3D多孔微载体说明书

【产品名称】

3D 多孔微载体

【产品货号】

产品货号	MC0002-1	MC0002-2	MC0002-3	MC0002-4	MC0002-5	MC0002-6
包装规格	0.15 g/ 瓶	0.25 g/ 瓶	0.75 g/ 瓶	1 g/ 瓶	5 g/ 瓶	10 g/ 瓶

【产品简介】

本产品为淡黄色 / 浅棕色干粉形式，由无数颗具有 3D 多孔结构的明胶微球组成，孔隙率高达 90%，比表面积大于 9000 cm^2/g。高比表面积和 3D 多孔结构不仅为细胞提供更多的黏附位点，支持高密度细胞扩增，同时也提供了物理屏障，有效降低培养过程中的剪切力如搅拌、通气等对细胞的机械损伤，进而提高细胞存活率与扩增效率。

适合间充质干细胞等贴壁细胞的 3D 培养，可收获外泌体或搭配特异性降解酶，实现高质量、高活性细胞的温和收获。

【物理参数】

物理参数	单位	3D 多孔微载体
材质	—	明胶
颜色 [2]	—	淡黄色 / 浅棕色
粒径 [1,2]	μm	100-300
数量 [2]	个 /g 干重	4.2×10^6
表面积 [2]	cm^2/g 干重	9300
孔隙率 [2]	%	90.25
无菌性	—	非无菌
平均孔径 [2]	μm	48
溶胀因子 [1,2]	mL/g 干重	28.22

1 在生理盐水中测试
2 不同批次间可能存在波动

【储存条件】

1. 未拆封的微载体应常温干燥避光存放，并在有效期内（6 个月）使用。
2. 微载体高压蒸汽灭菌后，需 4 ℃无菌存放并尽快使用（一周内）。

【使用方法】

1、所需物料和设备

耗材	物料	设备
50 mL 注射器 50 mL 离心管 0.22 μm 孔径过滤器 细胞培养皿 （T-25 瓶、150 mm 皿） 无菌一次性移液管（30 mL） 无菌枪头（5 mL，1 mL，200 μL） 100 mL 细胞培养袋（YOCON/ 定制） 1 L 细胞培养袋（YOCON）	3 D 多孔微载体（YOCON/MC0002） DPBS（YOCON/BS0402） 温和消化酶（YOCON/NC1004.2） 明胶微载体消化酶（YOCON/ NC0207+ NC0207.S） GMP 级 MSC 无血清培养基套装 2.0（YOCON/NC0107+NC0106.s）	移液器 生物安全柜 低速离心机 细胞计数仪 细胞磁力搅拌器 125 mL 双侧壁细胞培养瓶（即转瓶） 细胞培养箱（37 ℃，5% CO_2） 全自动细胞培养工作站（YOCON/ FC06L）

2、微载体浸泡

微载体采用高压蒸汽灭菌（湿热灭菌），主要步骤包括 DPBS 浸泡复水、高压蒸汽灭菌和无血清培养基置换。具体操作如下:

2.1 DPBS 浸泡复水

推荐浓度为 20 g/L（常用量见下表），以 0.25 g 微载体为例：

称取 0.25 g 微载体置于 50 mL 离心管中，加入 12.5 mL DPBS，静置浸泡约 45 min。此时大部分微载体已沉降，可轻晃离心管，促使剩余的少量漂浮微载体沉降。

微载体 /g	0.15	0.25	0.75	1	5	10
DPBS/mL	7.5	12.5	37.5	50	250	500
备注	DPBS 用量可接受 ±20% 波动					

2.2 高压蒸汽灭菌：

将浸泡复水后的微载体进行灭菌，灭菌程序：121 ℃，30 min。灭菌后可直接进行后续操作或 4 ℃保存（1 周内使用）。

2.3 无血清培养基置换

灭菌后，在微载体沉降状态下，吸除上层液体，而后加入约 3 倍微载体体积的无血清培养基，300 g 离心 5 min，静置，待少量漂浮微球沉降后，吸除上层液体，并重复 1 次该置换操作。

