

实时检测收集液对分选后HEK293T细胞活性的影响

李艳伟* 宋兴辉 邢月婷 王佳佳 郭春 黄莹莹

(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 流式细胞分选是纯化活细胞较为常用的实验方法, 是获得高活性细胞的有效手段, 其中收集液为分选后的细胞提供一定的营养环境, 从而保证分选后细胞的高活性。该研究选用流式细胞分选仪分选人肾上皮细胞系HEK293T(简称293T)细胞, 用3组即A组(含BSA的PBS缓冲液)、B组(含FBS的PBS缓冲液)、C组(含FBS的DMEM培养基)收集液分别接收分选后的293T细胞, 以流式细胞检测法、细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)检测法、实时细胞分析(Real Time Cellular Analysis, RTCA)检测法分别检测分选后细胞的活性情况进行统计分析。结果显示, A组中含0.4% BSA的PBS缓冲液、B组中含10% FBS的PBS缓冲液、C组中含10% FBS的DMEM培养基接收的细胞活性分别高于各组内的对照, 凋亡率分别为(4.12±0.474)%、(4.10±0.660)%、(3.71±0.291)%, 均具有显著性统计学差异($P<0.0001$)。比较三种细胞活性检测方法发现, RTCA检测法具有极简的操作流程, 无须标记, 可实时获得细胞的动态增殖曲线的优点, 可作为分选后细胞活性最客观的检测方法。该研究为揭示收集液对细胞活性的影响提供参考依据, 为快速客观检测分选后细胞活性提供实时检测方法。

关键词 CCK-8; 流式细胞分析; 实时检测; 流式细胞分选; 细胞活性; 收集液

The Real-Time Detection of the Effect of Collection Solution on the Viability of Sorted HEK293T Cells

LI Yanwei*, SONG Xinghui, XING Yueting, WANG Jiajia, GUO Chun, HUANG Yingying

(Core Facilities, School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Flow cytometry sorting is a commonly used experimental method for purification of living cells and an effective means to obtain highly active cells. The collection solution provides a certain nutrient environment for the sorted cells, thus ensuring the high activity of the sorted cells. This study used flow cytometer to sort human renal tubular epithelial 293T (HEK293T) cells and received them with three groups of collection solution: group A (BSA in PBS buffer), group B (FBS in PBS buffer) and group C (FBS in DMEM medium). Flow cytometry, CCK-8 (Cell Counting Kit-8), and RTCA (Real Time Cellular Analysis) detection methods were used to detect the activity of the sorted cells, and then statistical analysis was performed. The results showed that the cell viabilities of group A (0.4% BSA in PBS buffer), group B (10% FBS in PBS buffer) and group C (10% FBS in DMEM medium) are higher than those of control in each group. The apoptosis rates separately were (4.12±0.474)%, (4.10±0.660)%, (3.71±0.291)%, with significant statistical differences ($P<0.0001$). Comparison of the three cell viability detection methods showed that the RTCA detection method had the advantages of a minimalist operation process, no label-

收稿日期: 2021-07-06 接受日期: 2021-08-20

浙江省教育厅基金(批准号: Y201941524)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88981951, E-mail: lywei@zju.edu.cn

Received: July 6, 2021 Accepted: August 20, 2021

This work was supported by Zhejiang Provincial Education Department Fund (Grant No. Y201941524)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981951, E-mail: lywei@zju.edu.cn

ing, and real-time acquisition of the dynamic proliferation curve of cells, which could be used as the most objective detection method for cell viability after sorting. This study provides a reference for revealing the influence of the collection solution on cell viability, and a real-time detection method for rapid and objective detection of cell viability after sorting.

Keywords CCK-8; flow cytometric analysis; real time detection; flow cytometric sorting; cell viability; collection solution

近年来,慢病毒载体被广泛应用于传染性疾病、恶性肿瘤基因功能的研究^[1-2]。HEK293T细胞(以下简称为293T细胞)是指利用基因工程技术从人胚胎肾细胞中产生的上皮细胞系,常常用于病毒包装和转染,是过表达蛋白尤其是表达细胞内蛋白以及细胞外蛋白最方便的途径^[3-4],因此,293T细胞的活性直接影响到病毒包装以及转染的效率。这也意味着提高293T细胞活性,就是提高该细胞在生物及生命科学领域的应用效率。

流式细胞分选术是分选及纯化活细胞最先进可靠的方法,利用该技术的分选性能可进行高效率的活细胞纯化研究^[5]。影响分选后细胞活性^[6]的因素如合适的喷嘴大小、精确的液滴延迟、稳定的液流、适中的细胞密度和良好的细胞状态都已被广泛报道^[7-8],但鲜有研究报道收集液对细胞活性是否有影响、分选后细胞的增殖活性检测方法是否准确等^[9-10],这不利于对分选后细胞功能的深入研究。

本研究从收集液的组成及配比方面探讨其对分选后细胞活性的影响,利用不同的细胞活性检测方法检测分选后293T细胞的增殖变化、酶活性代谢变化、凋亡变化等情况,从而判断不同收集液对细胞活性是否有影响。本研究建立快速准确地检测分选后细胞活性的方法,为分选后细胞的收集和功能研究提供筛选模型,以期为基础和临床分选实验中的细胞活性研究提供参考和指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 人肾上皮细胞系HEK293T(简称293T)细胞由浙江大学基础医学院提供,细胞形态为上皮细胞样,贴壁生长。流式分选质控微球购自美国Beckman Coulter公司。流式分析质控微球购自美国BD公司。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、增强型CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine

serum, FBS)、胰酶、PSG(penicillin-streptomycin glutamine)双抗购自美国Gibco公司。E-plate增殖板购自杭州荣邦生物科技有限公司。96孔板、离心管、无菌流式管、40 μm 无菌细胞筛购自上海普飞生物技术有限公司。凋亡试剂盒(Annexin V-FITC/PI apoptosis kit)购自杭州联科生物技术股份有限公司。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)片剂购自上海博升生物技术有限公司,加入 ddH_2O 溶解并高压灭菌后备用。

1.1.2 主要仪器 超高速流式细胞分选仪(Beckman MoFlo Astrios^{FO})购自美国Beckman Coulter公司。流式细胞分析仪(BD LSRFortessa)购自美国BD公司。高通量实时细胞功能分析仪(RTCA-SP)购自瑞士Roche公司。多功能微孔板检测仪(SynergyMx M5)购自美国Molecular Devices公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与样本制备 293T细胞接种于含10% FBS、1%双抗的DMEM培养基中,放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱内孵育,每隔2~3天传代,连续传代3次以上,待细胞达到指数生长期(镜下密度为70%~80%)时,弃去上清液,加入0.25%胰酶消化,300 $\times\text{g}$ 离心5 min,用无菌PBS制备成浓度为 1×10^7 个/mL的单细胞悬液,放置在冰浴中备用,待上机前使用40 μm 无菌细胞筛网过滤。分选样本需全程于无菌环境下制备。

