

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 17 日 18:00 — 2025 年 5 月 22 日 21:00

12.Transwell 细胞迁移（一）

一、实验目的

本实验旨在利用 Transwell 实验检测 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的迁移能力，分析耐药细胞株的迁移特性，为揭示膀胱癌 ADC 耐药机制提供实验依据。

二、实验内容

2.1 实验设计

样本类型：T24 野生型细胞株、低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株。

重复次数：每组 3 个复孔。

2.2 测定原理

Transwell 测细胞迁移的原理是基于细胞的趋化性运动。实验中，细胞被放置在上室，而下室加入含有趋化因子的培养基，形成化学浓度梯度。细胞感知到这种梯度后，会主动穿过带有微孔的膜向趋化因子浓度较高的下室迁移。实验结束后，通过显微镜观察并计数穿过膜的细胞数量，即可评估细胞的迁移能力。

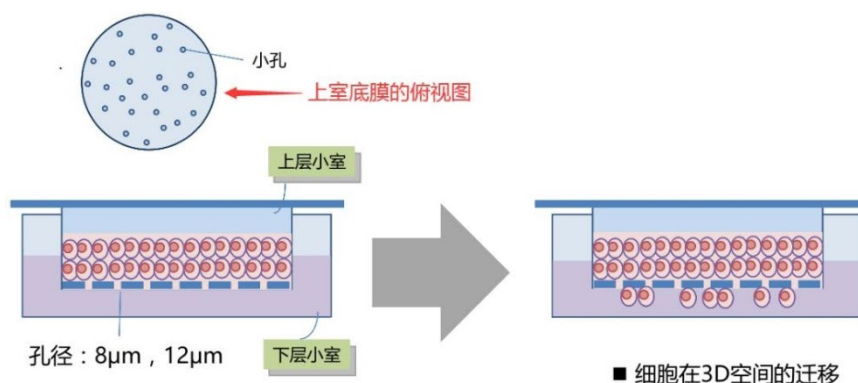


图 1 Transwell 小室原理

三、材料与试剂

3.1 材料

T25 细胞培养瓶

枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

Transwell 小室（8μm 孔径）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 17 日 18:00 — 2025 年 5 月 22 日 21:00

人膀胱移行细胞癌细胞株 (T24)

低, 中, 高耐药细胞株 T24-RC48

3.2 试剂

PBS、胰酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司

McCoy's5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司

细胞周期检测试剂盒 (联科生物, CCS012)

4%多聚甲醛

结晶紫

四、实验仪器

超净台: 苏州净化设备厂

台式常温低速离心机

倒置相差显微镜

五、实验步骤

5.1 将 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别接种于 T25 细胞培养瓶。

5.2 24 小时后, 将每瓶细胞的完全培养基换成含有 1%FBS 的 McCoy's5A 培养基饥饿处理 24 小时。

5.3 将 Transwell 小室放入 24 孔板中, 下室加入 500 μ l 含 10%FBS 的 McCoy's5A 培养基。

5.4 用胰酶消化处理后的细胞, 制备成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 3×10^5 个/ml。

5.5 取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室, 每组设置 3 个复孔。

5.6 将 24 孔板置于 37°C、5%CO₂培养箱中培养 24 小时。

5.7 取出 Transwell 小室, 用 PBS 轻轻冲洗上室内外表面, 去除未迁移的细胞。

5.8 用棉签轻轻擦去上室内层未迁移的细胞。

5.9 使用 4%多聚甲醛固定细胞 15 分钟。

5.10 用 PBS 冲洗 2 次, 每次 3 分钟。

5.11 使用结晶紫染色 10 分钟。

5.12 清水洗去浮色, 晾干。

5.13 将染色后的小室置于湿润的载玻片上, 沿十字线拍照记录细胞迁移情况。

5.14 使用图像分析软件 Image J 测量并计算迁移细胞数量。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 17 日 18:00 — 2025 年 5 月 22 日 21:00

