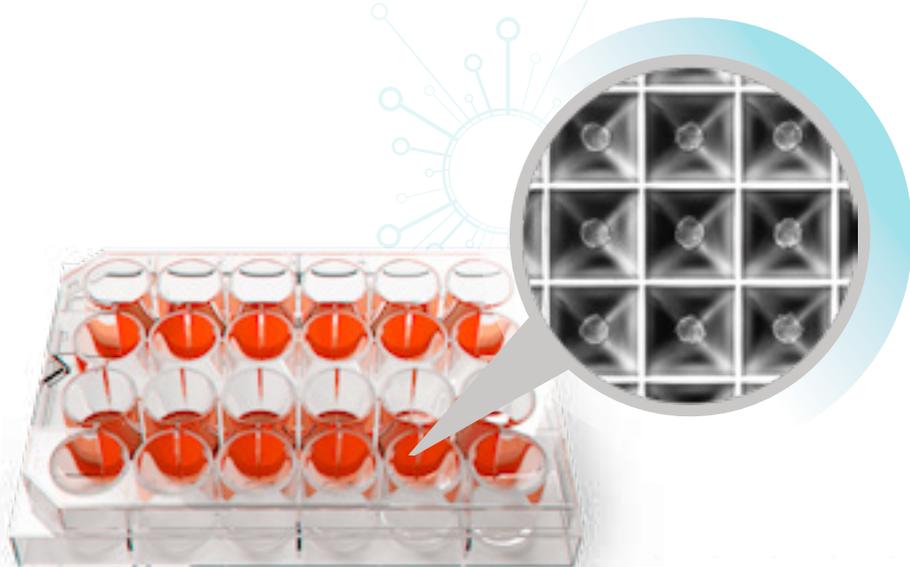


SPHERICALPLATE 5D®

Ecosistema per la medicina rigenerativa



- Piattaforma per la formazione di sferoidi facile da usare
- Fornisce sferoidi standardizzati e di grandezza uniforme
- Upscaling conveniente senza perdita di qualità degli sferoidi

1 Sphericalplate 5D®, 12 pozzetti,
750 micro-pozzetti ognuno = 9000 sferoidi

▶ TURN PIPETTING INTO PUBLISHING

Procedura operativa standard per la Sphericalplate 5D[®]

Semina cellulare iniziale

- 1 Prima di iniziare con la semina cellulare, bagnare i pozzetti funzionalizzati (micro-pozzetti) della Sphericalplate 5D[®] usando 1 ml di mezzo di risciacquo. Il fluido di risciacquo può essere un mezzo di coltura con o senza aggiunta di siero, o puro PBS. Evitare l'asciugatura dei micro-pozzetti.

Nota: Grazie al rivestimento applicato, il mezzo di solito scorre in modo regolare e ovunque e le bolle d'aria vengono rilasciate da sole. In base al mezzo usato, alcune bolle d'aria potrebbero rimanere all'interno dei micro-pozzetti. In tal caso, di solito, si rilasciano dando dei colpi leggeri alla Sphericalplate 5D[®] o centrifugando a 1000 x g per 1 minuto. È consigliata un'ispezione visiva tramite microscopia in campo chiaro per assicurarsi che non siano rimaste delle bolle intrappolate all'interno dei micro-pozzetti.

- 2 Calcolare il numero di cellule desiderato per micro-pozzetto e risospendere le cellule considerando che verranno seminate in 0,5 ml di mezzo per pozzetto. Inizialmente riempire il pozzetto con 0,5 ml di mezzo privo di cellule. Poi aggiungere la sospensione cellulare in altri 0,5 ml di mezzo, per un totale di 1 ml per pozzetto. Visto che le cellule viaggiano per gravità dentro ai micro-pozzetti, assicurarsi di generare una sospensione cellulare distribuita uniformemente in un tempo breve. Più si mescola bene la sospensione cellulare, più gli sferoidi saranno regolari.

Nota: Un pozzetto funzionalizzato della Sphericalplate 5D[®] contiene 750 micro-pozzetti. La piastra permette una grande varietà di sferoidi di grandezze differenti e standardizzati. In media, per far sì che uno sferoide raggiunga i 100 µm di diametro, sono necessarie 150-600 cellule per micro-pozzetto. Per cellule a crescita rapida si consiglia di seminare meno cellule, ad es. 40 cellule per micro-pozzetto. Per creare sferoidi di grandi dimensioni, è possibile caricare una grande quantità di cellule per micro-pozzetto, ad es. 1500 cellule per micro-pozzetto.

