

用 VIPS 和 InstiGRO 補充劑 改善 CHO-K1 集落生長的單 細胞接種實驗條件

相對於單細胞分離 (Single cell isolation) 步驟，克隆效率 (Cloning Efficiency)，或者說集落生長 (Colony Outgrowth) 在細胞株開發 (Cell line development) 工作流程中常被忽略。然而，單顆細胞的恢復 (Recovery) 和生長 (Growth) 是該過程中眾所周知的挑戰性步驟。

介紹

新基因編輯技術、新細胞株、補充劑和單細胞克隆 (Single cell cloning) 自動化技術的出現正在迅速提高細胞株開發的效率，然而，仍然有許多因素可以影響單細胞分裂 (Divide)，以及在最初的單細胞分離後繼續分裂成克隆細胞株 (Clonal cell line) 的傾向。

確定單細胞成功生長的最佳條件就像是拼圖遊戲，其中包括宿主細胞株、轉染條件、方法、載體、接種 (Seeding) 前的選擇和恢復期，甚至接種後的眾多生長條件因素，如孔盤類型、孔盤塗層、培養基類型、培養基體積。

為了獲得克隆生長 (Clonal outgrowth) 的最佳結果，並不像選擇一個因素 (例如單細胞接種方法) 進行優化那麼簡單。相反，需要從很多方面進行測試，消除不利因素，並增強有利因素。

所有優化步驟都不會徒勞，因其最終會使得更多數量的細胞克隆在單細胞分離的過程中存活下來，從而減少挑選克隆的數量，乃至使用的孔盤數量，進而減少了處理克隆所花費的時間和勞動力。

在眾多因素中，本篇實驗考慮了四個高克隆效率的關鍵因素，分別是**單細胞接種方法 (Single cell seeding method)**、**基礎細胞培養基 (Base cell culture media)**、**培養基補充劑 (Media supplements)** 和**固有細胞池差異 (Inherent pool differences)**。

材料和方法

HD-BIOP3 (Horizon Discovery) GS Knockout CHO K1 commercial cell line 用於所有實驗。限制性稀釋 (Limiting Dilutions, LD) 與 VIPS™ 進行細胞接種 (Cell seeding) 比較 (圖1)。Gibco® CD CHO 和 CD FortiCHO 細胞培養基用於細胞生長 (Outgrowth)，比較有無添加條件培養基 (Conditioned media, CM)、InstiGRO™ CHO 和 InstiGRO™ CHO PLUS 細胞營養補充劑對克隆生長的差異。

所有實驗均使用 Corning CELLBIND 孔盤 (3300)。在所有實驗中，將200 μ L 細胞培養基添加到 well 中，將孔盤在37 $^{\circ}$ C 下反應，並在第0、1、7、14天監測細胞生長 (Outgrowth) 情況，並使用 Cell Metric® 全孔成像儀 (Whole well imager) 監測克隆性 (Clonality) 和匯合 (Confluency) 情況。

所有細胞集落 (Colony) ，包含 VIPST[™] 和 LD 組別，均需監測是否來自單顆細胞，因為實際上在 LD 組別孔盤中會觀察到的許多 colony 源自2個或更多細胞。



圖1. VIPST[™] 確保高接種效率

結果與討論

Seeding Method - LD vs VIPST[™]

LD 被認為是最溫和的單細胞分離方法；然而，它是極其勞動密集、效率低下的，而且操作人員之間的差異很大。全孔成像設備的出現強調了另一個眾所周知的實用性，即儘管有機會獲得每 well 單個細胞並且與泊松分佈 (Poisson distribution，註1) 相對一致，但實際上所得的 colony 更有可能是從兩個或多個細胞，而不是一個細胞生長而來。

這些挑戰推動了 VIPST[™] 等新的自動化細胞接種機型之發展。使用基於影像 (Image-based) 的細胞偵測方式，每 well 獲得單一細胞的機會比 LD 更高且更普遍。