1.2.2 配制细胞收集液 按照细胞培养条件配制3组收集液,收集管为15 mL离心管。

A组(含BSA的PBS缓冲液):以无BSA的PBS缓冲液为对照组A,分别制备含0.04% BSA的PBS缓冲液(实验组A1)、含0.4% BSA的PBS缓冲液(实验组A2)、含2% BSA的PBS缓冲液(实验组A3),设置3个重复。

B组(含FBS的PBS缓冲液):以无FBS的PBS缓冲液为对照组B,分别制备含5% FBS的PBS缓冲液(实验组B1)、含10% FBS的PBS缓冲液(实验组B2)、

100% FBS(实验组B3), 设置3个重复。

C组(含FBS的DMEM培养基): 以DMEM培养基为对照组C, 分别制备含10% FBS的DMEM培养基(实验组C1)、含50% FBS的DMEM培养基(实验组C2)、100% FBS(实验组C3), 设置3个重复。

1.2.3 流式细胞分选仪调试 超高速流式分选仪(Beckman MoFlo Astrios[®])是一款空气激发的5激光17个检测通道的高端流式细胞分选系统^[11], 本次分选实验选用100 μm喷嘴, 30 psi鞘液压力, 样本与鞘液的压力差为0.3 psi, 设定分选模式为纯度(purity)-1液滴分选模式。

首先, 按照顺序依次打开仪器开关、启动液流并排气泡15 min、开启激光器。接着, 通过调节前后、左右千分尺的旋钮, 确保液流在针孔(pinhole)中央并且使液流垂直对齐。旋动上下千分尺旋钮调节激光光斑校正, 使调节光斑与校准光斑图像保持接近。取校准微球原液涡旋, 取1滴加入800 μL无菌ddH₂O中, 混匀后放入上样仓, 开始光路校正, 手动调节前向散射光(forward scatter, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC), 使光信号集中, 再调节2个距离最远的荧光通道的信号, 使信号最强。打开QC屏幕开启自动质控, 实现激光延迟校正。电极板无菌擦拭后放入仪器, 电极板加电进行液滴延迟校正。

取载玻片放置于分选收集架上, 调节侧液流加电量, 使分选液滴在载玻片上的落点刚好处于收集管的中央, 从而实现准确分选的目的。打开Summit软件, 新建Database, 激活FSC和SSC通道及相应的荧光通道, 设定FSC-SSC散点图, 用多边形门圈定目标细胞群, 设定FSC(A)-FSC(H)散点图, 用梯形门圈定单个细胞群。

1.2.4 单管分选 15 mL离心管里加入1 mL收集液置于收集架内, 取过滤好的细胞悬液加入上样仓内, 调整上样的细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 设置每支收集管内分选细胞浓度为 5×10^5 个/mL。分选完毕后, 取出收集管置于冰浴中备用。

1.2.5 流式细胞分析仪质控 流式细胞分析仪(BD LSRFortessa)是一款5激光18检测通道的高端流式细胞分析仪。按照流程执行开机清洗后, 涡旋CS&T微球原液, 取1滴加入500 μL ddH₂O中混悬, 之后运行仪器参数设置及追踪(cytometer setup and tracking, CS&T)程序, 完成仪器质控校正。

1.2.6 流式细胞检测方法 细胞凋亡是程序性细胞死亡过程, 细胞早期凋亡时, 细胞膜上磷脂酰丝

氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻并与Annexin V结合, 晚期凋亡时细胞膜具有通透性且仍保留外翻特性, 碘化丙啶(propidium iodide, PI)可以进入核内与脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)结合, 细胞坏死时, 细胞核裸露, 只有PI与DNA结合, 通过细胞这样的程序性死亡过程可以判断细胞凋亡情况^[12-13]。本实验选取3组收集液接收的分选后293T细胞悬液, 于4 °C、300 ×g条件下离心5 min, 弃去上清液, 使用500 μL 1×结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 设置3个复孔。每管分别加入5 μL Annexin V-FITC染色液和10 μL PI染色液, 混匀后放置于4 °C(或冰浴中)避光孵育5 min, 立即进行流式细胞凋亡检测。

1.2.7 CCK-8检测方法 CCK-8检测法是指在活细胞线粒体酶的作用下, 将底物还原为有颜色的水溶性产物, 通过检测有色产物的吸光度(D)值来间接反映活细胞的数量^[14-15]。本实验选取3组收集液接收的分选后293T细胞悬液, 于4 °C、300 ×g条件下离心5 min, 弃去上清液, 用含10% FBS的DMEM培养基分别重悬细胞使其浓度为 2×10^4 个/mL, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔加入100 μL细胞液, 每个检测时间点分别设置5个复孔, 每孔加入10 μL增强型CCK-8试剂, 于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育。空白对照孔中不加入细胞。分别于0 h、24 h、48 h、72 h从孵箱中取出3组收集液接收的细胞并将其放置在多功能酶标仪上, 设定检测波长为450 nm, 检测该波长处的细胞吸光度(D₄₅₀)值。计算细胞平均吸光度值, 根据吸光度值绘制细胞增殖曲线, 确定细胞增殖活性。

1.2.8 RTCA检测方法 RTCA是一种非标记、动态实时细胞分析监测的方法, 是基于检测微电子细胞传感器芯片阻抗的变化以反映细胞生理状态的技术。电阻抗转化为细胞指数(cell index, CI)即反映了细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁程度等一系列生理状态^[16]。首先向E-Plate中加入50 μL细胞培养液, 检测基线, 然后选取3组收集液接收密度为 1×10^5 个/mL的细胞悬液, 于4 °C、300 ×g条件下离心5 min, 除去上清液, 用含10% FBS的DMEM培养基将细胞分别调整成浓度为 5×10^4 个/mL的细胞悬液, 取100 μL细胞液加入到E-Plate中, 使每个孔含5 000个细胞, 设4个复孔, 室温静置30 min后放入仪器, 软件上设定每15 min检测一次CI值, 连续坚持72 h, 分别

以细胞的CI值为Y轴,以时间为X轴绘制293T细胞生长曲线。

RTCA检测法基于微电子阻抗变化监测细胞活性,用CI表示,公式如下:

$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left[\frac{R_{\text{cell}}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right]$$

$R_b(f)$ 和 $R_{\text{cell}}(f)$ 分别代表无细胞黏附的电阻抗和有细胞黏附的电阻抗, N 代表检测到电阻抗的频点数量^[17]。细胞铺板后,经过悬浮、贴壁、潜伏期、增殖达到覆盖率为70%~80%的最佳指数生长期,细胞指数处于0.5~1范围内,表示该浓度细胞适合后续的功能性实验研究^[18-19]。

