

吉康医学常规实验技术手册

第一版

By GENECOME MEDICAL

目录

- 细胞传代, 冻存和复苏
- 慢病毒感染预实验
- 腺病毒感染预实验
- 病毒感染
- 稳定株构建
- 细胞Transwell
- 细胞划痕检测
- 细胞克隆形成实验
- 细胞侵袭实验(细胞计数分析)
- 细胞软琼脂克隆形成实验
- 细胞增殖检测
- 血管形成实验
- 肿瘤细胞干性成球
- 细胞粘附检测
- FACS细胞凋亡检测
- PI-FACS-细胞周期检测



技术引领医学转化 专业创造行业口碑

目录 CONTENTS

细胞传代、冻存与复苏	3
慢病毒感染预实验	6
腺病毒感染预实验	9
病毒感染	13
稳定株构建	16
细胞Transwell	17
划痕检测	20
克隆形成	23
细胞侵袭实验（细胞计数分析）	25
细胞软琼脂克隆形成	28
细胞增殖	30
血管形成	39
肿瘤细胞干性成球	41
细胞粘附检测	43
FACS细胞凋亡（双染）	46
PI-FACS-细胞周期同步化后周期检测	48

细胞传代、冻存与复苏

细胞冻存

实验目的

长期连续传代的细胞，不仅消耗大量的人力和物力，而且细胞的生长与形态等会有一些退变或转化，因而细胞失去原有的遗传特性，有时还会由于细胞污染而造成传代中断，种子丢失。因此，在实际工作中常需冻存一定数量的细胞，以备替换使用。

实验器材

生物安全柜、37°C二氧化碳恒温培养箱、倒置显微镜、离心机、移液枪、冻存盒、-80°C冰箱、液氮罐；10cm 培养皿、1.5mL& 5mL EP 管、2mL 冻存管、50mL 无菌离心管。

实验试剂

完全培养基 Fetal Bovine Serum 0.25% 胰蛋白酶 DMSO PBS 异丙醇

操作流程（以SMMC-7721细胞为例）

- 将需要冻存的细胞消化离心，扩大到2个10cm培养皿中培养。
- 选择对数生长期的细胞冻存^[1]，冻存前一天换液。
- 细胞消化前先配制好冻存液^[2]（冻存液组成一般为：70%完全培养基+20%FBS+10%DMSO）。
- 从培养箱中取出细胞，弃去上清，加入2mLPBS液洗涤，弃去PBS，每皿加入1mL0.25%胰蛋白酶，在显微镜下观察细胞回缩变圆时加入1mL完全培养基终止消化^[3]，轻轻吹下细胞后收集于EP管中离心，离心300g，2min。
- 离心停止后弃去上清液，加入1mL冻存液重悬所有细胞，然后转移至总冻存液中混匀，冻存管每管分装1mL，管上标记：细胞名称、冻存日期、操作人。
- 把所有细胞放入冻存盒^[4]内，迅速放入-80℃冰箱过夜，次日再转移到相应的液氮罐中长期保存。

注：

[1] 冻存前的细胞状态一定要好，否则很难取得好的复苏效果。

[2] 冻存液建议在使用前半小时配好，不宜使用长期保存或刚刚配好的冻存液。

[3] 完全培养基中含有血清，血清能够保护细胞不被消化。

[4] 冻存盒不能从-80℃冰箱取出即用，如果没有冻存盒可按照室温——4℃ 20min——20℃ 30min后再转入-80℃冰箱过夜。

注意事项

- 冻存液组成可根据细胞情况调整。
- 在细胞库存电子表上记录细胞信息，冻存位置，冻存日期与数量。
- 冻存的细胞同时维持一盘在手培养，冻存一周后取一支冻存细胞复苏，确定冻存效果后再相应处理在手细胞。

细胞复苏

实验目的

细胞的传代是有限制的，长期连续传代的细胞状态会慢慢变差，通过复苏得到状态良好的细胞用于后续实验并确保实验结果的稳定性。

实验器材

生物安全柜、37°C二氧化碳恒温培养箱、倒置显微镜、离心机、移液枪。

实验试剂

完全培养基

操作流程（以SMMC-7721为例）

- 复苏之前确定该细胞的冻存批次，然后找出液氮罐中的具体位置，填写复苏登记表（包括复苏日期，细胞名称，具体位置，冻存日期，复苏人姓名，数量，次日复苏状态描述等内容）。
- 准备37°C水浴，迅速取出细胞，将冻存管放入水浴中快速摇晃使之融化^[5]。
- 融化完全后拿进超净工作台，酒精棉擦拭消毒后将细胞轻轻吹打成悬液，在15ml离心管中加入4ml完全培养基，并将细胞悬液转入15ml离心管中，离心300g，3min。
- 离心停止后取出离心管，小心倒去上清液，加入1ml完全培养基，轻吹打混匀成悬液，全部吸取转移到6cm培养皿中，再补足4ml完全培养基混匀后放置37°C二氧化碳培养箱培养。
- 次日于显微镜下观察细胞状态，视情况可换液或直接传代实验。

注：[5] 慢冻速融。

注意事项

- 复苏细胞一般采用快速融化法，以保证细胞外结晶快速融化，以避免慢速融化水分渗入细胞内，再次形成胞内结晶损伤细胞。
- 及时在复苏登记表上做好记录，以备日后查询更新。

细胞传代

实验目的

通过维持培养得到一定数量状态良好的细胞，为后续预实验、筛靶、验证实验做准备。

实验器材

生物安全柜、37 二氧化碳恒温培养箱、离心机、倒置显微镜、移液枪；6cm 培养皿、1.5mL EP 管、枪头（1mL、200ul、20ul、废液桶）。

实验试剂

胰酶

PBS

完全培养基

操作流程（以SMMC-7721细胞为例）

贴壁细胞

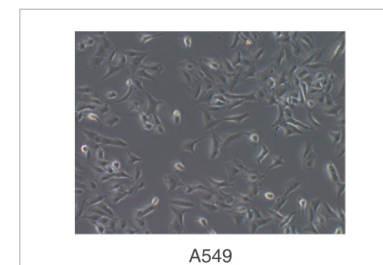
- 镜下观察细胞密度及培养基颜色，细胞达到密度 80% 时可进行传代。
- 用 1mL 移液器吸起原有培养基，弃去。
- 沿着 6cm 培养皿的侧壁，缓慢加入 1mL 的 PBS, 稍微轻晃 6cm 培养皿以洗掉残余的培养基。
- 加入 500uL 的 0.25% 胰蛋白酶或含 0.53mM EDTA 胰蛋白酶溶液，迅速放入培养箱，1~2min 后在倒置显微镜下观察，细胞开始回缩变圆，弃去胰酶溶液。
- 加入 1ml 完全培养基终止细胞消化，吹打使细胞脱离分散，然后收集于 1.5mL EP 管中准备离心。
- 离心机离心 300g，2min。
- 离心后弃去上清，加入 1mL 新鲜培养基重悬，轻轻吹打成均匀细胞悬液。
- 根据实验需要，接入适量的细胞到培养皿中，最后补足到 5mL，摇匀后放入培养箱培养。

悬浮细胞

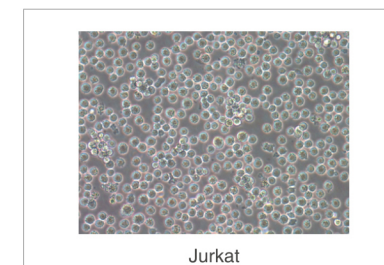
- 观察细胞状态，直立 T25 瓶使细胞沉降下去。
- 吸去上清培养基，余下细胞收集于 1.5mL EP 管中离心。
- 离心机离心 300g，2min。
- 离心后弃去上清，加入 1mL 新鲜培养基重悬，轻轻吹打成均匀细胞悬液。
- 根据实验需要，接入适量的细胞到实验孔板中，余下细胞在 T25 瓶中继续培养。

半悬浮半贴壁细胞

- 半贴壁细胞传代时，首先把悬浮于培养基中的细胞收集于管中，然后贴壁的细胞操作手法跟贴壁细胞相同，两者混合离心传代即可。



A549



Jurkat

想了解你的细胞

的功能学实验数据、
STR分型和具体培养方法

扫描下方二维码，带你走进细胞百科全书

干货专区

一个实验知识的分享地



慢病毒感染预实验

实验目的

通过感染预实验确定慢病毒对细胞的感染 MOI^[6] 和最佳感染条件，如接种细胞量，感染体系，感染后换液时间^[7]，这些将为正式实验提供参考。

实验概述

培养生长状态良好的细胞，设置不同的感染条件、MOI 等进行细胞感染。感染后，于荧光显微镜下观察细胞状态及荧光表达率，选择细胞状态良好且荧光率为 80% 左右的为最佳条件，用以指导正式感染实验。

注：

[6] 复感染指数，是指病毒对细胞的感染能力，MOI 越高，细胞越难被感染。通常把某株细胞有 80% 被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的 MOI。

MOI = (病毒滴度 × 病毒体积) / 细胞数目

[7] 正常时间为感染后第二天换为细胞正常培养基。

实验材料

主要试剂

胎牛血清 FBS 基础培养基 助感试剂 胰酶

主要仪器

荧光显微镜、CO2 培养箱、倒置显微镜、离心机、生物安全柜

实验步骤

为了确认合适的感染条件，按照不同培养条件将实验分为以下各组。

- A 组：常规培养基组，观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果。
- B 组^[9]：添加助感试剂的常规培养基组，观察助感试剂是否可以提升感染效果。
- Control 组：监控实验过程中细胞生长是否正常。

贴壁细胞的感染

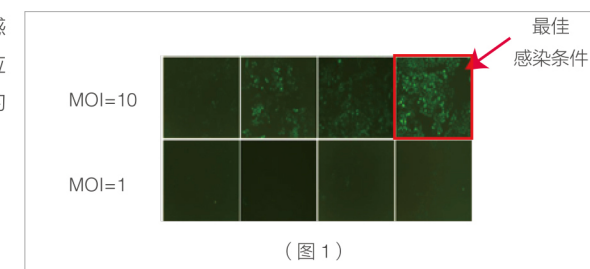
- 保证细胞的良好生长状态，实验前一天制备密度为 $3-5 \times 10^4$ 个/ml 细胞^[9] 悬液，接种 100 μ L 细胞悬液于 96 孔板中。预感染时每组需要 3 个孔，一般不使用边缘孔^[10]。不同种类的细胞生长速度有所差异，为保证较好的实验结果，进行慢病毒感染时细胞的融合率应为 20-40%。
- 感染预实验每组均设置三个不同梯度 MOI。用无血清培养基将慢病毒梯度稀释成 1×10^8 TU/mL、 1×10^7 TU/mL、 1×10^6 TU/mL^[11] 3 个组，各 50 μ L，对应不同梯度的 MOI。
- 吸掉上清液，并按照表 1 向各孔中加入相应体积的溶液，混匀，继续培养。此时，1-3 组加入的病毒量分别为 1×10^6 TU、 1×10^5 TU、 1×10^4 TU，细胞数目大约为 1×10^4 个，所以 1-3 组的 MOI 分别为 100、10、1。

病毒量/ML \ 感染条件	Control	A	B
1组: 1×10^8 MOI=100	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 90 μ L Virus: 10 μ L
2组: 1×10^7 MOI=10	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 90 μ L Virus: 10 μ L
3组: 1×10^6 MOI=1	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 90 μ L Virus: 10 μ L

表 1. 感染预实验实验分组和感染条件

- 感染 12h 后换回常规培养基^[12]，观察细胞形态，发生变化时可以提前到 8h 换液，保持细胞正常生长。

- 感染约 72h^[13]，显微镜观察荧光表达情况。感染效率 80% 左右，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可以作为后续感染实验的依据，如图 1。



悬浮细胞的感染

- 实验前保证细胞处于良好的生长状态，将目的细胞收集后离心，去掉上清液，分别用完全培养基和助感试剂将细胞稀释成 1.25×10^5 个/ml。取完全培养基稀释的细胞悬液 80 μ L/孔加入 96 孔板中，每组 3 个孔，按表 2，将病毒和助感试剂稀释液加入细胞悬液中，混匀，继续培养。

病毒量/ML \ 感染条件	Control	A	B
A组: 1×10^8 MOI=100	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 10 μ L Virus: 10 μ L
B组: 1×10^7 MOI=10	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 10 μ L Virus: 10 μ L
C组: 1×10^6 MOI=1	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	培养基与助感试剂混合液: 10 μ L Virus: 10 μ L

表 2. 悬浮细胞慢病毒感染预实验分组

- 8-12h 以后观察细胞状态，离心弃去原培养基，并用 100 μ L 新鲜培养基重悬培养。

- 感染约 72h，显微镜观察荧光表达情况。感染效率 80% 左右，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可以作为后续感染实验的依据，如图 2。

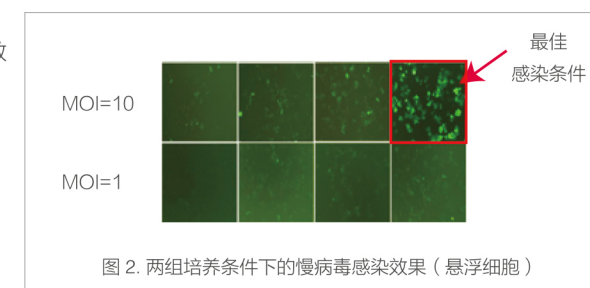


图 2. 两组培养条件下的慢病毒感染效果（悬浮细胞）

感染条件及 MOI 的选择原则

- 选择感染效率 80% 左右的作为最佳感染条件。
- 在细胞形态不受影响的情况下尽可能用少的病毒感染细胞。
- 感染效率及细胞状态相当的情况下尽量选择常规培养基进行感染。

注:

[8] 在有多种助感试剂的情况下可多设几个助感试剂组, 或者助感试剂互相组合。

[9] 根据细胞增殖速度决定细胞铺板密度, 增殖速度较快的细胞可以铺 3000-5000 个每孔, 增值较为缓慢的细胞铺板 10000 个每孔, 根据铺板的细胞量调整细胞密度。

