伤口愈合 / 细胞划痕实验新方法 – 如何划出笔直均一的划痕

前言

伤口愈合实验是体外研究细胞迁移的一个有用的实验。原理是人为的在铺板的单层细胞中制造一个空白的无细胞的地带，然后对这个无细胞地带的边缘的细胞进行观察；这些边缘的细胞会开始进行迁移活动，并且最终覆盖整个无细胞的区域，重新互相接触在一起。

传统实验方法

细胞在培养皿内贴壁后，使用移液枪的枪头在贴壁细胞的中间划过，人为造成一道伤口（划痕），之后定时测量划痕的宽度，进而得到伤口愈合的细胞迁移数据。

实验缺点：

1.手动划痕，不能保证每次划痕的一致；

2.有时候在划细胞的同时会刮坏一片细胞，对划痕的边缘的细胞造成机械损伤；

3.如果培养皿底部还有包被蛋白的话，枪头划过，很可能伤害到包被，进而影响到细胞迁移，结果便很难判断是哪个因素造成了决定性的影响。

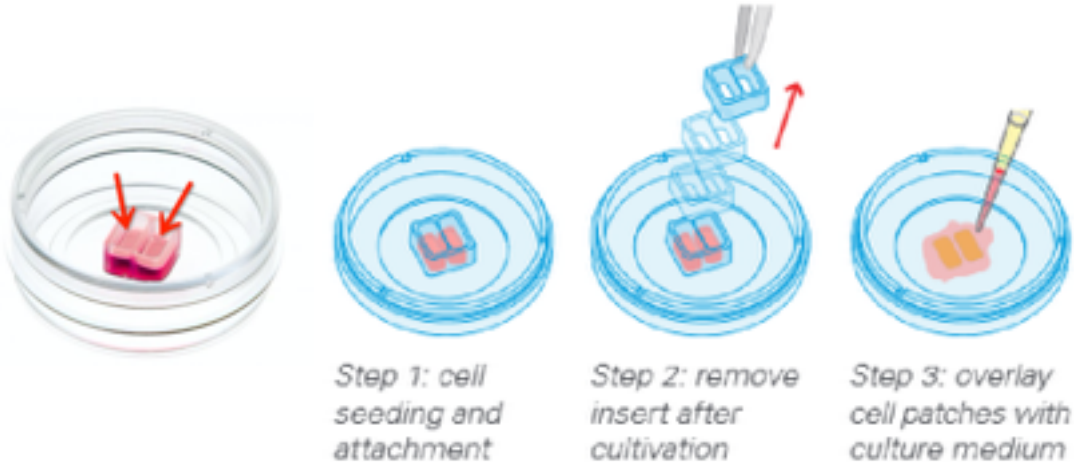
4.定时测量划痕的宽度，计算划痕宽度随时间推移的变化；在选取划痕测量点时，不可避免地引入了主观误差（人为选取了迁移结果符合实验预期的点）；

综上，传统的伤口愈合方法总是重复性不佳，对于实验结果的阐述说服力不足。

下面分享一种新方法，轻松得到笔直均一的划痕！

实验核心

使用伤口愈合插件制造笔直均一的划痕（图一）。



图一(a)　在图中红色箭头所示位置分别种入细胞。　　**图一(b)　细胞贴壁后，移除伤口愈合插件，即可得到2块细胞区域之间的笔直又均一的划痕（500微米宽）。**

实验方法

一.实验材料

1) 细胞:　MCF-7 (ATCC: HTB-22; DSMZ: ACC115)
2) 实验耗材:　ibidi 35 mm培养皿带伤口愈合插件(ibidi, 81176) ibiTreat

