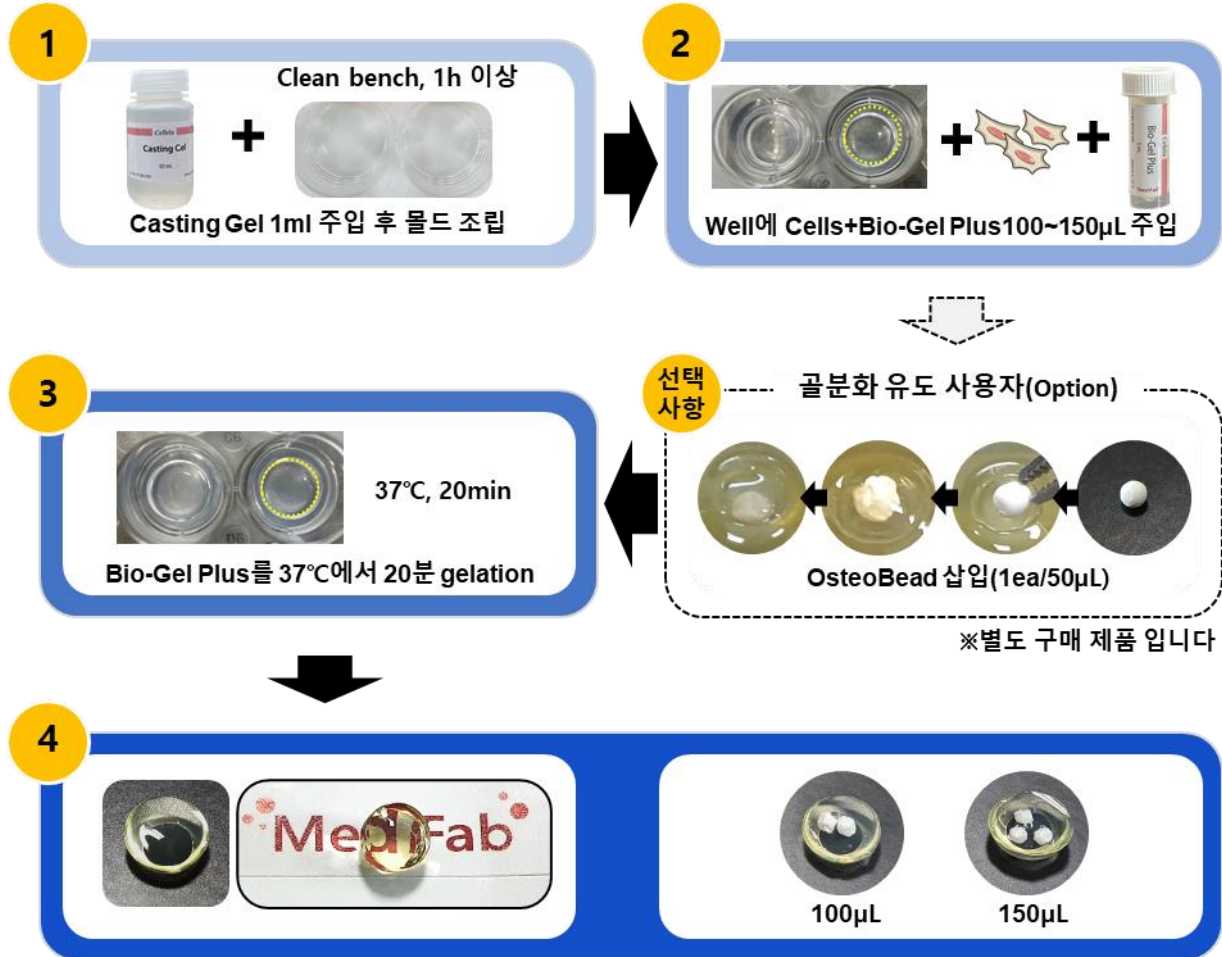


사용 프로토콜



Notice

- 실험자 마다 사용되는 세포의 수는 다르지만, 2×10^6 cells/mL (Bio-Gel Plus) Density 이상 권장
- 세포 현탁용 배지의 양에 따라 Bio-Gel Plus의 stiffness 조절이 가능 (ex. Bio-Gel Plus를 1/2로 dilution 하여 사용하고자 한다면, 세포를 배지 500 µL에 현탁 후 Bio-Gel Plus 500 µL를 첨가하여 mix)
 ※ bio-Gel Plus를 배지와 섞게 되면 4주 이상 물성 유지가 어려울 수 있습니다. 장기 배양을 원하시는 사용자는 3D Cell culture 기간 중 firming buffer 처리를 통해 물성 강화가 필요합니다.
- Open하여 사용 후 남은 Bio-Gel Plus는 4°C 보관 권장

Cellrix® 3D Culture System +Plus – 24 well kit 사용법

★ 메디팜 홈페이지 “imedifab.com” 에서 사용법 동영상을 참고하세요!

1. Casting Gel 준비 (Preparation of Casting Gel)

- ① Casting Gel을 80~90°C에서 20~30분 동안 완전히 녹인다.
 - ✓ **참고** 녹인 후 따뜻할 정도로 식혀 사용할 경우 Casting mold 분리 시 제거가 더욱 쉬움.
- ② Casting Gel 용액을 24 well plate에 각 1 mL씩 넣는다.
- ③ Casting mold를 깨끗이 씻은 후 24 well plate cover를 덮어 Clean bench 안에서 1시간~1시간30분 간 굳힌다.
- ④ 완전히 굳은 후 Casting mold를 수직 방향으로 조심스럽게 제거한다.

2. Bio-Gel Plus에 세포 담지 (Mix with Bio-Gel Plus and cells)

