

概念验证

BioNOC™ II 载体潮汐运动细胞培养手册

内容

| | |
|---|---|
| 简介 | 2 |
| 使用 CelXrocker™ 在 BioNOC™ II 载体上培养细胞 | 2 |
| CelXrocker™ 细胞培养 | 3 |
| 载体高压灭菌 | 3 |
| 载体附着因子包被（如有需要） | 3 |
| 接种 | 3 |
| 细胞培养 | 4 |
| 监控 BioNOC™ II 载体上细胞增殖情况 | 5 |
| 细胞收获和计数 | 5 |
| 细胞染色及观察 | 6 |
| 细胞染色示例 | 7 |

简介

使用 CelXrocker™ 在 BioNOC™ II 载体上培养细胞

潮汐式生物反应器依据潮汐涨落的原理，通过波纹管的压缩和解压，间歇性地将培养液推入和运出载体，实现固定填充床内培养液和气体运输（图 1）。

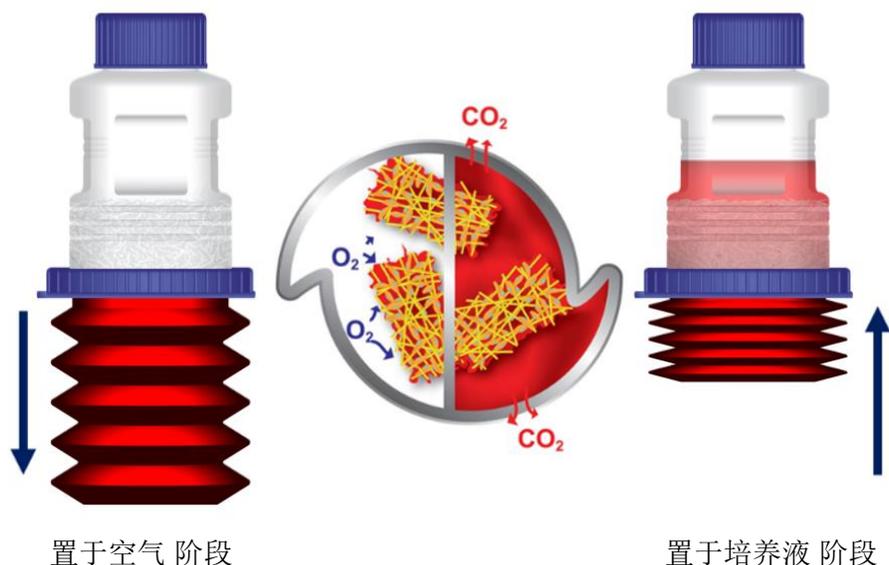


图1: CelCradle™通过潮汐式原理运行，其中附着于 BioNOC™ II 载体上的贴壁细胞通过瓶子压缩，让细胞交替暴露于空气和培养液。

CelXrocker™是一个小型潮汐式系统，以较低的成本实现初始实验过程的优化。在该系统中，将贴壁细胞接种至 BioNOC™ II 载体，并无菌转移到培养瓶中，然后将培养瓶放置在 2D 摇床上。摇床的摇摆运动模拟 CelCradle™潮汐式系统，将细胞交替暴露于培养液和氧气中（图 2）。

