

使用灵活的 SciVario® twin 双联生物反应器生产干细胞外泌体, 满足您的生物工艺需求

Jorge L. Escobar Ivirico and Ma Sha

Eppendorf, Inc., Enfield, CT, USA

Contact: bioprocess-experts@eppendorf.com

摘要

间充质干细胞(MSC)来源的外泌体是一种新的组织和器官恢复物质, 弥补了干细胞疗法相关的局限性。

MSC 来源外泌体参与细胞间通讯和组织重建相关的 MSC 旁分泌功能, 使得细胞自我更新和分化。尽管使用干细胞具有诸多优点, 但也存在一些局限性, 比如如何模拟良好的细胞生长的条件进行大规模生产。因此, 下一步需要在可控环境下增加外泌体产量。在本研究中, 我们将 SciVario® twin 生物反应器控制系统和 BioBLU® 1c 一次性罐体组合使用, 作为生物反应器大规模生产外泌体的案例。

SciVario twin 是 Eppendorf 开发的一种“永不过时”的生物反应器控制系统。该控制器遵循灵活性的开发原则, 目前设计的最大工作体积为 3.7L, 但该系统的灵活性使得未来可以通过硬件和软件的更新将工作体积升级至 40L。在本应用指南中, 我们监测和分析了人源诱导多能干细胞(hiPSC)的代谢产物以及细胞贴壁状态和形态, 结果显示我们实现了长期的良好细胞生长环境。此外, 我们还对 MSC 产生的外泌体进行分离、纯化、定量(使用 CD63 ELISA 试剂盒)。

引言

再生医学是关于组织和器官的结构工程学与功能工程学的多学科领域。由于可以迁移至受伤部位并通过旁分泌因子(分泌体蛋白质组)促进组织再生, 间充质干细胞已成为此类研究使用最广泛的干细胞类型 [1-3]。但是, 细胞分化控制不足和目标组织中细胞存活率较低的相关问题导致 MSC 吸引力下降。

最近, 旁分泌因子的关注度日益增加, 其有望克服 MSC 的局限性。胞外囊泡(EV), 包括外泌体是参与胞内通讯和运输的重要旁分泌因子之一 [4]。

外泌体是直径在 30 至 200nm 之间的一种脂质双层囊泡, 可通过四层跨膜蛋白的 CD9、CD63 和 CD81 等表面标志物轻松确认 [5]。

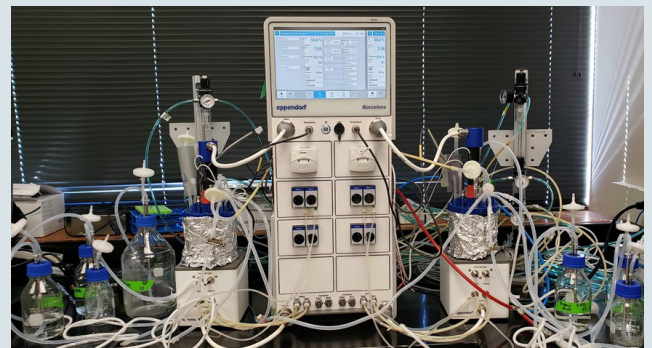


图 1: 使用 SciVario twin 生物反应器控制系统和 BioBLU 1c 一次性罐体, 通过培养基置换 - 批次培养生产人 iPSC 来源的 MSC 外泌体。

与细胞类方法相比,它们具有优异的稳定性和生物相容性等若干优势。另外,它们能够比全细胞更容易输送至目标组织,可以穿透血脑屏障 [6]。由于外泌体能够进行免疫调节,产生肿瘤或抑制炎症细胞迁移的风险低得多 [7、8]。此外,由于外泌体不涉及复杂的代谢活动,对目标组织环境的影响较小,从而减少了使用时出现并发症的风险。

在本研究中,我们使用 BioBLU 1c 一次性罐体作为生物反应器,用于生产和表征人类诱导多能干细胞(hiPSC)来源的 MSC 外泌体。我们使用 SciVario twin 生物反应器控制系统作为控制器装置 [9](图 2)、胶原蛋白包被微载体用于支持细胞培养。我们分析了细胞生长速率、活率和代谢活性(培养基中的葡萄糖、氨和乳酸水平),以及通过 CD63 Elisa 试剂盒分析不同时间段的外泌体产量。

材料和方法

SciVario twin 双联生物反应器

我们使用 SciVario twin 生物反应器控制系统以及装有单斜叶浆的 BioBLU 1c 一次性罐体进行培养基置换 - 批次培养。每个生物反应器装置都配有 3 个通用型连接端口,包括 pH(端口 1)电极和 DO(溶解氧、端口 2)电极,同时也包含集成电加热、水冷却的温度控制系统,搅拌控制和包含 1 个超高调节比(1:12000)TMFC(热式质量流量控制器)以及 4 个用于自动化 4- 气体混合电磁阀的气体控制模块。