在最佳起始細胞濃度下，假設泊松分佈並使用0.5 cell/well 的濃度，VIPST[™] 通常可以達到70-85% 的接種效率，而 LD 只能達到30 %。許多 LD 使用者使用較低的濃度0.2 cell/well，或進行多次 LD，以獲得更大的分離單細胞的機會。

圖2顯示 VIPST[™] 接種孔盤可以產生33個含有克隆的 well，而 LD 孔盤僅產生12個。更重要的是，在LD 孔盤中還有11個 well 中具有 colony。如果沒有額外的影像證據 (如 VIPST[™] 和 Cell Metric[®] 的全孔成像)，這些非單一細胞形成的 colony (以紅叉顯示) 在以往就會被認為是細胞克隆。

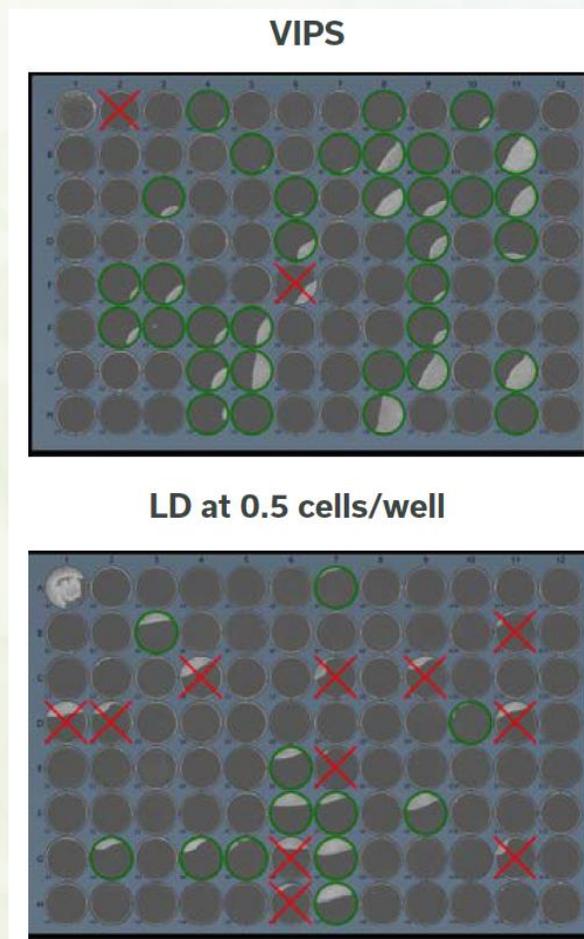


圖2. VIPST[™] 接種孔盤和手動LD接種孔盤的 Cell Metric[®] 概覽影像。綠圈顯示 colony 源自單一細胞的 well。紅叉顯示 colony 源自多個細胞的 well

Supplements - Conditioned Media vs InstiGRO™ CHO vs InstiGRO™ CHO PLUS

根據經驗和上面顯示的數據，我們知道某些培養基被認為比其他培養基“更精簡”，因此並不總是適合單細胞克隆生長。因此，在單細胞克隆階段使用的生長補充劑對於減少細胞壓力並幫助生長成 colony 以進行進一步評估至關重要。

對於大多數細胞株開發群體來說，添加血清 (Serum) 不是一種選擇，因此歷史上條件培養基 (Conditioned Media) 曾提供促進單細胞分裂的作用，然而，它可以是收穫然後驗證條件培養基性能的額外步驟，因為結果通常是可變的。

當比較VIPST™結果與LD結果 (相同的生長條件) 時，可以清楚地看到，VIPST™ 在實現每孔盤多個 well 且單細胞生長成 colony 方面要高效得多。

Base Media – CD CHO vs FortiCHO

商業細胞株通常具有最佳的生長條件；然而，這對於單細胞生長來說可能並不理想。細胞株開發的目標也可能是在從 CLD 到生產的整個過程中保持培養基條件盡可能一致。然而，選擇適當的基礎培養基可能會影響細胞從單一細胞生長的傾向，因此應該進行研究。

