

合同编号: NW20200724-001

检測量子水对人的间充质干细胞  
(MSC) 活性及增殖的影响报告



诺为生物技术有限公司  
NovoBiotechnology Co., Ltd.

## 委托实验技术服务合同附件：

### 检测量子水对人的间充质干细胞 (MSC) 活性及增殖的影响

## 报告

合同编号: NW20200724-001

### 实验步骤及准备事项:

#### 实验前的准备事项:

1、对量子水进行无菌过滤，以便细胞培养时滴加到细胞培养液中，避免细胞培养污染。

注意：无菌量子水避免接触强磁和高温以及其它辐射源（含热辐射和电磁辐射），以免影响量子水的物理状态。

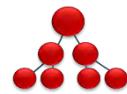
2、准备无菌超纯水 15-20ml。

3、MSC 细胞培养至 P4 时，细胞进行饥饿处理，然后进行实验检测。

4、饥饿培养基：无血小板裂解物培养基

5、试剂耗材：

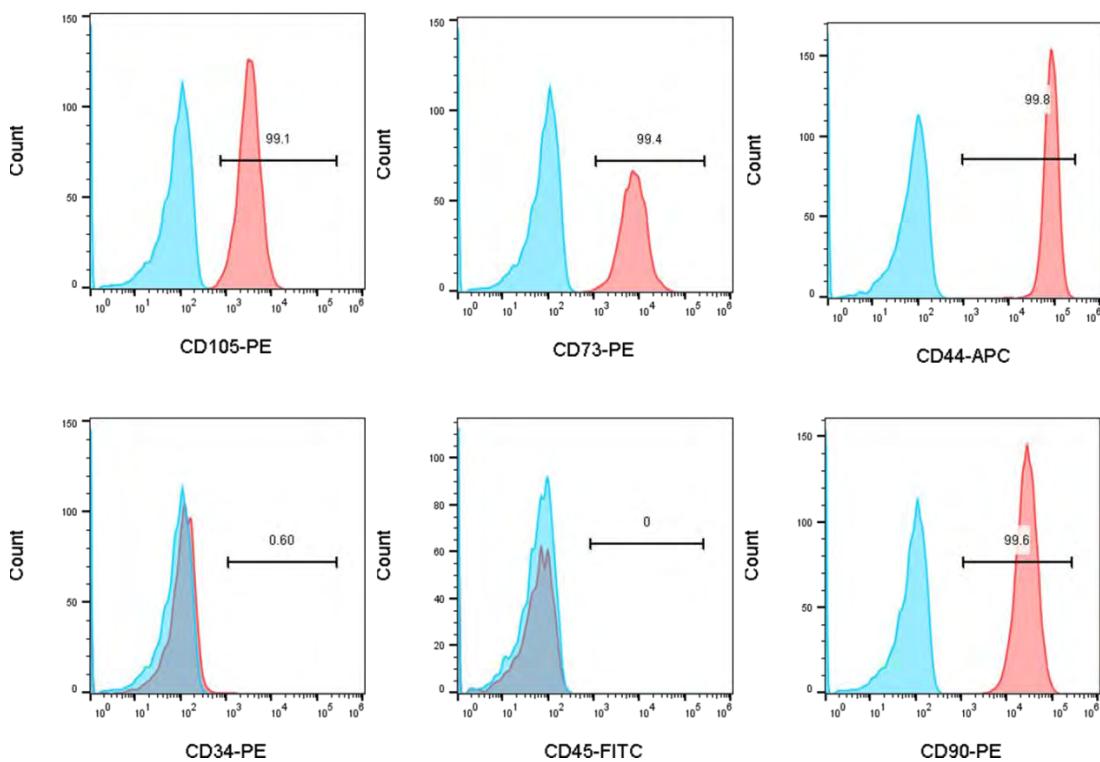
试剂名称	货号	品牌
D-PBS	201001	北京诺为
HapCult™ MSC SF basal medium(human)	637051	PTBM
HapCult™ MSC SF medium Supplements (human)	637052	PTBM
Accutase Enzyme Cell Detachment Medium	00-4555-56	eBioscience
Trypan Blue	07050	PBM
Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC	88-8005-72	eBioscience
L-Glutamine	07100	StemCell
CFSE	65-0850-84	eBioscience
100% DMSO	07939	StemCell
6 孔板	3516	Corning



## 实验（1）：MSC 细胞流式检测

MSC 正常培养的 p4 代细胞长至 90% 时，传代并进行流式检测分析。

### 流式检测报告：



## 实验(2)：细胞饥饿处理后优化量子水检测浓度，检测细胞增殖(CFSE)情况：

1、细胞正常传代接种前，细胞用 CFSE 染色：

- a) 准备待测单细胞悬液；
- b) PBS 清洗细胞两次，以去除血清；
- c) PBS 重悬细胞，浓度在  $5\sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ ；
- d) 添加 CFSE (终浓度  $1 \mu\text{M}$ ，例如  $5\text{mM}$  储存液，添加  $0.2 \mu\text{L}$  至  $1\text{mL}$  细胞悬液中)；
- e) 充分混匀，室温避光孵育  $10\text{min}$ ；
- f) 添加 4-5 倍体积预冷的完全培养基 (含  $\geq 10\%$  血清) 终止标记，冰上孵育  $5\text{min}$ ；
- g) 完全培养基  $1200\text{rpm}$  6 分钟洗涤细胞 3 次，离心后去除上清，用完全培养基重悬细胞备用。

2、然后将 CSFE 染色后的细胞接种至 6 孔板中培养 6 小时后，将培养基更换为饥饿培养基培养。饥饿培养细胞 6-12 小时后，实验孔加入量子水，检测量子水对脐带 MSC 细胞的增殖影响。

