

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/00

C12M 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02141356.8

[43] 公开日 2003 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 1400306A

[22] 申请日 2002.6.4 [21] 申请号 02141356.8

[30] 优先权

[32] 2001.6.6 [33] US [31] 60/296,407

[71] 申请人 贝克顿迪肯森公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 A·迈尔斯 S·R·伊尔斯利

F·J·马努扎

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 给基质提供具有现成的均匀分布的
细胞外基质的方法

[57] 摘要

给基质提供现成的均匀分布的胞外基质的方法。该方法包括将胞外基质组分施涂于基质区域；保温胞外基质组分使之聚合；冷冻位于基质区域表面的、聚合的胞外基质；冻干位于基质区域的冷冻的胞外基质；将冻干的胞外基质温度回升到室温。还涉及细胞培育装置，它具有通过上述方法形成的干燥的均匀分配胞外基质。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种给基质提供现成的均匀分布的胞外基质的方法，其特征在于，包括步骤：
- 5 a)将胞外基质组分施涂在基质区域；
b)保温所述的胞外基质组分，使之聚合；
c) 冷冻位于所述基质区域冷冻的该聚合的胞外基质；
d)冻干位于所述基质区域的、冷冻的胞外基质；
e)将冻干的胞外基质升温到室温。
- 10 2. 如权利要求1所述的方法，其中所述胞外基质组分被保温足够时间以便所述胞外基质形成凝胶。
3. 如权利要求1所述的方法，其中所述胞外基质组分在升高的温度下保温。
4. 如权利要求1所述的方法，其中所述胞外基质组分在37°C的温度保温
- 15 。
5. 如权利要求1所述的方法，其中所述胞外基质组分在有二氧化碳存在下保温。
6. 如权利要求5所述的方法，其中所述二氧化碳的浓度为5%。
7. 如权利要求1所述的方法，其中所述聚合的胞外基质在冻干器中冷冻
- 20 。
8. 如权利要求1所述的方法，其中所述聚合的胞外基质在温度低于-30°C的条件下冷冻。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述胞外基质组分包含天然的胶原纤维。
- 25 10.如权利要求9所述的方法，其中所述胞外基质组分还包含的选自下组的组分：层粘连蛋白，巢蛋白，硫酸乙酰肝素蛋白多糖，生长因子，蛋白酶和它们的混合物。
- 11.如权利要求1所述的方法,其中所述基质是一种膜材料,它选自多孔膜，蚀刻膜,浇注膜及其组合。
- 30 12.如权利要求11所述的方法，其中所述的膜上的孔为约0.5—30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

插件膜表面。

13.如权利要求1所述的方法，其中基质包含选自下组的天然的或合成的聚合物：纤维素膜，多孔聚碳酸酯，多孔聚四氟乙烯，尼龙膜和网，玻璃滤网，聚对苯二甲酸乙二酯，聚甲基戊烷，聚丙烯，聚乙烯及其组合。

5 14.一种细胞培养装置，其特征在于，包含用于细胞生长的表面，所述的表面包被有胞外基质，所述的基质由下列步骤形成：

- a)将胞外基质组分施涂在基质区域；
- b)保温所述的胞外基质组分，使之聚合；
- c) 冷冻位于所述基质区域冷冻的该聚合的胞外基质；
- 10 d)冻干位于所述基质区域的、冷冻的胞外基质；
- e)将冻干的胞外基质升温到室温。

15.如权利要求14所述的装置，该装置包含生长培养基。

16.如权利要求15所述的装置，所述的培养基是DMEM。

17.如权利要求14所述的装置,其中所述培养装置还包括选自下组的附加
15 材料：细胞，抗体，酶，受体，生长因子，胞外基质的额外组分，细胞因子，激素，药物及其混合物。

18.一种细胞培养装置,其特征在于，包括适合细胞生长的表面；以及位于该表面上的胞外基质包被层，所述的基质包被层包含具有生物活性的蛋白溶液的聚合产物，其中所述基质中残留流体基本上通过冻干除去。

重构的基质膜，在结构、成分、物理性能和在体内保持功能特性的能力方面与活体基质膜相似。

已经使用MATRIGEL®基质开发了一些方法，从而在体外研究肿瘤细胞侵入基质膜基质的情况。典型的，这些方法涉及将MATRIGEL®基质包被在
5 细胞培养插件(inserts)的微孔膜上。制备含有ECM的细胞培养体系的常规技术包括，首先加热冰冷的、中性可溶胶原的溶液，以诱导天然的原纤维发生聚合和沉淀。在升高到4℃以上的温度下保温MATRIGEL®基质，可聚合这种基质。

