

用 Celcradle 培养 HEK293T 细胞系操作手册

内容	页码
1、说明.....	2
2、材料.....	3
3、方法.....	4
3.1 载体包被（可选）.....	4
3.2 种子液解冻/扩增培养.....	4
3.3 CelCradle 接种.....	4
3.4 选择灌流培养.....	5
3.5 细胞增殖监控.....	5
3.6 细胞收获.....	6
4、结果.....	7
4.1 细胞生长曲线.....	7
4.2 pH 和 CO ₂ 浓度概况.....	7
4.3 葡萄糖指标.....	7
4.4 细胞染色.....	8
4.5 细胞活性.....	8
4.6 细胞形态学分析.....	9



1、说明

CelCradle 是细胞培养中获得高细胞密度的有力工具，它提供了一个低细胞撕裂、高氧气饱和度及高营养浓度的细胞培养环境。用户可以轻松收集高浓度细胞作为“种子”，用于如 TideXcell-002 这种更大规模的生物反应器，或建立高密度细胞库。本研究阐述了 CelCradle 500A 和 500AP 在 HEK293T 细胞扩增中的应用。每瓶接种 0.75×10^8 个细胞，收获得到 2.44×10^9 个细胞。为了监控细胞每天的生长情况，通过胰蛋白酶消化得到细胞并进行活细胞计数。结果显示，在维持高代谢率的情况下，8 天内共增加了 33 倍。而且分批培养与连续灌流培养的细胞增量无明显差异。此外，与分批培养系统相比，连续灌流培养系统中细胞培养环境变化较小，pH 和葡萄糖波动小，更有利于耐受度小的细胞。此操作手册为刚开始培养细胞的用户提供一个通用的操作规程。然而，每种细胞在不同情况下的最佳培养条件不一样，需要用户自己优化。

2、材料

- 0.01%多聚-L-赖氨酸 (Sigma P4707)
- PBS 不含 Mg^{2+}/Ca^{2+}
- HEK293T (ATCC: CRL-3216)
- 完全培养基:
 - DMEM 高糖培养基 (Hyclone SH30022.01)
 - 1X 青霉素/链霉素 (ThermoFisher Scientific 15141022)
 - 25 mM HEPES (Gibco 15630080)
 - 10% FBS (Hyclone SV30160.03HI)
- CelCradle™ 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell)
- CelCradle™ 500AP (EscoAster/VaccixCell)
- GlucCell 葡萄糖检测仪及检测试纸
- pH 计
- 长镊子
- A/AP 过滤器
- 荧光素二乙酸酯 (FDA) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- 碘化丙啶 (PI) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- Hoechst (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ThermoFisher Scientific)
- PrestoBlue 试剂 (ThermoFisher Scientific)
- 0.05 % Trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific 25300054)
- 75 g/L 碳酸氢钠 (0.22 μm 过滤)
- 100 g/L 葡萄糖溶液 (0.22 μm 过滤)

3、方法

3.1 载体包被（可选）

- a. 取一个 CelCradle™ 培养瓶至生物安全柜中
- b. 用 0.01% 多聚-L-赖氨酸（PLL）包被载体，静置 30 分钟
- c. 吸除 0.01% 多聚-L-赖氨酸
- d. 用 250 ml PBS 缓冲液冲洗载体
- e. 吸除 PBS 缓冲液
- f. 无菌晾干过夜，待用

