

Biozellen®3D 细胞培养基质胶套装

Catalog No. B-P-00002-2、B-P-00002-4、B-P-00002-10

Specification 2ml-kit、4ml-kit、10ml-kit

Storage 2-8°C保存、保存两年

一、产品描述

Biozellen®3D 细胞培养基质胶套装包含整套基质胶、胶体固定液、胶体溶解液，可应用到 3D 细胞培养与微环境应用等；本试剂盒操作便利且可调控基质胶硬度进行多种细胞培养测试；植物胶体可快速形成水凝胶，请操作前详细阅读此使用指南。

(Biozellen®3D 细胞培养基质胶套装为植物来源，无动物成分)

二、应用

- 3D 细胞球体培养试验
- 小鼠皮下成瘤
- 适用于 3D 细胞药物筛选平台
- 细胞生长和分化
- 代谢/毒理学研究

三、样本类型

- 肿瘤细胞系、小鼠组织

四、试剂盒组分

		B-P-00002-2、B-P-00002-4、B-P-00002-10 (对应数量和内容)	
货号.	Components	Amount	Content
B-P-00002-A	A 基质胶 (2X)	4、8、20	0.5mL / tube
B-P-00002-C	C 缓冲溶液 (10X)	1、2、1	1*10ml、2*10ml、1*50 mL / BT
B-P-00002-D	D 缓冲溶液 (10X)	1、2、1	1*10ml、2*10ml、1*50 mL / BT

五、3D 细胞球体培养试验步骤：**A、试剂制备**

- 1、A 基质胶：将 A 基质胶溶于 37°C 水浴槽回温 10 分钟，确认完全融解。
- 2、C 缓冲溶液(1X)制备：使用前将 10X C 缓冲溶液用冰的无细胞培养液(例如：无血清 DMEM、opt-MEM)制备成 1X C 缓冲溶液。(不要用 PBS 稀释 C 缓冲液)。
- 3、D 缓冲溶液(1X)制备：使用前用冷的 1x PBS 稀释 10X D 缓冲溶液至 1X D 缓冲溶液。

B、Biozellen®3D 细胞培养基质胶的制备

全部步骤需要在无菌环境内操作，操作步骤如下：

- 1、将 24 孔培养板放置于冰上预冷半小时。
- 2、细胞计数后取 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 细胞与 0.5 毫升 37°C 细胞培养基均匀混合，并与 0.5 毫升 37°C A 胶按照 1:1 等比例均匀混合，最终细胞密度 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL。
- 注：请选择适当的培养溶液与条件进行试验。
- 3、取 20-40 微升步骤 2 的混合液滴于步骤 1 预冷的培养板上，胶体将于 5 分钟内成胶。注：测试胶体是否成胶，可用微量吸管尖温和的触碰胶体表面进行确认。
- 4、待胶体成胶后，添加 1 毫升冰的 1X C 缓冲溶液，并盖过步骤 3 的胶溶液，固定 15 分钟。
- 5、待 15 分钟固定后，小心的吸取 C 缓冲溶液并替换为适合此细胞生长之培养基溶液。

6、将含有细胞的胶于 37°C 二氧化碳培养箱内进行 7~14 天的培养，并观察细胞球体的形成，按正常培养基更换频率进行更换操作。

C、溶胶与收集细胞球体准备程序

- 1、小心的将培养基吸取移除，并用 1X PBS 进行清洗。
- 2、小心的将 1X PBS 吸取移除，并添加 1 毫升冰的 D 缓冲溶液，盖过胶滴于室温反应 5 分钟。
- 3、温和的用 1 毫升移液管吸取，直到胶滴完全溶解。
- 4、将含有细胞球体的溶液吸入 1.5 毫升离心管，用 1000 rpm 的转速离心 10 分钟，移除上清液体并收集细胞球体做分析。

D、收集单细胞准备程序

在分离单细胞前，先按上述溶胶与收集细胞球体准备程序进行操作

- 1、添加 trypsin-EDTA 并与收集的细胞球体于 37°C 混合反应。
- 2、用 1 毫升移液管混合，直到细胞体完全分解。
- 3、待细胞球体完全分解，加入 3 倍体积的 1X PBS，并用 1000 转的转速进行离心 10 分钟，并移除上清液体收集沉淀的单细胞做分析。

