

CHAMOT

Matrix Gel For Organoid Culture , GFR、LDEV
Free、Phenol red-Free 实验操作指南

编号 : CM003-10CO

规格: 10mL



CHAMOT

乔默®生物

Specialize In Cytokines

CONTENT

1 小鼠小肠类器官培养

2 ESCs和iPSCs培养

3 细胞迁移和侵袭

4 体内成瘤实验

5 血管生成实验

6 成球实验

Matrix Gel 用于培养小鼠小肠类器官

应用指南

应用简介

类器官是简化的三维（3D）器官模拟体，作为新一代体外医学研究模型，广泛应用于基础生物学、疾病建模、药物开发及再生医学领域。干细胞与祖细胞通过自组织及其分化后代形成类器官。得益于肠道上皮的快速自我更新能力，肠道类器官成为体外治疗研究中最常用的类器官类型。位于肠道隐窝底部的干细胞可通过增殖分化为肠上皮细胞、杯状细胞、潘氏细胞及肠内分泌细胞，这些细胞是肠道类器官发育的关键。成功的体外类器官培养需依赖能精准模拟天然细胞外基质理化特性的 3D 基质。

Matrix Gel 是小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV 型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。**Matrix Gel** 专为支持类器官生长与分化优化开发，每批次产品均通过质控检测，可形成类器官培养体系中常规应用的稳定三维穹顶结构。

本指南验证了 **Matrix Gel** 在 IntestiCult™ 类器官生长培养基（小鼠）（STEMCELL Technologies）中支持小鼠肠道类器官连续传代超过七次的能力。培养类器官呈现典型出芽形态，且分化细胞表达特异性表面标志物。

产品参数

浓度：8-12 mg/mL

来源：小鼠肉瘤组织

缓冲液：DMEM（含酚红）/ DMEM（无酚红，PRF），含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件：长期保存需置于 -80°C；4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装，避免反复冻融。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意：**所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

**A.b. 关键材料与试剂**

产品名称	供应商	产品编号 #
Matrix Gel	Chamot Biotechnology	CM003-10CO
IntestiCult Organoid™ 培养基(小鼠)	STEMCELL Technologies	06005
温和细胞解离液	STEMCELL Technologies	100-0485
DMEM/F-12 (HEPES)	Thermo Fisher Scientific	11330032
牛血清白蛋白 (BSA)	Thermo Fisher Scientific	B14
庆大霉素	Thermo Fisher Scientific	15750060
70 μ m 过滤网	STEMCELL Technologies	27260
DPBS		
组织培养板/瓶		
50/15 mL 离心管		

B.a. 从小鼠新鲜小肠获取肠道隐窝

1. 冰上解冻 1 管 Matrix Gel。
2. 将 24 孔组织培养板置于 37℃ 培养箱预热至少 30 分钟。
3. 依据 IACUC 规范处死小鼠，截取约 20 cm 小肠。
4. 将小肠置于含 5 mL 预冷 (2-8℃) DPBS 的 10 cm 培养皿中。
5. 吸取 1 mL 预冷 (2-8℃) DPBS，将枪头从小肠一端伸入肠腔，冲洗肠腔。
6. 用手术剪纵向剪开小肠，用 1 mL 预冷 (2-8℃) DPBS 轻柔冲洗内肠壁 3 次。
7. 将小肠转移至含 15 mL 预冷 (2-8℃) DPBS 的 10cm 洁净培养皿中，用镊子夹持肠段充分漂洗。
8. 将肠段剪成 2 mm 片段，收集至含 15 mL 预冷 (2-8℃) DPBS 的 50 mL 离心管中。
9. 用预冷 (2-8℃) DPBS 预湿后的 10 mL 移液管上下吹打洗涤肠片段。静置离心管 30 秒，待小肠片段沉降后吸出上清弃置。重新加入 15 mL 预冷 (2-8℃) DPBS。重复 15-20 次至上清澄清。
10. 去除上清，重悬肠片段于 25 mL 室温 (15-25℃) 温和细胞解离试剂中，室温 (15-25℃) 摇床孵育 15 分钟 (20 rpm)。
11. 弃上清，重悬于 10 mL 预冷 (2-8℃) DPBS (含 0.1% BSA) 中，上下吹打三次。
12. 让大部分肠片段沉降到底部。移除上清液，将剩余悬液通过 70 μ m 滤网过滤至 50 mL 离心管中。标记滤液为“组分 1”并置于冰上。
13. 重复步骤 11-12 三次，得到组分 2 至组分 4。
14. 将各组分在 290 $\times$ g 下离心 5 分钟，温度保持在 2-8℃。小心弃去上清。
15. 将每个组分分别重悬于 10 mL 预冷 (2-8℃) 的 DPBS + 0.1% BSA 中。
16. 将每个悬液转移至标记有对应组分编号的新鲜 15 mL 离心管中。
17. 将各组分在 200 $\times$ g 下离心 3 分钟，温度保持在 2-8℃。小心弃去上清。



18. 将每个隐窝组分分别重悬于 10 mL 预冷 (2-8°C) 的 DMEM/F-12 (含 15 mM HEPES) 中。
19. 从每个组分悬液中各取 1 mL 加入 6 孔板的单个孔中, 使用倒置显微镜评估悬液质量。选择富含肠道隐窝的悬液。

注: 适合培养的隐窝大小不一, 通常类似于单层上皮细胞的小折叠片段。组分 3 和 4 通常富含理想的隐窝。

20. 对于选定的组分, 使用倒置显微镜计数 10 μ L 等分样品中的隐窝数量, 并计算每毫升悬液中的隐窝数量。
21. 从选定的组分中, 将含有约 2000 个隐窝的悬液分装至 15 mL 离心管中。

后续步骤请参考 C 部分进行肠道类器官培养。

B.b.复苏小鼠肠道类器官

1. 冰上解冻 1 管 **Matrix Gel**。
2. 将 24 孔组织培养板在 37°C 培养箱中预热 30 分钟。
3. 将含有类器官的冷冻管置于 37°C 水浴中解冻。通常需要不到 3 分钟。待冷冻培养基完全液化且类器官可见后立即进行后续步骤。
4. 将冷冻管中的内容物转移至 15 mL 离心管中, 并加入 9 mL DMEM/F-12 (含 15 mM HEPES + 1% BSA)。使用移液管轻柔吹打 5 次以重悬类器官。
5. 使用倒置显微镜计数类器官数量, 计算每毫升悬液中的类器官数量, 并将含有约 2000 个类器官的悬液分装至另一个 15 mL 离心管中。

后续步骤请参考 C 部分进行肠道类器官培养。

C. 小鼠小肠类器官培养

1. 将来自 B.a.或 B.b.步骤的类器官等分样品在 200 $\times$ g 下离心 5 分钟, 温度保持在 2-8°C。弃置上清。
2. 向类器官沉淀中加入 90 μ L 室温的完全类器官生长培养基 (小鼠)。
3. 加入 210 μ L **Matrix Gel**, 轻柔吹打 10 次以重悬沉淀。避免引入气泡。
4. 将悬液小心加入预热的 24 孔板的 5 个孔中, 每孔 50 μ L。将移液枪头保持在孔板底部上方, 并缓慢释放。样品应在每孔中央形成穹顶结构。避免引入气泡。
5. 将孔板转移至 37°C 培养箱中孵育 10-15 分钟, 直至 **Matrix Gel** 固化。转移过程中请勿扰动穹顶结构。
6. 沿孔壁缓慢加入 750 μ L 室温 (15-25°C) 的完整类器官生长培养基 (小鼠)。请勿直接将培养基滴加在凝胶穹顶上。
7. 向未使用的孔中加入无菌 DPBS。
8. 盖上孔板盖, 置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。
9. 每 3 天更换一次培养基, 使用 750 μ L 新鲜的完整类器官生长培养基 (小鼠), 室温 (15-25°C) 操作。使用 Nikon C2 共聚焦显微镜观察类器官的发育情况 (图 1)。小鼠肠道类器官应每 7-9 天传代一次, 平均传代比例为 1:5。