然而，细胞培养中使用的无定型、化学交联和碱性改性的胶原质膜常常
10 被干燥，以改进储存寿命并且不必每次使用前制备这种细胞培养基，因而制备含有天然的纤维胶原质的细胞培养基并仅仅使用天然纤维的固定的、粘着的凝胶的形式。这些凝胶通常按照上述方法生产，即通过加热冰冷的、中性的可溶胶原溶液以诱导天然原纤维发生聚合和沉淀。可是，它们不能干燥储存，因为早先使天然纤维胶原质凝胶收缩和干燥的作法导致了天然结构的丧失，
15 次最佳的纤维形成和差劲的渗透性能。因此，必须在使用之前制备天然纤维胶原质的细胞培养基。这增加了采用天然纤维胶原质的细胞培养进行研究的劳力和不方便性。于是，存在一种对于含有天然纤维胶原(如在MATRIGEL 基质中发现的天然纤维胶原质)的细胞培养基的需求，该培养基能够在使用之前用制备物进行制备。

20 制备含有天然纤维胶原的细胞培养装置的常规方法，在使用之前和凝胶聚合后希望清除残存在基质中的液体。从ECM清除液体的常规方法包括空气干燥和在提高的温度下干燥。通常提高温度的干燥条件包括在提高温度的情况下采用干燥气流的快速干燥，该方法可促进大的盐结晶和更明显的MATRIGEL 基质模式。迅速的MATRIGEL 基质干燥导致侵入细胞的分布
25 不好。

常规液体清除技术也包括将多孔表面的下面放在吸附材料上一段时间(3分钟到过夜)和/或对多孔表面使用温和的真空。在缓慢的降低温度和没有气流的情况下缓慢清除液体，导致最均匀的包被层和侵入的细胞最均匀的分布。例如，Swiderek等人的美国专利5, 731, 417揭示了制造用于细胞
30 培养的天然胶原干膜的方法,其中包括空气干燥基质。

给基质提供具有现成的均匀分布的细胞外基质的方法

5 背景技术

1. 发明的领域

本发明涉及提供一种独特的细胞培养基的方法。更具体地说，本发明涉及从细胞培养装置中提取液体的方法，所述的装置包括粘附在基质上的均匀分布的胞外基质。

10 2. 相关的背景技术

存在于细胞间的纤维状和球形蛋白质的网状系统称之为胞外基质（ECM）。ECM是细胞环境的一种重要组成部分。细胞分泌的各种ECM成分形成基质间质和基质膜，在体内细胞锚定在该构架上。这些结构提供了组织特异性组织学的机体形成和发展所需要的空间定位和稳定性。然而，ECM
15 并不仅仅是无活性的支架，而是一种在调节细胞的生长和分化中的必需物。ECM提供了一种环境，在正常的病理重新成型过程中（如胚胎发育，组织修复，炎症，肿瘤侵入和转移）调节细胞功能时扮演着重要角色。例如，ECM对生长因子的诱导，结合，储存和呈递功能是公知的。

认识到ECM是在细胞微环境的重要组成成分这一事实后，越来越多的
20 研究者正将细胞外基质掺入到它们的细胞培养系统。ECM的体外应用，给细胞提供尽可能接近于它们在体内的生理环境状态。ECM为细胞提供机械支撑，并通过提供生物化学信息(所述信息通过细胞表面受体而影响细胞)，影响细胞的行为。

基质膜是一种特殊类型的胞外基质，主要由层粘连蛋白和IV型胶原构成
25 。从Englebreth-Holm-Swarm老鼠瘤提取的著名的基质膜基质，以MATRIGEL®的商品名称出售。这种老鼠瘤富含基质膜蛋白质。这种基质的主要成分是层粘连蛋白、IV胶原、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖，也含有生长因子、基质金属蛋白酶(MMPs [胶原酶])，和其他的蛋白酶（血浆酶原活化剂），以及几种未界定的化合物，但是并不含有可检测水平的金属蛋白
30 酶的组织抑制剂（TIMPs）。在室温下，MATRIGEL®基质凝胶化并形成

