

从活组织培养层中分离独立的细胞团

简介

从活组织培养层中分离得到具有生物活性的细胞，用于随后的独立培养，对于涉及组织工程的许多研究，如肿瘤研究、干细胞分离等都具有一定的意义，Eppendorf 的压电式显微切割仪 PPMD (Piezo-Powered MicroDissection) 可成功地从培养的活组织细胞层中分离出相应的细胞，用于以后的培养。

材料与方法

细胞培养

大鼠的原代细胞，培养大约三周左右长成贴壁且正在三维生长的细胞团，分离这一大约有 150 μm 大小的细胞团用来做后续的培养。

设备

- Eppendorf MicroDissector 显微切割仪 1 个
- TransferMan® NK2 显微操作仪 2 个
- CellTram® vario 油压式注射器 1 个

耗材

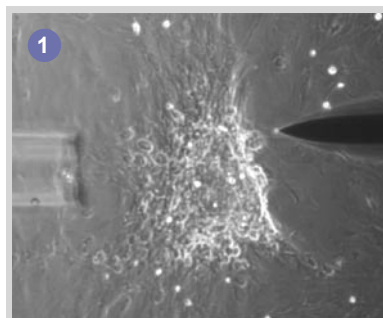
- Eppendorf MicroChisel 高频振动金属凿 (切割用)
- Eppendorf CustomTip number 02/223 定制的毛细管针 (取细胞用) (I 型，内径 150 μm ，折角 35°)

显微切割过程

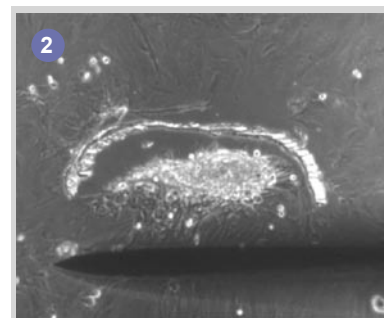
利用以超声振动的金属凿，可以将细胞团从周围组织中切割下来。切割完成后，可以操作 CellTram® vario (油压式注射器) 利用其产生的负压将细胞团吸入玻璃毛细管针中，然后移入另一个培养皿中。

下游应用

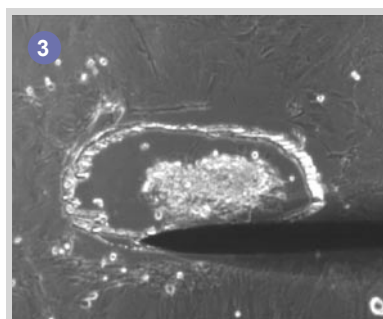
48 小时后移植来的细胞开始生长，表示从正在生长的组织中分离细胞成功。



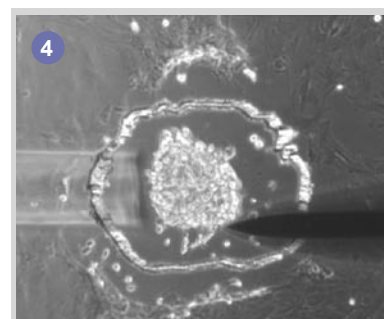
细胞团，大约 150 μm 左右大小



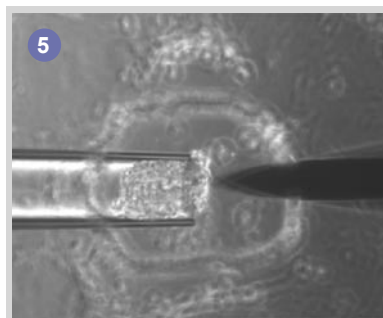
细胞团切割步骤 (a)



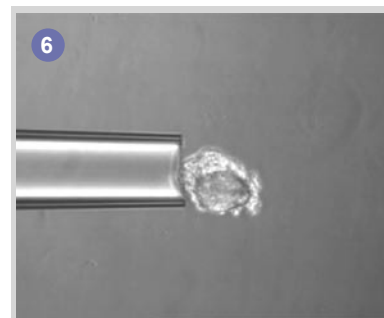
细胞团切割步骤 (b)



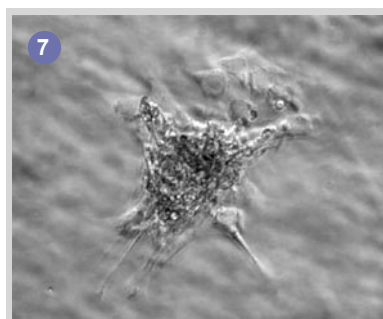
收集细胞团步骤 (a)



