

【基质胶应用一】HUVEC 血管形成实验

一.实验材料

细胞：HUVEC

培养基：ECM 完全培养基、DMEM 培养基

耗材：预冷枪头、预冷 96 孔板和预冷 1.5mL 离心管

其他：胰酶，PBS，Matrigel (ABW 货号：082704，金牌基质胶)

二. 实验步骤

A. 准备基质胶

- 1.实验前一天将 Matrigel 置于冰盒中，放入 4°C 冰箱，使胶能过夜缓慢融化。（注意：同样要准备一些 4°C 预冷的枪头用于吸取 Matrigel）
- 2.开始实验前，将 Matrigel 始终保持放在冰盒中。
- 3.冰上操作。Matrigel 用预冷枪头混匀。

B. 铺基质胶

由于每一批 ABW[®] Matrigel 基底膜基质浓度会有差异，建议使用前做 1:1 及 2:1 的稀释，操作如下：

1.提前将 96 孔板和枪头预冷，准备两个预冷 1.5mL 离心管用于稀释 Matrigel。按照想要的比例，稀释完 Matrigel 后，于每孔中加入 50 μ L Matrigel，避免产生气泡。在 37°C 培养箱中放置 45min-1h。（注意枪头要垂直于内孔的正上方加入 Matrigel，防止有 Matrigel 流经孔壁而留下残留胶。若是孔的底部没有铺满胶，可以晃动一下 96 孔板，使底部铺胶均匀）

例如：铺原胶、稀释 1 倍、稀释 0.5 倍时，用 DMEM 稀释

	ABW [®] Matrigel 基底膜基质
原胶	50 μ L 原胶
1: 1	25 μ L 原胶+25 μ L DMEM
1: 2	33.3 μ L 原胶+16.7 μ L DMEM

C. 铺细胞

- 1.当 HUVEC 细胞长满 70~80%时，消化下来，并用含 10%FBS 的 DMEM 重悬，计数，使

每孔加入 50 μ L 重悬液，浓度为 30000 个细胞/孔，重复三孔。（注意保持枪头垂直在孔的上方，不要接触到下面的凝胶。）

2.37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育，四小时后可见血管形成。

D. 采集图像

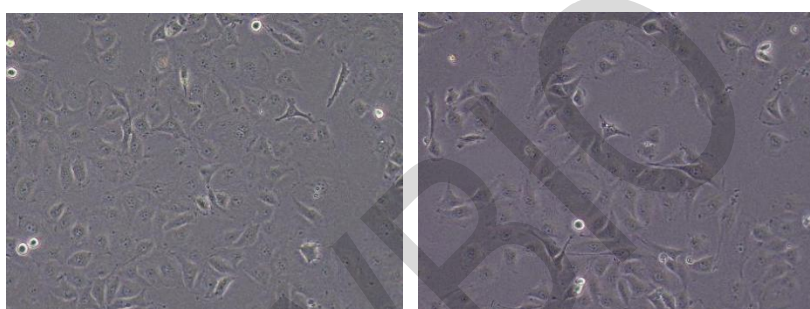


图 1: HUVEC 正常细胞

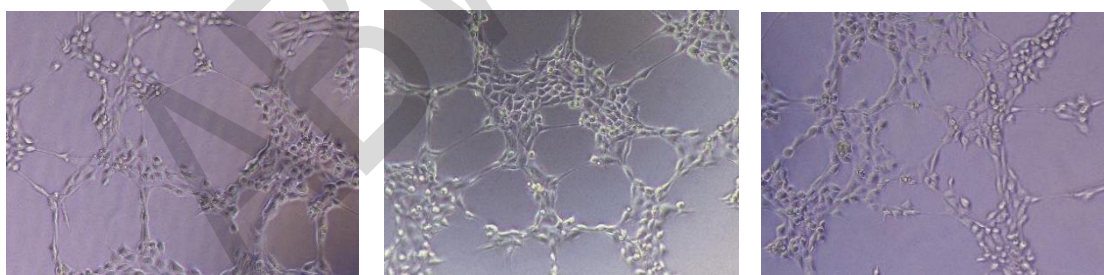


图 2. HUVEC 血管形成四小时图片

常见问题及解答：

1. 稀释 ABW[®] Matrigel 基底膜基质用什么稀释？

用不加双抗、不加胎牛血清的高糖的 DMEM 培养基稀释。

2. 怎么样铺胶均匀？

枪头要垂直于内孔的正上方加入 Matrigel，防止有 Matrigel 流经孔壁而留下残留胶。若是孔的底部没有铺满胶，可以晃动一下 96 孔板，使底部铺胶均匀，若还是没有均匀，可用枪头稍微搅动一下。

3. HUVEC 用什么培养基培养？

用 ECM 专用培养基，配制按照说明书。

4. HUVEC 必须用专用培养基吗？能不能用普通培养基？

用普通培养基的话，还要添加生长因子，常见的有 ECGF/ECGF，ECGF，但价格贵，不如专用培养基来的划算，故推荐使用专用培养基。

5. 进行血管形成实验，应该选用多大浓度的 Matrigel 呢？

康宁认为最低浓度应不低于 10mg/mL，ABW[®] Matrigel 基底膜基质的稀释比例是 6mg/mL 以上。成管效果最好的是 6-8mg/mL。

附件：

1. ABW 基质胶的使用

1. 基质胶颜色的变化可能发生在冷冻或解冻 ABW[®] Matrigel 基底膜基质药瓶的过程中，由于二氧化碳与重碳酸盐缓冲液和酚红的相互作用，颜色会从淡黄色变化到深红色。颜色的变化是正常的，不影响产品功效，在与 5% 的二氧化碳平衡后颜色将消失。

2. 在冰上 4°C 解冻 ABW[®] Matrigel 基底膜基质。一旦解冻，旋转药瓶以确保材料均匀分散。向药瓶的顶端喷洒 70% 乙醇，并在空气中干燥。将产品放置在冰上，处理时请使用无菌操作。利用预冷的移液管、吸头和管分装材料，并立即冷冻。避免反复冻融。

2. 预防措施

ABW[®] Matrigel 基底膜基质在 22°C 到 35°C 将快速凝胶化。请在冰上 4°C 过夜解冻。在使用前请将产品放置在冰上，当准备使用 ABW 基质胶时，请预冷移液管、吸头和管。

3. 包被程序

注意：一旦凝胶化，ABW[®] Matrigel 基底膜基质应该被立即使用。我们推荐至少 6mg/mL 蛋白浓度的 ABW[®] Matrigel 基底膜基质。ABW[®] Matrigel 基底膜基质的浓度是批次特异的，并且以分析证明书为基础。您可以预先检查基质的批次，通过联系 ABW 来预定适合您蛋白浓度的特定批次的 ABW[®] Matrigel 基底膜基质。

按推荐的方法解冻 ABW[®] Matrigel 基底膜基质。使用预冷的移液管，均匀的混合。

将24孔细胞培养板放置在冰上,向每个孔中加入0.289 mL冷冻的ABW[®] Matrigengel 基底膜基质(10 mg/mL)。该量对于覆盖整个生长表面应该是足够的。如果ABW[®] Matrigengel 基底膜基质需要稀释到10 mg/mL,请使用无血清培养基稀释。

在移液管吸取液体加入到每个孔中时,请避免气泡。如果孔中含有气泡,请在4°C预冷的离心机中将培养板离心300xg,10分钟。

在37°C培养30-60分钟。