3.2 种子液解冻/扩增培养

提前准备好种子液

- a. 使用传代数低的细胞
- b. 解冻的细胞至少需要传代 2 次才能使用
- c. 传代细胞在 1:5-8 比例下，细胞汇合度不超过 85%

（注意：不要使胰蛋白酶过度消化细胞。过度消化会对细胞表面蛋白质造成损伤，影响细胞附着率）

3.3 CelCradle 接种

第 0 天：细胞接种

- a. 准备 150 ml 含 0.75×10^8 个细胞的新鲜细胞悬液
- b. 将细胞悬液缓慢倒入 CelCradle500A（CC）培养瓶
- c. 压缩波纹管尽可能地排出培养瓶中的空气，然后用白色密封盖盖紧培养瓶。
- d. 倒转培养瓶，使所有的载体完全浸没在细胞悬液中。
- e. 将培养瓶倒置于二氧化碳培养箱中，设置 5% CO_2 ，37°C 孵育。
- f. 孵育 3h 至 5h，期间每隔 30 分钟，轻轻地旋转培养瓶，使尚未附着在载体上的细胞在溶液中均匀混合，以便进一步附着。
- g. 孵育 3h 后，将培养瓶移至生物安全柜中，轻轻摇晃，使瓶中的载体和细胞悬液混匀，然后取少量培养液进行细胞计数，计算未贴附细胞数（悬浮细胞），回算细胞贴附率。
- h. 若贴附率达到 80%，则向培养瓶中加入新鲜的完全培养基至 500 ml，盖上蓝色通气盖。
- i. 将培养瓶放至 CelCradle 平台，设置运行参数，过夜培养。

- i. Uprate: 1 mm/sec
- ii. Uphold: 1 min;
- iii. Downrate: 1 mm/sec
- iv. Downhold: 1 min

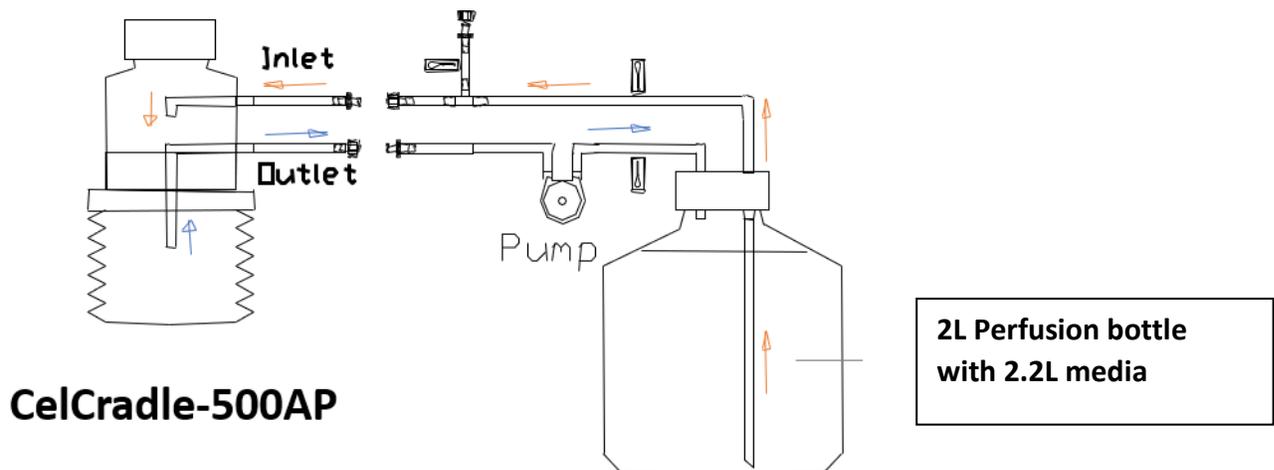
注：

可以延长孵育时间，再计算细胞贴附率。通常，3-5 h 细胞就可以完全附着，5h 后细胞附着率不会再增加。

3.4 选择灌流培养（500 AP）

如果选择灌流培养装置需准备：

- a. 装有 2.2 L 载体的 2 L 玻璃培养瓶
- b. 将玻璃培养瓶与 CelCradle (500 P 或 500 AP)和泵相连接（如下图）
- c. 设置相应的运行程序：
 - i. 灌流体积（标准设置：1999 ml）
 - ii. 运行时间及天数
 - iii. 循环频率（标准设置：24 个循环/天）