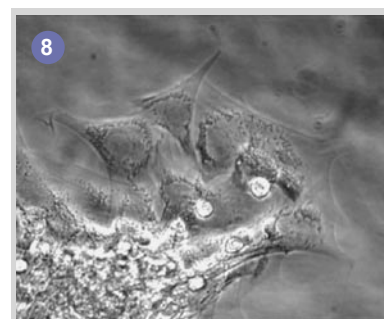
收集细胞团步骤 (b)



转移细胞团



24 小时后的转移细胞团



48 小时后的转移细胞团

显微切割步骤

仪器安装与调试

根据操作者个人喜好，可以将安装有切割器（MicroChisel）和毛细管针（CellTram® vario）的机械手放在显微镜的左侧或右侧。在大约 40° - 45° 的范围内移动切割工具。根据对许多组织操作的经验，我们建议采用折角为 35° 的毛细管针。根据毛细管针的角度可以调整其余装置的角度。至于培养皿和培养液，本案用的是直径 5 cm 的培养皿和 4 ml 的标准培养液。

1. 切割侧

以 MicroChisel 来定焦，根据要处理的组织来选择物镜倍数，将目标定在细胞高度密集的区域来选择一个细胞团，大约有 150 μm（如图 1）。（简单测量细胞团大小，可以用 TransferMan® NK2 的自带功能来完成，根据操作手册第 90 页的提示，设坐标为“0”，沿着目标区域移动 TransferMan® NK2 和操作臂等，在坐标轴的帮助下测量细胞团的大小。）

设置参数：

根据 MicroChisel 和组织间的相互作用，将频率值设在 40-55 kHz 左右。设置幅度大约为 50%。MicroChisel 可以通过脚踏板等来控制。

注意：

- 桔色灯亮表示“外源控制”接通
- 在显微镜下可以监控 MicroChisel 的振动，并且可以根据观察到的 MicroChisel 和组织间的相互作用来调整频率和幅度
- 避免无规则或过强的 MicroChisel 振动
- 在切割时，通过按“Limit”键（TransferMan® NK2）来设置一个 Z-limit 功能，这一功能对于保证操作中的水平工作平面状态是非常实用的

2. 移取侧

将毛细管针置入工作面中定焦，根据组织大小来选择放大倍数。在显微切割开始前，毛细管可以放在目标细胞上方不远的“停泊”位置。

提示：用显微操作仪控制面板上的功能键“Pos 1-3”，可以贮存位置。

切割和移取细胞团

- 1 调低 MicroChisel 至培养皿底部
- 2 通过踩脚控装置启动 MicroChisel 振动
- 3 用高频率开始切割细胞
- 4 为了从贴壁生长的细胞团中获得一个满意的切割结果，您可以根据培养皿底水平设 Z-limit 功能键（Eppendorf TransferMan® NK2），切割可到培养皿的塑料底板上。MicroChisel 最好的切割方向是从细胞团的左侧到右侧（见图 2）。谐振保证了将细胞从培养皿上分离下来
- 5 停下切割，调整位置，再次从左向右切割（见图 3）
- 6 停止振动，将细胞团小心地从培养皿上刮下来
- 7 将切割器稍退后一点
- 8 切割后立即将毛细管针（CellTram® vario）调低（见图 4）
- 9 移动毛细管针到切下来的细胞团处
- 10 逆时针旋转活塞旋钮用 CellTram® vario 吸取这一区域细胞（见图 5）
- 11 手动调高毛细管针和切割器
- 12 换培养皿
- 13 通过手动调低毛细管针，并且顺时针旋转活塞旋钮释放转移的细胞团（见图 6）
- 14 24 小时（见图 7）和 48 小时（见图 8）后观察生长的细胞

常见问题及解决方法：

- 1 虽然 MicroChisel 正常振动，但切割形状不正确
 - 切割器的角度不够（大约 40° - 45°）
 - MicroChisel 钝了，需要更换
- 2 细胞不能从培养皿底切下来
切到培养皿底板的塑料上。通过利用 MicroChisel 振动技术帮助细胞从培养皿底分离下来

参考文献：

Kramer et al. (2000): Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of Development* 92, 193-205.

作者 Charli Kruse, Institute for Medicine, Molecular Biology at the University of Lübeck, Germany
Nada Pavlovic, Eppendorf AG