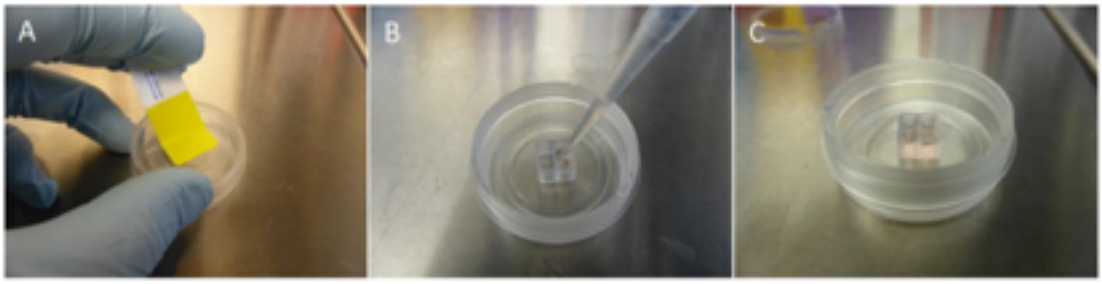
3) 细胞培养基：RPMI (Sigma, R8758) + 10% FCS (Sigma, F0804)
4) 细胞消化试剂：Trypsin-ETDA (Sigma, 59418C)
5) 灭菌镊子
6) 倒置显微镜，如果需要进行连续的观测最好搭配镜载加热孵育系统

二.实验步骤

1.铺细胞（图二）

为了获得更好的实验结果，在做实验之前最好进行一次预实验，以确定需要使用的细胞悬液的密度。我们建议，最好将细胞悬液密度调整为24小时后正好可以长满每个插件的小孔。

- 将ibidi伤口愈合培养皿底部的保护胶带撕除。
- 准备细胞悬液，调整悬液浓度为$3*10^5$ cells/ml，这样24小时后，细胞能刚刚长满单个小孔。
- 在ibidi细胞插件的每孔中加入70μl的细胞悬液。注意不要大力晃动培养皿。以防止细胞不均匀。
- 在37。C培养箱中孵育24小时。

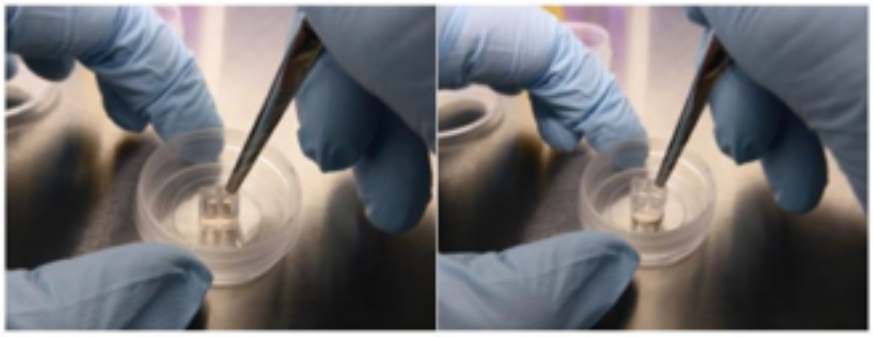


图二：A. 去除培养皿底部的保护胶带。B.C.在ibidi伤口愈合插件中加入细胞。

2.形成“划痕”

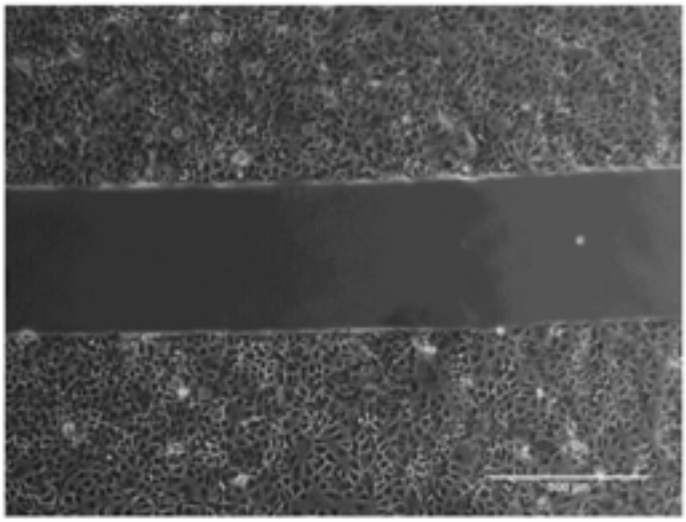
当所有细胞都贴壁并且刚刚长满的时候，就可以开始伤口愈合实验了。用镊子将伤口愈合插件提出，之后加入新鲜的培养基，或者在培养基中加入刺激剂，然后观察伤口愈合的情况。

- 24小时后对细胞前一天种的细胞做镜检。细胞要贴壁并且是刚刚长满每个孔。长得过多移除插件时会带走很多细胞，长得过少，伤口愈合的效果很差。
- 如图三所示，小心的用镊子夹住插件的一个角，将插件移除。