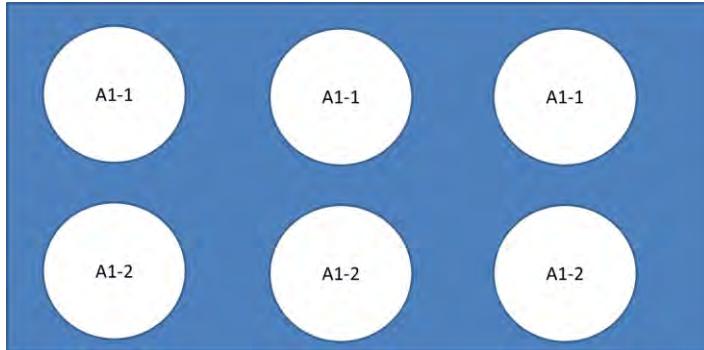
3、实验分 6 组，共需 3 个 6 孔板

- ① MSC (饥饿处理) + 无菌水；(A1-1)  $100 \mu\text{L}$
- ② MSC (饥饿处理) + 无菌水；(A1-2)  $200 \mu\text{L}$
- ③ MSC (饥饿处理) + 无菌水；(A1-3)  $400 \mu\text{L}$
- ④ MSC (饥饿处理) + 量子水；(A2-1)  $100 \mu\text{L}$
- ⑤ MSC (饥饿处理) + 量子水；(A2-2)  $200 \mu\text{L}$
- ⑥ MSC (饥饿处理) + 量子水；(A2-3)  $400 \mu\text{L}$

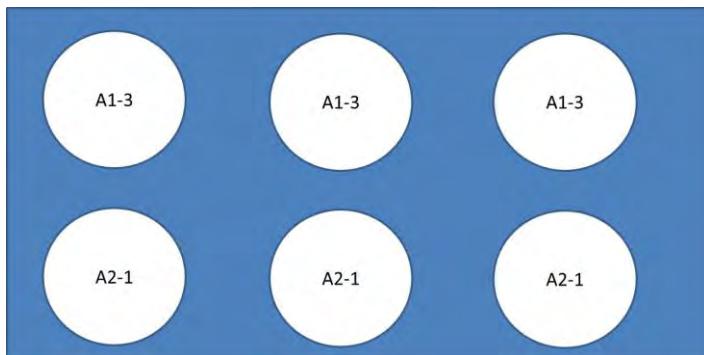
4、根据实验分组在对应培养孔中加入量子水或无菌水或不加。

具体细胞传代接种参照如下排布：

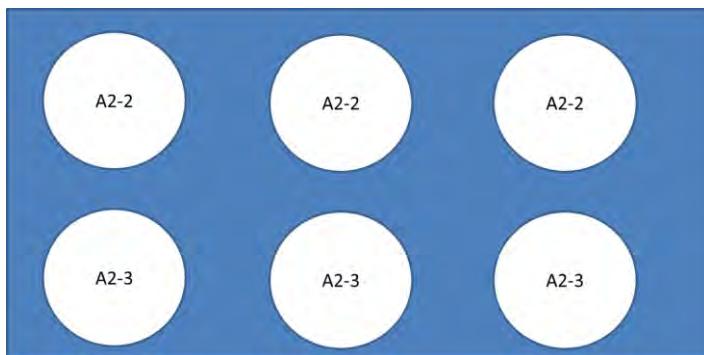
第一个 6 孔板



第二个 6 孔板

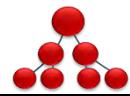


第三个 6 孔板

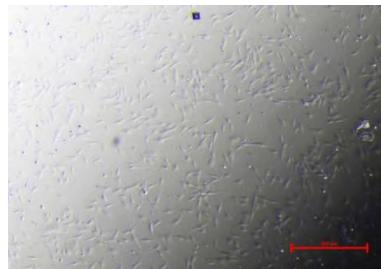


- 5、细胞形态在加入量子水作用前，拍照
- 6、细胞培养 3 天，拍照
- 7、进行 CFSE 检测前，提前将之前没有 CFSE 染色细胞进行检测前的 CFSE 染色，  
作为起始点细胞（CFSE 染色）（染色步骤参照步骤 1）。
- 8、消化收集实验组细胞，检测细胞增殖情况（CFSE）。

**拍照结果(4x 拍照):**



诺为生物



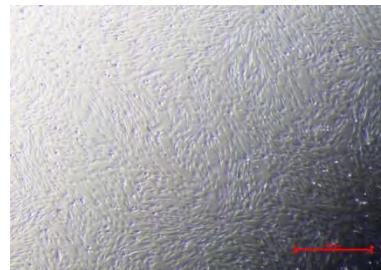
A1-1-作用前 (07.27)



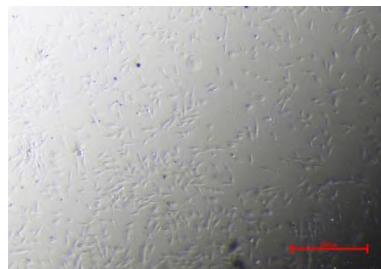
A1-1-培养 (07.30)



A1-2-作用前 (07.27)



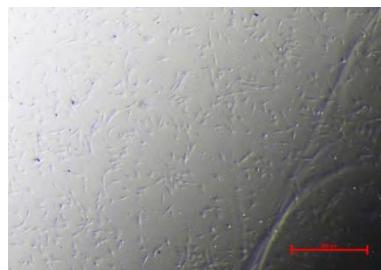
A1-2-培养 (07.30)



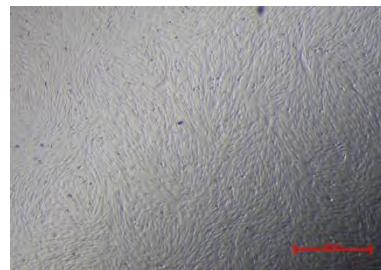
A1-3-作用前 (07.27)



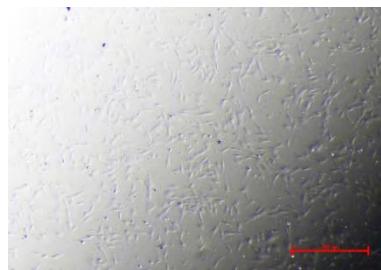
A1-3-培养 (07.30)



A2-1-作用前 (07.27)



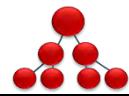
A2-1-培养 (07.30)



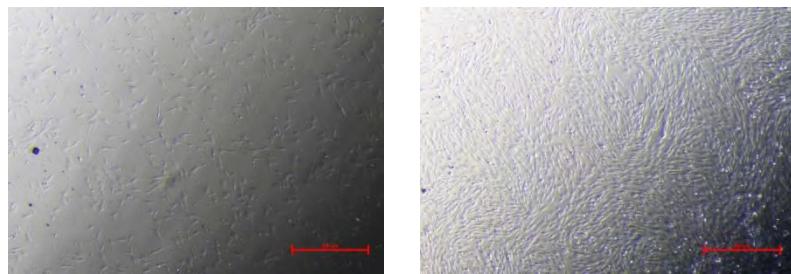
A2-2-作用前 (07.27)