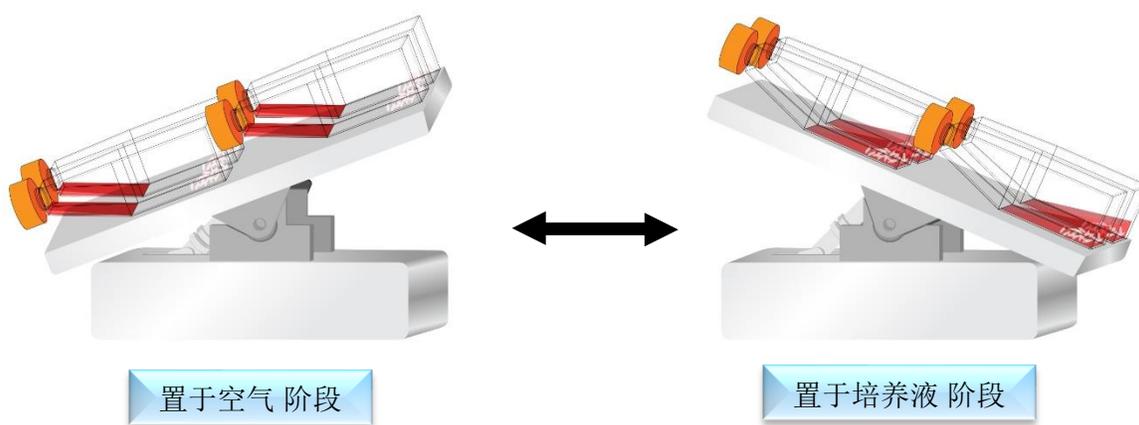


图2: CelXrocker 系统通过使用培养瓶和摇床，模拟 CelCradle 潮汐式系统，将细胞交替暴露于培养液和氧气中。

CelXrocker™ 细胞培养

载体高压灭菌

1. 将载体放入可高温高压灭菌的容器中。
2. 加入 PBS，使载体完全浸没在 PBS 中。
3. 121°C 高压灭菌 20 分钟。
4. 将载体保存在 PBS 中直至使用。

注：灭菌时请勿使载体处于干燥状态。

载体附着因子包被（如有需要）

1. 将灭菌后的载体无菌转移到 50 ml 离心管中。
2. 吸出多余的 PBS。
3. 按照供应商的建议加入包被材料。载体应根据厂家建议的时间和温度浸没在包被溶液中。
4. 去除包被溶液。
5. 如果需要可用 PBS 冲洗。
6. 保存已包被的载体，储蓄在适当的温度下直到使用。

接种

1. 将 30 片 BioNOC™ II 载体无菌式转移至 50 ml 离心管中。
2. 接种所需要的细胞数量至 50 ml 离心管中的载体上。不同种类细胞的最佳接种密度可参考表 1。
3. 添加培养液以确保载体完全浸没。pH 值需维持在 7.0-7.4 之间（最佳 pH 值 7.2）。

表 1. 不同种类细胞的最佳接种密度。

| 细胞类型 | 接种密度指标（细胞量/载体） |
|--------------------------------------|-------------------|
| CEF | 300,000 – 500,000 |
| A-549 | 200,000 – 300,000 |
| CHO | 100,000 – 300,000 |
| HEK293T / PK-15 / IBRS-2 | 100,000 – 300,000 |
| Vero | 100,000 – 300,000 |
| Hybridoma (OKT3) | 100,000 – 300,000 |
| MDCK | 60,000 – 120,000 |
| Leghorn male hepatoma (LMH) | 50,000 – 200,000 |
| MARC-145 | 50,000 |
| Human mesenchymal stem cells (hMSCs) | 20,000 – 60,000 |
| Human diploid cells (WI-38 / MRC-5) | 15,000 – 20,000 |

注：多种细胞类型均可在载体上播种。若细胞类型不在表中，可与 Esco 人员联系。

4. 倾斜并旋转离心管 2-3 次，以使细胞与载体均匀混合（参见图 3）。

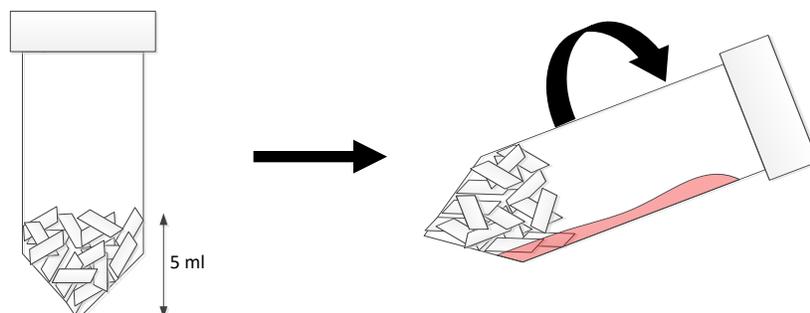


图3: 倾斜旋转离心管。避免倾斜超过90°, 以减少细胞损失。

5. 将离心管直立置于 37°C, 5% CO₂ 的 CO₂ 培养箱中 3-5 小时。放置在培养箱时, 把管盖松开。
6. 在第一个小时内每隔 15 分钟, 重复步骤 4 以混匀已沉到管底的细胞。
7. 在接下来的 2-3 小时内, 以 30 分钟的间隔重复步骤 6。
8. 孵育 3h 后, 将离心管放入生物安全柜中, 轻轻混合培养液并吸取约 50 μl 培养液进行细胞计数。可用细胞计数板或自动细胞计数器对培养液中的悬浮细胞进行计数, 并计算附着细胞的百分比。
9. 如果达到 90% 的附着率 (即小于 10% 的细胞残留在培养液中), 继续进行细胞培养步骤。一般情况下, 细胞在 3-5 小时之间即可得到 >90% 的附着率。