1.3 统计学分析

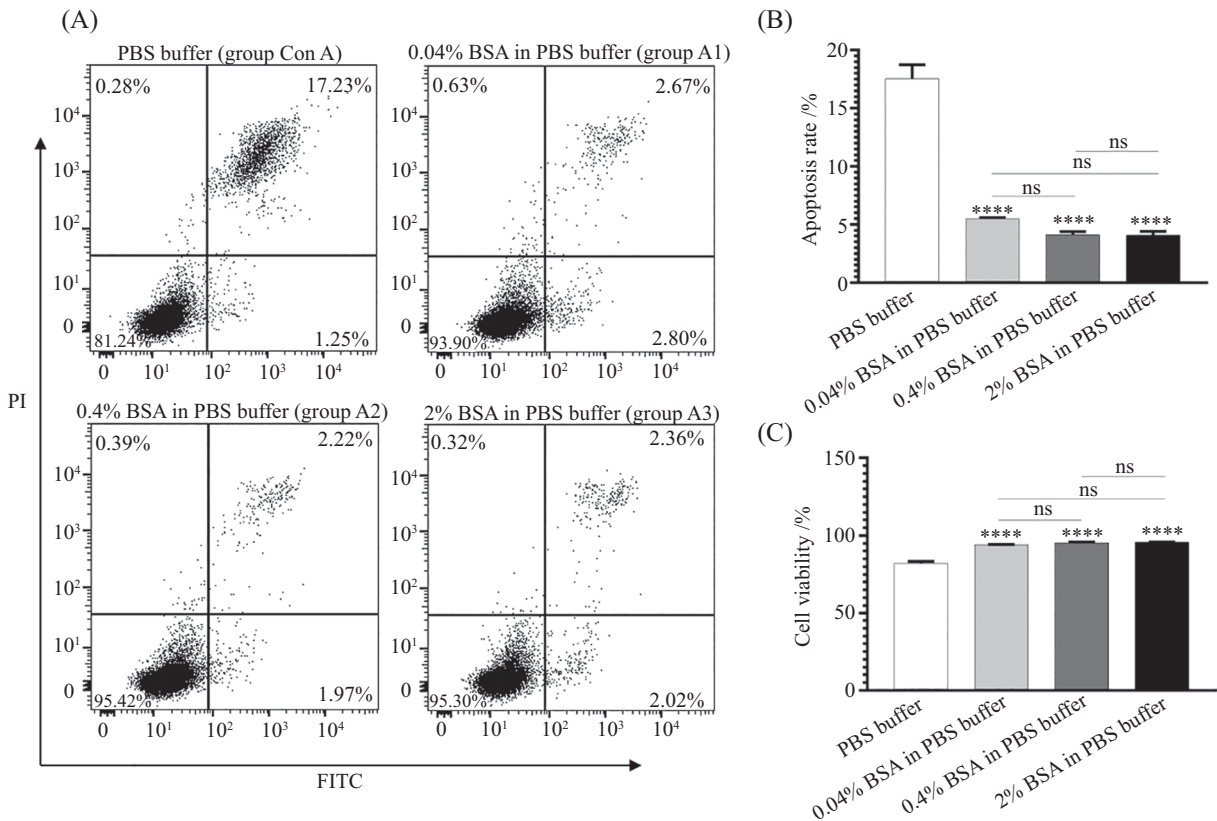
从每次实验的至少3个重复数据中选取具有代表性的实验结果进行展示。采用FlowJo_V10软件和GraphPad Prism 7软件分析处理数据,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较组间统计差异。 $P < 0.05$ 表示实验结果具有统计学差异。

2 结果

2.1 流式细胞术检测3组收集液接收的293T细胞的凋亡结果

按两色标记检测,调节荧光补偿,以Annexin V-FITC(A)为横坐标、PI(A)为纵坐标作图。分析时,以FSC(A)和SSC(A)确定细胞群的位置,以Annexin V-FITC(A)单阳细胞比例确定细胞早期凋亡情况,以Annexin V-FITC(A)和PI(A)双阳细胞的比例确定细胞晚期凋亡情况,细胞早期凋亡率与晚期凋亡率的和等于细胞凋亡率。

2.1.1 A组收集液接收的293T细胞凋亡结果 流式细胞检测得到的凋亡结果(图1)显示,对照组A接收的293T细胞凋亡率为(17.53±2.144)%、实验组A1接收的293T细胞凋亡率为(5.49±0.215)%、实验组A2接收的293T细胞凋亡率为(4.12±0.474)%、实验组A3接收的293T细胞凋亡率为(4.09±0.561)%。该结果显示,实验组接收的293T细胞凋亡率明显低于对照组,表明BSA可有效减少细胞凋亡,提高细胞



A: 流式分析检测分选后293T细胞的凋亡结果; B: 293T细胞凋亡统计分析图; C: 293T细胞的活性统计分析图。**** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 3$ 。
A: the apoptosis results of 293T cells after sorting by flow cytometry; B: the apoptosis statistical analysis chart of 293T cells; C: the statistical analysis chart of 293T cell viability. **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 3$.

图1 A组收集液接收的293T细胞凋亡情况

Fig.1 Apoptosis of 293T cells received by the collection solution of group A

活性, 实验组与对照组比较, 具有显著性统计学差异($P < 0.0001$)。实验组内凋亡结果比较发现, 随着BSA浓度的增加, 细胞凋亡率呈现下降趋势, 但实验组内差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。

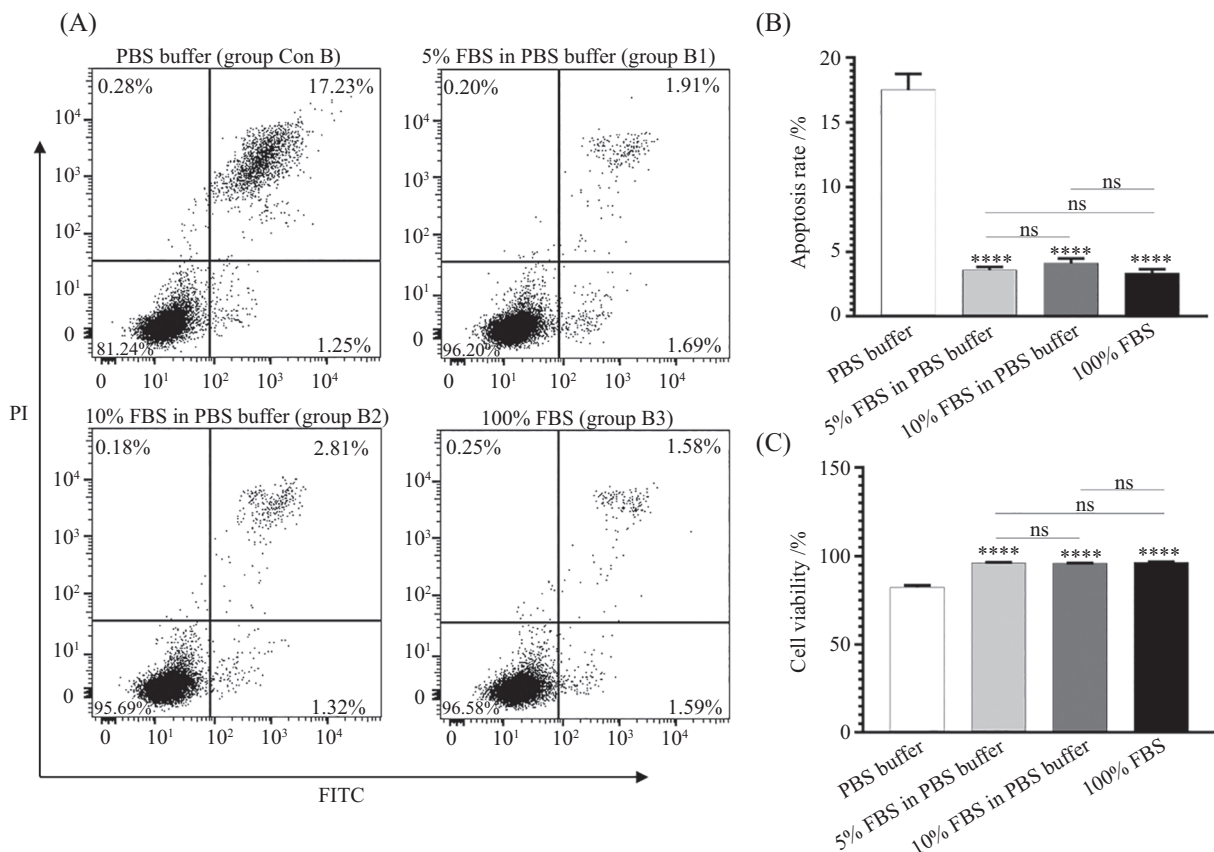
2.1.2 B组收集液接收的293T细胞凋亡结果 流式细胞检测得到的凋亡结果(图2)显示, 对照组B接收的293T细胞凋亡率为(17.53±2.144)%, 实验组B1接收的293T细胞凋亡率为(3.61±0.380)%, 实验组B2接收的293T细胞凋亡率为(4.10±0.660)%, 实验组B3接收的293T细胞凋亡率为(3.35±0.510)%。该结果显示, 实验组接收的293T细胞凋亡率明显低于对照组, 表明FBS可以提高细胞的活性, 降低细胞的凋亡程度, 实验组与对照组比较, 具有显著性统计学差异($P < 0.0001$)。比较实验组内凋亡统计结果发现, 随着FBS浓度的增加, 细胞凋亡率呈现下降趋势, 但实验组内差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。