A2-2-培养 (07.30)

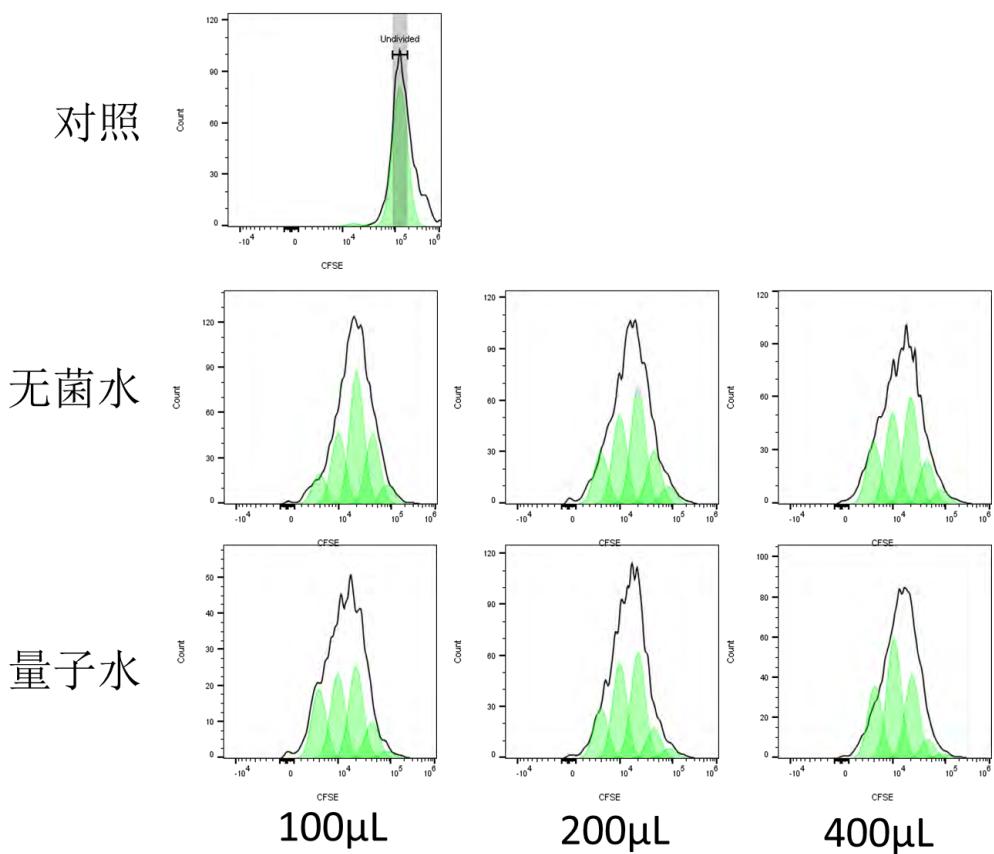


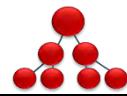
诺为生物



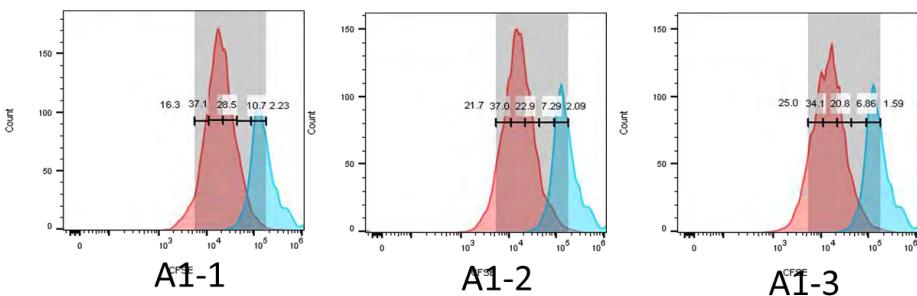
A2-3-作用前 (07.27)                            A2-3-培养 (07.30)

### 流式检测数据

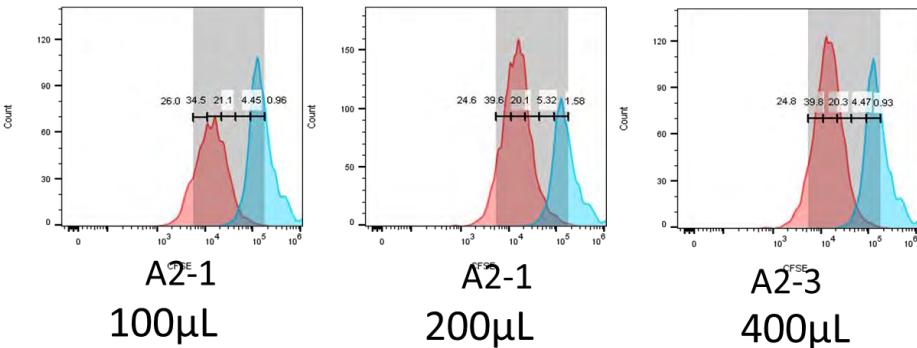




无菌水



量子水



100μL

A2-1

CFSE

200μL

A2-1

CFSE

400μL

A2-3

CFSE

**量子水对细胞增殖影响检测：**脐带 MSC 细胞经 CFSE 染色后接种，在完全培养基培养 6 小时后进行饥饿培养，同时在不同实验组添加不同浓度的无菌水或量子水，检测量子水对细胞增殖的影响。A1-1、A1-2、A1-3、A2-1、A2-2、A2-3 实验组细胞培养 3 天后进行流式检测，分析 CFSE 染色后细胞荧光的衰减情况，结果显示实验组细胞均发生增殖后 CFSE 荧光衰减，而且细胞培养孔（A2-3）加入 400 μL 高浓度量子水对 CFSE 荧光衰减作用更强，表明量子水在加入细胞培养孔（A2-3）对脐带 MSC 细胞有促进增殖的作用趋势。

### 实验（3）：细胞饥饿处理后检测细胞的凋亡情况

1、饥饿处理：MSC 细胞正常传代接种至 6 孔板中,  $3 \times 10^4$ /孔, 培养 6 小时后, 将培养基更换为饥饿培养基培养。饥饿培养细胞 6 时。MSC 饥饿处理后, 拍照。

