

Lung-Chip Operation Manual

Part I: Pre-Coating and Cell Seeding Protocol

Protocol Overview

本手冊列出使用肺晶片進行原代小氣道上皮細胞 (HSAEC) 培養的基本步驟，從前置準備、晶片塗佈 (coating) 到下細胞程序 (seeding)

Timeline

Topic		Description
		Reagent and equipment preparation
Day -1		Chip coating preparation
Day 0		Cell thawing and seeding (Loading to chip)

Reagent and Equipment Preparation

Introduction

準備試劑前先進行分裝，避免反覆凍融，確保試劑的穩定性與活性

Coating Reagents (ECM)

Reagent	Conc. (mg/mL)	Amount (mg)	Volume (mL)	Solvent
Collagen I	1	1	1	diH ₂ O

Collagen I Preparation:

- 分裝成單次使用體積的等分試劑，並儲存於 4°C (避免凍融)
- 將 1 mg Collagen I 加入 diH₂O 溶液中，充分混合直至完全溶解

Culture Supplement

Reagent	Conc. (mg/mL)	Volume (mL)
Trypsin 0.25% protease with porcine trypsin, HBSS, EDTA; without calcium, magnesium	-	100
Trypsin Neutralizer Solution (NEU)	-	100
PneumaCult™-Ex Plus Medium	-	490
PneumaCult™-Ex Plus 50X Supplement	-	10
Hydrocortisone Stock Solution	-	3
PneumaCult™-ALI Medium	-	450
PneumaCult™-ALI 10X Supplement	-	50
PneumaCult™-ALI Maintenance Supplement	-	1
Heprin Solution	-	2
Penicillin-Streptomycin (P/S)	-	0.5

Cell Thawing Protocol

Steps

Step	Action
1	將 3mL 預熱的 PneumaCult™-Ex Plus Medium 加入 15mL 無菌離心管中
2	取出凍存細胞: <ul style="list-style-type: none">- 從液態氮儲存槽取出所需的 HSAEC 細胞凍存管- 立即用 75% 乙醇噴灑凍管，並用紙巾擦乾
3	解凍細胞: <ul style="list-style-type: none">- 將凍管置於 37°C 水浴槽中，懸空靜置，使細胞快速解凍- 當凍存管內只剩一小塊冰時，立即取出 (解凍時間約 60-90 秒)
4	轉移細胞至離心管: <ul style="list-style-type: none">- 在無菌操作台內，小心將凍管細胞轉移至 15mL 離心管 中，並緩慢加入 7 mL 預熱的培養基 以稀釋細胞- 輕柔混合細胞懸液，避免氣泡產生
5	將離心管細胞移至 T75: <ul style="list-style-type: none">- 將均勻混和完成的細胞，使用 10mL pipette 將離心管細胞全數吸出- 緩慢將液體在 T75 左下角吐出

Day -1: Chip Coating

Overview

Goals 使用 Collagen I 進行晶片塗覆，提供適合細胞貼附的 ECM 基質環境

- Required Materials**
- Chip: Lung Chip (問一下我們第一代有沒有固定名稱)
 - Reagents:
 - A. Collagen (0.3 mg/mL)
 - B. diH₂O (-/-) at room temperature
 - C. 75% Ethanol
 - Devices:
 - A. 無菌操作台
 - B. 1000μL & 200μL Pipette & tips
 - C. 15mL 無菌離心管

Key Steps

Step	See Page
Prepare Chips	5
Prepare ECM Coating Solution	6
Coating Chip with ECM	7

Prepare Chips

Steps	Step	Action
	1	消毒晶片包裝: <ul style="list-style-type: none">● 使用 70% 乙醇噴霧消毒晶片包裝外部表面● 將晶片包裝帶入無菌操作台 (Biosafety Cabinet, BSC) , 等待酒精揮發乾燥後再打開包裝
	2	打開包裝並接上管子: <ul style="list-style-type: none">● 打開晶片包裝, 確保無菌操作環境, 避免汙染● 使用流體連接管, 將管子接至機片的入口及出口端● 確認管路連接, 避免過度彎曲或堵塞
	3	標記晶片編號: <ul style="list-style-type: none">● 使用無菌標籤或防水記號筆, 在每個晶片標記對應的編號● 確保標記清晰可辨, 並記錄於操作紀錄表中 (例如: 晶片序號、實驗參數設計等資訊)