最后加入约 3 倍微载体体积的无血清培养基，备用。

3、细胞培养

3.1 转瓶细胞培养

3.1.1 准备转瓶

将转瓶清洗、硅化、高压灭菌、干燥并降至室温备用，确保无菌。

转瓶使用前需进行浸泡，以去除可能存在的四氟搅拌桨碎片和脱落的硅化试剂：转瓶中加入 40 mL 无血清培养基，放入培养箱中 35 rpm 搅拌过夜。

注：此处“转瓶”即指 125 mL 双侧壁细胞培养瓶。

3.1.2 准备细胞

按照常规消化步骤，收获足量的细胞；通过离心去除消化酶后，用无血清培养基重悬到所需浓度。

注：需充分去除残留消化酶，否则可能会对后续实验造成负面影响。

3.1.3 接种参数

推荐接种量：每 100 mL 无血清培养基添加 0.25 g 微载体、11×10^6 个细胞。

推荐接种代次：P3-P4 细胞。

接种时应通过实验过程监测并设置对照组，确保细胞质量，具体如下：

以接种 P4 细胞为例，接种前通过细胞培养皿扩培，需满足 P3-P4 扩增倍数 >12，汇合度 >90%，消化后呈单细胞悬液，消化过程未造成细胞损伤。

细胞在微载体上接种时，同步在 T-25 瓶中接种以作对照，培养 3 天后计数，扩增倍数 >12。

3.1.4 接种操作（在生物安全柜内）：

将浸泡微载体和转瓶的无血清培养基弃除；

向转瓶中预先加入部分无血清培养基（50 mL）；

注：培养基使用前需 37 ℃预热；

向装有微载体的离心管中加入相应数量的细胞，使用移液枪充分吹吸混匀，而后转移至转瓶内的无血清培养基液面以下；

使用无血清培养基清洗 2 次离心管以冲洗残留的微载体与细胞，并转移至转瓶内，最后使用无血清培养基将总体积补充至 100 mL。

注：由于搅拌桨的存在，转瓶上的刻度不能真实反映微载体和无血清培养基的总体积，建议使用离心管记录；

3.1.5 细胞培养

在细胞培养箱中进行，CO_2 浓度为 5%，温度为 37 ℃。

培养箱中放置细胞磁力搅拌器，转瓶放在搅拌器主机上，设置搅拌参数：35 rpm-5 min，0 rpm-5 h；循环 5 次；后续持续 35 rpm 搅拌培养。

注：首次循环后（即首次静置 5 h 后），应确保微载体可在后续搅拌完全重悬混匀，若转瓶中心处载体未随搅拌移动，可适当提高转速至 40/45 rpm；若转瓶底部边缘处有堆积，可轻微晃匀。

按培养需求进行换液，推荐第 3 天进行全量换液。换液时，将转瓶转移至生物安全柜中静置，待微载体全部沉降后，尽量取出上清并弃除，而后加入对应量的新鲜无血清培养基。

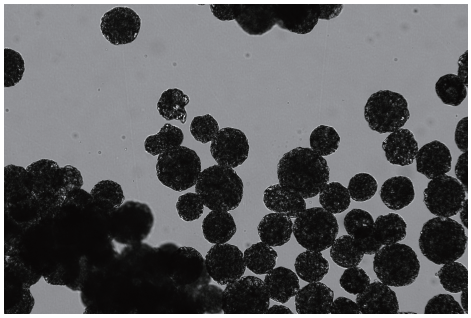
注：接种 1 天后，搅拌程序进展至持续搅拌时，应取出部分悬液转移至平面上，静置 5-10 min 后，镜下观察，上清中应无或含较少漂浮细胞，基本全部黏附在微载体上。