2、检测量子水对 MSC 细胞生长影响

3、实验分 3 组, 共需 3 个 6 孔板

① MSC (饥饿处理) +400  $\mu$  L 无菌水; (A1)

②MSC (饥饿处理) +400  $\mu$  L 量子水; (A2)

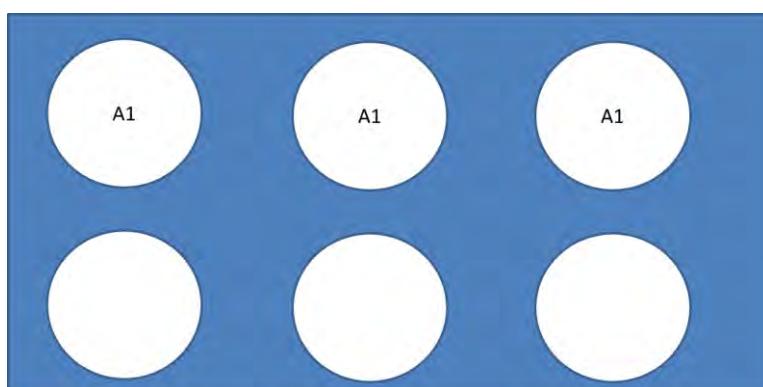
③MSC (饥饿处理); (B)

1mL:加 1mL 量子水

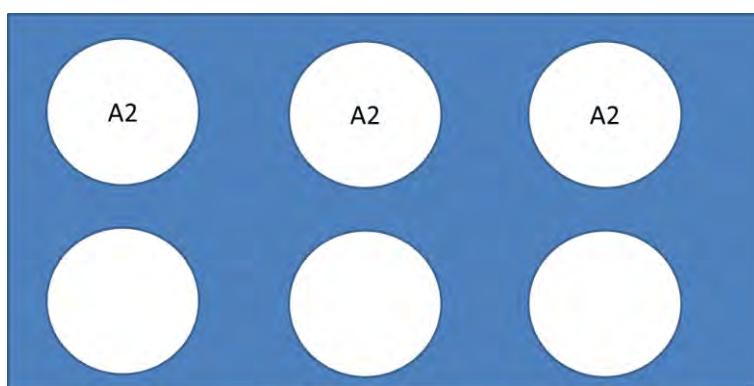
4、根据安排在对应孔中加入量子水或无菌水或不加。

具体传代安排参照如下排布:

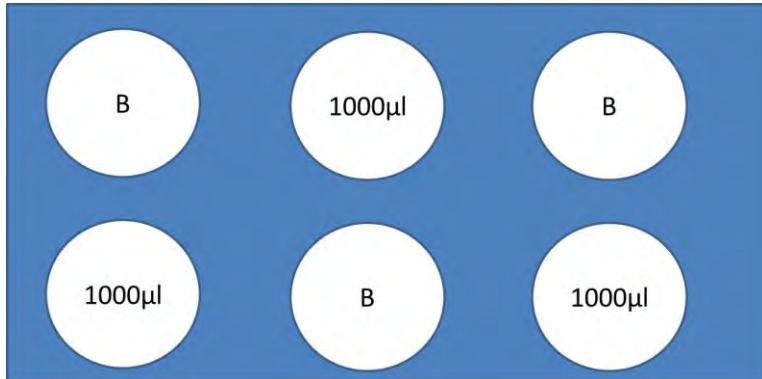
第一个 6 孔板



第二个 6 孔板



第三个 6 孔板



5、细胞培养 4 天，流式检测细胞凋亡情况。

6、所用试剂：Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (货号：88-8005-72)

注意：凋亡反应中不能用含 EDTA 的溶液

7、蒸馏水稀释 10X Binding Buffer 至 1X Binding Buffer (1mL 10X Binding Buffer+9mL 无菌水)；

8、D-PBS 清洗细胞一次，1X Binding Buffer 再次清洗细胞一次；

9、1X Binding Buffer 重悬细胞，浓度  $1\sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ ；

