



Cardiosight®

应用说明书

适用于 Axion Maestro MEA

目录

1. 介绍2

 Cardiosight® MEA 电生理研究.....2

 所需材料设备、耗材和软件.....3

2. MEA 培养皿细胞铺板4

 MEA 培养皿包被.....4

 MEA 培养皿细胞复苏与铺板.....5

3. MEA 检测.....7

 MEA 培养皿细胞维持培养.....7

 药物准备、数据记录和分析.....8

1. 介绍

Cardiosight® MEA 电生理研究

Cardiosight® 是人源诱导性多能干细胞 (hiPSC) 衍生的心肌细胞，复苏后可用于各种功能性检测，培养时间短，加速用户的研究进展。NUOXINTE 提供 Cardiosight® 在 Axion Maestro MEA 平台上的应用说明书，通过局部场电位 (Local Field Potential, LFP) 检测心脏电生理。Cardiosight® 与 Maestro MEA 技术结合，可以利用与综合体外致心律失常测评价 (CiPA) 肌细胞研究 (Blinova 等人，2018) 相同的方法可靠地检测潜在心律失常风险。图 1 为示例。

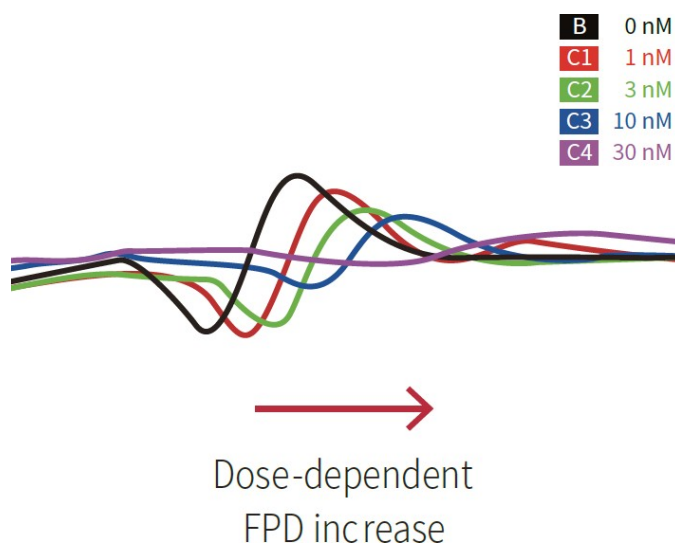


图 1. 使用 Axion Maestro 检测 E-4031 对 Cardiosight® 的影响。

此应用说明书给用户提供了如何为心脏安全性评价铺板和培养 Cardiosight® 的指导。

Cardiosight® 应用说明书 不是独立说明书，应与 **Cardiosight® 产品说明书** 一起观看。

为了更好地理解，我们建议与视频一起观看。

(<https://www.youtube.com/watch?v=XBIZq31qEAI&t=56s>)。

所需设备、耗材和软件

物品	供应商	货号
设备		
多通道移液枪：8 或 12 通道	多家供应商	
MEA 系统	Axion	
耗材		
Cardiosight®, 冷冻保存 hiPSC 衍生的心肌细胞	诺欣特	C-001/C-002
Cardiosight® Advanced 培养基	诺欣特	CMS001A/002A
CytoView MEA 24	Axion	M384-tMEA-24w
CytoView MEA 48	Axion	M768-tMEA-48w
Fibronectin	Sigma-Aldrich	F0895
加样槽	多家供应商	
软件		
AxIS Navigator	Axion	
Cardiac Analysis Tool	Axion	

2.MEA 培养皿细胞铺板

MEA 培养皿包被

1. 计算需要包被的体积，每个孔需要 5 μl 。

 例如，包被 MEA 48 孔培养皿，总共需要准备 250 μl (以 50 孔计算，以防误差)。

2. 请参考以下表格，将包被溶液稀释成工作浓度。稀释后的包被溶液可放 4°C 下储存一段时间 (1 小时)，但建议尽快使用。

包被溶液种类	保存浓度	工作浓度
Fibronectin	1 mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$ (1:20 dilution)

