

CardioEasy® 人心肌细胞纯化培养基

V2.1 版本，更新日期：2017 年 3 月 8 日

货号：CA2005100

规格：1 Kit

储存条件：基础培养基 2 ~ 8°C，添加剂 -80 ~ -20°C，混匀后 2 ~ 8°C，
1 个月内使用完毕。

产品简介：

CardioEasy® 人心肌细胞纯化培养基是由赛贝生物（Cellapy）开发生产的用于人心肌细胞在体外纯化富集的试剂盒，可用于人多潜能干细胞（hESC/iPSC）向心肌细胞诱导分化后所得心肌细胞的纯化。人心肌细胞在 CardioEasy® 人心肌细胞纯化完全培养基中可保持性状稳定，维持正常的生理功能，非心肌细胞则无法在 CardioEasy® 人心肌细胞纯化完全培养基中生存，从而选择性获得高纯度的人心肌细胞。

产品内容：

组份代码	名称	规格	数量
CA2005100-1	CardioEasy® 人心肌细胞纯化基础液	100mL	1 瓶
CA2005100-2	CardioEasy® 人心肌细胞纯化添加剂	1mL	2 支

需要材料:

- CardioEasy® 人心肌细胞纯化培养基 (Cellapy: Cat. CA2005100)
- 细胞培养级的PBS溶液 (Hyclone: Cat. SH30256.01)
- CardioEasy® 人心肌细胞铺底工作液 (Cellapy: Cat. CA2010100/CA2010500)
- CardioEasy® 人心肌分化试剂盒 (Cellapy: Cat. CA2004500)
- CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基 (Cellapy: Cat. CA2003500/CA2003100)
- CardioEasy® 人心肌细胞复苏培养基 (Cellapy: Cat. CA2002500/CA2002100)
- CardioEasy® 人心肌细胞消化液 (Cellapy: Cat. CA2006009/CA2006100)
- CryoStor cell cryopreservation media (Sigma: Cat. C2874)

培养材料准备:

- CardioEasy® 人心肌细胞铺底工作液包被培养皿/瓶: 往培养皿/瓶中添加工作液至完全覆盖皿/瓶底, 37°C 包被4小时以上备用。包被好的培养皿/瓶, 如果暂时不用, 可用PARAFILM封口后2 ~ 8°C 储存, 并于1周内使用, 保存期间, CardioEasy® 人心肌细胞铺底工作液需始终保持完全覆盖皿底。
- CardioEasy® 人心肌细胞纯化完全培养基: 在2 ~ 8°C 解冻 CardioEasy® 人心肌细胞纯化添加剂, 离心后混匀, 随后将添加剂

加入CardioEasy®人心肌细胞纯化基础培养基中形成CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基（每0.2ml添加剂与10ml基础培养基混合）。CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。

注：CardioEasy®人心肌细胞纯化添加剂在2 ~ 8℃解冻，可按实际用量对添加剂进行分装，分装后重新置于-80 ~ -20℃保存，避免反复冻融。

诱导分化获得的心肌细胞纯化：

1. 待心肌细胞分化完成，为了提高心肌细胞的纯度，需要对心肌细胞进行1 ~ 2次纯化处理。
2. 室温平衡 CardioEasy®人心肌细胞复苏培养基、PBS 溶液和 CardioEasy®人心肌细胞消化液，取出包被过 CardioEasy®人心肌细胞铺底工作液的培养皿/瓶，吸去包被液并加入适量 CardioEasy®人心肌细胞复苏培养基，置于 5% CO₂的 37℃恒温细胞培养箱中。
3. 吸走 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液清洗一次。
4. 加入 CardioEasy®人心肌细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 37℃恒温 CO₂培养箱孵育 20 ~ 30 min，显微镜下观察到大部分细胞相互分离，且呈现“圆形”，表明细胞消化时间理想。
6. 用移液器轻柔吹打，制成单细胞悬液。将细胞悬液转至 15mL 离心管中，再向皿/瓶中加入适量 PBS 溶液清洗皿/瓶底，收集剩余细胞加入同一离心管中，200g 离心 5 min。

注：吹打力度要轻柔，避免损伤心肌细胞。

7. 弃去上清，用 CardioEasy® 人心肌细胞复苏培养基重悬细胞，轻柔吹打混匀，并按 2:1 ~ 3:1 的比例接种到准备好的皿/瓶中，水平十字摇匀。

注：心肌纯化过程中会有部分细胞死亡，所以推荐 2:1 ~ 3:1 的再接种比例。再接种后，合适的心肌细胞密度为 70% ~ 80%。

8. 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养 24h，更换为 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基。

注：心肌细胞因传代操作暂时停止搏动，一般 1 ~ 3 天后恢复正常。

9. 待心肌细胞稳定搏动 1 ~ 2 天后，吸走 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基，加入 PBS 溶液清洗一次，更换为 CardioEasy® 人心肌细胞纯化完全培养基进行纯化。

10. 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养 4 天，过程中无需换液。纯化结束后，加入 PBS 溶液清洗一次去除死细胞，更换为 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基。

11. 1 ~ 3 天后，可观察到细胞恢复搏动，细胞纯度变高。

12. 可根据对心肌细胞纯度需求，重复以上步骤再次进行纯化。

注：再次纯化前细胞要恢复到稳定状态，一般建议更换为 CardioEasy® 人心肌细胞维持培养基，至少培养 3 天。

培养中的心肌细胞纯化：

1. 心肌细胞在长期培养过程中，具有增殖能力的少量杂细胞会逐渐增多，需要定期进行纯化。

注：心肌细胞纯化的合适密度不高于 80%，如果密度过大，推荐以适当的比例进行再接种。再接种操作会导致 20%的细胞死亡，计算密度时需将这 20%的细胞减除。再接种的细胞需要在 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基中恢复 4 天以上，观察到细胞正常搏动，才能进行纯化。

2. 吸走 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基，并且加入 PBS 溶液清洗一次。
3. 加入 CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基进行纯化，纯化过程中，每 3 天更换一次新鲜 CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基。
4. 心肌细胞达到所需的纯度，停止纯化。吸走 CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基，加入用 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基维持培养。
5. 如果纯化的过程中，观察到心肌细胞搏动减缓，停止纯化。吸走 CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基，加入 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基维持培养 3 天以上，待心肌细胞恢复正常搏动，再次用 CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基进行纯化。该步骤可以重复直至心肌细胞达到所需纯度。

疑难解答：

CardioEasy®人心肌细胞消化液传代心肌细胞时，何种程度才算是消化合适？超过推荐时间（30min）会对心肌细胞造成损伤吗？

加入 CardioEasy®人心肌细胞消化液后，显微镜下观察细胞脱离皿底，观察细胞呈“圆形”，即可终止消化。消化终止时细胞不需要

呈单细胞，而是通过吹打将细胞制成单细胞悬液。可根据具体情况适当延长/缩短消化时间，1小时之内，不会对心肌细胞造成过大损伤。

心肌细胞停止搏动或搏动缓慢

1) 心肌细胞在再接种操作后，需要1 ~ 3天才能恢复搏动；2) 心肌细胞在换液操作后、或在培养箱外放置过久，会减缓搏动或停止搏动，需要1 ~ 3小时才能恢复正常搏动；3) 心肌细胞长时间在CardioEasy®人心肌细胞纯化完全培养基中培养，搏动会减缓，需及时停止纯化，在CardioEasy®人心肌细胞维持培养基中恢复4天以上，才能再次纯化。