使用 T-flasks 和多层细胞瓶培养细胞

我们从美国菌种保藏中心(ATCC®, ACS-7010™)购买了 iPSC 来源的 MSC,使用添加 10% 胎牛血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific, 16000044)和 1% 抗生素 - 抗真菌剂(100X)(Sigma Aldrich, A5955)的 15 mL DMEM/F12 培养基(Thermo Fisher Scientific®, 11320033)或者添加 7% FBS(Thermo Fisher Scientific, 16000044)、125pg/mL rhFGF basic(人源重组碱性成纤维细胞生长因子)、15ng/mL rh IGF-1、2.4mM L- 丙氨酸 -L- 谷氨酰胺(MSC 生长试剂盒(ATCC PCS- 500-041™))和 1% 抗生素 - 抗真菌剂(100X)(完全 ATCC 培养基)的 MSC 专用基础培养基(ATCC, PCS-500-030™)(ATCC 培养基)接种 10,000 个细胞 /cm²/T-75 型瓶(Eppendorf, 0030711122),制备种子液。

我们使用 CellXpert® C170i 二氧化碳培养箱(Eppendorf, 6731001044)、在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下培养细胞。

当细胞体贴的融合度大约在 80% 至 90% 时,进行第二步操作:我们抽出每个培养瓶中的培养基,使用 5 mL (Thermo Fisher Scientific, 14190144)冲洗细胞,除去残留的血清,然后抽出 DPBS。随后,我们加入 3 mL 预热胰蛋白酶 -EDTA 溶液(0.25%)(Thermo Fisher Scientific, 25200056),在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 5 分钟。多数细胞分离后,我们在各培养瓶中添加两倍体积的 ATCC 完全培养基。我们收集细胞并使用 Vi-CELL XR 细胞活率分析仪(Beckman Coulter®)计数。最后,我们将 iPSC 来源 MSC 在 1500rpm 转速(Centrifuge 5430R, Eppendorf, 5428000090)下离心分离 5 分钟(保留细胞团块,吸去上清液),重新悬浮于 DMEM/F12 培养基或 ATCC 完全培养基中,然后在 T-175 细胞瓶(Eppendorf, 0030712129)中接种至 10,000 个细胞 /cm² 的密度。

我们按照上述相同细胞继代培养过程进行第三步培养(要求类似的细胞接种密度),该细胞瓶是将细胞接种于与多层细胞培养瓶中,具有相同细胞培养密度的 HYPERFlask® M 细胞培养瓶(Corning®, 09-761-22)。

微载体制备

我们使用胶原蛋白包被的交联聚苯乙烯微载体(颇尔公司: C-221-020)作为培养载体。我们按照生产商说明书 [10] 进行灭菌,仅作轻微调整。简而言之,在 250 mL 含有 100ml DPBS 的玻璃瓶中,用 17g 胶原蛋白包被微载体(125-212µm 粒径范围和 360cm²/g 的表面积)。然后,将玻璃瓶进行 30 分钟的 121°C 高压灭菌。灭菌之后,我们小心抽出高压灭菌的 PBS,添加 100mL 培养基至微载体中,孵育 24 小时。

电极校准

在准备 BioBLU 1c 一次性罐前,我们先将 ISM® 凝胶 pH 电极连接至 SciVario twin 双联生物反应器控制系统,控制器软件会自动进行检测。我们分别使用 pH 7 和 pH 4 的缓冲液作为“zero”和“span”,按照操作手册进行校准。然后,断开 pH 电极,在高压灭菌袋中灭菌。

BioBLU 1c 一次性罐体准备及过程参数

我们为各 BioBLU 1c 配备了磁力驱动和斜叶浆, pH 电极、微载体沉降管 (Eppendorf, M1287-908402) 以及管道适配器 (Eppendorf, M1287-503001), 两者都先经过灭菌, 然后在生物安全柜中无菌操作插入备用 PG 13.5 端口。我们还为反应器安装了极谱式 DO 电极 (Mettler Toledo®)、尾气冷凝器、取样管路, 4 气混合管路连接深层通气接口, 另外将 N₂ 连接表层通气, 并配有 3 个补料接口。还有一个用于接种和培养基补料的接口、一个用于添加碱液的接口以及一个用于添加 0.1% 消泡剂 (Pluronic®-F68 surfactant, Life Technologies®, 24040-032) 的接口。然后, 我们将组装好的罐体置于各自的温度控制模块中, 并保持恒温。最后, 将 DMEM/F12 或 ATCC 完全培养基加入各罐中, 按照表 1 所示的参数和设定值, 将各罐保持在该状态下至少 24 小时。

表 1: 第一次和第二次实验的过程参数和设定值

	第一次实验	第二次实验
参数	设定值	
开始体积	700 mL	
结束体积	1 L	
初始搅拌速度	80 rpm (0.2 叶尖速度)	
温度	37 °C	
接种密度	3 x 10 ⁴ cell/mL	10.4 x 10 ⁴ cells/mL
细胞培养基	DMEM/F12 培养基	ATCC 完全培养基
DO 设定值	40% (P=0.1; I=0.001)	
pH 设定值	7.2(死区 = 0.1)、级联 CO ₂ (酸) 级联 0.45M 碳酸氢钠(碱)	7.6(死区 = 0.1)、级联 CO ₂ (酸) 级联 0.45M 碳酸氢钠(碱)
表通 N₂ 气流量	0.20 SLPM	0.25 SLPM
流量范围	0.1 SLPH-30 SLPH	
气体级联	将 30% 控制器输出时的 O ₂ % 设置为 21%、100% 控制器输出时的 O ₂ % 设置为 21%。将 0% 控制器输出时的流量设置为 0.5 SLPH、100% 控制器输出时的流量设置为 30 SLPH	