图三：用镊子移除插件

- 移除插件后，要用显微镜检查是否形成合格的“划痕”（图四）。
- 小心的清洗细胞，之后加入2ml培养基进行培养。

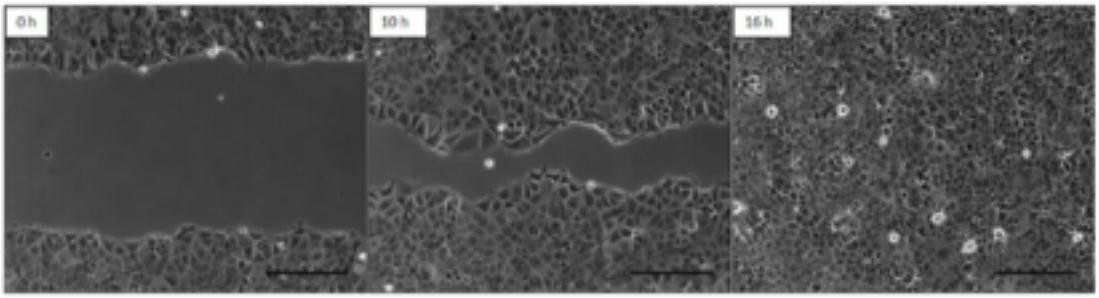


图四 笔直均一的划痕

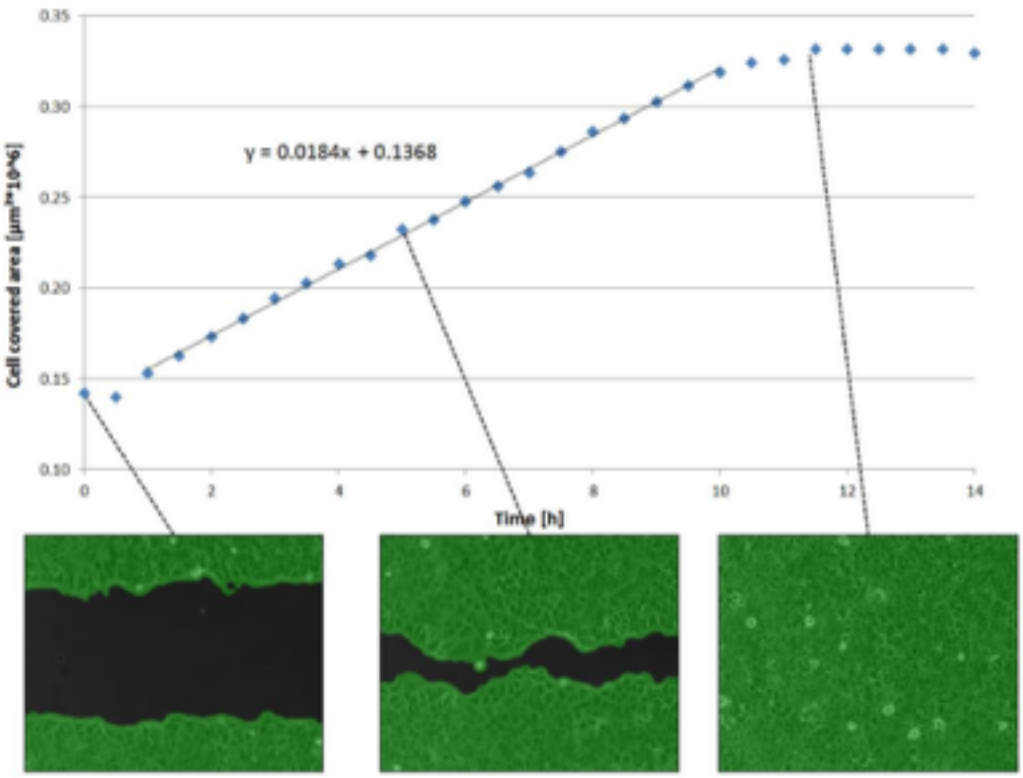
3.采集并分析图像

一般伤口愈合实验都是采集一张“划痕”的初始图像，再在实验结束时候采集一张“划痕”愈合的图像。我们建议可以在这个过程多做几个时间点，这样可以观测到细胞迁移随时间的变化特征。