[10] 边缘孔存在蒸发效应, 孔内培养基易因蒸发而减少。

[11] 根据病毒最后所加量 10 μ l, 目的细胞量 10000, MOI=100, 10, 1 所得的病毒梯度。

[12] 正常第一次感染可以第一天下午 5 点左右, 到第二天早上换液 (16 小时左右), 对于细胞对病毒比较敏感的, 可以第一天早上感染, 晚上换液, 时间 8h 左右。

[13] 慢病毒感染表达较慢, 一般代谢较旺盛的细胞 (如 293T、BHK21 等) 48h 后可以观察到 GFP 荧光 (或者 RFP 红色荧光); 代谢比较慢的细胞 (如原代培养细胞、神经干细胞、胚胎干细胞等) GFP (RFP) 蛋白表达所需时间较长, 感染后 72h-96h 甚至更长可以观察到荧光。感染后请根据细胞的生长情况对细胞进行换液或传代, 以保证细胞良好的生长状态。

两百余株常用

肿瘤细胞感染信息

干货专区

一个实验知识的分享地

扫描下方二维码, 即可获得



腺病毒感染预实验

实验目的

通过感染预实验确定腺病毒对细胞的感染 MOI 和最佳感染条件, 如接种细胞量, 感染体系, 感染后换液时间^[14], 这些将为正式实验提供参考。

MOI: 复感染指数, 是指病毒对细胞的感染能力, MOI^[15] 越高, 细胞越难被感染。通常把某株细胞有 80%^[16] 被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的 MOI。

$$MOI = (\text{病毒滴度} \times \text{病毒体积}) / \text{细胞数目}$$

实验概述

培养生长状态良好的细胞, 设置不同的感染条件、MOI 等进行细胞感染。感染后, 于荧光显微镜下观察细胞状态及荧光表达率, 选择细胞状态良好且荧光率为 80% 左右的为最适条件, 用以指导正式感染实验。

实验材料

主要试剂

胎牛血清

基础培养基

胰酶

促感染试剂

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、离心机、倒置显微镜

实验步骤

为了确认合适的感染条件, 按照不同培养条件将实验分为以下3组。

- A 组: 常规培养基组, 观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果。
- B 组: ENi.S. 组^[17], 观察用 ENi.S. 替代常规培养基时病毒对细胞的感染效果。
- Control 组: 监控实验过程中细胞生长是否正常。

贴壁细胞的感染

- 保证细胞的良好生长状态, 实验前一天制备密度为 5 \times 10⁴ 细胞悬液, 接种 100 μ L 细胞悬液于 96 孔板中。预感染共需 15 个孔, 一般不使用边缘孔^[18]。不同种类的细胞生长速度有所差异, 为保证较好的实验结果, 进行腺病毒感染时细胞的融合率应为 40-60%^[19]。
- 感染预实验共设置两组感染条件, 每组均设置五个不同梯度 MOI。用 ENi.S. 将腺病毒梯度稀释成 1 \times 10¹⁰PFU/mL、1 \times 10⁹PFU/mL、1 \times 10⁸PFU/mL、1 \times 10⁷PFU/mL、1 \times 10⁶PFU/mL 5 个组, 各 50 μ L^[20], 对应不同梯度的 MOI。
- 吸弃上清液, 并按照表 3 向各孔中加入相应体积的溶液, 混匀, 继续培养。此时, A-E 组加入的病毒量分别为 1 \times 10⁹PFU、1 \times 10⁷PFU、1 \times 10⁶PFU、1 \times 10⁵PFU、1 \times 10⁴PFU, 细胞数目大约为 1 \times 10⁴ 个, 所以 1-3 组的 MOI 分别为 10000、1000、100、10、1。

病毒量/ML \ 感染条件	Control	A	B
A组: 1 \times 10 ¹⁰ MOI=10000	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 90 μ L Virus: 10 μ L
B组: 1 \times 10 ⁹ MOI=1000	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 90 μ L Virus: 10 μ L
C组: 1 \times 10 ⁸ MOI=100	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 90 μ L Virus: 10 μ L
D组: 1 \times 10 ⁷ MOI=10	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 90 μ L Virus: 10 μ L
E组: 1 \times 10 ⁶ MOI=1	培养基: 100 μ L	培养基: 90 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 90 μ L Virus: 10 μ L

表 3. 贴壁细胞腺病毒感染预实验分组

- 感染 8-12h^[21] 后换回常规培养基，过程中观察细胞形态，发生变化时可以提前换液，保持细胞正常生长。
- 感染约 24-48h^[22]，显微镜观察荧光表达情况。感染效率 80-90%，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可以作为后续感染实验的依据，如图 3。

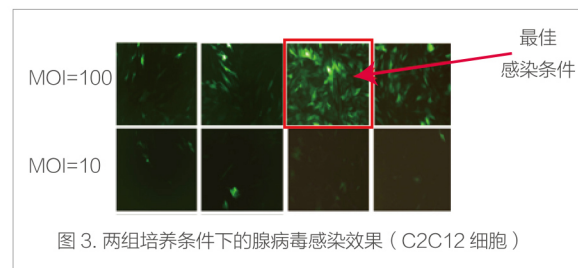


图 3. 两组培养条件下的腺病毒感染效果 (C2C12 细胞)

悬浮细胞的感染

- 实验前保证细胞处于良好的生长状态，将目的细胞收集后离心，去掉上清液，分别用完全培养基和 ENi.S. 将细胞稀释成 1.25×10^5 个 /mL，各 1mL。取完全培养基稀释的细胞悬液 80 μ L/孔加入 96 孔板中，接 10 个孔，并取 ENi.S. 稀释的细胞悬液 80 μ L/孔，接 5 个孔。
- 按表 4，将病毒和感染液加入细胞悬液中，混匀，继续培养。

病毒量/ML \ 感染条件	Control	A	B
A组: 1×10^{10} MOI=10000	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 10 μ L Virus: 10 μ L
B组: 1×10^9 MOI=1000	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 10 μ L Virus: 10 μ L
C组: 1×10^8 MOI=100	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 10 μ L Virus: 10 μ L
D组: 1×10^7 MOI=10	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 10 μ L Virus: 10 μ L
E组: 1×10^6 MOI=1	培养基: 20 μ L	培养基: 10 μ L Virus: 10 μ L	ENi.S.: 10 μ L Virus: 10 μ L

表 4. 悬浮细胞腺病毒感染预实验分组

- 8-12h^[23] 以后观察细胞状态。
- 感染约 24-48h^[24]，显微镜观察荧光表达情况。感染效率 80% 左右，且细胞生长良好的组所对应的感染条件和 MOI 即可以作为后续感染实验的依据。

感染条件及 MOI 的选择原则

- 选择感染效率 80% 左右作为最佳感染条件。
- 在细胞形态不受影响的情况下尽可能用少的病毒感染细胞。
- 感染效率及细胞状态相当的情况下尽量选择常规培养基进行感染。

注:

- [14] 因为细胞感染是病毒感染，正常时间为感染后第二天换为细胞正常培养基。
- [15] MOI 是指 1 个细胞被感染上荧光所需要的病毒颗粒数。
- [16] 80% 左右。
- [17] ENi.S. (Enhanced Infection Solution), 感染增强剂。
- [18] 边缘孔容易出现边缘效应，培养基蒸发较快，所以正常不选择。
- [19] 因为腺病毒对细胞毒性较大，所以会加大细胞密度。
- [20] 最后每个梯度加 4 个孔，每个 10 μ L，所以只要大于 40 μ L 即可，注意完全混匀。
- [21] 8 小时左右或者感染后第二天早上换液 (即 16 小时左右) 具体根据细胞耐受病毒毒性程度决定，正常为感染后 16 小时左右换液。
- [22] 腺病毒感染正常为感染后第二天即可观察。
- [23] 同贴壁细胞，感染时间同理贴壁细胞，根据细胞情况，换液时间可以调整。
- [24] 同贴壁细胞。

两百余株常用
肿瘤细胞感染信息

干货专区

一个实验知识的分享地

扫描下方二维码，即可获得



病毒感染

实验目的

培养生长状态良好的目的细胞，根据慢病毒感染预实验结果设计各组实验条件^[25]，进行正式感染。若为荧光标记的慢病毒感染，参照预实验确定的感染时间点，于荧光显微镜下观察 GFP 表达情况，荧光率达 80%左右^[26]，细胞汇合度达 80%左右^[27]，收集细胞进入下游实验。若为抗性基因（如 Puromycin）标记的慢病毒感染，感染 48h 后，使用抗生素筛选感染效率 80%左右的^[28]生长状态良好的细胞进行下游实验。

实验材料

主要试剂

完全培养基 胰酶 Puromycin PBS

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、离心机、生物安全柜

实验步骤（慢病毒）

贴壁细胞

- 处于对数生长期的细胞胰酶消化，完全培养基制成 3-5×10⁴ 个 /mL 细胞悬液，并根据表 5 接种相应的细胞数到培养板中，继续培养保证感染时铺板量达到 15-30%^[29]左右。

	底面积	接种体积	换液体积
96孔板	0.3 cm ²	100μL	100μL
48孔板	0.6 cm ²	200μL	200μL
24孔板	2 cm ²	500μL	500μL
12孔板	4 cm ²	1ml	1ml
6孔板	10 cm ²	2ml	2ml
T25瓶	25 cm ²	5ml	5ml

表 5. 贴壁细胞接种和病毒感染时感染液体积

- 按照预实验结果，参考表 1 更换感染培养基，加入最适病毒量^[30]进行感染。
- 参照预实验结果，选择感染后最适时间点更换为常规培养基继续培养，一般为感染后 8-16h 左右。

悬浮细胞

- 按照预实验确定的感染条件，使用感染液将细胞制成 3-5×10⁴ 个 /mL 悬液，并根据表 6 接种相应的细胞数到培养板中，使铺板量达到 15-30%^[31]左右。

	底面积	接种体积
96孔板	0.3 cm ²	200μL
48孔板	0.6 cm ²	400μL
24孔板	2 cm ²	1000μL
12孔板	4 cm ²	2 mL
6孔板	10 cm ²	4 mL
T25瓶	25 cm ²	10 mL

表 6. 悬浮细胞接种体积

- 铺板后无需培养，参照预实验确定的 MOI 加入最适病毒量感染。
- 参照预实验结果，选择感染后最适时间点，一般为 8-16h 左右，将各孔中细胞收集到干净的 1.5mL EP 管中，以 300g 离心 2min，去掉上清液，更换为完全培养基，轻轻混匀后放回培养板中继续培养。

观察感染后细胞状态及感染效率

细胞状态良好，未出现大量死亡现象，特别是保证阴性对照组与空白对照组细胞状态相当^[32]。

- 一般而言，下游为细胞功能实验，保证感染效率达到 80%左右^[33]；荧光标记的慢病毒感染，感染后，荧光显微镜观察报告基因（如 GFP）的表达情况^[34]，荧光率即为阳性感染率。
- 抗性基因标记的慢病毒感染。一般于感染 24-48h^[35]后，换用含抗生素（如 puromycin）的培养基筛选细胞，细胞存活率即为阳性感染率^[36]。

细胞状态良好，感染效率合格组，可用于下游检测；否则重新感染

注：

操作时污染了病毒的管和枪头以及培养基和最后的细胞都需要用消毒液（完全浸泡于 2% SDS 病毒灭活液）处理后才能丢弃。

注:

[25] 是指细胞具体感染的 MOI、感染条件。

[26] 荧光效率达 80% 以上, 正常只要细胞不过感, 细胞状态良好的情况下, 均可以安排下游实验。

[27] 细胞汇合度达 80% 以上, 细胞状态良好, 不要被挤到变形, 均可以安排进行下游实验。

[28] 如果感染后 48 小时, 细胞荧光效率比较低或者细胞密度低时, 可以待感染第三天后进行抗生素筛选。

[29] 根据细胞增殖速度, 较快细胞可铺板 15%~20%, 增殖缓慢细胞铺板 30% 密度; 如果是腺病毒感染, 因为腺病毒的细胞毒性大于慢病毒, 所以需要控制感染时细胞量达到 60% 左右。

[30] 病毒颗粒数 = 细胞数 * MOI

[31] 同贴壁细胞感染。

[32] 实验组可能因为基因表达的变化而导致细胞状态不佳, 但是阴性对照组和空白对照组不应有明显的差异。

[33] 保证细胞不过度感染, 以免影响后续功能实验结果。

[34] 腺病毒的感染时间短, 感染后 16—48 小时即可注意观察荧光。

[35] 如果病毒是带有荧光且有抗性基因标记的, 可以在感染后第二天 - 第三天观察细胞荧光效率, 细胞效率 80% 以上, 可以不进行药筛, 如果荧光效率较低, 进行药筛。如果病毒是不带有荧光且有抗性基因标记的, 可以在感染后第二天 - 第三天换用含抗生素 (如 puromycin) 的培养基筛选细胞, 细胞存活率即为阳性感染率。

[36] 细胞状态不佳, 调整细胞状态后重复实验, 荧光效率不佳, 调整感染量或者细胞密度重复实验。

想要感染效率高

这里有妙招

扫描下方二维码, 了解更多感染操作方案

干货专区

一个实验知识的分享地



混合克隆稳定株构建实验方法

实验目的

培养生长状态良好的目的细胞, 根据慢病毒感染预实验结果进行慢病毒感染, 感染 72h 后, 于荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 随后使用适当浓度的 puromycin 筛选至少 48h, 当细胞荧光效率达到 100% 或再无细胞出现死亡时, 将 puromycin 浓度至少减半, 继续扩培细胞, 同时收集细胞进行 qPCR 鉴定, 并将鉴定结果符合预期的细胞冻存保种, 混合克隆稳定株则构建完成。