3.5 细胞增殖监控

每天监测剩余葡萄糖含量和 pH 值，判断是否需要更换培养基或者补充葡萄糖及碳酸氢钠。

- a. 取 2 ml 培养液：pH 和葡萄糖检测
- b. 取 3 片载体（可选操作）：根据 PrestoBlue™试剂标准操作步骤检测细胞活性

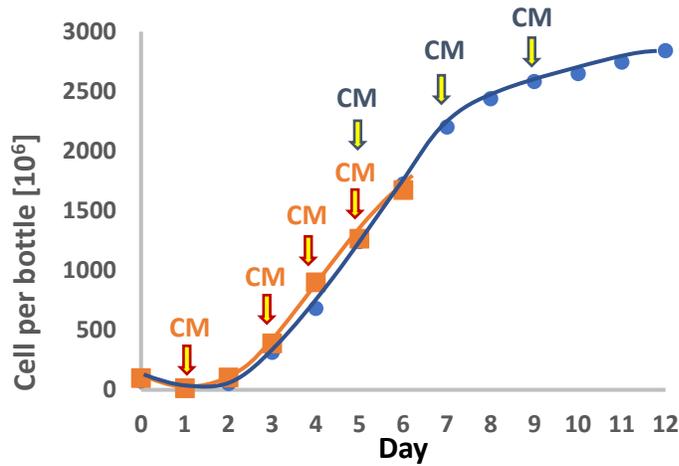
- c. 取 3 片载体：根据荧光素二乙酸酯（FDA）、碘化丙啶（PI）和 Hoechst 染色的标准操作步骤分别对活/死细胞进行染色。
- d. 取 10 片载体：用胰蛋白酶消化收集细胞，并对活细胞进行计数（参考细胞收集操作步骤）
- e. 当葡萄糖浓度 < 1 g/L 时，更换新鲜培养液
- f. 维持 pH > 6.80：
如果 pH 降至 7.10，则降低 CO₂ 浓度。如果 CO₂ 浓度已经为零，则加入少量碳酸氢钠溶液（约 0.1g / L）缓冲，再观察 3 小时。如果需要，可添加更多碳酸氢钠

3.6 细胞收获

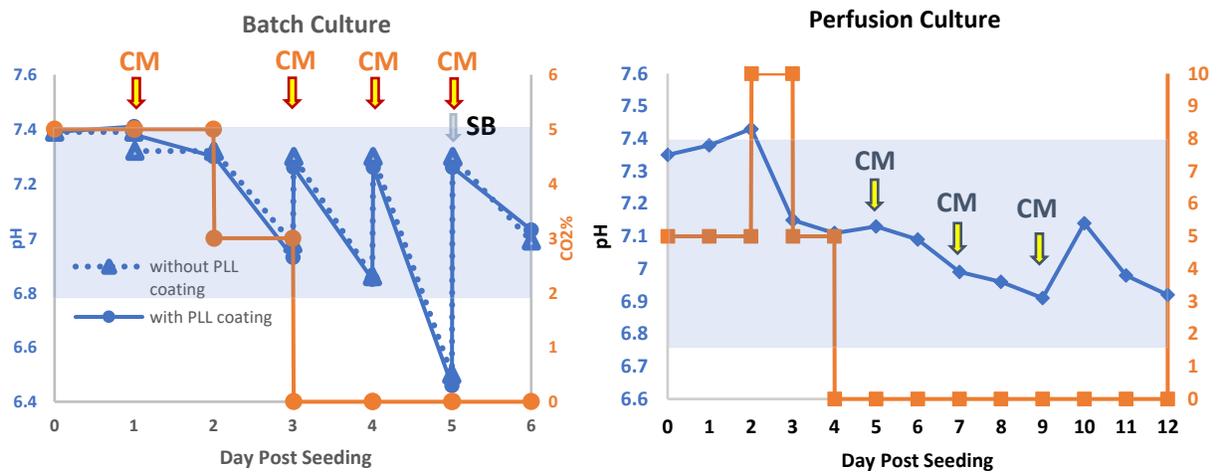
- a. 排尽培养瓶中的培养液（倒出培养基时可以用过滤器防止载体倒出）
- b. 加入 250 ml PBS，用白色密闭盖盖住培养瓶，倒转并旋转培养瓶 20 sec 使载体完全浸没在 PBS 中
- c. 弃 PBS
- d. 用 PBS 重复清洗一遍
- e. 弃 PBS
- f. 加入 120-150 ml 预热的 0.05% 胰蛋白酶溶液，盖上白色密闭盖
- g. 上下翻转培养瓶使载体与胰蛋白酶溶液充分混合
- h. 将培养瓶置于 37°C 二氧化碳培养箱中孵育 15-20 min
- i. 加入 15 ml 100% FBS 中和终止消化
- j. 用白色密闭盖盖住培养瓶，倒置瓶身，用力摇晃拍打瓶身载体腔室部分 1 min（参考附件操作视频）
- k. 收集细胞悬液，可使用过滤器防止载体倒出
- l. 用 100 ml 完全培养基收集细胞，重复收集 4 次
- m. 将所有细胞悬液混合
- n. 4°C, 1500 rpm, 离心 10 分钟
- o. 弃上清
- p. 用完全培养基重悬细胞
- q. 活细胞计数
- r. 收集的细胞可用于后续如 TideXcell-002 大规模生物反应器，或建立高密度细胞库