2.1.3 C组收集液接收的293T细胞凋亡结果 流

式细胞检测得到的凋亡结果(图3)显示, 对照组C接收的293T细胞凋亡率为(12.31±2.324)%, 实验组C1接收的293T细胞凋亡率为(3.71±0.291)%, 实验组C2接收的293T细胞凋亡率为(3.76±0.516)%, 实验组C3接收的293T细胞凋亡率为(3.35±0.510)%。该结果显示, 实验组接收的293T细胞凋亡率明显低于对照组, 表明培养基中的FBS可以提高细胞的活性, 降低细胞的凋亡率, 实验组与对照组比较, 具有显著性统计学差异($P < 0.0001$)。比较实验组内的凋亡统计结果发现, 随着FBS浓度增加, 细胞凋亡率呈现下降趋势, 但实验组内不具有统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 CCK-8检测3组收集液接收的293T细胞的增殖结果

3组收集液接收的293T细胞连续孵育72 h, 分别于0 h、24 h、48 h、72 h检测细胞的吸光度值, 分别绘制细胞增殖曲线, 结果显示吸光度值会随着细胞孵育时间的增加而增加, 之后增殖曲线进入平台期,

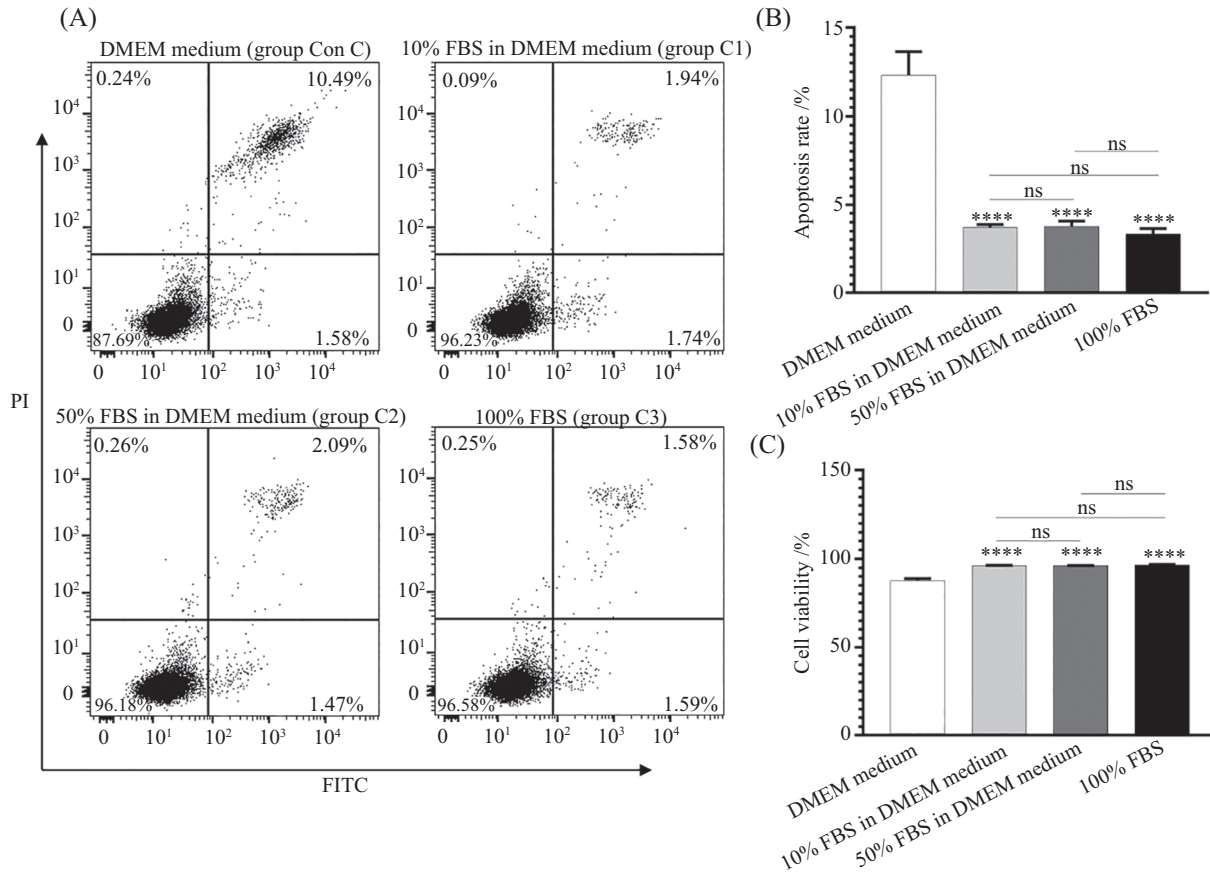


A: 流式分析检测分选后293T细胞的凋亡结果; B: 293T细胞凋亡统计分析图; C: 293T细胞的活性统计分析图。**** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 3$ 。

A: the apoptosis results of 293T cells after sorting by flow cytometry; B: the apoptosis statistical analysis chart of 293T cell; C: the statistical analysis chart of 293T cell viability. **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 3$ 。

图2 B组收集液接收的293T细胞凋亡情况

Fig.2 Apoptosis of 293T cells received by the collection solution of group B



A: 流式分析检测分选后293T细胞的凋亡结果; B: 293T细胞凋亡统计分析图; C: 293T细胞的活性统计分析图。**** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 3$ 。
A: the apoptosis results of 293T cells after sorting by flow cytometry; B: the apoptosis statistical analysis chart of 293T cells; C: the statistical analysis chart of 293T cell viability. **** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 3$.