Per ottenere una sospensione unicellulare uniforme senza aggregazione di cellule, è consigliato l'uso di un filtro cellulare (ad es. 70 µm) prima della semina. Le cellule tumorali, ad esempio, si raggruppano meno se non vengono agitate colpendo o scuotendo il pallone mentre si aspetta il distacco (ad es. durante la tripsinizzazione).

- 3 Dopo la semina, incubare conformemente al protocollo standard appropriato. Non è necessaria un'ulteriore centrifugazione.

Cambio del mezzo

- 4 Dopo che è avvenuta la formazione degli sferoidi, aspirare attentamente il soprannatante posizionando la pipetta direttamente al di sotto della superficie del mezzo (lontano dagli sferoidi) per evitare turbolenze. L'altezza del micro-pozzetto è stata pensata per trattenere gli sferoidi durante il cambio del mezzo, ma bisognerebbe fare attenzione a non dislocarli.

Nota: Il pipettaggio deve essere molto lento, altrimenti si potrebbe creare un'onda d'urto che potrebbe spingere gli sferoidi fuori dal loro micro-pozzetto originale e dislocarli da un micro-pozzetto all'altro. Questo dovrebbe essere monitorato tramite microscopio.

Raccolta di sferoidi

- 5 Inclinare la piastra di 20 o 30 gradi prima di entrare nel pozzetto con la pipetta. Spurgare il pozzetto da cima a fondo e raccogliere tutto il soprannatante contenente gli sferoidi mettendolo nel contenitore apposito per ulteriore analisi. In caso di ulteriore coltivazione degli sferoidi all'interno della piastra, evitare di inclinare la piastra e procedere direttamente con la spurgatura. Si ricorda che ci potrebbe essere una piccola perdita nella quantità del raccolto, se necessario il pozzetto può essere risciacquato ulteriormente con del mezzo per raccogliere gli sferoidi rimasti.

Varie

Specificazione della piastra: La Sphericalplate 5D® è una piastra a 24 pozzetti. I pozzetti da A1 a A6 e da C1 a C6 (12 pozzetti in totale) contengono 750 micro-pozzetti ciascuno. Una piastra contiene 9000 micro-pozzetti standardizzati in totale. Le file B1-B6 e D1-D6 possono essere usate per la coltivazione delle colture cellulari 2D corrispondenti.

Condizioni di coltura: Le condizioni di coltura delle tue specifiche cellule all'interno della Sphericalplate 5D® devono essere determinate su base individuale. Ad esempio, la tensione dell'ossigeno all'interno del mezzo dipende dall'altezza del mezzo. La grandezza degli sferoidi può raggiungere dimensioni critiche per quanto riguarda la tensione dell'ossigeno nel nucleo degli sferoidi. È quindi importante adattare la quantità del mezzo al metabolismo della tua cellula. Un volume finale di 1 ml per pozzetto è un suggerimento di partenza.

Coltivazione a lungo termine: In base al processo d'incubazione (incl. umidità, volume e frequenza delle ispezioni al microscopio) può occorrere un'evaporazione su tutta la piastra nella coltivazione a lungo termine. In tal caso si consiglia di incorporare un mezzo tampone contro l'evaporazione (ad es. PBS sterile) usando i pozzetti esterni non funzionalizzati (B1-B6 and D1-D6).

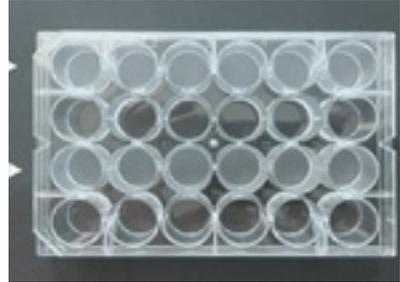


Procedura operativa standard per la Sphericalplate 5D® in breve

► Fase 1

Preparazione

Prepara pozzetto
funzionalizzato con
0,5 ml di mezzo



► Fase 2

Aggiunta di cellule

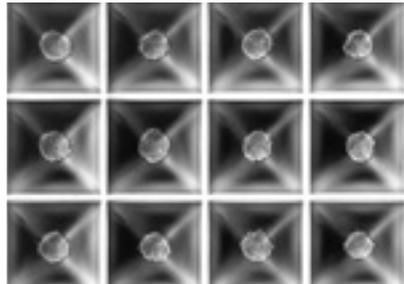
Aggiungi 0,5 ml
di sospensione
monocellulare



► Fase 3

Coltivazione

Incubatore



01-006-003-33-0

► FACILE DA USARE

Kugelmeiers Ltd.

www.kugelmeiers.com

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

www.heidolph.com

