

使用指南

产品：ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质，5 mL瓶

产品目录号：0827775

背景： 基底膜是一种连续片层的特化的细胞外基质，其被发现与真皮-表皮连接处，整个消化系统、呼吸系统、生殖和泌尿系统的全部管腔-衬里上皮细胞，基底膜也位于内分泌腺和外分泌腺的软细胞组织下。

ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质是一种可溶性的基底膜制剂，这种基质是通过基因编辑技术将多种表达胶原蛋白的基因序列插入到经永生化处理的小鼠子宫肌瘤细胞系中，并在实体肿瘤中抽提出来的¹。ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质的主要成分是层粘连蛋白、胶原蛋白 IV、巢蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖^{2,3}。生长因子、胶原酶、纤溶酶原激活剂和其他不明确的成分也已经被报道存在于ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质中^{4,5}。

干细胞： 从历史观点上说，人类胚胎干(hES)细胞的衍生和培养技术利用了血清和/或小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层⁶。人类胚胎干细胞研究的理想环境由一个专门针对人类胚胎干细胞资格的细胞培养表面和一个无血清的已知成分的培养基组成。

来源： 经基因编辑的小鼠子宫肌瘤细胞

制剂： 达尔伯克改良伊格尔培养基和 50 µg/mL 庆大霉素。ABW[®] Matrigel 高浓度基底膜基质低生长因子适合所有的培养基。

储存： 储存在-20℃ 时是稳定的。通过分装并一次性使用分装物来最小化产品的冻融。在-20℃ 冰箱中储存分装物直到准备使用。请不要储存在无霜冰箱中。请保持产品的冻结。

有效日期： ABW[®] Matrigel 基底膜基质的有效日期是批次特异的，您可以在产品的分析证明书中找到。

警告： 因为ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质在10℃以上会开始凝胶化，所以极其重要的是ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质和所有的进入与ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质接触的培养皿或培养基都应该预冷。在实验的全部过程中请保持ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质处于冰上。

重构和使用： 在ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质小瓶冻融的过程中可能会发生颜色的变化，由于二氧化碳和碳酸氢盐缓冲液以及酚红的作用，颜色会从淡黄色变化到深红色。颜色的变化是正常的，不会影响产品的功效，颜色将会在5%CO₂ 平衡下消失。

请将小瓶淹没在冰中并放置在 4℃ 冰箱里过夜解冻 ABW[®] Matrigel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。一旦ABW[®] Matrigel 基底膜基



质人类胚胎干细胞专用基质被解冻，请涡旋小瓶以确保材料的均匀分散。请将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质全程保持在冰上。请使用无菌技术处理。请将解冻的ABW® Matrigengel基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质放置在无菌的区域，在小瓶的顶部喷洒70% 的乙醇并风干。

使用预冷的移液管轻柔的吸取ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质以确保其均匀性。将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质分装到离心管中，每当ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质堵塞吸头和/或移液管测量不精确时请更换吸头。如果将材料放置在 4℃ 的冰上 24-48 个小时，凝胶化的ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质可能会被重新水化。

ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质可以被用来作薄层凝胶(0.5 mm)，细胞可以接种在其顶部。当作为 1 mm 凝胶层使用时，细胞也可以在ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质的内部培养。大量的稀释将会导致 1 个薄的、非凝胶化的蛋白层。这对于细胞附着是有用的，但是在分化研究中可能不起作用。

使用方法:

包被涂层方法:

ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质可以以几种方式使用。薄层凝胶法适用于在凝胶顶部接种细胞，厚层凝胶法允许您在三维基质内培养细胞，薄层包被法(不凝胶化)给您提供了复杂的蛋白质层，您可以在其上培养细胞。您的选择基于您想要实现的最终结果，无论是细胞生长、附着还是分化。

注意: 在www.abwbio.com网页上发布了具体的应用程序*。ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质产品的蛋白质浓度是批次特异的并提供在分析证明书上。通过计算需要的特定蛋白浓度(mg/mL)获得了稀释ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质产品的一致结果。为了维持凝胶化的一致性，我们推荐不要将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质稀释到少于 3 mg/mL。请使用冰冷的无血清培养基来稀释ABW® Matrigengel基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。通过在冰上移液管上下吸液或涡旋小瓶来混合。

