

分类号：  
学号：20212114129

密级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学 硕士学位论文



## Neuritin 对胃癌细胞中 TUBB3、Akt/mTOR 信号 通路作用的初步研究

学位申请人

陈雪茹

指导教师

马雅静 教授

钟晨 讲师

申请学位级别

专业硕士

专业名称

临床检验诊断学

研究方向

肿瘤分子生物学

所在学院

医学院

中国·新疆·石河子  
2024年05月

分 类：  
号  
学 号：20212114129

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学 硕 士 学 位 论 文



## Neuritin 对胃癌细胞中 TUBB3、Akt/mTOR 信号 通路作用的初步研究

学 位 申 请 人	陈雪茹
指 导 教 师	马雅静 教授 钟晨 讲师
申 请 学 位 级 别	专业硕士
专 业 名 称	临床检验诊断学
研 究 方 向	肿瘤分子生物学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2024年05月

**A preliminary study of the effect of Neuritin on the TUBB3 and  
Akt/mTOR signalway in gastric cancer cells**

A Dissertation Submitted to  
**Shihezi University**  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
**Master of Medicine**

**By**

**Chen xue-ru**  
**(Clinical Laboratory Diagnostics)**

Dissertation Supervisor: Prof. **Ma Ya-jing**  
**Zhong Chen**

May, 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 陈雪茹

时间： 2024年5月13日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 陈雪茹

时间： 2024年5月13日

导师签名： 马维静

时间： 2024年5月13日

## 摘要

目的：初步探究胃癌细胞中 Neuritin 对III型 $\beta$ -微管蛋白（Type III  $\beta$ - Microtubule protein,TUBB3）、Akt/mTOR 信号通路的作用,为进一步探究 Neuritin 在胃癌发生发展中的作用及可能的分子机制提供工作基础,以期对胃癌诊断、预后判断提供新的潜在靶点。

方法：（1）培养4种不同分化程度的人胃癌细胞系（KATOIII、SNU-1、AGS、NCI-N87）和人正常胃黏膜上皮细胞系（GES-1），采用定量逆转录PCR(quantitative reverse transcription PCR,qRT-PCR)实验及蛋白免疫印迹法(Western Blot,WB)实验检测 Neuritin 在胃癌细胞及胃黏膜上皮细胞中的表达情况。（2）用 pcDNA3.1-Neuritin 质粒转染内源性相对低表达 Neuritin 的 KATOIII、NCI-N87,用 siRNA-Neuritin 转染内源性高表达 Neuritin 的 SNU-1、AGS,并通过 qRT-PCR 和 WB 实验检测转染效率；采用 WB 实验检测 Neuritin 与 TUBB3、Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白表达情况的相关性。

（3）进一步采用 CCK8 实验、Transwell 实验检测 Neuritin 敲低细胞株的增殖、迁移及侵袭能力。  
结果：（1）qRT-PCR 和 WB 实验结果均显示 Neuritin 的 mRNA 及蛋白的表达水平在 KATOIII、SNU-1、AGS、NCI-N87 中高于 GES-1。（2）qRT-PCR 和 WB 实验证实敲低组细胞株中 Neuritin 的 mRNA 及蛋白的表达水平较对照组细胞株降低；过表达组细胞株中 Neuritin 的 mRNA 及蛋白的表达水平较对照组细胞株升高。WB 实验结果显示 Neuritin 过表达组细胞株中 TUBB3、p-Akt、p-mTOR 的表达水平高于对照组细胞株；Neuritin 敲低组细胞株中 TUBB3、p-Akt、p-mTOR 的表达水平低于对照组细胞株。（3）CCK-8 实验结果显示 Neuritin 敲低组细胞株的增殖能力较对照组细胞株降低。Transwell 实验结果显示 Neuritin 敲低组细胞株的侵袭、迁移能力较对照组细胞株降低。

结论：（1）Neuritin 在人胃癌细胞系中高表达。（2）Neuritin 在胃癌细胞中可促进 TUBB3 蛋白表达,促进 Akt/mTOR 信号通路中关键分子的磷酸化水平,Neuritin 可能通过促进 TUBB3 表达、激活 Akt/mTOR 信号通路,促进胃癌的发生发展。（3）Neuritin 表达下调后降低了胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。Neuritin 可能成为胃癌诊断、预后判断新的潜在靶点。

