

#### 1. GelNest 高浓度基底膜基质用于哪些实验？

GelNest 高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究，如高浓度蛋白可促进肿瘤生长。高蛋白浓度同时可使 GelNest 基底膜基质注射入小鼠皮下后保持完整，有利于注射的肿瘤细胞和/或血管生成因子的原位保持，便于用于原位分析和/或以后的切除。

#### 2. 如何将 GelNest 基底膜基质用于 3D 培养？怎样制作 3D 胶？需要将细胞嵌入到 GelNest 基底膜基质中吗？

GelNest 高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究，如制备厚层包被用于 3D 细胞培养。细胞可以嵌在 GelNest 基底膜基质中或者接种在 GelNest 基底膜基质表面（覆盖法）。

#### 3. 使用 GelNest 基底膜基质时，需要将移液器吸头和离心管预冷吗？

是的。因为 GelNest 基底膜基质在高于 10°C 的条件下即会开始成胶，我们推荐操作基底膜基质时使用预冷的移液管、吸头和离心管。

#### 4. GelNest 基底膜基质会快速聚合吗？

GelNest 基底膜基质在 10°C 至 35°C 时会快速聚合成胶。

#### 5. 什么情况下，需要使用无酚红 GelNest 基底膜基质？

对于涉及颜色检测的实验，推荐使用无酚红 GelNest 基底膜基质，如使用荧光染料或 Drabkins 法计数内皮细胞成管实验。对于子宫内膜细胞培养，也需使用无酚红 GelNest 基底膜基质。此外，酚红和非甾体雌激素结构类似，有类雌激素效应。在实验动物体内可能具有干扰内分泌和荷尔蒙代谢的能力。

#### 6. 如何从 GelNest 基底膜基质中收获细胞？

推荐使用中性蛋白酶或细胞回收解决方案来收获培养在 GelNest 基底膜基质中的细胞。中性蛋白酶相比胰酶、胶原酶或其他蛋白水解酶能够更温和有效地获得单细胞悬液，不会损伤细胞或细胞表面蛋白。对于需要继续接种培养或进行检测的细胞，使用中性蛋白酶不会产生损伤。此外中性蛋白酶也可以用于组织分离。

对于代谢研究和 RNA 抽提，建议在 4°C 使用细胞回收解决方案进行非酶反应的细胞收集。因为 GelNest 基底膜基质中含有痕量的 RNA，进行 RNA 分析时，应设一个 GelNest 基底膜基质（不接种细胞）的对照组。其它从 GelNest 基底膜基质中收获细胞的方法：降低温度至 4°C-6°C 使 GelNest 基底膜基质解聚，需要一定的时间并且仅适合一部分应用。

#### 7. GelNest 基底膜基质包被过的培养皿可以储存多长时间呢？

包被过的培养皿最好当天使用，具体情况取决于实验目的。需要保存的情况下，可在 37°C 培养箱中最多存放 7 天。保存时 GelNest 基底膜基质表面需要使用无血清培养基均匀覆盖，保持湿润。

#### 8. 哪些情况下应该选用薄胶？什么时候用厚胶呢？3D 培养有哪些应用？

薄胶主要用于辅助细胞贴壁，有利于细胞增殖。如原代细胞培养，需要一层薄薄的蛋白层辅助，就可以选用薄胶；厚胶主要用于 3D 细胞培养，如大鼠主动脉组织分化为毛细血管样结构（RingAssay），以及进行细胞侵袭实验等；3D 细胞培养实验，主要是用于研究细胞与细胞间的相互作用以及复杂结构，如生物组织等。

9.进行内皮管形成实验，应该选用多大浓度的 GelNest 基底膜基质呢？

进行该实验，GelNest 基底膜基质最低浓度应不低于 10mg/mL。

10.GelNest 基底膜基质厚胶实验的最低成胶浓度是多少？

不同的实验目的需要不同的 GelNest 基底膜基质浓度，用户应该根据具体的实验需求确定。GelNest 基底膜基质厚胶的最低成胶浓度为 7mg/mL。稀释时不要简单进行体积倍比稀释，不同批次间的 GelNest 基底膜基质浓度有差异，应该根据最终工作浓度(mg/mL)算出需要加入的稀释液体（如 PBS 或无血清培养基）的量。用于体内研究的 GelNest 基底膜基质，为了避免成胶不完全，最终工作浓度不应低于 10mg/mL。

11.GelNest 基底膜基质胶块在体内可以维持多长时间？

基质胶胶块可以在体内维持至少一周的时间。

12.怎样稀释 GelNest 基底膜基质？

使用冰上预冷的无血清培养基或者 PH7.4 的 PBS。

13.应该如何对 GelNest 基底膜基质移液操作？

推荐使用预冷的移液器或者注射器操作，移液管、枪头同样需要预冷。吸液时不要触及瓶子底部；分液时切忌过快、用力过猛。如果使用移液管（Pipets），需要分液 5mL 时，应该吸取 6mL，分液到移液管内仍有 1mL 时即停止；如果使用自动移液器（Pipetman），按压到第二档位吸液，然后按压到第一档位进行分液。