圖3表明，存在條件培養基的情況下，使用 FortiCHO 基礎培養基獲得的克隆生長 (Outgrowth) 結果優於使用 CD CHO 基礎培養基獲得的結果。

然而，在補充了 InstiGRO™ 的不同基礎培養基中，並沒有觀察到克隆生長 (Outgrowth) 的差異。這意味著基礎培養基的適用性之間存在差異，但是，透過添加足夠的補充劑來維持單細胞生長，基礎培養基類型的影響會降低。

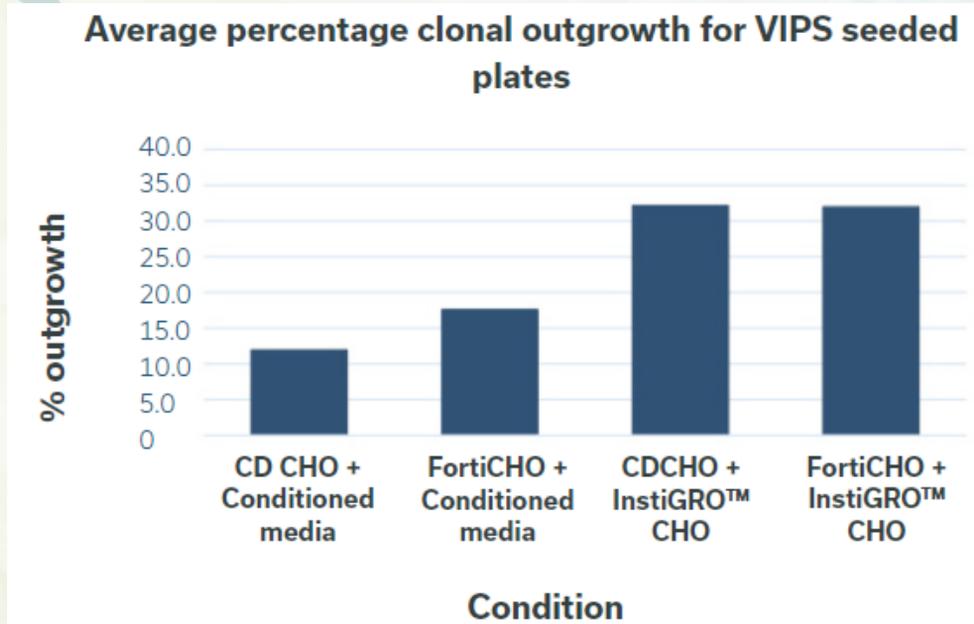


圖3. 在 CH CHO 與 FortiCHO 兩種培養基中，添加條件培養基以及添加 InstiGRO™ CHO 的平均克隆生長比較

圖4顯示，無論基礎培養基如何，條件培養基的性能均不如專門優化的 InstiGRO™ CHO 補充劑。

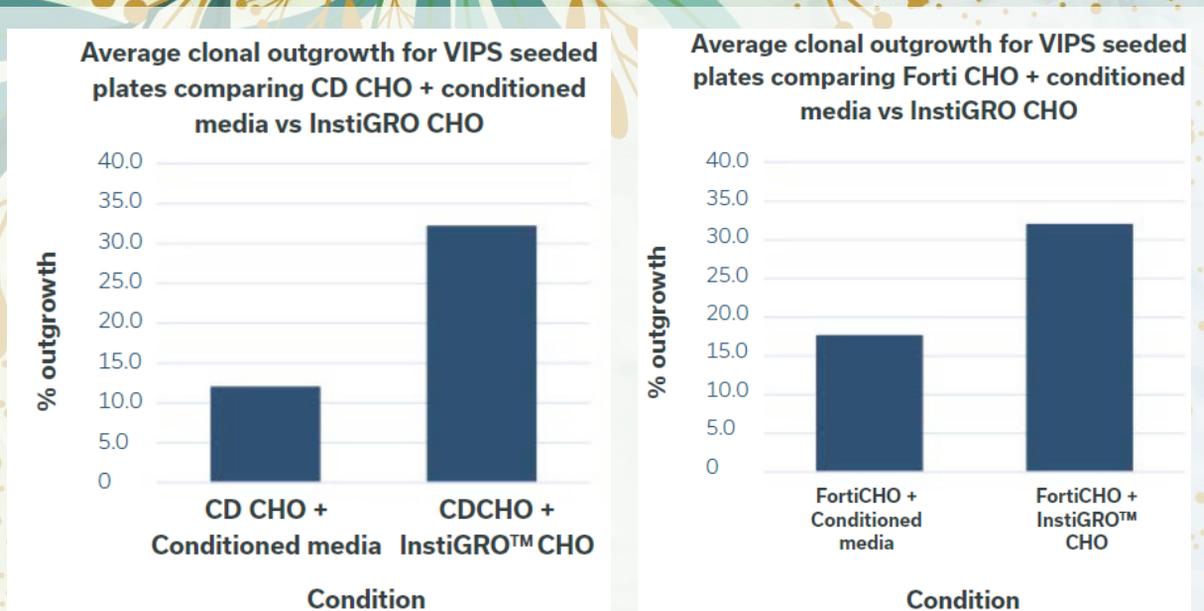


圖4. 比較使用 VIPS™ 接種細胞下，用 CD CHO 和 FortiCHO 添加條件培養基與添加 InstiGRO™ CHO 的克隆生長比較。