DO 级联控制

我们仅通过空气通气创建 DO 的级联控制, 不添加氧气: 设定 O₂% 控制在控制器输出 30% 时输出值为 21%, 在控制器输出 100% 时输出值为 21%。设定控制器输出 0% 时气流量输出为 0.50 SLPH, 控制器输出 100% 时气流量输出为 30 SLPH。



图 2: 我们实验使用的 DO 级联控制参数

使用 BioBLU 1c 一次性罐体培养 hiPSC 来源 MSC

我们从多层细胞瓶中收集细胞 (参见“使用 T 型细胞培养瓶和多层细胞瓶培养细胞”章节), 以表 1 所述的密度接种于装有胶原蛋白包被微载体 (参见“微载体制备”) 和 300 mL 的 DMEM/F12 或 ATCC 完全培养基的玻璃瓶中。我们将细胞培养瓶在 CellXpert C170i 培养箱中静置 2 小时 (37°C 和 5% CO₂)。孵育后, 将 300 mL 已贴附于微载体的细胞转移到 BioBLU 1c 生物反应器中, 该反应器中已先添加 700 mL 培养基, 使工作体积达到 1 L, 微载体浓度为 17g/L。另外, 我们将表层通气的 N₂ 气流量设置在 0.2 和 0.25 SLPM 之间, 保持 DO 水平为 40%。

培养基更换

正如上述“BioBLU 1c 一次性罐体准备以及过程参数”章节所述, 我们将收液管和适配器插入备用 PG 13.5 接口, 从而更换培养基而不干扰细胞培养。简而言之, 经过 5 天细胞培养后, 我们每两天更换一次培养基, 直至第 9 天, 然后每天更换一次培养基。我们将搅拌和通气停止 5 分钟, 使微载体沉降在 BioBLU 1c 底部, 然后更换 10% 的培养基 (使用出液管除去上层的细胞培养基, 使用进料管路添加新培养基)。另外, 在第二次实验中, 培养至第 11 天起, 在新培养基中添加 1g/L 浓度的葡萄糖溶液, 增加细胞培养基中的葡萄糖浓度, 然后更换培养基。

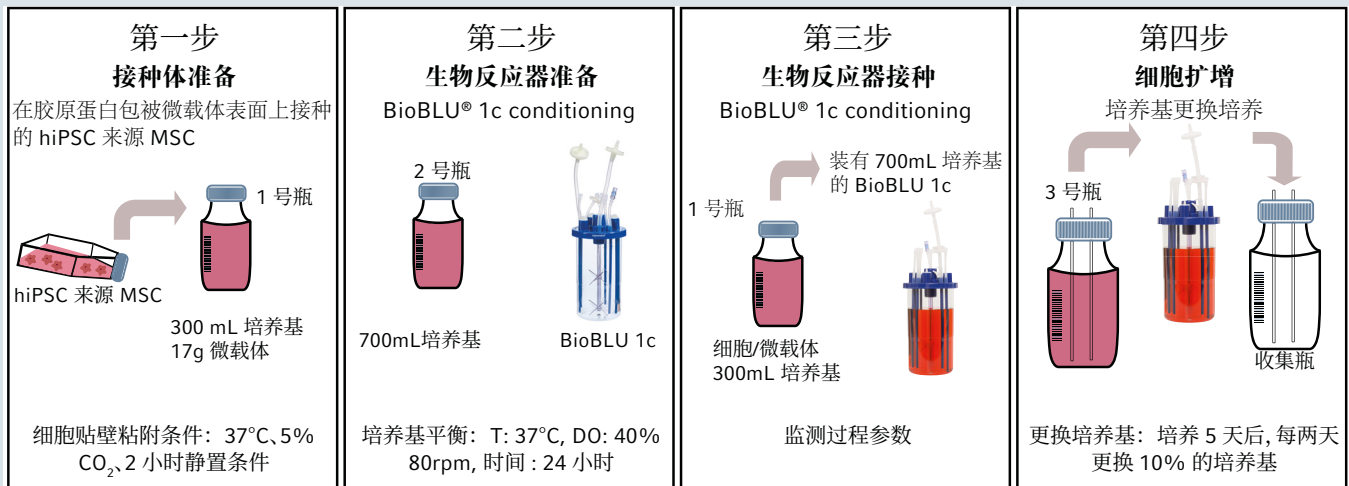


图 3: 实验设置工艺流程图

外泌体采集检测

经过 5 天培养后, 我们使用配备管路的 Labtainer Pro 生物过程容器(BPC)袋(Thermo Fisher Scientific, SH30658.11), 采集 50 mL iPCS 来源 MSC/ 微载体 / 培养基。我们将 50 mL 液体转移至 50 mL 离心管(Eppendorf, 0030122186)中, 使 iPCS 来源 MSC/ 微载体系统沉降到管底部。我们除去上清液, 另外添加相同组成但使用 2% 无外泌体 FBS(ED-FBS)(Fisher Scientific, A2720801)代替普通 FBS 的 50mL 培养基(根据实验而定), 然后将内容物转移至 250mL 摇瓶(Schott Duran®)中。最后, 我们使用新型 Eppendorf S41i CO₂ 恒温摇床, 将 iPCS 来源 MSC/ 微载体系统在 37°C、5% CO₂ 和 50rpm 条件下培养 48 小时。我们分别在培养第 8、11 和 14 天时重复采集样品。

