

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 31 日 18:00 — 2025 年 6 月 4 日 21:00

14. Transwell 细胞侵袭（一）

一、实验目的

本实验旨在利用 Transwell 侵袭实验初步检测中、高耐药 T24-RC48 细胞株的侵袭能力，探究耐药性与细胞侵袭行为的关系，为正式 Transwell 侵袭实验摸索条件，争取为解析膀胱癌 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： 中度耐药/高度耐药 T24-RC48 细胞株。

细胞密度： 每孔 10000 个细胞。

重复次数： 每组 3 个复孔。

基质胶： Transwell 小室预先包被 Matrigel 基质胶（1:8 稀释）

2.2 测定原理

Transwell 侵袭实验在迁移实验基础上增加了基质胶屏障。实验中，Transwell 小室上室预先铺 Matrigel 模拟细胞外基质环境，细胞需分泌蛋白酶降解基质胶后，才能穿过微孔膜向下室迁移。通过比较穿过基质胶的细胞数量，可评估细胞的侵袭能力。

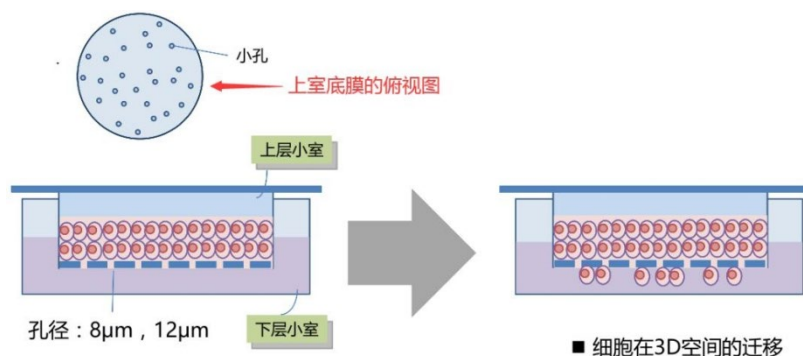


图 1 Transwell 小室原理

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

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 31 日 18:00 — 2025 年 6 月 4 日 21:00

移液器：Eppendorf

Transwell 小室（8μm 孔径）

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

基质胶 Matrigel 购自康宁，货号 354234

McCoy's5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司

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 在 4°C条件下（冰上操作）将 Matrigel 胶用无血清的 McCoy's5A 细胞培养基 1:8 进行稀释。

5.4 取 60μl 均匀添加到 Transwell 小室上室面，37°C培养箱中孵育 3h，使基质胶聚合成薄膜。

5.5 孵育后将上室中多余液体吸掉，加入低血清培养基 100μl /小室，置于培养箱 30min，进行基底膜水化。

Tips:

- （1）将枪头沿小室内壁将 Matrigel 轻轻打出，不要产生气泡，切忌戳到小室滤膜。
- （2）加入的 Matrigel 胶的体积不可太大，把聚碳酸酯膜浸湿即可。
- （3）Matrigel 在过高或过低的温度均易凝固，操作所需枪头等都应提前在 4°C预冷。
- （4）铺胶时保证液面水平，胶的厚度均匀一致，切勿产生气泡。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 31 日 18:00 — 2025 年 6 月 4 日 21:00

5.6 加入 10% 血清 McCoy's5A 培养基 600 μ l /孔，然后用镊子将 Transwell 小室置于 24 孔板内。

5.7 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 1×10^5 个/ml。

5.8 取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室，每组设置 3 个复孔，继续培养 48h。

5.9 加入 800 μ l PBS 至空白培养孔，轻轻放入已经吸除培养基的小室，轻轻清洗（全部的清洗操作注意不要刮蹭或冲落膜下部已经迁移的细胞）。

5.10 轻轻擦去小室内层的细胞：用棉签，可以稍微扯松一点，确保边缘也被擦干净，擦后用 PBS 冲洗内壁。

5.11 将小室转移至加有 800 μ l/孔 4%多聚甲醛的空白培养孔中，室温固定 15min；PBS 清洗两遍，每次 2min（所有清洗操作泡着就行，少晃动，不要涮洗）。

5.12 将小室转移至加有结晶紫染液 600 μ l/孔的空白培养孔中，染色 10min；染色结束后用清水洗去浮色，洗两遍，每次 2min。

5.13 将染色够的小室置于洁净载玻片，注意不要完全干燥，稍微湿润会让细胞形态更好；十字划分进行拍照：沿十字线拍一遍再把四个角各拍一遍。

5.14 使用图像分析软件 Image J 测量并计算迁移细胞数量。

六、实验结果

本次实验中，各组细胞侵袭能力均表现较低。结晶紫染色显示，Transwell 小室下室表面仅零星分布少量细胞（图 2）。

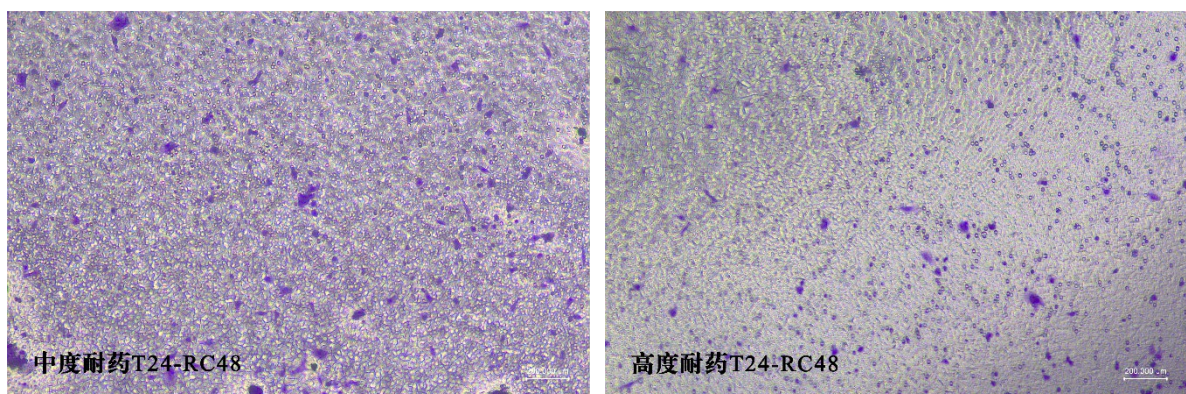


图 2 倒置相差显微镜下观察结晶紫染色后的 Transwell 小室

七、结果分析

实验结果显示，各组细胞侵袭数量显著低于预期，可能的原因有：1）每孔 10000 个细胞在 48h 侵袭实验中难以形成有效迁移群体，尤其在基质胶屏障下，细胞穿透效率进一步降低；

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 31 日 18:00 — 2025 年 6 月 4 日 21:00

2) 侵袭实验可能需要更长时间以完成基质胶降解及迁移过程；3) 预铺的 Matrigel 稀释比例或厚度可能阻碍细胞侵袭；4) 下室血清浓度不够高，与上室未形成有效的浓度梯度。且由于使用的是重复利用的 Transwell 小室，染色后小室背景不清楚，影响观察。

下次实验将使用全新的 Transwell 小室，将每孔细胞数调整为 50000 个，以增加穿透细胞数。适当提高下室血清浓度以形成有效的浓度梯度。也可适当延长孵育时间，以确保细胞充分降解基质胶。同时优化基质胶条件，测试不同 Matrigel 稀释比例对侵袭效率的影响。通过上述调整，预期可显著提升侵袭细胞数量，为后续分析耐药性与侵袭能力的关联提供可靠数据。