Prepare ECM Coating Solution

- Before Beginning**
- 在每次使用前，需新鮮配製 ECM 溶液，將各 ECM 成分與冷 DPBS 混合
 - ECM 溶液將塗佈於肺晶片的通道中

Needed Volumes

針對肺晶片 (Lung-Chip)，ECM 工作濃度為

Component	Required Volume
Collagen I	10μL
diH ₂ O	90μL

Steps

Step	Action
1	混和 ECM，配置工作濃度溶液： <ul style="list-style-type: none"> ● 每片晶片體積需求：約 200μL (上、下流道各 100μL) ● 使用預冷的 diH₂O 作為稀釋溶液，將 Collagen I 配製成 0.3 mg/mL ● 使用 pipette 來回混和，勿劇烈混和，避免氣泡產生

Example ECM Calculation

Solution	Concentration
Collagen I concentration	0.3 mg/mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

其中：

- C₁ 原始濃度= 3 mg/mL
- V₁ 原始體積= 10 μL
- C₂ 稀釋後的濃度= X
- V₂ 稀釋後的總體積 = 10μL + 90μL = 100μL

將數值代入公式：

$$3\text{mg/mL} \times 10\mu\text{L} = C_2 \times 100\mu\text{L}$$

$$C_2 = 0.3\text{mg/mL}$$

Coating Chip with ECM

Steps

Step	Action
1	清洗微流道: 先使用各 1000 μ L 的 DPBS 灌注上下流道，再使用 suction 完全去除晶片通道中的 DPBS，照 UV 光滅菌 10min，，確保通道內乾淨無多餘溶液。
2	注入 ECM 溶液至欲培養細胞的流道: 使用 200 μ L pipette，吸取 100 μ L ECM 溶液，注入晶片流道入口端，直至管線出口端，並輕輕抽出 200 μ L tip，即為完成 coating 程序
3	ECM 固化處理: 為獲得最佳效果: <ol style="list-style-type: none"> 1. 將晶片置於 4°C 過夜，使 ECM 完全附著 2. 或是將晶片放置於 37°C 培養箱 1 小時，即可操作
Attention 確認 ECM 溶液填滿通道: - 確保 ECM 溶液充滿晶片流道，包含兩側管線 去除氣泡: - 使用 pipette 輕柔的沖洗通道，去除通道內的氣泡，確保溶液均勻分佈	

Day 0: HSAEC to Chip

Overview

Goals 將原代小氣道上皮細胞 (HSAEC) 均勻接種至肺晶片中，確保細胞黏附具 ECM 塗覆的流道表面

- Required Materials**
- 健康人類小氣道上皮細胞 (HSAEC): PCS-301-010 (ATCC)
 - 細胞培養基:
 - Ex-plus 培養基: Pneumult™-Ex Plus Medium (STEMCELL #05040)
 - ALI 培養基: Pneumult™-ALI Medium (STEMCELL #05001)
 - DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (室溫)
 - 細胞分離與處理試劑:
 - Trypsin 0.25% protease with HBSS and EDTA (without calcium, magnesium)
 - Trypsin Neutralizer: Gibco™ #R002100
 - 75% 乙醇
 - 細胞培養瓶: T75 培養瓶
 - Pipette and tips (1000、200、20μL)
 - 15mL 離心管
 - 台盼藍染色液 (Trypan Blue Solution)
 - 血球計數片 (Hemocytometer)
 - 顯微鏡
 - 具 Collagen I 塗覆 24 wellplate 的培養板 (若需要)
 - 已 coating 完成的肺晶片

