

Transwell 实验

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
基质胶	BD	354230
Opti-MEM	Gibco	31985-070
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-019
细胞培养小室	Falcon	353097
结晶紫	上海生工	A600331-0100
4%多聚甲醛	赛维尔	G1101

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
台式离心机	Thermo	Pico17

三、实验步骤

迁移实验

(1) 将细胞消化后, 1500rpm 离心 5min 收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞两次并加合适体积无血清培养基吹散细胞并计数, 调整细胞浓度达到 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 左右;

(2) 按实验方案进行转染或加药处理。

转染步骤如下:

a、用 50 μL Opti-MEM 稀释分别稀释 NC、siRNA (转染细胞的终浓度为 100nM, 每孔 1 μL)、质粒 (0.4 μg), 轻轻吹吸 3-5 次混匀。

b、轻轻颠倒混匀转染试剂, 用 50 μL Opti-MEM 稀释 0.5 μL Lipofectamine 2000, 轻轻吹吸 3-5 次混匀, 室温下静置 5min。

c、混合转染试剂和 NC/siRNA/质粒稀释液, 轻轻吹吸 3-5 次混匀, 室温下静置 20min。孵育后与细胞悬液等比例混合, 每组总量为 200 μl 。

(3) 取 24 孔细胞培养板, 每孔加入 600 μl 含 10%FBS 的完全培养液, 将 Falcon 公司 8 μm 孔径 PET 膜的 transwell 小室置于其中, 此过程动作要轻柔, 避免小室底层与培养液之间产生气泡;

(4) 每个上层小室内加入前一步制备的转染试剂-细胞混合液 200 μl , 平稳地将培养板置于细胞培养箱内;

(5) 48h 后取出细胞培养板, 取出小室, 弃掉上层培养液, 用湿润的棉签轻柔擦掉上层的

细胞，4%多聚甲醛固定 15 分钟，0.1%结晶紫溶液染色 20 分钟，倒置显微镜下(100×)计数每个视野内的细胞数，并拍照保存。

侵袭实验

Transwell 侵袭实验与迁移实验采用同样方法，唯一不同之处在于 Transwell 小室 PET 膜的上层均匀覆盖 Matrigel 基质胶，具体实验过程为在冰上解冻存放于-20°C的原胶，无血清培养液 1:8 稀释原胶后取 80 μ l 基质胶溶液平铺于 PET 膜上层，置于细胞培养箱 1 小时后吸出基质胶溶液即可加入制备好的转染试剂-细胞混合液。其余步骤同迁移实验。