一、薄层凝胶法

- 1.依照推荐的方法解冻ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。使用预冷的移液管，将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质混合至均匀。
- 2.将培养板放置在冰上，以 50 µl/cm² 向生长表面加入ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。
- 3.将培养板放置在 37 °C，30 分钟。
- 4.如果有必要的话，请在使用无血清培养基轻柔漂洗前吸出未结合的材料。请确保移液器的吸头不要



刮擦包被的表面。培养板现在可以使用了。

二、薄层包被法

- 1.依照推荐的方法解冻ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。使用预冷的移液管，将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质混合至均匀。
- 2.使用无血清培养基将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质稀释到需要的浓度。对于您的应用程序，您应该完成以经验为主的研究来确定您的最适包被浓度。
- 3.向被包被的容器中加入稀释的ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。加入的量应该足以容易地覆盖整个生长表面。4 °C放置的已经铺好基质胶的培养板，需要再次进行37 °C过夜孵育，或最低孵育时间不低于1小时，选择最佳效果的处理方式。
- 4.吸出未结合的材料并使用无血清培养基轻柔地漂洗。培养板现在可以使用了。

三、厚层凝胶法

- 1.依照推荐的方法解冻ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。使用预冷的移液管，将ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质混合至均匀。
- 2.将培养板放置在冰上。向ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质中加入细胞并使用预冷的移液管悬浮。以150-200 μ l/cm² 向生长表面加入ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质。
3. 4 °C放置的已经铺好基质胶的培养板，需要再次进行37 °C过夜孵育，或最低孵育时间不低于1小时，具体可根据实际情况选择最佳效果的处理方式。现在可以添加培养基了。细胞也可以培养在这一凝胶的顶部。

细胞复苏：

使用细胞复苏溶液在冰上 7 小时内解聚ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质能够实现将生长在ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质上的细胞最有效地复苏，或者使用中性蛋白酶，考虑到连续培养，中性蛋白酶作为一种金属酶可以分散细胞。

注意事项：

因为ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质在 10°C 以上会开始凝胶化，所以极其重要的是ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质和所有的进入与ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质接触的培养皿或培养基都应该预冷。产品需要放置于冰上，并在 2°C-6°C的冰箱中或者冷室中过夜融化，蛋白浓度高时可能需要更多时间。操作ABW Matrigel matrix时，我们建议使用预冷的移液管、吸头和管子。在实验的全部过程中请保持ABW® Matrigengel 基底膜基质人类胚胎干细胞专用基质处于冰上。



常见问题:

1. ABW® Matrigel 高浓度基底膜基质用于哪些实验?

ABW® Matrigel 高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究, 如高浓度蛋白可促进肿瘤生长。高蛋白浓度同时可使ABW® Matrigel 基底膜基质注射入小鼠皮下后保持完整, 有利于注射的肿瘤细胞和/或血管生成因子保持原位, 便于用于原位分析和/或以后的切除。

2. 如何将ABW® Matrigel 基底膜基质用于3D培养? 怎样制作3D胶? 需要将细胞嵌入到ABW® Matrigel 基底膜基质中吗?

ABW® Matrigel 高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究, 如制备厚层包被用于3D细胞培养。细胞可以嵌入到ABW® Matrigel 基底膜基质中或者接种在ABW® Matrigel 基底膜基质表面(覆盖法)。

3. 使用ABW® Matrigel 基底膜基质时, 需要将移液器吸头和离心管预冷吗?

是的。因为ABW® Matrigel 基底膜基质在高于10°C的条件下即会开始成胶, 我们推荐操作基底膜基质时使用预冷的移液管、吸头和离心管。

4. ABW® Matrigel 基底膜基质会快速聚合吗?

ABW® Matrigel 基底膜基质在 22°C至 35°C时会快速聚合成胶。

5. 什么情况下, 需要使用无酚红ABW® Matrigel 基底膜基质?

对于涉及颜色检测的实验, 推荐使用无酚红ABW® Matrigel 基底膜基质, 如使用荧光染料或 Drabkins 法计数内皮细胞成管实验。对于子宫内膜细胞培养, 也需使用无酚红ABW® Matrigel 基底膜基质。

此外, 酚红和非甾体雌激素结构类似, 有类雌激素效应。在实验动物体内可能具有干扰内分泌和荷尔蒙代谢的能力。

6. 如何从ABW® Matrigel 基底膜基质中收获细胞?

