### 应用说明第472期

### 通过系统培养工艺优化,增加 iPSC 细胞数量

#### Felix Manstein<sup>1,2</sup>, Kevin Ullmann<sup>1,2</sup>, Robert Zweigerdt<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO), Germany <sup>2</sup>REBIRTH Cluster of Excellence, Hannover Medical School, Hannover, Germany

联系方式: bioprocess-experts@eppendorf.com

#### 摘要

人诱导多能干细胞(hiPSC)是研发创新的有力工具,广 泛应用于药物发现、体外疾病建模或再生疗法等领域。然 而,此类研发需要用到大量细胞,传统的 2D 培养方法难 以满足这一标准。另一方面,搅拌釜式生物反应器为细胞 提供了一种 3D 培养环境,能够提供、控制和维持最佳生 长条件。在本研究中,我们使用 DASbox<sup>®</sup> 迷你生物反应 罐和 DASbox 迷你平行生物反应控制系统,在分步过程中系统地优化 hiPSC 培养的工艺参数。与不受调控的条件相比,这种方法导致细胞密度增加了 10 倍以上(几乎达到 35 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升),同时保留了干细胞的特征和活力。

### 引言

诱导多能干细胞(iPSC)与胚胎干细胞(ESC)一起构成多 能干细胞群(PSC)。这两种细胞类型都具有无限生长和发育 成人体任何细胞谱系的能力 [1,2]。胚胎干细胞是自生的,而 诱导多能干细胞则通过递送特定因子对体外体细胞进行重新 编程而产生 [3]。因此,诱导多能干细胞可以根据需要进行培 养。诱导多能干细胞可以按需培养,并且具备干细胞特性, 是研发创新的有力工具,如药物发现和体外疾病建模 [4]。

此外,科研人员正在开展有关再生疗法的临床试验,如神经 退行性疾病或心力衰竭的组织修复 [5]。在这种情况下,获得 数量较多的临床相关细胞对于干细胞治疗至关重要。相关研 究表明,如需使用 PSC 疗法,治疗单个患者的细胞剂量为 10°个细胞,单个产品每年的产量为10<sup>11</sup>至10<sup>14</sup>个细胞[6]。

在摇瓶或培养皿中通过传统的 2D 单层培养方法无法获得所需 的细胞数量 [7]。这种培养方法的生长表面有限,并且可能仅 在两个方向上生长,从而导致不良的细胞增殖行为、细胞分 化不良、基因和蛋白质表达模式不当 [8]。除此之外, 2D 培 养方法无法单独控制生长参数,如 pH、溶氧(DO)、培养物 补料或培养基灌流。

#### 免责声明

本应用文献中的所有方法和结果均来自德国汉诺威医学院莱布尼茨生物技术和人工器官研究实验室 Robert Zweigerdt 博士团队发表的论文(doi:10.1002/sctm.20-0453)[9], © 2021 The Authors。牛津大学出版社出版的《干细胞转化医学》。本应用文献由牛津大学出版社根据原始出版物的 CC-BY-NC 许可授权编写。

感谢 Zweigerdt 博士授权共享这些数据。

另一方面, 生物反应器通过生物工艺控制装置提供 3D 设置和 精确的生长参数控制, 是一种更接近干细胞自然生长环境的有 效方法。此外, 一旦在小规模实验中确定了最佳生长条件, 即 可扩展到中试和生产规模来增加产量。

本应用文献详细介绍了在小规模实验中建立人诱导多能干细胞 (hiPSC)培养的优化过程。我们使用 DASbox 迷你生物反应罐 和 DASbox 迷你平行生物反应控制系统,在分步过程中系统地 调整了多项重要的生长参数,以便在 7 天的培养期内增加细胞 数量 [9,10]。DASbox 迷你平行生物反应控制系统对 pH、营养 补料、DO 和搅拌进行精确控制,结合灌流操作模式和预培养 优化,使得培养 7 天后细胞数量从最初的约 3×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升增加到约 18×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升。此外,我们还使用计算 机支持的培养建模,进一步增加了细胞数量,达到了几乎 35× 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升的细胞密度。在这一优化过程中,DASbox 迷 你生物反应罐使用 60°8 叶斜叶桨(专门设计用于培养悬浮液 或团块中的剪切敏感细胞),确保了干细胞在整个过程中的高 活率 [11]。以这种方式培养的 hiPSC 保留了其干细胞特性,以 及发育为内胚层、中胚层和外胚层组织的能力。