4、结果

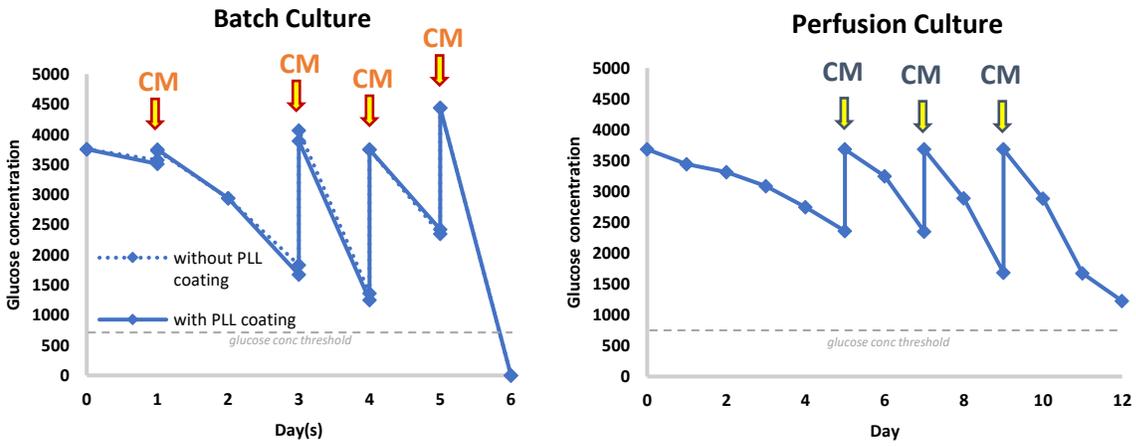
4.1 细胞生长曲线（橙色：分批培养；蓝色：连续灌流培养）



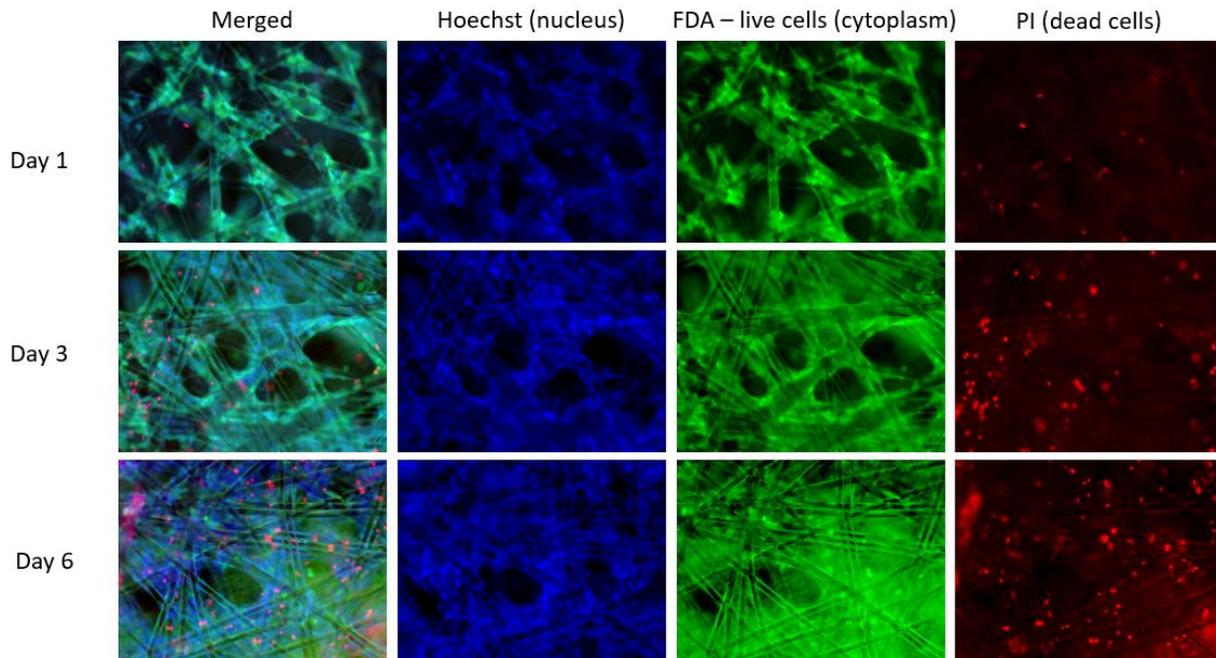
4.2 pH 和 CO₂% 变化曲线



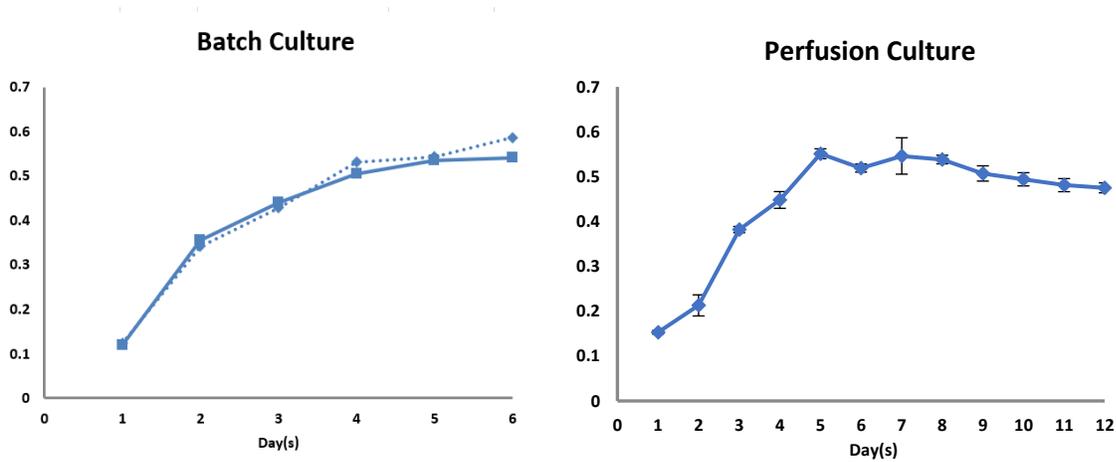
4.3 葡萄糖指标



4.4 细胞染色

