

# FiberCell 中空纤维细胞培养系统

## FAQ

### 1. 使用 FiberCell 系统是否需要特殊的设备？

FiberCell 双向泵尺寸为 25cm\*42cm\*21cm (W\*L\*H)，可以放在任何标准大小的培养箱中；其电源线为扁线设计，因此不会影响培养箱的开关。若用途是**细胞培养**，需要放置于二氧化碳培养箱。若**培养细菌**，则需放于细菌培养箱中培养。若用途为体外 **PK/PD 模型**，则需要根据实际使用药物数量等搭配进药泵、稀释泵及相应连接管路。

### 2. 是否有证书可以用于临床申请？

FiberCell 为生产细胞产物过程中的辅助设备，无法单独就临床应用申报。若用户有终产品需要申请医疗器械，我司可以备妥相应的药品主文件供用户提交。FiberCell 的生产过程符合 cGMP，并且具有欧盟的 CE 认证。

欧盟药品监督管理局 (EMA) 已批准 FiberCell 系统用于体外毒性测试，得到的实验数据可用于临床申报。

### 3. FiberCell 培养筒的整体体积 (培养筒+管路) 是多少？

不同的管柱型号体积不同：C2011 的总体积约为 70ml，C3008 约为 58ml。

### 4. MWCO 50%是什么意思？

MWCO (Molecular Weight Cut Off) 是指能穿透的物质分子量；MWCO 50%则表示通透率为 50%的对应分子量。例如 C2011 的 MWCO 50%是 20kD，所以 20kD 的蛋白有 50%的通透率；随着分子量越大，通透率越小，>100kD 的蛋白则无法穿透。

### 5. 血清中含有许多分子量>20kDa 的蛋白，这些蛋白要如何通过中空纤维？

经 FiberCell 公司测试发现，高密度细胞培养时，细胞对血清中的营养成分需求多为小分子，也因此 FiberCell 可以提供完全化学合成的血清替代物 CDM-HD。若针对特定细胞有任何必需的生长因子大于该培养筒可通透的分子量，可以直接添加在纤维外空间 (ECS) 的培养基。

### 6. 想要收获重组蛋白，要怎么选择培养筒？

如果 20kD<蛋白分子量<100kD，选用 MWCO 50%为 5kD 的 C2003 和 C2008；假使蛋白质分子量>100kD，则选用 MWCO 50%为 20kD 的 C2011 和 C2018。

### 7. 要做体外 PK/PD 模型，要怎么选择培养筒？

目前做 PK/PD 使用最多的培养筒型号为 C2011，但是建议在选择前将您的药物及细菌模型先发给我们了解下。C2011，纤维材质是亲水性聚砜材质 (high flux PS)，如果某些药物是使用极性溶剂 (例如 DMSO)，这些溶剂可能会和 C2011 的亲水性聚砜产生特异性结合，而且也可能破坏纤维的结构，所以建议改用相同大小、相同通透孔径，但材质为纤维素 (Cellulosic) 的 C3008 培养筒。

### 8. 中空纤维使用的细胞培养基和普通 2D 培养基相同吗？

可以，不过建议使用高糖培养基。

### 9. 为何需要使用高糖培养基?

因为在中空纤维中的细胞密度是平盘培养的 50-100 倍，糖含量较低的培养基，例如 RPMI1640，无法供给细胞足量的葡萄糖。建议使用高糖培养基，例如葡萄糖含量为 4.5g/L 的 DMEM 高糖培养基。

### 10. 什么样的细胞株可以选用血清替代物 CDM-HD?

CDM-HD (chemically defined medium for high density cell culture) 为纯化学合成、无蛋白的血清替代物，适用于大部分细胞的高密度培养，例如 CHO、293T、杂交瘤、MDCK 或 VERO 等等。但对于胆固醇依赖的细胞，如 NSO，还是建议使用血清培养。此外，CDM-HD 没有铁蛋白 (ferritin)，所以含有许多游离的铁离子，若是用于蛋白生产，后续的纯化步骤要避免磷酸盐缓冲液。

### 11. CDM-HD 的保质期是多久?

CDM-HD 为干粉形式，较为稳定，有效期为生产后 3 年。配制好的 CDM-HD 溶液，可在 4°C 稳定保存 6 周。

### 12. 纤维外空间需要包被吗?

这取决于细胞株的种类和使用的培养基。

- 若是一般的贴壁细胞，可以在接种时以含血清的培养基操作，血清中的成分就可以使细胞贴壁。
- 若是使用无血清培养基、或者培养贴壁较弱的细胞，可以用纤连蛋白 (fibronectin) 包被。

### 13. 如何包被纤维外空间?

以纤连蛋白为例，在 PBS 预洗之后，将 (PBS 配制准备的 1mg/C2011) 纤连蛋白溶液打入纤维外空间，静置一晚后，接着即可进行培养基预洗。

### 14. 使用时需要接种多少细胞?

接种的细胞数量要能够覆盖纤维表面积的 50%，并且要注意细胞活率需 >90%；活细胞的总数量太低，细胞生长会停滞甚至死亡。例如 C2011 的纤维表面是 3000cm<sup>2</sup>，所以需要接种可覆盖 1500cm<sup>2</sup> (约 9 个长满的 T175) 的细胞。

### 15. 如果接种细胞数量不足，可以重复接种吗?

可以。如果发现细胞数量太少而进入生长停滞期，可以再次接种同一种细胞，按照正常接种步骤操作即可。如果是因为细胞活率太低而停止生长，可以先将死细胞和细胞碎片吸出后，再接种细胞。