注 1: 新鲜分离的小肠隐窝通常在培养 2-4 天后开始出芽。

注 2: 对于从冷冻管复苏的类器官, 建议在用于下游实验前传代 2 次以获得最佳结果。类器官生长初期较慢, 1-2 天内形成球状体, 5-7 天后开始出芽。5-7 天后类器官即可传代。经过 1-2 次传代后, 类器官的典型生长特征应恢复正常。

D. 小鼠小肠类器官传代

1. 冰上解冻 1 管 **Matrix Gel**。
2. 将类器官生长完全培养基（小鼠）预热至室温（15-25℃）。将含 15 mM HEPES 的 DMEM/F-12 保持在冰上。
3. 将 24 孔组织培养板在 37℃培养箱中预热至少 30 分钟。
4. 轻柔移除每孔中的培养基。请勿扰动 **Matrix Gel** 的穹顶结构。
5. 每孔中加入 1 mL 温和细胞解离试剂，覆盖暴露的穹顶结构。室温（15-25℃）孵育 1 分钟。
6. 使用预湿的 1000 μ L 移液枪头，将孔内溶液上下吹打约 20 次以破坏穹顶结构并打散类器官。
7. 将悬液转移至 15 mL 离心管中。用额外的 1 mL 温和细胞解离试剂冲洗孔内，并加入同一离心管中。
8. 对每个需要传代的孔重复步骤 6-7。
9. 将含有类器官的 15 mL 离心管置于室温（15-25℃）摇床上，以 20 rpm 的速度孵育 10 分钟。
10. 在 $290 \times g$ 下离心 5 分钟，温度保持在 2-8℃。轻轻倾倒并弃去上清液。
11. 使用预湿的移液管将沉淀重悬于 10 mL 预冷（2-8℃）的 DMEM/F-12 中。
12. 在 $200 \times g$ 下离心 5 分钟，温度保持在 2-8℃。弃去上清液。

后续培养步骤请参考 C 部分。

E.a. 全标本免疫荧光染色

1. 移除培养基，并用 DPBS 洗涤含有小鼠肠道类器官的 **Matrix Gel** 三次。
2. 将类器官在 4%多聚甲醛（PFA）中室温固定 1 小时。
3. 用 DPBS 洗涤类器官两次，每次至少 15 分钟。
4. 通过梯度甲醇在室温下透化 3D 细胞模型。依次用以下溶液洗涤类器官：DPBS 洗涤两次；50%甲醇（溶于 DPBS）洗涤一次；80%甲醇（溶于去离子水）洗涤一次；最后 100%无水甲醇洗涤一次。
5. 依次用以下溶液洗涤类器官：20% DMSO/甲醇洗涤一次；80%甲醇（溶于去离子水）洗涤一次；50%甲醇（溶于 DPBS）洗涤一次；100% DPBS 洗涤一次；最后用含 0.2% Triton X-100 的 DPBS 洗涤一次。
6. 在 37℃下用 1% BSA（溶于 0.1% DPBS-Tween）孵育 1.5 小时，以阻断非特异性蛋白相互作用。
7. 与一抗（E-cadherin, Abcam）在 4℃下孵育过夜。
8. 与二抗（phalloidin, Thermo Fisher Scientific; DAPI, Thermo Fisher Scientific）在避光条件下孵育 3 小时。
9. 用 DPBS 洗涤样品三次，并进行共聚焦成像（Leica TCS SP8）。（图 2）

E.b. 免疫细胞化学（ICC）染色

1. 移除培养基，并用 DPBS 洗涤含有小鼠肠道类器官的 **Matrix Gel** 三次。
2. 将类器官在 4%多聚甲醛（溶于 DPBS）中室温固定 1 小时。
3. 用 DPBS 洗涤孔板三次。
4. 向孔中加入含 1%牛血清白蛋白（BSA, Sigma-Aldrich）的 DPBS，并通过上下吹打破坏 **Matrix Gel** 的结构。将类器官及其碎片转移至 1.5 mL 离心管中。
5. 让类器官静置几分钟，或离心 5-10 秒以加速沉淀。弃去上清液，避免扰动类器官。
6. 加入 30%蔗糖溶液，将类器官样品脱水过夜。
7. 将脱水后的类器官包埋于 OCT 化合物（Tissue-Tek）中，置于-80℃保存。
8. 对类器官样品进行 8 μ m 的冷冻切片。

9. 用含 0.1% Triton X-100 的 4%山羊血清 (Thermo Fisher Scientific) 对样品进行封闭和透化处理。
10. 将样品与下列 6 种一抗孵育过夜: Vimentin Cytoskeleton, Abcam; Lysozyme, Abcam; Chromogranin-A, Abcam; Mucin2, Abcam; Villin, Santa Cruz Biotechnology。
11. 与相应的二抗在避光条件下孵育 3 小时。
12. 用 DPBS 洗涤样品三次, 并进行共聚焦成像 (Leica TCS SP8)。(图 3)

