



BD Bioscience Discovery Labware **BD Biocoat™ 产品使用指南**

BD Biocoat™ Matrigel™ 基质

BD Biocoat™ 细胞相关检测系统

目 录

1	BD Biocoat™ Matrigel™ 基质	
1.1	Matrigel 基底膜基质胶	1
1.2	高浓度 HC Matrigel 基底膜基质胶	3
1.3	人来源细胞外基质	4
1.4	III型人重组胶原蛋白	5
1.5	高浓度层粘连蛋白/巢蛋白混合物	6
1.6	人胚胎干细胞专用的 Matrigel 基质	7
2	BD Biocoat™ 细胞检测相关系统	
2.1	Biocoat 肿瘤侵袭系统	8
2.2	Biocoat 血管生成系统：内皮细胞侵袭	10
2.3	Biocoat 血管生成系统：内皮细胞迁移	12
2.4	Biocoat 血管生成系统：内皮血管形成	14
2.5	Biocoat HTS Caco-2 检测系统	15
	附录：细胞培养系统快速使用指南	17
	Biocoat™ Matrigel™ 常见问题	17

1 BD Biocoat™ Matrigel™ 基质

1.1 Matrigel 基底膜基质胶

BD 产品货号: 354230 354234 356230 356231 356234 356235 356237

储存和运输: -20 度储存, 干冰运输。

操作指南

BD 采用专利技术, 从富含胞外基质蛋白的 EHS 小鼠肿瘤中分离出 BD Matrigel 基底膜基质, 其主要成分由层粘连蛋白, IV 型胶原, 巢蛋白, 硫酸肝素糖蛋白等组成, 还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。BD Matrigel 基底膜基质在室温条件下, 聚合形成具有生物学活性的三维基质, 模拟体内细胞基底膜的结构、组成、物理特性和功能, 有利于体外细胞的培养和分化, 以及对细胞形态、生化功能、迁移、侵染和基因表达的研究。

BD Matrigel 基底膜基质形成的三维培养基质, 可促进上皮细胞、肝细胞、Sertoli 细胞、黑色素瘤细胞、血管内皮细胞、甲状腺细胞及毛囊细胞等的贴壁与分化。同时, Matrigel 还能影响乳腺上皮细胞的蛋白表达, 支持外周神经的新生和牛输卵管上皮细胞的分化。高浓度的 Matrigel 适用于研究体内血管生成和肿瘤细胞迁移及肿瘤模型的建立等。

产品特性

Matrigel 基质会有色差变化(淡黄色到深红色), 是由于酚红和碳酸氢盐与 CO₂ 作用引起的, 但是与 5%CO₂ 平衡后色差即会减少。冻融后, 轻轻摇晃试剂瓶使 Matrigel 分散均匀。所有操作均需在无菌环境下进行, 试剂瓶瓶盖可用 70%乙醇擦拭, 并自然干燥。应使用预冷的移液器以保证 Matrigel 呈匀浆状。

细胞可在 0.5mm 厚度的 Matrigel 基质层表面生长, 也可在 1mm 厚度的 Matrigel 三维基质内生长。过度稀释的 Matrigel 会形成非胶质的蛋白层, 可以用于细胞贴壁, 但不能用于细胞的分化研究。

注意: 可将冻融后的 Matrigel 分装在多个小管, 所有分装均需用预冷的冻存管, 迅速冷冻并保存, 避免多次冻融。

Matrigel 在 22-35°C 温度环境下快速成胶, 因此溶解时在 4°C 冰上过夜冻融(4 度时会随着温度的上升部分成胶)。所有用品在使用前需置于冰浴, 必须使用预冷的移液管、吸头及小管操作 Matrigel。成胶后的 Matrigel 可以在 4°C 24-48 小时后重新呈液态。

推荐包被与成胶方法

注意: 为了保证 Matrigel 基质膜的成胶性能与稳定性, 稀释浓度不应低于 1: 3, 可用无血清培养基稀释, Matrigel 成胶后立即使用。

薄胶成胶方法:

- 1、冻融后, 用预冷的移液枪头混匀 Matrigel 基质成匀浆状。
- 2、将需要使用的培养板置于冰上, 加入浓度为 50 μ L/cm² 生长面积的 Matrigel 基质。
- 3、在 37°C 放置 30 分钟, 即可使用。

厚胶成胶方法:

- 1、冻融后, 用预冷的移液枪头混匀 Matrigel 基质成匀浆状。
- 2、将需要使用的培养板置于冰浴, 将培养的细胞与 Matrigel 基质混合, 用移液枪头使其悬浮于基质中。加入浓度为 150-200 μ L/cm² 生长面积的 Matrigel 基质。
- 3、在 37°C 放置 30 分钟, 可成胶。可以加入细胞培养的基质, 也可使细胞直接生长在胶表面。

薄层包被方法:

- 1、冻融后，用预冷的移液枪头混匀 Matrigel 基质成匀浆状。
- 2、根据需要使用，采用无血清培养基稀释 Matrigel 基质。根据实验需要确定最佳包被浓度。
- 3、将稀释的 Matrigel 基质包被于所需的培养器皿中，包被量至少覆盖整个器皿的生长表面。
室温下孵育 1 小时。
- 4、去除未结合的 Matrigel，用无血清培养基轻轻地冲洗。

