



Transwell 实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μl 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μl 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μl 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μl 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μl 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
结晶紫染液	碧云天	C0121-100ml
组织固定液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-GD-01



二、Transwell 实验步骤

1. 实验材料准备：

1. 细胞培养相关：处于对数生长期、状态良好且无污染的细胞系；细胞培养基，如含血清的完全培养基用于常规细胞培养、无血清培养基用于实验；胰酶等细胞消化液，用于消化细胞使其从培养容器表面脱离。

2. 试剂：基质胶（如 Matrigel），用于模拟细胞外基质；4% 多聚甲醛固定液，用于固定细胞；结晶紫染液等用于染色；无菌 PBS 缓冲液，用于清洗细胞。

3. 耗材与仪器：Transwell 小室（一种具有通透性膜的小装置，膜上有微孔可供细胞穿过）；细胞培养板；显微镜；枪头、离心管等常规实验耗材；镊子、湿棉签等操作工具。

2. Transwell 小室准备：

1. 基底膜水化（无基质胶的小室可省略此步骤）：

1. 将 Transwell 小室放入孔板中，每个小室孔中加入适量的无血清培养液，一般为 50 μ l。

2. 将孔板放入 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中温育 30 分钟，使基底膜充分水化，为后续细胞的迁移和侵袭提供适宜的环境。

2. 铺基质胶（模拟细胞外基质环境）：

1. 基质胶需提前在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜融化，并始终保持在冰上操作，防止其在室温下迅速凝固。

2. 用预冷的枪头吸取适量的基质胶，垂直地加入到 Transwell 小室的上室底部中央，加胶量要适中，避免过多或过少。例如，对于常见的 24 孔 Transwell 小室，加入 60 - 80 μ l 的基质胶 12。

3. 将加好基质胶的 Transwell 小室放入 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中，孵育一段时间，让基质胶充分聚合凝固，通常需要 30 - 60 分钟，具体时间可根据基质胶的说明书和实际实验情况确定。

3. 细胞悬液制备：

1. 提前对细胞进行饥饿处理，将细胞培养在无血清的培养基中 12 - 24 小时，去除细胞周围的血清影响，使细胞处于相对同步的状态，增强实验的重复性。

2. 用胰酶消化细胞，当在显微镜下观察到细胞变圆、从培养容器表面脱离时，加入含血清的培养基终止消化。

3. 将细胞悬液转移到离心管中，进行离心，一般以 800 - 1000 rpm 的转速离心 3 - 5 分钟，去除上清液（即旧的培养液）。

4. 用无菌 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 - 2 次，再次离心去除 PBS 缓冲液。

5. 用含有 BSA（牛血清白蛋白）的无血清培养基重新悬浮细胞，调整细胞密度至合适的浓度，



一般为 $1 - 10 \times 10^5$ 个 /ml，具体密度可根据细胞类型和实验需求进行摸索 2。

4. 细胞接种：

1. 取适量的细胞悬液，加入到 Transwell 小室的上室中，注意要缓慢加入，避免产生气泡。对于 24 孔 Transwell 小室，一般加入 100 - 200 μ l 的细胞悬液。

2. 在孔板的下室中加入适量的含有血清（如 10% 胎牛血清）或特定趋化因子的培养基，作为吸引细胞迁移和侵袭的诱导剂。例如，对于 24 孔板的下室，通常加入 600 μ l 的培养基。

5. 细胞培养：

1. 将接种好细胞的 Transwell 小室放入细胞培养箱中进行培养，培养时间根据细胞的迁移和侵袭能力而定，通常为 12 - 48 小时。

2. 在培养过程中，定期观察细胞的状态和小室的情况，如是否有气泡产生等 2。

6. 结果统计 2：

1. 直接计数法：

1. 细胞固定：小心取出 Transwell 小室，吸去上室内的培养基，用棉签轻轻擦拭基质胶和上室内未穿过膜的细胞。然后，将小室放入含有 4% 多聚甲醛的孔板中进行固定，固定时间为 20 - 30 分钟。

2. 细胞染色：吸去固定液后，将小室移至预先加入结晶紫染液的孔中，让细胞染色 15 - 30 分钟。之后，去除未与细胞结合的结晶紫，可轻轻用棉签擦拭小室的上侧。

3. 细胞计数：用清水冲洗小室，吸干上室内的液体。使用镊子小心地将膜揭下，确保底面朝上并风干。将膜转移到载玻片上，用中性树胶进行封片。在高倍显微镜下观察和拍照，随机选择多个视野（如 5 个或更多），计数呈紫色的阳性细胞，最后统计结果。

三、结果判读：

一般情况下，穿过小室膜到下室面的细胞越多，说明迁移/侵袭能力越强；穿膜细胞越少，说明迁移/侵袭能力越弱。

四、注意事项：

1、实验前细胞应处于良好状态

2、不要过度消化

3、细胞数过少，穿膜细胞太少，不易统计；细胞数过多，容易重叠，影响计数。