

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

Corning® BioCoat™ Matrigel® 侵袭小室 常见问答

康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室是研究恶性肿瘤细胞侵袭的有用工具。对于细胞的转移，它们必须能够分泌蛋白酶来分解基底膜并迁移。侵袭通过一个康宁基底膜基质包被的细胞培养嵌入皿已经成为细胞转移潜能高通量定量和定量测定的金标准，包括细胞侵袭和细胞侵袭抑制的机制研究¹⁻¹⁰。

问：我怎样准备康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室以备使用？

答：从-20℃储存物中除去包装并将其解冻到室温。

检查嵌入皿在配套培养板的凹位。向嵌入皿的内部加入温热的碳酸氢盐基本培养基。对于精确的体积，请参看康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室使用指南(产品会附带)。在5% CO₂培养箱中允许再水化2个小时。

注意：如果在同一实验中您不想使用全部的嵌入皿，那么请不要将它们解冻，因为反复冻融会破坏基底膜基质屏障。请在无菌条件下打开包装，并且，使用无菌钳将嵌入皿转移到独立的配套培养板中解冻。在原包装中将不用的嵌入皿包装好并快速把它们放回到-20℃冰箱。

问：我应该向上部或底层小室中加入趋化因子吗？

答：趋化因子应该放置在较低的、或基底外侧的小室中。它会缓慢地扩散进上部、或顶层小室中，对不同层细胞设置趋化因子梯度。详细的说明请参看康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室使用指南。

问：如果我引入了气泡，这有关系吗？我应该怎样避免气泡？



答：重要的是康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室在凹槽上并且没有气泡。向Falcon®组织培养配套板的孔中加入含有趋化因子的预热培养基，或者加入纯培养基到阴性对照孔中。使用无菌钳转移小室到预先充满的配套培养板的孔中。为了避免气泡，请以微小的角度倾斜小室，因为这样其能降到液体中并匹配凹槽。如果有气泡产生，请小心地轻敲培养板的一侧来驱逐气泡。

问：我不想在迁移/侵袭实验中让细胞变弱，因此我能向上部小室中加入血清吗？

答：我们不建议向顶层小室中加入血清；尝试使用0.1%的BSA代替。我们建议开始时使用

Corning Restricted

CORNING

FALCON®

AXYGEN®

GOSSSELIN®

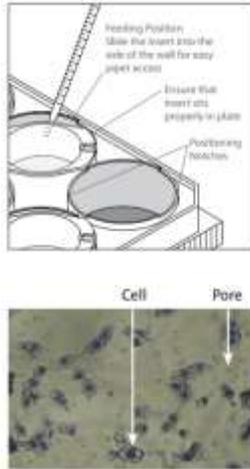
PYREX®

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

牛血清蛋白(康宁商品目录号354331)。如果您必须向顶层隔室加入血清，请使用0.4%浓度。在顶层小室中高浓度的血清会干扰趋化因子梯度。

问：我使用了Corning® BioCoat™ Matrigel®侵袭小室和康宁BioCoat对照嵌入皿，但是细胞在嵌入皿的底部是不均匀的。为什么会发生这种情况？



答：这存在着某些正常的变化，您应该计算多个视野的情况。所有的条件应该执行3次。在设置实验时总要检查气泡，因为细胞不能迁移通过干燥的膜。请一直使用Falcon® 24孔细胞培养嵌入皿配套培养板和其配套系统(康宁商品目录号353504)以及Falcon 6孔细胞培养嵌入皿配套培养板(康宁商品目录号353502)——不要使用标准的多孔培养板。确保嵌入皿在配套培养板的凹槽定位。

问：在显微镜下细胞看起来将是什么样的？

答：由于细胞类型的不同，细胞看起来会有轻微的不同。细胞将会有不规则的形状。孔将是圆的或卵形的并有折射。

问：如果孵育时间长，在迁移/侵袭后细胞会增殖吗？

答：我们推荐在未包被的嵌入皿上做一个迁移的对照并以侵袭通过康宁基底膜基质侵袭小室的细胞数除以迁移通过对照嵌入皿的细胞数再乘以100的方式计算迁移百分比。这控制增殖。具体细节请参看康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室使用指南。

问：在膜上染色细胞有什么试剂推荐？

答：我们建议任何对细胞质和细胞核区别染色的比色染色，例如苏木精和伊红(H&E)或瑞特染色剂。这些染料类型的2个例子是Diff-Quik™ (VWR商品目录号47733-150)和Hemacolor®染色组(Merck KGaA, Darmstadt, 德国, 商品目录号65044-93)。

问：从嵌入皿中清除基底膜基质有什么技巧吗？

Corning Restricted

CORNING

FALCON®

AXYGEN®

GOSSSELIN®

PYREX®

答：你应该从嵌入皿的顶部移去液体并预先湿润棉签。以一个角度拿住嵌入皿，这样膜的底部不会接触平面并轻柔地彻底清洗凝胶，小心的除去细胞但是不要从小室中分离嵌入皿的膜。