對於 CD CHO 和 FortiCHO 兩組別來說，與添加條件培養基相比，添加 InstiGRO™ CHO 補充劑的組別皆顯著增加了克隆生長wells的數量。

在此之後，InstiGRO™ CHO 產品的進一步優化促進了 InstiGRO™ CHO PLUS 的開發，InstiGRO™ CHO PLUS 使得本實驗中克隆生長百分比進一步提高 (見圖5)。

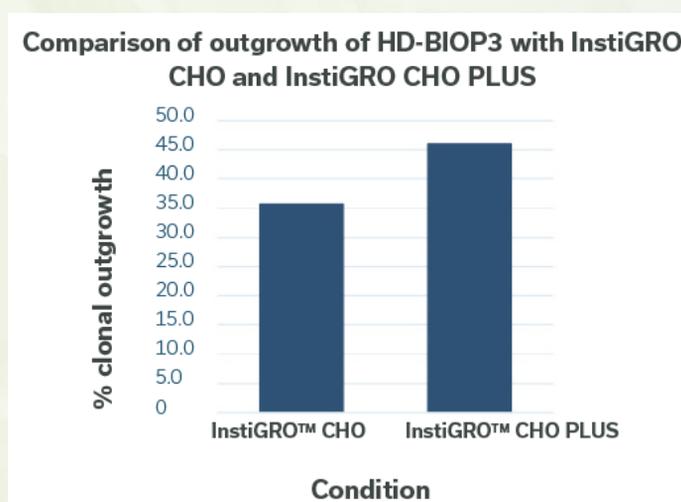


圖5. 使用 VIPS™ 接種細胞，比較使用 FortiCHO 添加 InstiGRO™ CHO 和 InstiGRO™ CHO PLUS 補充劑的 HD-BIOP3 克隆生長。

Pool Performance

最後，在優化親代細胞株以建立支持單細胞生長的最佳條件後，考慮轉染 (Transfection) 和選擇 (Selection) 對生長 (Outgrowth) 的影響很重要，相同的細胞培養條件可能會顯示轉染群體的內在差異。