Key Steps

Topic	See page
Prepare HSAEC seeding media	9
Count and seed HSAEC	10
Adjust cell density	12

Prepare HSAEC seeding media

HSAEC Seeding Media

Ex-plus media: Pneumult™-Ex Plus Medium (500-mL bottle)

Reagent	Volume (mL)	Concentration	Source	Cat No.
PneumaCult™-Ex Plus Medium	490	-	STEMCELL	#05040
PneumaCult™-Ex Plus 50X Supplement*	10	-	STEMCELL	#05042
Hydrocortisone Stock Solution	0.5	-	STEMCELL	#07925
Penicillin-Streptomycin 100X solution	0.5	-	Hyclone	SV30010

- 儲存條件: 將 Base HSAEC Seeding Medium 儲存於 4°C
- 使用期限: 建議於 30 天內使用完畢

ALI 培養基: Pneumult™-ALI Medium

Reagent	Volume (mL)	Concentration	Source	Cat No.
Pneumult™-ALI Medium	450	-	STEMCELL	#05002
PneumaCult™-ALI 10X Supplement	50	-	STEMCELL	#05003
PneumaCult™-ALI Maintenance Supplement	1	-	STEMCELL	#05006
Hydrocortisone Stock Solution	2.5	-	STEMCELL	#07925
Heprin Solution	1	-	STEMCELL	#07980
Penicillin-Streptomycin 100X solution	0.5	-	Hyclone	SV30010

- 儲存條件: 將 Base HSAEC Seeding Medium 儲存於 4°C
- 使用期限: 建議於 30 天內使用完畢

Count and seed HSAEC

Before Beginning

- 細胞凍存管: 健康人類 HSAEC (PCS-301-010, ATCC)
- Ex-plus 培養基 (PneumaCult™-Ex Plus Medium): 預熱至 37°C
- ALI 培養基 (Pneumult™-ALI Medium): 預熱至 37°C
- DPBS: 預熱至 37°C
- 鑷子 1 支
- 滅菌燈 1 台
- 試管架 1 個
- 電動及手動 Pipette
- Tips (10mL、5mL、1000µL、200µL、20µL)
- Eppendorf 1 管
- 15mL 離心管 3 管
- 確保無菌操作台 (BSC) 準備就緒

Tips for Thawing Cells

1. 快速但輕柔 的操作對於細胞存活至關重要
2. 細胞解凍後需立即稀釋至培養基中，避免 DMSO 對細胞造成毒性
3. 切勿讓細胞長時間置於室溫或冰上

Steps

Step	Action
1	清洗流道中的 Collagen I: - 將晶片流道內的 Collagen I 溶液吸除 - 使用 DPBS 輕柔清洗流道 1–2 次，確保去除多餘的 Collagen I 溶液
2	準備 T75 培養瓶細胞: - 在無菌操作台內，將 T75 培養瓶中的培養基完全吸除 - 加入 4mL DPBS 沖洗細胞，輕輕搖晃，確保完全覆蓋培養表面，然後吸除 DPBS
3	加入細胞分離試劑 (Trypsin, HBSS, EDTA；不含鈣鎂): - 加入 3 mL Trypsin 0.25% 分離試劑 - 將培養瓶放入 37°C 細胞培養箱中孵育 3 分鐘，使細胞變成懸浮狀態
4	細胞懸浮與分離: - 取出培養瓶後，輕敲瓶子的側邊，確保細胞充分從瓶壁分離並懸浮 - 加入 3 mL 胰蛋白酶中和液 (Trypsin Neutralizer)，停止分離反應
5	收集細胞並離心: - 將細胞懸液轉移至 15 mL 離心管中 - 使用控溫型離心機，以 150 x g，室溫離心 5 分鐘
6	移除上清液並計算細胞濃度: - 小心地移除離心後的上清液，保留細胞沉澱 - 加入適量的 Ex-plus 培養基重新懸浮細胞，並使用血球計數板計算細胞數量
7	調整細胞濃度: - 根據計算結果，將細胞濃度計算至 3×10^6 cells/mL

