无菌条件下贴壁细胞换液的 Bravo 自动化液体处理平台参数设置 Parameter Setting of Bravo Automated Liquid Handling Platform for Adherent Cells Medium Exchange Under Sterile Condition

慈云青*

化学生物学技术平台，中国科学院分子细胞科学卓越创新中心，上海市

*通讯作者邮箱: yqci@sibcb.ac.cn

引用格式: 慈云青. (2021). 无菌条件下贴壁细胞换液的 Bravo 自动化液体处理平台参数设置案. *Bio-101* e1010845. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010845.

How to cite: Ci, Y. Q. (2021). Parameter Setting of Bravo Automated Liquid Handling Platform for Adherent Cells Medium Exchange Under Sterile Condition. *Bio-101* e1010845. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010845. (in Chinese)

摘要: 在一些高通量筛选实验中，细胞培养一定时间后，培养液营养成分和代谢产物逐渐变化，导致低 PH 环境，进而对细胞生长产生影响。另外，在诱导分化或其他特定表型出现的筛选体系中，也往往涉及更换不同成分培养液的操作。所以，实验者需要在无菌条件下对微孔板内细胞更换培养液，以维持细胞继续增长。传统方法需要通过排枪吸液和加液，耗时长，且易将贴壁不牢的细胞吸起，导致实验失败，合适的高通量仪器可以帮助实验者实现贴壁细胞换液操作。本文采用 293-T 细胞，细胞培养于 384 孔板，通过 Bravo 自动化液体处理平台，可以实现无菌条件下细胞换液，细胞贴壁不脱落，且不影响细胞状态，以期后续实验的顺利进行，为优化筛选体系中的换液操作提供参考流程。

关键词: 高通量筛选实验，贴壁细胞换液，Bravo，参数设置

材料与试剂

1. DMEM 培养液 (HyClone, Catalog Number: SH 3024301)
2. TRYPSIN-EDTA (0.25%) (Gibco, Catalog Number: 25200056)
3. 384 孔黑边底透板 (Corning, Catalog Number: 3764)
4. 96 孔 PP 材质板 (Corning, Catalog Number: 3879)

5. 15 ml 离心管 (NEST, Catalog Number: 601002)
6. 50 ml 离心管 (NEST, Catalog Number: 602002)
7. Multidrop 仪器标准管分液盒 (Thermo, Catalog Number: 24072671(0))
8. 细胞计数片 (BodBoge 细胞计数仪配置)
9. 移液管 (Corning, Catalog Number: 4488)
10. 100 mm 细胞培养皿 (NEST, Catalog Number: 704001)
11. 70 μ l 384 孔 Bravo 仪器移液头盒 (Fluotics, Catalog Number: AGI-P70.ST)

仪器设备

1. BodBoge 细胞计数仪 (上海祥合医疗器械有限公司, 型号: JSY-SC-021H)
2. Multidrop Combi 自动分液器 (Thermo Fisher Scientific, 型号: Multidrop Combi)
3. Bravo 自动化液体处理平台 (Agilent Technologies, 型号: Bravo)
4. 高速离心机 (Eppendorf, 型号: Centrifuge 5810R)
5. Ensign 多功能微孔板检测仪 (PerkinElmer, 型号: Ensign Multimode Plate Reader)
6. 37 °C 恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 型号: SERIES 8000 DH)

实验步骤

1. 接种细胞

293-T 细胞用胰酶消化后, 悬浮于含 10%胎牛血清 DMEM 培液的 15 ml 离心管中, 取 10 μ l 细胞悬液使用 BodBoge 细胞计数仪记取个数, 然后计算细胞合适接种量, 再使用 Multidrop 自动分液器, 按每孔 1,000 个细胞接种于 384 孔板, 微孔板每孔加入 55 μ l 细胞液, 129 $\times$ g 离心 2 min, 然后放置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱孵育 72 h。

2. 使用 Bravo 仪器进行细胞换液操作

2.1 打开层流净化罩紫外灯, 光照 30 分钟后, 打开风机, 达到无菌效果。

2.2 在 Bravo 电脑控制软件里编写程序。

整个程序流程是从细胞板里吸液, 加入到盛装废液的微孔板中, 然后从含新鲜培养液的微孔板中吸取培养液, 加到细胞板中。下文所叙述的是从细胞板里吸液和往细胞板里加液的参数设置情况。

