



吉康医学
GENECOME MEDICAL

TECHNICAL MANUAL

吉康医学实验室常见实验 技术手册

第一版

BY GENECOME MEDICAL

目录

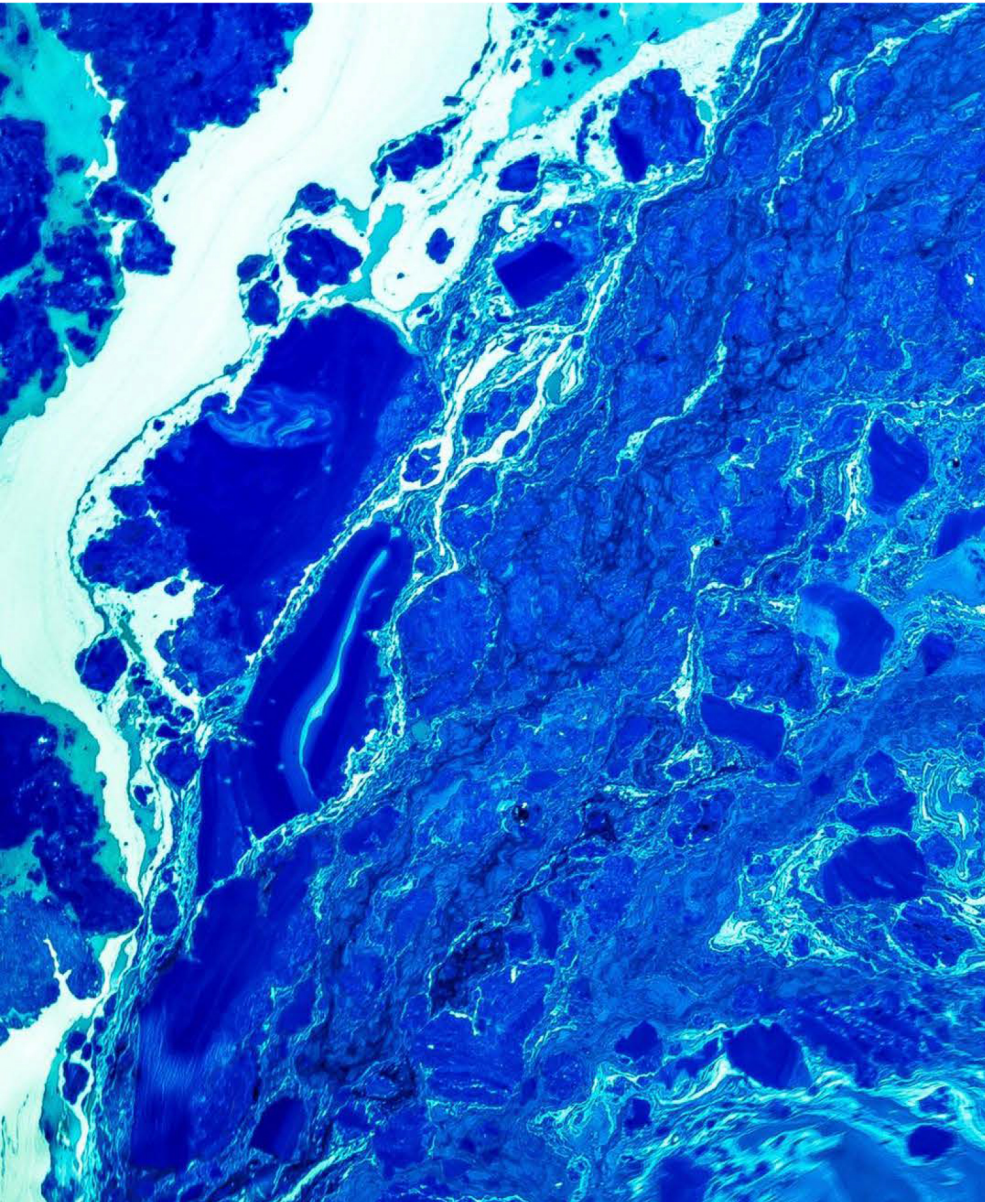
分子生物学研究技术

细胞生物学研究技术

免疫学研究技术

病理学研究技术

蛋白和多肽研究技术



目录

1.总 RNA 的提取(Trizol 法提取)	3
2.PCR	3
3.RT-PCR	5
4.琼脂糖核酸电泳	7
5.胶回收纯化 DNA	8
6.大肠杆菌质粒 DNA 的提取(碱裂解法)	8
7.乙醇沉淀 DNA	9
8.酶切	9
9.连接	10
10.感受态细胞的制备	10
11.转化	11
12.重组子的筛选和鉴定	11
13.真核细胞的转染	12
14.转染细胞的稳定筛选	12
15.重组蛋白质的表达、纯化、复性和定量	13
16.肿瘤细胞体外传代培养及保种	15
17.肿瘤动物模型的建立	15
18.小鼠尾静脉注射方法	16
19.肿瘤蛋白疫苗预防性动物实验	16
20.人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养	16
21.实验动物免疫方案	17
22.血清制备	18
23.ELISA	18
24.血清学筛选克隆新抗原/新基因	20
25.ELISPOT	23

26.藻酸盐包裹实验.....	23
27.重组腺病毒构建, 扩增及纯化基本技术操作.....	24
28.组织病理技术.....	27
29.免疫组化染色.....	28
30.流式细胞仪常用的几种检测方法.....	30
31.Western Blot(免疫印迹法).....	36
32.PVDF 膜上蛋白的可逆染色.....	38
33.人肿瘤抗原的识别与鉴定—免疫沉淀实验流程.....	39
34.蛋白质组实验流程.....	41
35.SDS-PAGE 胶染色.....	44
36.双向电泳蛋白点的切取和保存.....	45
37.数据库搜索(Databases search).....	46
38.主要的公共数据库及网址.....	47
39.蛋白质的序列分析流程.....	47
40.聚丙烯酰胺凝胶的配制.....	49
41.分子生物学常用溶液配制.....	51

1.总 RNA 的提取(Trizol 法提取)

在收集到生物材料之后，最好能即刻进行 RNA 制备工作。若需暂时储存，则应以液氮将生物材料急速冷冻后，储存于-80 °C冷冻柜。在制备 RNA 时，将储存于冷冻柜的材料取出，立即以加入液氮研磨的方式打破细胞，不可以先行解冻，以避免 RNase 的作用。

1. 提取组织 RNA 时，每 50~100 mg 组织用 1ml Trizol 试剂对组织进行裂解；提取细胞 RNA 时，先离心沉淀细胞，每 $5-10 \times 10^6$ 个细胞加 1 ml Trizol 后，反复用枪吹打或剧烈振荡以裂解细胞；
2. 将上述组织或细胞的 Trizol 裂解液转入 EP 管中，在室温 15~30 °C 下放置 5 分钟；
3. 在上述 EP 管中，按照每 1ml TRIZOL 加 0.2 ml 氯仿的量加入氯仿，盖上 EP 管盖子，在手中用力震荡 15 秒，在室温下(15 °C ~ 30 °C)放置 2~3 分钟后，12000 g(2 °C ~ 8 °C)离心 15 分钟；
4. 取上层水相置于新 EP 管中，按照每 1 ml TRIZOL 加 0.5ml 异丙醇的量加入异丙醇，在室温下(15 °C ~ 30 °C)放置 10 分钟，12000 g(2 °C ~ 8 °C)离心 10 分钟；
5. 弃上清，按照每 1ml TRIZOL 加 1 ml 75%乙醇进行洗涤，涡旋混合，7500 g(2 °C ~ 8 °C)离心 5 分钟，弃上清；
6. 让沉淀的 RNA 在室温下自然干燥；
7. 用 RNase-free water 溶解 RNA 沉淀。

2.PCR

实验室常用 DNA 聚合酶有三种：TaKaRa Taq™，TaKaRa ExTaq™ 和 Pyrobest™ DNA Polymerase。TaKaRa Taq™ 是一般的 DNA 聚合酶，保真性较差，但价钱便宜，一般用于基因表达的检测等。TaKaRa ExTaq™ 是具有 Proof reading 活性的耐热性 DNA 聚合酶，具有一定的保真性，而且其扩增得到的 PCR 产物 3'端附有一个 A 碱基，如果希望直接将产物克隆到 T-vector 可以用此酶。Pyrobest™ DNA Polymerase 也是具有 Proof reading 活性的耐热性 DNA 聚合酶，其特点是保真性极高，扩增得到的 PCR 产物为平滑末端。如果进行基因的扩增请使用此酶。

1. 按下列组成在 PCR 反应管中调制反应液:

TaKaRa Taq™ 或 TaKaRa ExTaq™ 的配方

Reagent	For 50µl of reaction mixture
10X PCR buffer(Mg ²⁺ free)	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	如 TaKaRa Taq™ 加 3 µl 如 TaKaRa ExTaq™ 加 4 µl
2.5mM dNTP mix	4 µl
10µM Primer 上游	1 µl
10µM Primer 下游	1 µl
Template DNA	1 µl
Taq 或 ExTaq DNA Polymerase	0.25 µl
Sterile deionized water	Up to 50µl
Total	50 µl /Sample

Pyrobest™ DNA Polymerase 的配方

Reagent	For 50µl of reaction mixture
10X Pyrobest buffer	5 µl
2.5mM dNTP mix	4 µl
10µM Primer 上游	1 µl
10µM Primer 下游	1 µl
Template DNA	1 µl
Pyrobest™ DNA Polymerase	0.25 µl
Sterile deionized water	Up to 50 µl
Total	50 µl /Sample

- 1) 反应总体积根据实际情况进行调控, 可以做 20~50 μl 以节约试剂;
 - 2) 将上表各成分加入到 0.2 ml 或 0.5 ml 灭菌的 PCR 薄壁管中;
 - 3) 如果不用 PCR 仪的加热盖, 在反应混合液的上层加 30 ~50 μl 的矿物油防止样品在 PCR 的过程中蒸发;
2. 按以下程序进行 PCR 扩增。

PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异, 在实际操作中需根据具体的情况以及 PCR 结果而进行优化。

Step	Temperature	Time	Number of cycles	Note
起始变性	94~95 °C	1-3 min	1	
变性	94~95 °C	0.5-2 min	25-35	退火温度比理论退火温度大概低 5°C, 再根据反应结果优化
退火	37-70 °C	0.5-2 min		
延伸	70-75 °C	根据扩增产物的大小		
最终延伸	70-75 °C	10 min	1	每分钟延伸 1000bp

反应结束后, 抽取扩增样品 5 μl , 用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 用 DNA marker 判断扩增片段的大小或冷冻保存, 以备以后分析使用。

3.RT-PCR

Protocol: TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)

1. 按下列组成在 PCR 反应管中调制反应液

Reagent	For 50 μl of reaction mixture
10×One Step RNA PCR Buffer	5 μl
25 mM MgCl ₂	10 μl
10 mM dNTP mix	5 μl

RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
AMV-Optimized Taq	1 μ l
AMV RTase XL (5 U/ μ l)	1 μ l
上游特异 Primer (20 μ M)	1 μ l
下游特异 Primer (20 μ M)	1 μ l
实验样品 RNA(\leq 1 μ g Total RNA)	1 μ l
RNase Free dH ₂ O	24 μ l
Total	50 μ l /Sample

