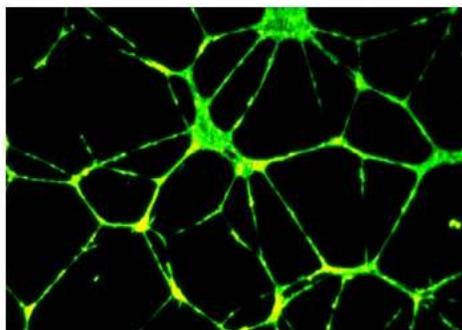


实验方法

实验程序：内皮细胞管形成实验



血管再生描述了许多细胞事件，包括内皮细胞迁移、侵袭和分化成毛细血管。通过血管再生剂，体外的血管再生实验已经作为一个模型来研究内皮细胞的分化和内皮细胞管形成的调控。通过使用自动成像仪和MetaMorph[®]软件能实现荧光标记细胞的图像采集和定量。在下列的实验程序中，当最小化钙荧光素乙酰氧基甲酯对人微血管内皮细胞系(HMEC-1和HMVEC)和初级人脐静脉内皮细胞(康宁HUVEC-2)的毒性效应时，内皮细胞管形成的实验条件和用于定量的细胞标记已经优化以最大化荧光信号。实验结果可能的变异取决于细胞、使用的染料和特定的实验条件。

材料：

- Corning[®] Matrigel[®]基质，10 mL (康宁货号354234)；康宁基底膜基质批次推荐浓度：10 mg/mL或更高。
- Falcon[®] 24孔平底标准组织培养处理板(康宁货号353047)。
- 内皮细胞培养基(例如，EGM-2 MV，Lonza货号CC-4147)。
- 作为血管生成刺激物的小牛血清或合适的生长因子。
- Hanks平衡盐溶液(HBSS) (例如，Life Technology货号14025-092)。
- 荧光基团(例如，康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯荧光染料，10x50 µg，康宁货号No. 354216)。
- 二甲基亚砜。
- 湿润的组织培养抑制剂37 °C，5% CO₂浓度。
- 内皮细胞，例如HMEC-1、HMVEC或康宁HUVEC-2细胞(康宁货号354151)。
- 超净工作台
- 自动成像仪、荧光显微镜、细胞管定量软件。

实验程序：

Corning Restricted

1.0 康宁基底膜基质的重构

颜色的变化可能发生在冷冻或解冻康宁人工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。

- 1.1 在冰上4℃解冻康宁基底膜基质。
- 1.2 一旦解冻，旋转药瓶以确保材料均匀分散。
- 1.3 向药瓶的顶端喷洒70%乙醇，并在空气中干燥。
- 1.4 将产品放置在冰上，处理时请使用无菌操作。
- 1.5 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。

预防措施

康宁基底膜基质在22℃到35℃将快速凝胶化。请在冰上4℃过夜解冻。在使用前请将产品放置在冰上，当准备使用康宁基底膜基质是，请预冷移液管、吸头和管。

2.0 包被程序

注意：一旦凝胶化，Corning® Matrigel® 基质应该被立即使用。我们推荐至少10 mg/mL浓度的蛋白和康宁基底膜基质一起使用。康宁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，通过联系康宁来预定适合您蛋白浓度的特定批次的康宁基底膜基质。

- 2.1 按推荐的方法解冻康宁基底膜基质。使用预冷的移液管，均匀的混合。
- 2.2 将24孔细胞培养板放置在冰上，向每个孔中加入0.289 mL冷冻的康宁基底膜基质(10 mg/mL)。该量对于覆盖整个生长表面应该是足够的。如果康宁基底膜基质需要稀释到10 mg/mL，请使用无血清培养基稀释。
- 2.3 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℃预冷的离心机中将培养板离心300 x g，10分钟。
- 2.4 在37℃培养30-60分钟。
- 2.5 培养板现在可以使用了。

3.0 内皮细胞管形成实验

- 3.1 准备上述的内皮细胞管形成培养板。
- 3.2 用要求的内皮细胞培养基培养内皮细胞，达到要求的细胞融合度。对于康宁HUVEC-2、HMVEC和HMEC-1，推荐达到70-80%的细胞融合度。

