

BioNOC™ II 载体 - 细胞培养步骤

内容

潮汐式生物反应器简介.....	2
小型潮汐式系统.....	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.....	4
细胞收获和计数.....	4
细胞染色.....	5
附录.....	6

潮汐式生物反应器简介

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）。

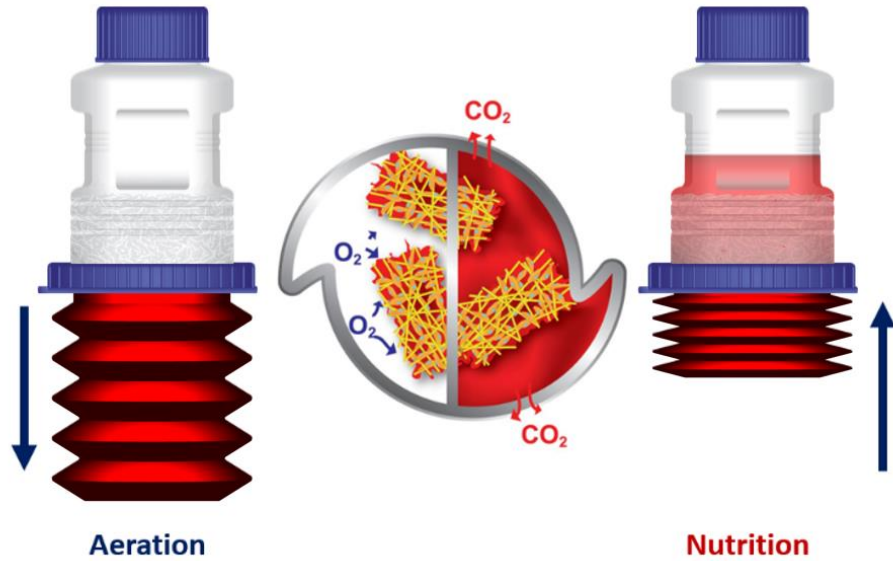


图1: CelCradle™通过潮汐式原理运行，其中附着于 BioNOC™ II 载体上的贴壁细胞通过瓶子压缩，让细胞交替暴露于空气和培养液。

小型潮汐式系统作为一个小规模的系统，可以实现初始实验过程的优化。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）。

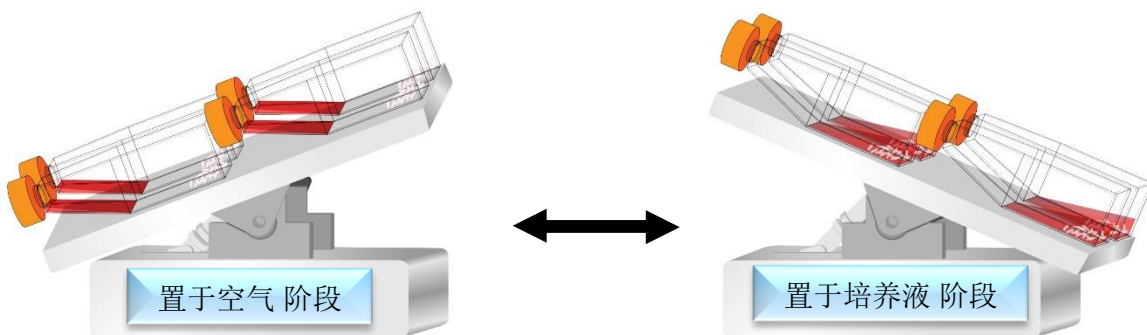


图2: 小型潮汐式系统通过使用培养瓶和摇床，模拟 CelCradle 潮汐式系统，将细胞交替暴露于培养液和氧气中。

小型潮汐式系统

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，灭菌时请勿使载体处于干燥状态。
3. 121°C 高压灭菌 20 分钟，将载体保存在 PBS 中直至使用。

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，让载体完全干透。
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. 让载体完全干透，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。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）。