- 1) 反应总体积根据实际情况进行调控, 可以做 20~50 μ l 以节约试剂;
- 2) 将上表各成分加入到 0.2 ml 或 0.5 ml 灭菌的 PCR 薄壁管中;
- 3) 如果不用 PCR 仪的加热盖, 在反应混合液的上层加 30 ~50 μ l 的矿物油防止样品在 PCR 的过程中蒸发;

2. 按以下条件进行反应

Step	Temperature	Time	Number of cycles	Note
逆转录	50 °C	30 min	1	
逆转录酶失活	94 °C	2 min	1	
变性	94 °C	0.5 min	25-35	退火温度比理论退火温度大概低 5 °C, 再根据反应结果优化 Taq 酶每分钟延伸 1000 bp
退火	37-65 °C	0.5 min		
延伸	72 °C	根据扩增产物的大小		
最终延伸	72 °C	10 min	1	

反应结束后, 抽取扩增样品 5 μ l, 用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 用 DNA marker 判断扩增片段的大小或冷冻保存, 以备以后分析使用。

4.琼脂糖核酸电泳

1. 用蒸馏水将制胶模具和梳子冲洗干净，放在制胶平板上，封闭模具边缘，架好梳子；
2. 根据欲分离 DNA 片段大小用凝胶缓冲液配制适宜浓度的琼脂糖凝胶：准确称量琼脂糖干粉，加入到配胶用的三角烧瓶内，定量加入电泳缓冲液(一般 20~30 ml)；
3. 放入到微波炉内加热融化。冷却片刻，加入一滴荧光染料，轻轻旋转以充分混匀凝胶溶液，倒入电泳槽中，待其凝固；
4. 室温下 30~45 分钟后凝胶完全凝结，小心拔出梳子，将凝胶安放在电泳槽内；
5. 向电泳槽中倒入电泳缓冲液，其量以没过胶面 1 mm 为宜，如样品孔内有气泡，应设法除去；
6. 在 DNA 样品中加入 10×体积的载样缓冲液(loading buffer)，混匀后，用枪将样品混合液缓慢加入被浸没的凝胶加样孔内；
7. 接通电源，红色为正极，黑色为负极，切记 DNA 样品由负极往正极泳动（靠近加样孔的一端为负）。一般 60 ~ 100 V 电压，电泳 20 ~ 40 min 即可；
8. 根据指示剂泳动的位置，判断是否终止电泳；
9. 电泳完毕，关上电源，在凝胶成像仪上观察电泳带及其位置，并与核酸分子量标准 Marker 比较被扩增产物的大小。

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 的最佳分辨范围	
琼脂糖凝胶浓度	线形 DNA 的最佳分辨范围(bp)
0.5%	1, 000 ~ 30, 000
0.7%	800 ~ 12, 000
1.0%	500 ~ 10, 000
1.2%	400 ~ 7, 000
1.5%	200 ~ 3, 000
2.0%	50 ~ 2, 000

5. 胶回收纯化 DNA

1. 琼脂糖电泳，将特异电泳带用刀切下放入到 EP 管中，称琼脂糖带的重量；
2. 按照每 100 mg 加 400 μ l 的量加入 binding buffer，放入到 EP 管振荡器中，45 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 温育振荡，直到所有的琼脂糖都溶解(大概要 5 分钟)；
3. 取出纯化柱，将上述溶解液转移至柱中，室温下放置 2 分钟，8,000 rpm 离心 1 分钟，弃 EP 管中的液体，将纯化柱放回 EP 管中；
4. 加 500 μ l 的 wash buffer 至柱中，8,000 rpm 离心 1 分钟。弃管中的溶液；
5. 重复操作 4 步的操作 1 次，最后将纯化柱放入 EP 管中 10,000 rpm 离心 30 秒，除去痕量的 wash buffer；
6. 将纯化柱放入一个新的 EP 管。加 30~40 μ l H₂O 或者 elution buffer 至纯化柱膜的中央，在 37 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 下放置 2 分钟，10,000 rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA，将 EP 管中的 DNA 溶液放在 -20 $^{\circ}$ C 保存。
7. 注：若想要不电泳而直接纯化 DNA 溶液，只需要在第 2 步中按 100 μ l 液量加 400 μ l 的 binding buffer，其余的步骤不变。

6. 大肠杆菌质粒 DNA 的提取(碱裂解法)

此方法适用于小量质粒 DNA 的提取提取的质粒 DNA 可直接用于酶切 PCR 扩增。

1. 取 1.5 ml 细菌培养物于 EP 管中，4000rpm 离心 1 分钟，弃上清液，使细菌沉淀尽量干燥；
2. 将细菌沉淀重悬于用冰预冷的 100 μ l 溶液 I (50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 中，剧烈振荡；
3. 加入 200 μ l 新配制的溶液 II(0.2 mol/L NaOH, 1% SDS(m/v))，盖紧 EP 管口，快速颠倒离心管 5 次，以混合混合物，确保离心管的整个内表面与溶液 II 接触，不要涡旋，置于冰浴中；
4. 加入 150 μ l 预冷溶液 III(每 100 ml 的溶液 III 中含 60 ml 5 mol/L 乙酸钾，11.5 ml 冰乙酸，28.5 ml H₂O)，盖紧 EP 管口，反复颠倒数次，使溶液 III 在粘稠的细菌裂解物中分

散均匀，之后将管置于冰上 3~5 分钟；

5. 在最大转速下离心 5 min，取上清液于另一新 EP 管；
6. 用两倍体积的乙醇室温沉淀双链 DNA，振荡混合于室温放置 2 分钟，最大转速离心 5 分钟；
7. 小心吸去上清液，将离心管倒置于滤纸上，以使所有液体都流出，在将附于管壁的液滴除尽；
8. 加 1ml 70%乙醇洗涤沉淀，振荡混合，用 12, 000 g 离心 2 分钟，弃上清，将开口的 EP 管置于室温使乙醇挥发，直至 EP 管中内没有可见的液体存在(5~10 分钟)，用适量的 ddH₂O 溶解；
9. 用 0.5 μl 的 RNase 37 °C 温育 5~10 分钟；
10. 电泳鉴定。

7.乙醇沉淀 DNA

1. 加入 1/10 体积的乙酸钠(3 mol/L, PH 5.2)于 DNA 溶液中充分混匀，使其最终浓度为 0.3 mol/L；
2. 加入 2 倍体积用冰预冷的乙醇混合后再次充分混匀置于-20 °C 中 15~30 分钟；
3. 12, 000 g 离心 10 分钟，小心移出上清液，吸去管壁上所有的液滴；
4. 加入 1/2 离心管容量的 70%乙醇，12000 g 离心 2 分钟，小心移出上清液，吸去管壁上所有的液滴；
5. 于室温下将开盖的 EP 管的置于实验桌上以使残留的液体挥发至干；
6. 加适量的 ddH₂O 溶解 DNA 沉淀。

8.酶切

1. 酶切前确定待切样品的浓度，并选择合适的限制性内切酶和配套 Buffer。
2. 在离心管中加入如下成分：10*Buffer 1 μl+待酶切样本 x μl+酶 0.5-1 μl，然后加水补足至 10 μl
3. 混匀样品并短暂离心使样品沉于管底。

4. 将离心管置于 37 °C 中温育 1-3 hr, 若待切样品为 PCR 产物, 则可将反应时间适当延长。
5. 用未酶切的质粒作为对照, 琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

注: 当酶切样品用于回收而不是鉴定时, 可按比例适当加大反应体积。双酶切可选用二者活性都较高的 Buffer 或者通用 Buffer, 但要注意不能有星反应。)

9. 连接

1. 连接前先电泳确定待连接载体与片段的浓度。
2. 在离心管中加入如下成分: 10×连接 Buffer 1 μl+待连接的样品 x μl+连接酶 0.5-1 μl, 然后加水补足至 10 μl
3. 混匀样品并短暂离心使样品全部沉于管底。
4. 将离心管置于连接酶要求的温度孵育适当的时间(根据不同公司的酶的要求而定, 一般为 22 °C 1-3 hr 或 16 °C 连接过夜)。
5. 连接完的样品可直接用于转化, 也可放 4 °C 冰箱短期保存。

10. 感受态细胞的制备

1. 挑取适当菌株的 *E.coli* 单菌落接种于 2 ml SOB 培养液中, 37 °C 摇床过夜。
2. 取 0.5-1 ml 过夜培养的菌液转种到 50 ml SOB 中, 18 °C 剧烈震荡, 直到 A₆₀₀ 达到 0.6。
3. 将培养物转移到 50 ml 离心管中, 4 °C 4, 000 rpm/min 离心 10 min。同时在冰浴上配置 TB 溶液。
4. 弃上清, 将离心管倒置于滤纸上, 使培养液被吸干。
5. 取 1 ml 刚配的 TB 溶液打散菌体沉淀, 再加入 15 ml TB(1/3 体积的起始培养液), 冰浴 10-15 min, 4 °C 4, 000 rpm/min 离心 10 min。
6. 弃上清, 沉淀重悬于 4 ml TB(1/12.5 体积的起始培养液), 冰浴 10 min。
7. 加入 280 μl DMSO, 缓缓滴入并轻轻摇晃, 使其充分混合均匀, 冰浴 10 min。
8. 将菌液分装于 EP 管中, -80 °C 或液氮冻存。
9. 取两管感受态细胞分别加入 1 μl 无菌 ddH₂O(阴性对照)和 1 μl 纯质粒(阳性对照)进行转化, 以检测感受态的质量。阴性对照平板上应该无菌落生长, 阳性对照平板上菌落数目

的多少显示感受态效率的高低。

11.转化

1. 取 100 μ l 感受态细胞于冰浴上融化。
2. 加入 1 μ l 纯质粒或连接产物，轻轻吹打混匀，冰浴 30 min。
3. 将菌液放入 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 90 秒，立即放入冰浴中 2 min。
4. 加入 0.9 ml SOC，于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上 200 rpm \times 1 hr 温育。
5. 将菌液 4000 rpm/min 离心 3 min，留 200 μ l 上清将菌体打散，均匀涂布于含适当抗生素的琼脂平板表面，平板于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

注：新倒的平板可于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中预先放置数小时至过夜干燥。

当转化的是 TA 克隆连接产物时可在菌液中加入 8 μ l 1 M IPTG 和 40 μ l 20 mg/ml X-gal 以进行蓝白斑筛选。

12.重组子的筛选和鉴定

重组子可通过酶切进行鉴定，也可以利用扩增引物通过 PCR 进行鉴定，阳性重组子能切出所需要的片段或得到相应片段的 PCR 产物。

1. 用牙签挑取平板上的菌落接种于 2 ml 含适当抗生素的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。
2. 次日取菌液 0.2-0.5 ml，13, 000 rpm \times 3 min 离心，弃上清，加入 20 μ l ddH₂O 和 20 μ l 酚/氯仿，震荡混匀，13, 000 rpm \times 5 min 离心。
3. 取上清进行琼脂糖电泳，加入载体质粒 DNA 作为阴性对照，根据质粒大小初步筛选重组子，重组子的泳动速度应该慢于载体质粒。
4. 用碱法小量制备可能是重组子的质粒 DNA。
5. 选取适当的酶，对重组子进行酶切分析，酶切体积均为 10 μ l 体系。酶切样品进行琼脂糖电泳鉴定是否有所需片段。
6. 酶切分析正确的重组子分成两份，一份进行测序反应，另外一份保种。
7. 若用 PCR 法鉴定，则在第 2 步时每个样本取 0.5-1.0 μ l 菌液为模板进行 PCR 反应，每