图 1: (A) DASbox 迷你生物反应罐配备 60° 8 叶斜叶桨,专门设计用于培养以悬浮或聚集体形式存在的对剪切力敏感的细胞。(B) DASbox 迷你平行生物反应控制系统采用 4 罐体设计,能够同时操作 24 台罐体。该系统专为细胞培养和微生物发酵应用而开发,可以与标准玻璃罐体或一次性生物反应罐体一起使用。

 如需了解有关 DASbox 迷你平行生物反应控制系统的 更多信息,请访问 <u>www.eppendorf.com/dasbox</u>

#### 应用说明 | 第 472 期 | 第 3 页

#### Α В 不受调控的条件 L Process Ш + pH 控制 解离 + 单细胞接种 <u>0</u>p + 葡萄糖补料 ш IV + DO 控制 常规贴壁细胞培养 (单层) +(预)培养/DO优化 接种密度 VI + 灌注/补料优化 0.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml 灌注 VII/VIII + 计算机建模 d0 d1 d2 单细胞接种 收获

### 材料与方法

图 2: (A) 在 DASbox 迷你平行生物反应控制系统下,在 DASBox 迷你生物反应罐中优化 iPSC 培养参数的实验程序(使用 BioRender.com 绘制)。(B) 工艺优化步骤和术语概述。

#### DASbox 迷你生物反应罐与

#### DASbox 迷你平行生物反应控制系统

干细胞培养和培养优化在 DASbox 迷你生物反应罐中进行。该反应罐配有针对干细胞扩增进行优化的 8 叶斜叶桨(60°) [11],用于搅拌、pH 和 DO 传感器的顶置驱动器,以及温度控制,以确保关键工艺参数的精确调节(图 1A)。

灌流操作模式通过流出过滤装置实现,允许培养基流入和流出 生物反应器,同时将细胞保留在其中。通过调整新鲜培养基 (进料)通过顶盖端口的流入速率和废弃培养基(废物)通过 流出过滤器的流出速率,生物反应器的体积在整个运行过程中 保持恒定 [12]。培养基流量通过 DASbox 迷你平行生物反应控 制系统的泵进行调节(图 1B)。

该系统还用于监测和调整工艺参数,如 pH、进料速率或 DO。 根据 Kempf 等人 [13] 和 Ackermann 等人 [14] 的方案进行泵 和电极校准。

#### 人诱导多能干细胞系

使用三种不同的人诱导多能干细胞系进行细胞培养实验:来源于造血干细胞的 hHSC\_1285i\_iPS2 (MHHi006-A) 细胞 [15], 以及来源于 CD34<sup>+</sup> 人 脐 血 造 血 干 细 胞 的 Phoenix (HSC\_ADCF\_SeV-iPS2; MHHi001-A) 和 GMPDU\_8

(CD34+hPBHSC\_GMPDU\_SeV-iPS8; MHHi008-A) 细胞 [16], [17]。GMPDU\_8 细胞在符合 GMP 标准的条件下生产。

#### 人诱导多能干细胞预培养

在生物反应罐实验之前,使用补充有 ROCK 抑制剂 (RI) Y-27623 (10μM) 的 Essential 8 (E8) 培养基 (Thermo Fisher Scientific®),在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的烧瓶中将细胞扩增为无饲 养层单层培养物 (图 2A)。48 小时后更换培养基,传代间隔为 3 天,48 和 72 小时后传代间隔为 4 天。如需了解准确的传代 方案,请参阅 Manstein 等人 2021 年发表的论文 [9]。