人类 iPSC 来源 MSC 外泌体的分离和纯化

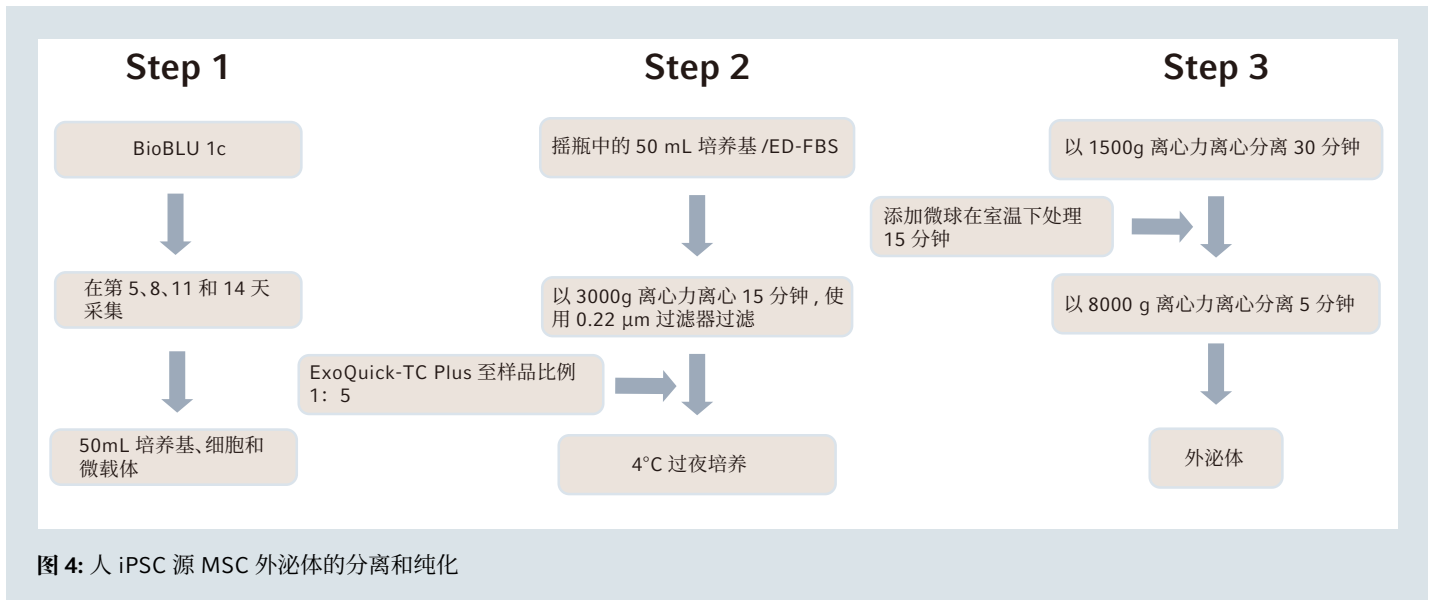
每次采集 48 小时后, 先除去上清液, 然后按照 ExoQuick-TC PLUS(System Bioscience, EQPL10TC-1)方案(进行一定改动)进行外泌体分离和纯化。简而言之, 我们使用 3000 x g 的离心力离心分离上清液(Centrifuge 5430R 分离 15 分钟, 然后使用 0.22µm 过滤器过滤, 从而去除细胞和细胞碎片)。然后, 我们使用 Amicon® Ultra-15 离心系统(Millipore Sigma, UFC910024)过滤上清液, 使用 100000 的分子筛, 浓缩外泌体部分。我们将上清液转移至无菌管中, 添加比例为 5: 1 的 ExoQuick-TC 外泌体沉淀液, 在 4°C 下恒温过夜培养。经过孵育后, 将 ExoQuick-TC/ 上清液混合物 1500 x g 离心处理 30 分钟,

使外泌体团块降至管底部。然后, 我们小心抽出上清液, 使用 1500 × g 离心力将团块再次离心处理 5 分钟, 除去残留的 ExoQuick-TC 溶液, 并将外泌体重新悬浮于 250 µL 的重悬缓冲液中。

最后, 我们使用重悬缓冲液将微球珠清洗三次, 将 250 µL 外泌体样品添加至清洗后的微球。微球珠为定制产品, 可减少来自血清 / 血浆和组织培养物的蛋白质遗留。使用翻转振荡器, 在室温下将外泌体和微球混合 15 分钟。然后, 收集含有纯化外泌体的上清液, 将混合物在 8500rpm 下离心分离 5 分钟(Centrifuge MiniSpin® plus, Eppendorf, 5453000097)。