注意：原代细胞应该低传代(例如，HUVECs细胞不应该传代超过5次)。

- 3.3 当使用康宁HUVEC-2、HMVEC或HMEC-1细胞时，通过胰蛋白酶处理单层细胞来制备细胞悬液，并且在 4×10^5 个细胞/mL时用含5-10%血清或您需要的血管再生促进剂的培

培养基重悬细胞。在此步骤时也可以外加测试剂，例如抑制剂。

注意：大部分内皮细胞培养基没有足够浓度的血清来失活胰蛋白酶。推荐使用胰蛋白酶中和溶液。

3.4 向每个孔中加入300 μl 的细胞悬液(1.2×10^5 个细胞的康宁HUVEC-2、HMVEC或HMEC-1)。

3.5 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度的条件下将血管再生实验培养板培养16-18小时。

4.0 细胞管形成的测定——Corning®钙荧光素乙酰氧基甲酯荧光染料的标记

注意：24孔培养板的每个孔需要300 μl 溶于Hanks平衡盐溶液(HBSS)的8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的钙荧光素乙酰氧基甲酯染料。由于移液时的损失，我们推荐每板配制9 mL的染料溶液。如果您使用的是50 μg 的瓶装康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯，那么您需要2瓶。推荐使用HBSS是因为培养基的使用会导致标记的自溶，产生不能接受的高背景。这一部分可以在非无菌的条件下操作。

4.1 准备8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯溶液。对于每个培养板，您需要9.0 mL的康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯染料溶液。如果您使用2瓶50 μg 的荧光素乙酰氧基甲酯，请量取12.5 mL的HBSS并加热到37 $^{\circ}\text{C}$ 。在每瓶50 μg 的康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯中加入20 μl 的DMSO，之后将2瓶的量转移至总体积为12.5 mL的HBSS中，使终浓度为8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4.2 在培养之后(步骤3.5)，小心地从培养板中移除培养基。请小心不要破坏可能已经在康宁基底膜基质中形成的细胞管。使用巴氏吸管轻柔的移除培养基可以完成这一步骤。

4.3 向每个孔中加入750 μl 的HBSS，使用HBSS漂洗培养板。像4.2步骤描述的那样去除HBSS。

4.4 重复漂洗一次。

4.5 向每孔中加入300 μl 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶于HBSS的康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯标记细胞，在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度的条件下培养30-40分钟。

4.6 像4.2步骤描述的那样去除HBSS。

4.7 像4.3步骤描述的那样用HBSS漂洗培养板2次。

4.8 现在培养板可以利用自动成像仪或荧光显微镜拍照。

注意：一旦发生水解，细胞中康宁钙荧光素乙酰氧基甲酯的泄露会导致较高的背景。标记好的培养板需要在4 $^{\circ}\text{C}$ 存放1-2小时以最小化背景的增加。

4.9 使用要求的硬件和软件获取图片。我们使用Gen-1基于细胞的筛选系统和MetaMorph®软件来自动获取图片并测量细胞管长度。

4.10 如果没有自动图像采集设备，可以使用荧光显微镜来手动获取图像，处理图像时请使用MetaMorph或其他相似的软件。

注意：不同的研究人员会测量许多参数，例如细胞管长度、细胞管面积或分支点。在血管



CORNING

康宁生命科学（吴江）有限公司

江苏省吴江市经济开发区

庞金路 1801 号 T03/17

www.corning.com/lifesciences/china

再生系统中，内皮细胞管形成(康宁货号354149和354150)，利用MetaMorph软件系统来测量细胞管的形成。一些其他用于测量细胞管形成范围的常用图像采集软件包包括BD Pathway™ 855生物图像采集器，其含有精细的图像采集和数据分析算法；Image-Pro® Plus (媒体控制www.mediacy.com)和NIH图像采集(<http://rsb.info.nih.gov/nihimage/index.html>)。

Corning Restricted

CORNING

FALCON®

AXYGEN®

GOSSSELIN®

PYREX®