8	<p>接種細胞至肺晶片:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 在下層流道中加入 Ex-plus 培養基作為培養液 - 接著使用 pipette 將計算完成的細胞懸浮液緩慢注入晶片的上層流道入口，確保細胞均勻分佈 - 將晶片水平放置於培養箱內，靜置 4-6 小時，讓細胞穩定貼附於流道表面 <div data-bbox="643 405 1431 667" data-label="Image"> <p>示意圖: 呈現所謂的均勻細胞示意圖, 時間分別為 0h 和貼附時的照片</p> </div>
9	<p>更換培養基:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 確認細胞穩定貼附後，輕柔吸除上層流道內的培養基並更換為新鮮培養基，提供細胞充足養分並移除代謝廢物
10	<p>轉換為動態流動培養:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 滅菌相關耗材，包括連接管路和微量蠕動幫浦 - 將晶片與動態裝置連接，將下層流道中的培養液轉換為 動態流動模式 - 放置於培養箱內，開始進行動態流動培養 - 上層流道培養基每天更換一次，確保細胞獲得足夠的養分供應
11	<p>氣液介面分化培養 (ALI):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 培養至第 3 天，確認細胞生長密度與貼附狀況穩定 - 抽乾上層流道的培養基，使用 DPBS 輕柔沖洗細胞表面，同時使用 ALI 培養基 (PneumaCult™-ALI Medium) 清洗下層流道 - 更換下層流道為 ALI 培養基，啟動動態培養 - 持續動態培養 2-4 週，讓細胞在氣液介面環境下完成分化

Adjust cell density

Overview

為確保將健康人類小氣道上皮細胞 (Primary Small Airway Epithelial Cells) 接種到肺晶片時，細胞密度精確且均勻，建議將細胞密度調整至 3×10^6 cells/mL。

準確的細胞密度對於細胞的黏附、生長和長期培養相當重要

Steps

Step	Action
1	稀釋細胞並計數: <ul style="list-style-type: none">- 使用 pipette 確保細胞團塊完全消失，均勻混合細胞懸浮液- 將 20μL 細胞懸浮液轉移到 eppendorf，使用 Trypan Blue 細胞計數溶液中，進行 1:1 稀釋- 混合均勻，確保細胞與 Trypan Blue 溶液充分結合
2	計數細胞: <ul style="list-style-type: none">- 使用血球計數板 (Hemocytometer) 進行細胞計數- 計算細胞總數並根據稀釋比例計算原液中的細胞濃度
3	調整細胞密度: <ul style="list-style-type: none">- 根據計算結果，將細胞濃度調整至 3×10^6 cells/mL，適合肺晶片接種需求:- 若細胞濃度過高，加入適量 Ex-plus 培養基進行稀釋；若過低，則進行離心並重新調整

Cell Counting and Viability Assessment

A. 計數細胞

使用 血球計數板 (Hemocytometer) 和 台盼藍染色液 (Trypan Blue)，進行細胞活性和總細胞數計算：

1. 將細胞懸浮液進行 1:1 稀釋
2. 20 μ L 細胞懸浮液 + 20 μ L Trypan Blue 溶液
3. 使用移液器取 20 μ L 稀釋後的細胞懸浮液，加入血球計數板的計數區域

B. 計數細胞

將細胞濃度調整至適合肺晶片接種的密度 3×10^6 cells/mL，使用以下公式計算重懸所需體積：

所需重懸體積 (mL) = 目標細胞濃度 (cells/mL) \times 所需總體積 (mL) / 細胞濃度 (cells/mL)

- 假設測得細胞濃度為 5×10^6 cells/mL，目標濃度為 3×10^6 cells/mL，計算所需體積：

所需重懸體積 (mL) = 3×10^6 (cells/mL) \times 0.4 mL / 5×10^6 (cells/mL) = 0.24 mL = 240 μ L