10、100  $\mu\text{L}$  细胞悬液中加入 2.5  $\mu\text{L}$  荧光偶联 Annexin V；

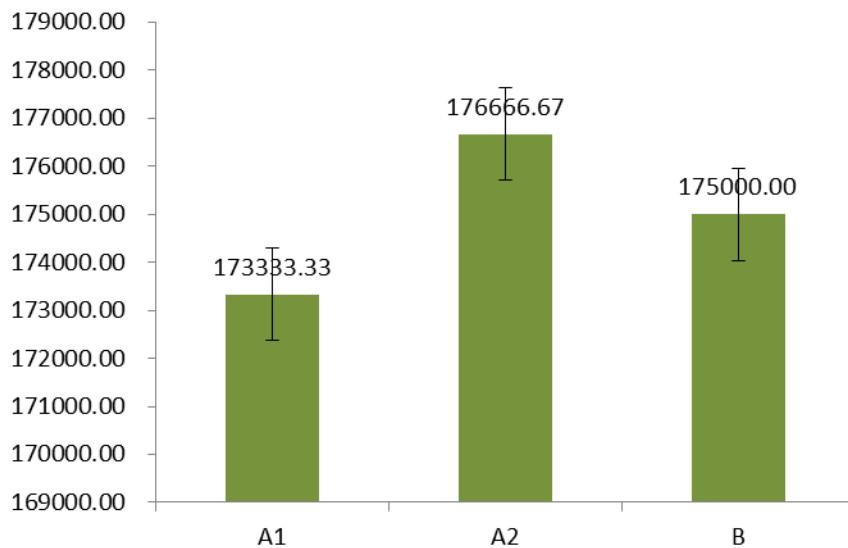
11、室温孵育 15min；

12、1X Binding Buffer 清洗细胞，200  $\mu\text{L}$  1X Binding Buffer 重悬细胞；

13、加入 2.5  $\mu\text{L}$  PI 染色试剂 (货号：00-6990)，避光室温孵育 10min；

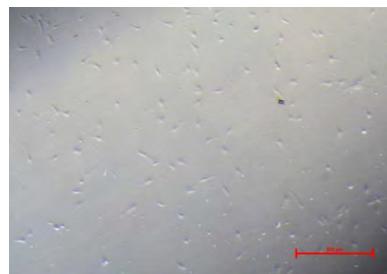
14、4 小时内进行流式检测，可在 2-8°C 黑暗中放置。

计数结果：

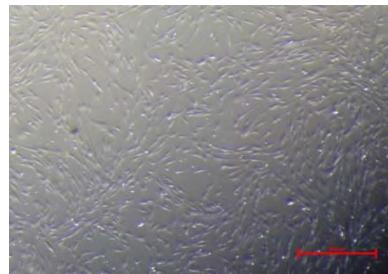


细胞传代接种时，每孔接种细胞数相同，在细胞培养过程中添加量子水后继续培养细胞 2 天，然后计数每孔的细胞数。添加量子水后，细胞增殖数量有增加的趋势。

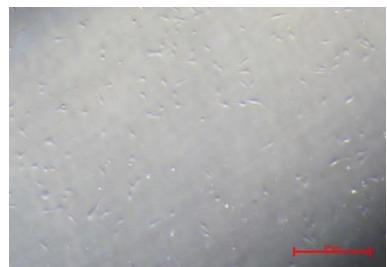
#### 拍照结果 (4x 拍照)：



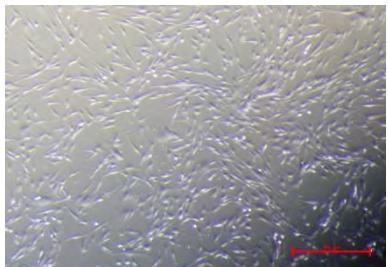
A1 作用前 (08.07)



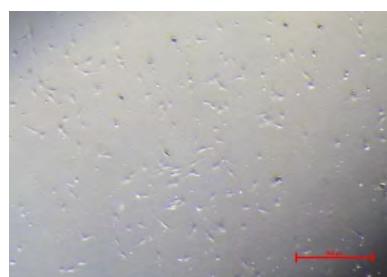
A1 培养 (08.12)



A2 作用前 (08.07)



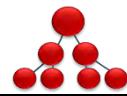
A2 培养 (08.12)



B 作用前 (07.23)



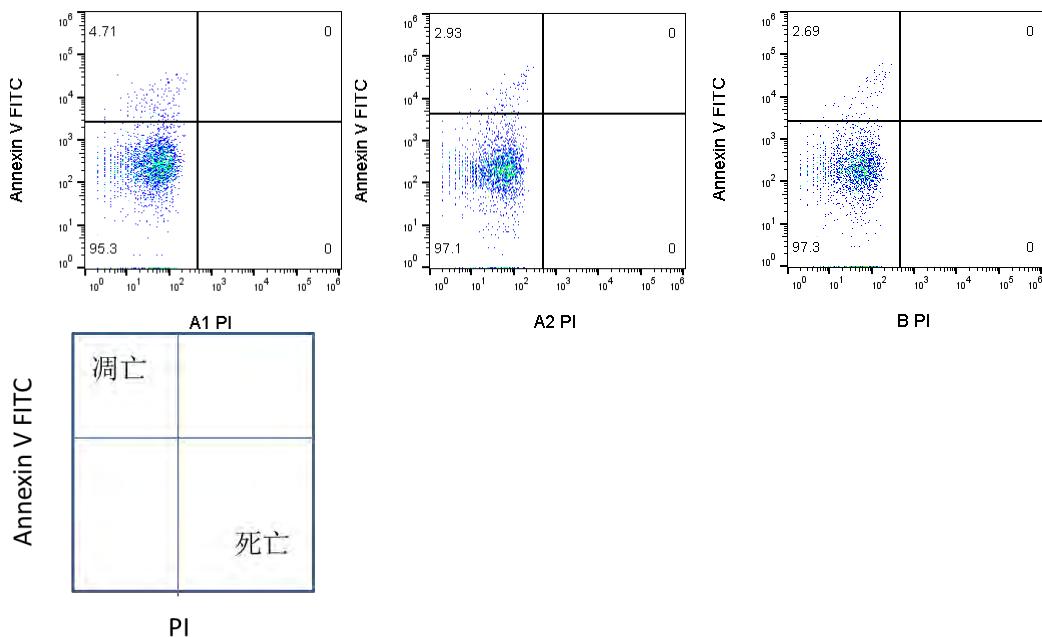
B 培养 (07.26)



诺为生物

细胞形态：添加量子水作用前的细胞生长形态和细胞添加量子水后继续培养的细胞形态。

### 凋亡检测结果：



**量子水的细胞毒性检测：**流式细胞仪检测分析细胞染色后 Annexin V 和 PI 的结合情况，对照组 Annexin V 阳性细胞所占比例为 4.7% (A1) ;在添加量子水后，Annexin V 阳性细胞所占比例为 2.9%，而将量子水放置在培养的 MSC 周边，B 实验组 Annexin V 阳性细胞所占比例分别为 2.7%。表明在添加量子水后细胞凋亡有降低的趋势 (A2, B)，能够维持细胞更好的活性状态。



#### 实验(4)：细胞饥饿处理后，检测细胞增殖(CFSE)情况：

9、细胞正常传代接种前，细胞用 CFSE 染色：

- h) 准备待测单细胞悬液；
- i) PBS 清洗细胞两次，以去除血清；
- j) PBS 重悬细胞，浓度在  $5\sim10\times10^6/\text{ml}$ ；
- k) 添加 CFSE (终浓度  $1\text{ }\mu\text{M}$ ，例如  $5\text{mM}$  储存液，添加  $0.2\text{ }\mu\text{L}$  至  $1\text{mL}$  细胞悬液中)；
- l) 充分混匀，室温避光孵育  $10\text{min}$ ；
- m) 添加 4-5 倍体积预冷的完全培养基 (含  $\geq 10\%$  血清) 终止标记，冰上孵育  $5\text{min}$ ；
- n) 完全培养基  $1200\text{rpm}$  6 分钟洗涤细胞 3 次，离心后去除上清，用完全培养基重悬细胞备用。

10、然后将 CSFE 染色后的细胞接种至 6 孔板中培养 6 小时后，将培养基更换为饥饿培养基培养。饥饿培养细胞 6-12 小时后，实验孔加入量子水，检测量子水对脐带 MSC 细胞的增殖影响。