图3 C组收集液接收的293T细胞凋亡情况

Fig.3 Apoptosis of 293T cells received by the collection solution of group C

吸光度值的增幅也变得越来越大,且实验组接收的293T细胞吸光度值均高于对照组。

2.2.1 A组收集液接收的293T细胞的增殖结果 观察增殖曲线(图4)发现,孵育0 h,实验组接收的293T细胞吸光度值低于对照组A,且有统计学差异($P < 0.05$),表明实验组接收的293T细胞增殖活性低于对照组A,提示BSA没有提高细胞的活性。随着孵育时间增加,实验组接收的293T细胞分别于24 h、48 h、72 h检测的吸光度值高于对照组A,具有显著性差异($P < 0.0001$),表明实验组接收的293T细胞增殖活性高于对照组A,说明BSA可增强分选后细胞的增殖活性。对实验组内增殖结果进行统计分析发现,孵育24 h的实验组A1 vs实验组A2、实验组A1 vs实验组A3,孵育48 h的实验组A1 vs实验组A3、实验组A2 vs实验组A3有统计学差异($P < 0.05$)。表明不同浓度BSA收集液接收的细胞随着孵育时间增加,整体细胞增殖变化不显著。

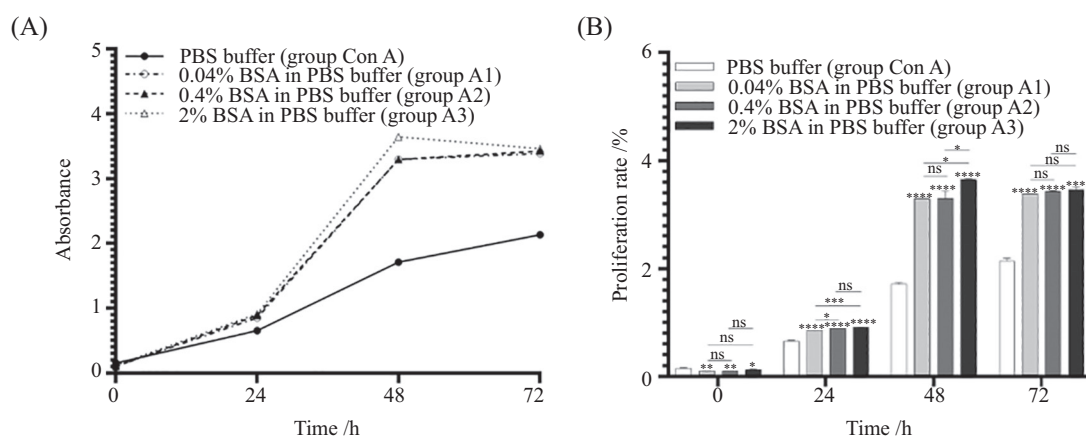
2.2.2 B组收集液接收的293T细胞的增殖结果 观察增殖曲线(图5)发现,孵育0 h,实验组接收的293T细胞吸光度值与对照组B接近,仅实验组B2 vs对照组B有统计学差异($P < 0.05$),表明其他实验组接收的293T细胞增殖活性与对照组B没有差异。孵育24 h,实验组B2接收的293T细胞增殖活性高于对照组B,有统计学差异($P < 0.05$),实验组B3接收的293T细胞增殖活性明显高于对照组B,具有非常显著的统计学差异($P < 0.001$)。继续孵育48 h、72 h时,实验组接收的293T细胞吸光度值均高于对照组B,具有显著性差异($P < 0.0001$),表明实验组接收的293T细胞的增殖活性高于对照组B,说明FBS可有效提高分选后细胞活性。对实验组内增殖结果进行统计分析发现,孵育24 h的实验组B1 vs实验组B3孵育48 h、72 h的实验组B1 vs实验组B2、实验组B1 vs实验组B3有统计学差异($P < 0.05$)。表明不同FBS浓度收集液接收的293T细胞增殖活性整体上递增但没有明显变化。

2.2.3 C组收集液接收的293T细胞的增殖结果 通过增殖曲线分析(图6)发现, 孵育0 h, 实验组接收的293T细胞吸光度低于对照组C, 没有统计学差异($P>0.05$)。孵育24 h, 实验组接收的293T细胞吸光度高于对照组C, 实验组C2 vs对照组C、实验组C3 vs对照组C均有显著性统计学差异($P<0.001$)。继续孵育48 h、72 h, 实验组接收的293T细胞吸光度值均高于对照组C, 具有显著性统计学差异($P<0.0001$)。表明实验组接收的293T细胞增殖活性高于对照组C, 说明DMEM培养基中添加FBS可以增强细胞活性。对实验组内增殖结果进行统计分析发现, 孵育24 h

的实验组C1 vs实验组C3, 孵育48 h的实验组C1 vs实验组C3、实验组C2 vs实验组C3, 孵育72 h的实验组C1 vs实验组C2、实验组C1 vs实验组C3有统计学意义($P<0.01$)。表明随着FBS浓度的增加, 培养基中细胞的增殖活性呈递增趋势, 整体差异不显著。

2.3 RTCA实时检测3组收集液接收的293T细胞的增殖结果

利用3组收集液接收分选后的293T细胞, 从实时动态监测的72 h细胞增殖曲线变化来观察细胞增殖过程, 结果显示CI值与细胞的活性和贴壁增殖数量成正比, 细胞的活性越高, 贴壁增殖数量越多, CI

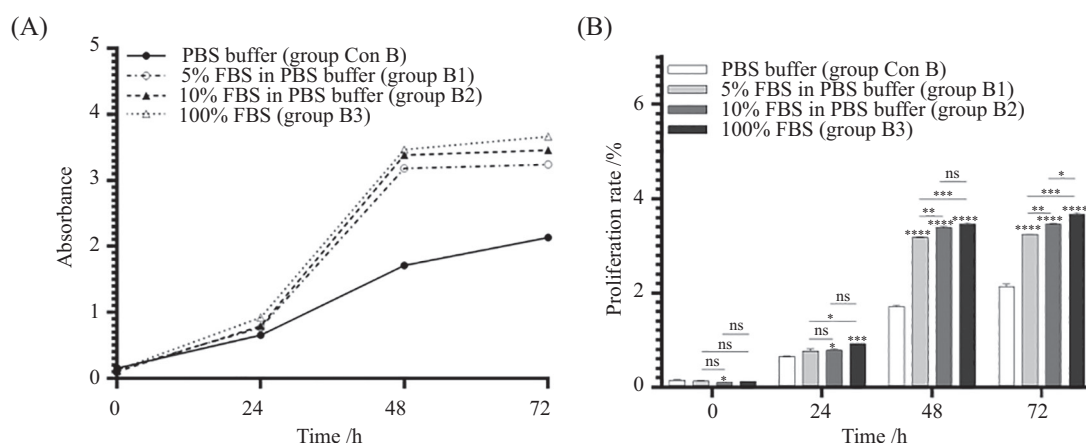


A: CCK-8检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, $^{ns}P>0.05$, $n=5$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by CCK-8 detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, $^{ns}P>0.05$, $n=5$ 。