**关键词：**胃癌；Neuritin；TUBB3；Akt/mTOR 信号通路

## Abstract

**Objective:** The role of Neuritin on Type III  $\beta$ -Microtubule protein (TUBB3) and Akt/mTOR signaling pathway in gastric cancer cells was preliminarily explored, so as to provide a basis for further exploring the role of Neuritin in the development and possible molecular mechanism of gastric cancer, so as to provide new potential targets for the diagnosis and prognosis of gastric cancer. **Methods:**(1) Four human gastric cancer cell lines (KATOIII, SNU-1, AGS, NCI-N87) and human normal gastric mucosal epithelial cell line (GES-1) were cultured, and the expression of Neuritin in gastric cancer cells and gastric mucosal epithelial cells was detected by quantitative reverse transcription PCR (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) and protein immunoblotting (Western Blot, WB). (2) KATOIII and NCI-N87, which express relatively low Neuritin, were transfected with SNU-1 and AGS with endogenous high Neuritin with siRNA-Neuritin, and the transfection efficiency was determined by qRT-PCR and WB experiment, and the correlation of key proteins in TUBB3 and Akt / mTOR signaling by WB experiment.

**Results:** (1) qRT-PCR and WB experiments showed that the expression levels of mRNA and protein of Neuritin were higher in KATOIII, SNU-1, AGS and NCI-N87 than GES-1. (2) qRT-PCR and WB experiments confirmed that the mRNA and protein of Neuritin in the knockdown group were decreased compared with the control cell lines; the mRNA and protein of Neuritin in the overexpressing group were increased compared with the control cell lines. The results of WB experiment showed that the expression levels of TUBB3, p-Akt, and p-mTOR were higher in Neuritin overexpression lines than in control lines; the expression levels of TUBB3, p-Akt, and p-mTOR in Neuritin knockdown lines were lower than those in control lines. (3) The results of CCK-8 showed that the proliferation of the Neuritin knockdown lines was decreased compared with the control lines. Transwell The experimental results showed that the invasion and migration capacity of the Neuritin knockdown cell lines was decreased compared with the control cell lines.

**Conclusion:** (1) Neuritin is highly expressed in human gastric cancer cell lines. (2) Neuritin promotes TUBB3 protein expression and the phosphorylation level of key molecules in Akt/mTOR signaling pathway in gastric cancer cells, and Neuritin may act by promoting TUBB3 expression and activating

**Key words:** Gastric Cancer; Neuritin; TUBB3; Akt/mTOR signaling pathway

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
前言.....	1
第 1 章 材料与amp;方法.....	3
1.1 实验材料.....	3
1.1.1 实验细胞株.....	3
1.1.2 质粒与 siRNA.....	3
1.1.3 主要仪器和实验试剂.....	4
1.2 实验方法.....	7
1.2.1 细胞的培养.....	7
1.2.2 细胞总 RNA 提取.....	9
1.2.3 RNA 的逆转录.....	10
1.2.4 PCR 上机.....	11
1.2.5 CCK-8 实验.....	12
1.2.6 Transwell 迁移实验.....	12
1.2.7 Transwell 侵袭实验.....	13
1.2.8 WB 实验.....	13
1.2.9 统计方法.....	15
第 2 章 实验结果.....	16
2.1 Neuritin 在人胃癌细胞及人胃粘膜上皮细胞中的表达差异.....	16
2.2 验证 Neuritin 质粒及 siRNA 的转染效率.....	17
2.3 Neuritin 过表达可增加 TUBB3 蛋白的表达，促进 Akt/mTOR 信号通路关键分子的磷酸化.....	20
2.4 Neuritin 敲低可降低 TUBB3 蛋白的表达，抑制 Akt/mTOR 信号通路关键分子的磷酸化.....	21
2.5 Neuritin 敲低可抑制胃癌细胞的增殖能力.....	22
2.6 Neuritin 敲低可抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力.....	23
第 3 章 讨论.....	26
第 4 章 结论.....	29

