

# 康宁可溶性微载体

## 常见问题解答

CORNING

### 1. 可溶性微载体是否有孔？

可溶性微载体为水凝胶，能允许水和小分子通过多聚半乳糖醛酸聚合物，但孔径不足以容纳细胞通过。

### 2. 是否可以用培养基或 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液（DPBS）来溶胀可溶性微载体？

必须用水来充分溶胀可溶性微载体，其渗透压利于产生尺寸均一的 200-300  $\mu\text{m}$  直径的微载体。

### 3. 溶胀的可溶性微载体是球形吗？

可溶性微载体不是完美的球体，但溶胀后的可溶性微载体尺寸分布窄，具有均一的表面积。

### 4. 可溶性微载体溶胀时可以用塑料（聚苯乙烯或聚丙烯）储液瓶代替硅化玻璃瓶吗？

可溶性微载体可以在塑料瓶中溶胀，但是微载体可能会粘附在瓶壁上不易被去除，带来微载体的损失。微载体的损失程度取决于储液瓶的表面积和溶胀微载体的量。因此，我们建议使用硅化玻璃瓶以尽量减少微载体的损失。

### 5. 如果溶胀后在水中观察到漂浮（不能沉降）的可溶性微载体，怎么办？

漂浮的微载体可能是由于加水时混入空气所导致。单个微载体含有空气，会使它们浮在液面上。有两种方法可以去除空气：

- ▶ 轻轻敲击容器的一侧，直到微载体落下并沉降。
- ▶ 重复地拿起容器并用力放到在坚硬表面上。

所有漂浮微载体的完全沉降可能需要 1 个小时。

为了防止在溶胀过程中产生漂浮微载体，请缓慢加入足量的水（每克微载体 150 mL），然后再混合。在微载体溶胀期间请朝一个方向旋转搅拌，不要颠倒或剧烈混合。请参考康宁关于可溶性微载体溶胀的技术文档（CLS-AN-467）了解更多详情。

### 6. 可溶性微载体可以灭菌吗？

康宁的可溶性微载体是无菌提供，其无菌保证等级（SAL）为  $10^{-6}$ 。我们不建议高压灭菌可溶性微载体。

### 7. 可溶性微载体降解后会影响细胞悬液的粘度和渗透压吗？

可溶性微载体降解后，粘度和渗透压在标准含血清培养基的预期范围内。注意：粘度和渗透压的变化取决于降解的微载体与收获溶液的比例，如果您优化得到的降解过程是使用小于 250 mL 的收获溶液溶解大于 1 g 的可溶性微载体，您应该预期会有粘度和渗透压的增加。

### 8. 溶胀后的可溶性微载体可以储存多久？

建议在 4°C 储存溶胀后的可溶性微载体，最长 1 周。

### 9. 1 克含有多少可溶性微载体？

1 克干燥的产品中约有  $2.8 \times 10^6$  个可溶性微载体。

### 10. 微载体溶解后，收获液中有哪些成分？

采用分子排阻色谱法，我们在收获溶液中观察到半乳糖醛酸短链、果胶酶、EDTA 和蛋白酶。

### 11. 是否可以降低收获液中试剂的体积或浓度？

在多种生物反应器和细胞类型中，每克微载体使用 250 mL 含 100 U/mL 果胶酶和 10 mM EDTA 的收获液，我们均观察到一致的微载体溶解和细胞释放。尽管如此，收获液中果胶酶、EDTA 和蛋白酶的体积和浓度可根据细胞类型和生物反应器的不同而减少。

需主要考虑的三点：

- ▶ 在微载体溶解过程中，确保使用足够量的收获溶液使叶轮完全浸没，以提供充分的低剪切力混合。在我们的生物反应器系统中，我们已经在降低收获溶液至 150 mL/g 时实现了溶解。
- ▶ 我们已经在果胶酶和 EDTA 浓度分别低至 50 U/mL 和 5 mM 时观察到了微载体的降解。
- ▶ 收获溶液体积或浓度的降低可能延长微载体完全溶解并获得单细胞所需的时间。我们建议分别评估这两个变量，再组合，以确定针对您系统的优化方案。

#### 12. 在可溶性微载体上需接种多大的细胞密度？

建议可溶性微载体的细胞接种密度略高于常规二维平面培养的密度。对于人间充质干细胞，推荐接种密度 4,000-7,500 个细胞 /cm<sup>2</sup>，具体取决于培养基类型。

#### 13. 需要使用多大浓度的可溶性微载体？

我们建议在初始评估时使用 5-10 cm<sup>2</sup>/mL (1-2 g/L) 的微载体浓度。根据搅拌速度、培养基补充时间和细胞接种密度，微载体浓度可以增加至 15-20 cm<sup>2</sup>/mL (3-4 g/L)。