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
Vero, CHO, HEK293T, PK-15, IBRS-2, 杂交瘤 OKT 3	100,000 – 300,000
MDCK	60,000 – 120,000
MARC-145	50,000
LMH	50,000 – 200,000
人间充质干细胞（hMSCs）	20,000 – 40,000
WI-38, MRC-5	15,000 – 20,000

表 1: 不同种类细胞的最佳接种密度。

操作注意事项: 各种贴壁细胞均可被接种在载体上，不建议细胞接种浓度 $> 1 \times 10^6$ 个细胞/ml，以避免细胞聚集。

4. 倾斜并旋转离心管，以使细胞与载体均匀混合（参见图 3）。

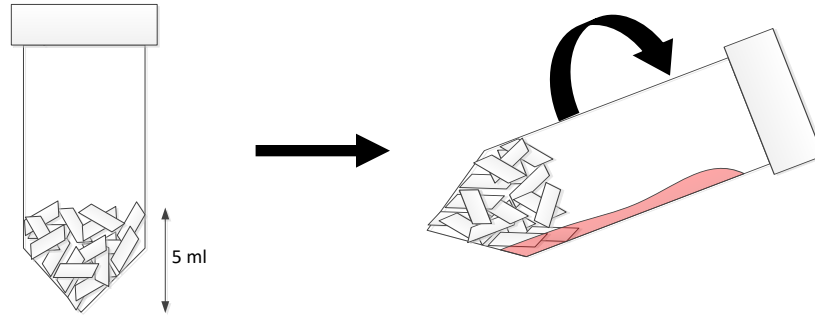


图3: 倾斜旋转离心管。避免倾斜超过90°, 以减少细胞损失。

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。在接下来的 2-4 小时内, 以 30 分钟的间隔重复步骤 4。
7. 孵育结束后, 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。
8. 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。

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. 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:

- 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。
- 初始试验建议添加 0.6 ml (可调整) 培养液/载体, 该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)。
- 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。
- 建议在培养过程中监测细胞生长情况 (通过细胞收获)。同时取 1-2 个载体进行细胞染色, 以直接观察细胞在载体上的生长 (参考下面的操作)。
- 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。

监控 BioNOC™ II 载体上细胞增殖情况

细胞收获和计数

1. 将三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 Mg²⁺/Ca²⁺) 轻轻洗涤载体, 每次清洗时上下温和倒转离心管, 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 0.25% 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。
- iii. **胶原酶:** (适用于干细胞/原代细胞)
 - 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。
6. 用镊子背面轻弹管子 40-60 次。
7. 将溶液转移到 15 ml 收集管中。
8. 重复步骤 5-7 至少 3 次以上 (均用 PBS)。
9. 将收集的溶液离心, 弃上清, 重新悬浮细胞在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。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。

细胞染色

用染料染色

1. 将 BioNOC™ II 载体从培养瓶中无菌转移至 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 或台盼兰染料染色细胞 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。

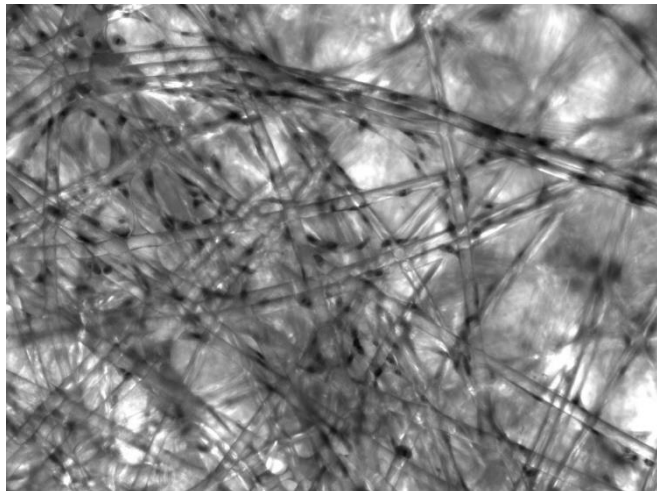
活细胞荧光染色

1. 将 BioNOC™ II 载体从培养瓶中无菌转移至 24 孔板。
2. 加入 500 μ l 培养液。
3. 以下列最终浓度添加染料: 培养液中 1 μ g/ ml Hoescht 33342 (Thermo Fisher, H3570), 1 μ M Calcein green (Thermo Fisher, C34852) 和 1 μ g/ ml PI (Propidium iodide 碘化丙啶, Sigma Aldrich P4170)。也可以使用 Fluorescein diacetate、Cell Tracker、DAPI 等其他荧光染料。
4. 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。