第 5 章 综述.....	30
参考文献.....	36
致谢.....	42
作者简介.....	43
导师评阅表.....	错误！未定义书签。

## 前言

胃癌是全球第五大恶性肿瘤，也是癌症相关死亡的第四大常见原因，具有高发病率、高死亡率的特点<sup>[1-4]</sup>。根据 GLOBOCAN 发布的最新数据，2020 年全球胃癌病例高达 108.9 万，同年约 76.9 万例死亡<sup>[2]</sup>。尽管几十年来全球大部分地区其发病率和死亡率总体呈下降趋势，但各国发病率和死亡率的长期趋势各不相同<sup>[3,4]</sup>。近年来研究显示，胃癌的流行正在从人类发展指数低的国家转向人类发展指数高的国家<sup>[5]</sup>。人类发展指数高的国家和地区发病率较高，但与人类发展指数低的国家及地区相比，其死亡率较低，因此在人类发展指数低的国家及地区中，胃癌是癌症相关死亡的主要原因之一<sup>[6]</sup>。一项调查性研究发现在全球所有胃癌病例中约 60% 发生在东亚，其中中国病例就占 43.9%；56.6% 的全球死亡胃癌病例发生在东亚，其中中国死亡病例就占 48.6%<sup>[7]</sup>。因此，胃癌构成了国内外一个主要的公共卫生问题，也是当前基础及临床研究的焦点之一。

胃癌早期常表现为无症状或仅出现非特异性症状，如消化不良，晚期可能伴有持续性腹痛、厌食症和体重减轻等<sup>[8,9]</sup>。位于胃食管交界处的肿瘤或贲门癌可能出现反流或吞咽困难等症状；溃疡性肿瘤可伴有呕血，肿瘤出血可导致贫血等<sup>[9]</sup>。因为早期症状体征极易忽视，当胃癌患者出现明显不适症状来院就诊时，疾病通常已进入晚期阶段，无法从手术治疗中获益，这是胃癌预后较差的主要原因之一<sup>[10,11]</sup>。我国胃癌患者中早期胃癌仅占 20%，大多数胃癌患者被发现时已处于进展期，5 年生存率 < 50%<sup>[12]</sup>。早期诊断可以降低胃癌患者的死亡率，但目前诊断胃癌的方法仍然主要依赖于胃镜检查 and 活检，该方法具有侵入性且一定程度上依赖于操作者的技能水平<sup>[2]</sup>。目前胃癌研究的主要重点是挖掘新的生物标志物来进行筛查和早期诊断，从而促进早期治疗以提高患者预后<sup>[10]</sup>。

Neuritin 又称候选可塑性基因(CPG)15，是基因位于 6 号染色体短臂 2 区 5 带 1 亚带（6p25.1）的神经营养因子家族的一员<sup>[13-15]</sup>。Neuritin 参与神经发育、突触可塑性和突触成熟，在阿尔茨海默病(AD)和精神障碍相关认知功能损害中发挥作用，是潜在的治疗靶点和临床应用前景<sup>[16-18]</sup>。Neuritin 在正常人体各种组织中广泛分布，尽管大多数关于 Neuritin 的研究主要集中于神经系统中（的）神经保护与再生调节功能上，但 Neuritin 新的潜在功能逐渐被发现。有资料表明，Neuritin 参与肿瘤发生的调控，在不同的癌症类型中其表达量不同，对肿瘤生长发挥着促进或抑制作用<sup>[19]</sup>，但关于 Neuritin 调控肿瘤发生发展的作用机制尚不清楚。

在课题组前期研究中，对胃癌组织及癌旁组织进行免疫组化染色，结果显示胃癌组织中 Neuritin 的高表达率为 89.7%（52/58），胃癌组织中 Neuritin 的低表达率为 10.3%（6/58）；癌旁正常胃组织中 Neuritin 高表达率为 19.0%（11/58），低表达率为 81.0%

(47/58), 提示 Neuritin 在胃癌组织中高表达率显著高于癌旁组织<sup>[20]</sup>。通过 qRT-PCR 和 WB 检测胃癌组织中 Neuritin 的 mRNA 和蛋白的表达水平均高于癌旁组织<sup>[20]</sup>。首次证实了 Neuritin 在胃癌组织中高表达。前期本课题组还利用免疫共沉淀技术将 pcDNA3.1-his-neuritin、pcDNA3.1-HA-TUBB3 共转染 293T 细胞, WB 结果显示 Neuritin 表达上调时 III 型  $\beta$ -微管蛋白 (TUBB3) 蛋白表达量较对照组增高, Neuritin 表达下调时 TUBB3 蛋白表达量较对照组降低 ( $P < 0.05$ ); TUBB3 表达上调对 Neuritin 蛋白的表达水平无影响。证实了 Neuritin 的表达可促进 TUBB3 蛋白表达<sup>[21]</sup>。