注：培养 2-3 天，可观察到微载体开始聚团，表明细胞正常生长。

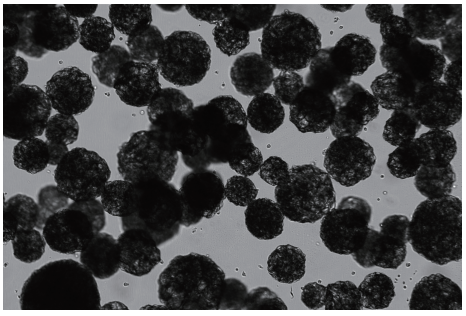
注：随培养时间延长，上清中会逐渐出现部分脱落细胞，推荐培养第 5 天左右进行收获。

3.1.6 细胞观察

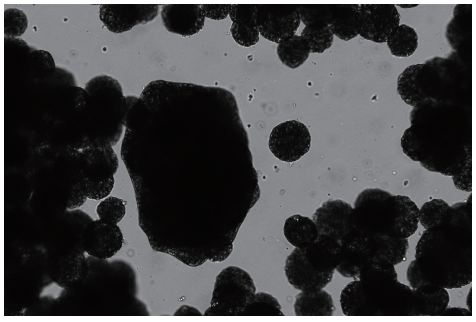
将转瓶转移至生物安全柜中，打开侧盖后，一手摇晃瓶身使微载体均匀悬浮，一手使用移液器取出适量微载体悬液，进行镜下观察、染色观察或消化后用于计数。



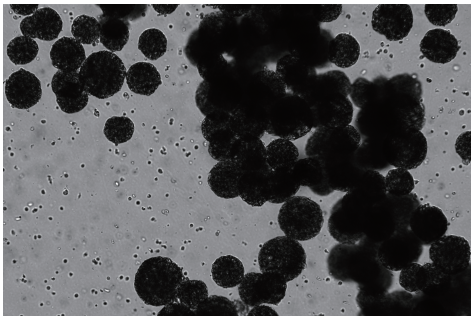
培养1天



培养3天



培养5天



培养6天

上图为 100 mL 无血清培养基、搭配 0.25 g 微载体与 11×10^6 个脐带间充质干细胞 P4，培养过程中取样观察。

3.1.7 细胞收获

将转瓶转移至生物安全柜中，打开转瓶顶部盖子，将微载体悬液均分至 3 个 50 mL 离心管中，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；

每个离心管内加入 30 mL DPBS 重悬，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；

每个离心管内加入 12.5 mL 已过滤除菌的明胶微载体消化酶（1 mg 微载体使用 0.15 mL 消化酶），置于 37 ℃水浴锅中进行消化，每 5-10 min 颠倒混匀 1 次，10-15 min 左右可在生物安全柜内使用移液器吹散其中微载体团块，20-25 min 可取部分液体镜下观察，此时微载体应完全降解。

注：明胶微载体消化酶使用前需 37 ℃预热；

注：如有微载体残留，应延长时间至微载体全部降解，一般不超过 30 min；

将消化液转移至 500 mL 的无菌瓶中，加入 150 mL 无血清培养基（消化液体积的 4 倍）终止消化，然后均分至 4 个 50 mL 离心管中，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；加入 15 mL 无血清培养基重悬细胞，300 g 离心 5 min，尽量去除上清，最后将每个离心管中细胞重悬至合适浓度并合并后用于后续实验。

3.2 工作站细胞培养

3.2.1 细胞准备同 3.1.2。

3.2.2 接种参数

100 mL 细胞培养袋使用 100 mL 无血清培养基、0.15 g 微载体、800 万细胞。

1 L 细胞培养袋使用 500 mL 无血清培养基、0.75 g 微载体、4000 万细胞。

3.2.3 接种细胞

在生物安全柜内，向细胞培养袋中充入少量空气（防止细胞培养袋两个表面贴附过紧，微载体与无血清培养基无法进入袋中），向细胞培养袋中加入少量无血清培养基，确定微载体可顺利进入袋中。

