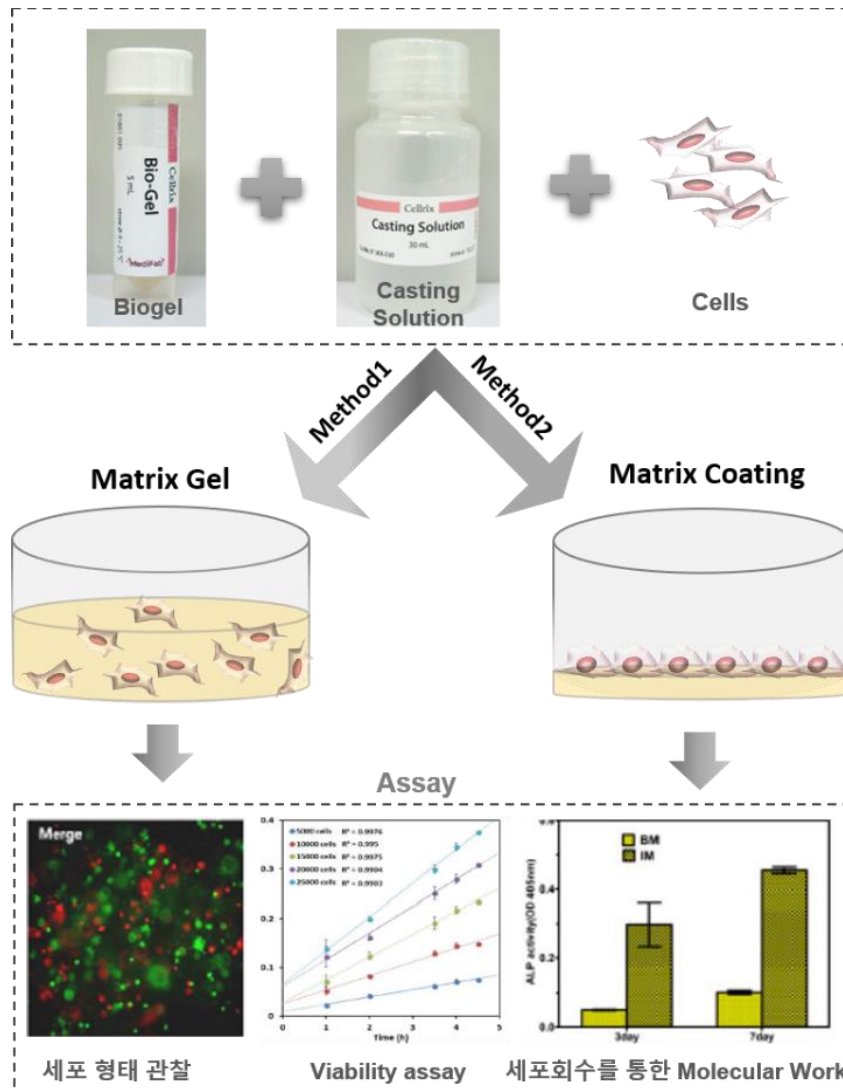


◆ Cellrix® 3D Culture System - BioCoat 소개

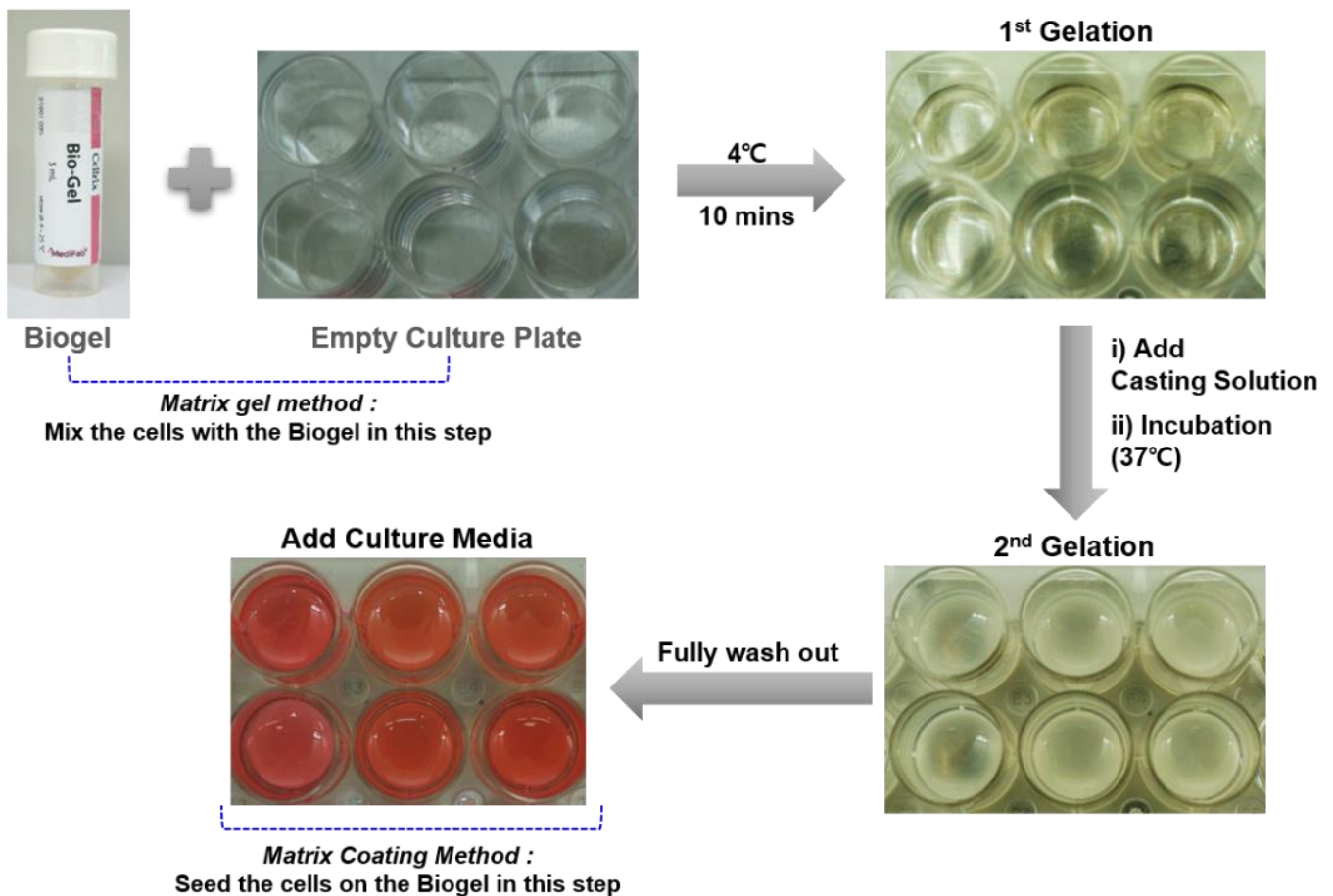


- **Matrix gel method** : BioGel 내에서 3차원 세포배양이 가능하며, 삼차원배양체를 plate 시스템에서 사용하여 겔의 고정과 더불어 공배양과 같은 다른 장치를 활용할 수 있음.
- **Matrix coating method** : BioGel 위에서 세포를 seeding 하여 세포의 부착력을 좀더 증가시키거나 처리하고자 하는 약물의 처리를 효율적으로 하고자 할 때 유용하게 사용될 수 있음.
- **Analysis** : 삼차원 세포배양 후 세포의 형태는 물론 세포의 활성도를 측정할 수 있을 뿐만 아니라 세포를 겔과 분리하여 회수 후 다양한 분석까지 적용가능 함.