14.为什么我的 GelNest 基底膜基质很粘稠？

基质胶的蛋白浓度越高，胶体越粘稠。如果浓度高于 13.0mg/mL，基质胶会显得非常厚重。GelNest 基底膜基质基质胶产品在未稀释前都会比较粘稠。粘稠的高浓度 GelNest 基底膜基质不稀释也可以直接使用，如用于培养肿瘤细胞和/或血管生成因子，注射于小鼠体内后，细胞可以保持原位，便于原位分析和/或以后的切除；或者稀释后，按照标准浓度的 GelNest 基底膜基质产品使用方法使用，具体稀释浓度根据实验需求确定。

除因为产品本身浓度高而粘稠外，基质胶的状态还与运输过程中温度的变化和储藏条件有关。整个运输过程中必须使用干冰冷藏。如果储藏 GelNest 基底膜基质的冰箱带有自动除霜功能，冰箱除霜过程中升温，可能使基质胶成胶。所以，切忌将 GelNest 基底膜基质储藏于此类冰箱中。为保证 GelNest 基底膜基质的使用效果，冻融次数应该尽可能减少。拿到新的 GelNest 基底膜基质后，请按照单次用量进行分装。每次融化操作，GelNest 基底膜基质都应该放置于冰上。

15.为什么 GelNest 基底膜基质在 37°C 成胶，而在 4°C 时却呈液体状态？

GelNest 基底膜基质是一种从小鼠肿瘤中提取的重组基底膜，新鲜提取的原料中主要包括以下成分：层粘连蛋白，IV 型胶原,巢蛋白，基底膜聚糖、表皮生长因子、类胰岛素生长因子及其他生长因子。这些蛋白构成了 GelNest 基底膜基质的基本结构。在 22°C-37°C 温度条件下，大分子间的共价键可以结合，促使 GelNest 基底膜基质形成凝胶。而在低温条件（如 4°C）下，由于没有足够的能量促使共价键结合，所以 GelNest 基底膜基质呈现液体状态。

16.GelNest 基底膜基质可以反复冻融吗？

建议用户第一次融化后按照单次用量进行分装，保存。

17.为什么细胞没有贴壁？GelNest 基底膜基质也脱落了？

首先需要检查细胞的接种浓度是否过高，GelNest 基底膜基质的用量应等同于细胞培养体系中培养基的用量。如果 GelNest 基底膜基质被稀释到过低的浓度，形成的胶体容易从组织培养器皿表面分离。

18.未稀释的 GelNest 基底膜基质中出现的沉淀应该怎么样处理？

4°C下低速离心，去除沉淀物。

19.未使用完的 GelNest 基底膜基质应该怎样保存的？

与细胞培养基或缓冲液混合过但未使用完的 GelNest 基底膜基质，不建议保留再用。

20.GelNest 基底膜基质可以储存在-70°C吗？

是的。GelNest 基底膜基质可以储存在-70°C。建议客户将整瓶的 GelNest 基底膜基质进行分装，储存于聚丙烯或其他可以耐受超低温条件材质的小管中，方便保存和使用。

21.GelNest 基底膜基质会有自发荧光吗？

GelNest 基底膜基质是一种蛋白混合物了，所以 GelNest 基底膜基质可能引发荧光的组分为蛋白质成分。如果需要使用荧光检测细胞生长状态，建议使用者建立对照实验，在所需要的波长条件下进行对比，以便排除背景荧光。

22.使用 GelNest 基底膜基质培养的细胞，如果需要切片或者免疫组织化学及免疫荧光检验，该怎样固定呢？如何避免解聚？

可以使用 2%浓度的多聚甲醛进行固定。为避免固定后出现解聚的情况，可以加入 1%浓度的戊二醛。戊二醛作为固定剂，常用于电镜观察。如果用户需要进行免疫荧光检验，加入戊二醛后，会出现明显的背景荧光。为了解决这一问题，我们建议用户在固定之后，使用 NaBH<sub>4</sub> 进行淬灭。NaBH<sub>4</sub> 极易产生气泡，进行该步骤时，必须在水平操作台上小心操作，避免晃动，尽量减少气泡的形成。另外，用户也可以尝试使用较低浓度的戊二醛进行固定，如 0.1% 到 0.5%，浓度越低，背景荧光信号越少。

22. 为什么 GelNest 的颜色不一样？

因为二氧化碳和碳酸氢盐缓冲液及酚红的反应，冷冻或刚融解的 GelNest 都有可能呈现不同颜色，颜色从稻草黄到暗红色不等。

酚红在冷冻或者酸性环境下呈现明黄色，在接近生理 pH 值或 0°C 以上呈现红色。

GelNest 出现颜色上的区别是正常情况，不会影响产品质量，并且在和 5%的二氧化碳平衡后，会恢复到统一颜色。