用 BD 细胞回收剂（354253）或离散酶（354235）可降解 Matrigel 基质，冰浴 7 小时后回收得到细胞。

1.2 高浓度HC Matrigel基底膜基质胶

BD 产品货号：354248 354262

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

产品特性

Matrigel 基质会有色差变化(淡黄色到深红色),是由于酚红和碳酸氢盐与 CO₂ 作用引起的,但是与 5%CO₂ 平衡后色差即会减少。冻融后,轻轻摇晃试剂瓶使 Matrigel 分散均匀。所有操作均需无菌环境下进行,试剂瓶瓶盖可用 70%乙醇擦拭,并自然干燥。应使用预冷的移液器以保证 Matrigel 呈匀浆状。

细胞可在 0.5mm 厚度的 Matrigel 基质层表面生长,也可在 1mm 厚度的 Matrigel 三维基质内生长。过度稀释的 Matrigel 会形成非胶质的蛋白层,可以用于细胞贴壁,但不能用于细胞的分化研究。

注意：可将冻融后的 Matrigel 分装在多个小管,所有分装均需用预冷的冻存管,迅速冷冻并保存,避免多次冻融。

Matrigel 在 22-35℃温度环境下快速成胶,因此溶解时在 4℃冰上过夜冻融(4 度时会随着温度的上升部分成胶)。所有用品在使用前需置于冰浴,必须使用预冷的移液管、吸头及小管操作 Matrigel。成胶后的 Matrigel 可以在 4℃24-48 小时后重新呈液态。

注射步骤：

- 1、注射前,必须保证 Matrigel 和细胞悬浮液在不冷冻的情况下,尽可能地保持低温,同时保证每一步都无菌操作。
- 2、对于每只注射小鼠,冰上混合 0.5 mL 细胞 (2×10^5 或更多细胞) 和 Matrigel 混合液。
- 3、细胞注射体积需尽可能小。通常,用含有 2×10^6 /mL 细胞的 250 μ L 预冷培养基,混合 250 μ L 冰浴的 Matrigel。
- 4、小鼠皮下注射,19G 针用于组织样品,23G 针用于培养的细胞。注射动作必须快速,以避免 Matrigel 凝固。
- 5、抽出注射器时旋转以防止泄漏。针头需要经常更换以避免堵塞。

用 BD 细胞回收剂(354253)或离散酶(354235)可降解 Matrigel 基质,冰浴 7 小时后回收得到细胞。

1.3 人来源细胞外基质

BD 产品货号：354237

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

产品特性

人源细胞外基质是来源于人体胚胎、经过层析纯化而得的细胞外基质提取物，由层粘连蛋白，IV 型胶原，硫酸乙酰肝素蛋白多糖（HSPG）等成分组成。人细胞外基质对贴壁依赖性上皮细胞特别是人源性细胞，有促进其贴壁、延展、代谢和分化的作用。

配方：0.02M 磷酸钠溶液，pH 值 7.4

包被方法：

- 1 用无血清培养基吸收细胞外基质到一定的浓度。最终浓度应足以满足覆盖培养器皿表面的量。例如：最终包被浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，应将基质稀释到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在 35 mm 的培养皿中加入 1mL 基质，在 60mm 培养皿中加入 3 mL 基质。
- 2 根据培养皿面积加入合适的已稀释基质。
- 3 室温孵育 2 小时。
- 4 吸走多余的基质。
- 5 仔细清洗培养器皿，避免刮擦底部表面。
- 6 包被后的培养器皿，应储存于 2-8℃ 的潮湿环境中，或在无菌环境中自然干燥。

1.4 III型人重组胶原蛋白

BD 产品货号：354255

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

III型胶原在皮肤、心血管系统和成年人的正常生理功能中发挥重要作用。III型胶原蛋白在正常人心血管纤维形成中起重要作用，还可用作促进细胞贴壁和调节细胞行为。

使用注意事项：

III型人重组胶原蛋白，可用于体外实验的薄胶包被，但也能优化用作胶。如果一次不能使用完，可分装后储存于 2-8℃。

推荐包被与成胶方法

薄胶包被：

- 1、选择合适的包被浓度。推荐包被浓度为：0.2-2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，视细胞种类决定。加入的包被体积必须足以覆盖细胞生长表面。如有必要，可将胶原蛋白用 10 mM 醋酸稀释。
- 2、当生长表面完全覆盖后，室温孵育 2 小时。倾斜培养皿至 45 度，使多余的胶原蛋白都聚集在培养皿的最低点。
- 3、用移液器去除多余的胶原蛋白。
- 4、在层流超净台上空气自然干燥或用灭菌的柔和气流干燥。
- 5、器皿包被完成，可备用。

成胶方法：

- 1、加入 9 份的人重组胶原蛋白和 1 份的 10 倍中性缓冲液或无菌组织培养基。
- 2、将混合液加入需要的培养器皿中。
- 3、室温孵育 60 分钟。
- 4、细胞可接种于胶的表面。如需将胶从培养皿中转移或用于更多操作，在成胶前混合细胞和胶原蛋白。

1.5 高浓度层粘连蛋白/巢蛋白混合物

BD 产品货号：354259

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

层粘连蛋白/巢蛋白混合物是 EHS 小鼠肿瘤基质膜的主要成分。纯化后，成等摩尔浓度分布。二价阳离子有利于混合物的形成。在 2 mg/mL 浓度时，层粘连蛋白/巢蛋白可以形成三维胶，可用于细胞生长和分化的研究。三维胶更接近体内微环境。细胞的分化受到与单一或混合细胞外基质蛋白之间的相互作用的影响，因此在层粘连蛋白/巢蛋白混合物上培养细胞，可以用以观察并揭示细胞分化和功能性的特性机理。混合蛋白的成胶过程对温度敏感。此外，高浓度的层粘连蛋白/巢蛋白（2-6 mg/mL）也用于人下颌腺泡细胞分化和内皮细胞的血管形成研究。