实验材料

主要试剂

胎牛血清

DMEM

胰酶

Puromycin

PBS

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、倒置显微镜、离心机、生物安全柜

实验步骤

目的细胞PUROMYCIN药筛浓度确定。

- 处于对数生长期的细胞胰酶消化, 完全培养基制成 6×10^4 个 /mL 细胞悬液。
- 取 500 μ l 细胞悬液接种至 48 孔板中 (共铺 8 个孔), 继续培养。
- 铺板第二天, 换液, 在 8 个孔中分别加入终浓度为 0 μ g/ml、0.5 μ g/ml、1 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、6 μ g/ml、8 μ g/ml、10 μ g/ml 的 puromycin。
- 加 puromycin 48 小时后显微镜下观察细胞状态 (未加药组细胞密度在 60%~90% 之间), 此时, 高浓度 puromycin 组细胞应死亡殆尽。
- 通过观察细胞状态, 将最低导致细胞死亡殆尽的浓度^[37], 确定为该细胞 puromycin 筛选的最佳浓度。

目的细胞慢病毒感染。 感染后细胞加入抗生素筛选。

- 感染 72h 后, 观察细胞状态和感染效率。要求细胞状态良好, 未出现大量死亡现象, 特别是保证 NC 组与 CON 组细胞状态相当。
- 加入合适浓度的抗生素, 筛选至少 48h。如病毒载体带有荧光标记, 荧光效率需要达到 100% 后, 降低抗生素维持浓度 (相较之前的药筛浓度, 浓度减至之前浓度的 1/2~1/4 或更低) 继续对感染后的细胞进行筛选和扩增, 同时收集细胞进行下游 qPCR 检测 (鉴定目的基因表达水平)。

细胞扩增、冻存、复检。

- 将加入抗生素维持浓度的细胞继续进行扩增。待 qPCR 检测结果合格后进行冻存，保证每株细胞至少冻存 6 支。
- 冻存 2-3 天后，任意复苏一支^[38]；如复苏细胞状态较好，则冻存细胞合格，可用于后续实验。

注：

[37] 如果第一次未筛选到有效杀伤浓度，需重新设计药物梯度筛选，如果设计的最低浓度也将细胞全部杀伤，也重新设计浓度。

[38] 构建完成的混合克隆稳定株，刚复苏调整细胞状态时，可用不含 puromycin 的完全培养基进行培养，细胞状态调整后，建议用含低浓度 puromycin 的完全培养基继续维持（浓度同稳定株构建后期减低后的维持浓度）培养。

扫码进入干货专区

查看更多问题及详细解答

扫描下方二维码，查看更多问题及详细解答

干货专区

一个实验知识的分享地



细胞TRANSWELL实验方法

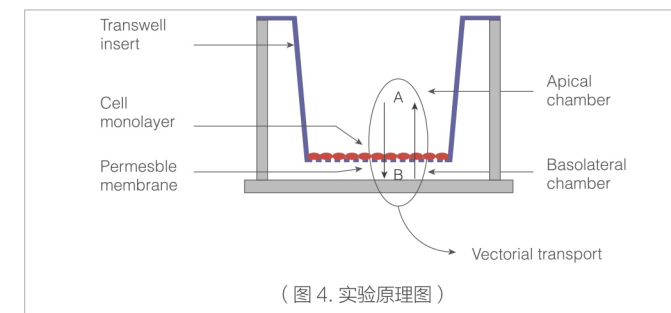
实验目的

通过检测目的细胞在 Transwell 小室中向含血清培养基的迁移情况来验证目的基因对细胞转移能力的影响。

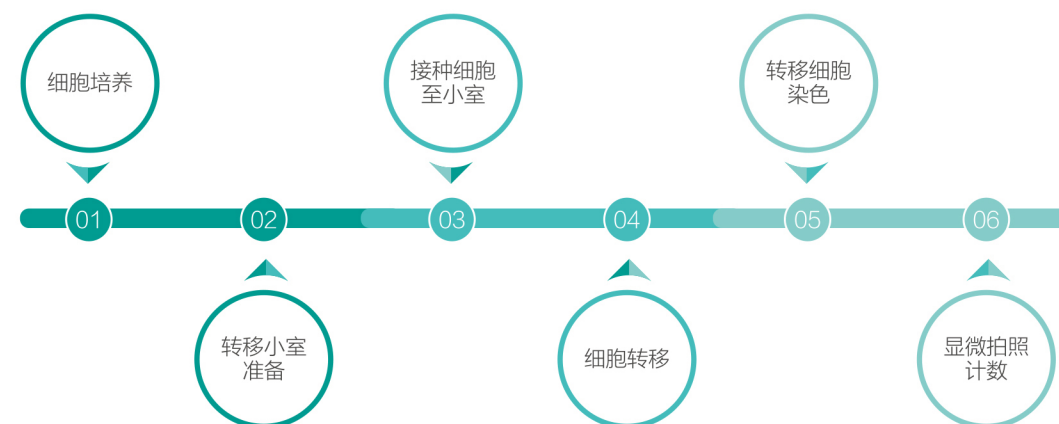
实验原理

细胞迁移是肿瘤转移的一个重要指标，应用 Transwell 可研究肿瘤细胞的迁移能力。Transwell 小室底层有一张通透性聚碳酸酯膜，上室为无血清细胞悬液，下室为含血清的培养基，血清中某些成分如一些细胞因子，对细胞生长来说是必不可少，因此细胞对这些因子具有趋向性，利用细胞的这种趋向性促使细胞向含血清的下室转移，而不同细胞在此会显示不同的运动转移能力^[39]。

Corning 转移实验试剂盒中的 transwell 小室是由 24 孔培养板和 12 孔细胞培养嵌入物组成的，嵌入物含有 8 μ m 孔径大小的聚碳酸酯膜，转移细胞迁移并黏附于聚碳酸酯膜底部。



实验流程



实验材料

主要试剂

- 胎牛血清
- 基础培养基
- 胰酶
- PBS
- Transwell 试剂盒
- 4% 多聚甲醛
- GIEMSA 染色液
- 结晶紫水溶液 (0.5%)

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、倒置显微镜、离心机

实验步骤

(使用 Corning 转移试剂盒，说明书链接 http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/Transwell_InstructionManual.pdf)

- 取出试剂盒，将所需数目的小室置于新的 24 孔板中，上室加 100 μ L 无血清培养基，37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 1h^[40]。
- 制备无血清细胞悬浮液，并计数，细胞数根据预实验调整^[41]，一般为 10⁵/孔 (24 孔板)。
- 小心除去上室中培养基并加入 100 μ L 细胞悬液，下室内加入 600 μ L 30% FBS 培养基。

- 37°C 培养箱培养一段时间^[42]（具体时间根据预实验调整）。
- 倒扣小室于吸水纸上以去除小室内部培养基，用棉拭子轻轻擦去小室内部非转移细胞，将小室置于 4% 多聚甲醛固定液中固定半小时^[43]。
- 固定后，将小室捞出，用吸水纸吸干小室底部膜的外表面固定液，滴 1-2 滴染色液到膜的外表面染色发生转移的细胞 3-5 min 后，将小室浸泡冲洗数次，空气晾干。
- 显微镜拍照：每个 transwell 小室，随机选取视野^[44]，拍 100X 照片 4 张，200X 照片 9 张。
- 以 200X 的照片来计数^[45]，进行数据分析，比较实验组与对照组细胞转移能力的差异：计算各组转移细胞数（Migratory cells per field），标准差，T-Test 分析得到 p 值，判断是否有显著性差异（ $p < 0.05$ ，有显著性差异，否则无显著性差异）。

参考文献

1. Stagg HW. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes microvascular endothelial cell hyperpermeability through phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Am J Surg.* 2013 Apr;205(4):419-25.
2. Jie S. et al. Berberine inhibits angiogenic potential of Hep G2 cell line through VEGF down-regulation in vitro. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jan;26(1):179-85.
3. Song Y. et al. Effects of RNA interference targeting four different genes on the growth and proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells. *Cancer Gene Ther.* 2011 Apr;18(4):297-304.

注：

[39] 同一细胞经过不同处理后，各实验组迁移能力也不同，从而可以研究不同基因对细胞迁移能力的影响。

[40] 平衡小室基底膜，同时观察小室是否有漏液现象。

[41] 预实验一般铺到小室的细胞量为 10^5 /孔，若预实验显示细胞转移能力较强，则降低细胞量（如 $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ ）。

小室最大细胞量为 10^5 /孔，若细胞在 48 小时后仅转移零星细胞，则不建议做转移实验。

[42] 根据细胞的迁移能力不同此处培养时间不同，一般细胞最长迁移时间为 48 小时，若 48 小时只有零星细胞转移成无细胞转移，则认为细胞迁移能力极弱，若细胞迁移能力较强，则缩短此处培养时间。

[43] 固定细胞形态，用于长时间保存。

[44] 保证实验的客观性。

[45] 细胞形态清晰容易计数。

想查看更多Transwell实验技巧

扫描进入干货专区，
获取更多实验Protocol及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



划痕检测实验方法

实验目的

细胞划痕实验（Wound Healing）是一种操作简单，经济实惠的研究细胞迁移 / 肿瘤侵袭的体外试验方法。这种方法的原理是，当细胞生长融合成单层状态时，在融合的单层细胞上人为制造一个空白区域，称为“划痕”，划痕边缘的细胞会逐渐进入空白区域使“划痕”愈合，在一定程度上模拟了体内细胞迁移的过程，是研究细胞迁移的体外实验中最简单的方法。

划痕实验中，检测目标为感染病毒后表达荧光蛋白的目的细胞^[46]（生长于 96 孔板中）。用专用的划痕工具制造划痕，细胞成像系统识别带绿色荧光的细胞并拍照（即读板）。然后通过软件对同一视野细胞迁移 0h 和 x h（x 为实验细胞合适的迁移时间点^[47]）后图像进行分析处理，计算出实验细胞在 x h 的迁移面积。

实验材料

主要试剂

胎牛血清

基础培养基

胰酶

PBS

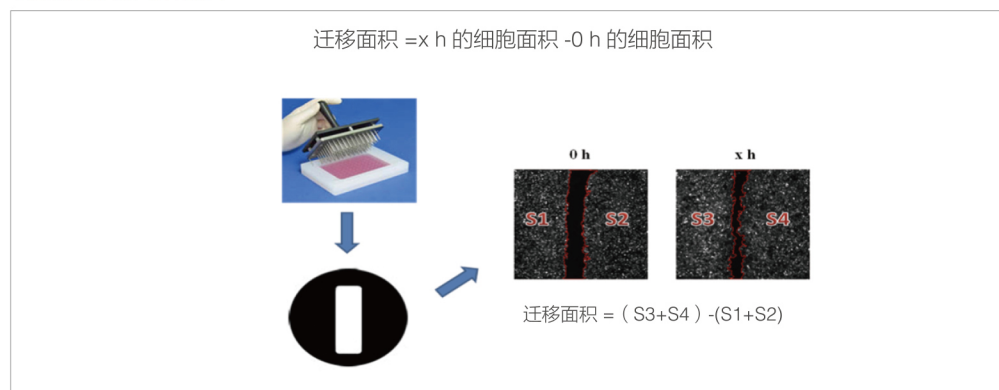
主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、生物安全柜、离心机

实验步骤

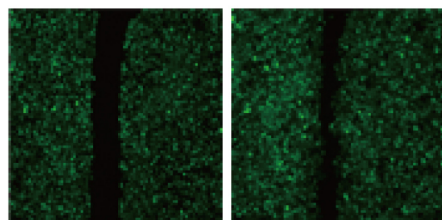
- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后，完全培养基重悬成细胞悬液，计数；细胞。
- 根据细胞大小决定铺板细胞密度（大多数细胞铺板数设定为 50000 cell/well），以次日细胞达到 90% 以上汇合度为准^[48]。37°C、5%CO₂ 培养箱培养，每组 3 复孔，培养体系为 100μL/孔。
- 第二天换低浓度血清培养基，使用 10μL 枪头垂直对准 96 孔板的下端中央部位，向上轻推形成划痕^[49]。
- 使用 PBS 轻轻漂洗 2-3 遍^[50]，加入低浓度血清培养基（如 1% FBS）^[51]，0h 拍照。
- 37°C、5% CO₂ 培养箱培养，根据愈合程度选择合适时间用细胞成像设备扫板。
- 分析迁移面积。

划痕数据分析概述



吉康划痕数据分析步骤^[52]

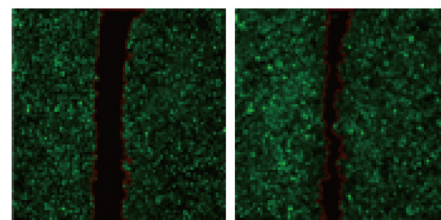
1. 在 0h 和 x h 对目标 96 孔板进行扫描读板，获得扫描图片；下图为针对同一视野在迁移 0h 和 20h 后获得的扫描图像示例（细胞为 H1299）。



0h 20h

3. 算迁移面积 = (S3+S4) - (S1+S2)

2. 用 Celigo 对扫描图片进行分析，获得细胞面积。



0h 20h

4. 针对划痕预实验，根据迁移面积，判断细胞是否有愈合能力；针对划痕实验，根据迁移面积，判断相对阴性对照组，KD（或 OE）组细胞愈合能力的差异。

质量控制

- 正式实验每个孔采集 3 张照片，照片要求划痕宽度基本一致，且划痕的面积内无遗留较多的细胞或者痕迹，图片中的细胞分布均匀，且无大面积的凋亡（对细胞的干预操作本身导致的凋亡除外）。
- 如果在实验中设置了 CON（空白）组，实验中 CON 和 NC（阴性对照）组的迁移能力要基本一致。
- 细胞划痕预实验基本从 8h, 16h, 24h, 36h, 48h 这几个时间点间进行选择，但是具体进行的时间点需要根据细胞的迁移能力进行调整；报告中的图片不能在第 1 和第 2 个时间点就出现愈合。

参考文献

- Arsic, N. et al. A Novel Function for Cyclin A2: Control of Cell Invasion Via Rhoa Signaling. *J. Cell Biol.* 196, 147-162 (2012).
- Espada J1, Matabuena M. et al. Cryptomphalus aspersa mollusc eggs extract promotes migration and prevents cutaneous ageing in keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *Int J Cosmet Sci.* 2015 Feb;37(1):41-55.
- Fathima Hurmath K. et al. IL-1 microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *Cell Biol Int.* 2014 Dec;38(12):1415-22.