#### 在 DASbox 迷你平行生物反应控制系统的调控下,使用 DASbox 迷你生物反应罐培养人诱导多能干细胞

所有主要实验均以干细胞团块培养物的形式进行,不使用用于 细胞附着的支架。为了接种 DASbox 迷你生物反应罐,通过 StemPro™ Accutase™(Thermo Fisher Scientific)分离细胞 单层来获得用于 hHSC\_1285i\_iPS2 和 Phoenix 细胞系的单细 胞悬浮液,或者通过含 EDTA 的乙二胺四乙酸溶液来获得用于 GMPDU\_8 细胞的单细胞悬浮液。用 5×10<sup>5</sup> 个细胞 / 毫升 E8 培养基 +RI 的活细胞密度进行接种,最终体积为 150 毫升 (75 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 生物反应罐)(图 2A)。

#### 应用说明 | 第 472 期 | 第 4 页

物反应罐培养条件为 37°C、搅拌速度 60、80、100 或 120 转 / 分钟(rpm) 及每小时 3 标准升(sL 表层通气), 含 21% O2 和 5% CO<sub>2</sub>。

一旦生物反应罐内的 pH 值达到≤7.0, 启动 pH 控制。此后, 首先减少气流中 CO<sub>2</sub>, 然后加入 1 M NaHCO<sub>3</sub>, 将其保持在 pH 7.0。

接种后 24 小时内不更换培养基。如无另外说明,则以 150 毫 升 / 天(一个培养体积 / 天或 6.25 毫升 / 小时)的流速用不含 RI 的 E8 不断更换培养基,同时通过细胞截留装置截留细胞。 在优化过程中,向培养基中加入不同的化合物,如葡萄糖(从 第 3 天开始为 3.15 - 6.15 克 / 升,或从第 4 天开始为 6.157.65 克 / 升)或降低剪切力的表面活性剂 Gibco™ Pluronic™ F-68 (Thermo Fisher Scientific)。

pH 控制、灌流速率或化合物添加的确切参数将在相应的结果 部分中详细说明。所有描述的过程在生物反应罐中进行 7 天。 优化步骤概述如图 2B 和表 1 所示。

#### 细胞取样、团块分析和细胞计数

在不中断搅拌的情况下,从生物反应罐中取样。通过采集每份样品多达五个独立的光学显微镜图像来监测团块的形成。通过 lamgeJ 软件(Wayne Rasband, National Institute of Health) 测定团块尺寸。平均直径代表 45 至 1096 个单个团块的算术平均值。

通过 Accutase 细胞消化液将团块解离成单个细胞后进行细胞 计数 [13]。细胞上清液储存在 -20°C 下,用于随后的代谢物分 析(葡萄糖和乳酸)。

#### 定形内胚层和肠道分化

定形内胚层和肠道分化如前所述 [18]。

简而言之,在生物反应罐扩增后,测定细胞密度,并以 10 × 10<sup>5</sup> 个细胞 / 毫升接种于补充有 100 纳克 / 毫升转录因子激活 素 A 和 3 μM GSK3beta 抑制剂 CHIR99021 的 RPMI 1640 中,用于在锥形瓶(20 毫升工作体积)中分化。

整整 24 小时后,用 RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) 中的 100 纳克 / 毫升激活素 A 和 0.8% KnockOut 血清替代物 (Thermo Fisher Scientific)更换培养基。 **表 1:** 由 DASbox 迷你平行生物反应控制系统调控的参数以及本应用文 献中使用的等效缩写

工艺优化步骤	正文中使用的缩写
无	I
рН 7	11
pH7, 葡萄糖补料	
pH7, 葡萄糖补料, DO控制	IV
pH 7, 葡萄糖补料, 优化预培养, 优化	V
DO 控制, 80 rpm	
pH 7,优化预培养,优化 DO 控制,80	VI
rpm,优化灌注,优化葡萄糖补料	
pH 7,优化预培养,优化 DO 控制,80	VII
rpm,优化灌注,优化葡萄糖补料,计	
算机建模 1	
pH 7, 优化预培养, 优化 DO 控制, 80	VIII
rpm,优化灌注,优化葡萄糖补料,计	
算机建模 2	