细胞活率和代谢活性

我们在第一次实验期间每天或者在第二次实验期间每两天从生物反应器中采集样品, 测定细胞活率、细胞密度和代谢物浓度(葡萄糖、氨(NH₃)和乳酸)。通过将无菌的 5 mL 注射器连接鲁尔接头得以实现。然后, 我们废弃 3 mL 死体积并再次采集 3 mL(使用新的 5 mL 无菌注射器), 作为可用样品进行分析。我们将可行样品转移至 15 mL 的 Eppendorf 离心管中, 使微载体在管中沉降。抽出培养基前, 我们抽取 1 mL 培养基并使用 Cedex® Bio 分析仪(Roche)测量代谢物水平。然后, 我们使用 1 mL 的 DPBS 清洗微载体, 使用 300 µL 胰蛋白酶(0.25%)在 37°C 下培养 5 分钟。



终止胰酶消化时,我们加入 700 µL 新鲜培养基,轻轻上下吹打样品,制成细胞悬浮液。我们使用 40 微米的滤网,将细胞和微载体过滤至 50 mL 的 Eppendorf 离心管中。最后,我们使用 Vi-Cell XR 活率分析仪检测细胞活率和密度。

人类 iPSC 来源 MSC 外泌体的定量检测

按照 ExoQuick-TC PLUS 的方案富集外泌体后,我们使用 ExoELISA-ULTRA CD63 试剂盒(System Bioscience, EX-EL-ULTRA-CD63-1)定量含有四次跨膜蛋白分子的外泌体。我们将外泌体固定在 CD63 ExoELISA 微量滴定板的表面。然后,我们按照生产商方案说明完成检测。

iPSC 来源 MSC 形态

为了研究在 BioBLU 1c 一次性罐体中进行细胞扩增期间人 iPSC 来源 MSC 的形态,我们采用如下所述方案:我们在培养第 5 天和第 9 天采集 500 µL 的细胞 / 微载体 / 培养基,将其转移至 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中,使微载体沉降到底部。然后,除去多数上清液,在荧光显微镜(Life Technology)下,使用细胞和微载体辅助可视化明场进行观察。

结果和讨论

为了证明人 iPSC 源 MSC 分泌外泌体的能力,我们使用 BioBLU 1c 一次性罐和 SciVario twin 生物反应器控制系统进行两种培养基更换。

在 T 型瓶培养条件下进行细胞初始扩增后,我们采用流式细胞技术分析其干性,发现它们呈现典型的 MSC 表型(参见图 5)。具体而言,细胞的 CD90 和 CD29(典型 MSC 标志物)呈阳性,CD34 和 CD11b 等造血标志物呈阴性。

然后,我们确定了最佳细胞培养条件。我们使用 17g/L 浓度的微载体支持细胞生长,使用 DMEM/F12 作为细胞培养基。在 CellXpert C170i 二氧化碳培养箱中进行细胞扩增和微载体细胞贴壁处理(在静置的 37°C 和 5% CO₂ 条件下),以制备接种液。然后,向 BioBLU 1c 一次性罐中接种 5 × 10³ 个细胞/cm² (3 × 10⁴ 个细胞/mL)的细胞,在受控环境下进行培养。另外,我们在培养基中添加 Pluronic- F68 表面活性剂(0.1%)作为消泡剂。

初始细胞扩增后,细胞数量不稳定,特别是每次取样后(图 6)。我们将该现象归因于接种密度较低以及使用 DMEM/F12 细胞培养基,其组成可能未达到 iPSC 来源 MSC 扩增的最佳标准。另外,已知 DO 水平是能够影响 MSC 生长和性能的重要因素。尽管某些研究报道在缺氧条件可以提高 MSC 及其分泌蛋白质组的治疗潜力,但其它研究表明:无论实验条件如何(缺氧或正常氧浓度),分泌蛋白质组的收集效果都是类似的 [11]。在本研究中,由于采用的接种细胞密度较低,预计 O₂ 需求量较低,这就是我们为什么在实验期间仅使用空气级联控制的原因,不需添加氧气(21%)即可达到期望设定值(图 2)。

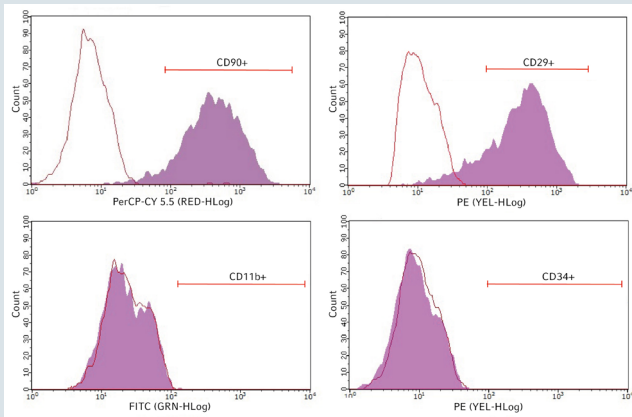


图 5: 通道 3 处的人类 iPSC 来源 MSC 免疫表型。我们确定了 CD90、CD29、CD34 和 CD11b 的人类 iPSC 来源 MSC 的免疫表型 (实心直方图)。我们使用未染色细胞作为对照物 (空心直方图)。