11、实验分 3 组，共需 3 个 6 孔板

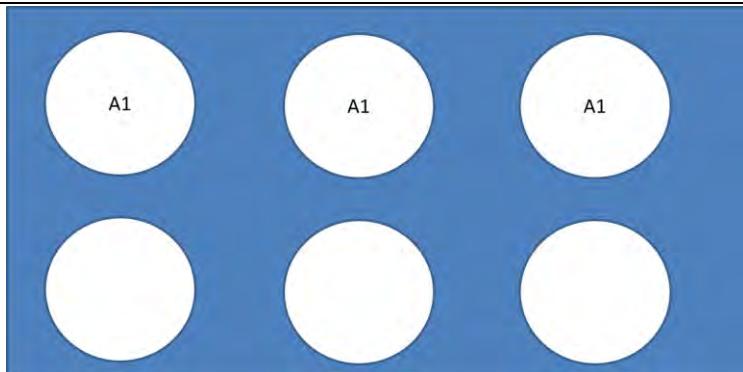
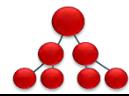
- ① MSC (饥饿处理) + $400\text{ }\mu\text{L}$  无菌水； (A1)
- ② MSC (饥饿处理) + $400\text{ }\mu\text{L}$  量子水； (A2)
- ③ MSC (饥饿处理)； (B)

1mL:加 1mL 量子水

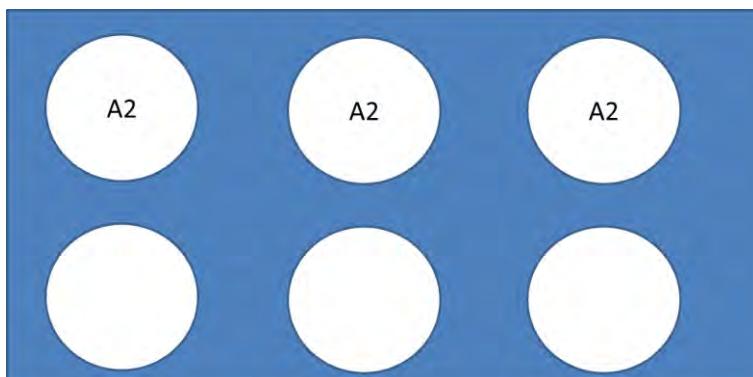
12、根据实验分组在对应培养孔中加入量子水或无菌水或不加。

具体细胞传代接种参照如下排布：

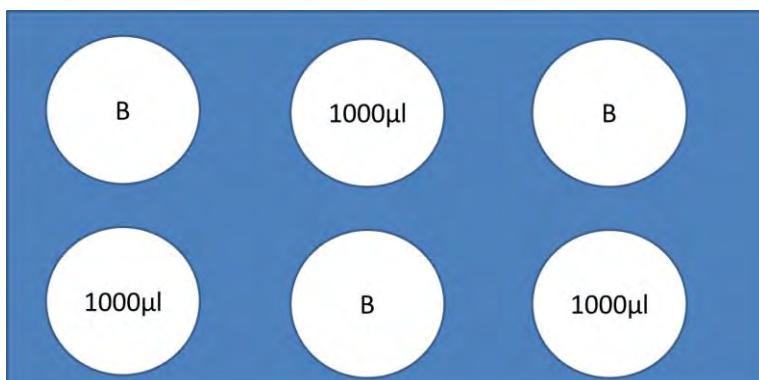
第一个 6 孔板



第二个 6 孔板

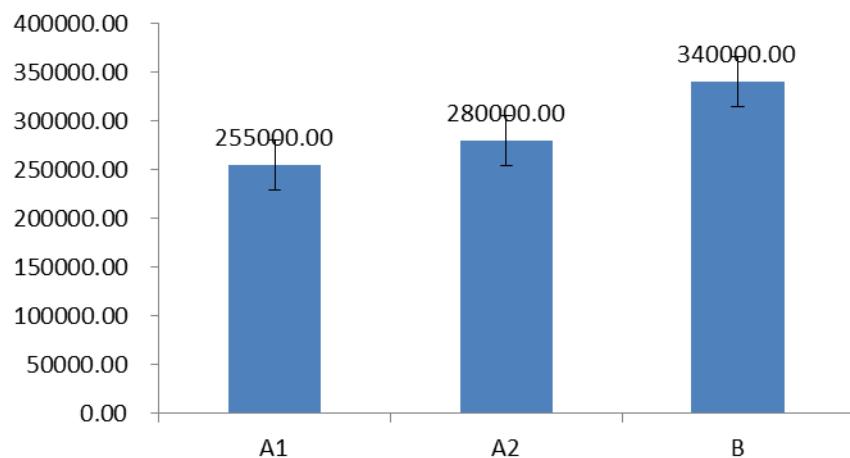


第三个 6 孔板



- 13、细胞形态在加入量子水作用前，拍照
- 14、细胞培养 4 天，拍照
- 15、进行 CFSE 检测前，提前将之前没有 CFSE 染色细胞进行检测前的 CFSE 染色，作为起始点细胞（CFSE 染色）（染色步骤参照步骤 1）。
- 16、消化收集实验组细胞，检测细胞增殖情况（CFSE）。

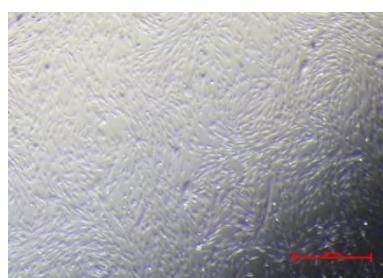
计数结果：



#### 拍照结果 (4x 拍照):



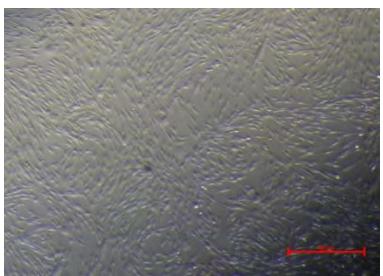
A1 作用前 (08.07)



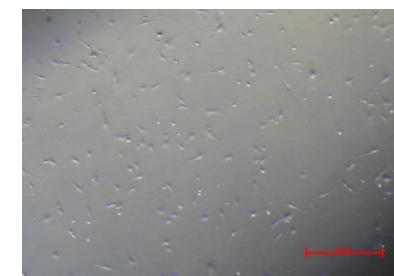
A1 培养 (08.12)



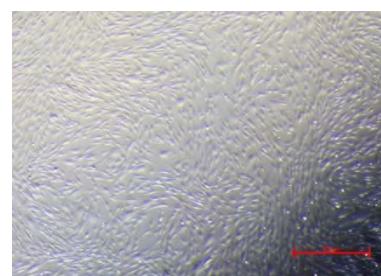
A2 作用前 (08.07)