管反应体系最低可少至 10 μ l, PCR 产物电泳, 能得到所需条带的样本进一步提取质粒酶切鉴定或送样品测序。

13.真核细胞的转染

该操作以 Invitrogen 公司的脂质体转染试剂 Lipofect AMINE 为例, 其它转染试剂可参照各自的使用说明书进行。

1. 在 6 孔板中接种 $1-3 \times 10^5$ 细胞/孔, 加入 2 ml 完全培养基, 置 CO_2 孵箱中 37°C 培养过夜。
2. 待细胞长到 50-80% 单层时, 在无菌离心管中配制如下溶液:
溶液 A: 将 1-2 μg 待转染的超纯 DNA 稀释到 100 μl 无血清培养基中
溶液 B: 将 2-25 μl Lipofect AMINE 稀释到 100 μl 无血清培养基中
3. 混合溶液 A 和 B, 轻轻混匀, 室温放置 15-45 min。
4. 用 2ml 无血清培养基轻轻洗涤细胞, 加入 0.8 ml 无血清培养基/孔, 将脂质体复合物滴加到孔中, 轻轻摇晃混匀, 置 CO_2 孵箱中 37°C 孵育 2-24 hr。
5. 用完全培养基替换转染液, 继续培养。
6. 24-72 hr 后检测蛋白质的表达或传代并加入选择性抗生素以筛选稳定表达株。

14.转染细胞的稳定筛选

1. 确定抗生素作用的最佳浓度:
2. 不同的细胞株对各种抗生素有不同的敏感性, 因此在筛选前要做预试验, 确定抗生素对所选择细胞的最低作用浓度。
 - 1) 提前 24 小时在 96 孔板或 24 孔板中接种细胞 8 孔, 接种量以第二天长成 25% 单层为宜, 置 CO_2 孵箱中 37°C 培养过夜。
 - 2) 将培养液换成含抗生素的培养基, 抗生素浓度按梯度递增(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。
 - 3) 培养 10-14 天以绝大部分细胞死亡浓度为准, 一般为 400-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 筛选稳定表达克隆时可比该浓度适当提高一个级别维持时使用筛选浓度的一半。
3. 转染按前面的步骤进行。

4. 转染 72 小时后按 1:10 的比例将转染细胞在 6 孔板中传代, 换为含预试验中确定的抗生素浓度的选择培养基。在 6 孔板内可见单个细胞, 继续培养可见单个细胞分裂繁殖形成单个抗性集落, 此时可用两种方法挑选单克隆。
 - 1) 滤纸片法: 用消毒的 5x5 mm 滤纸片浸过胰酶, 将滤纸片贴在单细胞集落上 10-15 秒, 取出粘附有细胞的滤纸片放于 24 孔板中继续加压培养。细胞在 24 孔板中长满后转入 25 cm² 培养瓶中, 长满后再转入 75 cm² 培养瓶中培养。
 - 2) 有限稀释法: 将细胞消化下来后做连续的 10 倍稀释(10⁻²—10⁻¹⁰), 将每一稀释度的细胞滴加到 96 孔板中培养, 7-10 天后, 选择单个克隆生长的孔再一次进行克隆。
5. ELISA 或 Western blot 检测单克隆细胞中外源蛋白的表达情况由于不同克隆的表达水平存在差异因此可同时挑选多个克隆选择表达量最高的克隆传代并保种。

15. 重组蛋白质的表达、纯化、复性和定量

按 Qiagen 公司的操作手册进行, 具体步骤如下。

一、重组蛋白质的诱导表达

1. 挑取转化有质粒的单菌落, 接种于 3ml 选择性 LB 液体培养基中, 37 °C, 250 rpm/min 振摇培养过夜。
2. 次日将培养过夜的菌液 500 μl 再接种于 10 ml(1:20)选择性 LB 液体培养基中, 37 °C, 250 rpm/min 振摇培养至光密度(OD₆₀₀=0.6)时, 取 1 ml 样本作为诱导前标本, 10000 g 离心 1 min 收集菌体沉淀, -20 °C 冻存备用。
3. 加入 1 mol/L IPTG 于菌液中, 使 IPTG 终浓度为 1 mM, 37 °C, 250 rpm/min 振摇培养 4 ~ 5 小时。取 1 ml 样本作为诱导后标本, 同上法收集菌体沉淀, -20 °C 冻存备用。
4. 将诱导前后菌体沉淀用 20 ~ 40 μl PBS(pH= 8.0)重悬, 加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸加热 5 min, SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离, 考马斯亮蓝染色 3 小时后, 脱色观察结果。
5. 选取诱导成功的细菌克隆, 扩大诱导规模, 收集菌体沉淀, 于-20 °C 保存, 准备做下一步分析及纯化。

二、重组蛋白质的分离纯化

重组蛋白质的可溶性鉴定

1. 将按上法诱导培养后收集的菌体重悬于裂解液 1 (Lysis buffer under native conditions)中, 然后在-80 °C 低温冰箱中放置 10 min。
2. 冰中解冻。
3. 在冰浴上用超声破碎仪破菌 6 次, 每次 10 sec, 间歇 10 sec, 电压 200-300 V。
4. 10000 g, 4 °C, 离心 20 min, 取上清(为溶液 A), -20 °C 保存; 另将沉淀用同样裂解液 1 溶解(为溶液 B), 同样-20 °C 保存, 供后继分析使用。
5. 将上述 A、B 溶液和诱导前后的细菌进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 比较分析重组蛋白质的溶解性。如果诱导表达的蛋白质位于 A 溶液中, 则为可溶性蛋白; 如果是在 B 溶液中, 则为非可溶蛋白。

重组蛋白质为非可溶性蛋白(变性条件下)的分离纯化

1. 将菌体沉淀溶于适量裂解液 2(Lysis buffer under denaturing conditions)中, 室温下搅拌和吹打沉淀, 避免泡沫生成。
2. 10000 g, 4 °C, 离心 30 min, 收集上清液。
3. 将 Ni-NTA Agarose 充填柱子, 并连接于 Pharmacia 低压液相层析系统, 用 5 倍柱体积的裂解液 2 平衡 Ni-NTA Agarose, 调节 A_{280} 值至零线。
4. 将适量上清液上样到 Ni-NTA Agarose 柱子中, 并用 lysis buffer 冲洗至 A_{280} 值低于 0.01。
5. 分别用 5 ~ 10 倍柱体积的清洗液 1 和清洗液 2(Wash buffer 1 and 2)清洗柱子, 直至 A_{280} 值低于 0.01。
6. 用洗脱液(Elution buffer)洗脱重组蛋白质, 在 A_{280} 值监测下, 收集出现峰线后含有重组蛋白的所有洗脱液。

三、重组蛋白质的复性、冻干和定量

纯化后的蛋白用梯度降低的尿素溶液缓慢透析, 最终用 0.01×PBS 透析, 透析后的蛋白质溶液经冻干成粉状。以牛血清白蛋白(BSA)为标准, 采用 BIO-RAD 公司蛋白质定量试剂(protein assay)比色测定蛋白质的含量。

16.肿瘤细胞体外传代培养及保种

一. 细胞复苏与培养

将液氮或-80 °C 保存的肿瘤细胞于 37 °C 水浴，快速溶化，用 8.0 ml 培养基混匀已融化的肿瘤细胞悬液，于 1500 rpm，离心 3 分钟。弃上清，再吸取 8.0 ml 培养基混匀细胞沉淀，再 1500 rpm，离心 3 分钟，弃上清，细胞沉淀用 1.0 ml 培养基混匀，备用。另取一个 75 cm² 方瓶，加入 14.0 ml 培养基，将上述制备的含肿瘤细胞悬液(1.0 ml)加入此方瓶中，于 37 °C，5% CO₂ 孵育箱中培养。

若此肿瘤细胞悬浮生长，大约 3-4 天细胞基质会变黄，5.0 ml 细胞悬液可传代一个方瓶培养，可用 3-4 个方瓶培养，一个方瓶中呈对数生长的肿瘤细胞可达 $1-1.5 \times 10^7$ 个，根据试验所需，可决定传代的次数。若此肿瘤细胞呈贴壁生长，经过 3-4 天，肿瘤细胞生长至 80%-95% 单层时，弃上清，用 0.5 mM 的 EDTA(难消化的肿瘤细胞用 0.25% 胰酶 1.0 ml)，处理肿瘤细胞大约 3-5 分钟，用倒置显微镜观察，当 90% 的肿瘤细胞变圆时，即可用弯管吹打并将消化的细胞转移到 15 ml 离心管中，于 1500 rpm 下，离心 3 分钟，弃上清，加少许培养基混匀，可传代 3 个 75 cm² 方瓶扩大培养。

二. 细胞冻存

将对数生长的肿瘤细胞用 1 个 75 cm² 方瓶按上述方法收集，于 1500 rpm 离心 3 分钟，弃上清，用保种液(含 10% DMSO 的小牛血清)3.0 ml 混匀，分别加入到 2-3 只保种管中，写上肿瘤细胞名称，时间，保种者姓名，放-80 °C 保存，次日将它们转移到液氮中保存(注: -80 °C 下可保存细胞半年至一年，液氮可保存细胞 5-10 年，甚至更长的时间)。以上所有物品均需经过高温灭菌(121 °C，30 分钟)，培养基则经过过滤(0.22 μm)除菌，所有操作均必须遵守无菌操作技术，避免细菌、真菌、病原体、衣原体等污染。

17.肿瘤动物模型的建立

将对数生长的肿瘤细胞收集，用无血清基质 10.0 ml，于 1500 rpm，离心 3 min，连续洗 3 次，最后用无血清基质混匀，用血球计数器计算肿瘤细胞数量(平均 5 个中方格的细胞计数 $\times 10^4$ 即是肿瘤数/毫升)。计算完肿瘤细胞总数，再将肿瘤细胞密度调至 4×10^6 个/ml，

每只小鼠腋下接种 50 μl (即 2×10^5 个肿瘤细胞), 2 周左右可扪及肿瘤小结节。一般选取 6-8 周的小鼠, 不同的肿瘤细胞接种的数量和动物不一样, 比如 LL/2, B16, Hep 可接种 C57 和 BALB/C 小鼠, NS-1, EL-4, C26, Meth A 可接种 BALB/C 小鼠, H22 接种昆明鼠。从肿瘤接种后可扪及小结节开始, 每 3 天用游标卡尺量肿瘤纵横大小(单位: mm), 至少连续一个月时间。注意要设计不同的实验组和对照组, 每组动物数一般为 5-10 只, 一般接种肿瘤 6-8 周后, 小鼠的肿瘤可生长至直径为 15-20 mm (即小鼠会濒临死亡)时, 可眼球取血, 分离血清并保存血清, 处死小鼠, 取肿瘤组织照相, 取部分肿瘤组织作冰冻组织切片(或-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存), 作相应的免疫组织化学染色, 取部分肿瘤组织用 3%中性的甲醛固定, 石蜡包埋, 作常规 HE 染色。

18.小鼠尾静脉注射方法

在靠近实验台边缘处, 用大培养皿扣住小鼠, 左手抓住小鼠尾巴, 用酒精棉球擦尾巴, 可见到两侧静脉; 注射前应确认针管内无气泡, 注射时由尾尖开始, 顺向刺入。失败后再逐渐移向根部重刺, 若准确刺入静脉内, 推进时无阻力, 一般可注入 0.1-0.5 ml。