注意事项：

- 1、所有操作的工作温度不能高于 4°C，蛋白需冰上操作保存，用冰块冷却的溶液或细胞悬浮液稀释。
- 2、由于混合蛋白溶液粘性较高，必须使用预冷的注射器型移液管，如 Gilson M 系列；避免使用气压式移液管或吸头。

推荐包被方法

铺胶步骤：细胞在胶表面培养

- 1、冰上溶解混合蛋白，所有操作均在冰浴上进行。
- 2、稀释到需要的浓度：稳定成胶浓度至少为 3.5mg/mL。
- 3、用预冷的等压盐溶液或 0.1mM 钙离子培养基稀释
- 4、将稀释的蛋白溶液加入到培养器皿，1-2 小时，37°C 成胶。

铺胶步骤：细胞在胶内部培养

- 1、冰上溶解混合蛋白，所有操作均在冰浴上进行。
- 2、根据加样体积计算并稀释混合蛋白，成胶浓度至少为 3.5mg/mL，稀释过程需在预冷的培养器皿或小管中进行。
- 3、加入预冷的细胞悬液，用等压盐溶液或培养基调节溶液浓度到第二步所需的浓度。
- 4、用 Gilson M 系列移液管混匀混合蛋白和细胞悬液。
- 5、将混合后的细胞蛋白悬液加入到预冷的培养板中，37°C 孵育 1-2 小时成胶。

1.6 人胚胎干细胞专用的Matrigel基质 (Matrigel hESC-qualified Matrix)

BD 产品货号: 354277

储存和运输: -20 度储存, 干冰运输。

产品特性

Matrigel 基质会有色差变化, 是由于酚红和碳酸氢盐与 CO₂ 作用引起的, 不会影响产品效率; 与 5%CO₂ 平衡后色差即会减少。冻融后, 混旋使充分分散溶解。所有操作均需无菌环境下冰上进行, 冻融管的表面需用 70%乙醇清洗, 并自然干燥。应使用预冷的移液器以保证呈匀浆状。分装的胶要用合适的分装份数, 用预冷的冻存管, 迅速冷冻, 避免多次冻融;

不要保存在除霜冰箱中!

稀释影响因子:

hESC 优化的 Matrigel 基质稀释需要根据各个批号的蛋白浓度进行。与干细胞培养技术相关的培养基一起使用时, 需要根据分析证书提供的影响因子浓度分装基质。液体可以在-70℃储存 6 个月。通常分装体积在 270-350 微升。

使用时:

加入一个分装量的基质到 25mL 的 DMEM/F-12, 包被 6-孔板 (1/ mL 每孔), 或者 3 个 100mm 直径的培养皿 (8 mL/皿)。

注意:

hESC 优化的 Matrigel 基质 354277 可以在 27-35 度迅速凝胶, 可在冰上 4 度过夜解冻; 成胶后的 Matrigel 可以在 4℃24-48 小时后重新呈液态。

2 BD Biocoat™ 细胞检测相关系统

2.1 Biocoat肿瘤侵袭系统

BD 产品货号：354166, 354165

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

使用指南

BD BioCoat™ 肿瘤侵袭系统由包被 Matrigel 基质的特殊材质 BD FluoroBlok 荧光屏蔽 8.0μm PET 膜的培养小室组合而成。BD BioCoat™ 肿瘤侵袭系统具有以下特点：提高肿瘤细胞侵袭实验的通量；自动化非破坏式的荧光检测；节约抗肿瘤转移药物筛选的时间和劳动力；高度可重复性：平均 $z'=0.7$ (24 孔)；平均 $z'=0.66$ (96 孔)；使用简便：无需反复取液和操作，仅需加入细胞、标记物，然后直接读板。

操作过程

1、冻融

- 1.1 从-20℃冰箱中取出产品，使其自然升温到室温。
- 1.2 取出培养板在细胞小室内加入 500μL 37℃预热的 PBS，37℃无 CO₂ 环境下孵育 2 小时。
- 1.3 解冻后，小心去除小室内的培养基，**避免破坏 Matrigel 基质膜。**

2、BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记法

细胞通过侵袭消化基质膜后迁移到下小室，采用荧光标记定量细胞。细胞的侵袭能力用终点计算法计算得到。对于采用实时动力曲线的计算，推荐使用前标记法。

- 2.1 如步骤 1 准备培养板。
- 2.2 胰酶消化细胞单层后制得细胞悬液，溶于无血清 DMEM 培养基，推荐浓度为 5×10^4 cells/mL。
- 2.3 上小室中加入 500μL 细胞悬液 (2×10^4 cells)。
- 2.4 通过进样口在下小室中加入 750μL 诱导剂。
- 2.5 在 37℃，5% CO₂ 条件下孵育培养板和对照板 20-22 小时（由细胞类型决定）。
- 2.6 孵育后，小心去除上小室中的培养基。**避免破坏 Matrigel 基质膜。**可以通过反扣住培养板，轻轻拍打，以使培养基的倾倒。
- 2.7 将培养小室转移到另一块 24 孔板中，该孔板含有 0.5 mL 每孔的 4 μg/mL 钙黄绿素（溶于 HBSS）。在 37℃，5% CO₂ 的环境下培养一小时。