推荐使用中性蛋白酶或细胞回收解决方案来收获培养在ABW® Matrigel 基底膜基质中的细胞。

中性蛋白酶相比胰酶、胶原酶或其他蛋白水解酶能够更温和和有效地获得单细胞悬液, 不会损伤细胞或细胞表面蛋白。对于需要继续接种培养或进行检测的细胞, 使用中性蛋白酶不会产生损伤。此外中性蛋白酶也可以用于组织分离。

对于代谢研究和RNA抽提, 建议在4°C使用细胞回收解决方案进行非酶反应的细胞收获。因为ABW® Matrigel 基底膜基质中含有痕量的RNA, 进行RNA分析时, 应设一个ABW® Matrigel 基底膜基质(不接种细胞)的对照组。

其它从ABW® Matrigel 基底膜基质中收获细胞的方法:

降低温度至4°C-6°C使ABW® Matrigel 基底膜基质解聚, 需要一定的时间并且仅适合一部分应用。

离心以破坏ABW® Matrigel 基底膜基质结构。

7. ABW® Matrigel 基底膜基质包被过的培养皿可以储存多长时间呢？

包被过的培养皿最好当天使用，具体情况取决于实验目的。需要保存的情况下，可在37°C培养箱中最多存放7天。保存时ABW® Matrigel 基底膜基质表面需要使用无血清培养基均匀覆盖，保持湿润。

8. 哪些情况下应该选用薄胶？什么时候用厚胶呢？ 3D培养有哪些应用？

薄胶主要用于辅助细胞贴壁，有利于细胞增殖。如原代细胞培养，需要一层薄薄的蛋白层辅助，就可以选用薄胶；厚胶主要用于3D细胞培养，如大鼠主动脉组织分化为毛细血管样结构（Ring Assay），以及进行细胞侵袭实验等；3D细胞培养实验，主要是用于研究细胞与细胞间的相互作用以及复杂结构，如生物组织等。

9. 进行内皮管形成实验，应该选用多大浓度的 ABW® Matrigel 基底膜基质 呢？

进行该实验，ABW® Matrigel 基底膜基质最低浓度应不低于10mg/mL。

10. 做细胞侵袭实验，需要使用多少ABW® Matrigel 基底膜基质进行包被？

包被24孔通透性支持物，推荐每孔使用0.1 mL (浓度200-300 µg/mL)，ABW® Matrigel 基底膜基质货号为082704。

11. ABW® Matrigel 基底膜基质的最低成胶浓度是多少？

不同的实验目的需要不同的 ABW® Matrigel 基底膜基质浓度，用户应该根据具体的实验需求确定。ABW® Matrigel 基底膜基质最低成胶浓度为 3 mg/mL。稀释时不要简单进行体积倍比稀释，不同批次间的 ABW® Matrigel 基底膜基质浓度有差异，应该根据最终工作浓度 (mg/mL)算出需要加入的稀释液体（如PBS或无血清培养基）的量。用于体内研究的 ABW® Matrigel 基底膜基质，为了避免成胶不完全，最终工作浓度不应低于 4 mg/mL。

12. ABW® Matrigel 基底膜基质胶块在体内可以维持多长时间？

基质胶胶块可以在体内维持至少一周的时间。

13. 怎样稀释ABW® Matrigel 基底膜基质？

使用冰上预冷的无血清培养基或者PH 7.4的PBS。

14. 应该如何对ABW® Matrigel 基底膜基质移液操作？

推荐使用预冷的移液器或者注射器操作，移液管、枪头同样需要预冷。吸液时不要触及瓶子底部；分液时切忌过快、用力过猛。如果使用移液管（Pipets），需要分液5mL时，应该吸取6mL，分液到移液管内仍有1mL时即停止；如果使用自动移液器（Pipetman），按压到第二档位吸液，然后按压到第一档位进行分液。

15. 为什么我的ABW® Matrigel 基底膜基质很粘稠？

基质胶的蛋白浓度越高，胶体越粘稠。如果浓度高于13.0 mg/mL，基质胶会显得非常厚重。ABW® Matrigel 基底膜基质产品在未稀释前都会比较粘稠。粘稠的高浓度ABW® Matrigel 基底膜基质(ABW® Matrigel 基底膜基质 HC)不稀释也可以直接使用，如用于培养肿瘤细胞和/或血管生成因子，注射于小鼠体内后，细胞可以保持原位，便于原位分析和/或以后的切除；或者稀释后，按照标准浓度的ABW® Matrigel 基底膜基质产品使用方法使用，具体稀释浓度根据实验需求确定。

