

BIOFLOAT™

Zellkulturoberfläche für die Sphäroidkultur

In vielen Bereichen der biomedizinischen Forschung sind in vitro-Modelle unerlässlich. Die herkömmlichste Form bildet die zweidimensionale Zellkultur. Bei der Übertragung der Ergebnisse auf einen gesamten Organismus treten nicht selten Diskrepanzen auf. Ziel der dreidimensionalen Zellkultur ist es daher diese Lücke zwischen der in vitro- und in vivo-Situation zu schließen. Weiterhin kann die Verwendung von dreidimensionalen Zellmodellen dabei helfen die erschwerte Übertragbarkeit von experimentellen Ergebnissen zwischen verschiedenen Spezies zu umgehen und damit parallel Tierversuche zu reduzieren.

Als eine einfache Variante der 3D-Zellkultur bietet Sphäroidkultur die Möglichkeit eines verlässlichen Modells für die biomedizinische Forschung. Durch die dreidimensionale Struktur können die Zellen so in vitro ausgeprägte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte bilden und es kann somit die Umgebung im Organismus (in vivo) nachgeahmt werden.

Im nachfolgenden Protokoll finden Sie empfohlene Arbeitsschritte, die Sie bei der Etablierung von Sphäroidkulturen unterstützen sollen. Die genauen Parameter, wie Arbeitsvolumen und Zelldichte für die Aussaat, sind abhängig von der verwendeten Zelllinie und geplanten Analysemethode. Deshalb empfiehlt sich eine sorgfältige Optimierung der Wachstums- und Analysebedingungen vorzunehmen.

Protokoll für die Sphäroidkultivierung

Die Zelldichte bei der Aussaat ist vom Zelltyp, der Dauer der Sphäroidkultivierung sowie der angestrebten Sphäroidgröße zum Analysezeitpunkt abhängig. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren bewegt sich das empfohlene Arbeitsvolumen für die 96-Well-Platte zwischen 100 und 200 µl pro Well.

- Lösen Sie die für die Sphäroidkultur vorgesehenen Zellen mit Ihrer gewohnten Methode (z.B. Trypsin, EDTA) von der Kultivierungsoberfläche ab. Dabei ist darauf zu achten, dass nach dem Ablösen eine Einzelzellsuspension als Ausgangsmaterial für die Sphäroidkultur vorliegt. Falls nötig, empfiehlt sich hier die Verwendung eines Zellsiebes (Art.-Nr. 83.3945.XXX) um Zellklumpen zu vermeiden.
- Passen Sie die Zellkonzentration ihrer Einzelzellsuspension an die geplante Zelldichte für die Aussaat an. Der empfohlene Bereich für die 96-Well-Platte liegt zwischen 1.000 und 10.000 Zellen / Well (vgl. Abb. 1).
- Verteilen Sie die Einzelzellsuspension in den Wells der BIOFLOAT™ 96-Well-Zellkulturplatte (empfohlenes Arbeitsvolumen: 100-200 µl / Well). Ein Zentrifugationsschritt wird nicht empfohlen. Beachten Sie, dass eine Zentrifugation die Sphäroidbildung mithilfe von BIOFLOAT™ sogar negativ beeinflussen kann.
- Inkubieren Sie die Zellen im Inkubator (37°C und 5% CO₂ für die meisten Säugetierzellen). Die Sphäroidbildung in der SARSTEDT BIOFLOAT™ Zellkulturplatte erfolgt je nach Zelltyp/-linie in den meisten Fällen innerhalb von 2 bis 24 Stunden. Kontrollieren Sie Ihre Sphäroide täglich mikroskopisch, um Bildung und Wachstum zu überprüfen.
- Je nach Kultivierungsdauer und / oder Zelltyp/-linie muss kontinuierliche Nährstoffversorgung der Sphäroide durch (teilweises) Wechseln des Nährmediums gewährleistet werden. Um die Sphäroide nicht zu beschädigen, sollte das Abnehmen und Hinzufügen des Mediums am Rand des Wells erfolgen. Außerdem empfiehlt es sich, ein geringes Restvolumen des alten Mediums von ca. 10 bis 20 µl im Well zu belassen. Geben Sie anschließend frisches Nährmedium bis zum gewünschten Arbeitsvolumen hinzu. Durch den Mediumwechsel oder eventuelles Berühren der Oberfläche mit der Pipettenspitze wird die anti-adhäsive Eigenschaft der BIOFLOAT™ Oberfläche nicht beeinträchtigt.

Sphäroidkulturen sind ein weit verbreitetes Kultursystem in der präklinischen Phase der Arzneimittelforschung, bei toxikologischen Studien sowie in der Krebs- und Stammzellforschung. Hierbei verbessern sie die Effizienz und die Zuverlässigkeit der präklinischen Zellmodelle.