数据展示

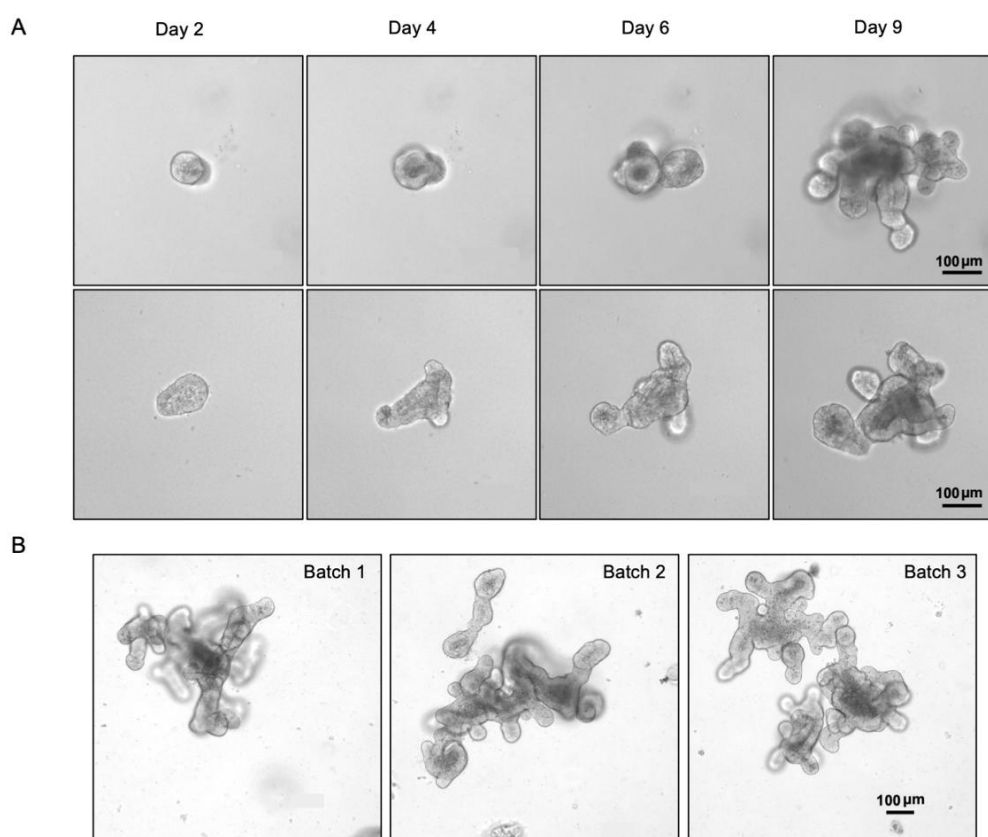


图 1. 在 **Matrix Gel** 中培养的小鼠小肠类器官。(A) 新鲜分离隐窝的原代培养图像 (典型出芽与管腔形态)。(B) 三个批次基质中传代培养的小肠类器官 (Batch 1: 第 6 代; Batch 2: 第 10 代; Batch 3: 第 9 代)。

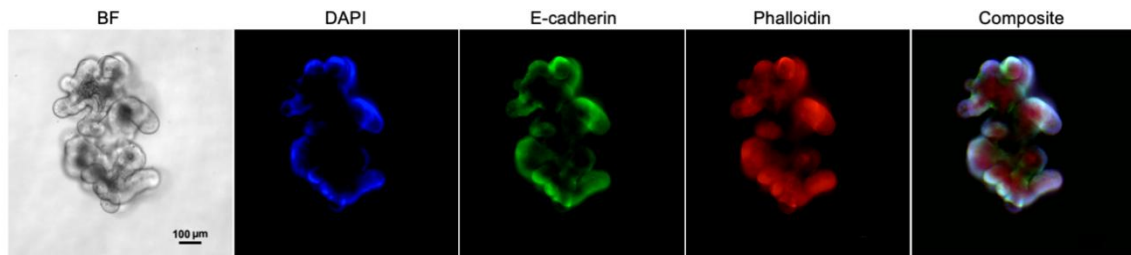


图 2. 在 **Matrix Gel** 中培养的小鼠小肠类器官全标本免疫荧光图像（DAPI、E-cadherin、Phalloidin 染色）。

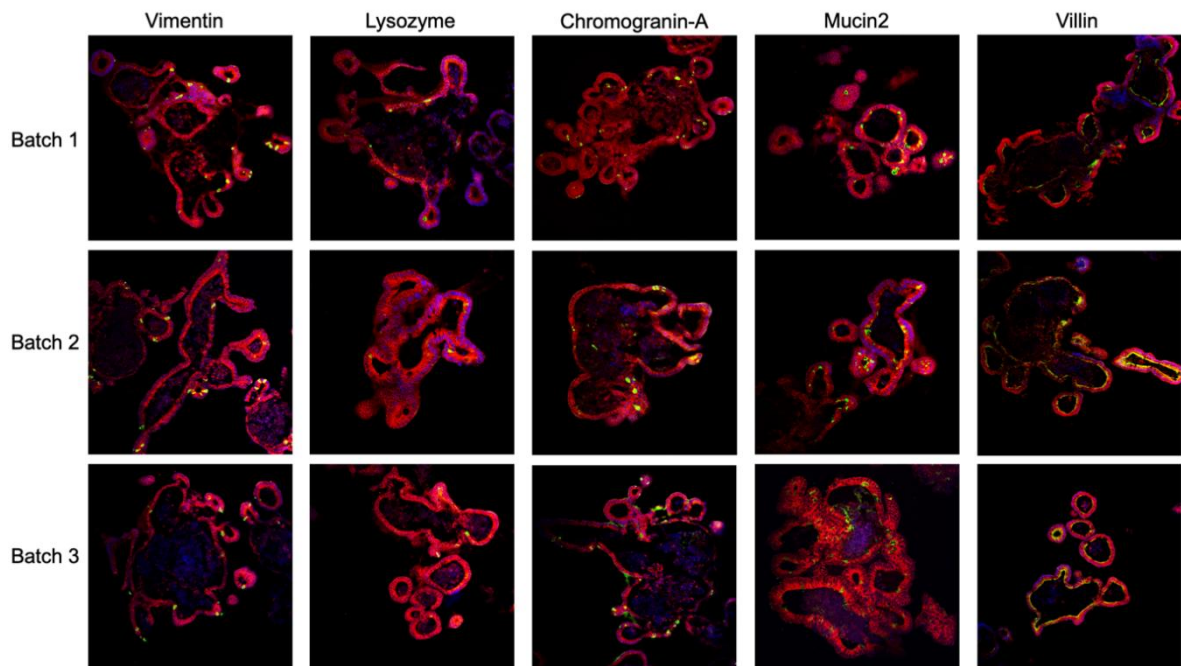


图 3. 在 **Matrix Gel** 中培养的三个不同批次（Batch 1: 第 6 代；Batch 2: 第 10 代；Batch 3: 第 9 代）小鼠小肠类器官的分化细胞分布情况。通过特异性标志物显示类器官中分化的肠道细胞，包括间充质细胞（vimentin）、潘氏细胞（lysozyme）、肠内分泌细胞（chromogranin-A）、杯状细胞（mucin 2）和肠上皮细胞（villin）。蓝色：DAPI（细胞核），红色：E-cadherin（细胞间连接），绿色：特异性标志物。

在涂有 Matrix Gel 的组织培养板上培养和维持人胚胎干细胞 (ESCs) 和诱导多能干细胞 (iPSCs)

应用指南



应用简介

基于诱导多能干细胞 (iPSC) 的模型在人类发育和疾病研究中具有巨大潜力。在无饲养层条件下维持和扩增人多能干细胞 (人胚胎干细胞[ES]和人诱导多能干细胞[iPS]) 可以消除饲养细胞固有的生物变异性 (培养系统中未定义的成分)，并提高实验的可重复性。理想的 iPSC 研究环境包括专门适用于 iPSC 细胞的培养表面和无血清、成分明确的培养基。**Matrix Gel** 作为一种高质量的培养表面与培养基组合，为 iPSC 的无饲养层扩增提供了完整的支持环境。

Matrix Gel 是从小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白 (糖蛋白)、IV 型胶原、巢蛋白 (糖蛋白)、基底膜蛋白聚糖 (硫酸乙酰肝素蛋白聚糖) 等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。

Matrix Gel 已广泛应用于干细胞培养、血管生成实验和组织工程等领域。**Matrix Gel** 是专为支持 iPSC 的贴附和扩增而优化的产品，每批次产品均经过验证，能够与 mTeSR™1 (产品编号 85850, STEMCELL Technologies) 配合使用，维持高质量的人 ES 和 iPS 细胞。

本指南展示了 **Matrix Gel** 在 mTeSR™1 培养基中支持 iPSC 连续传代超过 20 次的能力。在 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中维持的细胞高表达多能性标志物 (如 Oct-3/4 和 SSEA-3)，并且通过畸胎瘤实验证实这些细胞能够分化为三胚层，进一步证明了其多能性。