- 在显微镜下选取能同时看到“划痕”和两边细胞的视野进行成像，“划痕”的方向最好在视野内为水平的或者垂直的。
- MCF-7细胞每半小时采集一张图片，一直持续到20小时。
- 采用ibidi伤口愈合分析软件，统计细胞的覆盖面积，做出曲线图，可以看到在大约11个小时的时候，细胞基本就已经长满了，接下来几个小时细胞覆盖面积都不会发生变化（图五）。



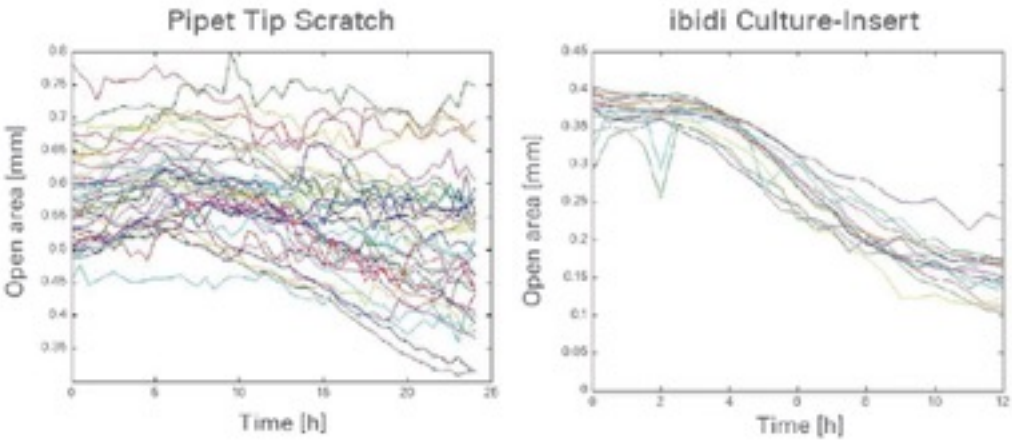
图五(a) 显微镜下观察细胞覆盖面积的变化



图五(b) 细胞覆盖面积的数据统计

实验总结对比

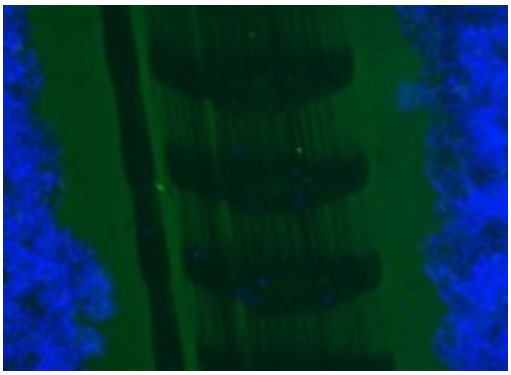
1.本实验方法能得到重复性更好的划痕（图六）；

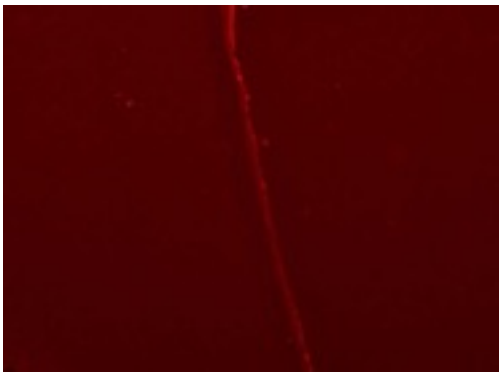


图六 通过计算划痕的面积可以看出，在多次实验中，枪头划痕（左图）制造的划痕面积数据波动大，重复性差；ibidi伤口愈合插件（右图）制造的划痕面积数据统一，重复性良好

2.不会刮坏细胞，也不会造成划痕的边缘的细胞有机械损伤；

3.不会伤害到培养皿底部的包被蛋白；





图一：左图表示枪头划过后，底部包被蛋白被划伤，细胞迁移结果受到底部不均一的影响。右图ibidi插件移除后底部的包被蛋白没有被破坏。

4.通过计算细胞覆盖面积得出细胞迁移结果，避免人为选取测量点，使数据更客观。1天内就能得到测量结果，实验分析更快更准确。