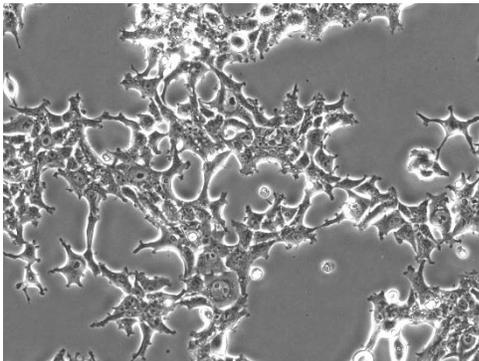


4.5 细胞活性

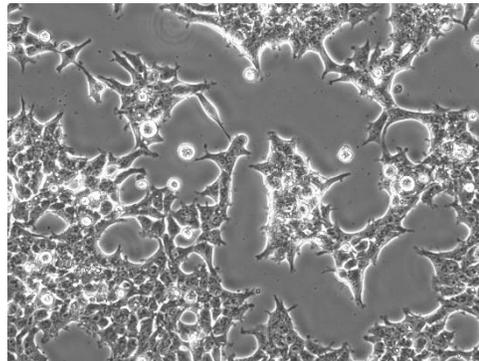


4.6 片状载体上收集的细胞形态学分析

第 0 天接种细胞



2D 培养瓶培养已在 CelCradle 培养 6 天所收集的细胞



细胞存活率大于 95%时，细胞收获率大于 90%。将从 CelCradle 收集的细胞在 2D 培养瓶培养过夜，结果显示仍维持健康的细胞形态。