19.肿瘤蛋白疫苗预防性动物实验

一般肿瘤蛋白疫苗首次免疫剂量 10 μg /只小鼠, 与相应佐剂混匀, 在背部皮下注射, 第 2 次免疫间隔 2 周, 同样加佐剂在皮下注射; 第 3 次免疫间隔 2 周, 同样加佐剂在皮下注射; 第 3 次免疫后 2 周, 用 ELISA 检测其血清效价, 当效价达到要求时; 在接种肿瘤细胞前 3 天, 于腹腔或尾静脉加强注射 20 μg /只。

20.人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养

1. 将 15-20 cm 长的新生儿脐带放入无菌的 PBS 溶液中储存。
注: 4 $^{\circ}\text{C}$ 下最多贮存 24 小时, 室温下不超过 6 小时, 否则废弃
2. 用一个钝头的针头扎入脐带静脉管中, 用无菌的 PBS 溶液冲洗 3-5 次, 将污血冲洗干净为止。
3. 用手术钳夹紧脐带下端, 加入 15 ml 的胶原酶(1 mg/ml)室温下消化 15-20 分钟, 并不时

上下摇动脐带。

4. 消化完后, 将下端手术钳松开, 消化液流入一个 50 ml 无菌离心管中, 用无菌的 PBS 溶液冲洗脐带 2-3 次。
5. 将收集液离心(2000 rpm)3 分钟。
6. 倒去上清, 加入 10 ml M199 培养基(加入 10 U/ml 的 bFGF), 用弯管吹散细胞, 将所有液体转入一个用明胶包被好的培养瓶中, 37 °C 培养。
注: 每个培养瓶中加入 3-4 ml 无菌的 1% 的明胶溶液, 摇匀使得明胶溶液完全铺满瓶底, 放入 37 °C 孵育, 最少 2 小时, 用前将明胶溶液倒了即可, 明胶包被有利于细胞贴壁。
7. 培养 24 小时后, 倒掉培养基, 并用无菌的 PBS 溶液清洗 2-3 次, 洗掉红细胞和死细胞, 加入 10 ml 新鲜的 M199 培养基。
8. 以后每 2 天换一次培养基(每次换掉 2/3 的培养基)。
9. 一般培养 5-7 天, 细胞可长满至 80-90% 单层, 这时可以传代。
10. 倒掉培养基, 用无菌的 PBS 溶液清洗 2-3 次, 加入 2-3 ml 消化液(0.25% 胰酶+0.1% EDTA) 消化细胞, 在显微镜下观察, 一旦细胞变圆, 即加入 2-3 倍的有血清的 DMEM 培养基终止反应。
11. 用弯管将细胞吹打下来, 并将所消化的细胞转移到一个 50 ml 无菌离心管中, 2000 rpm, 离心 3 分钟。
12. 倒掉上清, 加入 10 ml 新鲜培养基, 一般一瓶细胞可传代 3-4 瓶. 以后照此传代培养.
13. 一般传代 2-3 代(培养了 20 天左右)用于做各种实验效果最好。

21. 实验动物免疫方案

1. 抗原: 蛋白质、多肽、细胞器、细胞、组织等。
2. 免疫方式: 皮下注射、腹腔注射、静脉注射、肌肉注射等。
3. 不同动物免疫所需抗原量(以蛋白免疫为例)

动物	>18-20kDa		<18-20kDa	
	最佳抗原量	抗原量	最佳抗原量	抗原量
兔子	20-200 µg	100 µg	50-400 µg	200 µg

小鼠	2-40 μg	15 μg	4-60 μg	40 μg
大鼠	10-50 μg	30 μg	20-150 μg	50 μg
绵羊	100-1000 μg	200 μg	200-1000 μg	400 μg
母鸡	20-200 μg	100 μg	50-400 μg	200 μg

4. 免疫方案(以免疫兔子为例):

天数	0	14	28	38	56	66	87
注射	x	x	x		x		
采血量	2 ml			2 ml	2+20 ml		2+50 ~ 70 ml

5. 注意:

- 1) 第一次免疫用完全佐剂与免疫原混合, 以后加强免疫用不完全佐剂与免疫原混合, 采取多点, 时间间隔式免疫法。
- 2) 如果用细胞免疫兔子, 那么每次免疫所需细胞量为 $2-3 \times 10^7$ cells。
- 3) 在连续免疫完三次后, 需要少量取血进行 ELISA 检测, 检测所免疫动物的抗体滴度, 一般滴度能达到 1:10, 000-50, 000。在处死所免疫的动物前一周应加强一次免疫。
- 4) 如果用小鼠免疫, 可以尾静脉小量采血(大约 50 μl), 最后取眼球大量采血(大约 500-1000 μl); 如果用兔子免疫, 可以耳缘静脉小量取血(大约 2 mL), 最后心脏大量取血(50-100 mL)
- 5) 按血清制备的标准方法将血清分离, 并且分装成小份, 储藏在-80 °C。

22.血清制备

1. 取血后, 37 °C 下, 让血液凝固 1 到 2 小时(不加抗凝剂);
2. 4 °C 冰箱过夜(让血块固缩);
3. 当血清自然析出后, 4 °C, 3000 rpm, 离心 10 分钟, 分离血清, 弃去不溶物;
4. 将血清移至一干净试管, 并分装成小份, 储藏在-80 °C。

23.ELISA

一、包被抗原

1. 用 50 mM 的碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6)溶解抗原, 使抗原浓度为 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加 100 μl /孔到 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。
2. 第二天弃去包被液后, 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 150 μl 1% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 小时。
3. PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 100 μl 不同倍比稀释度的血清, 并加入对照样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时。
4. PBST 洗涤 5 次后, 加入 100 μl 稀释后的 HRP 标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。
5. PBST 洗涤 5 次后, 显色剂显色 20 min 后, 酶标仪上读取 A_{405} 吸收值。

二、包被细胞

1. 在 96 孔培养板上接种细胞数为 1×10^4 cells/well, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。
2. 第二天用 PBS 洗涤培养板 2-3 次。
3. 加入 125 $\mu\text{l}/\text{well}$ 10% Formalin(1:10 稀释), 室温下固定 15 min。
4. 用 ddH₂O 洗涤培养板 3 次, 并晾干, 储藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 备用。
5. 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 150 μl 1% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 小时。
6. PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 100 μl 不同倍比稀释度的血清, 并加入对照样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时。
7. PBST 洗涤 5 次后, 加入 100 μl 稀释后的 HRP 标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。
8. PBST 洗涤 5 次后, 显色剂显色 20 min 后, 酶标仪上读取 A_{405} 吸收值。
9. 50 mM 的碳酸盐包被缓冲液: 0.05 mol/L pH9.6 碳酸缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 保存, Na₂CO₃ 0.15 克, NaHCO₃ 0.293 克, 蒸馏水稀释至 100 ml。
10. ABTS 作为底物进行显色反应(10 ml):
 - 0.2M Na₂HPO₄ 2.4 ml
 - 0.1M 柠檬酸 2.6 ml
 - ddH₂O 5 ml
 - ABTS 5 mg
 - H₂O₂(30%) 4 μl (用前加入)

注意:

- 1) 一般做倍比稀释进行检测，需要有相应的对照血清。
- 2) 不同的显色系统对应不同的光吸收值。

24.血清学筛选克隆新抗原/新基因

一、*E.coli*/ phage 裂解液预吸附血清

1. 将 *E.coli* /phage lysate 以 1:10-20 稀释在 TBST 溶液中。
2. 将 4 张 82 mm 的 nitrocellulose membranes(NC)浸入稀释后的 *E.coli*/ phage lysate 中，室温下水平摇动 30 分钟，取出 NC 并使膜沥干。
3. 用 50 ml TBST 溶液洗膜 3 次，每次 10 分钟。
4. 用滤纸轻轻吸去膜上的液体。
5. 将膜放入 50 ml 封闭液中，室温下水平摇动最少 30 分钟。
6. 将膜从封闭液中取出，用 50 ml TBST 溶液洗膜 3 次，每次 10 分钟。
7. 将血清按 1:5 稀释在 TBST 溶液中，将一张膜放入溶液中，37 °C 下轻轻水平摇动 10 分钟。
8. 从血清稀释液中取出膜并丢弃，加入另外一张新膜，37 °C 下轻水平摇 10 分钟。
9. 重复步骤 8，直至所有 4 张膜都处理完。
10. 除去最后一张膜，收集血清(primary antibody)，分装成小份储存于-80 °C 冰箱中待用。

注意：

- 1) 该步处理过程是为了去除血清中能与细菌和噬菌体裂解蛋白进行免疫反应的抗体，这样可以减少假阳性率；
- 2) 一抗不能反复冻融，化冻后不要再次冰冻，可放于 4 °C 作短暂保存；
- 3) 可以是病人血清，也可以是免疫血清，如果是病人血清，则需要至少 10 个病人血清进行混合；

二、噬菌体筛选

1. 准备 NZY agar plates(至少用前 24 小时倒好)，用前在 37 °C 培养箱中烘烤 1-2 小时以去除水滴。
2. 将过夜培养的 XL1-blue MRF 细菌 2000 rpm，离心 10 分钟，将细菌溶解在 10 mM MgSO₄

中, 调整细菌浓度为 $OD_{600}=0.5$ 。

3. 融化 NZY top, 并将 NZY top 放在 50 °C 水浴中。
4. 将适量的 XL1-blue MRF 细菌溶液与一定稀释度的 phage 文库混合, 37 °C 下共同作用 15 分钟。
 - 1) 直径 90 mm 平板: 200 μ l XL1-blue 细菌+适量的 phage 文库
 - 2) 直径 150 mm 平板: 600 μ l XL1-blue 细菌+适量的 phag 文库
 - 3) 噬菌斑数量一般保持在 3000 pfu/90 mm; 12000 pfu/150 mm
5. 将步骤 4 中的混合液与 NZY top 溶液混合(200 μ l 混合液+3-4 ml NZY top 溶液; 600 μ l 混合液+8-10 ml NZY top 溶液), 倒入到 NZY agar plates 中, 室温下放 10 分钟左右, 然后倒置放于 37 °C 下培养。
6. 当噬菌斑刚好可看到时(大约 5-8 小时), 从培养箱中拿出平板。
7. 将 NC 放入 10 mM IPTG 溶液中完全浸湿, 在空中使膜沥干, 并做好 3 个不对称的标记。
8. 将 IPTG 处理好的 NC 贴在平板上, 不留气泡, 然后倒置放于 37 °C 下培养。
9. 过夜培养后, 第二天早上取出平板, 用镊子将膜轻轻掀起, 注意不要将培养基粘在膜上。
10. 将膜放于 50 ml TBST 溶液中, 水平脱色摇床上震荡洗膜 3 次, 每次 10 分钟。
11. 将膜放入 50 ml 封闭液中, 水平摇动, 封闭 4-6 小时。
12. 在封闭液中加入适当滴度的一抗, 水平摇动处理过夜。
13. 将膜放于 50 ml TBST 溶液中, 洗膜 3 次, 每次 10 分钟。
14. 在封闭液中加入适当滴度的二抗(各个公司的二抗使用滴度不同), 室温水平摇动 1-2 小时。
15. 将膜放于 50 ml TBST 溶液中, 洗膜 3 次, 每次 10 分钟, 最后用 50 ml TBS 溶液洗膜 15-20 分钟, 取出膜空气中沥干。
16. 将膜放入 BCIP-NBT 显色液中避光显色, 水平摇动直到阳性斑点可见为止。
17. 从显色液中取出膜放在 TBS 溶液中, 空气中使膜干燥。
18. 根据所做的标记, 将膜与平板对齐, 将平板上对应的阳性克隆区域的培养基挖出放入 500 μ l SM buffer 中, 并加入 25 ml chloroform, 4 °C 贮存(最多可贮 6 月)。
19. 第一轮筛选得到阳性克隆需要进行第二轮筛选以去除假阳性并获得阳性单克隆噬菌体。