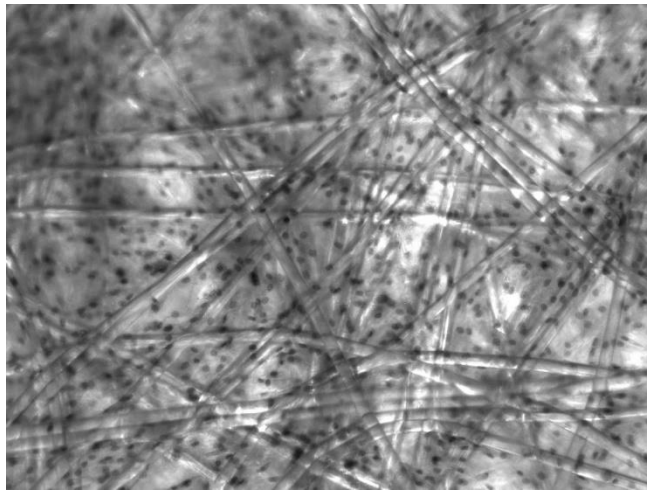
附录

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

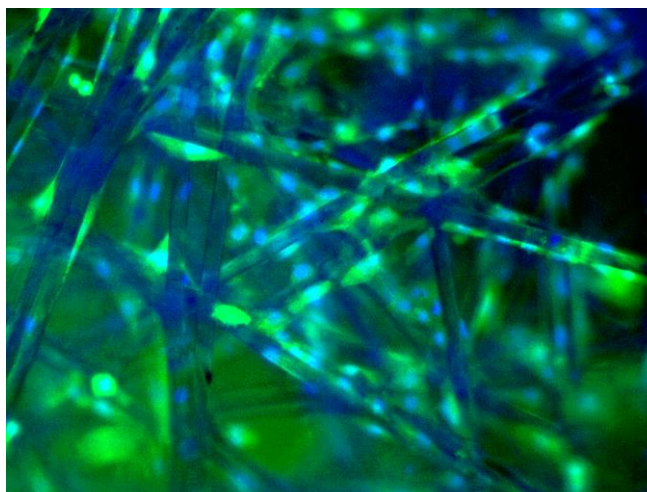
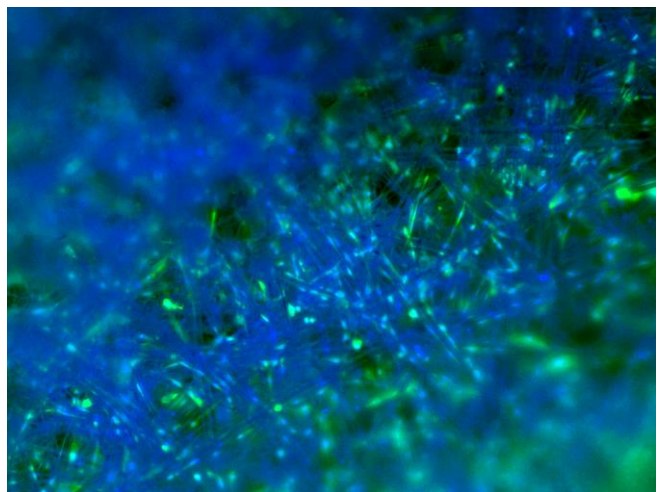
第 1 天



第 3 天



2. 人间充质干细胞 (hMSCs) 的荧光染色 (活体染色)



Calcein green 染活细胞质

Hoechst 33342 染活细胞核

Propidium iodide 染死细胞 (没有或很少观察到)