常规干燥方法降低了细胞培养装置的功能。例如，常规包被和干燥方法通常导致不均匀或中断的涂层，从而产生不均匀细胞的侵入，例如形成诸如侵入细胞显著的中心点或环的等各种模式。因此，在显微镜下精确计算侵入细胞是十分困难的。另外，区别侵入和非侵入细胞的能力明显降低。侵入细胞包括HT-1080细胞，而非侵入细胞包括NIH3T3细胞。因此，分布的纤维胶原基质例如MATRIGEL 基质宜为均匀和密实的。

发明的概述

本发明涉及一种细胞培养装置和方法，它们包括干燥的胞外基质和并已被开发用于细胞的体外生长。特别是本发明提出一种方法，该方法提供具有现成的均匀分布的胞外基质的基质，该方法包括：a) 将胞外基质组分施涂在基质区域；b) 保温胞外基质组分，使之聚合；c) 冻结位于基质区域的聚合的胞外基质；d) 冻干位于基质区域的、冷冻的胞外基质；e) 让冻干的胞外基质升温到室温。

本发明的另一个方面是提供一种细胞培养装置，它包括用于细胞生长的表面，所说的表面附着有干燥的均匀分布的胞外基质，所说的基质按照下述步骤形成：a) 将胞外基质组分施涂在基质区域；b) 保温这种胞外基质组分使之聚合；c) 冻结位于基质区域的聚合的胞外基质；d) 冻干冷冻的位于基质区域的胞外基质；e) 让冻干的胞外基质升温到室温。

本发明也提供一种细胞培养装置，它包括适合细胞生长的表面；和位于这个表面上的胞外基质包被层，基质包被层包括生物活性蛋白溶液的聚合产物，而基质内残存的液体通过冻干法基本被清除。

本发明试图提供一种方法，解决以前工艺的不足之处，这种方法提供一种含有胞外基质的细胞培养装置，所述胞外基质的分布均匀分布，能在更广的ECM浓度范围内有效，在整个细胞培养表面获得高度均匀的肿瘤细胞迁移，便于细胞计数，可区分侵入肿瘤细胞和推测的非侵入对照细胞。另外，本发明也包括细胞培养装置，该装置包含在使用之前制备好的胞外基质。

发明的详细描述

本发明提供从基质的一个边缘到另一边缘的高度均匀的胞外基质包被层，并且与常规液体干燥工艺制备的基质相比，能在更广的胞外基质浓度范围内有效。均匀的包被层使得在完整的胞外基质表面上提供了高度均匀的肿

瘤细胞的迁移,与之相反,常规工艺中细胞的迁移以非常不均匀方式发生在膜的中心。细胞的均匀迁移便于用手工方法或图象分析方法进行细胞计数。冻干包被层也有更强的区分侵入肿瘤细胞和设想的非侵入对照细胞的能力。

在任何本领域已知的细胞培养方案和方法中,常规的胶原细胞培养基质可以用具有干的天然纤维胶原的细胞培养装置加以替换。在多孔表面上的天然纤维胶原细胞培养基质,被置于组织培养板的孔中,并且多孔表面与合适的培养基相接触。这允许培养基流过多孔表面并与细胞培养基质接触。培养基和其他存在于其中的物质可扩散通过细胞培养基质,与在表面接种的细胞接触。为了易于操作,细胞培养基质可以在细胞培养插件的微孔膜上制备。

一旦将冰冷的胞外基质施涂在多孔表面,就让冰冷的、中性胶原溶液的温度升高到大约15°C到大约40°C,从而引发形成天然胶原纤维和纤维。对于本发明的保温步骤,温度宜升高,优选大约37°C,并且在潮湿箱中含有5%的二氧化碳。当胶原溶液的温度增加时,天然的原纤维在多孔表面上开始聚合和凝胶化,从而包被在上面。凝胶包括大的、有组织的、并且具有天然胶原的条纹特性的胶原纤维和从胶原溶液中俘获的液体(纤维间液体)。保温步骤应有足够的时间以便使胞外基质形成凝胶。一般在37°C大约0.5~3小时就足以获得在多孔表面(如细胞培养插件的膜)上的完全聚合。

在胞外基质的胶原聚合后,宜从凝胶中驱赶掉聚合胶原的纤维间液体。在本发明的方法中,在开始冻干工艺之前,直接将涂有凝胶的插件在不高于-30°C的温度下冷冻。包被的插件可以在冻干器中冷冻,然后冻干过夜,在那时冻干器允许升温至室温。这工序使凝胶收缩坍塌在多孔表面并形成天然胶原纤维和原纤维的薄膜。较佳地,获得粘附在插件的膜上的均匀的糕状物。