- 过程如第一轮筛选，只不过用直径 90 mm 平板；具体过程见步骤 4，这时所加入的噬菌体溶液是第一轮筛选得到的噬菌体上清(见步骤 18)，在用前要滴定好噬菌体的滴度，噬菌斑的数量以可区分出单个克隆，同时密度不能太稀为标准(一般 100-200 pfu/90 mm)。
20. 按第一轮相似的过程进行实验，最后显色，确定真正的阳性克隆，并将阳性单克隆所在的培养基挖出放入 500 μ l SM buffer 中，并加入 25 ml chloroform，4 $^{\circ}$ C 贮存(最多可贮存 6 月)。

注意：

- 1) 封闭液一般可用：5%的脱脂牛奶或 1%的 BSA 溶解在 TBST 溶液中。
- 2) 第一轮筛选用 150 mm 的平板；第二轮筛选用 90 mm 的平板，一般需要筛选至少 1×10^6 pfu。
- 3) 认真做好三个不对称的标记，特别在第二轮挑选阳性克隆时要仔细将膜与平板吻合好，不能挑错。

三、单克隆剪切

1. 取第二轮筛选得到的阳性克隆贮存液上清。
2. 将过夜培养的 XL1-blue MRF 细菌 2000 rpm 离心 10 分钟，将细菌溶解在 10 mM MgSO₄ 中，调整细菌溶度到 OD₆₀₀=1.0。
3. 在一个 EP 管中加入：200 μ l XL1-blue MRF'细菌+250 μ l phage stock(步骤 1)+1 μ l ExAssist helper phage。
4. 将以上三种样品混合，37 $^{\circ}$ C 下共同保温 15 分钟。
5. 将样品混合物加入到 3 ml LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 震荡培养 3-4 小时。
6. 将试管放于 65-70 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟，3000 rpm，离心 15 分钟。
7. 将上清转入新的离心管中，已发生剪切的 phage particles 在上清中(上清可在 4 $^{\circ}$ C 下储存 1-2 月)。
8. 将 100 μ l phage 上清+200 μ l SOLR cells(OD₆₀₀=1.0)混合，37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟。
9. 取步骤 8 中溶液 5-10 μ l 涂于 LB-amp agar plates(amp=50 μ g/ml)，过夜培养。
10. 第二天细菌长出，随机挑取单克隆接种到 LB-amp 培养基中培养过夜。
11. 过夜培养细菌分为三部分：(1)提取质粒做双酶切，鉴定外源基因的大小；(2)送样品进

行 DNA 测序; (3)加入 30-40%的甘油进行保种, 分装成小份储存于-80 °C备用。

25.ELISPOT

1. PBS 溶解抗原为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加 100 μl /孔于 PVDF 膜铺底的 96 孔灭菌板过夜;
2. 第二天吸去包被液后, 加 5% FCS 的 PRMI 1640 培养基 100 μl 封闭 1 小时, 37 °C;
3. 准备脾细胞悬液(用氯化铵去除红细胞, 制备成单个脾淋巴细胞悬液);
4. 从 1×10^6 /孔开始, 按 1:3 的稀释度开始逐孔稀释做不同浓度梯度, 并做 3 个复孔, 37 °C 静置培养 5 小时;
5. PBS 洗 3~5 次, 生物素化的抗鼠 IgG 二抗孵育 30 min;
6. PBS 洗 3~5 次, 链亲和素标记的碱性磷酸酶孵育 30 min;
7. PBS 洗 3~5 次, 用底物 BCIP/NBT 显色, 显微镜下观察显色反应, 显色后及时终止反应;
8. 计数每孔中的斑点数目, 计算每 10^6 个脾细胞中抗体分泌细胞数量。

26.藻酸盐包裹实验

1. 将藻酸钠溶于无菌生理盐水, 终浓度为 1.5%;
2. 收集培养的肿瘤细胞, 用无血清的培养基洗涤 1 次, 将细胞沉淀重悬于 1.5%藻酸钠溶液中;
3. 将上述肿瘤细胞悬浮液用 1 ml 加样枪缓慢滴入磁力搅拌的 250 mM CaCl_2 溶液中, 形成乳白色的藻酸盐小珠。继续静置于 250 mM CaCl_2 中 30 min 即可使用。以上操作步骤均在无菌条件下进行;
4. 将第 4 次免疫后 7 天的小鼠用苯巴比妥钠 0.1 ml (按 100 mg/kg 计) 腹腔注射麻醉, 小鼠麻醉后置于解剖台上, 切开背部皮肤, 皮下植入 4 粒藻酸盐包裹颗粒, 缝合皮肤, 外敷手术胶膜;
5. 天以后, 小鼠经尾静脉注入 100 μl (按 100 mg/kg 计) FITC 标记的葡聚糖(FITC-Dextran);
6. 20 min 后处死动物, 取出藻酸盐颗粒, 常温下加入 1 ml 的生理盐水, 剪碎研磨颗粒, 再加入 1 ml 的生理盐水, 混匀标本, 放置 1 小时, 1500 rpm 离心 5 min。取上清液用荧

光酶标仪测定；

7. 用不同浓度的 FITC-Dextran 制备标准曲线。

27. 重组腺病毒构建，扩增及纯化基本技术操作

一 目的基因的克隆(以 pshuttle-CMV 质粒为例)

1. 选择适当酶切位点，进行酶切连接，将目的片段插入 pshuttle-CMV 质粒多克隆位点。
2. 重组质粒鉴定：酶切鉴定或测序。
3. 重组质粒扩增，纯化并准备适量含目的基因的穿梭质粒。
4. 用 PmeI 单酶切线性化重组穿梭质粒，电泳鉴定质粒完全被切开。
5. 胶回收线性化质粒，以备共转化使用。

二 共转化

1. 大肠杆菌 BJ5183 电转感受态制备
 - 1) 从新鲜琼脂板上挑取单个 BJ5183 细菌，接种于 LB 培养基中，37 °C 振摇过夜。
 - 2) 接种 25 ml 过夜培养物于 500 ml LB 培养基，37 °C 振摇，至 OD₆₀₀ 达到 0.4。
 - 3) 迅速将培养物置于冰浴中 30 min，至充分冷却。
 - 4) 将菌液转移至预冷的离心管中，4 °C 下以 2500 r/min 离心 15 min，弃培养液，回收细胞。
 - 5) 以 10 ml 预冷的 10% 甘油洗涤沉淀，低温离心，共两次。
 - 6) 加约 1 ml(适量)预冷的 10% 甘油重悬沉淀，稀释悬液 100 倍，测量 OD₆₀₀，至稀释浓度为 2-3×10¹⁰ 个细胞/ml (1.0 OD₆₀₀ 约 2.5×10¹⁰ 个细胞/ml)。分装，-80 °C 或液氮保存待用。
2. 病毒骨架质粒转化大肠杆菌，扩增，纯化。
3. 将 1-5 μl (约 1 μg) 线性化的穿梭质粒及 1 μl(约 100 ng/μl)病毒骨架质粒(如 pAdEasy-1) 加入至含约 40 μl BJ5183 电转感受态的 EP 管中混匀，冰上冷却。
4. 将混合物加入电转杯，电击(1250-1500 V/mm, 5 ms)。
5. 电击结束取出样品，加入 1 ml SOC 或 LB 培养液，37 °C 低速振荡 40 min。
6. 取适当体积的电击转化细胞液涂于数个卡那霉素抗性平板(25-50 mg/ml)，37 °C 培养 16-20 hr。
7. 次日挑取平板上长出的菌落(选择最小的菌落)，接种于 3 ml 含 25-50 mg/ml 的 LB 培养

基, 37 °C培养 10-15 hr。

8. 碱裂法提取质粒, 0.8%琼脂糖凝胶电泳筛选, 大质粒为可能阳性克隆, 进一步酶切鉴定。以 PacI 单酶切, 0.8%琼脂糖凝胶电泳如显示出一条大片段(约 30 kb), 及一条小片段(约 3.0 或 4.5 kb)(同时可进行其它酶切鉴定), 则基本确定为阳性克隆。
9. 取1-5 μl阳性质粒转化至DH5α大肠杆菌细胞(BJ5183为recA+, 质粒DNA易发生突变, DH5α或JM109, XL1-blue菌株为重组缺陷性菌株, 可稳定扩增已鉴定的重组质粒), 扩增细菌并纯化质粒。

三 重组病毒质粒转导293细胞

1. 293细胞培养: 转导24小时前, 以方瓶为例, 接种 2×10^6 293细胞于25 cm²方瓶, 使生长密度约50-70%。(也可以使用6孔或96孔板)
2. 以PacI单酶切重组病毒质粒(转导25 cm²方瓶约需4 μgDNA), 完全线性化后, 乙醇沉淀, 再以20 μl ddH₂O溶解。
3. 脂质体包裹质粒(以Lipofectamine为例):每4 μg PacI约需20 μl Lipofectamine包裹.质粒及脂质体分别稀释于500 μl无血清培养基再混合, 置于室温下15-30 min。
4. 以无血清培养基轻轻洗涤培养瓶, 另加2.5 ml无血清培养基, 37 °C放置10 min。
5. 将Lipofectamine-DNA混合物加入培养瓶, 37 °C孵箱放置4 hr。
6. 4 hr后, 弃Lipofectamine-DNA混合液, 另加入6 ml DMEM完全培养基(含10% FCS)。如有大量细胞漂浮, 可不弃Lipofectamine-DNA液, 加入6 ml DMEM完全培养基, 37 °C孵育过夜, 再换液。
7. 培养过程中观察细胞生长情况。约2周后可观察到细胞病变(CPE)出现(如用pAdTrack-CMV质粒, 由于含GFP, 可观察到绿色荧光)。

四 重组病毒鉴定

1. 转导10-14 d后, 收集细胞沉淀, 加入2 ml灭菌的PBS混悬, 冻融细胞, 离心后收集上清保存于-80 °C。
2. 取 30-50%步骤 1 中上清, 感染 50-70%饱和度的 25 cm²方瓶中 293 细胞。2-3 d 后出现明显细胞病变。
3. 感染后 3-5 d, 当 1/3-1/2 细胞漂浮时收集病毒。按步骤 1 收集细胞并准备病毒上清。通