- ① Bio-Gel Plus를 실험 시작 전에 37°C에서 10분 동안 예열하여 solution 상태로 준비한다.
- ② 배양하고자 하는 세포를 필요한 수만큼 tube에 담아 spin down 시킨다.
- ③ Cell pellet에 Cellrix® Bio-Gel Plus를 서서히 첨가해준 후 조심스럽게 섞어 준다. 이때, 기포가 생기지 않도록 주의한다.
 - ✓ **참고** Cell pellet을 소량의 배지로 풀어준 후 Bio-Gel Plus를 섞어주면 균일한 혼합이 쉬워지며 또한 배지 양에 따라 최종 Bio-Gel Plus gel의 물성 조절이 가능

3. 세포 담지된 Bio-Gel Plus의 3D 배양체 형성 (Cast cell mixed Bio-Gel)

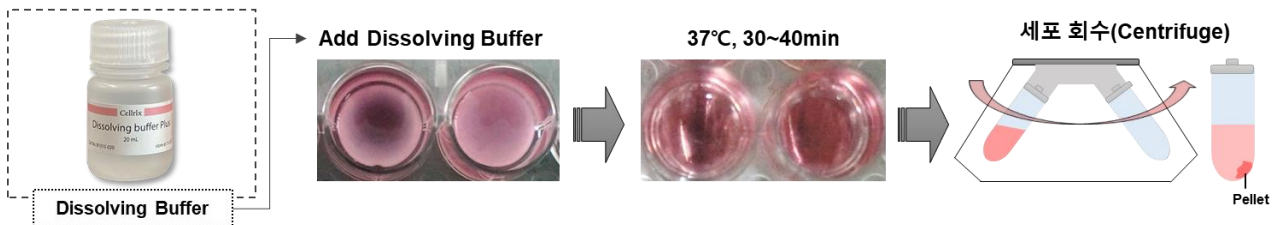
- ① 세포가 혼합된 Bio-Gel Plus solution (권장: 2×10^5 cells/mL (Bio-Gel Plus))을 앞서 준비해 놓은 Casting Gel에 생성된 각각의 홈에 100~150 μ L씩 분주한다.
 - ✓ **선택** 골 분화를 위해 *Cellrix – OsteoBead(cat. No. B1100-150)*를 사용시, 겔화 시키기 전단계에서 각 홈에 담지시킨 Bio-Gel Plus안에 멸균된 포셉으로 2~3 개의 Bead를 포매 시킨다.
- ② 분주 된 Bio-Gel Plus를 37°C에서 20분간 보관하여 겔화(Gelation)한다.
- ③ 24well plate에 세포 배양 배지를 미리 첨가해 둔다.
- ④ 겔화 된 Bio-Gel Plus 3D 배양체를 전용 spatula로 살짝 밀어 꺼낸 후 배지가 담긴 24 well plate에 옮겨 배양을 시작한다.
 - ✓ **주의** 이때 Casting Gel이 떨어져와 Cell과 함께 Culture 되면 세포 증식이 늦춰질 수 있으므로 제거해 준다.