注: 为确保较高的贴附率, 15 ml 离心管至少需要 3 片载体, 50 ml 离心管至少需要 10 片载体。需添加足够的培养液浸没载体。如果不在离心管接种细胞, 细胞贴附率可能更低。

细胞培养

1. 准备一台小型摇床并放入 CO₂ 培养箱内, 调整摇摆速度, 使得速率为 4 个循环/分钟 (每个循环包括从左侧→右侧→左侧摇摆)。
2. 孵育结束后, 用无菌钳将载体从离心管转移到含有 18 ml (0.6 ml 培养液/载体) 新鲜培养液的 T-75 培养瓶中。
3. 离心收集离心管中剩余的接种培养基, 用于计数未附着细胞总数, 以确定最终的附着效率。
4. 将 T-75 培养瓶置于 37°C, 5% CO₂ (可根据所培养的细胞进行设置) 的 CO₂ 培养箱中摇床上。
5. 每 2-3 天更换新鲜培养液, 或根据您实验室建立的细胞培养方法调整。

操作注意事项:

- 接种后, 细胞温和地附着在载体上。移动时要小心, 防止细胞脱落。
- 使用 Esco CelXrocker™ 或具有 4-6 个循环/分钟缓慢摇摆速度的 2D 摇床。如果摇摆速度过快, 细胞可能脱离或减少生长。在这种情况下, 我们建议在静态条件下培养细胞, 但由于营养不足, 细胞可能无法达到最佳生长条件。如果没有使用摇床, 则添加足够的培养基以浸没载体, 并保持静止状态培养。测试的最佳条件是使用 2D 摇床向左、向右移动并返回到左。使用轨道摇床/3D 摇床或在静态条件下培养可能会得到不理想的结果。
- 培养基的量和培养瓶的大小需要根据使用的载体数量来调整。例如, 要在单个方瓶中培养 50 个 BioNOC™II 载体上的细胞, 可以将载体置于装有 30 ml 培养基的 T-175 烧瓶中。在 T-25 烧瓶中应使用不超过 5 ml 的培养液 (10 片载体), 使用 T-75 培养瓶 (30 片载体) 时不超过 18 ml 培养基, 或 T-175 培养瓶 (50 片载体) 时不超过 30 ml 培养基, 避免在摇床上摇动过程中渗漏或弄湿过滤器通风口, 预防细胞污染。
- 初始试验建议添加 0.6 ml (可调整) 培养液/载体, 但可根据不同细胞类型的需要进行调整。0.6 ml/载体的添加量是模拟在使用 CelCradle 时, 每片载体可用的培养液量 (每个瓶子装有 850 片载体, 共有 500 ml 培养液, 相当于每片载体拥有 0.6 ml 的液体量可消耗)。但是, 如果有意向进入 CelCradle 平台的灌流培养系统, 则可以为每个载体提供更多的培养基。

- 初始试验培养过程中，建议在整个培养期间监测细胞在载体上的生长情况。细胞计数可以通过每隔一天取 3 个载体并收集细胞来进行。同时也可取 1 或 2 个载体进行染色，以便直接观察细胞在载体上的生长（参考下面的建议操作）。