本发明的天然纤维胶原质细胞培养基可以以多孔表面上的干膜形式产生。它们宜以干燥形式保留天然纤维胶原结构,因此具有改进的浇注胶原凝胶的渗透性能并具有无定型或交联的胶原膜的储存稳定性。如果需要,这种干膜可以从多孔表面取下用于细胞培养,但是通常优选使用在多孔表面的这种天然纤维胶原细胞培养基质,以便增加结构支撑度和便于操作。在细胞培养基质的上表面的细胞能暴露于培养基、生长因子和其他物质,这些物质可通过扩散而穿过多孔表面下面和细胞培养基质,因为本发明的细胞培养膜有

杰出的扩散性能。

大约生理浓度或更高的盐浓度,优选大约为0.15~1摩尔的浓度,可以用于促进大的天然胶原纤维的形成。在低于生理浓度的盐浓度下,胶原纤维形成很少(如果有的话)。但是,盐增加到接近生理浓度时,纤维的形成基本完成,并有少量无定型的胶原存在。另外,当盐增加到生理浓度以上时,会形成越来越大的纤维。然而,当盐的浓度达到大约1.1摩尔时,纤维形成再次基本上完全不存在。当溶解的胶原是在酸性溶液中时,pH值可升到约6-8,更适宜的为约7.0-7.4,这可通过添加缓冲液(如磷酸盐缓冲液(PBS))中冷的NaOH来同时调整盐的浓度,使最终盐浓度为大约0.15-1摩尔,优选至少为约0.6摩尔(大约是生理盐浓度的4倍)。胶原通过在低温保存(通常在4℃)而维持在溶液中,直到发生所期望的胶原纤维和纤维的聚合。胶原浓度对于天然胶原纤维的形成而言并不重要,但作为细胞培养基质使用时,优选为约10到500ug/cm²多孔表面,更优选地为约65到85 ug/cm²。

各种聚合条件,包括非生理条件,可以用于生产细胞培养膜并不必考虑非胶原质残余物如盐和有机物质对细胞环境的负面影响。根据本发明方法,使凝胶在多孔表面上收缩并干燥,可形成纤维胶原质薄膜,从而提供一种用于均匀分布细胞的均匀表面和所期望的胶原浓度(大约5-10 mg/ml)。天然的纤维胶原结构为粘合细胞受体提供了体内空间定位,这种定位是无定型胶原细胞培养基质所没有的。胶原纤维网络也提供了有纹理的表面,这使得在每个膜上的表面积大于其他胶原细胞培养基质的基本上二维表面的表面积。与现有技术的胶原基质相比,天然的胶原纤维细胞培养基质能更牢固和均匀地将细胞结合在其表面。这样,许多不同类型的细胞(如上皮细胞,内皮细胞和纤维原细胞)可被施加在其表面并快速和完全地结合。

组织熵驱动了本发明的聚合反应。由于对于其他发生相似类型的自装配的蛋白而言,物理机理是相同的,因此当在前述生产工艺中代替胶原时,在体外自发形成的组织化聚合结构的蛋白质将产生天然结构物。这些包括形成均聚物(例如,纤连蛋白或层粘连蛋白)和杂聚物(例如,胶原IV和层粘连蛋白,或蛋白聚糖和层粘连蛋白)的蛋白质。含有自装配蛋白(例如在MATRIGEL(COLLABORATIVE BIOMEDICAL PRODUCTS, INC)发现的那些蛋白)的胞外基质组分,可以按照本发明方法被聚合和干燥,从而产

生天然的结构。当纤维间液体被去除时，虽然并非所有这样的蛋白质都能产生收缩的凝胶体并以胶原质凝胶同样的方式形成一层膜，但是，从聚合基质去除纤维间的液体和干燥可使最终的产物获得天然的结构。

采用本发明方法时，任何膜材料可以作为基质使用，但是，在某些生物应用中5 所选择的膜会有正面的或负面的作用。移植研究优选蚀刻膜，如果所测试的材料渗透系数不超过这种膜的渗透系数（也就是膜的渗透系数不是限制性因素）时，也可以使用浇注膜。为了方便细胞培养，优选掺入多孔膜的培育板插件（例如，BIOCOAT Control Cell培养插件，Collaborative Biomedical Products; TRANSWELL, Costar; MILLICELL培养插件，Millipore Corporation）。10 用于显微技术时，与高密度聚碳酸酯之类的材料相比，优选使用PET膜，由于其有更高的透明度。由于这些原因，不同的膜可以优选用于不同的应用场合，这可由本领域技术人员常规选择。