相同的細胞培養條件也可能仍表現出內在差異。圖6說明了這一點，因此應該對一系列細胞池 (Pool)/已建立的表達細胞株進行優化。

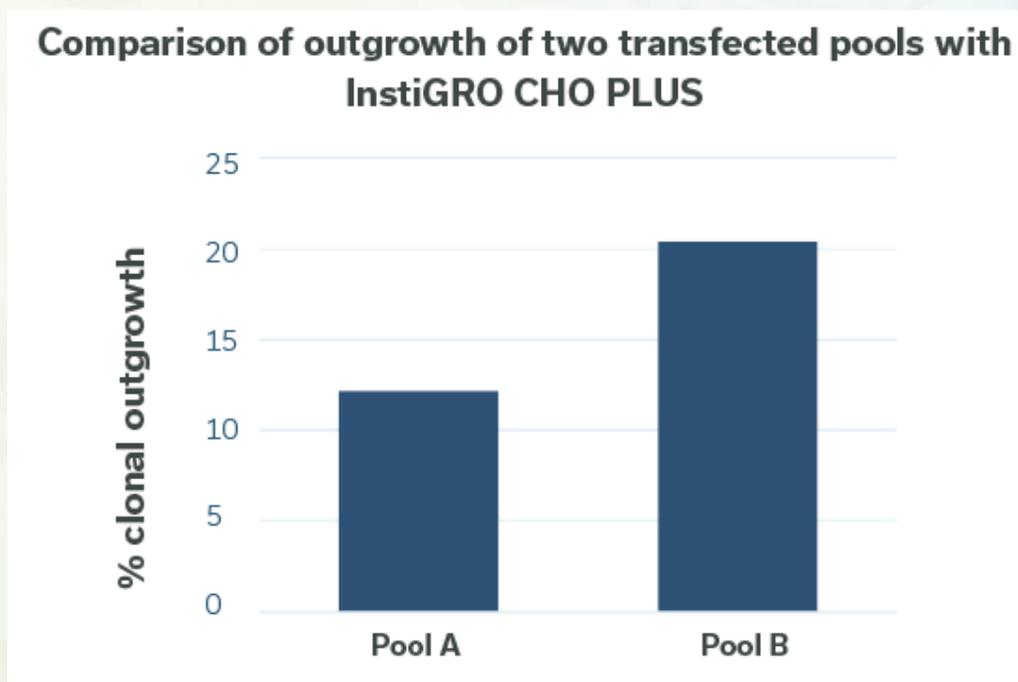


圖6. 使用 VIPST[™] 接種細胞，比較添加條件 InstiGRO[™] CHO PLUS 補充劑的兩個細胞池 (Pool) 之克隆生長表現

結論

本篇實驗所提供的數據表明了，在優化生長條件時考慮可能影響單細胞生長的眾多因素的重要性。接種方法和儀器可以從一開始就顯著提高細胞接種效率，但如果單細胞周圍的條件和環境不是最佳的，那麼要提高隨後的生長和克隆效率將始終是一項挑戰。VIPST[™] 和 InstiGRO[™] CHO 產品的結合顯著且持續地提高了這些實驗中實現的克隆生長百分比。未來這些研究將繼續擴展到不同的商業細胞株上。

註1：泊松分佈 (Poisson distribution)，又稱為卜瓦松分布，是一種統計與機率學裡常見的離散機率分布，由法國數學家西莫恩·德尼·卜瓦松在1838年時發表。泊松分佈是二項分佈處理罕見事件的特殊情形，亦即樣本的數目趨向無窮大，事件發生的機率趨向無窮小。在這情況下，二項分佈就可簡化成卜瓦松分佈 $P_n = m^n \times e^{-m} / n!$ (e是自然常數)。當事件發生的平均值(期望值)是m次時，發生n次的機率 (Pn) 可以用這公式算出來。把泊松分佈用在樣本很多和機率很小的事件，雖然得到的結果只是近似值，但還是很方便。它只有m和n兩個變數，不像二項分佈有三個變數。分子生物學常常使用泊松分佈處理族群很大，但是發生機率很低的事件，例如基因的突變和重組、病毒感染、神經元激發、放射性衰退，都適用卜瓦松分佈來分析。(參考資料：[科學人期刊：馬蹄下的統計學](#))

文章來源：[Single Cell Seeding Conditions for improved colony outgrowth. Optimizing for HD-BIOP3 with the VIPST[™] and InstiGRO[™] supplements. \(Advanced Instruments\)](#)