24 小时后, 再次用 RPMI 1640 中的 100 ng/mL 激活素 A 和 0.8% KnockOut 血清替代物更换培养基。在分化的第 3 天, 用 Accutase 在 37°C 的水浴中解离团块 3 分钟, 针对定形内胚 层 (DE) 标记物进行分析, 并通过在由 DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific)、2% 胎牛血清、500 ng/mL 成纤维细胞生 长因子 (FGF) 4、3μM CHIR99021 和 1% 青霉素 / 链霉素组成 的肠培养基中以 2 x 105 个细胞 /cm2 的密度接种细胞, 进一步分化为肠细胞。每隔一天更换一次培养基, 直到第 7 天分析 细胞。

#### 统计分析

通过 GraphPad Prism 6 软件(GraphPad Software, Inc)对每 个培养条件下三至四次独立的生物反应罐运行进行统计分析。 采用单因素方差分析或双因素方差分析以及邦费罗尼事后检验 来确定统计显著性。P 值 <0.05、<0.01 和 <0.001 被认为是显 著的。结果报告为平均值和平均值标准误差(SEM)。



### 结果与讨论

#### pH 值、葡萄糖补料和 DO 控制对 hiPSC 生物反应罐培养的 影响

为了提高细胞产量,采用 DASbox 迷你平行生物反应控制系统 对 pH 值、葡萄糖补料和 DO 进行精确监测和调控,并与不受 调控的条件进行对比(I,见表 1)。通过集成的 DASware 软 件,生物工艺控制器能够自动调整和维持给定的生长条件。首 先,一旦某个 pH 阈值降低,控制器就会自动调整至 pH 7.0 的 设定值(II,见表 1),从而在整个运行过程中使培养物的 pH 值稳定在 7.0,而在不受调控的条件中存在更高的波动和通常 更低的 pH 值(图 3A)。与接种后 1 天葡萄糖水平停滞的不受 调控条件相比,随着时间的推移,采用 pH 控制的培养物的葡 萄糖消耗要高出许多(图 3B)。

为了补偿这一重要碳源的减少,从第 3 天开始,除了 pH 控制 (III,见表 1)外,还开始了葡萄糖补料(3.15-6.15 克 / 升), 这导致了更高的培养物葡萄糖浓度(图 3B),但也提高了乳酸 (厌氧酵解的生长抑制副产物)水平(图 3D)。为了提供更稳定的氧气供应,从培养的第一天开始引入设定值为 40% 的 DO 控制(IV,见表 1)。这导致了更稳定的培养氧水平,尤其是在以后的时间点。然而,与其他条件相比,初始溶氧水平(第 0-2 天)较低(图 3C)。

从不同生长参数设置获得的细胞密度暗示了条件 IV 下初始溶 氧水平降低的影响(见表 1)。与接种后 7 天不受调控情况下的 3.04 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升相比,其他优化步骤均导致细胞密度 显著增加。引入 pH 控制后,细胞密度达到约 4.03 × 10<sup>6</sup> 个细 胞 / 毫升;采用额外的葡萄糖补料后,细胞密度甚至达到 6.13 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升(图 3E)。然而,从培养第一天起维持 40%的溶氧水平,仅产生与单独补充葡萄糖的培养物大致相 同的细胞密度(6 × 106 细胞 / 毫升)(图 3E)。这可能是因为 在培养的第一天细胞计数较低,与其他培养模式相比溶氧水平 降低(图 3C/E)。



**图 3:** 与不受调控的培养条件(I,见表 1)相比,(A) pH(II,见表 1)以及额外的(B)葡萄糖补料(III,见表 1)和(C)DO控制(IV, 见表 1)对搅拌釜生物反应器 hiPSC 培养的(D)乳酸水平、(E)细胞密度和(F/G)细胞团块大小的影响。