 不建议除了 Fibronectin 以外其他任何包被溶液。

3. 以一定角度握住培养皿，以便能够看清每个孔中的电极。将适量的包被溶液 (5 μl) 滴入孔中心覆盖电极。此步骤决定了细胞的接种位置，请覆盖中间所有测量电极，最好避免覆盖旁边 T 形参考电极。

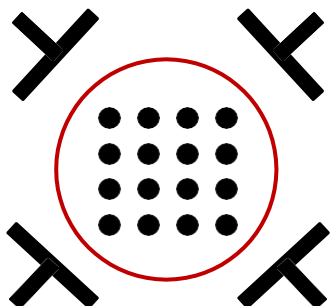


图 2. 包被液滴放置图

无论培养皿规格如何，所有 Axion 培养皿的形状都相似，中心有较小的圆形测量电极，外围有 T 形参考电极。如图所示，将 5 μl 包被液滴覆盖到红色测量区域。

4. 请在 MEA 培养皿孔与孔之间的缝隙处均匀添加 6~8 ml D-PBS，防止包被液滴变干。包被液滴变干细胞将无法附着。
5. 在 37°C 下孵育 1 小时。

 包被时间需要准确遵循一小时，且防止变干。我们建议孵育 40 分钟时候开始细胞复苏过程。

MEA 培养皿细胞复苏与铺板

1. 根据 Cardiosight® 产品说明书 (第 8 页) 复苏细胞。

2. 计算所需细胞总数，每个孔需要 50,000 个细胞。

 例如，接种 MEA 48 孔培养皿，总共需要 2,500,000 个细胞 (按 50 个孔计算，以防误差)。

3. 将相应细胞数量的细胞重悬液转移到 1.5 毫升离心管中。

4. 在室温下以 180 g 离心 3 分钟。

5. 小心地吸走上清液。

6. 加入相应 Advanced 铺板培养基重选重悬细胞 (细胞浓度: 50,000 个细胞/5 μ l)。

 例如，2,500,000 个细胞，加入 250 μ l Advanced 铺板培养基。

7. 将孵育中的 MEA 培养皿取出。为了下一步铺板操作，请吸走缝隙中加入的 D-PBS。

 加上细胞复苏约 20 分钟，包被时间刚好 1 小时。

8. 吸走包被溶液，每个孔加入 5 μ l 细胞悬浮液到包被区域。

 可稍微倾斜培养皿，准确观察包被位置。建议每次操作 6 个孔，防止包被区域变干导致细胞附着不良。由于表面张力，加入细胞重悬液后不会扩散出包被区域。

9. MEA 培养皿缝隙中重新均匀添加 3~5 ml D-PBS，防止细胞重悬液变干。

10. 室温下孵育 1 小时。

11. 待细胞贴壁，每个孔轻轻加入 300 μ l Advanced 铺板培养基。

12. 将培养皿放入培养箱。

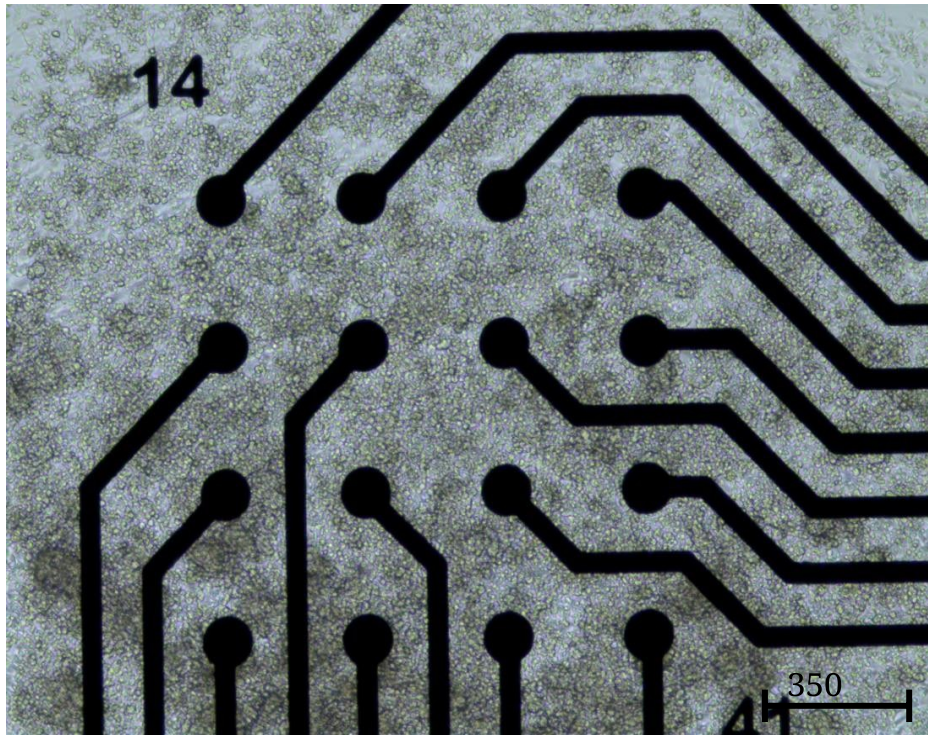


图 3. 细胞铺板后第一天 Cardiosight® 的形状 (40 倍)。

3.MEA 检测

MEA 培养皿细胞维持培养