六、实验结果

本次 Transwell 细胞迁移实验中，每室铺板细胞数为 30000 个，染色结果显示细胞数目过多。细胞在 Transwell 小室的下室表面形成密集的聚集区域，彼此之间相互重叠严重，导致无法清晰区分单个细胞的边界，这使得迁移细胞数量的统计变得困难且不可靠。尽管整体染色效果良好，细胞染色均匀，背景清晰，但由于细胞密度过高，大量细胞重叠在一起，严重影响了实验结果的定量分析。

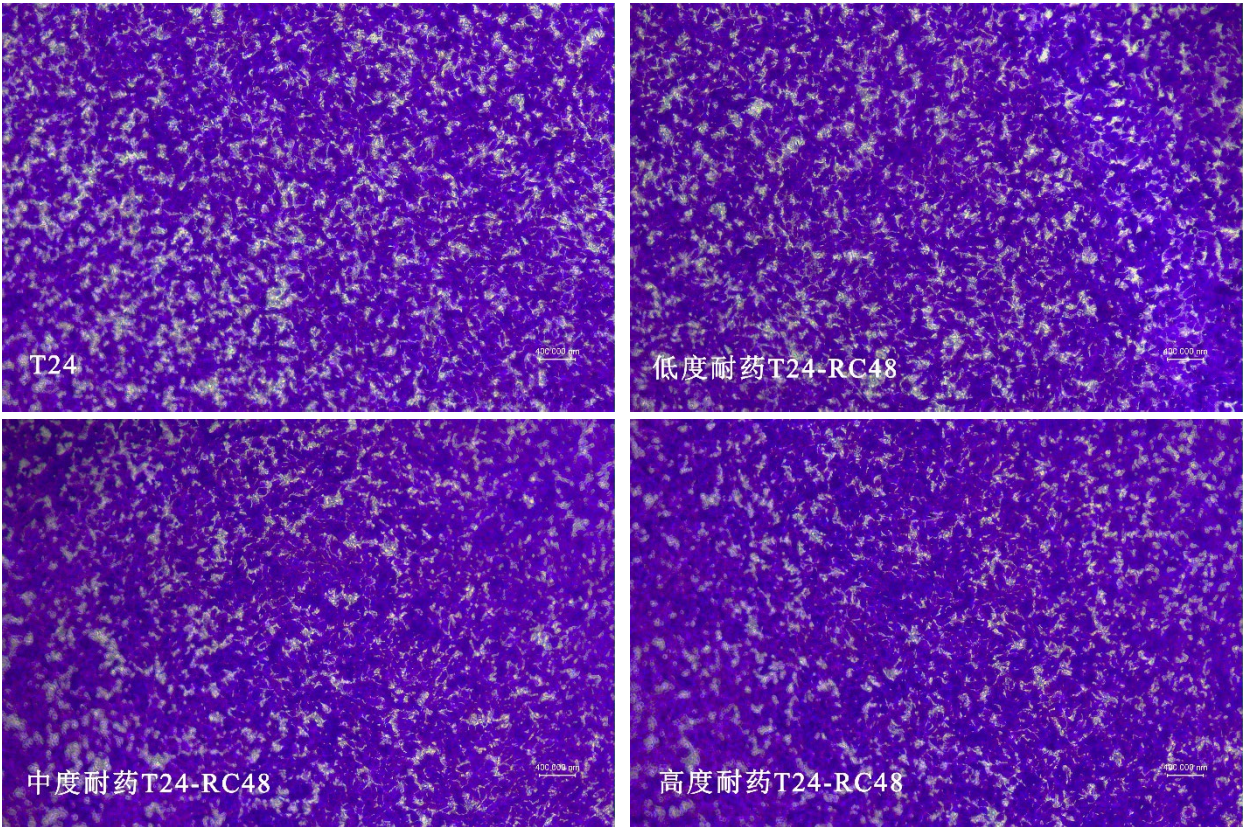


图 2 倒置相差显微镜下观察结晶紫染色后的 Transwell 小室

七、结果分析

造成上述问题的主要原因可能是铺板时细胞密度过高。为解决这一问题，下一次实验将每室细胞数调整为 10000 个，以减少细胞重叠，使细胞分布更加均匀，从而便于清晰区分细胞边界。通过降低细胞密度，预期可以显著改善细胞的分布情况，提高迁移细胞数量统计的准确性，为后续实验提供更可靠的实验数据。