#### 应用说明 | 第 472 期 | 第 6 页

此外,所采用的 DO 策略在运行结束时导致更大的细胞团块 (图 3F/G),这可能是由大量死亡细胞产生的细胞碎片造成的 [19]。由于过大的团块(>300 pm)会导致不利的氧气和营养 递送,因此需要减小尺寸。

尽管如此,这些实验已经显示了调控 pH 值和葡萄糖补料的正向影响,与不受调控的培养系统相比,细胞密度高达两倍。此外,我们观察到,采用额外 DO 控制的方法 Ⅳ (见表 1)产生的最终细胞密度与仅单独补充葡萄糖的方法 Ⅲ 相当(见表 1)。这表明在后续时间点补充 DO 可能具有补偿效应,能够弥补最初的细胞损失。尽管如此,仍有必要进一步调整 DO 策略,以减少初始细胞损失和控制团块大小。

#### 通过预培养优化、调节 DO 和搅拌速度来调控细胞团块大小和 活力

为了克服方法 IV 中初始细胞损失和团块尺寸增加的问题(见表 1),我们采用了四阶段参数调节方法(图 4A):

(i) 通过将 2D 培养时间从 96 小时缩短至 72 小时进行预培养 优化,导致细胞融合度为 65-75%,而非 90-95%。

(ii) 引入 DO 水平级联, 初始 DO 水平为 100 %。在培养基中 稀释后, 则自动稳定在 40 %。

(iii) 在 接 种 期 间 加 入 剪 切 保 护 剂 Gibco Pluronic F-68
(Thermo Fisher Scientific),以便 (iv) 通过将搅拌速度从最初的 60 提高到 80、100 或 120rpm 来提供更好的细胞环境以控制团块尺寸。

虽然所有三种搅拌速度调节均成功地减少了初始细胞损失(导致培养的头 24 小时出现典型的停滞期)(图 4B),但 80 rpm 已经足以在整个运行过程中将团块尺寸保持在 300 pm 的临界 限值以下(图 4C)。这些措施与 8 叶斜叶桨的温和搅拌特性相结合,导致细胞密度与在该设置下以 60 rpm 培养 7 天所获得的 9.5 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升相当(图 4B)。同样值得注意的是,尽管搅拌速度较高,但所有条件下的细胞活力仍然相当(图 4B)。因此,为了在细胞团块尺寸控制和最小剪切力之间取得 平衡,以下实验开始使用 80 rpm 的搅拌速度(V,见表 1)。

#### 优化补料和灌流速率

如前所述,添加葡萄糖有利于细胞培养物的生长,但也会增加 生长抑制代谢产物乳酸的水平。因此,为了增加葡萄糖水平并 防止乳酸上升到抑制细胞生长的水平,在培养第2天和第5天 之间,培养基灌流速率从1个培养体积/天逐步增加到2个培 养体积/天。同时,葡萄糖浓度从第1天至第3天的 3.15-6.15 g/L增加到从第4天开始的6.15-7.65 g/L(VI,见 表1)(图5A)。优化葡萄糖补料策略后,乳酸水平也会增加。 因此,应该提高培养基流量,加快培养基更换速度。



图 4:通过 (A) 预培养优化以及 DO 和搅拌调控,防止初始干细胞损失并控制细胞团块大小。(A) 中描述的优化步骤对 (B) 活细胞密度和 (C) 团块大小的影响。



事实上,在这种情况下,乳酸水平仍然与未优化补料的方法相 当(图 5B)。

然而,细胞密度再次增加到 18×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升(图 5C), 几乎是上一个优化步骤的两倍。

因此,与不受调控条件(I,见表 1)下 3.04 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升的细胞密度相比,调控 pH、葡萄糖补料、DO、搅拌和灌流

速率并且优化预培养条件导致接种后第 7 天的细胞密度增加了 六倍。

#### 通过计算机建模进一步优化培养

此时,由于 DASbox 迷你平行生物反应控制系统能够提供精确 参数控制,并且 DASbox 迷你生物反应罐的 8 叶搅拌桨能够进 行温和的细胞混合,因此干细胞数量显著增加。为了进一步提 高细胞密度,并减少在实验室环境中测试每项参数的工作量, 我们采用计算机建模来进一步优化培养条件。