### 16. 中空纤维如何了解培养中的细胞健康状态?

中空纤维是通过测量葡萄糖摄取率来了解细胞的健康状况。

### 17. 可以把细胞收获出来，观察细胞的存活率吗?

FiberCell 收获细胞的方式为高糖收获，以这样物理方式收获得到的细胞存活率很低，但这并不是细胞在中空纤维管里真正的存活率，因为大部分健康的贴壁细胞不容易被这样的方式吹打下来。因此当然可试着将细胞收获出来，接种进 2D 培养，即使只有 10% 的细胞贴壁生长，也表示管柱内的细胞情况良好。

### 18. 如果细菌污染该怎么办?

一旦确认污染，该中空纤维管柱就无法使用了。(千万不可用 75% 酒精处理中空纤维管，这样会破坏里面的纤维!!!) 若担心无法在整个培养操作过程维持无菌，可适量添加抗生素。

#### 19. 如何判断培养筒有没有被细菌污染?

如果是细菌污染，糖消耗会急速上升，而且培养基会变黄有异味。若不确定，可用琼脂平板培养少量的培养基和 ECS 的上清，看看是否有菌落形成；或者将少量的培养基和 ECS 的上清加入新鲜的培养基培养，观察溶液是否变混浊。

#### 20. 以 FiberCell 收获单抗，可以收获多少的量?

使用 C2011 一般 1 天消耗 0.5L 高糖培养基，可生产 5-25mg 单抗；不过具体的收获量主要取决于细胞和操作状况而定。

#### 21. 以 FiberCell 收获外泌体，可以持续收获多久?

同样也是视细胞和操作状况而定，一般约 2 个月。

#### 22. 如何判断什么时候该停止收获细胞产物?

当产物不再分泌或不再有糖消耗。

#### 23. 循环培养基流速怎么设定?

随着糖消耗越高（细胞量越多），流速要加快；中型筒（C2008 和 C2011）起始流速建议设在 20（约 80~90ml/min），3~4 天糖消耗逐渐上升后，可以调整为 25。大型筒（C2003 和 C2018）起始流速也建议设在 20，之后 2 天开始有糖消耗后，可以调整为 25-30。

#### 24. 为什么接种后糖消耗一直都很低?

- 接种的细胞量为  $10^8$  或者（贴壁细胞）足够覆盖 50%纤维表面积的细胞量。如果接种细胞数量太少，细胞长不起来，糖消耗就会一直很低，甚至不消耗。
- 接种后培养液的体积要随细胞量上升而逐步增加，才能维持足够的养分供细胞生长。因此要按照建议步骤，逐步增加培养液的体积。

#### 25. 如何在 FiberCell 培养期间更换培养基?

- 不同基础培养基的替换，例如把 RPMI 1640 换成 DMEM，需逐步替换。例如培养基瓶的培养基由 125ml 换成 250ml 时，使用 75% RPMI1640 + 25%DMEM 培养基；培养基体积增加到 500ml 时，使用 50% RPMI1640 + 50%DMEM 培养基；若糖消耗稳定或持续增加，下次换液时使用 25% RPMI1640 + 75%DMEM 培养基；观察糖消耗若稳定或持续增加，再换成 100% DMEM 培养基；纤维外细胞生长空间的培养基最后可以直接换成 DMEM 培养基，或者在每次糖消耗达 50%，需换液时按照上面的比例逐步更换。
- 细胞在中空纤维中高密度生长时会比在二维的平皿中更容易适应无血清的环境，所以如果要在培养过程中将含血清的培养基替换成无血清系统，建议在接种进中空纤维系统后操作。其操作过程也是如 a 中的逐步替换方式。如果是由含血清的培养基换成含 CDM-HD（血清替代物）的培养基，则可以在糖消耗稳定后或达到 1g/天时，直接更换。

#### 26. 为了提高 C2011 培养的细胞密度，是否可以培养到糖消耗 2g/天，甚至更高?

不行。1g/天的糖消耗大约等同  $1 \times 10^9$  细胞量，糖消耗可以稍高到 1.2g/天，但这时要进行高糖收获以取出细胞，降低培养筒内的细胞密度。若糖消耗太高（例如 >2g/天），培养筒内的空间会被细胞占满导致氧气供应不足，细胞会开始死亡或者转为无氧代谢，便无法再收获正确的细胞产物。

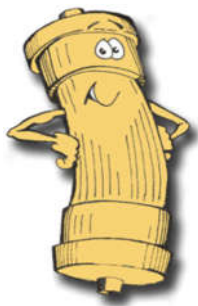
**27. 当使用 FiberCell 系统扩增病毒，病毒扩增后细胞都裂解了，能否不更换培养筒，直接接种同种细胞，**

**继续培养？**

可以。若属于裂解病毒或悬浮培养的细胞，容易从培养筒中移除大部分细胞出来，可以再次接种同一株细胞而不更换培养筒。

**28. 可以重复使用培养筒吗？**

培养筒为一次性使用，不能高温高压灭菌，因此不建议重复使用。若用户想尝试，请务必确认培养筒没有污染，并且只能重复相同的细胞株培养，但使用效果无法保证。



关注上海道鹏微信公众号获取更多产品信息



上海道鹏生物科技有限公司为 FiberCell Systems 在中国地区（含香港、澳门）独家代理商，如果有任何疑问，请随时与我们联系！