3、DilC12 (3) 荧光染色剂预标记法

细胞接种于孔板之前先用染色剂标记，可用于均一化实验，所产生的实时动力数据可揭示细胞通过基底膜侵袭的动力曲线，不需要分解和破坏各个时间点。

- 3.1 如 1.所示冻融。
- 3.2 10μg/mL DilC12(3)溶解于含 10%FBS 的 DMEM 中，37℃ 1 小时标记单层细胞。
- 3.3 胰酶消化细胞单层，制备细胞悬液，溶于无血清 DMEM 培养基，浓度为 1×10^5 cells/mL。
- 3.4 上小室加入 500μL 细胞悬液 (5×10^4 cells)。
- 3.5 通过进样口在下小室加入 750μL 诱导剂。
- 3.6 在 37℃，5% CO₂ 环境下孵育培养板和对照板 18-24 小时（由细胞类型决定）。在 549 激发波长和 565nm 发射波长条件下进行荧光读数。

4、数据计算

侵袭率%=受趋化剂诱导通过 Matrigel 基质膜的细胞平均相对荧光值/受趋化剂诱导通过未包被 FluoroBlok 荧光膜的细胞平均相对荧光值×100

注意：数据可以用相对荧光值 RFU 或侵袭百分比表示，后者在标准化数据处理中更有用。
背景扣除：计算平均背景值，将其从各个孔板中扣除。

自动化操作注意事项

1. BD Falcon FluoroBlok 24 孔板培养小室系统能适用于自动化操作系统。盖子可以用标准机械手取走，也可用吸力取走。
2. 为了避免各孔间污染，孔板设定为一个统一的方向。为了与培养小室匹配，确保 Falcon 的商标均在二者上方，面向同一个方向。
3. 任何规格的枪头都能达到小室的两边。包括 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 250 μ L, 1000 μ L。

2.2 Biocoat血管生成系统：内皮细胞侵袭

BD 产品货号：354141 354145 354146

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

血管生成过程中，内皮细胞活化后表达基质金属蛋白酶（MMPs），可降解血管基底膜。BD BioCoat 内皮细胞侵袭系统提供了抗/促血管再生化合物的体外定量实验模型。内皮细胞侵袭系统包括：BD Falcon24 多孔板培养小室，含配套接收板和盖子；BD FluoroBlok 荧光屏蔽 3.0μm 孔径 PET 膜，预包装 Matrigel 基质。具体操作步骤如下：

操作过程

1、冻融

1.1 从-20℃冰箱中取出包装，使其自然升温到室温。

1.2 在小室内加入 0.5 mL 37℃ 预热的的基本培养基，在 37℃ CO₂ 环境下冻融 15-45 分钟，待用。

1.3 冻融后，小心去除培养基，**避免破坏 Matrigel 基质膜**。可用抽吸或倒置培养板并轻拍的方法去除培养基。

2、侵袭实验：用 BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记

细胞侵袭基质膜穿过荧光标记膜后，采用荧光标记定量。

2.1 采用如 1.1 的步骤冻融，对照板无需冻融。

2.2 胰酶酶解细胞单层，使其悬浮在无血清培养基中，浓度为 2.0×10⁵/mL。最佳的接种细胞浓度需要采用一系列细胞浓度进行优化，包括在下室培养表面的浓度（例如，培养瓶，培养皿和培养板）。例如，接种浓度为 10⁵ cells/cm² 时，采用浓度为 0.5×10⁵ 到 5.0×10⁵ cells/cm² 的范围确定最佳的接种浓度。

2.3 在上小室中加入 0.25mL 的细胞悬液（5.0×10⁴ cells/well）。

2.4 通过进样口，快速加入 750 微升含 5%FBS 或适量生长因子（比如 BD VEGF）的培养基，作为底部小室的化学诱导剂。

2.5 小室和对照小室在 37℃，5% CO₂ 环境下培养 22±1 小时。

3、细胞侵袭能力的测定：用 BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记定量

注意：对于每一个完成得培养板，需要 12.5 mL 的 HBSS 和 50 μg 的钙黄绿素。HBSS 的使用时为了减少荧光染色剂自动水解引起的高背景荧光。

3.1 准备浓度为 4μg/mL 的钙黄绿素。12.5 mL 的 HBSS 37℃ 预热。50μg 钙黄绿素用 20 μL DMSO 溶解，加入 150μL 预热的 HBSS。将其转入大量的 HBSS 中，用 150μL 预热的 HBSS 清洗荧光染料的容器。

3.2 孵育后，小心去除上小室中的培养基。注意小心转移邻近小室底部的培养基。可以通知抓住培养板，轻轻拍打，使培养基从下部滴落。**避免破坏 Matrigel 基质膜**

3.3 将培养小室转移到另一块 24 孔板中，该孔板含有 0.5 mL 每孔的 4 μg/mL 钙黄绿素。在 37℃，5% CO₂ 环境下孵育 90 分钟。

3.4 侵袭小室的荧光定量信息通过荧光板读板机底部读数取得，激发波长 494nm，发射波长 517nm。只有侵袭并通过 Matrigel FluoroBlok™ 膜后细胞才能被检测。