六、细胞侵袭实验准备程序

- 1、准备 24 孔板的 Transwell(例如:康宁 Transwell insert, 8 μ m PET membrane)及无血清细胞培养液(例如: 无血清 DMEM，用于稀释 A 胶)。
- 2、A 胶 (2X) (货号: B-P-00002-A)与无血清细胞培养液置于 37 °C 水浴槽回温 10 分钟，并确认胶体完全融解。
- 3、用 37 °C 已回温的无血清 DMEM 细胞培养液将 A 胶 (2X) 原液体积稀释 10-40 倍，建议一开始可尝试选用 30 倍。(可依照细胞种类做稀释比例对比实验，找出最适合自己的实验体系的稀释倍率，稀释倍率越高，胶体越软，细胞越容易穿透)
- 4、Transwell 上室底部面积加入 0.1 mL 稀释后的 A 胶稀释液到 Transwell 上室中。
- 5、将步骤 4 在 4 °C 冰箱孵育 2 小时。
- 6、涂层形成后，将多余的稀释液吸出。
- 7、在涂层完成的 Transwell 上室中加入 0.2 mL 无血清的细胞悬浮液，使细胞最终浓度约 7.5×10^4 cells/well。
- 8、在 Transwell 下室中加入 0.8 mL 含 10 % 血清的细胞培养液做为 chemoattractant，吸引细胞进侵袭。(对照组为 Transwell 下室中加入含 0.8ml 无血清的细胞培养液)。
- 9、将细胞培养板在 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱孵育 24-48 小时。
- 10、移除培养液，用 PBS 清洗 2 次。
- 11、用棉签轻轻擦掉上层未迁移的细胞。
- 12、加入 1 ml 100 % 甲醇室温固定 30 分钟,再以 PBS 清洗 2 次。
- 13、加入 1 ml 0.1 % 结晶紫染液 (0.1 % (g/ml) PBS 结晶紫) 室温染色 20 分钟，再以 PBS 清洗 2 次。
- 14、将 Transwell 移至载玻片上，在显微镜下随机 6-9 个视野观察计算迁移的细胞数。

七、小鼠皮下成瘤实验准备程序

A、细胞房内材料准备、试剂制备及步骤

(1) 材料准备:

1. 冰盒、2. 37 °C 水浴槽、3. C 缓冲溶液(10X)、4. 无血清细胞培养液 (例如: 无血清 DMEM ,DMEM-F12 等，不可用 PBS)、5. A 胶 (2X)、6. 细胞培养液、7. 23-26G 针头、8. 1 mL 针筒、9. 细胞。

(2) 试剂制备:

1、C 缓冲溶液 (0.5 X) 制备：使用 37 °C 水浴回温的无血清细胞培养液（例如：无血清 DMEM 或 DMEM-F12 等，不可用 PBS）稀释 C 缓冲溶液 (10 X) 至 C 缓冲溶液 (0.5 X)，即体积稀释 20 倍。使用前放置 37 度水浴槽。（例如：1 mL C 缓冲溶液 (10 X) + 19 ml 无血清 DMEM；若未使用完毕，可先保存于 4 °C 冰箱，保存一周）

2、A 胶 (1X) 制备：将 A 胶 (2X) (货号:B-P-00002-A) 置于 37 °C 水浴槽回温 10 分钟，确认完全溶解。再将 37 °C 水浴回温的无血清细胞培养液取 0.5 mL，加至 37 °C 已溶解的 0.5 mL A 胶 (2X)，配置成 1 mL 的 A 胶 (1X)。使用前置于 37 度，可降低黏度。（单次使用，勿重复冷冻解冻 A 胶 (1X)）

(3)步骤:

1、取细胞溶液离心后收集细胞沉淀，与 C 缓冲溶液 (0.5 X) 均匀混合使细胞浓度为 3×10^6 cells/mL。

2、A 胶 (1X) 与步骤 1 含 C 缓冲溶液 (0.5 X) 的细胞系悬浮液，按照 2:1 比例均匀混合配置，细胞悬浮液最终浓度为 106 cells/mL。使用前置于 37 °C，可降低黏度。（C 缓冲溶液用于 A 胶凝胶反应，例如 0.5 ml C 缓冲溶液 (0.5 X) 含细胞 加入 1 ml A 胶 (1X) 混合成 1.5 ml 的注射液）

