

细胞表型实验

1. Cell Counting Kit-8 (CCK8) 实验

(1) 观察细胞生长状态良好且汇合度达到 80%以上时，可准备做 CCK-8 实验。弃掉旧的培养基，加入 PBS，轻轻晃动培养皿，吸出 PBS，重复 3 次。向培养基中加入 1 mL 胰酶，轻摇培养皿，使胰酶可以充分覆盖培养皿底部，置于 37°C 培养箱中，计时 1 min。计时结束后取出培养皿，加入培养基终止消化，将细胞混合液吸取到新的离心管中，设置离心机转速为 1000 rpm，离心 5 min，弃掉上清，保留沉淀。

(2) 加入培养基吹打均匀重悬细胞，可先稀释再进行计数也可以直接计数。准备细胞计数板，用酒精消毒并擦净，取一个干净的盖玻片放在细胞计数板上方，注意要覆盖计数区域，用 10 μ L 吸头吸取 10 μ L 混合均匀的细胞悬液，沿着盖玻片边缘滴加，注意不能产生气泡，以免计数不准。将细胞计数板放置在显微镜下，计数四个区域内的细胞，相加并取平均值。调整细胞浓度为 2.0×10^4 个细胞/mL。将细胞再次吹打混匀，加入 100 μ L 细胞悬液至 96 孔板中，此时 96 孔板每孔的细胞数量为 2×10^3 个细胞。每个样设置 3 个复孔。

(3) 约 6 h 后，细胞贴壁生长。将 CCK-8 试剂和 DMEM 培养基按照 1: 9 的比例配置成 CCK-8 稀释液。向 96 孔板每孔加入 100 μ L 的 CCK-8 稀释液，放入 37°C 培养箱中孵育 2 h，2 h 将孵育后的样品转移到酶标条中，注意避免气泡产生。

(4) 放入酶标仪中测定 OD 值，波长设置为 450 nm，并进行记录，此后 4 d 每天要在固定时间检测 OD 值，将得到的 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的

OD 值统计分析数据，根据实验结果绘制 HCC 细胞的 CCK-8 生长曲线图。

2. 平板克隆形成实验

(1) 当细胞生长状态良好且汇合度达到 80% 以上时，可准备做平板克隆实验。向培养基中加入 1 mL 0.25% 胰酶，轻摇培养皿，使胰酶可以充分覆盖培养皿底部，置于 37°C 培养箱中，计时 1 min。计时结束后取出培养皿，加入培养基终止消化，设置离心机转速为 1000 rpm，离心 5 min，弃掉上清，保留沉淀。

(2) 加入培养基吹打均匀重悬细胞，可先稀释再进行计数也可以直接计数。准备细胞计数板，用酒精消毒并擦净，取一个盖玻片置于细胞计数板上方，注意要覆盖计数区域，用 10 μ L 吸头吸取 10 μ L 混合均匀的细胞悬液，沿着盖玻片边缘滴加，注意不能产生气泡，以免计数不准。将细胞计数板放置在显微镜下，计数 4 个区域内的细胞，相加并取平均值。计数后调整细胞浓度为 8.0×10^2 个细胞/mL。向 6 孔细胞培养板中每孔加入稀释好固定浓度的细胞悬液，每组平行实验设置 3 个复孔。

(3) 每 3 d 更换一次培养基，加 DMEM 培养基时，吸头贴壁缓缓加入，当每个细胞克隆斑的数量到 100 个左右时，终止培养。

(4) 将 6 孔细胞培养板内的旧培养基吸出，加入 PBS 轻摇清洗，将 PBS 弃掉，重复 3 次。向 6 孔细胞培养板内加入 1 mL 75% 的乙醇，进行固定 30 min，然后吸出乙醇，再用 PBS 清洗 3 次。

(5) 向 6 孔细胞培养板的每个孔中加入 1 mL 的 0.2% 的结晶紫染液，使染液能够覆盖 6 孔细胞培养板底部，室温避光染色 30 min，用自来水冲洗，注意水

的方向和力度，去掉多余的结晶紫染液后，自然风干。将 6 孔细胞培养板放在白纸上拍照，进行统计学分析。

3. 细胞划痕实验

(1) 当细胞生长状态良好且汇合度达到 90% 以上时，准备消化细胞。弃掉多余的培养基，加入 2 mL PBS，轻轻晃动培养皿，将 PBS 吸出，重复 3 次。加入 1 mL 的胰蛋白酶，使其完全覆盖住底部，计时 1 min 消化。随后终止消化，将细胞混合液放入离心机中进行离心，1,000 rpm, 3 min 后取出离心管，小心地弃掉上清，加入 DMEM 培养基重悬细胞。将细胞计数板用酒精消毒，取一片干净的盖玻片盖到计数板上，用 10 μ L 的移液器吸取混合均匀的细胞沿盖玻片边缘滴加，过程中不能产生气泡。在显微镜下计数，将细胞数调整为 3.0×10^6 个/mL。为了减少实验误差，每组平行实验设置 3 个复孔。加入 2 mL 的细胞悬液到 6 孔细胞培养板的每孔中，放入培养箱培养。

(2) 第二天取出 6 孔细胞培养板，观察细胞生长状态和密度。当细胞整体密度达到 90% 时，在显微镜下寻找实验组细胞和对照组细胞密度相近的区域准备划痕。持 10 μ L 的移液器，插上 10 μ L 吸头，沿着直尺在找好的区域划直线，尽量保持划痕宽度一致且笔直。用 PBS 清洗掉下来的细胞碎片，在显微镜下观察避免有碎片掉入划痕内影响实验结果。加入 2 mL 无血清 DMEM 培养基，放置于显微镜下观察初始划痕密度并进行拍照记录，放入培养箱中继续培养。

(3) 每隔 12 h，进行拍照，保证每次拍照的区域都是一致的。及时更换新鲜的双无培养基。分别记录 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 这几个时间点 HCC 细胞划痕的愈合速度。

