**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 细胞Transwell侵袭实验报告 |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

详见实验方案

# 2 仪器与试剂与实验细胞系

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 二氧化碳培养箱 | 3111 | Thermo |
| 三气恒温培养箱 | CI-191TX | 苏州捷美电子有限公司 |
| 全自动细胞计数仪 | Countess II | Thermo |
| 荧光倒置显微镜 | Ts2R-FL | NIKON |
| 成像系统 | DP73 | OLYMPUS |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| DMEM培养基 | C11995500BT | Gibco |
| 0.25％Trypsin Solution | SH30042.01 | HyClone |
| Penicillin-Streptomycin Solution | SV30010 | HyClone |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | Solarbio |
| 胎牛血清（FBS） | 10091148 | Gibco |
| Matrigel 基质胶 | 356234 | BD |
| 结晶紫 | C8470 | Solarbio |

# 2.3 实验细胞系

# BV2 (小鼠小胶质细胞):生长培养基:DMEM＋10% FBS＋1% P/S

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏（原代细胞和干细胞不适用）

3.1.1从液氮中取出细胞冻存管 (注意：佩戴防爆管面具) ，快速将其置入 37℃水浴中解冻， 直至冻存管中无结晶，然后用 75%的酒精擦拭冻存管外壁；

3.1.2将冻存管中的细胞移至含 5mL 完全培养基的 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.1.3弃上清，沉淀用 5mL 完全培养基重悬，接种 T25 培养瓶，于 37℃,5%CO2 细胞培养箱中培养；

3.1.4第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

## 3.2细胞传代（原代细胞和干细胞不适用）

3.2.1细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.2.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.2.3弃上清，沉淀细胞用 1-2mL 完全培养基重悬，然后按 1:2 比例进行分瓶传代 (两个 T25)， 补充新的完全培养基至 5-8mL/瓶，最后放入 37℃,5%CO2 细胞培养箱中培养；

## 3.3 细胞冻存

3.3.1细胞生长至覆盖培养瓶的80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.3.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.3.3弃上清，沉淀细胞加入 1mL/支的无血清冻存液，混匀后加入冻存管中。 (如：冻一支，加入 1mL 无血清冻存液)

3.3.4将冻存细胞直接放入－80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 小时以上。

## 3.4 细胞TransweLL侵袭检测

3.4.1提前将MatrigeL胶从-20℃取出于4℃冰箱过夜，在4℃条件下将MatrigeL胶用无血清的细胞培养基稀释至300uL/mL，取100uL均匀涂抹一层在小室的PET膜上表面，然后将培养池轻轻放入24孔板内，37℃放置3h左右，取出在超净工作台过夜干燥。

3.4.2将对数生长期细胞用0.25%Trypsin消化并加入少量培养基终止消化，把细胞轻轻吹打下来，转移到离心管，1000rpm离心4min，弃上清，收集细胞，用PBS轻轻重悬细胞并计数。

3.4.3在下室（24孔板底部）加入600uL含10%血清的培养基，上室每孔接种1\*104细胞，按照实验方案进行处理后，培养一定时间。

3.4.4 培养结束后在24孔板中加入4%多聚甲醛500uL，上室加入100uL 4%多聚甲醛，固定30min，风干小室后，0.1%结晶紫染色5min（染色前要将膜风干，否则会染不上）。自来水将表面的结晶紫洗干净，用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞（轻轻擦细胞，防止把膜碰破）。

3.4.6显微镜下对非细胞接种侧拍照并记录，以细胞数量反应细胞的侵袭能力。

## 3.6 实验结果

实验结果见附件。