#### 14. 可溶性微载体细胞贴壁和扩增过程中可以使用连续搅拌吗？

连续搅拌方案可以用于可溶性微载体细胞贴壁和扩增阶段。但是，我们建议首先在细胞贴壁阶段分别评估静止（在一定时间内不搅拌）、间歇（搅拌 / 不搅拌循环）和连续搅拌方案，以确定哪种方案能更好地实现 > 80% 的细胞贴壁以及细胞在所有微载体上均匀分布。在细胞贴壁阶段，采用使微载体悬浮所需的最小搅拌速度。不同的细胞类型、培养基配方（例如有 / 无血清）、微载体表面（如康宁 Synthemax™ II、变性胶原蛋白）和容器类型（如转瓶、生物反应器）的组合需要不同的方案。

#### 15. 由于溶胀后可溶性微载体的透明度高，怎样才能更好地观察溶液或搅拌培养中的微载体小球？

为了提高溶胀后可溶性微载体的可见度，建议用明亮的手电筒照射溶液。

#### 16. 可溶性微载体是否会在操作处理和搅拌中破碎？

在常规处理过程中，以及在具有标准叶轮的容器中以支持细胞贴壁和生长的速率搅拌中，未发现对可溶性微载体的损坏。

#### 17. 可溶性微载体怎样进行细胞传代？

建议通过离心或过滤方式去除微载体降解后细胞中的收获溶液。

为了优化微载体降解后的直接传代方案，我们建议测试在收获溶液不同稀释度下细胞在新的可溶性微载体上的贴壁情况。

同时，我们已验证了可通过直接加入新的可溶性微载体到培养系统的方式进行放大培养（如细胞的微载体球转球）。优化以添加新鲜微载体来扩增细胞的方案时，应考虑以下问题：

- ▶ 优化添加新鲜微载体的时机。我们建议在细胞亚汇合（50%-70%）时添加新的微载体。
- ▶ 改变搅拌方式为慢速搅拌或静止，以促进细胞移动。
- ▶ 应知晓工作体积的增加以及额外的微载体可能会影响混匀、微载体球相互碰撞和细胞迁移。

#### 18. 如果我在微载体方面的经验有限，有推荐的起始方案吗？

首先，您应该在静止而不是搅拌的培养环境下验证细胞在可溶性微载体的贴壁。当微载体在水中溶胀并将水换成培养基后，我们建议在超低吸附表面的 6 孔板（康宁货号 3471）中每孔加入 2 mL 含 10 cm<sup>2</sup> 微载体的培养基。注意不要让移液管接触到超低吸附表面，这可能会损坏表面包被，使细胞贴壁到孔板上。

然后，根据标准方案制备您的细胞悬液，每孔以 10,000 个细胞 /cm<sup>2</sup> 微载体接种 2 mL 细胞悬液（共 100,000 个细胞），终体积为 4mL。轻轻来回晃动培养板使细胞与微载体混合均匀，将其放置在 37°C 二氧化碳培养箱或适合您细胞的培养环境中培养。每隔 30 分钟用显微镜观察细胞贴壁情况。评估不同的细胞接种密度、培养基添加剂（如有 / 无血清）和微载体表面，以确定支持细胞贴壁和铺展的最佳条件。

当细胞在可溶性微载体上达到约 70% 汇合度，验证微载体的降解和细胞释放。首先去除培养基，用

Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (DPBS, 康宁货号 21-031) 洗涤一次, 然后加入 1 mL 收获溶液 (蛋白酶 +100 U/mL 果胶酶 +10 mM EDTA)。用显微镜监测 10-15 分钟内微载体的降解和细胞的释放。旋转培养板几次以促进单细胞悬液的形成。吹打混匀细胞悬液, 取样进行细胞计数, 并计算最终的细胞产量。在静止培养条件下, 细胞在微载体上的倍增时间和扩增倍数预计与平面培养一致。

接下来, 我们建议验证在转瓶搅拌培养下细胞的贴壁和生长。以下是推荐的测试条件:

测试项目	推荐条件
转瓶	125 mL 一次性转瓶 (康宁货号 3152)
培养的工作体积	50 mL
细胞接种密度	5,000 至 10,000 个细胞 /cm <sup>2</sup>
可溶性微载体浓度	5 cm <sup>2</sup> /mL (或 1 g/L)
搅拌速度	30-40 rpm

根据培养板静止培养实验的结果, 确定细胞开始贴壁所需要的时间, 将该时间应用到转瓶间歇搅拌方案:

- 如果细胞在静止条件下需要 30 分钟贴壁, 那么建议在转瓶中接种后 12-24 小时内, 每隔 30-60 分钟进行一次开 / 关搅拌循环。例如, 将培养物以 30 rpm 混合 5 分钟, 然后在 0 rpm 静置 30 分钟, 总共重复该循环 12 至 24 小时, 或直到 80% 至 90% 的细胞已经贴壁 (通过监测培养基中未贴壁细胞的减少来确定)。建议间歇搅拌方案和连续搅拌方案都进行优化。

转瓶中可溶性微载体的降解及细胞收获可采用与静止培养相同的过程, 并在收获期间以 30 rpm 搅拌培养物。

当放大培养到更大的转瓶时, 我们推荐采用与 125 mL 一次性转瓶相同叶尖速度的搅拌速率。采用以下公式及叶轮直径计算叶尖速度:

叶尖速度 (m/s) = DN/60, 其中 D = 叶轮直径 (m), N = rpm。

转瓶材料和尺寸	康宁货号	叶轮直径 (m)
125 mL 一次性转瓶	3152	0.040
500 mL 一次性转瓶	3153	0.050
125 mL 玻璃转瓶	4500-125	0.040
250 mL 玻璃转瓶	4500-250	0.045
500 mL 玻璃转瓶	4500-500	0.059
1L 玻璃转瓶	4500-1L	0.079

#### 19. 如果细胞不贴壁到可溶性微载体上, 怎么办?

首先, 请参阅康宁关于可溶性微载体溶胀的实验方案 (CLS-AN-467), 以确保微载体在水中正确溶胀, 并在溶胀后 1 周内使用。

其次, 验证细胞在静止培养中能够贴壁到可溶性微载体。我们建议在超低吸附表面的 6 孔板 (康宁货号 3471) 中每孔加入 2 mL 含 10 cm<sup>2</sup> 微载体的培养基。每孔以 10,000 个细胞 /cm<sup>2</sup> 微载体接种 2 mL 细胞悬液 (100,000 个细胞 / 孔), 终体积为 4 mL。轻轻来回晃动培养板使细胞和微载体混合均匀, 将其放置在加湿的 37°C 二氧化碳培养箱或适合您细胞的培养环境中培养。每 30 分钟在显微镜下观察细胞贴壁情况, 记录细胞贴壁所需的时间。

如果细胞仍不贴壁:

- 在贴壁阶段减少或去除培养基中的血清。
- 增加细胞接种密度。

优化静止培养中的细胞贴壁后, 可在转瓶中重复这些条件。对于剪切敏感型细胞, 可能需要对细胞贴壁期间的搅动速度 / 速率进一步优化。

#### 20. 如果细胞在静止培养时可贴壁到可溶性微载体上, 但搅拌培养 (转瓶或生物反应器中) 时, 不像预期的那样扩大, 怎么办?

微载体培养的优化可能需要评估培养基配方、搅拌速率、细胞接种密度及其它参数。强烈建议在进行放大之前优化搅拌培养条件。

## 21. 如果微载体不能完全降解，怎么办？

首先，请参阅康宁关于可溶性微载体溶胀的实验方案（CLS-AN-467），以确保微载体在水中正确溶胀并在溶胀后 1 周内使用。

其次，确认使用预热（> 25°C）的收获溶液溶解微载体。

然后，请参阅康宁关于可溶性微载体降解的实验方案（CLS-AN-466），证明裸微载体（无细胞）的可溶性，确认收获溶液为含终浓度 100 U/mL 果胶酶（Sigma 货号 P2611; 3800 U/mL）和 10 mM EDTA（康宁货号 46-034-Cl; 0.5 M pH 8）的蛋白酶溶液。

最后，如果含有细胞的微载体仍不溶解：

- ▶ 在加入收获溶液之前，用 DPBS（康宁货号 21-031）洗涤 2 次，以减少或去除培养基残留组分（如血清、盐）对收获溶液中蛋白酶、果胶酶及 EDTA 功能的影响。
- ▶ 如果微载体上的细胞过度融合（如特别紧密的细胞单层或堆积的多层细胞），首先仅加入蛋白酶溶液（每克微载体 250 mL）以松动细胞层。当细胞开始变圆并暴露微载体表面，直接加入终浓度分别为 100 U/mL 和 10 mM 的果胶酶与 EDTA。

## 22. 如果在微载体溶解后观察到大的细胞团，该怎么办？

增加收获溶液中的蛋白酶浓度，延长收获时间，并确保收获溶液保持在蛋白酶的最佳温度。

## 23. 如果在微载体溶解后观察到大量的细胞串，该怎么办？

大的“串状”细胞团通常是细胞裂解的结果。将细胞收获期间的搅拌速度降低至使微载体悬浮所需的最小速度，缩短收获时间，或降低收获溶液中蛋白酶的浓度。

如需更多具体信息，请访问 [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences) 上的证书页面。

授权 / 免责声明：除非另有规定，否则所有产品仅供研究使用，不适用于诊断或治疗程序，不适用于人类。康宁生命科学从未声称这些产品可以用于临床或诊断应用。

如需更多的产品或技术信息，请访问 [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences) 或拨打 800.492.1110，美国以外地区的用户，请拨打 +1.978.442.2200 或联系当地康宁销售代理。

**CORNING**

☎ 400-600-0207

✉ CLSCHINA@corning.com

🌐 [www.corning.com/lifesciences/china](http://www.corning.com/lifesciences/china)

**FALCON**

🌐 [www.cls-china.cn](http://www.cls-china.cn)

🌐 [www.cellculturesuccess.com](http://www.cellculturesuccess.com)

**AXYGEN**

**PYREX**