我们还使用 N2 进行表层通气并通过将 N2 出口绕过控制器直接连接在一个额外的外部流量计 (Omega Engineering, FMA-1608A) 上以平衡培养系统。

总体来讲, 培养第 15 天的细胞生长比初始细胞密度增加 4 倍以上, 但最终密度较低。

在随后进行的第二次实验中, 我们增加 iPSC 来源 MSC 接种密度和每个样品的外泌体产量。为此, 我们修改了第一次实验的 iPSC 来源 MSC 的细胞培养条件。首先, 我们在 ATCC 完全培养基中进行细胞扩增并将初始细胞附着在微载体上。

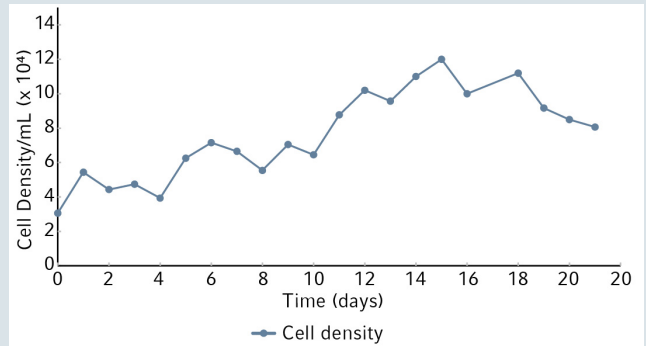


图 6: 装有 DMEM/F12 培养基的 BioBLU 1c 一次性罐中的 iPSCs 来源 MSC 细胞生长趋势。

然后, 我们将接种细胞浓度增加至 17×10^3 个细胞 / cm^2 (10.4×10^4 个细胞 / mL), 保持微载体浓度在 17g/L 。其它条件与第一次实验相同, 除了将表层通气气流量增加至 0.25 SLPM 以外, 从而更好地平衡最小空气流。另外, 我们还从培养第 5 天开始每天更换培养基。我们发现接种后出现 24 小时的初始停滞期, 随后培养的第 1 日到第 9 日间细胞量稳定增加。然后, 在保持整个运行期间乳酸和 NH_3 浓度分别低于 1.2g/L 和 1.2mmol/L 的条件下, 测定葡萄糖消耗量以及乳酸和 NH_3 的产量。ATCC 完全培养基中的葡萄糖水平明显低于 DMEM/F12 中, 需要添加 1g/L 的葡萄糖。

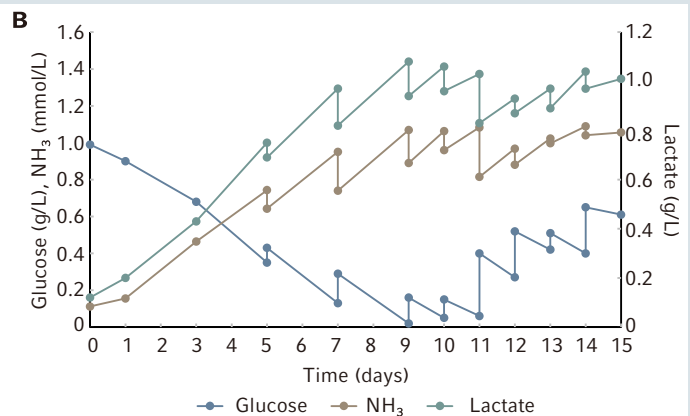
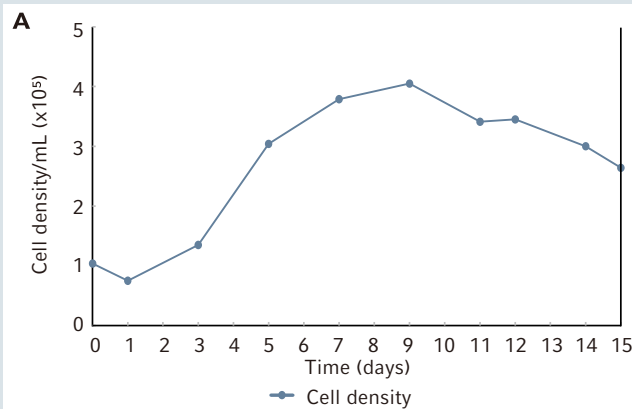


图 7: ATCC 完全培养基在 BioBLU 1c 一次性罐体中培养 iPSCs 来源 MSC 的生长趋势。A: iPSC 来源 MSC 密度和活率。B: 新陈代谢趋势图

培养体系大约在第 9 天达到稳定期, 随后细胞密度下降, 直至第 15 天(图 7)。在第 9 天, iPSC 来源 MCS 达到最大细胞密度的 4.1×10^5 个细胞 /mL。但我们在培养后期发现大量微载体聚集。我们后期仅使用悬浮的微载体进行细胞计数, 因此罐中的真实的平均细胞扩增值无疑升高。为了分离和表征 iPSC 来源 MSC 外泌体, 我们使用配有管路的 labtainer 袋连接 BioBLU 1c。