图4 CCK-8检测A组收集液接收的293T细胞增殖情况

Fig.4 CCK-8 detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group A



A: CCK-8检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $^{ns}P>0.05$, $n=5$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by CCK-8 detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $^{ns}P>0.05$, $n=5$ 。

图5 CCK-8检测B组收集液接收的293T细胞增殖情况

Fig.5 CCK-8 detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group B

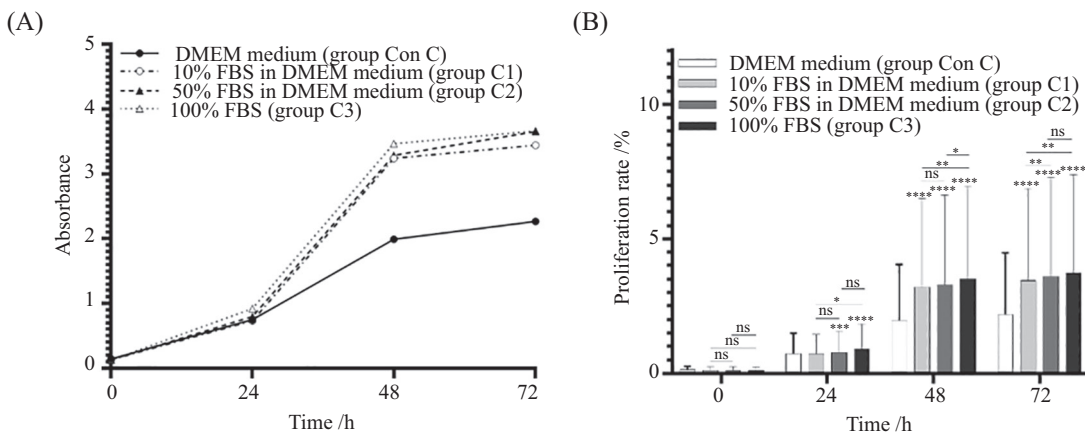
值越大。当E-plate孔中细胞贴满孔底,曲线进入平台期,CI值将停止增加。

2.3.1 A组收集液接收的293T细胞的实时增殖结果 观察细胞动态增殖曲线(图7)发现,随着孵育时间增加,细胞增殖曲线是连续的,且实验组接收的293T细胞CI值均明显高于对照组A。对连续监测72 h的实验结果进行统计分析发现,实验组293T细胞增殖活性明显高于对照组A,具有显著性的统计学差异($P < 0.0001$),表明BSA可提高分选后的细胞活性。而各实验组接收的293T细胞增殖活性比较,没有统计学差异($P > 0.05$)。

2.3.2 B组收集液接收的293T细胞的实时增殖结果

观察细胞动态增殖曲线,分析结果(图8)显示,实验组接收的细胞CI指数明显高于对照组B,具有显著性的统计学差异($P < 0.0001$),表明FBS可有效提高分选后细胞的增殖活性。各实验组接收的293T细胞增殖活性分析结果,没有统计学差异($P > 0.05$)。

2.3.3 C组收集液接收的293T细胞的实时增殖结果 观察细胞动态增殖曲线(图9)发现,实验组接收的细胞CI指数明显高于对照组C,具有显著的统计学差异($P < 0.0001$),表明培养基中加入FBS可以提高细胞增殖活性。各实验组接收的293T细胞增殖活性比较分析结果,没有统计学差异($P > 0.05$)。

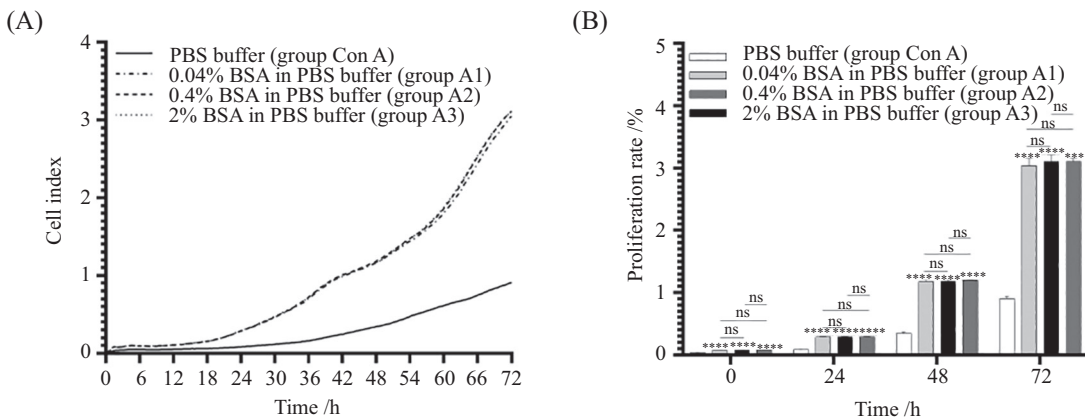


A: CCK-8检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 5$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by CCK-8 detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 5$ 。

图6 CCK-8检测C组收集液接收的293T细胞增殖情况

Fig.6 CCK-8 detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group C



A: RTCA检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。**** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 4$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by RTCA detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, $n = 4$ 。

图7 RTCA检测A组收集液接收的293T细胞增殖情况

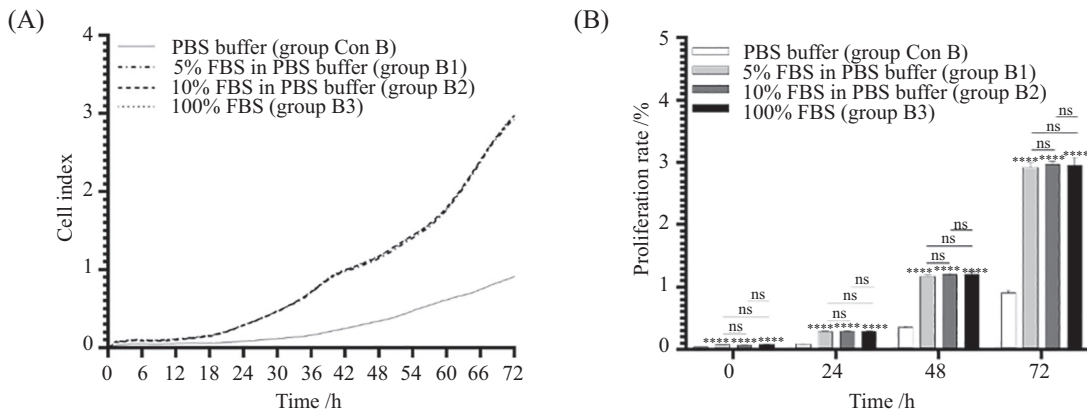
Fig.7 RTCA detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group A

3 讨论

流式分选后的细胞需经过分选前处理、高速检测、加电分选等过程,使得分选后的细胞比较敏感、脆弱,这就对分选后细胞的接收条件提出很高的要求,以保证细胞的高活性。293T细胞的活性直接关系到包装病毒和转染的效率,因此尽量保持细胞收集液的环境与细胞体外生长繁殖所需的营养环境一致,其中培养基常作为人工模拟体内生长的营养环境,为细胞提供生长与增殖的物质基础。血清为细胞生长提供蛋白等营养物质,其中血清蛋白可增加血清的黏度,并保护细胞免受机械损伤。BSA作为无血清培养基的基本配方,可增加培养基的黏度,保