注：

[46] 不表达荧光蛋白也可以，但是图片的视觉效果不如表达荧光蛋白。

[47] 时间太早，划痕愈合的效果不明显，时间太长，不同组别的划痕都愈合完成，组间看不到差异，推荐时间点为 0h、8h、16h、24h、36h、48h。

[48] 细胞铺的太多，太挤，连原本细胞形态都会看不清。划的时候，也很容易划不干净，而且划完以后，两边会挂有一团团细胞，使两边边界不清晰。不同细胞，形态大小不一，铺板细胞量自然也就不一样，想要找出铺板最佳细胞量，最快捷的方法就是铺梯度。96 孔板，那么多孔，足够一次铺好几个密度梯度了（3 万，5 万，10 万，随便试）。

[49] 人工枪头制造划痕难以保证划痕宽度的一致性，影响实验结果，这也是该方法最大的缺陷，建议使用专用的划痕仪。

[50] 划完以后，痕中间和培养液中遗落少量细胞，是可以通过清洗去除的（如果太多，就别挣扎了，重新再来吧），有些是已经被划动了，但没有完全划掉，这时候清洗个两三次，清洗的时候轻拍 96 孔板，已经被划动的贴壁不牢的细胞大多数会别洗掉。不过，对于一些本身就on容易脱落的细胞，就不能这样洗了，只能“温柔以待”，以免细胞全被洗没了。

[51] 使用低浓度的培养基是为了防止细胞增殖对划痕结果的影响。

[52] 不同的细胞成像设备使用不同的分析方法，八仙过海各显神通吧，但是整体思路就是比面积、比宽度。

想查看更多划痕实验技巧

扫描进入干货专区，
获取更多实验 Protocol 及操作视频



干货专区

一个实验知识的分享地



克隆形成

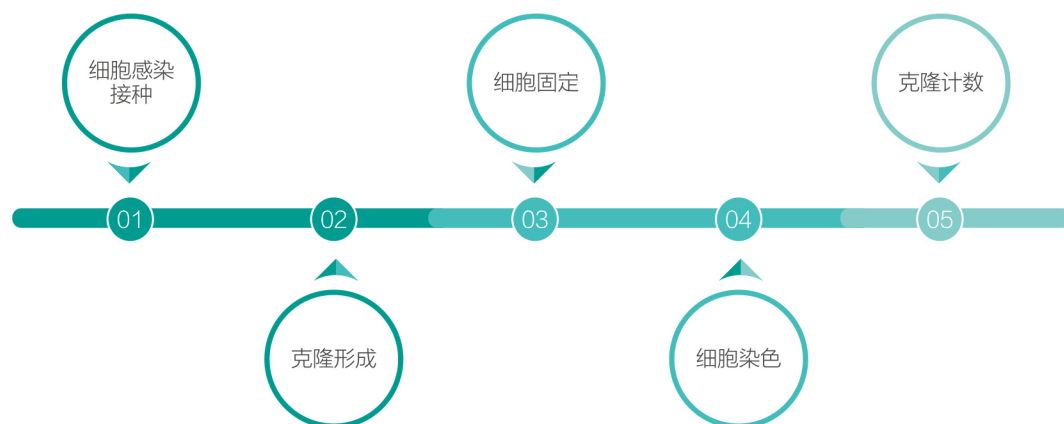
实验目的

通过细胞在细胞培养板上的克隆形成能力来提示细胞的增殖能力。

实验原理

克隆形成是测定细胞增殖能力的有效方法之一。单个细胞在体外持续 6 代以上，其后代所组成的细胞群称为克隆。这时每个克隆含有 50 个以上的细胞，大小在 0.3-1.0mm 之间，通过计数克隆形成率，可对单个细胞的增殖潜力做定量分析，了解细胞的增殖能力和独立生存能力。

实验流程



实验器材

生物安全柜、荧光显微镜、离心机、倒置显微镜、CO₂ 培养箱、完全培养基、胰酶、PBS、结晶紫、4% 多聚甲醛。

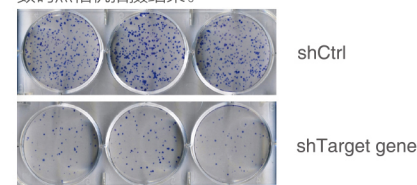
实验步骤

- 准备感染后细胞^[53]：将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化，完全培养基重悬，制成细胞悬液，计数。细胞接种：于 6 孔板培养板中各实验组接种 500-1000 个细胞 / 孔^[54]，每个实验组设 3 个复孔，培养基为含 30%FBS 的完全培养基。
- 将接种好的细胞摇匀后轻放于培养箱中继续培养，每隔 3 天进行换液并观察细胞状态，显微镜下观察克隆大小^[55]，待单个克隆生长到大小不超过图片视野时可以进行拍照。

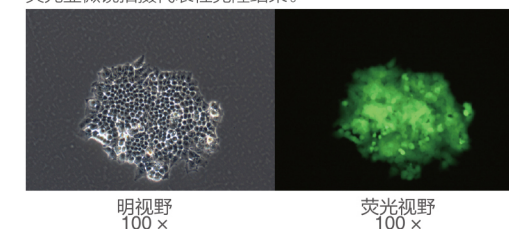
- 拍完照之后将 6 孔板放入培养箱中继续培养，待孔中大多数单个克隆中细胞数大于 50 为止，弃上清，PBS 洗涤细胞 1 次。
- 每孔加入 1mL 4% 多聚甲醛^[56]，4 度冰箱固定细胞 60min，PBS 洗涤细胞 1 次。
- 每孔加入洁净、无杂质结晶紫染液 1000μL，染细胞 2min。
- ddH₂O 洗涤细胞数次，晾干，数码相机拍照，克隆计数。

吉康结果

数码相机拍摄结果。



荧光显微镜拍摄代表性克隆结果。



参考文献

1. Ruan J. et al. Increased expression of cathepsin L: a novel independent prognostic marker of worse outcome in hepatocellular carcinoma patients. PLoS One. 2014, 9(11):112-136.
2. Sun R. et al. Down regulation of Thrombospondin2 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. Mol Cancer. 2014, 13:225.
3. Ma Y. et al. Prostate cancer cell lines under hypoxia exhibit greater stem-like properties. PLoS One. 2011, 6(12):e29170.
4. Suresh B. et al. Stability and function of mammalian lethal giant larvae-1 oncoprotein are regulated by the scaffolding protein RanBPM. J Biol Chem. 2010, 285(46):35340-9.
5. Liu JW. et al. ssDNA-binding protein 2 is frequently hypermethylated and suppresses cell growth in human prostate cancer. Clin Cancer Res. 2008, 14(12):3754-60.

注：

[53] 如果是克隆形成预实验，直接用空细胞进行实验。

[54] 正常增殖速度为 1:5-1:10 传代，3 天长满细胞，可以接种 500 个细胞，其余增殖缓慢细胞，可以接种 800-1000；接种时注意梯度稀释细胞悬液，观察细胞密度，以免因计数不准确导致实验结果偏差。

[55] 3 复孔之间克隆大小应相似。

[56] 有毒，注意在通风橱中操作。

想查看更多实验技巧



扫描进入干货专区，
获取更多实验Protocol及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



细胞侵袭实验侵袭小室检测实验方法

实验目的

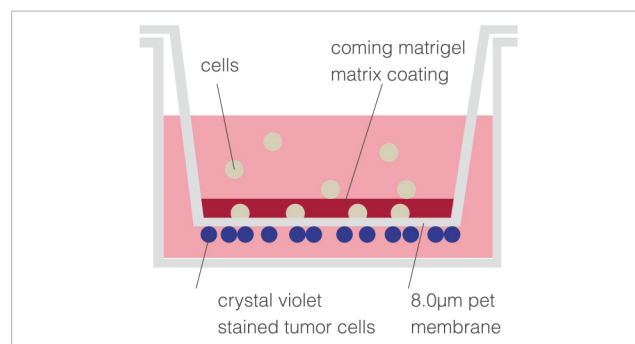
通过检测目的细胞在小室中向含血清培养基的侵袭能力来验证目的基因对细胞侵袭能力的影响。

实验原理

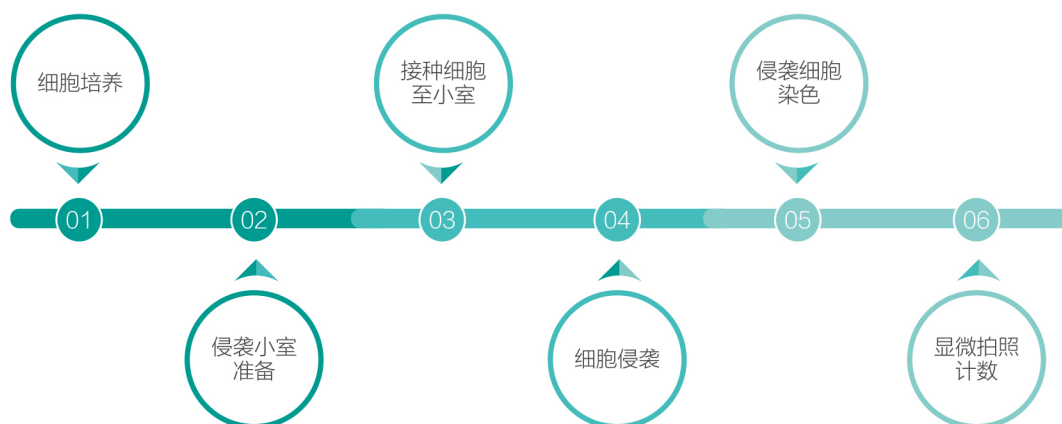
从细胞外基质入侵是肿瘤转移的一个重要步骤，肿瘤细胞穿过重建基质膜的能力与它的体内侵袭转移能力表现出较好的相关性。侵袭实验通过在聚碳酸酯膜上涂上一层基质胶，模仿细胞外基质，上室用无血清培养基培养肿瘤细胞，下室加入含 FBS 或某些特定的趋化因子的培养基，细胞欲进入下室，先要分泌基质金属蛋白酶 (MMPs) 将基质胶降解，方可通过聚碳酸酯膜，通过计数进入下室的细胞量测定细胞的侵袭能力。

Corning® BioCoat™ Matrigel®

Invasion Chambers 为检测肿瘤细胞穿过基底膜模型提供一个有效的系统。侵袭小室是由 24 孔培养板和 12 个嵌入物组成的，嵌入物含有 8μm 孔径大小的聚碳酸酯膜，其上方是 Matrigel 基质的薄层，用以封闭膜孔防止非侵袭细胞通过，而侵袭细胞则可降解 Matrigel 基质层迁移并黏附于聚碳酸酯膜底部。



实验流程



实验材料

主要试剂

胎牛血清

基础培养基

胰酶

PBS

GIEMSA 染色液

侵袭试剂盒

主要仪器

生物安全柜、荧光显微镜、倒置显微镜、CO₂ 培养箱、离心机

实验步骤

(使用 Corning 侵袭试剂盒, 说明书链接 http://www.corning.com/uploadedFiles/Lifesciences/PDFs/ProductInformation/CellCultureandBioprocess/CLS-DL-CC-096_REV1.pdf)

- 从冰箱 -20 中取出试剂盒^[57], 将所需数目的小室置于新的 24 孔板中, 无菌操作台内放置使其恢复到室温。上、下小室各加 500μL 无血清培养基, 37 培养箱中放置 2h 使 Matrigel 基质层再水化。
- 制备无血清细胞悬浮液, 并计数, 细胞数根据预实验调整, 一般为 10⁵/孔 (24 孔板)^[58]。
- Matrigel 基质层再水化完成后, 将小室全部转移至新的孔板中, 小心除去上室中培养基并加入 500ul 细胞悬液^[58], 下室内加入 750μL 30% FBS 培养基。
- 37 培养箱培养一段时间^[59] (具体时间根据预实验调整)。
- 倒扣小室于吸水纸上以去除培养基, 用棉拭子轻轻移去小室内非侵袭细胞, 滴 2-3 滴染色液到膜的下表面染色发生转移的细胞 3-5 min 后, 将小室浸泡冲洗数次, 空气晾干。
- 显微镜拍照: 每个小室, 随机选取视野^[60], 拍 100X 照片 4 张, 200X 照片 9 张。
- 以 200X 的照片来计数, 进行数据分析, 比较实验组与对照组细胞侵袭能力的差异: 计算各组侵袭转移细胞数 (Migratory cells per field), 标准差, T-Test 分析得到 p 值, 判断是否有显著性差异 (p<0.05, 有显著性差异, 否则无显著性差异)。

参考文献

1. Shelef MA. et al. Focal adhesion kinase is required for synovial fibroblast invasion, but not murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014 Oct 4;16(5):464.
2. Mathews LA. et al. Genomic Analysis of Invasive Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Bone Marrow Res.* 2013 May 23;1:122.
3. Xu GD. et al. Down-regulation of eIF5A-2 prevents epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013 Jun;14(6):460-7.
4. Zengel P. et al. Multimodal therapy for synergic inhibition of tumour cell invasion and tumour-induced angiogenesis. *BMC Cancer.* 2010 Mar 11;10:92.

注:

[57] 含基质胶的小室在 -20℃ 能够保存时间较长。

[58] 预实验一般铺到小室的细胞量为 10^5 / 孔, 若预实验显示细胞侵袭能力较强, 则降低细胞量 (如 5×10^4 - 8×10^4)。小室最大细胞量为 10^5 / 孔, 若细胞在 72 小时后仅零星细胞发生转移, 则不建议做侵袭实验。

[59] 此处为无血清培养基, 培养基量太少无法完全覆盖小室底部, 培养基量太多则导致细胞容易悬浮造成细胞转移不均匀。

[60] 根据细胞的侵袭能力不同此处培养时间不同, 一般细胞最长迁移时间为 72 小时, 若 72 小时仅零星细胞发生转移或无细胞转移, 则认为细胞不具有侵袭能力, 若细胞侵袭能力较强, 则缩短此处培养时间。

[61] 保证实验的客观性。

想查看更多实验技巧 ?