图 6:采用 (A) 计算机建模后,(B) 3 种不同干细胞系的细胞密度增加。

使用 Berkely-Madonna 软件(https://berkeley-madonna.myshopify.com/),通过设置 VI(见表 1)获得的最新实验室 结果被输入到一个算法中,以预测进一步的参数优化方法(图 6A,第一行)。

这导致模型 VII (见表 1) 在培养第 7 天的细胞密度预计达到 70×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升。然而,建议模型的实验室结果达到了 23×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升的细胞密度 (图 6A,第二行)。尽管这 些数字超过了以前所有的培养方法,但它们仍然低于预期。这 可能是由于在培养的第 6 天出现了意外的葡萄糖峰值,表明需 要进一步调节建模方法。

为了进一步提高建模过程的精度,将模型 VII(见表 1)的实验室结果再次输入到软件中,产生了模型 VIII 方法(见表 1)。现在,实验室的结果与预测的 40×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升非常接近,达到 33×10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升,几乎是不受调控条件下细胞密度的 10 倍(图 6A,第三行)。

在模型 VIII(见表 1)条件下完成三次不同的干细胞系培养实验,细胞活率与之前的实验相当,证实了 150 mL 培养体积的 细胞数量能够达到惊人的 5 × 10° 个细胞(图 6B)。

#### 在搅拌釜生物反应器中培养的 hiPSC 干细胞特性

先前的实验结果表明,在搅拌釜生物反应器中通过精确的参数 调控进行工艺优化,可以实现更高的细胞数量和强大的细胞活力。

下一步,我们将测试干细胞在经历了如此强劲的生长期后是否仍能保持预期的干细胞特性。为此,在培养7天后,我们分析了细胞的典型多能性标记物 TRA-1-60、SSEA-4、OCT-3/4、NANOG、SOX2和 KI-67。如图7A和B所示,可以通过流式细胞术和免疫荧光显微镜鉴定每种标记物呈阳性的细胞。

iPSC 的另一项重要特性是能够分化为各种细胞类型的内胚 层、中胚层和外胚层。因此,通过常规非定向分化测试了细胞 分化能力的存在,这揭示了胚层特异性标记物 Desmin (DES)、SOX17和 TUB3的表达(图7C)。此外,将特异性分 化方案应用于培养4天和7天的hiPSC,以产生定形内胚层、 肠道祖细胞和心肌细胞,可重复诱导85-95%的子代细胞(图 7D)。此外,值得注意的是,在培养7天后,未观察到工艺衍 生细胞的染色体异常,如图7E中hHSC\_1285所示。通过在 搅拌釜生物反应器中进行工艺优化,在培养至高细胞密度后, 多能干细胞群保持了所有预期的关键特性。

应用说明 | 第 472 期 | 第 9 页



图 7: 在搅拌釜生物反应器中培养的 hiPSC 干细胞特性。通过 (A) 流式细胞术和 (B) 免疫荧光显微镜以及 (C) 向三个胚层分化的 hiPSC, 分析未分化 hiPSC 中多能性相关标记物的表达。(D) 工艺衍生的 (d4 和 d7) GMPDU\_8 团块分化成定形内胚层 (DE)、肠道祖细胞和心肌 细胞。(E) 在条件 VIII 下培养 7 天的细胞的核型 (见表 1)。



### 结论

本研究中描述的数据证明了可控、可调生长环境的优势。利用 DASbox 迷你平行生物反应控制系统的精确参数调控能力,结 合系统性调节和计算机工艺建模,使干细胞密度从不受调控环 境中的约 3 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫升增加到约 35 × 10<sup>6</sup> 个细胞 / 毫 升(图 8)。这意味着,整个培养体积的总细胞数几乎达到 5 × 10<sup>9</sup> 个。此外,DASbox 迷你生物反应罐配备有专门设计的 60<sup>°</sup> 8 叶斜叶桨,能够实现高效混合、有效控制团块尺寸和高细胞 活力,同时保持较低的剪切力。