护细胞免受机械损伤。缓冲液中的钾、钠离子为细胞提供必要的营养环境,维持细胞渗透压平衡,保持pH稳定,并维持细胞的形态。由于分选后的细胞收集液中除了细胞还有包裹细胞的鞘液,使得分选后的细胞收集液被鞘液稀释,所以本研究根据适合细胞生长繁殖的营养环境配制了3组收集液,研究收集液对分选后细胞活性的影响。

流式细胞检测结果(表1)显示,3组收集液中实验组接收的293T细胞的凋亡率均显著低于各自组内对照,比较实验组间细胞凋亡率,发现随着BSA浓度或FBS浓度增加,接收的293T细胞凋亡率虽有递增趋势,但没有统计学差异。表明BSA、FBS均可

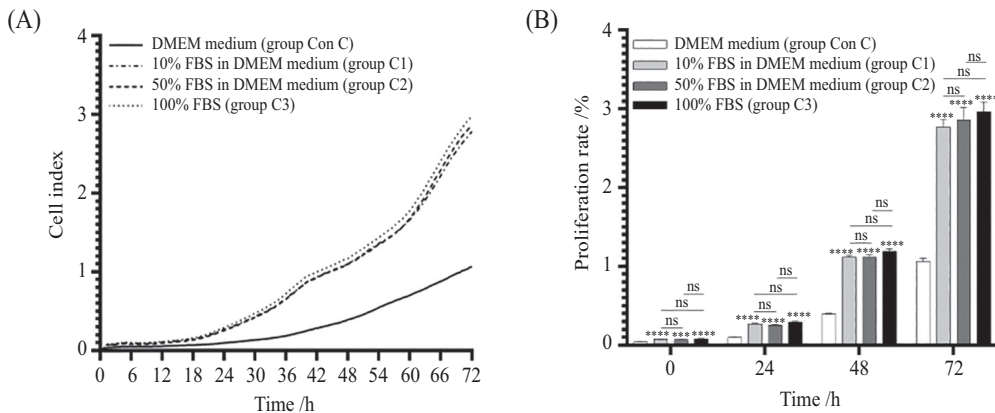


A: RTCA检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。**** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 4$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by RTCA detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. **** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 4$ 。

图8 RTCA检测B组收集液接收的293T细胞增殖情况

Fig.8 RTCA detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group B



A: RTCA检测分选后293T细胞的增殖曲线; B: 293T细胞增殖统计分析图。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 4$ 。

A: the proliferation curve of 293T cells after sorting by RTCA detection method; B: the proliferation statistics analysis graph of 293T cells. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, $^{ns}P > 0.05$, $n = 4$ 。

图9 RTCA检测C组收集液接收的293T细胞增殖情况

Fig.9 RTCA detects the proliferation of 293T cells received by the collection solution of group C

以有效降低细胞的凋亡率, 保证分选后细胞的活性。而不同浓度的BSA或FBS在降低细胞凋亡, 提高细胞活性方面没有显著差异。

CCK-8检测结果(表2)显示, 3组收集液中, 孵育0 h检测的实验组接收的293T细胞吸光度值低于对照组, 但没有明显统计学差异。造成这种情况, 可能是因为孵育时间过短还不能通过吸光度的检测如实反映细胞的增殖活性情况, 或者因为细胞经过分选后、孵育前过多的操作步骤, 导致细胞活性有所下降而出现偏差。孵育24 h后, 各实验组收集液接收

的细胞增殖活性均呈现上升趋势, 表明BSA或FBS仍有提高细胞增殖活性的作用。不同时间点各实验组内的增殖情况比较发现, 个别时间点有统计差异, 总体趋势统计差异不明显, 表明因BSA或FBS浓度不同以及检测的时间点不同, CCK-8检测的个别实验组细胞增殖活性有差异。

RTCA连续动态检测结果(表3)显示, 分选后的293T细胞从铺板开始到孵育72 h的细胞增殖曲线是连续的, 且实验组接收的293T细胞增殖活性显著高于对照组, 表明BSA或FBS确实可以提高细胞增殖

表1 3组收集液接收的293T细胞的流式凋亡结果比较

Table 1 Comparison of the apoptosis results of 293T cells received by three groups of collection solutions by flow cytometry

组别	分类	凋亡率/%	单因素比较	统计结果
Group	Category	Apoptosis rate /%	One-Way ANOVA	Statistical results
Group A	Con A: PBS buffer	17.53±2.144		
	A1: 0.04% BSA in PBS buffer	5.49±0.215	Con A vs A1	$P<0.000 1$
	A2: 0.4% BSA in PBS buffer	4.12±0.474	Con A vs A2	$P<0.000 1$
	A3: 2% BSA in PBS buffer	4.09±0.561	Con A vs A3	$P<0.000 1$
Group B	Con B: PBS buffer	17.53±2.144		
	B1: 5% FBS in PBS buffer	3.61±0.380	Con B vs B1	$P<0.000 1$
	B2: 10% FBS in PBS buffer	4.10±0.660	Con B vs B2	$P<0.000 1$
	B3: 100% FBS	3.35±0.510	Con B vs B3	$P<0.000 1$
Group C	Con C: DMEM medium	12.31±2.324		
	C1: 10% FBS in DMEM medium	3.71±0.291	Con C vs C1	$P<0.000 1$
	C2: 50% FBS in DMEM medium	3.76±0.516	Con C vs C2	$P<0.000 1$
	C3: 100% FBS	3.35±0.510	Con C vs C3	$P<0.000 1$

表2 3组收集液接收的293T细胞的CCK-8检测的增殖结果比较

Table 2 Comparison of the proliferation results of 293T cells received by three groups of collection solutions by CCK-8 detection

组别	分类	单因素比较	统计结果			
			Statistical results			
Group	Category	One-Way ANOVA	0 h	24 h	48 h	72 h
Group A	Con A: PBS buffer					
	A1: 0.04% BSA in PBS buffer	Con A vs A1	$P<0.01$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	A2: 0.4% BSA in PBS buffer	Con A vs A2	$P<0.01$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	A3: 2% BSA in PBS buffer	Con A vs A3	$P<0.05$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
Group B	Con B: PBS buffer					
	B1: 5% FBS in PBS buffer	Con B vs B1	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	B2: 10% FBS in PBS buffer	Con B vs B2	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	B3: 100% FBS	Con B vs B3	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
Group C	Con C: DMEM medium					
	C1: 10% FBS in DMEM medium	Con C vs C1	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	C2: 50% FBS in DMEM medium	Con C vs C2	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	C3: 100% FBS	Con C vs C3	$P>0.05$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$

表3 3组收集液接收的293T细胞的RTCA检测的连续动态增殖结果比较
Table 3 Comparison of the continuous dynamic proliferation results of 293T cells received by three groups of collection solutions by RTCA detection