使用移液器将浸泡微载体的无血清培养基弃除，加入相应数量的细胞，充分吹吸混匀，而后通过连接袋体的注射器分批加入到细胞培养袋内，每批次转移完全后再继续补加，避免堵塞。

最后使用无血清培养基清洗 2 次残留微载体与细胞，将其完全转移至细胞培养袋中，最终培养体积定容至 100 mL 或 300 mL（1 L 细胞培养袋初始培养体积为 300 mL，第三天会自动换液并定容至 500 mL）。

3.2.4 细胞培养

将细胞培养袋中无血清培养基与微载体手动摇晃混匀，然后转移至全自动细胞培养工作站摆台上进行培养。

注：培养 1 天后，外观观察应当无明显微载体团块，细胞培养袋底部无黏附，若出现该情况，可通过轻微按压或摇晃震荡等方式，将其分散。取出部分悬液转移至平面上，静置 5-10 min 后，镜下观察，上清中应无或含较少漂浮细胞，基本全部黏附在微载体上。

注：培养至 2-3 天，可观察到微载体开始聚团，表明细胞正常生长，无需调整。但若发现极大团块，需将其压散。

培养至第 3 天和第 5 天时，全自动细胞培养工作站会自动进行换液操作。培养期间注意观察微载体分布，若分布极为不匀，可手动摇晃混匀。

3.2.5 细胞观察

使用注射器从细胞培养袋取样口取出部分微载体悬液，转移至平面上，静置 5-10 min 后，进行镜下观察。

3.2.6 细胞收获

将细胞培养袋转移至生物安全柜中，竖直放置，待微载体沉降在出样口后，打开出样管，将微载体转移至离心管中，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；

加入微载体 1.5 倍体积的 DPBS 重悬，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；

加入已过滤除菌的明胶微载体消化酶（1 mg 微载体使用 0.15 mL 消化酶），放在 37℃水浴锅中进行消化，每 5 min 颠倒混匀 1 次，10 min 左右可使用移液器吹散其中微载体团块，20-25 min 可取部分液体镜下观察，此时微载体应完全降解。

注：明胶微载体消化酶使用前需 37 ℃预热；

注：如有微载体残留，应延长时间至微载体全部降解，一般不超过 30 min；

向消化液中加入 4 倍体积无血清培养基终止消化，300 g 离心 5 min，尽量去除上清；加入无血清培养基重悬细胞（推荐 1 mg 微载体使用 0.2 mL 无血清培养基），300 g 离心 5 min，尽量去除上清，最后将细胞重悬至合适浓度用于后续实验。

注: 随培养时间延长，上清中会逐渐出现部分脱落细胞，100 mL 细胞培养袋（100 mL 培养体积）推荐第 6 天进行细胞收获，1 L 细胞培养袋（500 mL 培养体积）推荐第 7 天进行细胞收获；

【注意事项】

1. 产品保存时请勿与水汽接触，以防变质。

2. 为避免污染，在使用本产品时，应严格执行无菌操作。

3. 更换培养基时，应待微载体全部沉降至瓶底再小心吸走上层培养基，避免损失细胞及微载体；补充新鲜培养基时也应避免移液器直接对准微载体，以免冲掉微载体上的细胞。

4. 本款微载体在普通光学显微镜下并不能直接观察到细胞状态，可通过上清液中细胞数和微载体聚团情况进行判断。若初始上清中细胞较少，且微载体在换液后正常聚团，辅助证明细胞正常生长；也可取部分悬液进行消化计数以直接确定细胞数量。

5. 本产品搭配不同培养基进行细胞培养时，细胞形态与粘附位置可能存在差异，进而导致荧光观察结果与细胞实际收获数量不同，需以实际获得的细胞数量为准。

6. 随培养时间延长，微载体上细胞数量超过负荷量时，上清中脱落细胞数量明显增多，且上清中杂质明显增加，细胞状态变差，应根据实验目的调整培养时间。

【基本信息】

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路 6 号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

【说明书批准日期及修改日期】

修改 2026 年 8 月 27 日

【版本号】 1.0.2