合适的可用作本发明基质的多孔表面，包括天然或合成聚合物，例如纤维素膜、多孔聚碳酸酯、多孔聚四氟乙烯（如MILLIPORE CM公司等生产的TEFLON网膜），15 尼龙膜和网，玻璃滤网，多孔聚对苯二酸乙二酯、聚甲基戊烷、聚丙烯、聚乙烯和各种过滤器（例如，ANOPORE铝晶体过滤器）。多孔表面的孔径小到足够防止在聚合之前胶原溶液流过，而又大到足够允许诸如培养基和纤维间液体这样的液体流过。一般而言，具有大约0.5到30微米的孔径的膜可提供所期望的性能。包含接近8微米孔径的膜的表面，可20 优选用于大多数普通的细胞培养应用，例如物质转移研究。

在干燥后，本发明的细胞培养装置应灭菌，例如通过辐射灭菌（例如，紫外光，电子束或伽玛辐射）或暴露在环氧乙烷气体中。本发明的天然的纤维胶原膜与现有技术的胶原细胞培养基质相比，在干燥时获得了天然的纤维结构，因此更接近于体内的胶原基质。

25 各种不同的材料（包括生物活性蛋白）可以与本发明的胞外基质一起共聚，或通过胶原质吸收而掺入膜中，这在特定的细胞系统中是所期望的。这些材料包括但不局限于，细胞、抗体、酶、受体、生长因子、胞外基质的额外成分、细胞因子、激素和药物。这些材料可以适当的浓度加入冰冷的胶原质溶液中，以用于选定的细胞培养。如上所述的天然胶原纤维的聚合作用，30 可使材料粘合于胶原质纤维，或者使该材料与胶原质纤维共聚合。由于细胞

培养基质的开放性纤维结构,加入的生物活性材料可轻易地供给所培养的细胞,从而介导或调控细胞的特性或行为。

待培养的细胞可以以亚汇合或汇合方式接种于基质上表面,然后置于适宜细胞生长的环境条件下。例如,当细胞培养基质是在培养皿孔的插件的膜表面上制备时,可将少量的生长培养基置于孔内。将插件置于孔内,以至于培养基与多孔渗透膜的底部接触并扩散通过细胞培养基质,从而与接种在基质表面的细胞接触。

适用于上皮细胞生长和分化的任何细胞培养基,都可以用于采用本发明胶原质细胞培养基质的细胞培养。这些培养基包括,但不限于Dulbecco's 改良Eagle 培养基(DMEM), MEM, M-199 和 RPMI。本领域内公知的添加物,可以加入培养基中,其中包括血清(如, FBS或小牛血清),含有血清的添加物(NU-SERUM),无血清添加物(MITO+)。首选培养肠内上皮细胞的细胞培养基是补加MTTO+血清添加物(Collaborative Biomedical Products, Bedford, Mass.)的DMEM,从而提供完全确定的无血清细胞的培养环境。

在下述例子中要给出本发明某些具体的说明,但附加的权利要求和其等价含义定义的本发明并不局限于此。

实施例1

具有干燥的均匀分布的胞外基质的细胞培养装置的制备

在以下的实验实例中描述了,在PET细胞培养物插件上的 $1\mu\text{m}$ 的聚乙烯对苯二酸膜(PET)上的均匀分布的、干燥的天然原纤维胶原细胞培养基的制备。在本实施例中,大约 $200\mu\text{m}$ 的MATRIGEL®基质被加到膜上。

通过加入10倍的DPBS/NaOH,调整MATRIGEL®基质冷的酸溶液,从而使最后浓度为4倍DPBS(pH7.4),然后将混合物置于冰中备用。将插件夹具置于组织培养器皿中。细胞培养插件和无菌镊子一起置于放有夹具中,然后将盖子盖在培养皿上直到应用。MATRIGEL®胶原质包被凝胶(0.10ml)被分配到每个膜上,重新放置培养器皿的盖子,然后培养皿被轻轻的摇动,从而使包被溶液均匀分布于膜上。包被的膜在 37°C 培养,从而使胶原质聚合(大约2.0小时),并将膜保持在潮湿的环境中以防止提早干燥。