组别 Group	分类 Category	单因素比较 One-Way ANOVA	统计结果 Statistical results			
			0 h	24 h	48 h	72 h
Group A	Con A: PBS buffer					
	A1: 0.04 %BSA in PBS buffer	Con A vs A1	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	A2: 0.4% BSA in PBS buffer	Con A vs A2	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
Group B	Con B: PBS buffer					
	B1: 5% FBS in PBS buffer	Con B vs B1	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	B2: 10% FBS in PBS buffer	Con B vs B2	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
Group C	Con C: DMEM medium					
	C1: 10% FBS in DMEM medium	Con C vs C1	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	C2: 50% FBS in DMEM medium	Con C vs C2	$P<0.001$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$
	C3: 100% FBS	Con C vs C3	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$	$P<0.000 1$

活性。随着BSA或FBS浓度的增加,各实验组细胞的增殖活性没有统计学差异,表明不同浓度的BSA或FBS在提高细胞增殖活性方面没有差异。

综上,根据3组收集液接收的分选后细胞凋亡情况与增殖情况以及各实验组内、实验组间统计结果分析,综合考虑收集液被鞘液稀释的情况以及试剂的经济成本等因素,可以选择含0.4% BSA的PBS缓冲液或含10% FBS的PBS缓冲液或含10% FBS的DMEM培养基用作分选后细胞的收集液。

通过本研究还发现,检测分选后细胞凋亡或增殖等活性的方法中,RTCA检测法具有极简的操作流程,无须标记,可实时动态监测细胞整个生长变化过程。CCK-8检测成本较低,操作过程须要添加检测试剂并选取一些时间点,从而获得细胞增殖变化情况。流式细胞检测成本相对较高,操作步骤比较多,须要使用荧光标记获得终点增殖数据。因此,RTCA检测法对于细胞活性研究而言,细胞用量少、操作便捷,适用于分选后细胞活性的实时检测,可作为细胞功能深入研究的基本手段。该检测方法有望为基础医学及临床医学中的细胞活性检测研究提供指导,具有推广意义。

参考文献 (References)

- [1] AUSUBEL L J, HALL C, SHARMA A, et al. Production of CGMP-grade lentiviral vectors [J]. *Bioprocess Int*, 2012, 10(2): 32-43.
- [2] 张名媛, 郭晓萍, 孙晴超, 等. 广西巴马小型猪miR-148b慢病毒制备及靶基因通路预测分析[J]. *南方农业学报* (ZHANG M Y, GUO X P, SUN Q C, et al. Construction of miR-148b lentivirus vector and prediction of target gene pathways in Guangxi Bama mini-pig [J]. *Journal of Southern Agriculture*), 2019, 50(7): 1596-604.
- [3] 徐兰, 刘敏英. 293T细胞的培养[J]. *细胞生物学杂志* (XU L, LIU M Y. Culture of 293T cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2009, 31(1): 130.
- [4] 汪新建, 樊爽爽, 翁少亭, 等. AAV-SaCas9敲除MSTN基因病毒的构建及鉴定[J]. *河南农业科学* (WANG X J, FAN S S, WENG S T, et al. Construction and identification of MSTN knockout AAV-SaCas9 [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*), 2018, 47(1): 118-21.
- [5] GROGAN W M, COLLINS J M. *Guide to flow cytometry methods* [M]. New York: Mareel Dekker, 1990: 29-190.
- [6] 刘洋, 王丽婷, 刘芳, 等. 流式细胞分选优化经验浅谈[J]. *科学咨询* (LIU Y, WANG L T, LIU F, et al. Discussion on optimization experience of flow cytometry [J]. *Scientific Advisor*), 2018(1): 55-6.
- [7] 户乃丽, 徐晓雪, 邹林樾, 等. 利用BD FACSAria III二次分选法纯化低比例细胞群体的流式细胞技术[J]. *中国医疗器械信息* (HU N L, XU X X, ZOU L Y, et al. Flow cytometry for purification of low proportion cell population by BD FACSAria III secondary [J]. *China Medical Device Information Separation*), 2020, 26(21): 19-21.
- [8] 吴昊, 王敏, 罗贤强, 等. 利用流式分选技术富集空载质粒转染特定巨噬细胞的方法及条件优化[J]. *温州医科大学学报* (WU H, WANG M, LUO X Q, et al. The method and optimized condition for enriching empty plasmids transfected specific macrophages by flow cytometry sorting [J]. *Journal of Wenzhou Medical University*), 2019, 49(6): 408-11,17.
- [9] 陈朱波, 曹雪涛. *流式细胞术-原理操作及应用*, 第二版[M]. 北京: 北京科学出版社, 2010, 85-142.
- [10] 闵智慧, 程韵枫. 第三代流式细胞分选仪及96孔板分选单个

- 细胞的方法及参数优化[J]. 中国临床医学(MIN Z H, CHENG Y F. Method and parameter optimization of the third-generation flow cytometry sorter and 96-well plat in single cell sorting [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine), 2016, 23(6): 846-50.
- [11] 张小翠, 符蓉, 赵犇鹏. 流式细胞仪 MoFlo Astrios^{EQ} 96孔板单细胞分选方法的条件优化[J]. 上海交通大学学报(医学版)(ZHANG X C, FU R, ZHAO B P. Condition optimization of the Flow cytometry MoFlo Astrios^{EQ} on single-cell sorting in 96-well plate [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, Medical Science), 2018, 38(7): 845-50.
- [12] WALLBERG F, TENEV T, MEIER P. Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2016, 2016(4): 347-53.
- [13] 张伟, 梁智辉. Annexin V-FITC/PI双标记与Hoechst33342/PI双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志(ZHANG W, LIANG Z H. Comparison between annexin V-FITC/PI and Hoechst33342/PI double stainings in the detection of apoptosis by flow cytometry [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology), 2014, 30(11): 1209-12.
- [14] 邵军丽, 李林秋, 戴娟秀, 等. CCK-8试剂用于测定活细胞数量的细节研究[J]. 生物技术世界(SHAO J L, LI L Q, DAI J X, et al. Detailed study of CCK-8 reagent for measuring the number of living cells [J]. Biotech World), 2016(5): 31-2.
- [15] BONNIER F, KEATING M E, WRÓBEL T P, et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(1):124-131.
- [16] SOBOLESKI M R, OAKS J, HALFORD W P. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells [J]. FASEB J, 2005, 19(3): 440-2.
- [17] GIAEVER I, KEESE C. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(12): 3761-4.
- [18] 严国俊, 裴燕芳, 朱贞宏, 等. 实时细胞电子分析技术的应用研究进展[J]. 中国药理学杂志(YAN G J, PEI Y F, ZHU Z H, et al. Research progress in application of real-time cell-based assay (RTCA) [J]. Chinese Pharmaceutical Journal), 2014, 49(3): 169-73.
- [19] 李艳伟, 宋兴辉, 王佳佳, 等. 实时无标记肿瘤细胞凋亡筛选技术体系的建立[J]. 生物技术通报(LI Y W, SONG X H, WANG J J, et al. Establishment of the real-time and label-free screening system for tumor cell apoptosis [J]. Biotechnology Bulletin), 2019, 35(10): 220-6.