



血管生成实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

| 名称 | 厂家 | 型号 |
|-----------------------|--------------|-----------|
| 立式冷藏柜 | 海尔 | SC-332 |
| 台式高速冷冻离心机 | 湖南恒诺仪器设备有限公司 | 2-16R |
| 超净工作台 | 苏净安泰 | SW-CJ-1FD |
| CO ₂ 细胞培养箱 | Thermo | 4131 |
| 电热恒温水浴锅 | 恩谊 | HH-48 |

2、主要实验试剂及耗材

| 耗材 | 厂家 | 货号 |
|------------------|--------------|----------|
| 1.5 ml 离心管 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTL-15-W |
| 2 ml 研磨管 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTL-20-W |
| 10 μ l 移液器 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTY-10 |
| 100 μ l 移液器 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTY-100 |
| 200 μ l 移液器 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTY-200 |
| 1000 μ l 移液器 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTY-1000 |
| 5000 μ l 移液器 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTY-5000 |
| T25 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTP-25-T |
| 胰酶 | 安徽科兔生物科技有限公司 | RG-CE-18 |
| PBS 缓冲液 | 安徽科兔生物科技有限公司 | RG-RT-01 |
| DMEM 培养基 | 安徽科兔生物科技有限公司 | RG-CE-2 |
| 血清 | 安徽科兔生物科技有限公司 | CG-SR-02 |
| 6 孔板 | 安徽科兔生物科技有限公司 | KTB-6 |
| 基质胶 | Biosharp | BL1833B |



二、实验步骤

- 1、将 HUVEC 细胞以适当密度接种于 6 孔板中。加入对应的抑制剂，将细胞放回培养箱，继续培养 48 小时。
- 2、24 小时后，从培养箱中取出细胞。用移液器小心地将每孔中的培养基（即条件培养基，CM）收集到 15 mL 离心管中。在 4°C，1000-1500 rpm 条件下离心 5 分钟，以去除细胞碎片。小心吸取上清液，分装到新的无菌离心管中。这就是我们需要的 XX 条件培养基。
- 3、将所有试剂、96 孔板和移液器吸头提前置于 4°C 冰箱预冷。整个过程在冰上操作。用预冷的吸头，向 96 孔板的每孔中加入 50 μ L 的 Matrigel 溶液，避免产生气泡。将 96 孔板在 37°C 培养箱中孵育 30-60 分钟，使 Matrigel 完全聚合。聚合后的 Matrigel 会变成不透明的固体胶。在铺胶的同时，用胰蛋白酶消化处于对数生长期的 HUVEC，重悬并计数。细胞重悬：用离心机在室温，300 \times g 条件下离心 5 分钟，弃去上清。用步骤一中制备的不同组别的条件培养基（或 CM/ECM 混合培养基）重悬 HUVEC 细胞，调整细胞密度至 1.0-2.0 \times 10⁵ 个/mL。培养 6-8 小时后，小心吸弃孔内培养基。每孔加入 100 μ L 4% 多聚甲醛，室温固定 15-30 分钟。

三、结果判读：

管状结构越多、分支越多、网状结构越完整，说明血管生成能力越强；管腔断裂、分支减少、网络不完整，则说明血管生成能力下降。

四、注意事项：

- 1、细胞状态要好
- 2、Matrigel 提前放 4°C 过夜融化；
- 3、不同孔之间 Matrigel 厚度必须一致，否则会影响细胞成管。