细胞铺板 24 小时后进行第一次换液，此后每 48 小时换液。

1. 根据 Cardiosight®产品说明书准备 Cardiosight® Advanced 维持培养基。
2. 室温 (25°C) 下放置 Cardiosight® Advanced 维持培养基至少 20 分钟。
3. 用移液枪贴边吸走液体，加入 300 µl Advanced 维持培养基。注意慢慢操作，避免破坏心肌细胞层或触碰细胞。

 细胞全程进行全量换液。

 请勿一次性吸走所有孔。建议每次操作 6 个孔，避免细胞与空气接触时间太长。

 请勿倾斜培养皿，换液请保持培养皿放平。

4. 将 MEA 培养皿放回培养箱中。
5. 每隔 48 小时重复步骤 2-3。
6. NUOXINTE 建议第 7 天开始进行检测。

药物准备、数据记录和分析

当对细胞进行 MEA 电生理检测时，我们建议在实验当天早上进行一次换液，确保细胞有足够的营养维持高药物反应性。

1. 第 7 天，在主要实验开始前至少 3 小时，用 300 μ l Cardiosight® Advanced 维持培养基进行全亮换液。
2. 制备药物处理组 (Treatment group) 和对照组 (Control group)，制成最终工作浓度的 10 倍，且每个孔所需的量为 30 μ l (300 μ l 体系)。我们建议一种药物至少为 n=3，n=5 组以符合 CiPA 标准。如果是在单个孔中连续增加浓度，请计算后制备相应药物溶液浓度。下面提供示例。

工作浓度 (nM)	3	10	30	100
单次处理药物溶液浓度 (nM)	30	100	300	1000
单个孔连续处理药物溶液浓度 (nM)	30	73	210	730

3. 根据您的实验计划，在 AxIS 软件中将 MEA 培养皿分组。
4. 将 MEA 培养皿放入 Axion Maestro 中并按下开始键。
5. 首先进行基线测量 (baseline measurement)。打开 MEA 培养皿盖子，利用多通道移液枪以 30 μ l 体系上下吹打两次，模拟药物处理过程。
 吹打的目的是尽量与后面药物处理的条件保持一致。
6. 盖上 MEA 培养皿盖子平衡 5 分钟，然后记录 5 分钟。
7. 接下来是药物处理。先从每个孔中移出 30 μ l 培养基，然后添加 30 μ l 制备的药物溶液。上下吹打两次，确保药物完全加入。
8. 加入药物后平衡 1 小时 (至少 30 分钟)，然后记录 5 分钟。
9. 单个孔连续处理药，重复步骤 7 和 8。通常，单个孔测量 4 种不同的浓度 (Axion 心脏分析软件支持的数量) 没有任何影响。
10. 分析记录数据。