过 Western blot 和/或 PCR 鉴定重组腺病毒产生。

4. PCR 鉴定重组病毒。取 5 μ l 病毒上清加入 10 μ l 蛋白酶 K, 55 °C 孵育 1 hr, 再煮沸 5 min, 离心后取 1-2 μ l 作 PCR。

五 重组病毒扩增, 纯化

1. 75 cm² 方瓶中接种 293 细胞, 至密度达到 90%, 加入适量病毒上清感染细胞。3-4 d 后, 细胞几乎变圆, 且有一半细胞漂浮, 则收集所有细胞。约 500 g 转速离心, 弃上清。
2. 以灭菌 PBS 重悬沉淀, 反复冻融 4 次。4 °C 下 7000g 离心 5 min 病毒纯化至少需要 30 瓶 75 cm² 方瓶细胞。
3. CsCl 连续梯度离心纯化: 50 ml 离心管中称量 4.4 g CsCl, 加入 8 ml 病毒裂解上清液, 混匀, 体积约为 10 ml。转移至 12 ml 超速离心管(用于 SW41 转头)中, 覆盖约 2 ml 矿物油。平衡后, 10 °C 下 32000 rpm 离心 18-24 hr, 用注射器抽吸离心出的病毒带。
(也可 CsCl 不连续梯度离心: 20ml 超速离心管中缓慢加入 8 ml CsCl 1.4 (53 g + 87 mL 10 mM Tris-HCl, pH=7.9), 上面小心加入 6 mL CsCl 1.2 (26.8 g + 92 mL 10 mM Tris-HCl, pH=7.9), 再小心加入病毒上清液至体积达到 20 ml。平衡后, 4 °C 下 23000 rpm 离心 90 min (SW28 转头), 用注射器抽吸下层蓝白色病毒带)
4. 病毒透析去盐: 配置透析液(10 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 5% sucrose), 灭菌处理。4 °C 透析, 更换 3 次透析液, 可基本去除 CsCl, 病毒保存于 -80 °C。

六 病毒滴度测定(TCID₅₀)

1. 细胞准备: 96 孔板中接种 100 μ l 293 细胞, 每孔细胞数约 10⁴ 个, 以 2% DMEM 培养
2. 稀释病毒液准备: 以 2% DMEM 将病毒液稀释成 8 个较高浓度(如 10⁻³-10⁻¹⁰), 每个浓度重复 10 个, 每孔加入病毒稀释液 100 μ l。另留两排不加病毒液作为阴性对照。37 °C 下, 孵箱培养 10 天。
3. 10 d 后观察细胞, 记数每排出现 CPE 的孔数, 计算细胞病变率。(如某一浓度各孔细胞全部病变, 比率为 1, 如无细胞病变, 则比率为 0)。

$$\text{计算 } T = 10 \times 10^{1+d(S-0.5)} / \text{ml}$$

$$d = \text{Log}_{10} \text{稀释度 (如为 10 倍稀释, } d=1)$$

$$S = \text{各浓度细胞病变比率之和}$$

实验室重组腺病毒常用质粒：病毒骨架质粒：pAdEasy-1, pAdEasy-2

穿梭质粒：p-Shuttle, p-Shuttle-CMV, pAdTrack, pAdTrack-CMV

28.组织病理技术

组织处理：

1. 取新鲜组织厚度不超过 5mm, 10% 中性福尔马林固定, 大于 24 小时。
2. 固定后冲水 12-24 小时;
3. 75%酒精, 1 次, 1 小时;
4. 85%酒精, 1 次, 1 小时;
5. 95%酒精, 3 次, 1 小时;
6. 100%酒精, 3 次, 1 小时;
7. 二甲苯, 2 次, 1 小时;
8. 石蜡浸泡, 3 次, 2 小时。

HE 染色：

1. 石蜡切片脱蜡至水

依次将切片放入二甲苯I 10 min—二甲苯II 10 min—无水乙醇I 5 min—无水乙醇II 5 min—95%酒精 5 min—90%酒精 5 min—80%酒精 5 min—70%酒精 5 min—蒸馏水洗。

2. 苏木素染细胞核

切片入 Harris 苏木素染 3-8 min, 自来水洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 0.6% 氨水返蓝, 流水冲洗。

3. 伊红染细胞质

切片入伊红染液中染色 1-3 min。

4. 脱水封片

将切片依次放入 95%酒精 I 5 min—95%酒精 II 5 min—无水乙醇I 5 min—无水乙醇II 5 min—二甲苯I 5 min—二甲苯II 5 min 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树脂封片。

5. 显微镜镜检, 图像采集分析

29.免疫组化染色

一. 石蜡切片免疫组化染色实验步骤:

1. 石蜡切片脱蜡至水: (石蜡切片染色前应置 60°C 1 小时)。

- 1) 二甲苯I、II, 各 10 分钟。
- 2) 梯度酒精: 100%, 2 分钟至 95%, 2 分钟至 80%, 2 分钟至 70% 2 分钟。
- 3) 蒸馏水洗: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

2. 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶: 3% H_2O_2 , 室温 10 分钟(避光)。

3. 蒸馏水洗: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

4. 抗原修复: 根据待检测的抗原, 选择适当的方法。

附: 抗原修复液(10 mM pH 6.0 枸橼酸钠缓冲液)的配制

储备液的配制:

A 液: 枸橼酸三钠-2 H_2O 29.41 g + 蒸馏水 1000 ml

B 液: 枸橼酸 21 g + 蒸馏水 1000 ml

工作液的配制: A 液 82 ml + B 液 18 ml + 蒸馏水 900 ml

抗原修复的方法:

高压锅处理技术: 枸橼酸钠缓冲液(10 mM, PH 6.0), 淹没切片, 盖上锅盖, 高压锅内煮沸, 上汽 3 分钟后缓慢冷却(可用自来水在高压锅外冲, 以助冷却)。

微波处理技术:用塑料切片架, 置于塑料或耐温玻璃容器内, 枸橼酸钠缓冲液淹没切片, 选择中高或高档, 5 分钟;取出并补充已预热的枸橼酸钠缓冲液;再选择中高或高档, 5 分钟。

(最佳温度为 92~95 °C)

酶消化处理: 此略。

抗原修复的注意事项:

- 1) 组织不能干。
- 2) 选择抗原修复方法要因抗体而异。
- 3) 该方法主要用于 10%福尔马林固定、石蜡包埋组织。
- 4) 抗原修复后至 DAB 显色的过程中, 均需用 PBS 缓冲液。

5) PBS: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

5. 正常血清封闭: 从染片缸中取出切片, 擦净切片背面水分及切片正面组织

周围的水分(保持组织呈湿润状态), 滴加正常山羊或兔血清(与第二抗体同源动物血清)处理, 37 °C, 15 分钟。

附: 正常血清配制 (或按试剂盒规定的浓度配制)

按 1:20 比例, 用 PBS 配制, 每张切片需要量按 50 μ l+5 μ l (10%抛洒量)计算。

6. 滴加第一抗体: 用滤纸吸去血清, 不洗, 直接滴加第一抗体, 37 °C 2 小时(也可置于 4 °C 冰箱过夜)。

7. PBS: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

8. 滴加生物素化的二抗, 37 °C, 40 分钟。

9. PBS: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

10. 滴加三抗 (SAB 复合物), 37 °C, 40 分钟。

11. PBS: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

12. DAB 显色, 镜下观察, 适时终止(自来水冲终止)。

附: DAB 的配制

储备液(DAB 25 mg/ml)的配制: DAB 250 mg + PBS 10 ml, 待完全溶解后分装成 1 ml, 100 μ l, 50 μ l, 20 μ l 等, -20 °C, 冻存。

工作液: DAB 储备液 20 μ l + PBS 1000 μ l + 3% H₂O₂ 5 μ l

13. 自来水(细水)充分冲洗。

14. 苏木素复染, 室温, 30 秒, 自来水冲洗。

15. 自来水冲洗返蓝, 15 分钟。

16. 梯度酒精脱水:

80%, 2 分钟至 95%, 2 分钟至 100%, 2 次, 5 分钟。

17. 二甲苯透明:

I, II(二甲苯)各 5 分钟

18. 封片: 加拿大树胶(或中性树胶)封片。

二. 细胞爬片的免疫组化染色:

1. 取出细胞爬片，迅速置入冷丙酮固定 20 ~30 分钟。
2. 蒸馏水浸泡 5 分钟，2 次。
3. 打孔液浸泡 5 分钟。
4. 蒸馏水浸泡 5 分钟，2 次。
5. 后接前述实验步骤的第 6 步(正常血清封闭)。

注：第 3、4 步仅用于检测细胞内抗原，检测细胞膜抗原时不用。

三. 冰冻切片的免疫组化染色：

1. 新鲜组织立即在恒冷冰冻切片机内切片(也可-80 °C保存)，厚度为 5~ 6 μm；
2. 载玻片可不打底，裱片后，立即用电吹风吹干；
3. 如不马上染色，可密封后-20 °C保存；
4. 染色前用冷丙酮在 4 °C固定 10-20 分钟；
5. PBS 洗 2 次，每次 5 分钟，(必要时应用 0.1%柠檬酸钠+0.1% Triton 打孔)；
6. 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶，20 分钟，避光；
7. 用 PBS 洗 2 次，每次 5 分钟；
8. 接前面实验步骤第六步。

四 . 切片的预处理：

1. 洗衣粉液浸泡 30 分钟，冲洗，晾干；
2. 洗液 (含强酸、高锰酸钾等)浸泡 24 小时，冲洗，晾干；
3. APES(1: 50 丙酮溶液) 10-20 秒(注意：不能用塑料容器及塑料切片架)；
4. 纯丙酮 I, 约 10 秒。纯丙酮 II, 约 5 秒；
5. 晾干或烤箱内烤干，备用。

30.流式细胞仪常用的几种检测方法

一、测定用乙醇固定的 DNA 的含量

1. 培养细胞的 DNA 含量的测定

制备单细胞悬液于 200 μl 的 PBS 缓冲液中；

加入 2 ml 预冷的 70%乙醇，4 °C保存；

附:细胞固定的一般步骤

- 1) 取单细胞悬液 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞于 PBS(PH=7.2)缓冲液中;
- 2) 300 g 离心 5 分钟, 弃上清, 反复两次;
- 3) 重悬细胞于 0.5 ml PBS 缓冲液中;
- 4) 将细胞悬液放置于 2~3 ml 冷 70%乙醇中, 混匀, 保存于 4 °C, 至少 30 分钟。在 4 °C 条件下可保存 2~3 周。

注意:

- 1) 根据实验的要求, 固定剂也可选用 1~3%多聚甲醛;
- 2) 将乙醇作为固定剂时, 乙醇应预冷至 0~4 °C;
- 3) 细胞在固定时, 固定剂应缓慢滴入细胞悬液中, 使固定剂的浓度缓慢增加, 并不断震摇, 以免细胞成团(特别是用乙醇固定时)。
- 4) 300 g 离心 5 分钟, 去上清, 再重悬于 400 μ l PBS 中;
- 5) 显微镜下观察, 若有明显的黏附, 须再用筛网过滤;
- 6) 加入 PI(含 Rnase), 避光孵育 30 分钟;
- 7) 上机检测。

2. 新鲜组织的 DNA 含量的测定

- 1) 用 200 mg 湿重组织用机械法制成单细胞悬液;
- 2) 500 g 离心 5 分钟;
- 3) 弃上清, 重悬于 10 ml 染色-去污剂中;
- 4) 再过滤, 用 200 目的筛网或 70~80 μ m 的筛网过滤;
- 5) 上机检测。