2.3 设置从 384 孔细胞板里吸液程序。

图 1. Bravo 操作软件中吸液 Task Parameters 显示图

图 1 显示的是从细胞板里吸液的 Aspirate Task Parameters。

在 Aspirate Task Parameters 设置中，Volume 选择 60 µl，即从细胞板里吸取培养液体积，Well selection 选择所需吸取培养液的细胞板内列数（本文实验中，移液头按列排列一次性获取 8 根移液头吸液或加液，也即做 8 个复孔）。

另外，影响吸液效果的关键参数主要包括：1. Liquid class, 2. Distance from well bottom。其中 Aspirate Liquid class 参数中主要包含 Aspirate Parameters 设置（图 2），它包括 Velocity、Acceleration 和 Post-aspirate delay，在此次实验中，主要调节前两项参数（见表一）。

图 2. Bravo 操作软件中 Aspirate Parameters 显示图

表一. Aspirate Liquid Class 参数设置

	①	②	③	④	⑤	⑥
Velocity(0.1-500 $\mu\text{l/s}$)	1	5	10	50	100	500
Acceleration(1-1,000 $\mu\text{l/s}^2$)	1	5	10	50	100	500

吸液参数优化思路: 先选定表一中 **Aspirate Parameters** 最低速度和加速度条件 (见表一条件①, 也即 Velocity: 1 $\mu\text{l/s}$, Acceleration: 1 $\mu\text{l/s}^2$), 调节 Distance from well bottom (移液头距细胞板底高度), 由 0.5、1、1.5、2、2.5 和 3 mm 依次变化, 观察细胞贴壁情况。根据实验结果及实验需求, 选择合适的 Distance from well bottom。根据这个高度, 变化不同的 **Aspirate Parameters** 参数设置 (见表一, ①②③④⑤⑥6 种条件), 观察细胞贴壁情况及考虑实验所需时间, 选择合适的 **Aspirate Parameters** 和 Distance from well bottom 参数设置。

2.4 找到合适的吸液参数条件后, 确定向细胞板加新鲜培养液的参数条件。

Dispense Task Parameters 程序设置中 Volume 选择 50 μl , 即移液头往细胞板里加液体积, Well selection 选择与吸取培养液列数相一致的列数进行加液。同吸液参数设置类似, 影响加液效果关键参数主要也包括: 1. Liquid class 2. Distance from well bottom (图 3)。

图 3. Bravo 操作软件中加液 Task Parameters 显示图

其中 Dispense Liquid class 参数中主要包含 Dispense Parameters 设置（图 4）。在此次实验中，主要调节图中 Dispense Parameters 中的 Velocity 和 Acceleration 数值，调节条件见下表二，根据调节不同的参数设置，观察细胞贴壁情况。

图 4. Bravo 操作软件中 Dispense Parameters 显示图

表二. Dispense Liquid Class 参数设置

	①	②	③	④	⑤	⑥
Velocity(0.1-500 $\mu\text{l/s}$)	1	2	5	10	15	50
Acceleration(1-1,000 $\mu\text{l/s}^2$)	1	2	5	10	15	50

参数设置思路同吸液参数设置思路。即先选定表二中 Dispense Parameters 最低速度和最低加速度（见表二条件①，也即 Velocity: 1 $\mu\text{l/s}$, Acceleration: 1 $\mu\text{l/s}^2$ ），然后调节 Distance from well bottom，由 0.5、1、1.5、2、2.5 和 3 mm 依次变化，观察细胞贴壁情况。根据实验结果和需求，确定合适的 Distance from well bottom，根据此高度，变化不同的 Dispense Parameters 参数设置（如表二，①②③④⑤⑥6 种条件），观察细胞贴壁情况、考虑实验所需时间和可重复性，选择合适的 Dispense Parameters 和 Distance from well bottom 参数设置。

2.5Bravo 程序设置好后，仪器准备运行。Bravo 程序设置好后，仪器准备运行。

3. Ensight 仪器成像

Bravo 仪器运行结束后，将细胞板离心，129 $\times g$, 1 min，之后使用 Ensight 仪器成像。

结果与分析

使用 Bravo 自动化液体处理平台进行细胞换液包括两个步骤：1.从细胞板里吸培养液，2.往细胞板里加新鲜培养液。

对于吸液条件来说，当固定 **Aspirate Parameters** 条件，选择表一条件①，移液头在距细胞板底 0.5、1 和 1.5 mm 位置处，细胞均易被吸起，而在 2 mm 及以上位置处，细胞不易被吸起（图 5），所以吸液参数 **Distance from well bottom** 可选择 2 mm。

