not be copied, in whole or in part, without the written consent of Beijing CytoNiche Biotechnology Co., Ltd.
Every effort has been made to ensure that the information in this manual is accurate. Beijing CytoNiche Biotechnology Co., Ltd. is not responsible for printing or clerical errors.
3D TableTrix® and 3D FloTrix® is a trademark of Beijing CytoNiche Biotechnology Co., Ltd.
Other product names mentioned herein are trademarks of their respective companies.
Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations.
All prices and specifications are subject to change without prior notice.
Product claims are subject to change.
Please contact customer services for more information.

