

# 使用指南

## Cellpuri™ | 无需离心的微流控细胞浓缩芯片

### 1. 简介

分离和收集细胞是大多数细胞培养实验的基本程序，包括培养基交换、细胞洗涤和继代培养、细胞接种和细胞解冻过程中的杂物去除。迄今为止，运用离心机将样本离心来实现细胞收集。离心分离是种根据颗粒形状、大小、密度和转子运转速度，从溶液中分离、沉淀颗粒的方法。转子旋转对液体培养基中的细胞产生离心力，生物离心是利用这种离心力来分离并纯化细胞混合物的过程。由于细胞按照施加在自体的离心力成比例的速率沉降，所以有时离心机产生的强离心力会作用到样品中的每个细胞上，特别是在高转速的情况下。随着高转速下施加的离心力场增加，细胞会被诱导产生离心介导的机械应力，随后产生与炎症过程相关的细胞因子<sup>1</sup>。在某些报告中亦表示，作为细胞力学反应的一部分，离心产生的重力场会导致细胞牵引力和细胞骨架重排的变化<sup>2</sup>。

Curiosis 股份有限公司近期开发出无离心分离的细胞浓缩装置- **Cellpuri**，此产品可将产生流体剪应力的时间降至数秒内，进而将机械应力对细胞的影响降到最小。此外与离心分离不同，使用此产品分离后，无需去除上清液，即可获取细胞浓缩液。本研究目的为与传统离心方法进行比较，借此验证新开发的细胞富集芯片性能。

## 2.准备材料与实验方法

### 细胞制备

准备共七种的贴壁细胞和悬浮细胞系，用于测试 **Cellpuri** 的性能。悬浮细胞试验以Jurkat、HL60、Raji 和 K562细胞进行，贴壁细胞系试验则以NIH3T3、HeLa 和 MCF7细胞进行。悬浮细胞可从培养皿中直接获取，贴壁细胞则需在培养皿里将胰蛋白酶化后，加入培养基获得。所有类型的细胞均按  $2 \times 10^5$  个/ml 或  $2 \times 10^6$  个/ml 浓度稀释，以用于评估性能实验。为了测量活细胞和死细胞的浓度，使用自动荧光细胞计数器 FACSCOPE (CURIOSIS 股份有限公司)。另外将 HL60 细胞以 200g 转速离心 10 分钟，使用移液管小心吸出上清液，此作为产率比较的对照组。

### *Cellpuri* 的操作方式

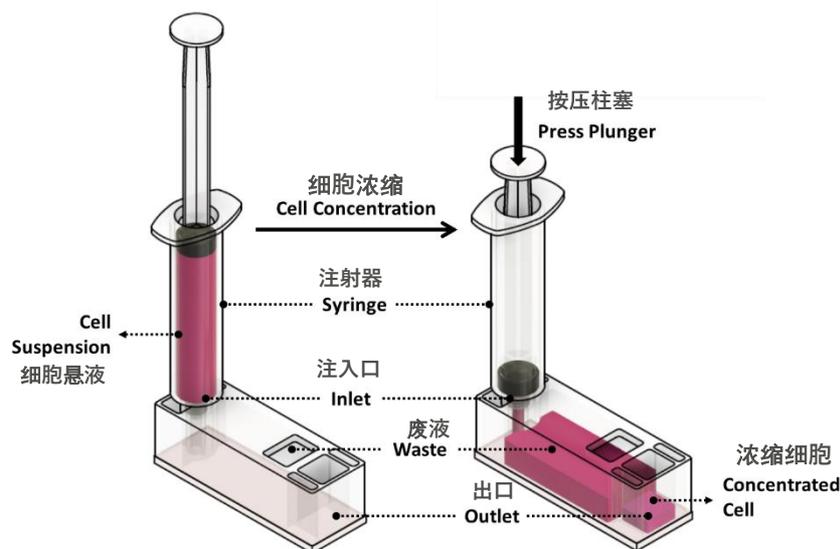


图 1.芯片操作示意图

按操作说明中的指示，将制备好的细胞装入注射器 [鲁尔锁型]，然后将注射器末端旋入 **Cellpuri** 的注入口，接着使用立式注射泵 (CURIOSIS 股份有限公司) 对注射器柱塞加压，细胞悬液即注入芯片中 (图 1)。操作完成后，使用移液管于 **Cellpuri** 的出口处收集浓缩细胞。富集过程结束后，无细胞残留的培养基和器材将作为废弃物处理。

## Cellpuri 的富集度和产率测定

在细胞悬液通过芯片的过程中，细胞因其大小、形状和形变能力不同而被分离。富集度和产率是评估芯片性能时的重要因素。

富集度定义为

$$\text{Enrichment} = \frac{\text{Cell concentration at the Outlet}}{\text{Cell concentration at the Inlet}}$$