本研究将在前期基础上,初步探究 Neuritin 在胃癌细胞中对 III 型  $\beta$ -微管蛋白 (Type III  $\beta$ - Microtubule protein, TUBB3)、Akt/mTOR 信号通路的作用,探究 Neuritin 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的作用。通过 WB 和 qRT-PCR 实验,检测胃癌细胞系及正常胃粘膜细胞系中 Neuritin 的蛋白水平和 mRNA 水平。为进一步探究 Neuritin 在胃癌中作用机制,我们用 pcDNA3.1-Neuritin 质粒转染内源性相对低表达 Neuritin 的胃癌细胞系 KATO3、NCI-N87,用 siRNA-Neuritin 转染内源性高表达 Neuritin 的胃癌细胞系 SNU-1、AGS,并通过 qRT-PCR 和 WB 实验检测转染效率。之后我们采用 WB 实验检测过表达 Neuritin 与敲低 Neuritin 后, TUBB3、Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白的表达情况。我们进一步采用 CCK8 实验和 Transwell 实验检测 Neuritin 敲低细胞株的增殖、迁移及侵袭能力。

本研究初步探究了在胃癌细胞中 Neuritin 对 TUBB3、Akt/mTOR 信号通路的作用,为进一步探究 Neuritin 在胃癌发生发展中的作用及可能的分子机制提供工作基础,以期对胃癌患者诊断、预后判断提供新的潜在靶点。

## 第1章 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验细胞株

人胃癌细胞系 KATOIII、SNU-I、AGS、NCI-N87 购于武汉普诺赛生命科技有限公司，人胃粘膜上皮细胞 GES-1 购于武汉塞维尔生物科技有限公司。保藏机构均为美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC）。

表 1-1 实验细胞株

Table 1-1 Experimental cell lines

细胞系	中文名称	组织来源及特点
KATOIII	人胃癌细胞	取材转移灶：胸水、锁骨、腋窝淋巴结，道格拉斯氏陷凹；具有印戒细胞的细胞学特征。
SNU-1	人胃癌细胞	取材转移灶：腹水；从在细胞毒性治疗前取出的低分化原位胃癌中建立，分化较差。
AGS	人胃腺癌细胞	取材未经治疗的切除肿瘤碎块；中高分化。
NCI-N87	人胃癌细胞	取材转移灶：肝脏；从在细胞毒性治疗前分化良好的胃癌肝转移灶中建立，分化良好。
GES-1	人胃粘膜上皮细胞	取材胎儿胃上皮细胞

#### 1.1.2 质粒与 siRNA

pcDNA3.1-neuritin、pcDNA3.1-空质粒、siRNA1-neuritin、siRNA2-neuritin 及 siRNA-空载体均由石河子大学医学院生物化学 308 实验室提供，经华大生物有限公司测序。

## 1.1.3 主要仪器和实验试剂

## 1.1.3.1 主要仪器设备

表 1-2 主要的仪器设备信息

Table 1-2 Main instrument and equipment information

仪器的名称	厂家名称
生物安全柜	上海博讯实业有限公司
恒温二氧化碳细胞培养箱	美国 Thermo 公司
恒温数显水浴锅	上海市一恒科学仪器有限公司
恒温烘干箱	上海市一恒科学仪器有限公司
高压灭菌蒸汽锅	日本 SANYO 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
全自动酶标摇床	美国 BIO-RAD 公司
天平	瑞典 Sartorius 公司
磁力加热搅拌器	江苏省金坛市医疗器械厂
掌上离心机	江苏海门市其林贝尔仪器制造公司
涡旋振荡器	江苏海门市其林贝尔仪器制造公司
摇床	北京东南仪诚实验室设备公司
纯水装置	美国 Millipore 公司
制冰机	美国 GRANT 公司
电泳装置	北京六一公司
电转装置	北京六一公司
逆转录仪	美国 BIO-RAD 公司
PCR 仪	西安天隆科技有限公司
自动曝光仪	TINON 公司

## 1.1.3.2 主要实验耗材

表 1-3 主要实验耗材信息

Table 1-3 The principal experimental consumables information

耗材名称	厂家名称
T25 细胞培养瓶	LANSELECT 公司
100cm 培养皿	LANSELECT 公司

续表 1-3 主要实验耗材信息

Continuing table 1-3 Information of main experimental consumables

耗材名称	厂家名称
冻存管	中国 Biosharp 公司
100μL 无酶 EP 管	LANSELECT 公司
1.5mL 无酶 EP 管	LANSELECT 公司
15mL 离心管	LANSELECT 公司
6 孔板	LANSELECT 公司
24 孔板	LANSELECT 公司
96 孔板	LANSELECT 公司
10μL 无酶吸头	LANSELECT 公司
200μL 无酶吸头	LANSELECT 公司
1ml 无酶吸头	LANSELECT 公司
黏附载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
细胞计数板	江苏世泰实验器材有限公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司
8 联管	南京诺唯赞生物科技股份有限公司