扫描进入干货专区,
获取更多实验Protocol及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



细胞软琼脂克隆形成实验方法

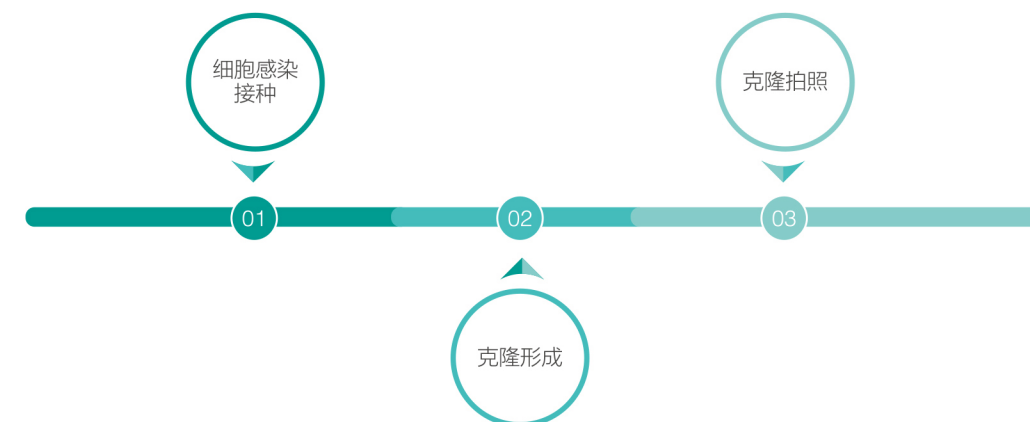
实验目的

通过细胞^[62]在软琼脂上的克隆形成能力来提示细胞的增殖能力。

实验原理

软琼脂克隆形成实验是让细胞处于不贴壁以及单细胞状态以模拟体内细胞处于半固液态的情况, 分散的单个细胞在软琼脂中进行增殖, 形成单克隆球形, 指示细胞的增殖能力。软琼脂克隆形成实验主要用于非贴壁生长的细胞, 而某些恶性肿瘤细胞, 不仅在贴壁状态下能增殖, 在悬浮状态下也能增殖, 其在软琼脂中形成克隆的能力反映了恶性程度。

实验流程



实验材料

主要试剂

胰酶

PBS

Noble Agarose

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、离心机、生物安全柜、冰箱、水浴锅

实验步骤

- 于^[63]六孔板中铺一层用含 10% 胎牛血清的培养基配制的 0.6% Noble Agarose 的底层胶, 等待底层胶充分凝固 (可置于 4℃ 冰箱)。
- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化, 完全培养基重悬, 制成细胞悬液, 计数。
- 细胞接种 用含 20% 胎牛血清的培养基配制的 0.3% Noble Agarose 上层胶重悬细胞, 并迅速铺于下层胶之上^[64]。
- 将培养板置于培养箱中继续培养到 14 天左右或绝大多数单个克隆中细胞数大于 50 为止, 中途^[65]保持上层胶不干燥 (可适当添加 20% 胎牛血清的培养基) 并观察细胞状态。
- 显微镜拍照: 单克隆球形成后, 随机选取视野, 进行拍照, 拍 40X 照片 3 张, 100X 视野照片 3 张。

参考文献

1. Jie Huang, Li Zhang, et al. Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. *Oncotarget*. 2015 Jan;6(3):1652-1665.
2. Ankana T, et al. Genomic amplification upregulates estrogen-related receptor alpha and its depletion inhibits oral squamous cell carcinoma tumors in vivo. *Sci Rep*. 2015;5:17621.
3. Ankana T, et al. Genomic amplification upregulates estrogen-related receptor alpha and its depletion inhibits oral squamous cell carcinoma tumors in vivo. *Sci Rep*. 2015;5:17621.

注:

[62] 如果安排软琼脂克隆形成预实验, 那就是空细胞。

[63] Noble Agarose 用 PBS 配置成 3% 的胶, 高温灭菌, 灭菌后放入提前设置好 70℃ 的水浴锅中。

首先用含 10% 胎牛血清的培养基按所需实验量配置相应体积的 0.6% 的底层胶, 配置好后放入 70℃ 的水浴锅中待用 (下层胶常温下会凝固, 所以需要放在 70℃ 的水浴锅中) 然后用含 20% 胎牛血清的培养基配置相应体积的 0.3% 的上层胶, 放常温待冷却后使用 (注意必须冷却后使用, 不然会烫死细胞)。

[64] 进行底层胶铺 6 孔板, 每孔 1ml, 注意操作迅速且没有气泡, 铺完后等待底层胶充分凝固 (可置于 4 度冰箱) 按照上层胶每孔 3000 个细胞, 1ml 体积配制, 待下层胶完全凝固后, 贴壁轻轻加入后放入培养箱。

[65] 每隔 3 天观察细胞状态及克隆大小, 及时补液, 待单个克隆细胞数生长大于 50 为止。

想查看更多实验技巧



扫描进入干货专区,
获取更多实验 Protocol 及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



细胞增殖

实验目的

通过检测处于增殖状态的细胞数量来检验目的基因与细胞增殖的关联。

实验原理

DNA 合成检测

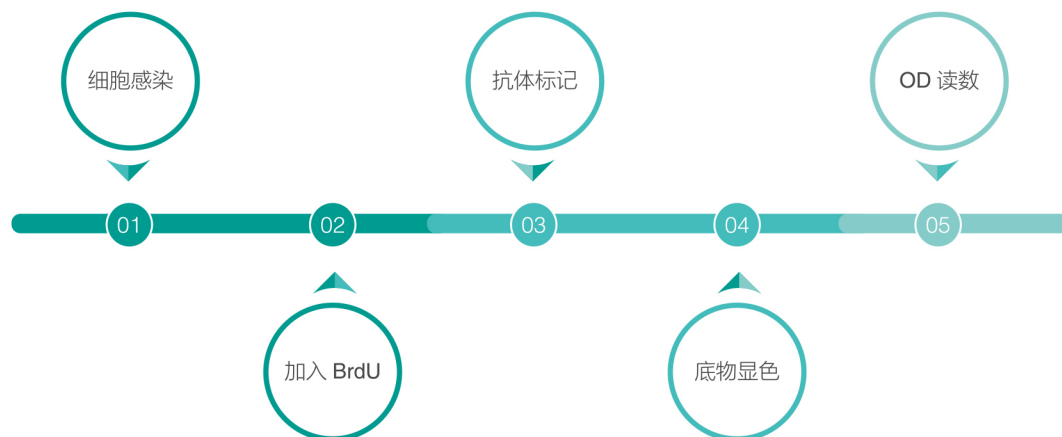
- Brdu: 溴脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷类似物, 可竞争性掺入 S 期细胞单链 DNA 核苷酸序列替代胸腺嘧啶, 利用抗体连接酶或荧光素作为指示系统标记 Brdu, 当处于旺盛分裂的细胞掺入 Brdu 后, 即可检测出含有 Brdu 的细胞, 并以此判断细胞的数目。固相包被细胞的微孔中加入 BrdU 抗体, 经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 BrdU 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 通过 OD 值的高低, 反映正在合成 DNA 细胞数的多少, 从而反映正处于增殖状态的细胞量。
- Edu: 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 掺入正在复制的 DNA 分子中, 通过基于 Edu 与荧光染料的特异性反应快速检测细胞的 DNA 复制活性, 与 Brdu 检测方法相比, Edu 检测方法更加快速、灵敏和准确, Edu 染料远小于 Brdu 抗体, 所以在细胞内更容易扩散, 无需 DNA 变性, 可有效避免样品损伤, 能够更好的反映 DNA 复制活性。

代谢活性检测

- MTT: 活细胞特别是增殖期细胞的线粒体中的琥珀脱氢酶能使外源性 MTT (即黄色噻唑兰) 还原成难溶于水的蓝紫色针状 Formazan 结晶并沉淀在细胞中, 且 Formazan 的形成量与细胞活力成正比, 二甲基亚砜 (DMSO) 能够溶解 Formazan 结晶, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定其吸收值, 即可间接反映细胞增殖情况。
 - CCK8: CCK-8 试剂中含有 WST-8: 化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐, 它在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二甲酯 (1-MethoxyPMS) 的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臞产物 (Formazan)。生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比。用酶联免疫检测仪在 450nm 波长处测定其光吸收值, 即可间接反映细胞增殖情况。
- CCK8 原理和 MTT 基本相同, 但是 CCK8 反应生产的 Formazan 是水溶性的, 不需要吸出培养基后加入有机溶剂溶解, 因此可以减少一定的误差, 重复性要高于 MTT。

BRDU实验

实验流程



实验材料

主要试剂

BrdU kit (Roche, 11647229001)

完全培养基

胰酶

PBS

主要仪器

96 孔板、血球计数板、酶标仪

实验步骤 (本实验使用Roche BrdU kit^[66]测定)

- 于 96 孔板中接种合适密度^[67]的待测细胞。
- 在检测前 2-24h 内加入 BrdU 试剂。BrdU 在使用前用培养基 1: 100 稀释，加入稀释后的 BrdU 10μL/well，继续培养至设定时间。
- BrdU 作用后，吸弃培养基，加入 FixDenat(Bottle 2) 200μL/well，在室温下暗室中固定 30min。
- 吸弃固定液，加入 5-10% 的 BSA 室温暗室中封闭半小时，吸弃封闭液。
- 加入抗体，加入 Anti-BrdU-POD 工作液 100μL /well，室温下暗室中反应 90min。
Anti-BrdU-POD 储存液：用双蒸水 1.1mL 稀释 Anti-BrdU-POD (bottle3) 10min，充分混匀。Anti-BrdU-POD 工作液：用 antibody dilution solution (bottle 4) 1:100 稀释 Anti-BrdU-POD 储存液。
- 用无菌双蒸水 1:10 稀释 washing buffer concentrate (bottle 5)，加入稀释后的 washing Buffer 200 -300μL /well，洗板三次，拍干。最后再在一个空的细胞板外盒中加入无菌水，将待测的培养板放入其中，无菌水没过培养孔，拍干，擦干。
- 加入 Substrate solution (bottle 6) 100μL/well，室温下暗室中反应 5-30min，直到反应溶液变为蓝色。

- 在培养孔中加入 50μL/well 10% H₂SO₄，上机检测。
- 在 450nm 单波长检测读板。
- 数据统计分析。

参考文献

- 李征, 毕跃东. 改良双抗体夹心酶联免疫法测定重组人活性蛋白 C 含量的研究. 微生物学免疫学进展. 2006,04: 48-51.
- P. Thored, A. Arvidsson, E. Cacci, H. et al., Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. Stem Cells.2006, 24: 739-747.
- R.J. Lichtenwalner, J.M. Parent. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. J Cereb Blood Flow Metab. 2006, 26:1-20.
- B. Leuner, E. Gould, T.J. Shors. Is there a link between adult neurogenesis and learning? Hippocampus. 2006,16(3): 216-224.
- P. Taupin. Adult neurogenesis and neuroplasticity. Neurosci.2006,24: 9-15.

注:

[66] 使用 Roche BrdU 试剂盒，说明书链接:

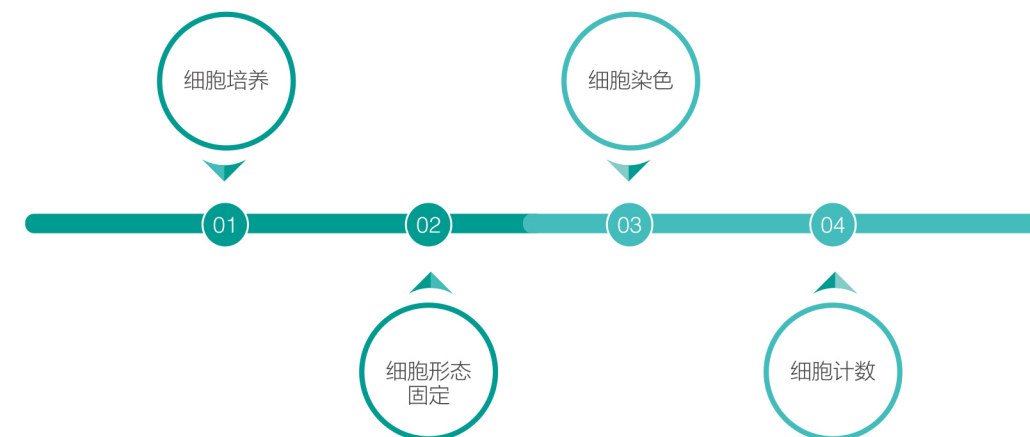
<http://lifescience.roche.com/shop/en/cn/products/cell-proliferation-elisa-brdu-chemiluminescent>。

[67] 终点时间时细胞密度不能高于 90%。

[68] 在桌面上放置吸水纸，倒扣血板轻拍，动作轻柔，防止细胞脱落，这个步骤是整个实验最易引入误差的步骤。

EDU实验

实验流程



实验材料

主要试剂

EDU 试剂盒 (C10310 锐博)^[69]

完全培养基

多聚甲醛

Triton X-100

甘氨酸

PBS

主要仪器

CO₂ 培养箱、倒置显微镜、荧光显微镜、生物安全柜、离心机

实验步骤

- 细胞培养：取对数生长期细胞，以每孔 2000 细胞接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段，一般三天最佳。
- 用细胞培养基按 1000: 1 的比例稀释 EdU 溶液 (试剂 A)，制备适量 50μM EdU 培养基。
- 每孔加入 100μL 50μM EdU 培养基孵育 2 小时，弃培养基。
- PBS 清洗细胞 1~2 次^[70]，每次 1 分钟。
- 每孔加入 50μL 细胞固定液 (即含 4% 多聚甲醛的 PBS) 室温孵育 30 分钟，弃固定液。
- 每孔加入 50μL 2 mg/mL 甘氨酸，脱色摇床孵育 5 分钟^[71] 后，弃甘氨酸溶液。
- 每孔加入 100μL PBS，脱色摇床清洗 1 分钟，弃 PBS。
- 每孔加入 100μL 的 1X Apollo 染色反应液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后，弃染色反应液。
- 加入 100μL 渗透剂 (0.5% TritonX-100 的 PBS) 脱色摇床清洗 2~3 次，每次 10 分钟，弃渗透剂^[72]。
- 去离子水按 100: 1 的比例稀释试剂 F，制备适量 1X Hoechst33342 反应液^[73]，避光保存。
- 每孔加入 100μL 1X Hoechst33342 反应液，避光、室温、孵育 30 分钟。
- 弃染色反应液；加入 100μL PBS 清洗 1~3 次。
- 染色后立即进行观测；如果条件限制请避光 4℃ 湿润保存，但不应超过 3 天。

参考文献

1. He Q, et al. Comparison in the biological characteristics between primary cultured sensory and motor Schwann cells. *Neurosci Lett.* 2012.
2. Huang Z, et al. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012.
3. Zheng LD, et al. Effects of resistin-like molecule 1 over-expression on gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2012.
4. Wen Q, et al. Change in hepatocyte growth factor concentration promote mesenchymal stem cell-mediated osteogenic regeneration. *J Cell Mol Med.* 2012.
5. Li J, et al. Plumbagin inhibits cell growth and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells in vitro through the NF-κB signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2012.
6. Li T, et al. Up-regulation of NDRG2 through nuclear factor-kappa B is required for Leydig cell apoptosis in both human and murine infertile testes. *Biochim Biophys Acta.* 2012.
7. Xiang R, et al. The miR-17-92 cluster regulates FOG-2 expression and inhibits proliferation of mouse embryonic cardiomyocytes. *Braz J Med Biol Res.* 2012.