◆ 제품구성

Kit Type	Kit Component	용량(mL)	Cat. No.	Usage
Bio Coat 5M (B1020-005)	Bio gel	5ML	B1001-005	Hydrogel base for 3D culture
	Casting Solution	30ML	B1006-030	Induce the gelation of Biogel without casting gel & mold system
	Dissolving Buffer Plus	20ML	B1015-020	Reagent for recovery of 3D cultured cells
	Firming buffer	50ML	B1005-050	Preventing from deformation of Biogel shape
	Viability Assay Kit	5ML	B1007-500	Reagent for cell viability assay
Bio Coat 15M (B1020-015)	Bio gel	5ML × 3	B1001-005	Hydrogel base for 3D culture
	Casting Solution	30ML	B1006-030	Induce the gelation of Biogel without casting gel & mold system
	Dissolving Buffer Plus	20ML × 2	B1015-020	Reagent for recovery of 3D cultured cells
	Firming buffer	50ML × 2	B1005-050	Preventing from deformation of Biogel shape
	Viability Assay Kit	5ML	B1007-500	Reagent for cell viability assay

◆ Cellrix® 3D Culture System - BioCoat 를 이용한 삼차원 배양 방법



▶ Matrix gel method

- ① Cellrix® Bio-Gel을 실험 시작 전에 37°C에서 예열하여 solution 상태로 준비한다.
- ② 배양하고자 하는 세포를 필요한 수만큼 tube에 담아 down 시킨다.
- ③ Cell pellet에 Cellrix® Bio-Gel을 서서히 첨가해준 후 조심스럽게 섞어 준다. 이때, 기포가 생기지 않도록 주의한다.
- ④ 세포가 혼합된 Bio-Gel solution을 배양할 용기에 100~200uL/cm² drop 후 4°C에서 10분간 보관하여 1st 겔 화(Gelation) 한다.
- ⑤ Bio-Gel 2배 용량의 Casting Solution을 1st 겔화된 Bio-Gel에 첨가한 후 37°C (5% CO₂ incubation)에서 모두 불투명한 흰색이 될 때까지 2nd 겔 화를 유도한다.
- ⑥ Casting Solution을 완전히 제거하고 culture medium으로 3회 rinse 후 적당량의 세포 배양 배지 첨가한 후 배양한다.

▶ Matrix Coating Method

- ① Cellrix® Bio-Gel을 실험 시작 전에 37°C에서 예열하여 Solution 상태로 준비한다.
- ② 50 ~ 100 μL/cm² Biogel을 cell culture dish에 분주하고, 표면이 완전히 적셔질 수 있도록 잘 기울여준다.
- ③ 4°C에서 10분간 보관하여 분주된 Bio-Gel을 1st 겔 화(Gelation) 한다.
- ④ Bio-Gel 2배 용량의 Casting Solution을 1st 겔화된 Bio-Gel에 첨가한 후 37°C (5% CO₂ incubation)에서 모두 불투명한 흰색이 될 때까지 2nd 겔 화를 유도한다.
- ⑤ Casting Solution을 완전히 제거하고 culture medium으로 3회 rinse 해준다.
- ⑥ 세포 현탁액을 seeding한 후 배양한다.

▶ Firming buffer 사용법

- ① 세포 배양 중인 well plate에서 배지를 조심스럽게 제거한 후 24 well plate 기준 Firming buffer 0.5~1 mL을 넣어 준다.
- ② 4°C (또는 on-ice)에서 5분간 반응시킨다.
- ③ Firming buffer를 완전히 제거하고, 세포 배양 배지를 이용하여 부드럽게 세척해 준다.
- ④ 추가 배양이 필요할 경우 적당량의 세포 배양 배지를 첨가하여 배양한다.