监控 BioNOC™ II 载体上细胞增殖情况

细胞收获和计数

1、通过酶解试剂

消解酶液：Accumax, 胰蛋白酶 0.25%, TrypLe Express, 胶原酶

1. 将 3 片载体从培养瓶无菌转移到 1.5 ml 微量离心管中。
2. 用 1 ml PBS（不含 Mg^{2+}/Ca^{2+} ）轻轻洗涤载体，每次清洗时上下温和倒转离心管 5 下，洗 3 次。
3. 进行酶消化反应：
 - i. 胰蛋白酶/ TrypLE Express：（大多数细胞类型）
 - 加入 1 ml 0.05% - 0.25% 胰蛋白酶-EDTA，在 37°C 孵育 10-15 分钟。
 - ii. Accumax / Accutase：（适用于干细胞/原代细胞）
 - 加入 1 ml Accumax / Accutase，在室温下孵育 15-30 分钟。孵育时间取决于细胞密度，建议进行 15 分钟、20 分钟、30 分钟的时间优化。Accumax 建议用在 3D 培养的细胞。但是，您也可以使用您首选的消化酶/方法。
 - iii. 胶原酶：（适用于干细胞）
 - 用 HBSS 稀释胶原酶，配置含有 100 units/ml 胶原酶的酶消化液。
 - 加入 1ml 胶原酶消化液并孵育 15-30 分钟，可根据需要适当延长孵育时间。
4. 孵育结束后，用移液器将酶溶液转移到 15 ml 收集管中。
5. 加入中和液或 PBS 至含有载体的 1.5 ml 微量离心管中。用镊子背面轻弹管子 40-60 次。
6. 将溶液转移到 15 ml 收集管中。
7. 重复步骤 5-6 至少 3 次以上（用 1 ml PBS 或培养液）。
8. 将收集的溶液离心，弃上清，重新悬浮细胞在少量培养液中并置于细胞计数板或自动细胞计数器上进行细胞计数。
9. 计算每片载体所获得的平均数量。
10. 将收获的细胞放入培养皿或培养瓶中重新培养，观察其形态和活力。

操作注意事项：

- 可以直接按上述方法收集 T-75 或 T-175 整个培养瓶细胞。加入足够的酶以完全浸没载体（每 10 片载体加入 1.5-2 ml 酶）。在孵育时，倾斜培养瓶，使载体集中到一个角落，确保载体完全被酶液浸没。

2、通过 CVD（结晶紫染料）试剂

注：CVD 试剂由 ESCO 提供，产品目录编号 1400014。由于干细胞分泌大量 ECM，不适合用于干细胞。

1. 将 3 片载体从培养瓶无菌转移到 1.5 ml 微量离心管中。
2. 加入 0.5 ml CVD 试剂至 1.5 ml 微量离心管中。
3. 漩涡振荡 60 s。
4. 将 1.5 ml 微量离心管置于 37°C 培养箱中孵育 2 h。
5. 孵育期间漩涡振荡数次。
6. 细胞核计数，并计算每片载体上的平均细胞数。

细胞染色及观察

用染料染色

1. 从培养瓶中取 1-2 片 BioNOC™ II 载体无菌转移至 24 孔板。
2. 用 70%-100% 乙醇处理 15 分钟以固定细胞。
3. 用去离子水或 PBS 清洗乙醇一次。
4. 用苏木精或 H&E 染料染色细胞 5-10 分钟。
5. 用去离子水洗掉多余的染料。
6. 在明视野/明场显微镜下观察带有细胞的载体。

注：可使用其它类型的染料，如台盼蓝。使用荧光染料染色，可以更好地观察细胞在载体中的残留情况。可见染料不能提供清晰的视野，不建议使用。

活细胞荧光染色

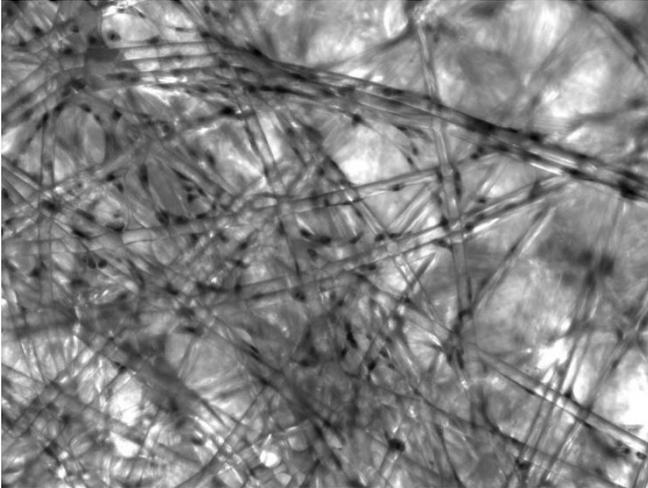
1. 从培养瓶中取 1-2 片 BioNOC™ II 载体无菌转移至 24 孔板。
2. 加入 500 μ l 培养液。以下列最终浓度添加染料：培养液中 1 μ g/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher, H3570)，1 μ M Calcein green (Thermo Fisher, C34852) 和 1 μ g/ml PI (Propidium iodide 碘化丙啉, Sigma Aldrich P4170)。也可以使用 Fluorescein diacetate、Cell Tracker、DAPI 等其他荧光染料。
3. 在 37°C，5% CO₂ 下孵育载体 30 分钟，然后在荧光显微镜下捕获图像（蓝色的是 Hoechst 33342，绿色的是 Calcein green，红色的是 PI）。