在第 5、8、11 和 14 天, 我们从含有 ED-FBS 的 ATCC 完全培养基中采集外泌体, 使用 ExoQuick-TC PLUS 试剂盒进行纯化。如图 8A 所示, 外泌体高表达大的蛋白中四次跨膜蛋白(膜蛋白: CD63、CD9、CD81、CD82)在细胞侵袭、渗透和融合方面发挥关键作用。我们采用直接酶联免疫吸附测定(ELISA), ExoELISA-ULTRA CD63 试剂盒定量外泌体产量。我们使用抗 -CD63 抗体孵育外泌体, 该抗体在外泌体表面结合四次跨膜蛋白 CD63。结果显示: 从第 5 日(2.6×10^{10})到第 16 日(8.6×10^{10} , 图 8), iPSC 来源 MSC 外泌体的数量稳定增加。另外, 我们还发现: 直至第 9 日, 细胞密度和分泌外泌体之间存在直接关系, 而在平台期之后生物反应器中的细胞密度下降不影响外泌体分泌。

为了研究胶原蛋白包被微载体上的三维细胞形态, 我们在培养第 5 和第 9 日采集样品, 通过明场图像进行观察(图 9A 和 B)。考虑到使用明场系统进行活细胞成像方面的局限性, 我们评估了人类 iPSC 来源 MSC 的形态, 证明在细胞生长早期, 一些细胞附着在微载体表面(图 9A)上, 逐渐形成微载体间细胞桥促成微载体聚集(图 9B)。我们都知道 3D 细胞环境可使细胞模仿体内细胞行为, 包括细胞间和细胞 - 细胞外基质(ECM)间相互作用, 促进细胞信号转导和增殖。最近有报道称: 尽管外泌体的产生以及囊泡运输和释放的机理尚不为人所熟知, 但人们发现细胞微环境会改变外泌体分泌和内部分子组成 [12]。