产品参数

浓度: 8-12 mg/mL

来源: 小鼠肉瘤组织

缓冲液: DMEM (含酚红) / DMEM (无酚红, PRF), 含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件: 长期保存需置于 -80°C; 4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装，避免反复冻融。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意:** 所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号
mTeSR™1 完全培养基	STEMCELL Technologies	85850
Matrix Gel	Chamot Biotechnology	CM003-10CO
温和细胞离解试剂	STEMCELL Technologies	100-0485
TrypLE™ select 重组酶	Thermo Fisher Scientific	12563011
CTS™ PSC 冻存培养基	Thermo Fisher Scientific	A4239301
Y-27632 (ROCK 抑制剂)	Sigma-Aldrich	Y0503
庆大霉素	Thermo Fisher Scientific	15750060
DPBS		
细胞培养板/瓶		
细胞刮刀		
50/15 mL 离心管		
台盼蓝		

B.a. 使用 Matrix Gel 涂布培养器皿

与完整的干细胞培养基（如 mTeSR™1 完全培养基）配合使用时，请根据分析证书上提供的稀释系数准备 **Matrix Gel** 的分装。分装体积通常为 270-350 μ L。

- 冰上解冻一份 **Matrix Gel**。
- 将 25 mL 预冷的 DMEM/F-12（含 15 mM HEPES）加入 50 mL 离心管中，并保持在冰上。
- 将解冻的 **Matrix Gel** 加入预冷的 DMEM/F-12 中（在 50 mL 离心管中），充分混匀。如有需要，可用预冷培养基冲洗分装管。
- 立即使用稀释后的 **Matrix Gel** 溶液涂布组织培养板/瓶。推荐涂布体积请参见表 1。
- 轻轻摇晃培养板/瓶，使 **Matrix Gel** 溶液均匀分布在表面。
注：如果培养板/瓶表面未被 Matrix Gel 溶液完全覆盖，则不可用于人 ES 或 iPS 细胞培养。
- 在室温（15-25℃）下孵育至少 1 小时后再使用。避免 **Matrix Gel** 溶液蒸发。
注：如不立即使用，需密封培养器皿以防止 Matrix Gel 溶液蒸发（例如使用 Parafilm® 密封），涂布后的培养器皿可在 2-8℃ 下保存最多 1 周。使用前需将保存的涂布培养器皿恢复至室温（15-25℃）30 分钟，然后继续步骤 7。
- 将培养板/瓶轻轻倾斜，使多余的 **Matrix Gel** 溶液汇集在边缘。使用移液管或吸液器移除多余溶液，确保涂布表面不被刮伤。
- 立即加入完全培养基（例：使用 6 孔板时每孔加入 2 mL）。

表 1. 使用稀释后的 Matrix Gel 溶液涂布推荐体积

培养器皿	溶液体积
6-孔板	1 mL/孔
100 mm 培养皿	6 mL/皿
T-25 cm ² 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 cm ² 培养瓶	8 mL/瓶

C. 人 ES 和 iPS 细胞的传代

在 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中培养的人 ES 和 iPS 细胞可以通过多种方法进行传代，包括酶解法和非酶解法。一下将介绍这些方法。温和的细胞离解试剂（STEMCELL Technologies）和 TrypLE™ Select 重组酶（Thermo Fisher Scientific）均与 **Matrix Gel** 兼容。温和的细胞离解试剂用于无酶解离法，生成的细胞团可能较为脆弱，应尽快重新接种。无酶法的优点在于其操作简便、细胞回收率高且能保护细胞表面蛋白的完整性（有助于细胞重新贴附基质）。

C.a. 温和的细胞离解试剂（非酶解法）

温和的细胞离解试剂（GCDR）是一种无酶试剂，用于通过手动刮取获得细胞团的方式传代人 ES 和 iPS 细胞。熟悉以下操作步骤后，可通过调整细胞团大小或接种密度来控制传代时间。以下为从 6 孔板的一个孔传代细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 传代前至少 1 小时，用 **Matrix Gel** 涂布新板（参见 **B.b.**部分）。
2. 分装足够的完全培养基并预热至室温（15-25℃）。
3. 使用显微镜观察分化区域，并用记号笔在孔板底部标记。
4. 用移液枪头或吸液器刮除分化区域。避免将培养板从培养箱中取出超过 15 分钟。
注：若分化区域少于 5%，可不进行选择；若培养质量高，选择区域不应超过孔的 20%。
5. 吸去孔中的培养基，加入 1 mL GCDR。
6. 室温孵育 6-8 分钟。
7. 吸去 GCDR，加入 1 mL 完全培养基。用玻璃移液管或细胞刮刀轻轻刮取细胞团。
注：尽量减少细胞团的破碎。
8. 将脱落的细胞团转移至 15 mL 离心管中。可选：用额外的 1 mL 完全培养基冲洗孔以收集剩余的细胞团。
注：无需离心细胞团。
9. 使用 2 mL 移液管轻轻吹打细胞团混合物 2-5 次，根据需要打散细胞团。50-200 μm 大小的均匀细胞团悬液为最佳；避免生成单细胞悬液。
10. 将细胞团混合物以所需密度接种到涂布好的孔中，孔内需预先加入完全培养基。若细胞团密度合适，可每 4-7 天按 1:10 至 1:50 的比例传代（即 1 孔的细胞团可接种至 10-50 孔）。若细胞团过密或过稀，下次传代时调整比例。
注：尽快将细胞团转移至新培养器皿中以最大化细胞活力和贴附率。
11. 将培养板放入 37℃ 培养箱中，快速前后左右移动培养板以使细胞团均匀分布。24 小时内不要扰动培养板。
注：细胞团分布不均可能导致人 ES 和 iPS 细胞分化增加。
12. 每天更换完全培养基，观察细胞生长情况直至下次传代。

C.b. TrypLE™ Select 重组酶（酶解法）

TrypLE™ 为现有胰蛋白酶方案的直接替代品。以下为从 6 孔板的一个孔传代细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 传代前至少 1 小时，用 **Matrix Gel** 涂布新板（参见 **B.b.**部分）。

2. 显微镜下观察细胞。若需成像，可通过更换培养基去除死细胞。期间建议使用培养基而非 DPBS，因为长时间 DPBS 孵育可能导致细胞脱落。
3. 弃去培养基。
4. 用 1 mL DPBS 洗涤一次并吸去。
5. 每孔加入 300 μ L 0.5X TrypLE™ Select 重组酶并均匀覆盖表面。
6. 将培养板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 分钟。
7. 1 分钟后取出培养板，轻轻重新分布 TrypLE™ Select 重组酶。
8. 继续孵育 3 分钟（总计 4 分钟）。
9. 取出培养板，显微镜下观察细胞（细胞应呈分离且圆形状态。4 分钟孵育会破坏细胞间连接，但细胞仍贴附于基质。注意：更长时间孵育会导致细胞脱落）。
10. 吸去 0.5X TrypLE™ Select 重组酶。
11. 用 2 mL/孔 DPBS 洗涤一次（轻轻加入 DPBS，因细胞易脱落）。
12. 每孔加入 1 mL 培养基。
13. 用细胞刮刀刮取细胞。
14. 显微镜下确认细胞已脱落。
15. 吹打细胞 10 次以完全解离，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中（防止细胞重新贴附）。
16. 使用自动细胞计数器（Countess）（iPSC 程序：灵敏度 5，最小尺寸 8，最大尺寸 30，圆形度 75）通过台盼蓝染色计数细胞。
17. 将 13,000 个活细胞接种到涂有 **Matrix Gel** 的 6 孔板（10 cm²）中（立即均匀分布细胞以避免贴附不均）。
18. 将培养板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。
注：每天更换培养基。若培养基变橙或黄色，需立即更换。通常在 8 天（ $\pm$ 1 天）内可获得约 1×10^6 个细胞（100 倍扩增）。