注意：后标记所使用的染色剂不局限于胞核染色，比如 SYTO-24，在血清培养基环境中具有较低背景，不需要使用第二块板用于标记。

4、侵袭研究：DiIC12（3）荧光染色剂预标记法

细胞接种于孔板之前先用染色剂标记，可用于均一化实验，所得到的实时动力曲线可揭示细胞通过基底膜侵袭的能力，不需要分解和破坏各个时间点。

4.1 如 1.所示冻融。

4.2 不同浓度的各类荧光素对细胞标记的程度不同，标记浓度和时间，接种细胞浓度和化学诱导剂必须预先优化。

4.3 胰酶消化细胞单层，制备细胞悬液，溶于无血清 DMEM 培养基，浓度为 2×10^5 cells/mL。最佳的接种细胞浓度需要采用一系列细胞浓度进行优化，包括在下室培养表面的浓度（例如，培养瓶，培养皿和培养板）。例如，接种浓度为 10^5 cells/cm² 时，采用浓度为 0.5×10^5 到 5.0×10^5 cells/cm² 的范围确定最佳的接种浓度。

4.4 在上小室中加入 0.25mL 的细胞悬液 (5.0×10^4 cells/小室)。

4.5 通过进样口，快速加入 750μL 含 5%FBS 或适量生长因子（如 BD VEGF）的培养基，作为下室的诱导剂。

4.6 小室和对照小室在 37°C，5% CO₂ 环境下培养 22±1 小时。

5、细胞侵袭的计算：用 DilC12（3）荧光染色剂后标记定量

侵袭小室的荧光定量信息通过荧光板读板机底部读数取得，激发波长 549nm，发射波长 565nm。只有侵袭通过 Matrigel FluoroBlok 膜被标记的细胞才能被检测。

6、结果计算

注意：数据可以用相对荧光值 RFU 或侵袭百分比表示，后者在标准化数据处理中更有用。

背景扣除：计算平均背景值，将其从各个孔板中扣除。

6.1 侵袭百分比

侵袭百分比% = 通过基质膜包被的荧光膜侵袭细胞的平均相对荧光值 / 通过未包被荧光膜侵袭的平均相对荧光值 × 100

6.2 信噪比

信噪比 S/N = 实验组细胞侵袭的相对荧光值 / 对照组细胞侵袭的相对荧光值

自动化操作注意事项

1. BD Falcon FluoroBlok 24 孔板培养小室系统能适用于自动化操作系统。盖子可以用标准机械手取走，也可用吸力取走。
2. 为了避免各孔间污染，孔板设定为一个统一的方向。为了与培养小室匹配，确保 Falcon 的商标均在二者上方，面向同一个方向。
3. 任何规格的枪头都能达到小室的两边。包括 50μL, 100μL, 200μL, 250μL, 1000μL。

2.3 Biocoat血管生成系统：内皮细胞迁移

BD 产品货号：354143 354144 354147, 354148

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

血管生成过程中，内皮细胞活化后表达基质金属蛋白酶（MMPs），可降解血管基底膜。BD BioCoat 内皮细胞侵袭系统提供了抗/促血管再生化合物的体外定量实验模型。内皮细胞侵袭系统包括：BD Falcon24 多孔板培养小室，含配套接收板和盖子；BD FluoroBlok 荧光屏蔽 3.0μm 孔径 PET 膜，预包装 Matrigel 基质。具体操作步骤如下：

1、冻融

从-20℃冰箱中取出包装，使其自然升温到室温。

2、迁移实验：用 BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记

细胞在 BD FluoroBlok™ 基质膜迁移后，采用荧光标记定量，只有迁移到下室的细胞可以计算得到。根据实时动力曲线的计算，推荐使用前标记法。

2.1 原代 HUVEC 细胞的迁移能力取决于其来源和所传代数。可以先对 HUVEC 迁移能力进行预筛选，推荐使用所传代数较低，8 代以内的 HUVEC。

2.2 HUVEC 细胞在血清培养基或生长因子 VEGF 优化的培养基中生长，会对不同的内皮细胞诱导剂产生不同的应激反应。

建议在实验前将细胞饥饿 4-5 小时，而后去除生长培养基，清洗细胞单层，加入含 0.1%BSA 的基础培养基（不含血清或生长添加剂）。

2.3 HUVEC 细胞悬液可用胰酶消化后制备，然而，采用非酶技术消化细胞，更能保存细胞迁移的应激能力。可采用专业培养基 Specialty Media（产品号：S-014-B）作为非酶消化的分散剂。

注意：大部分内皮细胞培养基不具有足够的血清浓度用于终止胰酶的消化。

2.4 接种细胞浓度由实验条件，如细胞来源，培养基，化学诱导物决定。推荐起始浓度为： 4.0×10^5 cells/mL 24 孔板 或 3.3×10^5 个/mL 96 孔板。推荐接种体积分别为 250μL 和 75μL。

2.5 推荐的化学诱导物体积分别为 24 孔板，750 微升，96 孔板，225 微升。

注意：为了减少气泡和优化荧光读板的性能，推荐通过进样口在配套板内添加试剂。

2.6 小室和对照小室在 37℃，5% CO₂ 环境下培养 22±1 小时。

3、细胞迁移的计算：用 BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记定量

注意：钙黄绿素的浓度在 4-5μg/mL(HBSS 溶液)。采用培养基用于荧光染色剂的稀释会引起荧光染色剂自动水解，并带来高背景荧光。

对一块完整的 24 孔板来说，需要一管溶解于 12.5mL HBSS 的 50μg 的染色剂。96 孔板则需要 2 管溶解于 25mL HBSS 的 50μg 染色剂。

3.1 在各管 50μg 钙黄绿素中加入 20 μL DMSO，加入 150μL 37℃预热的 HBSS。将其转入大量的 HBSS 中，用 150μL 预热的 HBSS 清洗荧光染料的容器。