图 5. 设定细胞板内吸液 **Aspirate Parameters** 参数不变，变化 **Distance from well bottom** 进行吸液后孔内细胞状态图

当固定吸液参数 Distance from well bottom 为 2 mm，依次变化 Aspirate Parameters 中速度和加速度，调节条件依次是表一条件①-⑥，发现当固定高度在 2 mm 处后，变化 Aspirate Parameters 条件①-⑥对细胞状态影响较小，均未将细胞吸起（图 6）。

图 6. 设定从细胞板内吸液 Distance from well bottom 为 2 mm, 变化 Aspirate Parameters 参数进行吸液后孔内细胞状态图

考虑吸液时间及细胞状态等综合因素，吸液中设置 Distance from well bottom 为 2 mm，Aspirate Parameters 是表一中条件③，也即 Velocity: 10 μl /s，Acceleration: 10 μl/s²。

固定好吸液条件后，随即选择 **Dispense Parameters** 表二条件中最低速度和加速度（见表二条件①，**Velocity: 1 $\mu\text{l/s}$** , **Acceleration: 1 $\mu\text{l/s}^2$** ），变化加液的 **Distance from well bottom** 的参数设置。我们发现，在移液头距细胞板底 1 mm 及以上处没有细胞脱落（图 7）。根据实验稳靠性考虑，加液参数 **Distance from well bottom** 设置成 2 mm

o

图 7. 固定从细胞板内吸液 **Aspirate Parameters** 和 **Distance from well bottom**，往细胞板里加液 **Dispense Parameters** 参数也不变，变化加液中 **Distance from well bottom** 进行加液后孔内细胞状态图

然后我们选择加液参数 **Distance from well bottom** 为 2 mm，变化 **Dispense Parameters** 条件，设置从如表一条件①-⑥依次变化，调节至条件⑥（**Velocity: 50 $\mu\text{l/s}$** , **Acceleration: 50 $\mu\text{l/s}^2$** ），细胞会被吹起（图 8），我们根据细胞状态及实验使用时间等

因素考虑, Dispense Parameters 选择表二条件③ (Velocity: 10 $\mu\text{l/s}$, Acceleration: 10 $\mu\text{l/s}^2$), Distance from well bottom 选择 2 mm。

图 8. 固定从细胞板内吸液 Aspirate Parameters 和 Distance from well bottom, 往细胞板内加液中 Distance from well bottom 不变, 变化加液中 Dispense Parameters 参数进行加液后孔内细胞状态图

同时, 我们还进行了对整块 384 孔细胞板进行吸液和加液的操作。如上所述, 吸液条件: Distance from well bottom 为 2 mm, Aspirate Parameters 是 Velocity: 10 $\mu\text{l/s}$, Acceleration: 10 $\mu\text{l/s}^2$; 加液条件: Distance from well bottom 为 2 mm, Dispense

Parameters 是 Velocity: 10 $\mu\text{l/s}$, Acceleration: 10 $\mu\text{l/s}^2$ 。发现在这个条件下，整板 293-T 细胞也未被吸起。

所以，我们使用 Bravo 自动化液体处理平台对 293-T 细胞板进行换液操作，293-T 细胞可以贴壁不脱落。

由本次实验可知，适当调节好从细胞板里吸液和往细胞板里加液的三个参数（1. Aspirate Parameters, 2. Dispense Parameters, 3. Distance from well bottom），是可以实现贴壁不牢细胞的换液操作的。

需要注意的是，根据前期实验摸索得到临界参数条件时，Distance from well bottom 设置高度适当提高一些，Aspirate Parameters 和 Dispense Parameters 中速度和加速度适当降低一些，这样可以保证实验的重复性。

另外，在吸液条件中，Distance from well bottom 设置高度不同，细胞板内培养液剩余体积会不同，随移液头距细胞板底高度的提高，培养液剩余体积逐渐增多。如果实验者希望原始培养液干扰实验影响降至最低，可以参照文中叙述距底高度条件，根据自身细胞特点，选择合适的距底高度，然后通过重复吸液加液操作，将原始培养液逐渐稀释，以此达到实验要求。

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台的每位成员的帮助。

参考文献

1. Masters, J. R. and Stacey, G. N. (2007). [Changing medium and passaging cell lines.](#) *Nat Protoc* 2(9): 2276-2284.
2. 徐兰 和 刘敏英 (2009). 293T 细胞的培养. *细胞生物学杂志*(01): 130-130.