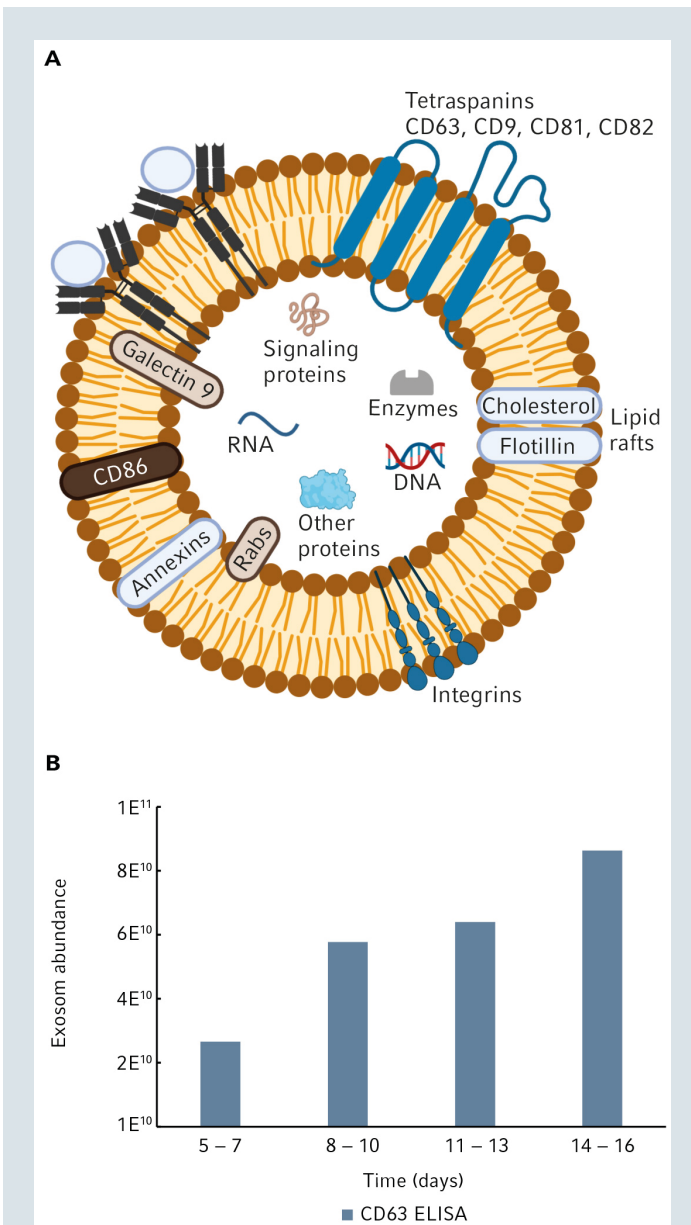


图 8:A) 外泌体组成的示意图。(使用 BioRender.com 创建)
B) iPSC 来源 MSC 在各采集期间分泌的外泌体产量

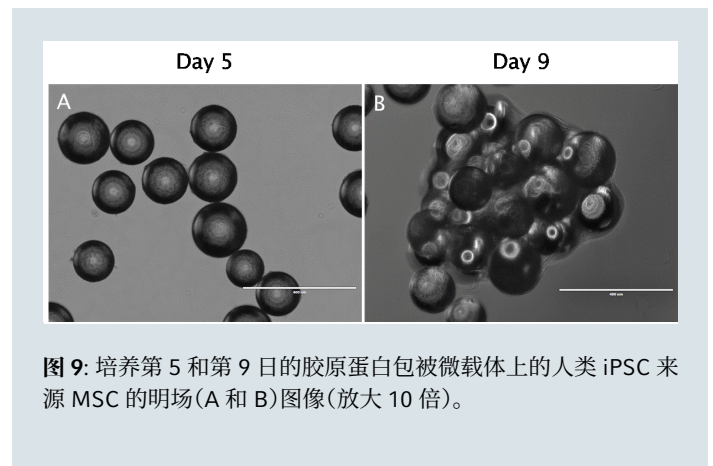


图 9: 培养第 5 和第 9 日的胶原蛋白包被微载体上的人类 iPSC 来源 MSC 的明场(A 和 B)图像(放大 10 倍)。

结论

我们确定可以使用 SciVario twin 双联生物反应器控制系统和 BioBLU 1c 一次性罐体生产 MSC 来源外泌体。未来的 SciVario twin 升级更新将使用户能够运行工作体积高达 40 L 的生物反应器。控制系统设计能够精确调控细胞培养环境,从而使人类 iPSC 来源的 MSC 在微载体表面上快速贴附并进行增殖。

我们展示了通过增加细胞接种密度,一定时间后可产生更多的 MSC 外泌体。这些 SciVario twin 实验是初步研究,尚未优化以确定最大外泌体生产水平。但我们的发现可用作为进一步改进 MSC 来源外泌体分离、纯化和放大的指导方案。

Literature

- [1] Fernández O, Izquierdo G, Fernández V, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSC) for the treatment of secondary-progressive multiple sclerosis: A triple blinded, placebo controlled, randomized phase I/II safety and feasibility study. *PLoS One* 2018; 13(5):e0195891.
- [2] Baboolal TG, et al. Synovial fluid hyaluronan mediates MSC attachment to cartilage, a potential novel mechanism contributing to cartilage repair in osteoarthritis using knee joint distraction. *Ann Rheum Dis* 2016; 75:908–915.
- [3] Wassef MA, et al. Therapeutic efficacy of differentiated versus undifferentiated mesenchymal stem cells in experimental type I diabetes in rat. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2016; 5:468–475.
- [4] Cheng L, Zhao W, Hill AF. Exosomes and their role in the intercellular trafficking of normal and disease associated prion proteins. *Mol. Aspects Med.* 2018; 60:62–68.
- [5] Joo HS, Suh JH, Lee HJ, Bang ES, Lee JM. Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. *Int J Mol Sci.* 2020; 21:727.
- [6] Chen CC, Liu L, Ma F, et al. Elucidation of exosome migration across the blood–brain barrier model in vitro. *Cell Mol. Bioeng.* 2016; 9(4):509–529.
- [7] Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res.* 2019; 7:8.
- [8] June SH, Jinkwan K. Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes: Applications in Cell-free Therapy. *Korean J Clin. Lab. Sci.* 2018; 50:391-398.
- [9] Parallel Fed-batch CHO Culture on SciVario® twin, the Flexible Controller for All Your Bioprocess Needs. *Application Note* 2020; App-432.
- [10] Siddiquee K, Sha M. Microcarriers-based Expansion of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Shake Flasks. *Bioprocessing Journal* 2013; 12:11-17.
- [11] Teixeira FG, Panchalingam KM, Anjo SI, et al. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:133.
- [12] Thippabhotla S, Zhong C, He M. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci Rep* 2019; 9:13012.

Ordering information

Description	Order no. international
SciVario® twin Fermenter/Bioreactor Control System, base unit, 100 – 240 V/50/60 Hz, for 2 vessels	7600100001
BioBLU® 1c Single-Use Vessel, cell culture, open pipe, 2 pitched-blade impellers, optical pH, sterile, 4 pieces	1386110500
Centrifuge MiniSpin® plus, non-refrigerated, with Rotor F-45-12-11, 230 V/50 – 60 Hz(CN)	5453000097
Centrifuge 5430 R, keypad, refrigerated, with Rotor FA-45-30-11 incl. rotor lid, 230 V/50 – 60 Hz (CN)	5428000090
Incubator CellXpert® C170i, inner door with 4 door segments, handle right side, 1 – 20 % oxygen control, 220 – 240 V/50 – 60 Hz (CN)	6731001044
Recirculation tube (from 3L decanter kit (M1287-119102))	M1287-908402
Adaptor, compression fitting, for Pg 13.5 port, (from 3L decanter kit (M1287-119102))	M1287-503001
Eppendorf Conical Tubes, sterile, pyrogen-, DNase-, RNase-, human and bacterial DNA-free, colorless, 50 mL	0030122178
Eppendorf Conical Tubes, sterile, pyrogen-, DNase-, RNase-, human and bacterial DNA-free, colorless, 15 mL	0030122151

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf AG · Barkhausenweg 1 · 22339 · Hamburg · Germany
 eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com/bioprocess

www.eppendorf.com/SciVario