胶原聚合后,包被的插件被置于预冷的冷冻干燥机内并在开始冷冻干燥

整个插件表面上的蛋白质含量分布情况。包被的插件用缓冲盐溶液在室温再水化2小时。再水化溶液被小心的去除并用考马斯染色液(1mg/ml 考马斯亮蓝R-250, 在 10%醋酸, 40%甲醇中)取代。30分钟后, 染色物被小心的去除, 插件用蒸馏水清洗两次然后风干。MATRIGEL®基质沉淀物的质量在放大100倍后进行评估。

实施例3

使用本发明细胞培养装置的侵入试验的结果

该实例证明, 用本发明方法制备的细胞培养插件能够按照需要的性能要求发挥其性能。这些性能要求在下表1中显示, 其中NIH 3T3(3T3)细胞代表非侵入肿瘤细胞, HT-1080细胞代表恶性转移的肿瘤细胞。

表 1

所需的性能要求

NIH 3T3侵入	HT-1080 侵入	图案	包被表面分布
小于或等于10%	大于或等于25%	无	均匀

对本发明细胞培养插件进行测试, 以检测NIH 3T3细胞和HT-1080细胞对基膜基质的侵入能力。固定和染色的插件如上所述进行检测, 以估计侵入程度和图案。评估结果将在下面详细描述。

本发明细胞培养装置显示, 基本上没有对照NIH 3T3细胞(即非侵入细胞)的侵入。然而, HT1080肿瘤细胞具有高侵入性。侵入的HT-1080细胞分布在每个插件的整个表面, 使肿瘤细胞在整个细胞培养表面高度均匀地迁移。本发明细胞培养装置没有诸如侵入细胞的周密的中央点或环之类的图案。当前实例的结果被分别的24孔插件和24个孔插件所证实。用本发明方法制得的、均匀分布在膜上的MATRIGEL®基质的簿包被层, 可以缩短完成肿瘤侵入试验的时间。

25

过程之前先冷冻（温度低于-30℃）。插件被冷冻干燥过夜,在该冻干过程中使冷冻干燥器的温度回升至室温。获得了粘附在插件膜上的均匀糕状物。

然后，天然的胶原细胞培养基在组织培养器皿中，通过暴露在0.05-0.06焦耳的紫外灯下而灭菌，随后保存在4℃密封袋中备用。

5

实施例2

侵入试验

NIH 3T3（非侵入性）和HT-1080(侵入性)细胞，在含10%胎牛血清或新生小牛血清的DMEM培养基中生长至几乎汇合。细胞通过胰蛋白酶消化而收集，并在没有添加血清或蛋白酶抑制剂的DMEM中洗涤。细胞以 1×10^5 /ml
10 悬浮在DMEM中。在制备细胞悬浮液之前，MATRIGEL®基质的干燥层用DMEM在室温下再水化2小时。该再水化溶液被小心地除去，将0.75ml含5%胎牛血清的DMEM加入到每个平皿孔中作为化学引诱物，然后将0.5ml（ 5×10^4 细胞）细胞悬液添加到每个插件中。平板插件在37℃,含5%CO₂空气的
15 条件下培育插件22小时。未包被的膜插件也接种细胞作为对照。

包被插件的固定和染色

在培育之后，每个插件的膜的上表面被小心地用棉签擦拭以除去非侵入的细胞和MATRIGEL®基质。在膜的下表面的侵入细胞被固定，并依次将其转移通过Diff-Quik(Dade)染色试剂盒的3种溶液，从而染色。过度的染色通
20 过将各个插件浸入蒸馏水中而去除。膜的上表面被第二次擦干以去除剩余的水、细胞或MATRIGEL®基质。插件被转移到另一个24孔平板并在空气中干燥。已经侵入并穿过膜上MATRIGEL®基质的细胞数量，在用Diff-Quik染色细胞后，通过在显微镜中直接计数而对位于膜的下侧的细胞进行定量检测。

根据细胞的数量和分布，拍摄放大40或200倍的显微照片来计量细胞的数量。照片是在不将膜从插件夹具上取下的情况下拍摄的。每张照片的多个
25 视野（通常为5个），在有刻度的栅格帮助下进行计数。数据表示为侵入百分数，即,侵入通过MATRIGEL®基质包被的插件的细胞与未包被的对照插件的细胞之比。

包被插件的蛋白染色

30 为了估计包被层的分配均匀性，包被的插件被考马斯蓝染色，以获得在