我们认为,分步参数调整是生物反应罐中干细胞培养工艺优化 和开发的最有效方法之一。本文描述的程序可以作为参考,有 助于识别和克服培养瓶颈、增加干细胞数量并推动干细胞应用 进展。





### 参考文献

- A. Y. L. Wang, 'Human induced pluripotent stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for various diseases', International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, no. 4. MDPI AG, pp. 1–17, Feb. 02, 2021. doi: 10.3390/ ijms22041769.
- [2] K. Takahashi and S. Yamanaka, 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', Cell, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [3] A. Haase et al., 'Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood', Cell Stem Cell, vol. 5, no. 4, pp. 434–441, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.stem.2009.08.021.
- [4] R. Zweigerdt, I. Gruh, and U. Martin, 'Your Heart on a Chip: iPSC-Based Modeling of Barth-Syndrome-Associated Cardiomyopathy', Cell Stem Cell, vol. 15, no. 1, pp. 9–11, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.06.015.
- [5] A. E. H. El-Kadiry, M. Rafei, and R. Shammaa, 'Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits', Frontiers in Medicine, vol. 8. Frontiers Media S.A., Nov. 22, 2021. doi: 10.3389/fmed.2021.756029.
- [6] G. M. Pigeau, E. Csaszar, and A. Dulgar-Tulloch, 'Commercial scale manufacturing of allogeneic cell therapy', Frontiers in Medicine, vol. 5, no. AUG. Frontiers Media S.A., 2018. doi: 10.3389/fmed.2018.00233.
- [7] R. Zweigerdt, R. Olmer, H. Singh, A. Haverich, and U. Martin, 'Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture', Nat Protoc, vol. 6, no. 5, pp. 689–700, May 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.318.
- [8] C. Jensen and Y. Teng, 'Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?', Frontiers in Molecular Biosciences, vol. 7. Frontiers Media S.A., Mar. 06, 2020. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [9] F. Manstein et al., 'High density bioprocessing of human pluripotent stem cells by metabolic control and in silico modeling', Stem Cells Transl Med, vol. 10, no. 7, pp. 1063–1080, Jul. 2021, doi: 10.1002/sctm.20-0453.
- [10] F. Manstein, K. Ullmann, W. Triebert, and R. Zweigerdt, 'Process control and in silico modeling strategies for enabling high density culture of human pluripotent stem cells in stirred tank bioreactors', STAR Protoc, vol. 2, no. 4, p. 100988, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.xpro.2021.100988.
- [11] R. Olmer et al., 'Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors', Tissue Eng Part C Methods, vol. 18, no. 10, pp. 772–784, Oct. 2012, doi: 10.1089/ten.tec.2011.0717.
- [12] C. Kropp et al., 'Impact of Feeding Strategies on the Scalable Expansion of Human Pluripotent Stem Cells in Single-Use Stirred Tank Bioreactors', Stem Cells Transl Med, vol. 5, no. 10, pp. 1289–1301, Oct. 2016, doi: 10.5966/sctm.2015-0253.
- [13] H. Kempf, C. Kropp, R. Olmer, U. Martin, and R. Zweigerdt, 'Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture', Nat Protoc, vol. 10, no. 9, pp. 1345–1361, Oct. 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.089.
- [14] M. Ackermann et al., 'Continuous human iPSC-macrophage mass production by suspension culture in stirred tank bioreactors', Nat Protoc, vol. 17, no. 2, pp. 513–539, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41596-021-00654-7.
- [15] S. Hartung et al., 'Directing cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells by plasmid-based transient overexpression of cardiac transcription factors', Stem Cells Dev, vol. 22, no. 7, pp. 1112–1125, Apr. 2013, doi: 10.1089/ scd.2012.0351.
- [16] A. Haase, G. Göhring, and U. Martin, 'Generation of non-transgenic iPS cells from human cord blood CD34+ cells under animal component-free conditions', Stem Cell Res, vol. 21, pp. 71–73, May 2017, doi: 10.1016/j.scr.2017.03.022.
- [17] A. Haase et al., 'GMP-compatible manufacturing of three iPS cell lines from human peripheral blood', Stem Cell Res, vol. 35, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.scr.2019.101394.
- [18] A. Sahabian et al., 'Chemically-Defined, Xeno-Free, Scalable Production of hPSC-Derived Definitive Endoderm Aggregates with Multi-Lineage Differentiation Potential', Cells, vol. 8, no. 12, p. 1571, Dec. 2019, doi: 10.3390/ cells8121571.
- [19] W. A. Renner, M. Jordan, H. M. Eppenberger, and C. Leist, 'Cell-cell adhesion and aggregation: Influence on the growth behavior of CHO cells', Biotechnol Bioeng, vol. 41, no. 2, pp. 188–193, Jan. 1993, doi: 10.1002/bit.260410204.