D. 细胞的冻存与复苏

在 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中维持的人多能干细胞可通过细胞团或单细胞形式冻存，使用 CTS™ PSC 冻存培养基（Thermo Fisher Scientific）等冻存液。适用于本手册中描述的常规细胞团传代方法。以下复苏方案适用于冻存前在 mTeSR™1 中维持的人 ES 和 iPS 细胞。

D.a. 以细胞团形式冻存细胞

注：打开冻存液瓶前，用 70%乙醇或异丙醇擦拭瓶外。

以下为使用 CTS™ PSC 冻存培养基冻存在 **Matrix Gel** 涂布的 6 孔板中培养的细胞的步骤。应在细胞正常传代时进行冻存。每管应包含 1 孔 6 孔板的细胞团。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 解冻并预冷 CTS™ PSC 冻存培养基至 2-8°C。
2. 使用无酶传代法（至步骤 8，**C.a.**部分）或酶解法（至步骤 15，**C.b.**部分）传代细胞。
3. 室温（15-25°C）下 300 $\times$ g 离心 5 分钟。
4. 轻轻吸走弃置上清，注意不要扰动细胞沉淀。
5. 用 1 mL/孔的预冷（2-8°C）CTS™ PSC 冻存培养基轻轻重悬细胞沉淀，尽量减少细胞团破碎。
6. 使用 2 mL 移液管将 1 mL 细胞团混合物转移至标记好的冻存管中。
7. 可以采用以下任一方法冻存细胞团：
 - 标准慢速程序降温法，以约 -1°C/分钟降温，随后长期保存于 -135°C（液氮）或更低温度。不建议长期保存于 -80°C。
 - 多步降温法：-20°C 保存 2 小时，随后 -80°C 保存 2 小时，最后长期保存于 -135°C（液氮）或更低温度。

D.b. 以单细胞形式冻存细胞

注：打开冻存液瓶前，用 70%乙醇或异丙醇擦拭瓶外。

以下为冻存在 **Matrix Gel** 涂布的 6 孔板中培养的细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。应在细胞正常传代时进行冻存。

1. 使用前将培养基、温和细胞离解试剂 (GCDR) 和 DPBS (不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 预热至室温 (15-25°C)。
2. 用 1 mL DPBS (不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 洗涤待传代的孔。
3. 吸去洗涤液, 加入 1 mL GCDR, 37°C 孵育 8-10 分钟。
注: 使用不同细胞系或其他传代试剂时, 孵育时间可能不同。
4. 用移液管上下吹打以确保单细胞悬液, 将细胞转移至 15 mL 离心管中。用 2-4 mL 培养基冲洗孔并加入离心管。
5. 使用台盼蓝染色进行活细胞计数。
6. 室温 (15-25°C) 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
7. 小心吸去上清, 留少量培养基以免扰动细胞沉淀。轻弹离心管重悬细胞沉淀。
8. 加入预冷 (2-8°C) CTS™ PSC 冻存培养基, 使细胞悬液浓度为 1×10^6 个细胞/mL, 充分混匀。
9. 将 1 mL 单细胞悬液转移至每个冻存管中。

D.c. 以细胞团形式复苏细胞

人 ES 和 iPS 细胞应复苏至 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中 (参见 B.b. 部分)。通常, 按上述方法冻存的一管细胞可成功复苏至 1-2 孔 6 孔板中。

1. 复苏前准备好所有试管、预热的完全培养基 (15-25°C) 和涂布好的培养器皿, 以确保复苏过程快速完成。
2. 用 70% 乙醇或异丙醇擦拭细胞冻存管外壁。
3. 在生物安全柜中, 拧松管帽四分之一圈以释放内部压力, 然后重新拧紧。
4. 在 37°C 水浴中轻轻摇晃冻存管快速解冻细胞。当剩余少量冻存细胞团时取出冻存管。不要涡旋振动细胞。
5. 用 70% 乙醇或异丙醇擦拭冻存管外壁。
6. 使用 2 mL 移液管将冻存管内容物转移至 15 mL 离心管中。
注: 使用 2 mL 移液管而非 1 mL 移液器可减少细胞团的破碎。
7. 逐滴加入 5-7 mL 预热的完全培养基至 15 mL 离心管中, 轻轻混匀。
8. 室温 (15-25°C) 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
9. 吸去培养基, 保留细胞沉淀。用 2 mL 移液管轻轻重悬细胞沉淀于 1 mL 完全培养基中, 注意保持细胞团状态。
10. 将 0.5 mL 细胞混合物转移至涂布好的 6 孔板中 (每孔含 mTeSR™1, 即每管可接种 2 孔)
注: 根据冻存的细胞团数量调整接种孔数。通常复苏后需接种更多细胞团。
11. 将培养板放入 37°C 培养箱中, 快速前后左右移动培养板以均匀分布细胞团。24 小时内不要扰动培养板。
注: 细胞团分布不均可能导致人 ES 和 iPS 细胞分化增加。
12. 每天更换 mTeSR™1 培养基, 观察细胞生长情况直至下次传代。通常在复苏后 6-7 天检查是否有未分化的细胞团 (中心密集) 可供传代。
注: 若复苏后仅观察到少量未分化细胞团, 可选择这些细胞团传代并重新接种至新涂布的孔中 (即不进行分盘)。

D.d. 以单细胞形式复苏细胞

人 ES 和 iPS 细胞应复苏至 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中 (参见 B.b. 部分)。通常, 按上述方法冻存的一管细胞可成功复苏至 1-2 孔 6 孔板中。

1. 复苏前准备好所有试管、预热的完全培养基 (15-25°C) 和涂布好的培养器皿, 以确保复苏过程快速完成。
2. 在完全培养基中加入 Y-27632 (ROCK 抑制剂) 至终浓度 10 μM 。
3. 用 70% 乙醇或异丙醇擦拭细胞冻存管外壁。
4. 在生物安全柜中, 拧松管帽四分之一圈以释放内部压力, 然后重新拧紧。
5. 在 37°C 水浴中轻轻摇晃冻存管快速解冻细胞。当剩余少量冻存细胞团时取出冻存管。不要涡旋振动细胞。



6. 用 70%乙醇或异丙醇擦拭冻存管外壁。
7. 使用 1 mL 移液器将冻存管内容物缓慢转移至含 5-7 mL DMEM/F-12 (含 15 mM HEPES) 的 15 mL 离心管中。
8. 室温 (15-25°C) 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
9. 小心吸去上清, 留少量培养基以免扰动细胞沉淀。
10. 加入 1 mL 含 10 μ M Y-27632 的完全培养基, 轻轻混匀。
11. 将细胞接种至涂布好的培养器皿中。
注: 通常, 一管含 1×10^6 个细胞的冻存管可复苏并接种至 1-2 孔 6 孔板中。
12. 将培养器皿放入 37°C 培养箱中, 快速前后左右移动以均匀分布细胞。
13. 每天更换完全培养基 (不含 Y-27632), 观察细胞生长情况直至下次传代 (即 80-90% 汇合)。通常在复苏后 2-5 天达到。
注: 不同细胞系达到 80-90% 汇合的时间可能不同, 需显微镜下观察以确定最佳传代时间。
14. 使用标准技术传代细胞以生成细胞团。
注: 不建议连续单细胞传代, 因会增加核型异常的风险。