注：

[69] 说明书链接：http://www.ribobio.com/sitecn/product_info.aspx?id=63

[70] 清洗目的是将未掺入 DNA 的 EdU 洗脱，清洗方式依据不同的细胞类型而定，贴壁不牢的细胞请降低清洗强度。

[71] 目的是中和多聚甲醛，保证染色反应体系，当采用其他方式进行细胞固定时可酌情省略此步骤。

注：

[72] 如果效果不好可酌情加入加强剂：每孔每次加入 100 μL 甲醇清洗 1~2 次，每次 5 分钟；PBS 清洗 1 次，每次 5 分钟。

[73] 可用 DAPI 代替。

MTT实验

实验材料

主要试剂

MTT

DMSO

完全培养基

胰酶

PBS

主要仪器

96 孔板、血球计数板、酶标仪

实验步骤

- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后，完全培养基重悬成细胞悬液，并计数。
- 根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度^[74] (多数为 2000 cell/well)，每组 3-5 重复，根据实验设计决定铺板数量 (如检测 5 天，则铺 5 张 96 孔板)。
- 统一铺好后，待细胞完全沉淀下来后，在显微镜下观察各实验组的细胞密度^[75]，放入细胞培养箱中培养。
- 从铺板后第二天开始，培养终止前 4h^[76] 加入 20μL 5mg/mL 的 MTT 于孔中，无需换液。
- 4h 后完全吸去培养液，注意不要吸掉孔板底部的甲瓩颗粒，加 100μL DMSO 溶解甲瓩颗粒。
- 振荡器振荡 2-5min，酶标仪 490nm 检测 OD 值。
- 数据统计分析。

参考文献

1. Fabrizio Angius, Alice Florisb. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicology in Vitro.* 2015, 29 (2): 314-319.
2. Suventha Moodley, Neil A. Koorbanally, Thrineshen Moodley. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the in vitro anti-tuberculous activity of chalcones. *Journal of Microbiological Methods.* 2014, 104: 72-78.
3. Juan C. Stockert, Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica.* 2012, 114(8): 785-796.

注：

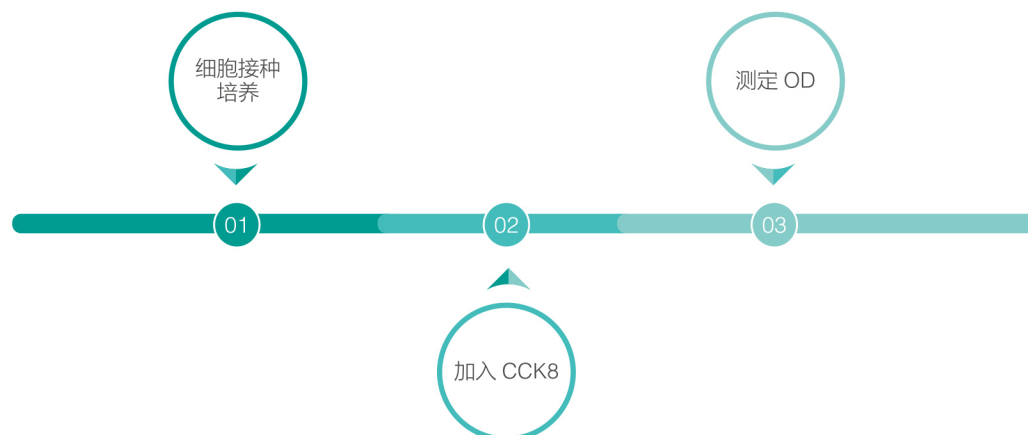
[74] 终点检测时细胞密度低于 100%。

[75] 如果密度不均匀，则固定一组，微调其他组细胞的量再次铺板，如：发现 Con 组细胞较多，降低细胞量再次铺板。

[76] 每天的检测时间点要一致。

CCK8

实验流程



实验材料

主要试剂

CCK8 完全培养基 胰酶 PBS

主要仪器

96 孔板、血球计数板、酶标仪

实验步骤

- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后，完全培养基重悬成细胞悬液，并计数。
- 根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度（多数为 2000 cell/well），每孔 100 μ l，每组 3-5 孔重复，根据实验设计决定铺板数量（如检测 5 天，则铺 5 张 96 孔板）。
- 统一铺好后，待细胞完全沉淀下来后，在显微镜下观察各实验组的细胞密度，放入细胞培养箱中培养。
- 从铺板后第二天开始，培养终止前 1-2h^[77]加入 10 μ L CCK-8 试剂于孔中，无需换液。
- 1-2h 后 96 孔板置于振荡器上振荡 2-5min，酶标仪 450nm 检测 OD 值。
- 数据分析。

参考文献

1. Assessment of caroverine as a potential chemotherapeutic agent in HNSCC cell lines. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2015 Nov;272(11):3451-6.
2. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. Int J Oncol. 2014 Sep;45(3):1027-35.
3. Caffeine inhibits the growth of glioblastomas through activating the caspase-3 signaling pathway in vitro. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015 Aug;19(16):3080-8.

注：[77] 每次检测前的反应时间要严格一致。

吉康CELIGO细胞计数法

实验目的

通过 Celigo 对细胞实现拍照和自动计数，从而大通量的检测各基因对细胞增殖的影响。

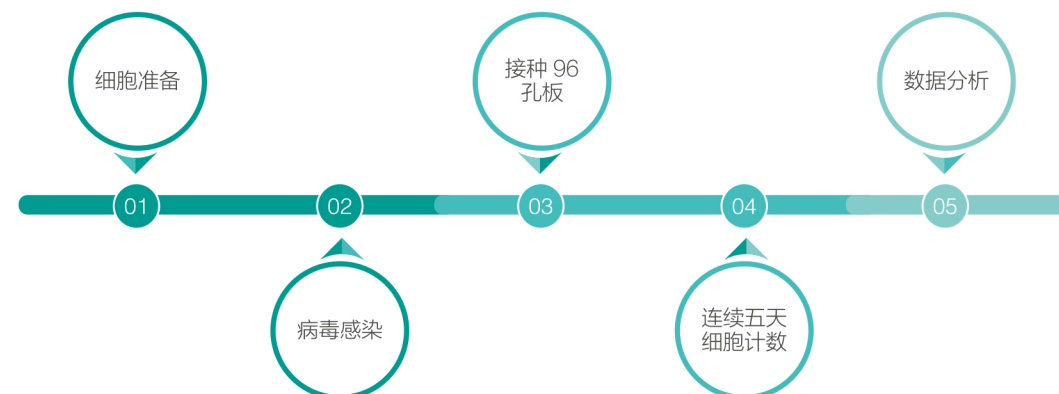
实验概述

Celigo 是基于全自动图像采集与图像数据分析的高通量筛选系统，由激发光源系统，光学放大系统，图像采集系统，目标载入机械系统和图像分析软件系统组成。该系统通过全自动目标载入，高速成像以及实时全自动化分析完成高通量的目的，目标可以从 6 孔细胞培养板到 96 孔细胞培养板。

该系统的检测原理大致为：通过对目标进行荧光激发，发射光经过光学显微镜系统，由 CCD 采集成为图片，再通过软件对图片进行分析，找出对应的生物学事件相应的光学信息，包括坐标位置信息，信号强度信息以及时间信息及其组合，分析生物学变化，包括细胞形态，细胞运动，细胞数目，细胞表达信号强弱，分子在细胞内定位，细胞周期，细胞凋亡等常见生物学现象。

吉凯 HCS 增殖检测实验中，检测目标即为感染病毒后表达 GFP 的目的细胞（生长于 96 孔板中）。Celigo 识别带绿色荧光的细胞并拍照（即读板）。然后通过软件对拍照的图像进行分析处理，计算孔板中不同组别含有的细胞数目。连续读板 5 天后，即可绘制出细胞生长曲线图，从而呈现出细胞增殖状况。

实验流程



实验材料

主要试剂

完全培养基

胰酶

PBS

主要仪器

生物安全柜、荧光显微镜、离心机、倒置显微镜、CO₂ 培养箱、Celigo

实验步骤

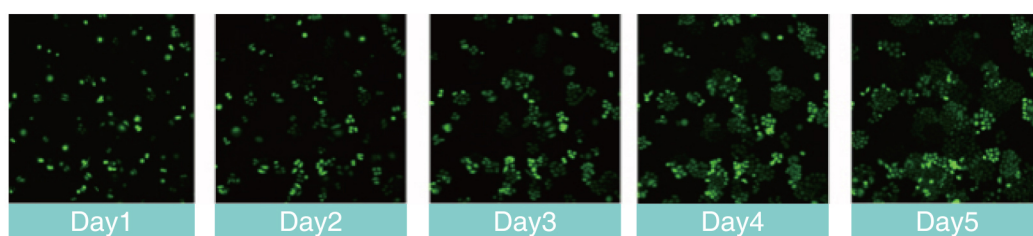
- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后，完全培养基重悬成细胞悬液，计数。
- 根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度（大多数细胞铺板数设定为 2000 cell/well）。每组 3 复孔，培养体系为 100 μL/孔，铺板过程中需确保每孔加入细胞数目一致 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。
- 从铺板后第二天开始，每天 Celigo 检测读板一次，连续检测读板 5 天。
- 通过调整 analysis settings 的输入参数，准确地计算出每次扫描孔板中的带绿色荧光的细胞的数量；对数据进行统计绘图，绘出 5 天的细胞增殖曲线。

分析概述

针对 96 孔板每一个实验孔，Celigo 每个时间点扫描获得 4 个视野的图像，然后用相应分析软件对这些图像中的细胞进行计数，得到该实验孔的细胞计数值。将每一个时间点各实验组 3 个复孔的细胞计数值求均值，以细胞数为纵坐标，时间点为横坐标，即可绘制出各组细胞连续 5 天的细胞生长曲线。各实验组细胞生长曲线的差异可以直观反映细胞增殖状况的差异。

分析步骤

- Celigo 连续 5 天在同一时间点对目标 96 孔板进行扫描读板，获得扫描图片；下图为 Celigo 针对同一视野连续 5 个时间点获得的扫描图像示例（细胞为 SGC-7901）。



※ 特殊说明：Celigo 获得的图像是黑白图像，上图对 Celigo 图像进行了上色处理。

Celigo 所得图片原始图大小相当于显微镜同等分辨率的 100-150 倍左右，具体如下：

Celigo	程序	图片倍数	分辨率dpi
	96孔板	100-150倍	96 (1μm x 1μm)

- 用图像分析软件对扫描图片进行细胞计数（软件分析时，需尽量优化单个细胞的识别条件，以便获得准确的细胞计数值），并将细胞计数结果导出。
- 将导出的实验数据进行统计分析。

针对 HCS 预实验

- 根据细胞计数值和时间点，绘制基于细胞计数值的细胞生长曲线。
- 计算各组细胞各时间点细胞计数值比该组第 1 天的细胞计数值的比值，获得该组细胞各时间点的增殖倍数，根据该增殖倍数和时间点，绘制基于细胞增殖倍数的生长曲线。
- 根据不同 MOI 下 NC 组的生长曲线，判断目的细胞 HCS 实验的最佳感染 MOI、铺板数等操作条件。

针对 HCS 筛选实验

- 根据细胞计数值和时间点，绘制基于细胞计数值的细胞生长曲线。
- 计算各组细胞各时间点细胞计数值比该组第 1 天的细胞计数值的比值，获得该组细胞各时间点的增殖倍数，根据该增殖倍数和时间点，绘制基于细胞增殖倍数的生长曲线。
- 计算最后一个时间点，即第 5 天，各组细胞增殖倍数相对于阴性对照 NC 组增殖倍数的 Fold Change 值，具体为。

$$\text{Fold Change (NC/ 实验组)} = \frac{\text{增殖检测 NC 组细胞计数倍数}}{\text{实验组细胞计数倍数}}$$

- ※ Fold change ≥ 2 时，即该实验组细胞相比 NC 组细胞，细胞增殖显著减缓，从而推断该实验组目的 shRNA 慢病毒针对的目的基因为增殖相关的阳性基因。（仅供参考）

参考文献

1. Differential susceptibility of human primary aortic and coronary artery vascular cells to RNA interference. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24;425(2):261-5.
2. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. BMC Biol. 2012 Mar 22;10:29.
3. High throughput RNAi assay optimization using adherent cell cytometry. J Transl Med. 2011 Apr 25;9:48.

还有其他细胞培养问题 ?