3.2 标记有 2 种方法

第一种适用于大规模孔板的自动化加样操作。小室和孔板内的培养基通过加样口添加。通过进料口加入 HBSS 清洗孔板和膜底部（24 孔板需 500μL，96 孔板需 200μL），反复抽吸。在 24 孔板中加入 500μL 钙黄绿素，96 孔板中加入 225μL。

第二种方法是手动操作较少数量的培养板。取出培养小室，轻摇后去除溶液。去除培养基后，将小室转入另一块新的培养板，该培养板预先溶有染色剂（24 孔板，每孔 500μL，96 孔板，每孔 225μL）。

3.3 在 37℃，5% CO₂ 环境下孵育 90 分钟。

3.4 培养小室的荧光定量信息通过荧光板读板机底部读数取得，激发波长 494nm，发射波长 517nm。只有迁移后通过 Matrigel FluoroBlok 膜的被标记的细胞才能被检测。

4、迁移研究：DiIC12 (3) 荧光染色剂预标记法

细胞接种于孔板之前先用染色剂标记，可用于均一化实验，所产生的实时动力数据可揭示细胞通过基底膜侵袭的动力曲线，不需要分解和破坏各个时间点。

4.1 如 1.所示冻融。

4.2 不同浓度的各类荧光素对细胞标记的程度不同，标记浓度和时间，接种细胞浓度和化学诱导剂必须预先优化。

4.3 接种密度参见步骤 2.在小室内加入 0.5 mL 37°C 预热的的基本培养基，在 37°C CO₂ 环境下孵育 15-45 分钟，待用。

4.4 培养小室的荧光定量信息通过荧光板读板机底部读数取得，激发波长 549nm，发射波长 565nm。只有迁移后通过 Matrigel FluoroBlok 膜的被标记的细胞才能被检测。

5、结果计算

注意：数据可以用相对荧光值 RFU 或迁移百分比表示，后者在标准化数据处理中更有用。

背景扣除：计算平均背景值，将其从各个孔板中扣除。

迁移百分比% = 受化学诱导的跨膜迁移的细胞平均荧光值 / 不受化学诱导的跨膜迁移的细胞平均荧光值 × 100

自动化操作注意事项

- 1 BD Falcon FluoroBlok 24 孔板培养小室系统能适用于自动化操作系统。盖子可以用标准机械手取走，也可用吸力取走。
- 2 为了避免各孔间污染，孔板设定为一个统一的方向。为了与培养小室匹配，确保 Falcon 的商标均在二者上方，面向同一个方向。
- 3 对于 96 孔板培养小室，需使用锥形头或窄孔口的吸头。宽口枪头会粘在储存口上，不利操作。
- 4 任何规格的枪头都能达到小室的两边。包括 50μL, 100μL, 200μL, 250μL, 1000μL。

2.4 Biocoat血管生成系统：内皮血管形成

BD 产品货号：354149, 354150

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

内皮细胞体外分化，可形成毛细管状结构。BD Matrigel 基质可促进内皮细胞血管形成，血管内腔通过相互交叉结合的膜复合体形成管腔，类似体内毛细管形成机制。研究发现 BD Matrigel Matrix 可在 18 小时内诱导内皮细胞血管形成。内皮细胞血管生成系统包括：预包被 Matrigel 基质的 BD Falcon 96 孔黑色透明底培养板。具体操作步骤如下：

操作过程

1、冻融.

1.1 从-20℃冰箱中取出包装，使其自然升温到室温。

注意：步骤 1.2-1.4 需在细胞接种前 30 分钟完成。

1.2 在层流超净台上，取出培养板待用。

1.3 在培养板上做白色标记。

1.4 打开盖子后，用无菌镊子去除内盖。更换培养板盖子。

1.5 在 37℃，5% CO₂ 环境下使 Matrigel 基质聚合 30 分钟。过长时间的聚会会引起大量的蛋白单层而非血管形成。

注意：避免使用在上方的 CO₂ 通风口和 CO₂ 直接吹气方式。水平底部吹风方式有利于血管形成。

2、血管形成

注意：应在无菌条件下进行。

2.1 如上准备培养板。

2.2 用适合的培养基培养使细胞汇合。对于 HUVEC 和 HMEC-1，建议 70-80%汇合率。

2.3 胰酶消化细胞单层，制备细胞悬液，可溶于 5-10%血清中或其他合适的血管生长促进剂中，HUVEC 和 HMEC-1 的推荐浓度为 4×10^5 个/mL。其他试剂比如抑制剂可在此时加入。

2.4 各孔加入 50μL 细胞悬液 (2×10^4 HUVEC, HMVEC, HMEC-1)。建议使用排枪进行操作。

3、血管形成的计算：用 BD 钙黄绿素 Calcein AM 荧光染色剂后标记定量

注意：对于每一个培养板，需要 6.25 mL 的 HBSS 和一管 50 μg 的钙黄绿素。HBSS 的使用时为了减少荧光染色剂自动水解引起的高背景荧光。该步骤需在无菌条件下操作。

3.1 准备浓度为 8μg/mL 的钙黄绿素。对于每一块板，先将 6.25 mL 的 HBSS 37℃预热。在 50μg 钙黄绿素中加入 20 μL DMSO，加入 100μL 预热的 HBSS。再将其转入大量的 HBSS 中。