A2 培养 (08.12)



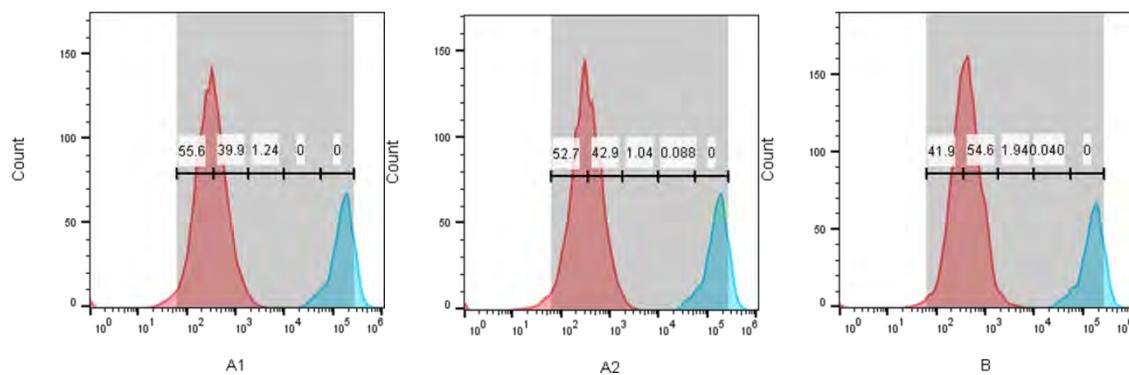
B 作用前 (08.07)



B-培养 (08.12)

**细胞形态:** 添加量子水作用前的细胞生长形态和细胞添加量子水后继续培养的细胞形态。

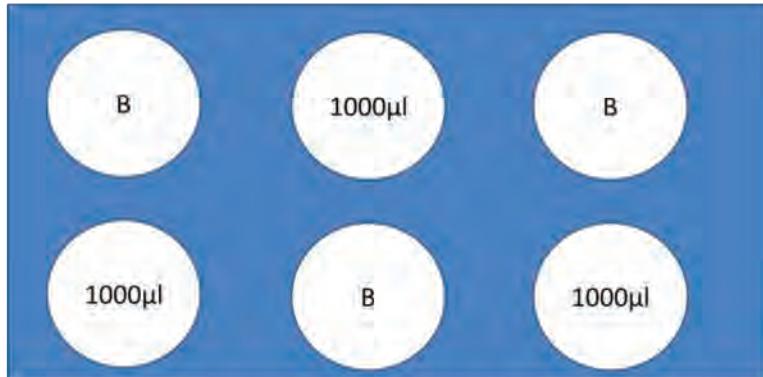
#### 流式检测数据



**量子水对细胞增殖影响检测：**脐带 MSC 细胞经 CFSE 染色后接种，在完全培养基培养 6 小时后进行饥饿培养，同时在不同实验组添加量子水，检测量子水对细胞增殖的影响。A1、A2、B 实验组细胞培养 4 天后进行流式检测，分析 CFSE 染色后细胞荧光的衰减情况，结果显示对照组（A1， A2， B）和实验组细胞均发生增殖后 CFSE 荧光衰减，而且量子水在加入细胞培养孔（A2）和量子水通过能量场作用于周围细胞（B）时 CFSE 荧光衰减比例更多，表明量子水在加入细胞培养孔（A2）和量子水通过能量场作用于周围细胞（B）的条件下，细胞增殖和同步化细胞分裂较好，且量子水对脐带 MSC 细胞有促进增殖的趋势。

北京诺为生物技术有限公司

2020年08月14日



请注意此孔板的设计：  
1000ul的量子水置于MSC的周围。此操作用于模拟观察量子水是否可通过场作用直接影响人体：  
在不直接服用量子水的情况下，环境中的量子水是否会对人体产生影响。

5、细胞培养 4 天，流式检测细胞凋亡情况。

6、所用试剂：Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (货号：88-8005-72)

注意：凋亡反应中不能用含 EDTA 的溶液

7、蒸馏水稀释 10X Binding Buffer 至 1X Binding Buffer (1mL 10X Binding Buffer+9mL 无菌水)；

8、D-PBS 清洗细胞一次，1X Binding Buffer 再次清洗细胞一次；

9、1X Binding Buffer 重悬细胞，浓度  $1\sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ ；