细胞培养学问深
免费秘籍等你拿

干货专区

扫描下方二维码，进入细胞专区

一个实验知识的分享地



血管形成

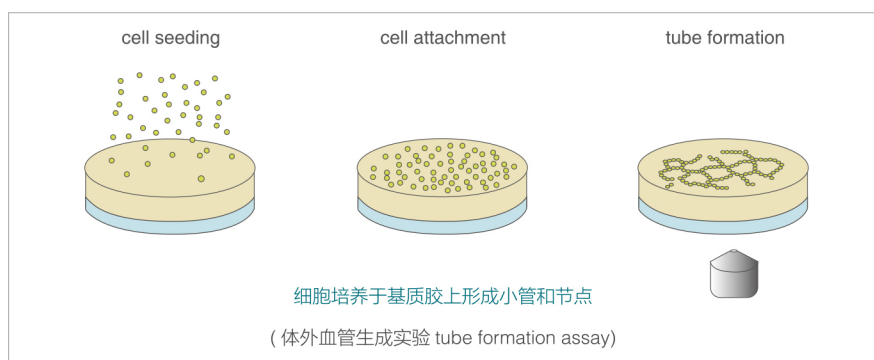
实验目的

通过研究肿瘤细胞上清液诱导 HMEC-1 细胞形成管腔的能力，从而分析该细胞成瘤以及转移能力。

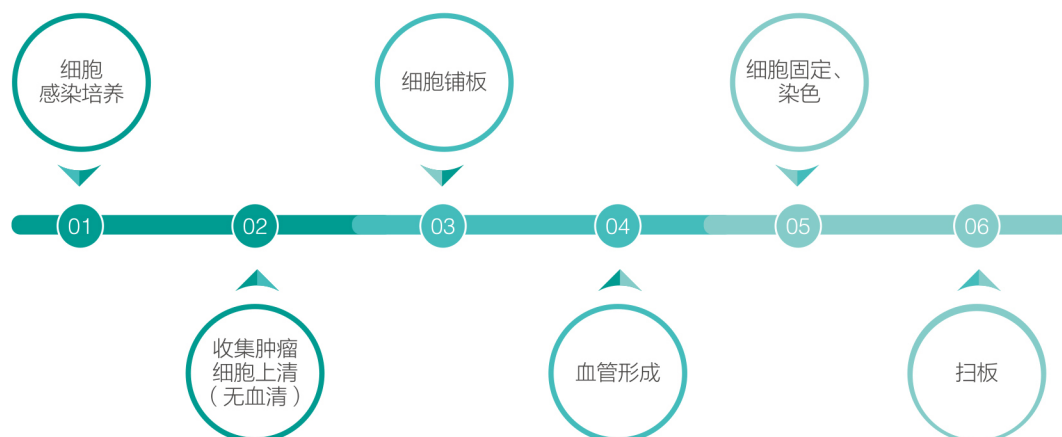
实验原理

肿瘤血管生成是一个极其复杂的过程，一般包括血管内皮基质降解、内皮细胞移行、内皮细胞增殖、内皮细胞管道化分支形成血管环和形成新的基底膜等步骤。无论原发性肿瘤还是继发性肿瘤，一旦生长直径超过 1-2mm，都会有血管生成，这是由于肿瘤细胞自身可分泌多种生长因子，诱导血管生成。血管生成在肿瘤的发展转移过程中起到重要作用，抑制这一过程将能明显阻止肿瘤组织的发展和扩散转移。

吉凯体外血管生成实验中，收集不同实验组别肿瘤细胞无血清上清液，刺激人脐静脉内皮细胞 HMEC-1 在 Matrigel 上形成管腔，通过 CQ1 仪器扫描板分析比较各组别肿瘤细胞上清分泌物对血管生成的影响。



实验流程



实验材料

主要试剂

胎牛血清

基础培养基

胰酶

PBS

Matrigel

Calcein-AM

主要仪器

荧光显微镜、CO₂ 培养箱、倒置显微镜、离心机、CQ1

实验步骤

(使用 Corning Matrigel, 使用说明书链接: <http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/SPC-356234.pdf>)

- 细胞感染后，铺 2×10^5 个细胞于 6 孔板中，待贴壁后，PBS 洗涤 2 遍^[78]，换无血清培养基培养 24h，收集上清。
- 提前一天将 Matrigel 从 -20℃ 中取出，4℃ 放置过夜融化，并将实验用孔板及枪头 -20℃ 预冷^[79]。
- 待 Matrigel 融化充分后，于预冷的 96 孔板中铺 Matrigel，每孔 70μL，37℃ 凝固 30min，备用。
- 消化 HMEC-1 细胞，用无血清培养基洗细胞 2-3 次，尽量将血清去除干净^[80]，用预先收集的细胞培养上清重悬^[81]为 3×10^4 细胞 / 100μL^[82]，每孔 100μL 加到 (3) 中备用的 96 孔板中。
- 37℃ 培养预设时间 (2-4h)^[83] 后，弃去旧液，每孔加入 50μL Calcein-AM^[84] 浓度为 0.2μM 的培养基 37℃ 孵育 5~10min。
- 荧光显微镜下观察，发现细胞已被染色后，置于 CQ1 仪中扫描，获得图片及数据。

实验材料

- Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. Nat Protoc. 2010 Apr;5(4):628-35. doi: 10.1038/nprot.2010.6. Epub 2010 Mar 11.
- Ueda D. et al. Inhibitory effect of lead on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. Hum Cell. 1997 Dec;10(4):283-91.
- Li Y. et al. Ephrin-A3 and ephrin-A4 contribute to microglia-induced angiogenesis in brain endothelial cells. Anat Rec (Hoboken). 2014 Oct;297(10).
- Mildner M. et al. Secretome of peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing. PLoS One. 2013;8(3):e60103.

注:

[78] 其目的是为了尽量除掉培养基中的血清，因为血清对 HMEC-1 细胞成管有很大影响。

[79] Matrigel 基质胶 22~35℃ 温度环境下快速成胶，因此溶解时在 4℃ 冰上过夜冻融 (4 度时会随着温度的上升部分成胶)。所有必须使用预冷的移液管、吸头及吸管操作 Matrigel。

[80] 其目的是尽量消除血清对实验结果的影响。

[81] 血管形成实验需要设置阳性对照 (成管能力强): 完全培养基 (含血清) 和阴性对照 (成管能力弱或者不成管) 基础培养基 (不含血清)。

[82] 可以根据情况调整细胞密度，细胞密度在 $1.5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ / 孔，有比较好的成管能力，如果太少成管不明显，太多细胞则会连成一片，观察不到管腔结构。

[83] 成管时间和细胞铺板密度有关 (观察阳性对照组)，所以铺的多成管需要的时间短，铺的少成管需要的时间多，因此什么时候染色扫描，根据自己观察的情况确定。

[84] 该试剂是一种可对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂，它穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Calcein，从而被滞留在细胞内，发出强绿色荧光。

想查看更多实验操作方法和技巧

扫描进入干货专区

获取更多实验Protocol及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



肿瘤细胞干性成球实验方法

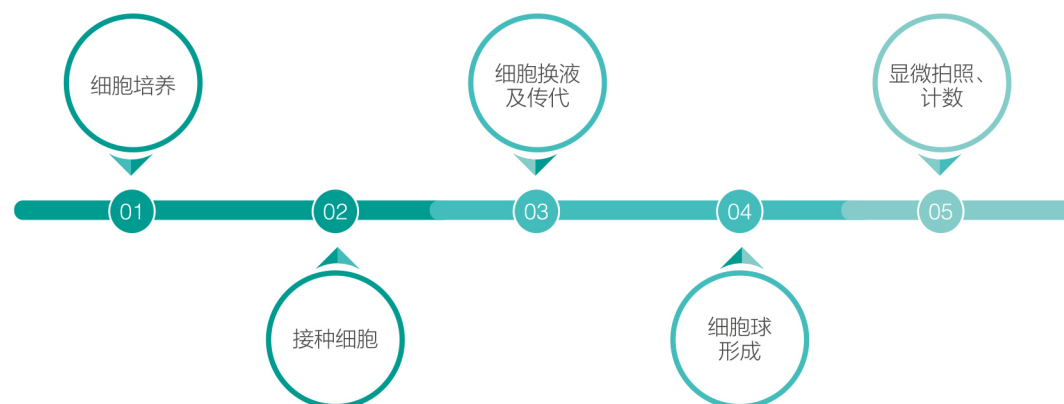
实验目的

通过感染后细胞在低粘附细胞培养板上无血清悬浮培养形成细胞球的能力来鉴定慢病毒感染后细胞的自我更新、体外增殖、干细胞标记表达及体内成瘤等特性。

实验原理

无血清培养成球法是分离肿瘤干细胞（CSC）的有效方法之一。在无血清培养基中添加成分明确的生长因子，促进细胞增殖，保持细胞未分化状态，可对肿瘤细胞进行筛选，分离出肿瘤干细胞。单个细胞在体外培养一段时间后，显微镜下观察到其形成若干大小及形态不等、结合紧密的悬浮球。每个悬浮球含有30个以上的细胞，通过计数干性成球数，可对肿瘤细胞的干性成球能力做定量分析，了解细胞的自我更新、体外增殖等能力。

实验流程



实验材料

主要试剂

DMEM/F12

胰酶

重组人表皮生长因子 (EGF)

重组人碱性成纤维生长因子 (bFGF)

B-27 supplement

主要仪器

生物安全柜、荧光显微镜、离心机、倒置显微镜、CO₂ 培养箱

实验步骤

- 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化，无血清培养基重悬，制成细胞悬液，计数。
- 细胞接种：肿瘤干细胞培养基为无血清培养基 DMEM/F12，其中含 10ng/ml bFGF、20ng/ml EGF、10μl/ml B27，将细胞悬液以 10000-20000 个^[85] 细胞 / 孔（根据细胞生长情况确定）的密度接种于超低粘附 6 孔板培养板中，每孔加 2mL 培养液，每个实验组设 3 个复孔。
- 将接种好的细胞于 37°C、5%CO₂ 条件下培养，每隔 2-3 天少量换液，每隔 6-8 天传代^[86]。少量换液时，待细胞球沉到底部，弃去 500μl 表层旧的培养基，再加入 500μl 新鲜培养基^[87]，混匀。传代时，离心除去旧培养基^[88]，用胰酶消化细胞沉淀，离心重悬后制成单细胞悬液，加入干细胞培养液以 10000-20000 个细胞 / 孔的密度传代，随时在显微镜下观察细胞成球情况和形态。实验取 2-3 代细胞球。
- 显微镜拍照：悬浮细胞球形成后，随机选取视野，进行拍照，拍 40X 照片 5 张，100X 视野照片 3 张，进行干性细胞球的统计分析和形态比较。
- 以 40X 的照片来计数，进行数据分析，比较实验组与对照组细胞干性成球能力的差异：计算各组细胞球数（Sphere-forming cells per field），标准差，T-Test 分析得到 p 值，判断是否有显著性差异（p<0.05，有显著性差异，否则无显著性差。

实验材料

- Lu C. et al. GnRH participates in the self-renewal of A549-derived lung cancer stem-like cells through upregulation of the JNK signaling pathway. *Oncology Reports*, 2015, 34(1):244-250.
- Qiu X. et al. Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Letters*, 2012, 323(2):161-170.
- Leung EL. et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *Plos One*, 2010, 5(11):e14062.
- Levina V. et al. Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop. *Cancer Research*, 2010, 70(1):338.
- Eramo A. et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*, 2008, 15(3):504.
- Ponti D. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*, 2005, 65(13):5506-5511.

注:

[85] 正常增殖细胞按照 20000 个每孔铺板, 增殖较快的细胞可以相对减少细胞密度。

[86] 大约 50 个细胞成球大小后可以进行传代。

[87] 如果发现细胞球未沉入底部, 无法进行换液操作的话, 可以直接补液。

[88] 可以直接将全部液体吸入大的离心管进行离心操作, 然后除去旧培养基。

想查看更多实验操作方法和技巧

扫描进入干货专区

获取更多实验Protocol及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



细胞粘附检测实验方法

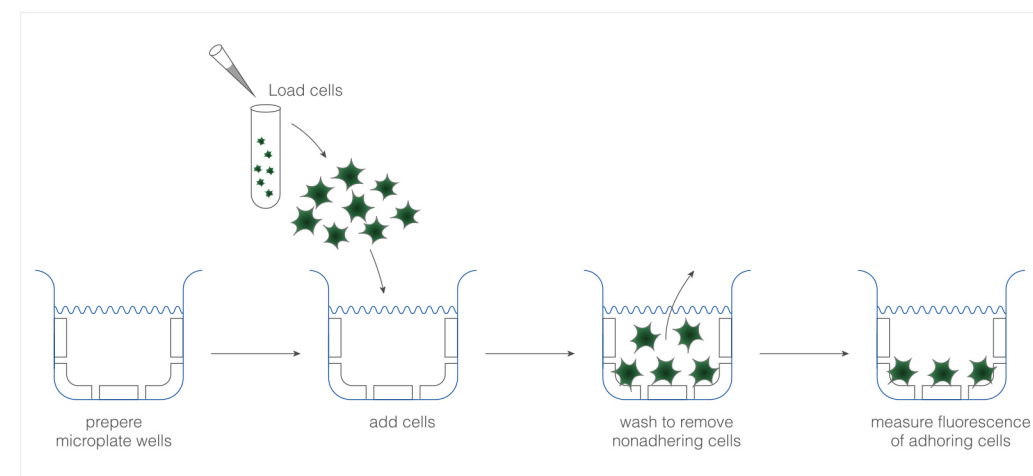
实验目的

通过细胞粘附实验来验证目的基因对细胞基质粘附能力的影响。

实验原理

细胞粘附即细胞与细胞外基质分子之间的相关作用, 其在肿瘤细胞转移、浸润、胚胎发生等过程中起着重要的作用, 同时正常细胞的生长和组织分化等过程中也需要众多细胞粘附功能发挥作用。在肿瘤细胞的组织间隙转移过程中, 细胞外基质是其必经的一环。细胞外基质 ECM 是由大分子构成的错综复杂的网络, 肿瘤细胞在发生转移前以及转移过程中需要通过和 ECM 的相互作用, 与细胞移动性有关的细胞骨架形成复合物, 而最终执行转移。