3. 石蜡包埋组织切片的 DNA 含量的测定

- 1) 从石蜡包埋切取切片 50 μ m 厚, 2~3 片, 制成单细胞悬液;
- 2) 用 PBS 缓冲液洗涤, 500 g 离心 5 分钟, 弃上清;
- 3) 加入 PI 液 1 ml 室温避光 30 分钟;
- 4) 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml;
- 5) 上机检测。

二、细胞凋亡检测及相关分子检测

1. 细胞 DNA 含量分布(由细胞 DNA 降解方式检测细胞凋亡)

- 1) 收集已固定的单细胞悬液约 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml;
- 2) 离心除去固定液, 3 ml PBS 重悬细胞;
- 3) 1500 rpm 离心, 5 分钟, 弃去 PBS;
- 4) 加 PI 染液 1 ml, 室温避光 20 分钟;
- 5) 调整细胞浓度 5×10^5 /ml;
- 6) 上机检测。

2. 磷脂酰丝氨酸外翻分析检测细胞凋亡

- 1) 常规制备单细胞悬液, 用 PBS 洗两次.(若为全血要先溶血), 取约 5×10^6 个细胞, 1500 rpm 离心, 弃上清, 用 400 μ l 1 \times Binding Buffer 重悬;
- 2) 分成 a、b、c、d、e 五管, 每管约 1×10^6 个细胞;
阴性对照, 不加任何试剂;
阳性对照, 加 2%多聚甲醛固定 30 分钟, 加 AnnexinV 5 μ l, 室温 10 min, 用 1 \times Binding Buffer 洗一次, 弃上清再加 190 μ l 缓冲液、10 μ l PI 避光 15 分钟
- 3) 加 10 μ l PI, 避光孵育 15 分钟;
- 4) 加 5 μ l AnnexinV 液, 室温避光孵育 15 min;
- 5) 加 10 μ l PI 和 5 μ l AnnexinV 液, 室温避光孵育 5 min;
- 6) 每管各加 400 μ l 1 \times Binding Buffer。
- 7) 上机检测。
注意 a. 操作动作要尽量轻柔, 勿用力吹打细胞;
b. 操作时注意避光;
c. 反应完毕后尽快检测, 最好在一小时内检测。
- 8) 用单克隆抗体 APO2.7 检测细胞凋亡
- 9) 放置 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞到试管中;
- 10) 室温离心 200 g, 6 min;
- 11) 弃上清, 加入 100 μ l 冷的(4 $^{\circ}$ C)在 PBSF 溶液中含 100 μ g/ml 的 digitonin, 轻轻地重悬

细胞, 在冰上孵育 20 min;

- 12) 加入 2 ml 冷的(4 °C)PBSF 液, 室温离心 200 g, 6 min;
- 13) 弃上清, 加入 20 μl PE 标记的 Apo2.7 单克隆抗体和 80 μl PBSF 液, 用 vortex 轻轻震荡, 室温避光孵育 15 分钟;
- 14) 加入 2 ml PBSF 液, 室温离心 200 g, 6 min;
- 15) 弃上清, 加入 1 ml PBSF 液重悬细胞;
- 16) 避光保存, 直到流式细胞仪检测。
- 17) PBSF: 含 2.5% FCS(v/v)和 0.01% NaN₃(w/v)的 PBS。

三、用流式细胞术进行 DNA 周期分析

方法: 同 DNA 含量检测

注意:

单细胞浓度应约 10⁶/ml, 以免影响检测的 CV 值和检测结果;

制备完成后的标本应用光学显微镜检查其质量(如细胞是否聚集或过多碎片), 以保证得到足够的细胞含量;

醛类固定会影响 PI 与核酸的结合。

四、免疫荧光标记法

1. 细胞膜上的免疫荧光检测法

间接标记法

- 1) 制备单细胞悬液;
- 2) 细胞计数, 取出 1×10⁶ 个细胞于试管中;
- 3) 用台盼蓝染色计活细胞数, 要求活细胞数>90~95%;
- 4) 在试管中加入一抗, (剂量按照说明书的要求), 孵育 30~60 分钟;
- 5) PBS 洗涤 1~2 次, 1500 rpm, 离心 3 分钟, 弃上清;
- 6) 加入二抗, 孵育 20~30 分钟;
- 7) PBS 洗一次, 1500 rpm, 离心 3 分钟, 弃上清;
- 8) 加 300 μl PBS, 上机检测(若不能及时上机检测, 可加 1 ml 1%多聚甲醛固定, 可放置 1 周)。

直接标记法

- 1) 前三步同间接标记法;
- 2) 在试管中加入荧光标记的抗体, 混匀, 孵育 30 分钟;
- 3) 用 PBS 洗 2 次, 1500 rpm, 离心 3 分钟, 弃上清;
- 4) 加 300 μ l PBS(PH=7.4), 上机检测。

2. 细胞膜内的免疫荧光标记法

- 1) 取已制备好的单细胞悬液, 用 1~3%的多聚甲醛固定 30 分钟(也可 4 °C保存过夜);
- 2) 用 PBS 洗两次, 弃上清;
- 3) 细胞膜打孔, 加入 0.1%皂素 200 μ l, 室温 10 分钟;
- 4) 用 PBS 洗涤两次;
- 5) 加入第一抗体, 室温 30~60 分钟, 或 4 °C过夜, 同时须设阴性对照或同型对照管;
- 6) 用 PBS 洗涤两次;
- 7) 加入二抗(荧光标记的抗体)室温 20 分钟, 避光;
- 8) 用 PBS 洗涤 1~2 次, 弃上清;
- 9) 重悬细胞于 500 μ l PBS 中, 上机检测。

3. 直接荧光标记法

- 1) 前五步同间接荧光标记法;
- 2) 加入荧光素标记好的抗体, 避光 30 分钟(同时做同型对照管);
- 3) 用 PBS 洗涤 1~2 次, 弃上清;
- 4) 加 300 μ l PBS 上机检测。

4. 细胞膜上及细胞内双标记法(直标法)

- 1) 取出已制备好的未固定的单细胞悬液 1×10^6 个细胞于试管中;
- 2) 用 PBS 洗涤两次;
- 3) 加入用荧光素标记的抗体来标记细胞膜上的抗原, 同时加上阴性对照管, 室温孵育 20 分钟;
- 4) 在试管中加入 1%~3%多聚甲醛 1 ml, 固定 30 分钟;
- 5) PBS 洗涤两次 1500 rpm 3 分钟, 弃上清;

- 6) 打孔, 加入 0.1% 皂素 200 μ l 室温 10 分钟;
- 7) 用 PBS 洗涤两次, 弃上清;
- 8) 加入用荧光素标记的抗体, 标记膜内的抗原(标记膜内的抗体的荧光素的颜色与膜上标记的荧光素的颜色务必不相同)室温 20 分钟孵育;
- 9) 用 PBS 洗一遍弃上清;
- 10) 用 300 μ l PBS 重悬细胞, 上机检测。

五、流式细胞术中的几点注意事项:

1. 对照组的设置:

在流式细胞术中所测得的量都是相对值, 不是绝对值。如需知道绝对值时必须设置对照组样品。对照组样品包括有阴性对照和阳性对照。

阴性对照的设置

在实验过程中, 如做间接标记法, 可设置与一抗无关的实验, 即在实验中不加一抗而只加上带有荧光标记的第二抗体作为阴性对照管, 作为阴性对照。

在实验过程中, 假设做直接标记法, 可设置理论上的阴性细胞作为阴性对照管, 实验过程及步骤与实验组务必相同。(做间接标记法时, 同样也可同时设置“阴性细胞”的阴性对照管作为阴性对照。

在实验过程中, 假设做直接标记法, 可将实验组细胞, 取一管, 加上与实验抗体所标记的荧光颜色相同的同型对照来作为阴性对照。

阳性对照的设置:

在实验过程中如涉及表达缺失或减少的实验, 应设置阳性对照组, 其设置方法与阴性对照设置相同。

2. 几点建议:

- 1) 在实验过程中, 在保证实验的科学性和准确性的基础上, 应尽量减少实验工序和过程。由于间接标记法的工序多, 实验过程长, 如再加之操作的不熟练, 细胞更容易丢失和受损, 而造成实验结果的误差。因此, 在条件允许的范围内, 建议尽量做直接标记法而不去做间接标记法, 以保证实验的真实性和准确性。
- 2) 建议送检细胞一定要足够量, 一般要求 1×10^6 个细胞。不要过少。因为, 如细胞太少检

测时样本流量相对会增大从而影响变异系数，结果也不可信。细胞量也不宜过多，因细胞量太多加入的抗体或染料相对不足，结果也由此受影响。

- 3) 同一种细胞需同时做双标记时，须做双标记的同型对照，且两种抗体所标记的荧光颜色务必不同。

31. Western Blot(免疫印迹法)

主要包括以下 4 个基本步骤：

- 1) 样品制备
- 2) 电泳分离
- 3) 蛋白的膜转移
- 4) 免疫杂交与显色—蛋白检测

样品制备

原始样品可为细胞、组织、培养上清、免疫沉淀或亲和纯化的蛋白，以下为定性检测目的蛋白时细胞样品的处理方法，其余的样品制备方法参阅相关文献。

- 1) 培养细胞或药物处理。
- 2) 弃培养基，用1x PBS漂洗细胞2次，去尽残留培养基。
- 3) 加入1xSDS样品缓冲液(6-well plate, 100 μ l/w或 75 cm² plate, 500-1000 μ l/瓶)，刮落细胞，转移到EP管。**注意：**冰上操作。
- 4) 超声10~15秒剪切DNA以减低样品粘性。
- 5) 煮沸样品5 min。
- 6) 离心12000 g, 5 min, 取上清。
- 7) 电泳分离：上样15 μ l~20 μ l 至 SDS-PAGE胶 (10 cm x 10 cm)电泳。
- 8) 如要定量检测某蛋白的表达水平，应用RIPA裂解液(1 ml per 10⁷ cells/100 mm dish/150 cm² flask)裂解细胞，收集裂解液至离心管中，在振荡器上混匀4~15 min, 14000 g离心15 min(4 °C)，弃沉淀，用Bradford法或其它蛋白质测定方法测定上清中蛋白浓度以调整上样体积和上样量，进行Western杂交时还需设置内或外参照，通常用beta-actin。

注意：一般上样20~30 μ g已足够，如待检蛋白为低丰度蛋白，可加大上样量至100 μ g，

但电泳条带易拖尾，可制备亚细胞组份或采用更敏感的检测方法。

电泳分离(参照SDS-PAGE电泳方法)

转膜

杂交膜的选择是决定 Western blot 成败的重要环节。应根据杂交方案、被转移蛋白的特性以及分子大小等因素，选择合适材质、孔径和规格的杂交膜。用于 Western blot 的膜主要有两种：硝酸纤维素膜(NC) 和 PVDF 膜。NC 膜是蛋白印迹实验的标准固相支持物，在低离子转移缓冲液的环境下，大多数带负电荷的蛋白质会与膜发生疏水作用而高亲和力的结合在一起，但在非离子型的去污剂作用下，结合的蛋白还可以被洗脱下来。根据被转移的蛋白分子量大小，选择不同孔径的 NC 膜。因为随着膜孔径的不断减小，膜对低分子量蛋白的结合就越牢固。通常用 0.45 μm 和 0.2 μm 两种规格的 NC 膜。大于 20 kD 的蛋白可用 0.45 μm 的膜，小于 20 kD 的蛋白就要用 0.2 μm 的膜了，如用 0.45 μm 的膜就会发生“Blowthrough”的现象。PVDF 膜灵敏度、分辨率和蛋白亲和力比常规的膜要高，非常适合于低分子量蛋白的检测。但 PVDF 膜在使用之前必需用纯甲醇浸泡饱和 1-5 秒钟。