产率定义为

$$\begin{aligned} \text{Yield}(\%) &= \frac{\text{the number of cells at the Outlet}}{\text{the number of passing through the chip}} \times 100 \\ &= \frac{\text{the number of cells at the Outlet}}{(\text{the number of cells at the Waste area}) + (\text{the number of cells at the Outlet})} \times 100 \end{aligned}$$

## 3.实验结果与讨论

样本离心是通过去除与细胞混合的培养基来达到浓缩细胞。此实验中我们旨在证明，**Cellpuri** 不需经过离心过程即可有效地浓缩细胞。**Cellpuri** 针对悬浮细胞和贴壁细胞采用两种不同初始细胞浓度来测定浓缩效率，实验结果证实，**Cellpuri** 的细胞平均富集度约为初始浓度的 22.79 倍。悬浮细胞在低浓度和高浓度细胞中的富集度分别为 23.52 倍和 21.37 倍（图 2A）。贴壁细胞在低浓度和高浓度的细胞中的富集度分别为 24.55 倍和 21.93 倍（图 2B）。由于悬浮细胞和贴壁细胞试验中，皆未观察到显著的富集差异。因此我们评估无论是何种细胞类型，都可以使用 **Cellpuri**。

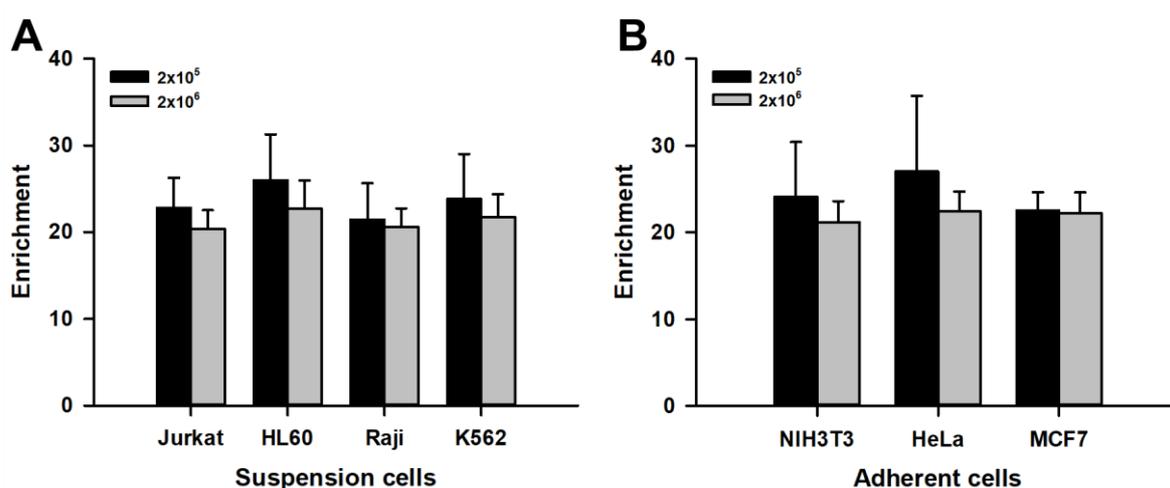


图 2.两种初始浓度下 Cellpuri 对不同细胞系的细胞富集度

(A) 以Jurkat (n=12)、HL60(n=10)、Raji (n=16) 和 K562 (n=16) 细胞进行两种浓度的悬浮细胞试验。

(B) 以NIH3T3 (n=10)、HeLa (n=6)、MCF7 (n=9) 细胞进行两种浓度的贴壁细胞试验。误差线，标准偏差

此时，经实验证明，贴壁细胞系和悬浮细胞系中通过芯片浓缩的细胞产率平均值均为 94.92% (图 3A 和 3B)。

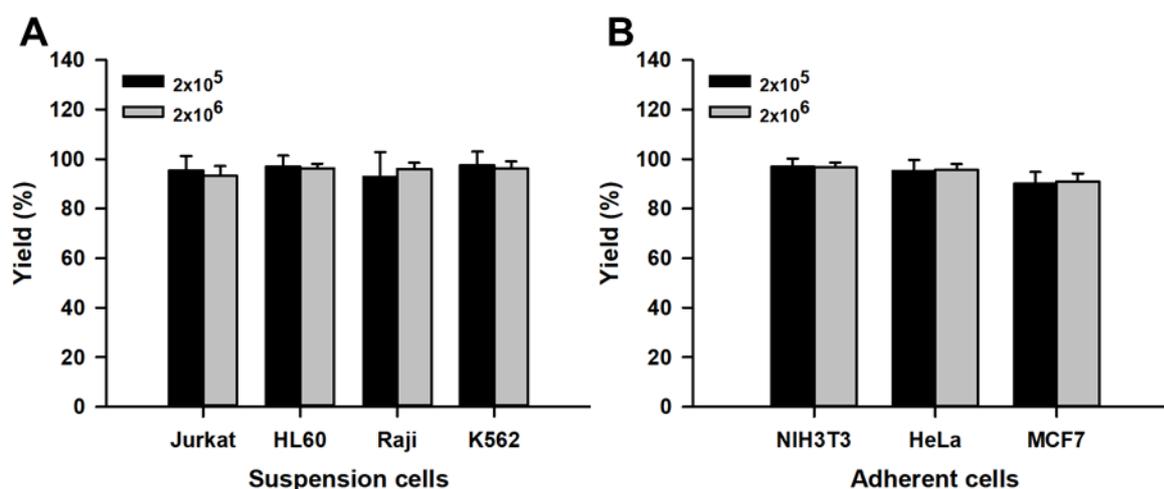


图 3.不同细胞系中富集两种初始浓度的细胞时的产率。

(A) 以Jurkat (n=12)、HL60 (n=15)、Raji (n=16) 和 K562 (n=16) 细胞进行两种浓度的悬浮细胞试验。

(B) 以NIH3T3 (n=10)、HeLa (n=6) 和 MCF7 (n=9) 细胞进行两种浓度的贴壁细胞试验。误差线，标准偏差