除因为产品本身浓度高而粘稠外，基质胶的状态还与运输过程中温度的变化和储藏条件有关。整个运输过程中必须使用干冰冷藏。如果储藏ABW® Matrigel 基底膜基质的冰箱带有自动除霜功能，冰箱除霜过程中升温，可能使基质胶成胶。所以，切忌将ABW® Matrigel 基底膜基质储藏于此类冰箱中。为保证ABW® Matrigel 基底膜基质的使用效果，冻融次数应该尽可能减少。拿到新的ABW® Matrigel 基底膜基质后，请按照单次用量进行分装。每次融化操作，ABW® Matrigel 基底膜基质都应该放置于冰上。如果ABW® Matrigel 基底膜基质在成胶状态被冻住，再次融化时将不能成恢复液体。

16. ABW® Matrigel 基底膜基质可以诱导ES/iPS细胞分化吗？

可以的，已经有相关文章表明ABW® Matrigel 基底膜基质可以用于ES/iPS细胞的分化研究。

17. 为什么ABW® Matrigel 基底膜基质在37°C成胶，而在4°C时却呈液体状态？

ABW® Matrigel 基底膜基质是一种从小鼠骨肉瘤中提取的重组基底膜，新鲜提取的原料中主要包括以下成分：层粘连蛋白，IV型胶原，巢蛋白，基底膜聚糖、表皮生长因子、类胰岛素生长因子及其他生长因子。这些蛋白构成了 ABW® Matrigel 基底膜基质的基本结构。在22°C-37°C温度条件下，大分子间的共价键可以结合，促使 ABW® Matrigel 基底膜基质形成凝胶。而在低温条件（如4°C）下，由于没有足够的能量促使共价键结合，所以 ABW® Matrigel 基底膜基质呈现液体状态。

18. ABW® Matrigel 基底膜基质可以反复冻融吗？

建议用户第一次融化后按照单次用量进行分装，保存。

19. 为什么细胞没有贴壁？ABW® Matrigel 基底膜基质也脱落了？

首先需要检查细胞的接种浓度是否过高，ABW® Matrigel 基底膜基质的用量应等同于细胞培养体系中培养基的用量。如果ABW® Matrigel 基底膜基质被稀释到过低的浓度，形成的胶体容易从组织培养器皿表面分离。

20. 未稀释的ABW® Matrigel 基底膜基质中出现的沉淀应该怎么样处理？

4°C下低速离心，去除沉淀物。

21. 未使用完的ABW® Matrigel 基底膜基质应该怎样保存的？

与细胞培养基或缓冲液混合过但未使用完的ABW® Matrigel 基底膜基质，不建议保留再用。

22. ABW® Matrigel 基底膜基质中含有 DNA和/或RNA吗?

是的。ABW® Matrigel 基底膜基质没有经过DNA酶或RNA酶消化处理，可能会含有痕量的DNA、RNA。

23. ABW® Matrigel 基底膜基质中有血管内皮生长因子（VEGF）和金属蛋白酶（MMPs）吗?

在标准浓度的ABW® Matrigel 基底膜基质中含有 5.0-7.5 ng/mL 的血管内皮生长因子（VEGF），GFR ABW® Matrigel 基底膜基质中VEGF含量为1.0-1.5 ng/mL。另外，可能含有老鼠肿瘤细胞来源的痕量金属蛋白酶（MMPs）。

24. ABW® Matrigel 基底膜基质中有 LDEV吗?

没有的。ABW® Matrigel 基底膜基质经免疫方法及PCR方法检测，并不含有乳酸脱氢酶增高病毒（LDEV）或者乳酸脱氢酶增生病毒（LDHV）。此外，我们还针对小鼠群体及肿瘤来源筛查了其他种类的病毒。详细信息请参见产品说明书。