### 补充信息

**补充表 1**:本应用文献中使用的培养条件缩写以及原始出版物中的等效缩 写 [9]。

正文中使用的缩写	原始出版物中的术语
I	pUC
11	р7
111	p7G
IV	p7GO
V	p7GOS80
VI	p7GOS80oF
VII	Stg1M
VIII	Stg2M

#### 订购信息

描述	订购号
DASbox <sup>®</sup> 迷你平行生物反应控制系统,用于细胞培养,4 罐体	76DX 04C C
DASbox <sup>®</sup> 迷你生物反应罐,用于细胞培养,玻璃,不锈钢罐盖,温度、pH、DO 和液位电极	76DS 025 00D SS
斜叶浆, 8 叶片, 60°, 不锈钢, 外径 34 mm, 内径 5 mm	7810 060 4
DASbox <sup>®</sup> 顶置驱动器,	76DX OHD
DASbox® 尾气系统,	76DX OFF
DASbox® 尾气冷凝器, 珀耳帖	76DX CON D
压缩接头, 全套, 带 Pg 13.5 外螺纹, 内径 12 mm	7853 228 4
三通端口, Pg 13.5 螺纹, 3 根管线(外径 4 mm、长度 85 mm), 含所有零件	7870 641 4
管道,不锈钢,带倒钩,外径 4 mm/ 内径 2 mm,长度 225 mm	7810 702 3
压缩接头, 全套, 带 Pg 13.5 外螺纹, 内径 6 mm	7853 228 3
L 形分布器,不锈钢,全套,外径 6 mm,长度 300 mm,宽度 63 mm	7710 202 2
<b>泵头管</b> ,用于 DASGIP MP8 泵,Bioprene 材质,内径 0.5/ 宽 1.05 mm,内螺纹 / 内螺纹	7851 011 8
<b>泵头管</b> ,用于 DASGIP MP8 泵,Bioprene 材质,内径 1.0/ 宽 1.05 mm,外螺纹 / 内螺纹	7851 010 9
补料管线,带2个Luer锁紧配件,外螺纹/外螺纹,C-Flex,内径0.8mm,长1m	7851 030 9
补料管线,带2个Luer锁紧配件,外螺纹/外螺纹,C-Flex,内径0.8mm,长2m	7851 031 0
取样配件,带抽汲阀	7851 014 5
DASware <sup>®</sup> control 软件, 含 PC、OS 和许可证, 用于 4 罐体 DASbox® 迷你平行生物反应控制系统	7860 016 7
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5和 2.0 mL	0030 120 086

**Eppendorf 中国** 服务热线: 400 885 6070 电子邮件: marketinfo@eppendorf.cn

#### www.eppendorf.com

Sigma-Aldrich® is a registered trademarks of Merck KGAA, Germany. Thermo Fisher Scientific® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Eppendorf® and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. DASbox® and DASware® are registered trademarks of DASGIP Information and Process Technology GmbH, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2023 by Eppendorf SE.

Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This application note is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing the application note alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.

AA472-020-01-092023-STS