数据展示

按照上述方案，在 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中对人 iPS 细胞进行了培养和传代测试。在 **Matrix Gel** 涂布的培养器皿中培养的未分化人 iPS 细胞生长为致密的多细胞集落，具有清晰的边界特征（图 1）。

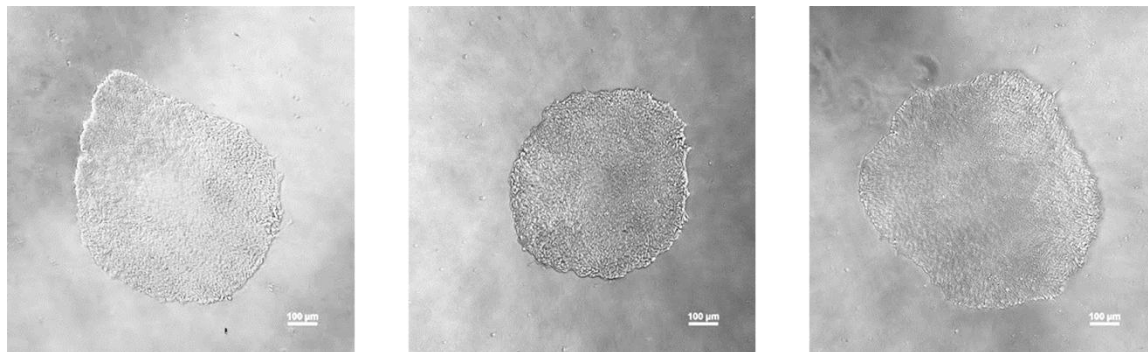


图 1. 在 **Matrix Gel** 涂布的培养板上培养的未分化人 iPS 细胞。

未分化的人 iPS 细胞还可通过特异性生物标志物的免疫细胞化学（ICC）染色进行表征（图 2）。

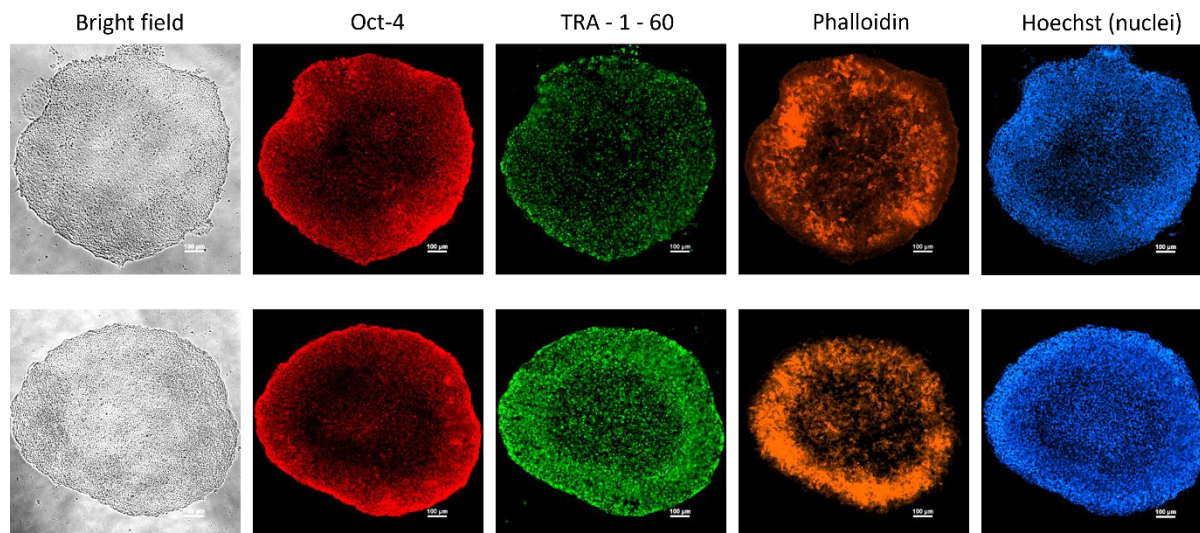


图 2. 在 **Matrix Gel** 涂布的培养板上培养的人诱导多能干细胞（iPSCs）免疫染色。iPSCs 在 **Matrix Gel** 培养 6 代后仍然维持了多能性标志物 Oct-4 和 TRA-1-60 的表达。

Matrix Gel 用于细胞迁移和侵袭

应用指南

应用简介

Matrix Gel 是从小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。

Matrix Gel 已广泛应用于干细胞培养、血管生成实验及组织工程等领域。

细胞迁移和侵袭实验是细胞生物学中的关键技术，特别是在伤口愈合、炎症和癌症转移的研究中。**细胞迁移实验**是一种分析细胞在特定化学刺激下移动的方法，通常通过检测细胞是否能穿过多孔膜来实现。目前最广泛接受的细胞迁移技术是博伊登小室实验。该实验使用一个一端密封有多孔膜的塑料腔室，将细胞放置在腔室内并允许其通过孔迁移到膜的另一侧。迁移的细胞随后被染色并计数。**细胞侵袭实验**是一种更高级的细胞移动分析方法，细胞需要穿过覆盖有细胞外基质（ECM）分子的滤膜。该实验用于检测细胞是否能同时穿过膜和细胞外基质（ECM）。在细胞侵袭实验中，小室膜会涂覆基质胶，而在细胞迁移实验中则不会。这些实验为研究细胞如何移动和与周围环境相互作用提供了宝贵的信息，尤其在癌症研究中，可用于研究癌细胞如何侵入周围组织并扩散到身体其他部位。

在本手册中，我们使用可渗透细胞培养小室和 **Matrix Gel** 来演示如何进行迁移和侵袭实验。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从-20/-80℃解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意：**所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10℃ 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号
Matrix Gel	Chamot Biotech	CM003-10CO
MDA-MB-231 细胞	ATCC	HTB-26
Transwell Insert, 24-well plates with 8-µm pores, PET 8 µm, Sterile	Chamot Biotech	CM001-12AR
0.2% 结晶紫溶液		
固定液（4% 多聚甲醛 PFA）		

B. . 操作步骤

1. **接种和增殖细胞：**使用完全 DMEM 培养基将 MDA-MB-231 细胞接种到合适的培养器皿中。接种密度为 5×10^3 细胞/cm² 至 2×10^4 细胞/cm²。每 2-3 天更换一次培养基。使细胞达到 70-90% 的汇合度。
2. **（仅适用于侵袭实验）Matrix Gel 涂布准备：**实验前一天，将 Matrix Gel 从冷冻室取出，置于冰上的冰箱中。在 4°C 下过夜孵育完成解冻。将 1 份 Matrix Gel 与 4 份预冷的 PBS 混合，充分吹打混匀。
3. **（仅适用于侵袭实验）用 Matrix Gel 涂布细胞培养插入小室：**将稀释后的 Matrix Gel 管置于冰上，轻轻颠倒几次。每个插入小室中加入 150 μ L 稀释后的 Matrix Gel。将培养板置于湿润的培养箱（37°C，5% CO₂）中孵育 30 分钟至 1 小时，使基质完全凝胶化。在某些情况下，您可能会观察到基质固化后仍有少量液体残留。如有需要，可小心吸去插入小室中多余的液体。
4. **在细胞培养插入小室上接种细胞：**确定细胞计数，并用无血清培养基将细胞悬液稀释至所需的接种密度。在本实验中，24 孔板格式中使用了 100 μ L 含有 2×10^5 个细胞的悬液。向底部孔中加入 650 μ L 含趋化剂的培养基。本实验中使用的是含 10% FBS 的 DMEM。
5. **孵育：**将 24 孔板置于湿润的培养箱（37°C，5% CO₂）中孵育 12 小时。
6. **固定：**吸去底部孔和细胞培养插入小室中的培养基。用 PBS 洗涤插入小室和底部孔。用棉签轻轻擦拭每个插入小室内部，以去除未迁移/侵袭的细胞。特别注意膜边缘的清洁。向插入小室中加入 200 μ L 固定液，向孔中加入 500 μ L 固定液，室温孵育 15 分钟。倒掉固定液，彻底冲洗插入小室和孔。
7. **染色：**向每个底部孔中加入 500 μ L 结晶紫溶液，并将插入小室放入孔中。注意插入小室下方是否有气泡。15 分钟后，倒掉染色液，用 PBS 彻底冲洗插入小室。插入小室即可用于成像。