## 1.1.3.3 主要实验试剂

表 1-4 细胞实验主要试剂信息表

Table 1-4 Information table of main reagents for cell experiments

试剂名称	厂家名称
RPMI1640 培养基	美国 Gibco 公司
F12 培养基	武汉普诺赛生命科技有限公司
IMDM 培养基	武汉普诺赛生命科技有限公司
无菌 1×PBS	中国 Biosharp 公司
胎牛血清	以色列 Biolnd 公司
青霉素链霉素混合液	中国 Biosharp 公司
无血清细胞冻存液	中国雅酶生物医药科技有限公司
胰蛋白酶 (0.25%EDTA) 不含酚红	中国 Biosharp 公司
Lipofectamine®2000 Regent	美国 Invitrogen 公司
基质胶	美国 BD 公司
Cell Counting Kit-8	南京诺唯赞生物科技股份有限公司

续表 1-4 细胞实验主要试剂信息表

Continuing table 1-4 Information table of main reagents for cell experiments

试剂名称	厂家名称
1%结晶紫染色液	中国索莱宝科技有限公司
4%多聚甲醛	中国索莱宝科技有限公司

## 1.1.3.4 WB 实验所用试剂

表 1-5 WB 实验主要试剂信息表

Table 1-5 Information table of the main reagents of WB experiments

试剂名称	厂家
RIPA	中国索莱宝科技有限公司
PMSF	中国索莱宝科技有限公司
蛋白酶磷酸酶抑制剂	中国索莱宝科技有限公司
BCA 试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
15%快速制胶试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
10%快速制胶试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
上样缓冲液 (5x loading buffer)	中国康为世纪生物科有限公司
脱脂奶粉	中国索莱宝科技有限公司
BSA	中国索莱宝科技有限公司
PVDF 膜	法国默克密理博公司
预染蛋白 marker (26616)	美国 Thermo 公司
多色高分子量蛋白 marker (26625)	美国 Thermo 公司
Tween-20	中国康为世纪生物科有限公司
TBS 粉末	中国赛维尔生物科技有限公司
Tris-Glycine Transfer Buffer	中国赛维尔生物科技有限公司
电泳缓冲液粉末	中国赛维尔生物科技有限公司
甲醇、无水乙醇	中国富宇精细化工
化学发光试剂盒	中国 Biosharp 公司

## 1.1.3.5 WB 实验抗体

表 1-6 WB 实验抗体信息表

Table 1-6 Information table of WB experimental antibodies

名称	货号	种属	稀释比例	公司
Neuritin	bs-2464R	兔	1:500	北京博奥森公司
TUBB3	5568	兔	1:1000	美国 CST 公司
Akt	4691	兔	1:1000	美国 CST 公司
p-Akt(Ser473)	4060	兔	1:2000	美国 CST 公司
mTOR	2983	兔	1:1000	美国 CST 公司
p-mTOR(Ser2448)	2971	兔	1:1000	美国 CST 公司
$\beta$ -actin	TA-09	鼠	1:1000	中杉金桥公司
二抗	ab205718	山羊抗兔	1:10000	中杉金桥公司
二抗	ZB-2305	山羊抗鼠	1:10000	中杉金桥公司

## 1.1.3.6 PCR 实验相关试剂

表 1-7 PCR 实验主要试剂

Table1-7 Main reagent for PCR experiments

试剂名称	厂家
总 RNA 提取试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
HiFiScript cDNA Synthesis Kit	中国康为世纪生物科有限公司
UltraSYBR Mixture (Low ROX)	中国康为世纪生物科有限公司
DNase/RNase Free Water	北京天根公司

## 1.2 实验方法

## 1.2.1 细胞的培养

(1) 细胞复苏: 生物安全柜紫外线消杀 30min, 将所需对应的细胞完全培养基置于恒温水浴锅 37°C 预热 30min。打开生物安全橱窗至安全高度; 打开照明与通风。将置于 -80°C 超低温冰箱或液氮中保存的细胞冻存管取出, 迅速置于恒温水浴锅中大幅度摇晃冻存管, 直至看到冻存管中细胞冻存液融化 1/2 左右, 全面喷洒 75% 酒精后放入生物安全柜内。提前向 15mL 离心管中加入 4mL 拟复苏细胞对应的完全培养基, 将细胞冻存液滴加入内。将含细胞冻存液的离心管放于离心机中, 配平后 1000rpm 离心 5min。在 T25 细胞培养瓶中加入细胞对应的完全培养基 5mL。离心后的细胞喷洒 75% 酒精放入生物安