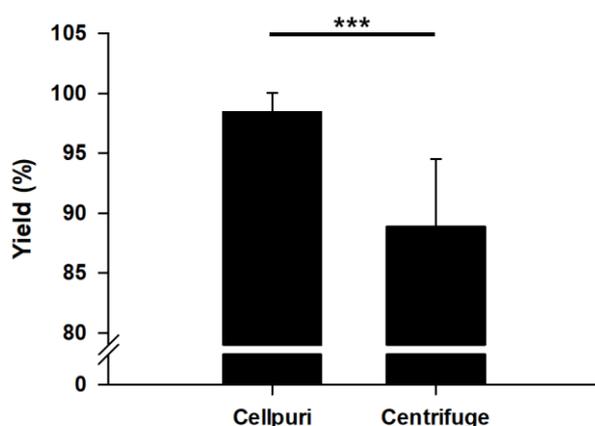


图 4.Cellpuri 和离心机的产率比较。P 值 (\*\*\*) $p < 0.001$ ，非配对 t 试验) 表明芯片和离心机之间的产率存在统计学上的显著性差异。误差线，标准偏差(n $\geq 10$ )。

离心沉淀细胞时，需轻轻吸出培养基的上清液，然而仍不可避免损失细胞。因此，我们分别使用 **Cellpuri** 和传统离心技术进行细胞浓缩，比较 HL60 细胞的产率。如图 4 所示，我们发现离心中的回收率降低，这是由于与细胞富集芯片相比，抽取后细胞损失更大。因此导致离心产率下降至 88.87%，而细胞富集芯片产率为 98.44% (图 4)。

根据上述结果，**Cellpuri** 能够以 94.92% 的高回收率浓缩细胞，并节省去除上清液的麻烦。因此，作为一种替代离心的方法，此产品可望在细胞浓缩方面被广泛应用。此外，若以离心机浓缩细胞，离心力作用于细胞将超过 5 分钟以上。但使用 **Cellpuri** 的话，细胞通过芯片受到剪切力的影响仅需数秒。与离心法相比，证明使用 **Cellpuri** 时，细胞受到机械应力的影响较小，对细胞功能的影响也降至最小。

## 4. 参考文献

- 1 HG Kim *et al.* Mechanical stress induces tumor necrosis factor- $\alpha$  production through  $\text{Ca}^{2+}$  release- dependent TLR2 signaling. *Am. J Physiol. Cell Physiol.* 295, 2 (2008)
- 2 Eckert J *et al.* Hypergravity affects cell traction forces of fibroblasts. *Biophys. J.* 120, 5 (2021)

### 关于 Cellpuri

Cellpuri™ 为无需离心过程即可浓缩细胞的一次性芯片。细胞悬液通过此芯片后，藉由微通道内的流变行为来过滤出废弃培养基，并浓缩细胞。本产品构造可分为细胞悬液注入口、收集细胞富集悬液的出口，及无细胞残留的培养基废液存储区。Cellpuri 尺寸为 76 (w) x 26 (d) x 23 (h) mm，能以 1mL/min 的速度处理 2 ~ 20mL 的细胞悬液。此外，Cellpuri 可浓缩 7-15 $\mu\text{m}$  大小的细胞，与原细胞浓度相比，富集浓度高达 20倍以上。