3、选用 23-26 G 的针头（建议选用 24 G）及 1 mL 针筒，抽取 步骤 2 A 胶与 C 缓冲溶液的细胞混合液至所需注射体积（例如：0.2-0.6 mL）。室温 37 °C 至 20 °C 操作抽取。（若抽取时发生塞针状态，可先把针头拔掉，以针筒进行抽取，建议一次抽取配置好所需针筒数量，避免步骤 2 溶液过度凝胶，发生塞针）

4、将抽取好步骤 3 的针筒，带入动物房，若短时间无法施打建议置于冰上。

B、动物房内材料准备及步骤

(1)材料准备:

1. 含 A 胶与 C 缓冲溶液的细胞混合液的针筒、
2. 皮肤消毒剂（例如：酒精）、
3. 手套、
4. 实验小鼠、
5. 麻醉小鼠的试剂

(2)步骤:

1、室温下可直接注射。若是置于冰盒上的针筒，回到室温后，待液化再进行注射。含 A 胶与 C 缓冲溶液的细胞混合液的针筒，以皮下注射方式，注射实验所需的体积至实验鼠（建议皮下注射量为 0.2 mL，实际状况依需求而定）。（针筒放冰上注射阻力会上升，放室温会液化注射阻力小。注射时若因凝胶缘故而阻力变大，需缓慢注射避免针头喷落）

注1：注射体积可依不同实验目的做调整，若为皮下血管生成研究注射体积需至少 0.5 mL 以上。

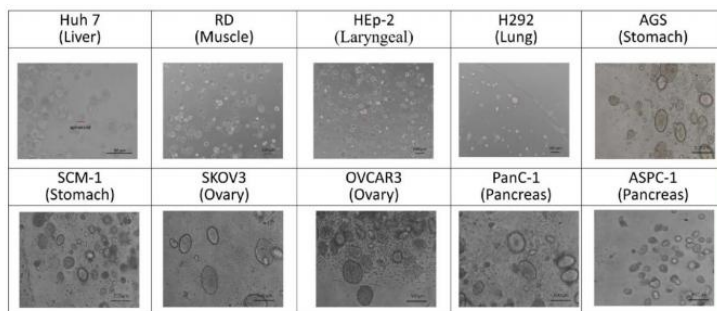
注2：此步骤依实验需求可执行或不执行，若需呈现明显的皮下注射隆起效果，可调整 2. 试剂制备将 C 缓冲溶液 (10 X) 稀释 15 倍，变成 C 缓冲溶液 (0.66 X)，再执行后续成胶实验；提高 C 浓度，可提高胶体硬度。

2、培养一至三周后观察量测接种的肿瘤尺寸。

注3：若为血管生成研究，应注射含 VEGF 及 heparin 的 A 胶，以促进血管生成。约三天后，可摘取含有新血管生成的肿瘤组织。

八、案例分享

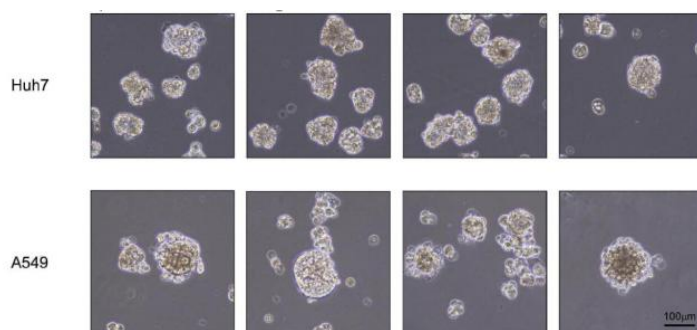
A、形成 3D 肿瘤球体成功案例分享



癌细胞球体的形态。癌细胞系（及其起源组织/形成时间）：

Huh7（肝脏/3天）、RD（肌肉/4天）、HEp-2（喉/4天）、H292（肺/4天）、AGS（胃/3天）、SCM-1（胃/3天）、SKOV3（卵巢/4天）、OVCAR3（卵巢/4天）、PanC-1（胰腺/4天）、ASPC-1（胰腺/5天）。

B、Biozellen 基质胶被溶解后分离的完整 3D 细胞结构照片



培养后的 3D 细胞球体，在 Biozellen 基质胶被试剂盒里面的 D Buffer 溶解分离后仍然可以得到完整的 3D 细胞结构

仅供研究使用