问：我能怎样去除膜？你能提供一个特殊的刀片吗？

答：不要从小室中去除膜，除非染色完全。我们不提供特殊的刀片。请使用#11解剖刀从小室中切割膜并立即将细胞一侧安放在显微镜载玻片上。把一滴浸镜油滴在膜上，在上面盖上盖玻片。

问：我能持有水化的嵌入皿多长时间？在水化之后能储存几天吗？

答：在正常的2小时复水化周期之后，您应该使用复水化的嵌入皿。如果因为您的细胞没有准备达到复制和增殖之间的CV，那么您必须在第二天使用它。请不要在24小时后使用。

问：我没能得到我的细胞非常多的侵袭，我应该怎么办？

答：请使用倒置显微镜来核实侵袭的细胞没有从嵌入皿的底部分离并落入了孔底。

因为接种培养基不含血清，请确保您在接种前使用了除去细胞的非酶切方法或使用血清洗涤失活胰蛋白酶。请确保您正在使用有凹槽的Falcon® 24孔细胞培养嵌入皿配套培养板(康宁商品目录号353504)和Falcon 6孔细胞培养嵌入皿配套培养板(康宁商品目录号353502)以及细胞培养嵌入皿在凹槽中。请在嵌入皿下没有气泡。不同的细胞类型侵袭有不同的比例，侵袭程序需要针对不同的细胞类型进行调整。作为第一步，在低层小室中将血清的浓度增加到10%，每个24孔嵌入皿增加细胞数量到50000个细胞或每个6孔嵌入皿增加到250000个细胞。如果这不能增加到充足地原始侵袭数量，您可以增加侵袭时间从24到48小时。

康宁BioCoat基底膜基质侵袭小室在科技文献中被高度引用，同时列出了许多细胞类型的具体细节。您可以联系康宁生命科学技术支持获得帮助，找到关于您特定细胞类型的参考文献。

问：对于我的IC50实验我尝试计算所有的那些嵌入皿，存在更简单的方法来定量侵袭吗？

答：是的，我们有Corning® BioCoat™ 24孔(康宁商品目录号354165，一包；354166，五包)和96孔(康宁商品目录号354167，一包；354168，五包)肿瘤细胞侵袭系统。这些系统利用康宁FluoroBlok™膜，一个获得专利的有效地阻止400到700 nm范围光透射的不透光膜，允许以简化的非破坏性的方式进行荧光检测。呈现在嵌入皿的顶层小室中荧光标记的细胞不能被底部读数的荧光培养板读数仪通过FluoroBlok膜读数。一旦标记的细胞迁移通过膜，它们就不再被光源屏蔽并被容易被底部读数的荧光培养板读数仪检

测到。BioCoat肿瘤侵袭系统能被用于动力学或终点侵袭实验中。

参考文献

1. Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Sarkar, F.H. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the NF- κ B downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of VEGF in prostate cancer. *Cancer Res.* 67(7):3310 (2007).
2. Albini, A., and Benelli, R. The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. *Nat. Protocols.* 2(3):505 (2007).
3. Oxelmark, E., Roth, J.M., Brooks, P.C., Braunstein, S.E., Schneider, R.J., Garabedian, M.J. The cochaperone p23 differentially regulates estrogen receptor target genes and promotes tumor cell adhesion and invasion. *Mol. Cell Biol.* 26(14):5205 (2006).
4. Duxbury, M.A., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W., Whang, E.E. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene.* 23:1448 (2004).
5. Seton-Regers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., Brugge, J.S. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(5):1257 (2004).
6. Singh, A., Singh, U.P., Grizzle, W.E., Lillard, Jr J.W. CXCL12- CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab. Invest.* 84:1666 (2004).
7. Takada, Y., Kobayashi, Y., Aggarwal, B.B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- κ B activation by inhibiting I κ B α kinase activation, thereby suppressing NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J. Biol. Chem.* 280(17):17203 (2005).
8. Ichikawa, H., Takada, Y., Murakami, A., Aggarwal, B.B. Identification of a novel blocker of I κ B α kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF κ B-regulated gene products. *J. Immunol.* 174(11):7383 (2005).
9. Silvera, D., Rezina, A., Darvishian, F., Levine, P.H., Zolfaghari, L., Goldberg, J., Hochman, T., Formenti, S.C., Schneider, R.J. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat. Cell Biol.* 11:903-908 (2009).
10. Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosumi, M.,

Corning Restricted



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

Murayama, A., Kimura, K., Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. Nat. Cell Biol. 11:312-319 (2009).

授权/免责声明：除非另有规定，所有的产品仅限研究使用。不要打算将其应用于诊断和治疗程序中。请不要应用于人类。康宁生命科学没有主张这些产品相关的性能用于临床或诊断的应用中。

Corning Restricted

CORNING | FALCON[®] | AXYGEN[®] | GOSSELIN[®] | PYREX[®]