数据展示

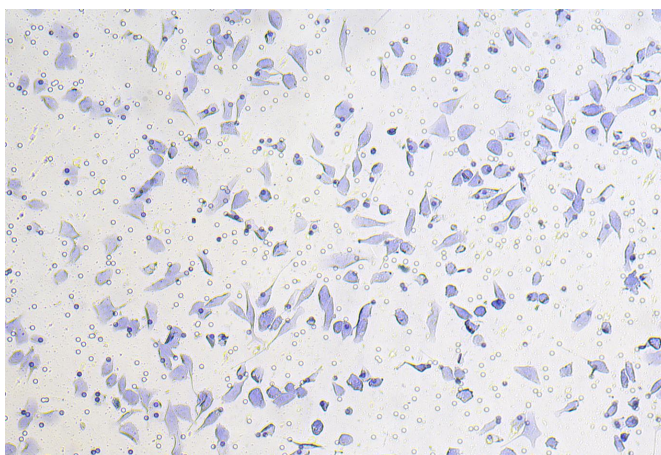


图 1. 显微镜下观察迁移后的细胞。

Matrix Gel用于促进体内肿瘤生长

应用指南

应用简介

Matrix Gel 是从小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。

Matrix Gel 已广泛应用于干细胞培养、血管生成实验及组织工程等领域。

细胞源异种移植（CDX）模型是种评估抗癌疗法的标准。免疫缺陷动物中建立的异种移植模型对药物的反应与临床实践高度一致，使其成为肿瘤学研究的可靠工具。本指南验证了 **Matrix Gel** 在促进裸鼠细胞源异种移植瘤形成中的有效性。

产品参数

浓度：8-12 mg/mL

来源：小鼠肉瘤组织

缓冲液：DMEM（含酚红）/ DMEM（无酚红，PRF），含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件：长期保存需置于-80℃；4℃保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装，避免反复冻融。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从-20/-80℃解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意：**所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10℃以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号
Matrix Gel	Chamot Biotech	CM003-10CO
BALB/c 裸鼠		
Lewis 肺癌细胞（LLC）	ATCC	CRL-1642

B. 细胞制备

- 植入前 3 天，将细胞接种于 10 cm 培养皿（ 0.5×10^6 细胞/皿）。
- 植入前 1 天更换培养基（DMEM/F12 + 10% FBS + 1% 青链霉素）。
注：细胞活性是异种移植成功的关键，需保持培养基新鲜。
- 胰酶消化收集细胞，PBS 清洗 3 次，计数后重悬于 PBS（ 1×10^7 细胞/mL）。
注：细胞悬液总体积根据实验所需小鼠数量调整。

- 按每只小鼠 1.5 mL 离心管的比例，将 60 μ L 细胞悬液与 60 μ L **Matrix Gel** 混合（细胞与基质体积比为 1:1）。

注：**Matrix Gel** 在 10℃ 以上会凝胶化，需提前 4℃ 过夜解冻并全程冰上操作。混合使用的枪头与离心管需预冷。提高细胞密度或基质比例通常可优化实验结果。若直接使用基质重悬细胞沉淀，需确保全程低温。

C. 将细胞-基质胶混合液植入 BALB/c 裸鼠

- 通过异氟烷吸入麻醉小鼠，操作过程中保持小鼠体温并监测呼吸。
注：需遵循 IACUC 规程控制异氟烷剂量。
- 用 70% 乙醇对注射部位消毒 3 次。
- 使用 21-25G 针头将混合液皮下注射至小鼠体内，避免细胞损伤。

D. 监测肿瘤生长

- 每日观察小鼠健康状况。
- 每周 3 次使用游标卡尺测量肿瘤尺寸，并记录小鼠体重至肿瘤体积达 1,000-1,500 mm³（注：实验终点需根据研究目标调整）。需记录肿瘤长径（最长直径）、短径（与长径垂直的直径）及高度。
- 根据实验需求在适当时机给予药物处理。

E. 收获肿瘤组织与器官

- 采用 CO₂ 窒息法处死小鼠，呼吸停止后持续通入 CO₂ 至少 1 分钟，随后实施颈椎脱位。
注：需遵循 IACUC 规程执行安乐死。
- 用 70% 乙醇清洁肿瘤区域。
- 切开皮肤并小心剥离肿瘤，置于无菌管中并于冰上保存。
- 收获的肿瘤可进一步用于染色与表征分析。

数据展示



图 1. 裸鼠体内形成的 LLC 异种移植瘤

Matrix Gel 支持体外血管生成

应用指南

应用简介

Matrix Gel 是小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV 型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。

Matrix Gel 基质胶已成功应用于干细胞培养、血管生成检测和组织工程等研究。

血管生成既是正常组织发育与创伤愈合的关键过程，也与多种病理状态相关。本方案可实现体外血管生成的快速定量检测。实验可采用原代或永生化内皮细胞系，本文以人脐静脉内皮细胞（HUVEC）为例，但该方案同样适用于 SVEC4-10（小鼠）或 3B-11（小鼠）等内皮细胞系。根据所选细胞系特性（是否经过转化处理），需通过预实验优化管状结构形成的最佳观察时间。

本指南验证了 **Matrix Gel** 在血管生成培养基中支持人脐静脉内皮细胞（HUVECs）体外成管的能力。

产品参数

浓度：8-12 mg/mL

来源：小鼠肉瘤组织

缓冲液：DMEM（含酚红）/ DMEM（无酚红，PRF），含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件：长期保存需置于 -80°C；4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装，避免反复冻融。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意：**所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号 #
Matrix Gel	Chamot Biotech	CM003-10CO
HUVEC 人脐静脉内皮细胞	ATCC	CRL-1730
EGMTM 2 Growth Medium 血管生成培养基	Lonza	CC-3162