▶ Notice

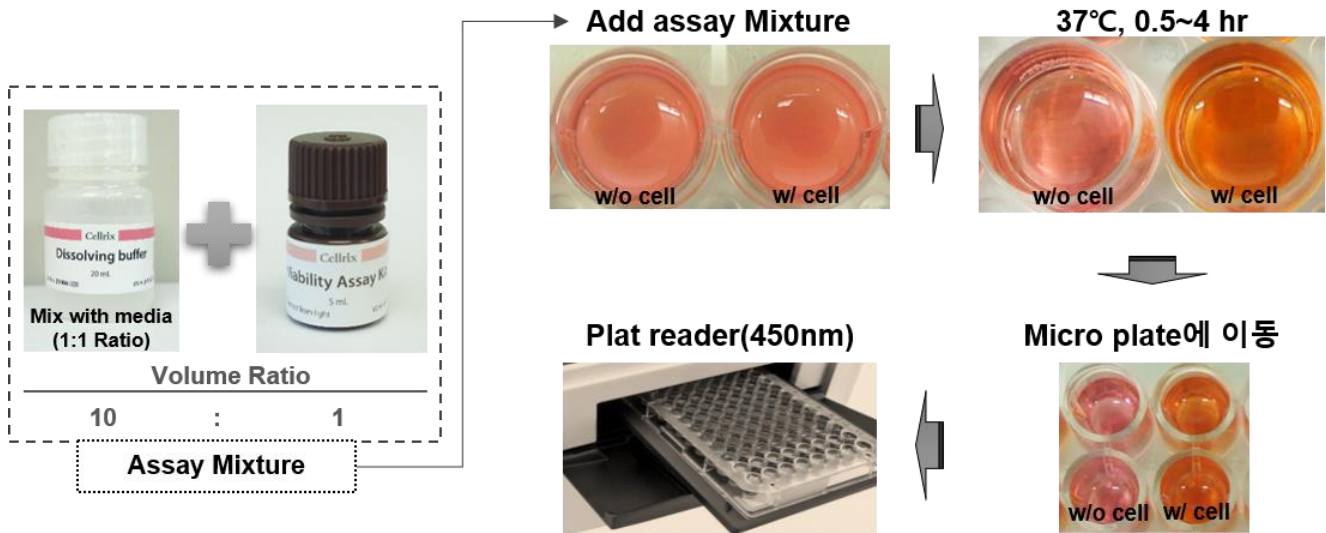
- ◆ 실험 목적에 따라 사용되는 세포의 수는 다르지만, 보통 1×10^6 cells/mL(Bio-Gel) 이상 사용 권장
- ◆ 세포 현탁용 배지의 양에 따라 Bio-gel의 stiffness 조절이 가능 (ex. Bio-Gel을 1/2로 dilution하여 사용하고자 한다면,
- ◆ 세포를 배지 500 μ L에 현탁 후 Bio-Gel 500 μ L를 첨가하여 혼합하여 사용)
- ◆ 사용 후 남은 Bio-Gel은 4°C 보관 권장
- ◆ Firming buffer는 Dilution된 Bio-Gel을 이용하거나, 1주일 이상 장기간 3차원 배양 시 cell viability에는 영향을 주지 않고 배양체의 물성을 강화해주어 형상 변형을 방지하는 제품임 (B1005-050)
- ◆ 배양 후 추가 분석 시 형태 유지를 해야 하는 경우 Firming buffer 처리하면 핸들링 용이성을 높일 수 있음
- ◆ Firming buffer를 4°C 상태로 준비하여 사용하면 더욱 효과적이며, 2~3일 마다 배지 교환 시 Firming buffer 처리 권장

➤ 2nd 겔화 조건 (24well plate 기준) 예시

	<i>Biogel (μL)</i>	<i>Gelation time (min)</i>
<i>24well Culture Plate (1.9cm²)</i>	100	10
	200	20
	300	30
	400	40

◆ Cellrix® 3D Culture System - BioCoat 를 이용한 삼차원 배양 후 다양한 세포 분석방법

▶ Viability assay (Matrix gel method & Matrix coating method)