细胞粘附实验中, 首先将细胞外基质蛋白 (或单个组分) 包埋到细胞培养板上, 然后接种细胞, 孵育一定时间让细胞发生粘附, 随后洗去未粘附细胞, 对粘附的细胞进行定量 (如细胞计数、染色测 OD 值等), 从而对细胞粘附能力进行判断 (如下示意图)。



实验材料

主要试剂

胎牛血清

基础培养基

胰酶

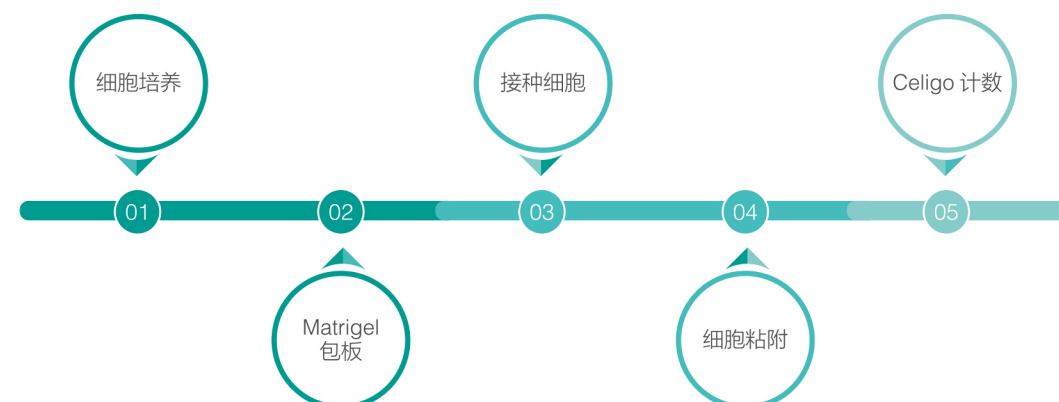
Matrigel

PBS

主要仪器

荧光显微镜、离心机、倒置显微镜、CO₂ 培养箱、Celigo

实验流程



实验步骤

- 用无血清培养基将 Matrigel^[89] 配制成 10µg/250µl (1:300) 的人工基底膜胶备用。
 - 96 孔板每孔中铺 Matrigel 2µg/50µl, 放于超净台中风干^[90]。
 - 96 孔板每孔加入适量无血清培养基 (或 PBS 或生理盐水), 放置 60-90 分钟^[91], 洗去多余的胶^[92]。
 - 取处于对数生长期、已感染表达 GFP 慢病毒的细胞以 4000/孔^[93] 接种在铺胶的 96 孔板中, 设 3 个重复孔, 放入 37°C、5%CO₂ 培养箱中分别培养 40min^[94]。
 - 在相应时间点取出 96 孔板, 吸出培养液, 用 PBS 洗 3 遍, 洗去未粘附细胞。
 - Celigo 扫板^[95], 分析计细胞数。
- 数据分析, 结果判断。

注:

[89] 注意使用时提前 1 天将胶放入 4 度解冻备用, 包括使用的枪头、96 孔板都需要提前 1 天放入 -20, 操作时动作要快, 以防止铺板时胶提前凝固。

[90] 一定要等胶凝固, 可以放置过夜风干。

[91] 时间不固定, 只要将胶洗去, 孔板底部无残留。

[92] 只需在板上形成薄薄的一层即可, 应洗至板内看不到培养基的淡红色。

[93] 细胞密度可以相对调整, 只要统计好粘附实验前后细胞数量即可 (可以细胞密度 10000 左右)。

[94] 可以设置时间梯度, 观察细胞粘附情况。

[95] 如果细胞是感染荧光的, 那么在扫板的时候只要选择相应荧光通道进行扫板即可。

如果是无荧光细胞, 进行扫板后发现细胞不清晰, 无法计数, 可以使用 0.25% 的结晶紫染色, 然后待晾干后进行扫板统计分析。

想查看更多实验操作方法和技巧

扫描进入干货专区

获取更多实验 Protocol 及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



ANNEXIN V-APC & PI 双染法流式细胞仪检测细胞凋亡实验方法

实验目的

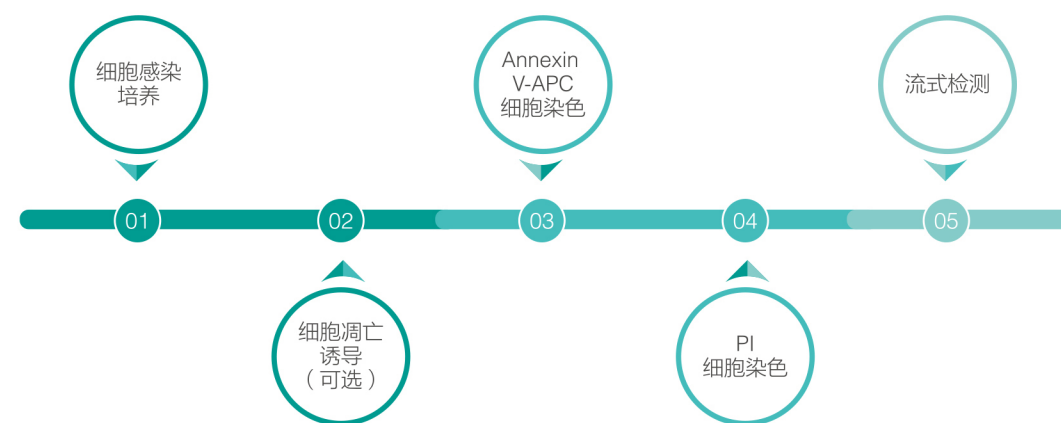
通过检测处于凋亡状态的细胞数量来检验目的基因与细胞凋亡的关联或者药物对细胞凋亡的影响。

实验原理

正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 主要分布在细胞膜内侧, 即与细胞浆相邻的一侧。在细胞发生凋亡的早期, 不同类型细胞的 PS 都会外翻到细胞表面, 暴露在细胞膜外侧, 这一变化早于细胞皱缩、染色质浓缩、DNA 片断化和细胞膜的通透性增加等凋亡现象。Annexin V 是一种 Ca²⁺ 依赖的磷脂结合蛋白, 具有易于结合磷脂类的特性, 对 PS 有高度的亲和性, 因此, Annexin V 标记上荧光素可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS, 从而检测处于早期凋亡的细胞。

PS 外翻不是早期凋亡细胞独有, 也发生在中、晚期凋亡和坏死细胞中。但早期凋亡细胞的细胞膜是完好的, 而中、晚凋和坏死细胞的细胞膜完整性已经丧失。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸染料, 它不能透过完整的细胞膜, 但凋亡中晚期的细胞和死细胞由于细胞膜通透性的增加, PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用, 就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

实验流程



实验材料

主要试剂

凋亡试剂盒

PBS

胰酶

主要仪器

流式细胞仪、生物安全柜

实验步骤

- 待各实验组 60mm 细胞培养皿细胞生长至覆盖率约为 70%^[96] 时可以做凋亡检测。
- 若为贴壁细胞，则上清中细胞也需收集。胰酶消化，完全培养基重悬成细胞悬液，与上清细胞收集于同一 5mL 离心管中，每组设三个复孔（为保证上机细胞数足够，细胞数目 $\geq 5 \times 10^5$ / 处理）。若为悬浮细胞，直接收集。
- 300g 离心 3min，弃上清，PBS 洗涤细胞沉淀^[97]。
- 1000 μ L 1x binding buffer 洗涤细胞沉淀一次^[98]，300g、3min 离心，收集细胞。
- 200 μ L 1x binding buffer 重悬细胞沉淀。
- 双染：加入 10 μ L annexin V-APC 染色，室温 10-15min 后离心去上清，200 μ L 1x binding buffer 重悬细胞；5 μ L PI 染色，避光染色 15min。
- 上机检测前，根据细胞量，补加 400-800 μ L 1x binding buffer^[99]。
- 结果分析，使用流式细胞仪分析软件进行分析。

实验材料

- NIEHS, Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007,35(4):495-516.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., et al. *Journal of Immunology.* 1992,148:2207-2216.
- Inaba, N., Sato, N., Ijichi, M., et al. *Tumor Biology.* 1984, 5:75-85.
- Yuliang Pan, Wenqian Shan, Heting Fang, et al. Sensitive and visible detection of apoptotic cells on Annexin-V modified substrate using aminophenylboronic acid modified gold nanoparticles (APBA-GNPs) labeling. *Biosensors and Bioelectronics.* 2014, 52:62-68.
- Bank H. Rapid assessment of Islet viability with A cridine orange and Propidium Iodide In vitro. *Cellular & Developmental Biology.* 1988, 24: 266-273.

注：

[96] 一方面是保证有足够的细胞量，另一方面是保证细胞处于对数生长期。

[97] 本步骤是为了洗去培养基残留，在细胞量不足的情况下，可以省去洗涤。

[98] 在第一次重悬细胞的时候将细胞从 5ml 离心管中转移到 1.5ml 离心管中，5ml 的离心管易丢失细胞，如果没有在上一步骤使用 PBS 清洗，则在本步骤清洗后转移。

[99] 根据流式细胞仪和实验的细胞密度要求稀释。

想查看更多实验操作方法和技巧

扫描进入干货专区

获取更多实验 Protocol 及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地



PI-FACS 细胞周期检测实验方法

实验目的

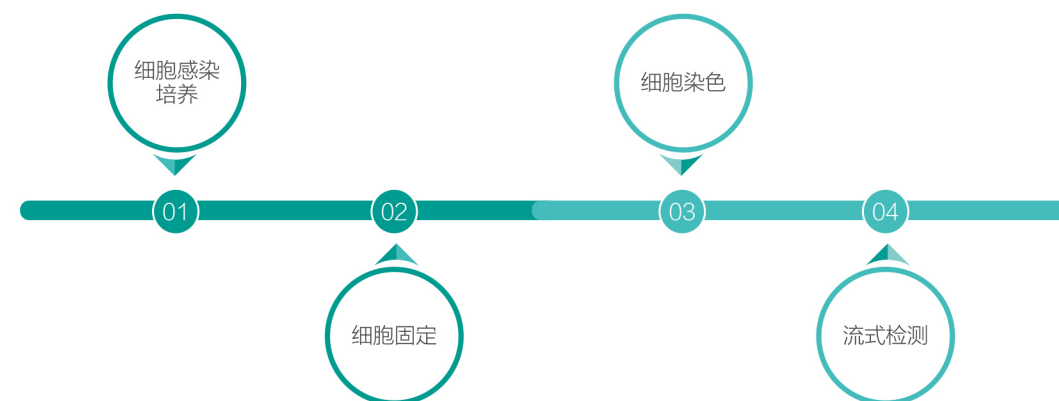
通过对细胞内 DNA 含量的检测，验证目的基因对细胞生长周期的影响。

实验原理

细胞周期 (cell cycle): 是指细胞从前一次分裂结束起到下一次分裂结束为止的活动过程，通常由 G0/G1 期、S 期、G2/M 期组成。G0/G1 期：二倍体细胞的 DNA 含量 (2N)。S 期：DNA 开始合成，这时细胞核内 DNA 的含量介于 G1 期和 G2 期之间。G2/M 期：DNA 复制结束成为 4 倍体 (4N)。

碘化丙啶 (Propidium, PI) 为插入性核酸荧光染料，能选择性的嵌入核酸 DNA 或 RNA 双链螺旋的碱基之间，产生红色荧光，并且荧光强度和所嵌入的核酸含量成正比。细胞周期检测时，首先用 RNA 酶将 RNA 消化排除影响，通过流式细胞术检测 PI 荧光强度直接反映细胞各时相的 DNA 分布状态，从而计算出各时相的百分率。

实验流程



实验材料

主要试剂

PI RNase A 胰酶 PBS

主要仪器

流式细胞仪、生物安全柜

实验步骤

- 细胞感染后第三天^[100]，至覆盖率约为 60%-80%（看细胞生长快慢，保证第三步胰酶处理前细胞密度为 80%）时，吸取原有细胞培养基，换无血清培养基进行饥饿 12-16h^[101]（最好饥饿过夜）。
- 饥饿完成后，加入正常培养基培养 3-6h^[102]。
- 胰酶消化，完全培养基重悬成细胞悬液，收集细胞于 5mL 离心管中，每组设三个复孔（为保证上机细胞数足够，细胞数目 $\geq 10^6$ /处理）。若为悬浮细胞，直接收集。
- 300g 离心 5min，弃上清，PBS 洗涤细胞沉淀 1 次。
- 300g、5min 离心，去上清，4℃ 预冷的 75% 乙醇固定细胞^[103] 至少 1h。
- 300g 离心 5min 去固定液，PBS 洗涤细胞沉淀一次^[104]。
- 细胞染色液配制：40×PI 母液（2mg/mL）：100×RNase 母液（10mg/mL）：1×PBS=25:10:1000。
- 细胞染色：根据细胞量^[105]，加入一定体积的细胞染色液（0.6-1mL）重悬，使上机时细胞通过率为 300~800 Cell/s。
- 上机检测。
- 数据分析。

实验材料

1. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Science. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. Science. 1969,163(3872):1213-4.
2. Bank H. Rapid assessment of Islet viability with A cridine orange and Propidium Iodide In vitro. Cellular & Developmental Biology. 1988, 24: 266-273.
3. Krishan, A. (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cells by propidium iodide staining. J. Cell. Biol. 66: pp. 188-193.
4. Krishan .Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. JCB. 1975,66 (1): 188-193.

注：

[100] 一般为第二天，可以防止最后检测时细胞密度过高，具体根据细胞生长速度。

[101] 有部分细胞在无血清培养基的情况下生长会受较大的影响，这类情况应缩短无血清培养时间。

[102] 根据细胞生长快慢，如果生长较快，则时间较短。

[103] 每加一个样后都需要先混匀再加下一个样，防止细胞结团。

[104] 如果细胞量很少，可以不做第 4 步和第 6 步。

[105] 1E6 个细胞可以加 600ul 的染色液。

想查看更多实验操作方法和技巧

扫描进入干货专区

获取更多实验 Protocol 及操作视频

干货专区

一个实验知识的分享地