◆ Dissolving buffer Plus 사용 및 응용

- Dissolving buffer Plus는 사용 전에 37°C로 예열한다.

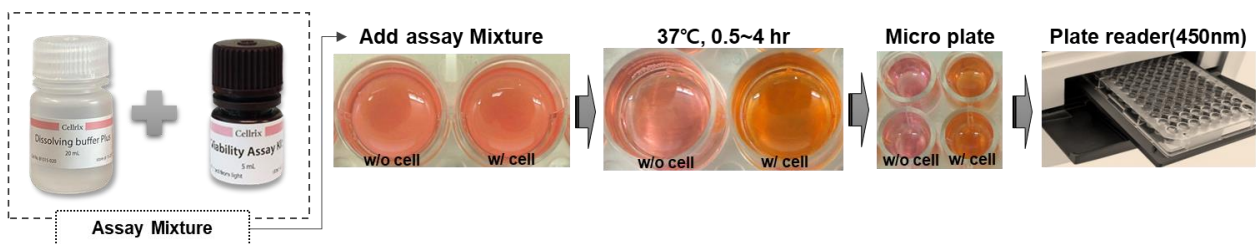
▶ 3차원 배양 세포 회수 시

- ① Well에서 배지를 제거한다. 이때 배양체가 손실되지 않도록 주의한다.
- ② 24 well plate 기준으로 각 well 당 Dissolving buffer Plus를 1mL 첨가하고 incubator (e.g., at 37°C, 5% CO₂)에서 30~40분 동안 반응시킨다.
- ③ 각 well의 용액을 수거하여 원심분리법으로 세포를 회수한다.
 - ✓ 세포 회수가 어려울 시, Dissolving Buffer Plus 용량을 늘려 처리하거나 Centrifuge 시 회전수(RPM)를 높여 진행한다.



▶ Cell Viability 측정 시

- ① Well에서 배지를 제거한다. 이때 배양체가 손실되지 않도록 주의한다.
 - ② 24 well plate 기준으로 각 well 당 Dissolving buffer Plus를 1mL에 *Cellrix® Viability Assay kit (cat. No. B1007)* 100 µL (Dissolving buffer Plus의 10% volume)를 첨가하고 incubator (e.g., at 37°C, 5% CO₂)에서 2~4시간 동안 반응시킨다.
- ◆ 주의) 실험 조건에 따라 Bio-Gel Plus가 녹는 시간이 상이할 수 있으므로 육안상으로 남아있는 겔이 없을 때까지 처리한다.
- ③ 흡광도를 측정하기 전 1분 이내로 부드럽게 shaking 해준다.
 - ④ Plate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정한다.





■ Kit 구성

제품명		용도	용량	Cat no.
Cellrix® 3D culture system +Plus 24 well kit (Cat no. B1030-024)	Bio-Gel Plus	3D 배양체 형성	5 mL x 2	B1016-005
	Casting Gel	3D 배양체 형상 제작	50 mL x 1	B1002-050
	Casting mold		1 pk (8 set)	B1003-024
	Dissolving buffer Plus	3D 배양 세포 회수	20 mL x 2	B1015-020
	Spatula	3D 배양체 이동	1 pk (12 ea)	B1014-012

■ 별매

제품명	용도	용량	Cat no.
Cellrix® - OsteoBead	골 환경 모사체	150ea	B1100-150