10、100 μL 细胞悬液中加入 2.5 μL 荧光偶联 Annexin V；

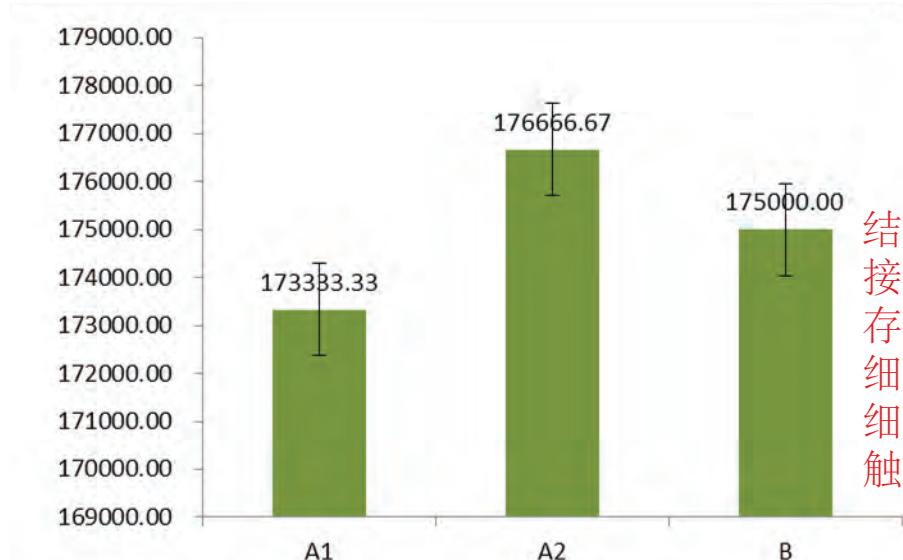
11、室温孵育 15min；

12、1X Binding Buffer 清洗细胞，200 μL 1X Binding Buffer 重悬细胞；

13、加入 2.5 μL PI 染色试剂 (货号：00-6990)，避光室温孵育 10min；

14、4 小时内进行流式检测，可在 2~8°C 黑暗中放置。

计数结果：



结果显示：即使没有直接接触量子水，环境中存在的量子水仍会提高细胞的数量 (B)，且细胞数量接近于直接接触量子水组 (A2)。

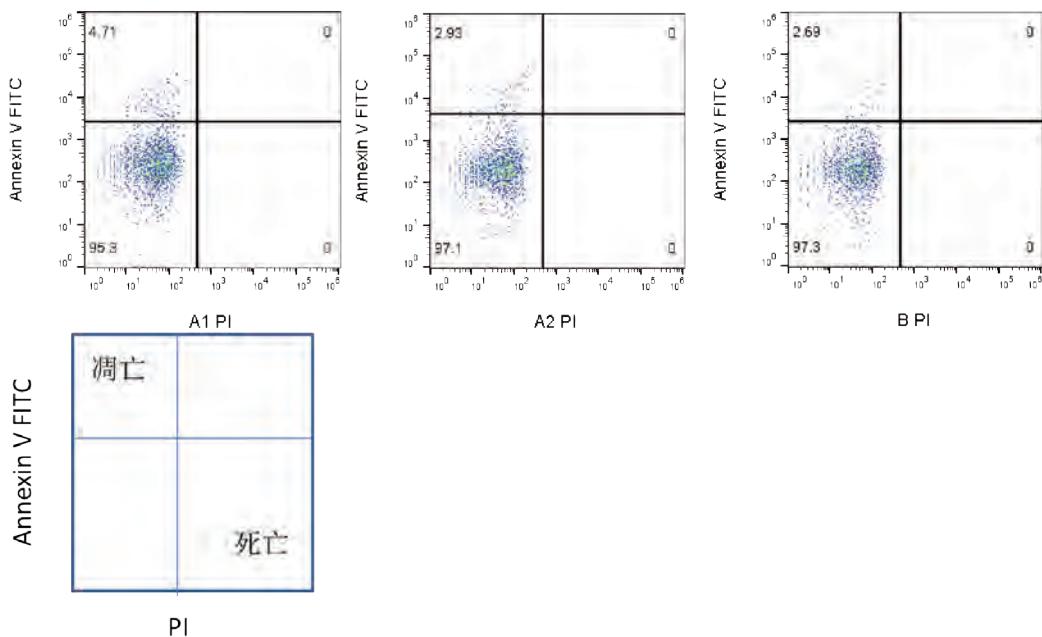
细胞传代接种时，每孔接种细胞数相同，在细胞培养过程中添加量子水后继续培养细胞 2 天，然后计数每孔的细胞数。添加量子水后，细胞增殖数量有增加的趋势。

# 附件 实验报告P12操作分析



细胞形态：添加量子水作用前的细胞生长形态和细胞添加量子水后继续培养的细胞形态。

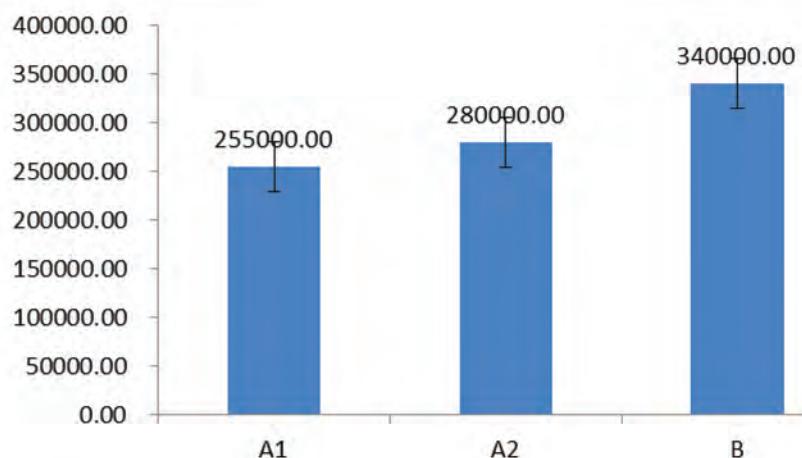
凋亡检测结果：



量子水的细胞毒性检测：流式细胞仪检测分析细胞染色后 Annexin V 和 PI 的结合情况，对照组 Annexin V 阳性细胞所占比例为 4.7% (A1) ;在添加量子水后，Annexin V 阳性细胞所占比例为 2.9%，而将量子水放置在培养的 MSC 周边，B 实验组 Annexin V 阳性细胞所占比例分别为 2.7%。表明在添加量子水后细胞凋亡有降低的趋势 (A2, B)，能够维持细胞更好的活性状态。

A1组（无菌水）凋亡细胞4.71%，A2组（量子水）为2.93%，B组（外围量子水）为2.69%，与直接量子水培养的细胞持平。

证明：无论是量子水直接添加组干细胞 (A2)还是零添加量子场外围作用(B)，均证明量子水可降低细胞凋亡率，促进干细胞活率。

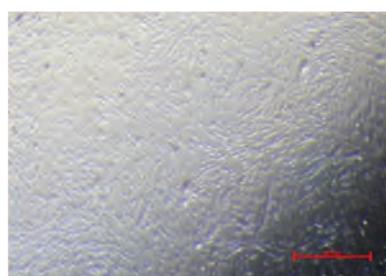


注：细胞增殖实验显示，同未经过量子水干预的实验组相比，经过量子水干预组（B）的干细胞数量相较更多，说明量子水有促进干细胞增殖的作用。

拍照结果(4x 拍照)：



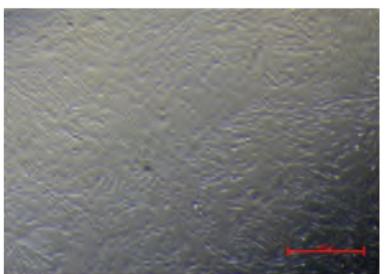
A1 作用前 (08.07)



A1 培养 (08.12)



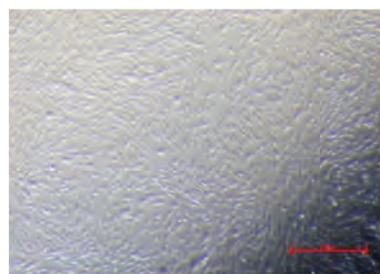
A2 作用前 (08.07)



A2 培养 (08.12)



B 作用前 (08.07)



B-培养 (08.12)

细胞形态：添加量子水作用前的细胞生长形态和细胞添加量子水后继续培养的细胞形态。

流式检测数据