B. 血管生成实验步骤

1. 内皮细胞接种与培养。使用内皮细胞专用培养基，按 Lonza 产品手册推荐密度 ($5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 细胞/cm²)接种于适宜培养容器。每 2-3 天更换培养基，待细胞汇合度达 70-90%时进行后续实验。
2. 化冻 **Matrix Gel**。实验前一日将基质从冷冻环境转移至 4℃冰盒，低温过夜解冻。
3. 使用 **Matrix Gel** 包被 96 孔板。将完全解冻的 **Matrix Gel** 置于冰上，轻柔颠倒混匀。取预冷 96 孔板，每孔精准加入 50 μ L 基质溶液，确保液面均匀覆盖孔底。置于恒湿培养箱 (37℃, 5% CO₂) 中孵育 30 分钟至 1 小时，待 **Matrix Gel** 完全凝胶化。
4. 内皮细胞悬液制备。收集处于对数生长期 (70-90%汇合度) 的内皮细胞，用含 0.5~10%血清或特定促血管生成因子的培养基重悬，调整细胞密度至 $1 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL。每孔轻柔加入 150 μ L 细胞悬液 (含 $1.5 \sim 3 \times 10^4$ 细胞)，注意避免触碰凝胶表面。
5. 诱导培养。将培养板置于恒湿培养箱 (37℃, 5% CO₂) 中培养 4-20 小时。可通过倒置显微镜在选定时间点观察管状结构形成过程。

数据展示

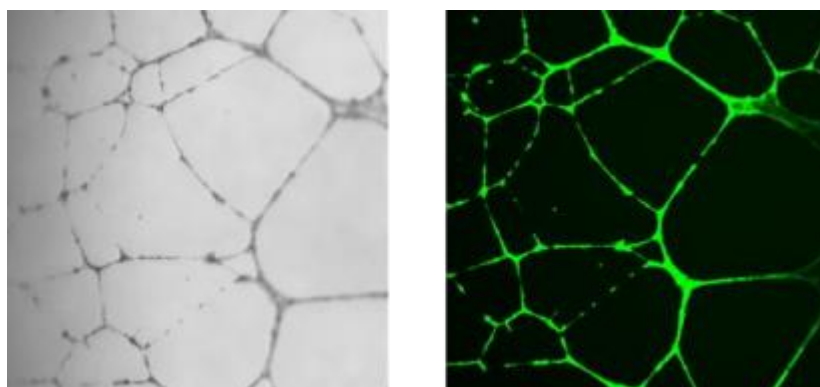


图 1. **Matrix Gel** 支持人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 体外血管生成

超低吸附孔板和 Matrix Gel 支持成球实验

应用指南

应用简介

球状体是三维细胞培养领域的经典模型，指通过细胞自组装形成的球形微组织。相较于传统二维培养，球状体能更精确模拟体内三维微环境，呈现紧密的细胞间相互作用与梯度分布特征。早在 20 世纪 70 年代，研究者已采用悬滴法等技术构建球状体用于肿瘤生物学研究。随着三维培养技术的持续革新，该模型已成为研究肿瘤侵袭、药物筛选及干细胞分化的理想体系。

Chamot 的超低吸附 U 型底孔板是专为细胞培养与高通量筛选设计的实验器具。其搭载的超低吸附技术为 Chamot 生物科技专利表面处理工艺，可显著降低细胞与培养表面的黏附力。本方案将演示该微孔板在球状体构建中的应用。

Matrix Gel 是小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜，包含层粘连蛋白（糖蛋白）、IV 型胶原、巢蛋白（糖蛋白）、基底膜蛋白聚糖（硫酸乙酰肝素蛋白聚糖）等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。

Matrix Gel 可增强球状体致密性与结构稳定性，但许多情况下并非必需组分，建议研究者根据具体细胞类型开展预实验评估其必要性。

产品参数

浓度：8-12 mg/mL

来源：小鼠肉瘤组织

缓冲液：DMEM（含酚红）/ DMEM（无酚红，PRF），含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件：长期保存需置于 -80°C；4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装，避免反复冻融。

操作指南

A.a. Matrix Gel 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Matrix Gel**。所有操作需在冰上进行，并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意：**所有接触 **Matrix Gel** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度，解冻的 **Matrix Gel** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号 #
Matrix Gel	Chamot Biotech	CM003-10CO
Ultra-Low Adhesion Plate, 96-well, Round Bottom	Chamot Biotech	CM004-96ARR
MDA-MB-231 细胞	ATCC	HTB-26

B. 实验步骤

1. MDA-MB-231 细胞接种与培养。使用经 TC 处理的培养容器，以完全 DMEM 培养基接种细胞。常规条件下培养 3-4 天，待细胞汇合度达 70-90% 时进行后续操作。
2. 化冻 **Matrix Gel**。实验前一日将 **Matrix Gel** 从 -20/-80℃ 转移至 4℃ 冰盒过夜解冻。
3. 细胞悬液制备。实验当日吸弃原培养基，使用 1×PBS 轻柔清洗细胞一次，胰酶消化后使用完全 DMEM 终止消化反应。
4. 细胞接种。离心收集细胞，用含 3% **Matrix Gel** 的完全 DMEM 培养基重悬细胞至 1×10^4 个/mL。取 200 μ L 细胞悬液加入 **Ultra-Low Adhesion Plate** 各孔，置培养箱中培养。研究者可根据实验需求调整接种密度与体积。
5. 球状体观察。培养第 4-9 天可收获成熟球状体。

数据展示

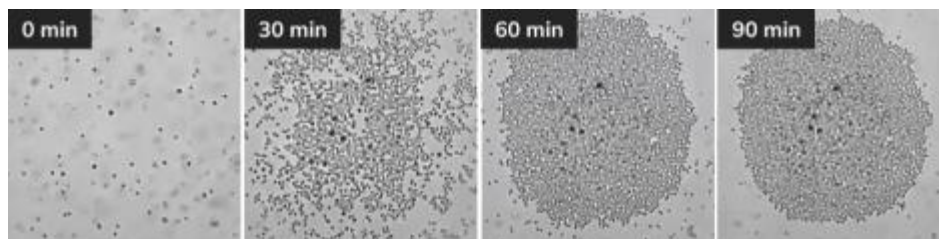


图 1. 加入细胞后，细胞在孔底中央迅速聚集

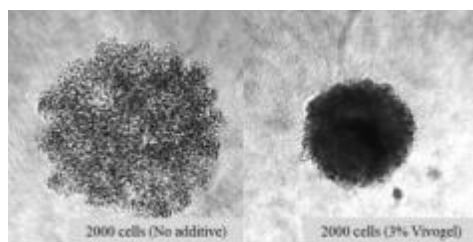


图 2. 球状体在培养5天后的形态

常见问题

1. 为何选用Chamot的超低吸附 U 型底微孔板？
经过处理的超低吸附表面可抑制细胞贴壁，促进细胞间相互作用；U 型孔底设计引导细胞向孔中心聚集，有利于形成均质化球状体。该体系较二维培养更能模拟体内微环境，适用于肿瘤与干细胞研究。
2. 球状体构建的最佳细胞密度如何确定？
最佳密度因细胞类型与目标球状体尺寸而异，推荐范围为 500-5,000 细胞/孔。建议通过预实验梯度筛选确定特定细胞系的最适条件。
3. 如何确保孔间球状体尺寸一致性？
 - 采用自动细胞计数仪保证接种精度
 - 接种前充分混匀细胞悬液



- 接种外圈孔填充 PBS 或培养基以消除边缘效应。
4. 如何监测球状体生长状态?
定期使用倒置显微镜观察 形态学特征：优质 球状体应呈规则球形，边界清晰光滑。可采用 Live/Dead 活死染色或 ATP 检测法（如 CellTiter-Glo）评估细胞活性
 5. 球状体培养如何换液?
建议采用半量换液法，既可维持球状体生长所需的分泌因子，又能减少机械扰动。换液后需显微镜确认球状体完整性。