Die SARSTEDT BIOFLOAT™ Zellkulturoberfläche bietet ihnen die Möglichkeit schnell und reproduzierbar Sphäroide herzustellen. Dabei wird in der BIOFLOAT™ 96-Well-Zellkulturplatte üblicherweise genau ein besonders gleichmäßiges, rundes Sphäroid pro Well gebildet. Daher ist BIOFLOAT™ hervorragend für Hoch-Durchsatz-Analysen geeignet, bei denen es besonders darauf ankommt, genau ein symmetrisches Sphäroid pro Well zu untersuchen. Um dies zu erleichtern, entspricht die SARSTEDT BIOFLOAT™ 96-Well-Zellkulturplatte standardisierten Abmessungen (ANSI/SLAS Standards) und ist damit geeignet für automatisierte Prozesse.



Beispiele für Sphäroidkultur in SARSTEDT BIOFLOAT™ Zellkulturplatten

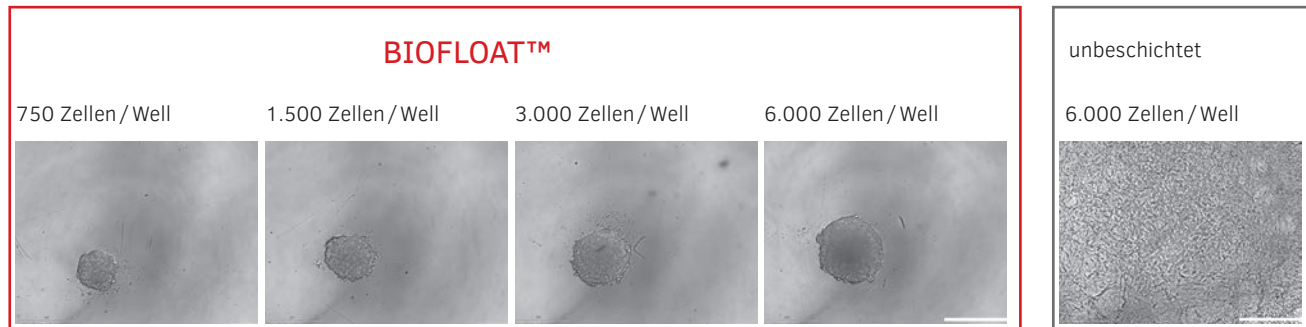


Abb. 1: Zellen einer Fibroblastenzelllinie (3T3) wurden in verschiedenen Zellzahlen auf der BIOFLOAT™ Zellkulturplatte ausgesät. Als Kontrolle diente eine unbeschichtete Platte. Die Ergebnisse wurden nach drei Tagen mikroskopisch dokumentiert. Es ist deutlich zu sehen, dass durch BIOFLOAT™ erfolgreich Sphäroide gebildet werden. Außerdem lässt sich die Größe des Sphäroids durch die ausgesäte Zellzahl pro Well beeinflussen. Auf der unbeschichteten Oberfläche hingegen können die Fibroblasten an der Oberfläche der Platte adhären und bilden keine Sphäroide. Maßstabsbalken = 400 µm.

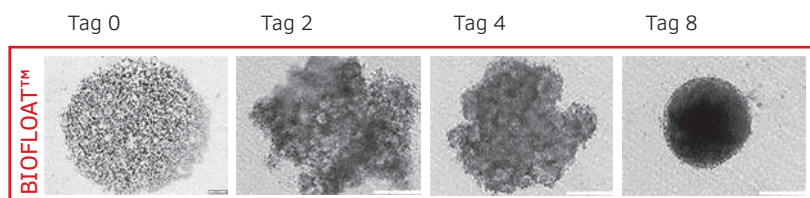


Abb. 2: Pro Well wurden 100 µl einer Suspension primärer humaner Hepatozyten mit einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml ausgesät (entspricht 2.500 Zellen/Well). Nach Sphäroidformierung wurden je 50 µl Medium alle 48–72 h ausgetauscht. Maßstabsbalken = 200 µm.

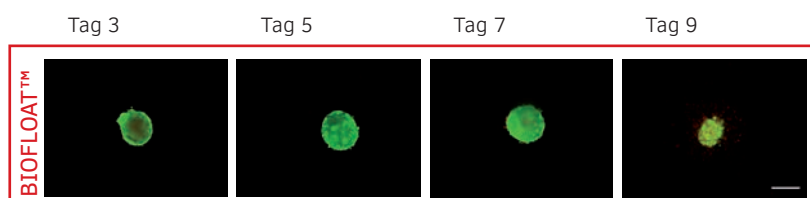


Abb. 3: Immortalisierte humane Astrozyten wurden in einer Konzentration von 10.000 Zellen/Well ausgesät. Anschließend wurde die Zellviabilität an mehreren Tagen mithilfe einer Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Hierbei wurden lebende Zellen mit Calcein (grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (rot) angefärbt. Maßstabsbalken = 200 µm.