25. ABW® Matrigel 基底膜基质中有尿素吗?

没有的。在ABW® Matrigel 基底膜基质生产准备过程中使用过尿素，后续流程中经过透析方法已经去除了。

26. ABW® Matrigel 基底膜基质中使用的什么缓冲液?

低葡聚糖 DMEM (1g/L)，其中包含 50 µg/mL 庆大霉素。

27. ABW® Matrigel 基底膜基质中含有纤维连接蛋白（Fibronectin）吗?

是的，通过使用Western Blot检验，我们在ABW® Matrigel 基底膜基质中发现了微量的纤维连接蛋白（Fibronectin）

28. ABW® Matrigel 基底膜基质中含有玻璃体结合蛋白（ vitronectin）吗?

某些EHS组织中可能含有微量的血液，因此ABW® Matrigel 基底膜基质中可能会有痕量的玻璃体结合蛋白（Vitronectin）。

29. ABW® Matrigel 基底膜基质 中还有什么别的物质?

ABW® Matrigel 基底膜基质中还可能含有浓度小于 0.02%的三氯甲烷，以及肿瘤细胞的产生的其他未知蛋白或分子。

30. 提取过程会引起层粘连蛋白变性吗?

不会的，不会引起层粘连蛋白变性。



31. ABW® Matrigel 基底膜基质可以储存在 -70℃吗？

是的。ABW® Matrigel 基底膜基质可以储存在-70℃。建议客户将整瓶的ABW® Matrigel 基底膜基质进行分装，储存于聚丙烯或其他可以耐受超低温条件材质的小管中，方便保存和使用。

32. ABW® Matrigel 基底膜基质的折射率是多少？

20℃ 条件下，ABW® Matrigel 基底膜基质的折射率是 1.3406 到 1.3407，相对折射率为1.0056（同等条件下，水的折射率为 1.333）。

33. ABW® Matrigel 基底膜基质会有自发荧光吗？

ABW® Matrigel 基底膜基质是一种蛋白混合物，经过透析处理后溶解在 DMEM 培养基中。为防止微生物污染，培养基中添加了庆大霉素。所以ABW® Matrigel 基底膜基质可能引发荧光的组分包括其中的蛋白质成分，维生素成分以及庆大霉素（氨基糖苷类抗生素）。如果需要使用荧光检测细胞生长状态，建议使用者建立对照实验，在所需要的波长条件下进行对比，以便排除背景荧光。

34. 使用 ABW® Matrigel 基底膜基质培养的细胞，如果需要进行切片或者免疫组织化学及免疫荧光检验，该怎样固定呢？如何避免解聚？

可以使用 2%浓度的多聚甲醛进行固定。为避免固定后出现解聚的情况，可以加入 1%浓度的戊二醛。戊二醛作为固定剂，常用于电镜观察。如果用户需要进行免疫荧光检验，加入戊二醛后，会出现明显的背景荧光。为了解决这一问题，我们建议用户在固定之后，使用 NaBH₄ 进行淬灭。NaBH₄ 极易气泡，进行该步骤时，必须在水平操作台上小心操作，避免晃动，尽量减少气泡的形成。另外，用户也可以尝试使用较低浓度的戊二醛进行固定，如 0.1%到 0.5%，浓度越低，背景荧光信号越少。

***注意：**获取技术资源请浏览支持页面 www.abwbio.com

致谢：上海诺娃医药科技有限公司；康宁生命科学；BD生命科学

参考文献:

1. Kleinman HK, et al, Basement membrane complexes with biological activity, *Biochemistry*, 25:312 (1986).
2. Kleinman HK, et al, Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma, *Biochemistry*, 21:6188 (1982).
3. Bissell DM, et al, Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver, *J Clin Invest*, 79(3):801 (1987).
4. Vukicevic S, et al, Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components, *Exp Cell Res*, 202:1 (1992).
5. McGuire PG, and Seeds NW, The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells, *J Cell Biochem*, 40:215 (1989).
6. Thomson JA, et al, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282:1145 (1998).
7. Ludwig TE, et al, Feeder-independent culture of human embryonic stem cells, *Nat Methods*, 3(8):637 (2006).
8. Xu C, et al, Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells, *Nat Biotechnol*, 19:971 (2001).
9. Xu C, et al, Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth, *Stem Cell*, 22:972 (2004).
10. Drukker M, et al, Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol.*, 30(6):531 (2012).
11. Hammerick, KE, et al, Elastic properties of induced pluripotent stem cells, *Tissue Eng Part A*, 17(3-4):495 (2011).
12. Ludwig TE, et al, Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions, *Nat Biotechnol*, 24:185 (2006).
13. Amit M, et al, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture, *Dev Biol*, 227:271 (2000)