全柜,弃上清后用 1ml 完全培养基重悬,滴加至含完全培养基的 T25 细胞培养瓶中。“十”字法或“8”字法混匀,在细胞培养瓶外身记录标记细胞名称、代数、复苏时间等。喷洒 75%酒精置入 37℃二氧化碳培养箱。24h 后显微镜下观察,视细胞情况进行换液或传代处理

(2) 细胞换液:生物安全柜紫外线消杀 30min,细胞完全培养基、无菌 1×PBS 缓冲液 37℃恒温预热 30min。打开生物安全橱窗至安全高度;打开照明与通风。将细胞培养瓶从培养箱拿出,75%酒精棉擦拭或喷洒培养基瓶外表面后移入生物安全柜。对于贴壁细胞,吸出培养瓶内全部旧培养液,沿侧壁用微量移液器加入 PBS 缓冲液 1mL,轻柔清洗后全部吸出,重复操作两次。对于半悬浮半贴壁细胞,吸出培养瓶内全部旧培养液加入 15mL 离心管中,1000rpm 离心 5min 后去除旧培养基,再用新鲜的完全培养基重悬细胞;剩余在细胞培养瓶细胞按照贴壁细胞换液操作,将重悬细胞滴加至培养瓶中轻柔混匀。将细胞培养瓶喷洒 75%酒精后移入培养箱中继续培养。

(3) 细胞传代:显微镜低倍镜下观察细胞密度,细胞汇合率约 80-90%时进行细胞传代操作。生物安全柜紫外线消杀 30min,细胞完全培养基、无菌 1×PBS 缓冲液 37℃恒温预热 30min。打开生物安全橱窗至安全高度;打开照明与通风。75%酒精喷洒培养瓶外部消毒,移入生物安全柜。吸出旧培养基。PBS 清洗至少两次及以上。向细胞培养瓶中加 1mL 胰酶后置于 37℃恒温二氧化碳细胞培养箱。培养箱内放置数 min,观察细胞变圆后终止消化。轻柔吹打培养瓶,将剩余细胞吹打下来形成细胞悬液,转移至 15mL 离心管中。离心后吸去上清,3mL 完全培养基重悬,滴加到三个已提前加入 5mL 新鲜完全培养基的 T25 细胞培养瓶中。“十”字法或“8”字法混匀,在细胞培养瓶外身记录标记细胞名称、代数、传代时间等。喷洒 75%酒精置入 37℃二氧化碳培养箱继续培养。

(4) 细胞冻存:当计划冻存的细胞在显微镜低倍镜下观察密度达到 80-90%时,进行冻存处理。生物安全柜紫外线消杀 30min,细胞完全培养基、无菌 1×PBS 缓冲液 37℃恒温预热 30min。打开生物安全橱窗至安全高度;打开照明与通风。75%酒精喷洒或擦拭培养瓶外部,转移至生物安全柜。吸出旧培养基。PBS 清洗至少两次及以上。向细胞培养瓶中加 1mL 胰酶后置于 37℃恒温二氧化碳细胞培养箱。培养细胞变圆后终止消化。轻柔吹打培养瓶,将剩余细胞吹打下来形成细胞悬液,转移至 15mL 离心管中。离心后吸去上清,1mL 细胞冻存液重悬细胞并转移入冻存管。封口后,在冻存管外部记录细胞名称、代数、冻存时间等。置于冻存盒中。转移至-80℃冰箱。

(5) 质粒转染:提前 24h 将细胞铺入 6 孔板,显微镜下观察细胞密度长至 50-60%。每孔更换为 2mL 新鲜的基础培养基。向 2 个无酶 EP 管中分别加入 100μL 基础培养基,再分别滴加 2.5μg 的质粒 DNA 及 5μL 的 Lipofectamine2000 试剂,轻柔吹打混匀。用微量移液器将含质粒 DNA 的 100μL 基础培养基滴加至含 Lipofectamine2000 试剂的 100μL 基础培养基中,混匀,静置 10min。向 6 孔板内均匀滴加 Lipofectamine2000 试剂与质粒