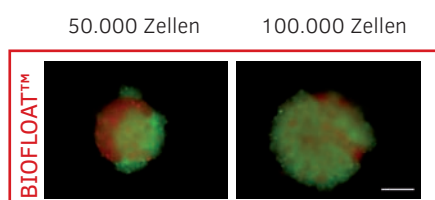


Abb. 4: Mit BIOFLOAT™ generierte Kokultursphäroide aus Osteoblasten (rot) und HUVEC-Zellen (grün). Maßstabsbalken = 250 µm.

BIOFLOAT™

Cell culture surface for spheroid culture

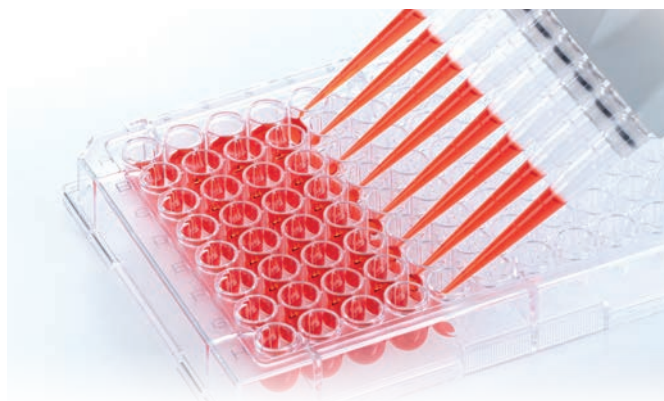
In many areas of biomedical research, in vitro models are indispensable. The most conventional form is the two-dimensional cell culture. However, discrepancies often occur in the transfer of the results to an entire organism. The aim of three-dimensional cell culture is therefore to close this gap between the in vitro and in vivo situation. Moreover, the use of three dimensional cell models can help to overcome hurdles in the transferability of experimental results to different species and thereby reduce animal experiments.

Spheroid culture, as a simple variant of 3D cell culture, offers a reliable in vitro model for biomedical research. Given the three-dimensional structure, the establishment of pronounced cell-cell and cell-matrix interactions is facilitated – realistically imitating the in vivo microenvironment.

Spheroid cultures are a widely used culture system in drug development, toxicological studies as well as cancer and stem cell research, thereby improving efficiency and reliability in these phases of preclinical research.

Our SARSTEDT BIOFLOAT™ cell culture surface offers fast and highly reproducible generation of perfectly round-shaped spheroids. Formation of a single, symmetrical spheroid per well of our SARSTEDT BIOFLOAT™ 96-well plate qualifies BIOFLOAT™ as an excellent choice for high throughput analyses. Furthermore, the SARSTEDT BIOFLOAT™ 96-well plate satisfies the standardized dimensions (ANSI/SLAS standards) and is therefore suitable for automated processes.

The following protocol describes exemplary working steps to support the establishment of spheroid culture. Exact growth medium volume and cell seeding density depend on cell line/type and the type of downstream analyses. Therefore, careful optimization of growth and analysis conditions is recommended.



Protocol for spheroid generation and culture

Cell seeding density depends on cell line / type, duration of spheroid cultivation and desired spheroid dimensions at the time of analysis. Taking these parameters into account, the recommended working volume per well of a 96-well plate ranges from 100 to 200 µl.

- Detach your cells from the culturing surface using your regular protocol (trypsinization, EDTA etc.). To seed cells for spheroid culture, a single cell suspension is recommended. If necessary, cell aggregates may be removed by straining the cell suspension through a cell strainer (83.3945.XXX).
- Adjust the cell concentration according to the desired seeding density. The recommended density ranges from 1,000 to 10,000 cells per well (see Fig. 1).
- Distribute the cell suspension into the wells of the BIOFLOAT™ 96-well plate (recommended working volume: 100 – 200 µl). A centrifugation step is not recommended. Note that centrifugation may even negatively affect spheroid formation using BIOFLOAT™.
- Incubate the plate in a humidified incubator (37°C and 5% CO₂ for most mammalian cells). For most cell types, spheroid formation in the SARSTEDT BIOFLOAT™ plate is accomplished within 2 to 24 hours. Carefully monitor spheroid formation and growth under the microscope on a daily basis.
- Depending on duration of spheroid cultivation and cell line/type, continuous nutrient supply needs to be ensured by (partial) growth medium exchange. Removal or addition of growth medium should be performed at the side of the well to prevent spheroid damage. Furthermore, it is recommended not to remove the complete volume of growth medium, but leave a residual 10 to 20 µl in the well. The anti-adhesive properties of the BIOFLOAT™ surface are not damaged by medium exchanges or accidental contact of the surface with the pipet tip.