注：其他类型的荧光染料也可用于细胞染色。如钙黄绿、吖啶橙、细胞跟踪器等

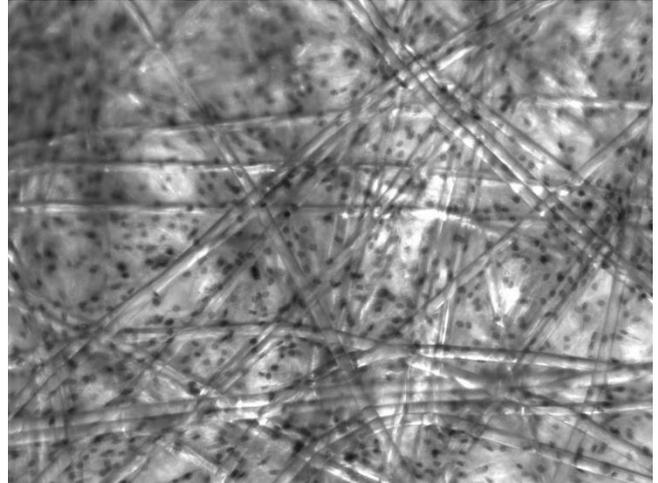
细胞染色示例

1. 人间充质干细胞（hMSCs）固定后，进行苏木精（hematoxylin）染色

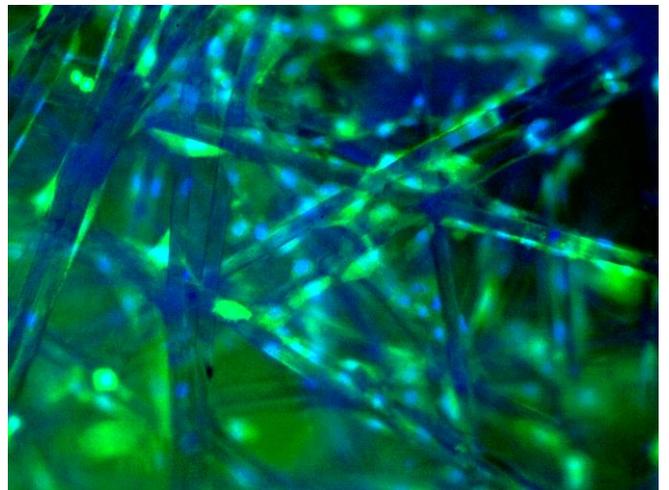
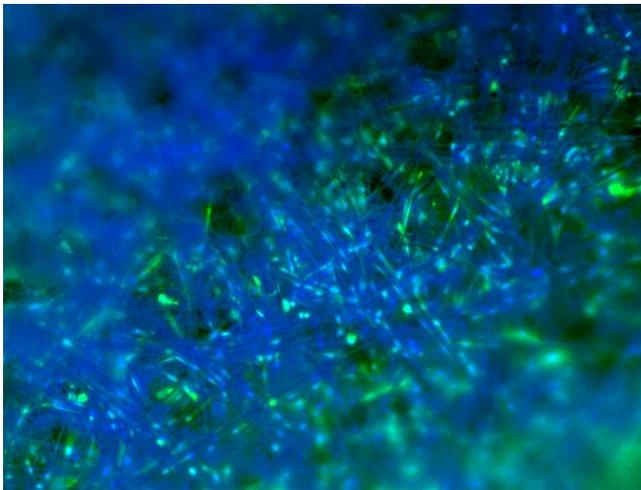
第 1 天



第 3 天



2. 人间充质干细胞（hMSCs）的荧光染色



绿色：Calcein green 染活细胞质

蓝色：Hoechst 33342 染活细胞核

红色：propidium iodide 染死细胞（没有或很少观察到）