3.2 孵育后，小心去除小室 A 面中的培养基。避免破坏 Matrigel 基质膜。可以通过抓住培养板，轻轻拍打，以使培养基从下部滴落。

3.3 用 HBSS 清洗培养板，在各孔中加入 100μL HBSS，如 3.2 去除 HBSS。

3.4 重复清洗一遍。

3.5 加入 50μL/孔的 8μg/mL 钙黄绿素染色剂，37℃，5% CO₂ 环境下培养 30-40 分钟。

3.6 如 3.2 去除染色溶剂。

3.7 如 3.2 清洗孔板 2 次。

3.8 完成的培养板用于图像摄取。

注意：一旦水解发生，染色剂会从细胞内漏出，造成高背景。染色标记后将培养板储存与 4℃ 1-2 小时，可以使背景最小。

2.5 Biocoat HTS Caco-2 检测系统

BD 产品货号：354801 354802

储存和运输：-20 度储存，干冰运输。

操作指南

Caco-2 细胞来源于人结肠癌细胞，能在培养过程中进行肠细胞的分化，其单层细胞常做研究小肠上皮细胞的物质转运和代谢的体外模型。BD BioCoat™ HTS Caco-2 系统由 BioCoat 肠上皮细胞生长环境和 Falcon 24 孔板培养小室组成，每个 kit 包括特别配方的无血清培养基、添加剂、接种培养基、纤维胶原包被的 HTS 24 孔插入小室。具体操作步骤如下：

1、配制 MITO+血清添加剂和培养基

1.1 用 70%乙醇对 MITO+血清添加剂试剂瓶擦拭消毒后，加入 500μL 细胞接种基础培养基溶解冻干粉末。

1.2 将 250μL 溶解后的 MITO+加入到基础接种培养基的容器瓶中。

1.3 将另外 250μL MITO 血清培养基加入到 Entero-STIM™培养基中。

1.4 所有培养基应存放于原始包装瓶中，2-8℃储存，保质期 21 天。

2、细胞的接种和生长

2.1 用胰酶/EDTA 消化培养瓶中的 Caco-2 细胞。建议细胞达到 250,000 cells/cm² 以上的浓度后进行消化收集。消化后，去除或中和胰酶/EDTA，细胞重悬于 37℃预热的已添加 MITO+血清混合物的基本接种培养基中，调整细胞浓度到 4×10⁵cells/mL。

2.2 在各小室中加入 500μL 细胞悬液。（接种浓度为每个小室 200,000cells 或 6.6×10⁵cells/cm²）。

2.3 在多孔饲养板（Mutilwell™ Feeder Tray）中加入 35mL 37℃预热的含 MITO+血清混合液的基础培养基。

2.4 在 37℃,5%CO₂，100%湿度条件下孵育 20-24 小时。

3、细胞的分化——加入 Entero-STIM™培养基，

3.1 小心去除小室底部和小室上部的基础培养基。

注意：过多的抽吸会破坏细胞单层和纤维胶原蛋白包被层，引起错误的渗透性计算结果。

3.2 在每个小室中加入 37℃预热的 500μL 含 MITO+血清混合物的 Entero-STIM 培养基。然后在多孔饲养板中加入 35mL 37℃预热的含 MITO+血清混合液的 Entero-STIM 培养基。

3.3 在 37℃,5%CO₂，100%湿度条件下孵育 44-48 小时.已经通过甘露醇扩散证明 Caco-2 在时间范围内分化。

4、渗透性实验推荐方法

注意：该实验部分无需在无菌环境下操作。

渗透性研究中，生长于 Caco-2 系统上的细胞单层需要放置在 Falcon24 孔板中用于化合物的渗透性过程研究。

尽管盖子和饲养板没有方向，但是为了避免各孔间污染，孔板设定为一个统一的方向。为了与培养小室匹配，确保 Falcon 的商标均在二者上方，面向同一个方向。

4.1 上/下小室渗透性实验

4.1.1 将细胞培养小室从进料板中取出，直接放入 Falcon24 孔板中。（该 24 板需要另行购买）

4.1.2 小心去除各小室中 Entero-STIM™培养基。可用适合的转运缓冲液清洗。

4.1.3 在各小室内加入 300μL 溶解于缓冲液的待测样品。（可选体积范围见表 1）

4.1.4 在 Falcon 24 孔板各孔中加入 1000μL 转运缓冲液。（可选体积范围见表 1）

TABLE 1: Recommended Volume Pairings

Volume in well (apical side)	Corresponding volume in plate well (basal side)
300µl	1000µl
400µl	1200µl
500µl	1400µl

注意：超过 500µL 的缓冲液会引起测试样品溢出小室。

4.1.5 在适合的温度下孵育，并轻微摇动（通常为 50rpm）。实验温度，孵育时间，摇动参数，应根据每个不同的实验自行确定。

4.1.6 从各个进样口去除溶液，测定待测样品在下小室中的浓度。进样口与 200µL 和 1000µL 枪头匹配。可采用液相闪烁计数法计算。

4.2 下/上小室渗透性研究

4.2.1 将细胞培养小室从进料板中取出，直接放入 Falcon24 孔板中。（该 24 板需要另行购买）可用适合的转运缓冲液清洗。

4.12.2 小心去除各小室中 Entero-STIM 培养基。可用适合的转运缓冲液清洗。

4.2.3 在各小室内加入 300µL 缓冲液。（可选体积范围见表 1）

4.2.4 在 Falcon24 孔板各孔中加入 1000µL 溶有待测样品的转运缓冲液。（可选体积范围见表 1）

4.2.5 在适合的温度下孵育，并轻微摇动（通常为 50rpm）。实验温度，孵育时间，摇动参数，应根据每个不同的实验自行确定。

4.2.6 从各个进样口去除溶液，测定待测样品在上小室中的浓度。进样口与 200µL 和 1000µL 枪头匹配。

5、常用结果

a. 细胞接种后 24 小时可见汇合的细胞单层。

b. 甘露醇渗透性测定可在加入添加了混合剂的 Entero-STIM 培养基 48 小时后进行。室温时，当用 PBS 作为转运缓冲液时，甘露醇的典型渗透约为 $4 \times 10^6 \text{cm/sec}$ 。（有效生长面积为 0.31cm^2 ）