Examples of spheroid cultures in SARSTEDT BIOFLOAT™ cell culture plates

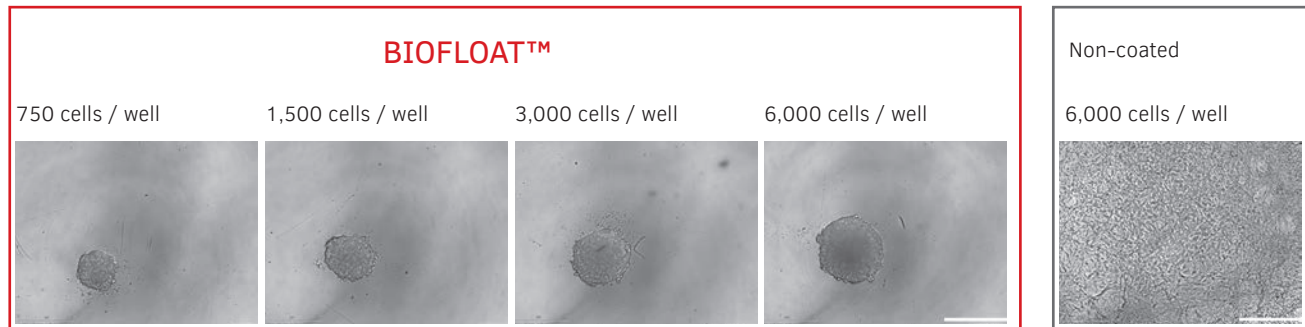


Fig. 1: 3T3 fibroblasts were seeded onto BIOFLOAT™ cell culture plates at different densities. As a control, a non-coated plate was used. After three days, successful spheroid formation in the BIOFLOAT™-coated plate could be confirmed by microscopic imaging, whereas the fibroblasts adhered to the non-coated control plate and failed to form spheroids. Furthermore, it could be demonstrated that keeping culturing time constant, the spheroid size strongly depends on the initial seeding density. Scale bar = 400 µm.

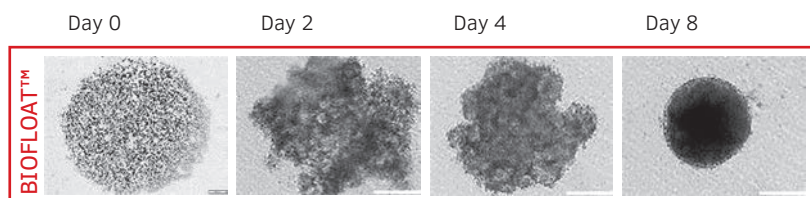


Fig. 2: Primary hepatocytes (*C. lupus familiaris*) were seeded onto BIOFLOAT™ 96-well plates (2,500 cells per well) and microscopically monitored for spheroid formation over the course of eight days. After spheroid formation, 50 µl of growth medium was exchanged every 48 - 72 h. Scale bar = 200 µm.

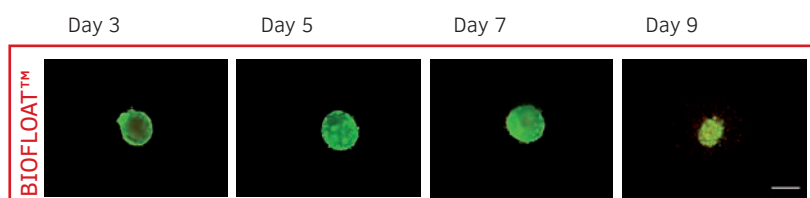


Fig. 3: Immortalized human astrocytes were seeded onto BIOFLOAT™ 96-well plates at a density of 10,000 cells / well. Subsequently, cell viability was determined over several days using fluorescent staining. Viable cells were labelled with calcein (green) and dead cells with propidium iodide (red). Scale bar = 200 µm.

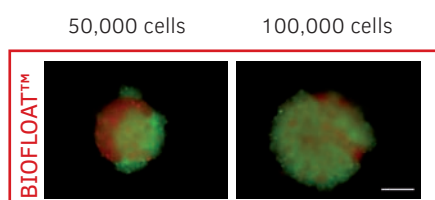


Fig. 4: BIOFLOAT™-induced co-culture spheroids containing osteoblasts (red) and HUVEC cells (green). Scale bar = 250 µm.