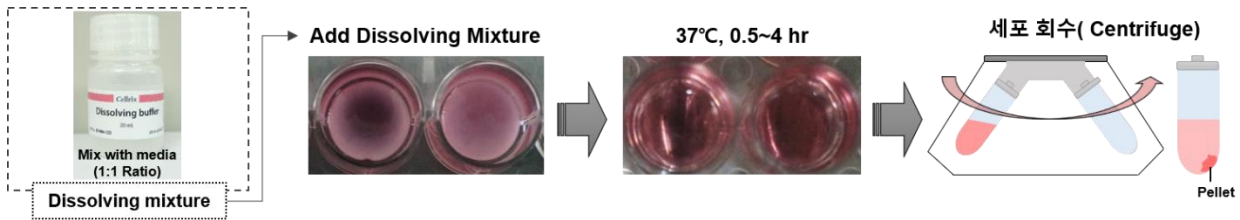


- ① Dissolving Solution과 Media를 37°C에서 예열하여 준비한다.
- ② 예열된 Dissolving Solution 과 Media를 1:1로 필요한 양만큼 섞어준다.
- ③ 준비된 ②번 용액에 Viability kit solution 을 1/10 용량으로 섞어 반응 시약(Assay Mixture)을 준비한다.
- ④ 세포가 배양된 Biogel이 담긴 well에 배지를 완전히 제거한 후 적정량의 반응 시약을 첨가해준다.
- ⑤ Incubator (e.g., at 37°C, 5% CO₂)에서 0.5 ~ 4hr 동안 반응시킨다.
- ⑥ 반응이 완료된 용액을 100~200 uL 취하여 micro plate에 옮겨 담고 1분 이내로 부드럽게 shaking 해준 후 Plate reader를 이용하여 450nm 에서 흡광도를 측정한다.

➤ Notice -Viability assay kit (B1007-500)

- ◆ 반응시약 처리전 용액이 well에 남아있을 경우 흡광도 값에 영향을 줄 수 있습니다.
- ◆ Viability kit은 0~4°C 냉장 보관하며, 제조일로부터 1년간 활성의 변화 없이 사용가능합니다. -20°C 보관 시 2년 이상 사용이 가능하나 냉동-해동 반복 시 제품의 활성이 떨어지고 background가 증가할 수 있습니다.

▶ Cell recovery methods



- ① Dissolving Solution과 Media를 37°C에서 예열하여 준비한다.
- ② 예열된 Dissolving Solution과 Media를 1:1로 필요한 양만큼 섞어 Dissolving Mixture를 준비한다.
- ③ 세포를 회수할 well의 media를 제거하고 3번 wash해 준다.
- ④ Wash 후 well에 적정량의 반응 시약을 첨가해준다.
- ⑤ Incubator (e.g., at 37°C, 5% CO₂)에서 0.5 ~ 4hr 동안 반응시킨다.
- ⑥ 반응이 완료된 용액을 tube에 회수하여 원심분리한 후 PBS를 이용하여 2번 wash하여 세포회수를 완료한다.
- ⑦ 회수된 세포로 분석을 진행한다.

➤ Notice – Cell recovery method

- ◆ Viability kit (B1007-500)은 0~4°C 냉장 보관하며, 제조일로부터 1년간 활성의 변화 없이 사용 가능합니다. -20°C 보관 시 2년 이상 사용이 가능하나 냉동-해동 반복 시 제품의 활성이 떨어지고 background가 증가할 수 있습니다.

➤ Dissolving 조건 (24well plate 기준) 예시

	공통		Viability 측정 시	세포 Recovery 시
	Biogel (μL)	Treat total volume (uL) (DP + Media)	VA (uL)	Dissolving time (min)
24well Culture Plate (1.9cm ²)	100	200	20	30
	200	400	40	60
	300	600	60	100
	400	800	80	150

* DP : Dissolving plus
* VA : Viability assay kit

➤ Notice

- ◆ Biogel의 표면적 및 부피에 따른 용해시간에 차이가 있을 수 있습니다.
- ◆ Dissolving을 처리해도 세포독성에는 영향을 주지 않습니다.
- ◆ 적정반응시간 후에도 녹지 않고 투명하게 남아있는 Biogel의 경우 Pipetting으로 풀어주면 세포회수에 보다 편리합니다.