6、可选方法

注意：所有方法的修改必须预先经过验证。

6.1 延长细胞生长期，以配合实验进度

一旦添加了含 MITO+血清添加剂的 Entero-STIM 培养基，分化就会开始，细胞单层就会在 24-48 小时后形成，在此之后，细胞单层会逐渐渗漏。

如果想要修改 3 天的 Caco-2 实验方法，细胞单层生长的相关步骤需要调整。

步骤 2.2（细胞生长）中的 20-24 小时时间范围不是该步骤中的关键因素。细胞可以在培养基内生长 3 天，直至培养基耗尽（pH 值改变）。因此，可以再周五下午接种，周一上午替换为 Entero-STIM 培养基，周三（48 小时后）形成细胞单层。有时候，3 天内培养基用量不够，需要更换。

6.2 更长的分化细胞单层

如果需要更耐时的细胞单层，以下方法可以采用。用基础接种培养基（355257）以 1: 10 稀释 Entero-STIM，将该溶液用于细胞分化（但仍需添加 MITO-血清混合剂）。细胞单层的耐时性延长了，但是缺点是一些分化的标记物和具备转运功能的酶活性不能上调或不能表达。

附录：细胞培养系统快速使用指南

人胚胎干细胞	神经细胞	内皮细胞	肝细胞	肠上皮细胞	肿瘤细胞	BD Bioscience DL产品	
■	■	■	■	■	■	BD Matrigel基质	细胞培养试剂
■					■	高浓度层粘连/巢蛋白混合物	
	■	■	■	■	■	I型胶原蛋白	
	■				■	纤维粘连蛋白	
■	■				■	层粘连蛋白	
	■				■	多聚左旋赖氨酸PDL	
	■		■		■	BD PuraMatrix多肽水凝胶	
■					■	碱性成纤维细胞生长因子bFGF	
			■			肝细胞培养基	
	■	■	■	■	■	胰岛素转铁蛋白ITS	
		■				血管内皮生长因子VEGF	
		■				内皮细胞生长添加剂ECGS	
	■					神经生长因子NGF	
	■					内皮生长因子EGF	
				■		肠上皮细胞分化培养基	
			■			肠上皮细胞分化培养基组合	
				■		促生长因子混合剂MITO	
				■		接种基本培养基	
		■				人脐静脉内皮细胞HUVEC-2	
	■	■	■	■	■	酯化钙黄绿素Calcein AM	
	■	■	■	■	■	荧光染料DilC12 (3)	
■	■	■	■	■	■	分散酶	
■	■	■	■	■	■	细胞回收液	
■						人干细胞培养专用BD Biocoat Matrigel基质包被孔板	细胞培养工具
		■	■	■	■	BD Biocoat I型胶原蛋白包被培养板	
			■			肝细胞培养专用BD Biocoat Matrigel基质	
	■			■	■	BD Biocoat 多聚赖氨酸包被培养板	
■	■				■	BD Biocoat 层粘连蛋白包被培养板	
	■				■	BD Biocoat 多聚右旋鸟氨酸/层粘连蛋白包被培养板	
	■				■	BD Biocoat 多聚左旋赖氨酸/层粘连蛋白包被培养板	
■	■	■	■	■	■	BD Falcon 细胞培养载玻片	
■	■	■	■	■	■	BD Falcon TC处理培养瓶	
■	■	■	■	■	■	BD Falcon 96孔成像板	
■	■	■	■	■	■	BD Primaria培养器皿	
			■			胆酸荧光素CLF	肝细胞
			■			BD Gentest肝细胞	
			■			肝细胞分化环境	细胞培养环境
		■				内皮细胞生长环境	
		■				BD Biocoat 血管生成系统：内皮细胞生成	
		■				BD Biocoat 血管生成系统：内皮细胞迁移	
		■				BD Biocoat 血管生成系统：内皮细胞侵袭	
				■		BD Biocoat 肠上皮细胞分化系统	
				■		BD Biocoat HTS Caco-2检测系统	
					■	BD Biocoat Matrigel侵袭小室	
					■	BD Biocoat 肿瘤侵袭系统	
				■		BD Biocoat 纤维胶原蛋白包被的细胞培养小室	细胞培养小室
				■		BD Biocoat 纤维胶原蛋白包被的24孔细胞培养系统	
■	■	■	■	■	■	BD Biocoat 和Falcon 细胞培养小室	

● 碧迪医疗器械（上海）有限公司

上海市南京西路 1168 号
中信泰富广场 30 楼, 200041
Tel: (021) 32104610 转 BDB DL
Fax: (021) 52925191

欢迎访问

BDIS: www.bd.com/china

www.bdfacs.com.cn

www.bdbiosciences.com

facservice@bdis.com

PMG: techserv@pharmingen.com

LABWARE: labware@bd.com

BIOIMAGING: www.bdbiosciences.com/bioimaging_systems/products/