蛋白质常用的转移方法主要有两种：槽式湿转和半干转移。前者操作容易，转移效率高；而后者适用于大胶的蛋白转移，所用缓冲液少。以下为槽式湿转的操作步骤。

- 1) 将胶浸于转移缓冲液中平衡 10 min。**注意：**如检测小分子蛋白，可省略此步，因小分子蛋白容易扩散出胶。
- 2) 依据胶的大小剪取膜和滤纸 6 片，放入转移缓冲液中平衡 10 min。如用 PVDF 膜需用纯甲醇浸泡饱和 3-5 秒钟。
- 3) 装配转移三明治：海绵—3 层滤纸—胶—膜—3 层滤纸—海绵，每层放好后，用试管赶去气泡。**切记：胶放于负极面(黑色面)。**
- 4) 将转移槽置于冰浴中，放入三明治(黑色面对黑色面)，加转移缓冲液，插上电极，100 V，1 h(电流约为 0.3 A)。**注意：应再次检查三明治和电极是否装配正确，电源是否接通。**
- 5) 转膜结束后，切断电源，取出杂交膜。

免疫杂交与显色

- 1) 用 25 ml TBS 洗膜 5 min，室温，摇动。
- 2) 置膜于 25 ml 封闭缓冲液中 1 h，室温，摇动。

- 3) 15 ml TBS/T洗3次(5 min/T)。
- 4) 加入合适稀释度的一抗, 室温孵育1-2 h或4 °C过夜, 缓慢摇动。
- 5) 15 ml TBS/T洗3次(5 min/T)。
- 6) 加入合适稀释度的碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温孵育1 h, 缓慢摇动。
- 7) 15 ml TBS/T洗3次(5 min/T)。
- 8) 15 ml TBS洗1次。
- 9) 蛋白检测(显色法或发光法, 按相应试剂说明操作)。

注意事项:

- 1) 操作中戴手套, 不要用手触摸。
- 2) PVDF膜在甲醇中浸泡时间不要超过5秒。
- 3) 如检测小于20 kD的蛋白应用0.2 μm的膜, 并可省略转移时的平衡步骤。
- 4) 某些抗原和抗体可被Tween-20 洗脱, 此时可用1.0% BSA代替Tween-20。
- 5) 关于封闭剂的选择: 5%脱脂奶/TBS or PBS: 能和某些抗原相互作用, 掩盖抗体结合能力; 0.3~3% BSA in PBS: 低的内源性交叉反应性。
- 6) 如用0.1% Tween 20、0.02% NaN₃ in PBS or TBS作封闭剂和抗体稀释液, 抗体检测后可进行蛋白染色。
- 7) 如要同时检测大分子量和小分子蛋白, 最好用梯度胶分离蛋白。

32.PVDF 膜上蛋白的可逆染色

Western 杂交时, 为确认蛋白是否转至 PVDF 膜上, 可用下列方法对膜上蛋白进行可逆性染色。

1. 氨基黑染色

染液: 0.5% Amido Black (w/v), 25% isopropanol (v/v) and 10% acetic acid.

染色: 将 PVDF 膜置于染液中染色数钟, ddH₂O 脱色。

2. 考马氏亮蓝染色

染液: 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) and 50% methanol (v/v);

脱色液：40% methanol (v/v) with 10% acetic acid (v/v);

染色：将 PVDF 膜置于染液中染色 15 min., 脱色液脱色。

3. 丽春红染色 Ponceau S

染液：0.2% w/v Ponceau S in TCA (3% v/v);

染色：将 PVDF 膜置于染液中染色 5 min;

脱色：ddH₂O 脱色。

4. 银染

PAGE 胶上蛋白质的银染方法有数百种，其原理相似，具体步骤各不相同。银染为蛋白质的非特异性染色，呈“爆炸性”反应模式，用于蛋白定量时准确性差，但其敏感度高、简便易行，仍被广泛应用。下面列举的这三种方法为常用的双向电泳凝胶染色法，可与质谱兼容。其中方法 1 敏感性最高，方法 3 背景最低、对比度好。

注意事项：

- 1) 应严格按照操作步骤进行;
- 2) 显色前最好更换新染色盘;
- 3) 显色时变为黄色或棕色后立即弃去，更换新鲜显色液，一般来说染一块胶应配制 500ml 染液。更换 2-3 次;
- 4) 市售甲醛的浓度为 37%;
- 5) 三种方法均与质谱兼容，Blum 法敏感性高，但背景呈淡黄色，EMBL 法次之但背景较低，染色点较黑。Vorum 相对不敏感，但背景清晰，信噪比高。

33.人肿瘤抗原的识别与鉴定—免疫沉淀实验流程

一、裂解细胞

- 1) 收集细胞。将培养瓶置于冰上，倒掉培养基，用 PBS 或生理盐水漂洗两次，留适量液体于瓶内，然后用特制的细胞刮棒朝一个方向刮取细胞。将细胞悬液转移到离心管，离心取沉淀，-80 °C 保存。(收集细胞要迅速，低温下进行，以减弱蛋白酶的作用)
- 2) 裂解细胞。采用 RIPA 裂解体系，使用前 4 °C 预冷，按 10⁷ 个细胞加入 1.0ml 裂解液，吹打混匀，加入适量的蛋白酶抑制剂(如 Cocktail)，冰上放置 3~5 分钟。

- 3) 超声处理裂解液。使用探针型超声进行多次适当频率的短促冲击, 10~20 秒/次, 重复 3 次, 中间间隔 10~20 秒, 冰浴下进行。
- 4) 15, 000rpm, 4 °C离心 15 min, 吸取上清液于另一 EP 管中, 置冰上。上清液用于下一步的预处理。

二、裂解物的预处理

- 1) 使用正常人的血清对裂解物进行预处理。
- 2) 按 1 ml 裂解物加 2 μ l 对照血清的比例加入正常人血清。
- 3) 室温孵育 2~3 小时, 缓慢摇动。

三、免疫复合物的纯化

- 1) 用 Dynabeads proteinA 进行免疫复合物的纯化。
- 2) 将 Dynabeads proteinA 振荡混匀, 吸取 100 μ l 磁珠于 Ep 管中, 置于磁铁架(Dynal MPC) 上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 3) 加 500 μ l 0.1 M Na-phosphate (pH 8.1)至 EP 管, 轻柔搓动管子约 2~3 min, 将 EP 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 4) 重复 2 步骤两次。
- 5) 清洗完磁珠后, 加 500 μ l 预处理后的裂解物, 反复摇动管子, 室温下反应 10~20 min。
- 6) 将 EP 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 将上清转移至另一 EP 管中。
- 7) 用 RIPA 裂解液清洗磁珠 3 次。
- 8) 洗脱抗原-抗体复合物。加 0.1 M Citrate (pH 3.1) 30 μ l 于 Ep 管中, 轻柔搓动管子约 2~3 min, 将 EP 管置于磁铁架上, 吸取上清于一 EP 管。
- 9) 重复步骤 7, 将上清收集于同一个 EP 管洗脱样品总体积为 60 μ l, 作对照用。
- 10) 磁珠用 0.1 M Na-phosphate (pH 8.1) 清洗三次后备用。
- 11) 在步骤 5 留取的上清中加入病人血清(1 ml 加 2 μ l 血清), 缓慢摇动, 室温孵育 2~3 h。
- 12) 将 EP 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 13) 重复步骤 6~8。共收集到两份样品, 对照与病人的纯化免疫复合物各 60 μ l。
- 14) 磁珠用 0.1 M Na-phosphate (pH 8.1) 清洗三次后加入柱储液 100 μ l, 4 °C保存。
- 15) 在样品中加入 2 \times SDS 上样缓冲液并用 1 M NaOH 调节 pH 至使溴酚蓝呈蓝色。

四、1D SDS-PAGE

用免疫沉淀后的样品可直接进行一维凝胶电泳，或者对磁珠上的蛋白 A 或蛋白 G 进行耦联剂修饰，洗脱后的样品可进行 Western Blot。

RIPA 裂解液：150 mmol/L NaCl; 1.0% NP-40; 0.5%脱氧胆酸钠; 0.1% SDS; 50 mmol/L Tris, (pH 8.0)

34.蛋白质组实验流程

1. 双向电泳的样品的制备

样品制备是双向电泳中最关键的一步，将直接影响 2-DE 结果好坏。目前并没有一个通用的样品制备方法，尽管处理方法多种多样，但都遵循几个基本的原则：

- 1) 尽可能的提高样品蛋白的溶解度，抽提最大量的总蛋白，减少蛋白质的损失；
- 2) 减少对蛋白质的人为修饰；3)破坏蛋白质与其他生物大分子的相互作用，并使蛋白质处于完全变性状态。

根据这一原则，样品制备需要四种主要的试剂：离液剂(Chaotropes)，主要包括尿素(Urea)和硫脲(Thiourea)；表面活性剂(Surfactants)，也称去垢剂，如 CHAPS 与 Zwittergent 系列等两性离子去垢剂；还原剂(Reducing agents)，最常用的是二硫苏糖醇(DTT)和磷酸三丁酯(TBP)等。当然，也可以选择性的加入 Tris-base，蛋白酶抑制剂以及核酸酶。

样品的来源不同，其裂解的缓冲液也各不相同。通过不同试剂的合理组合，以达到对样品蛋白的最大抽提。在对样品蛋白质提取的过程中，必须考虑到去除影响蛋白质可溶性和 2DE 重复性的物质，比如核酸、脂、多糖等大分子以及盐类小分子。大分子的存在会阻塞凝胶孔径，盐浓度过高会降低等电聚焦的电压，甚至会损坏 IPG 胶条，这样都会造成 2-DE 的失败。样品制备的失败很难通过后续工作的完善或改进获得补偿。

核酸的去除可采用超声或核酸酶处理，超声处理应控制好条件，并防止产生泡沫；而加入的外源核酸酶则会出现在最终的 2D 胶上。脂类和多糖都可以通过超速离心除去。透析可以降低盐浓度，但时间太长；也可以采取凝胶过滤或沉淀/重悬法脱盐，但会造成蛋白质的部分损失。

因此，样品制备方法必须根据不同的样品、所处的状态以及实验目的和要求来进行选择。目

前有很多方法适于 2-DE, 如组织或细胞的总蛋白提取物、亚细胞组份或细胞器蛋白、免疫沉淀的蛋白及其它亚组份蛋白(如磷酸化蛋白、采用亲和纯化凝集素结合蛋白等)。

2. 细胞样品

- 1) 细胞培养, 加药与处理。
- 2) 胰酶消化贴壁细胞, PBS 漂洗 3 次(1500 g, 5 min), 弃上清, 再次离心, 去尽残液(**非常重要!**)。如要比较细胞膜蛋白组的差别, 最好用细胞刮收获细胞。如用 10 mM Tris/250 mM Sucrose(pH 7.0)代替 PBS, 可有效降低样品的盐浓度。加入 5 倍体积裂解液, 混匀(或将 1×10^6 细胞悬于 60 ~ 100 μ l 裂解液中)。
- 3) 加 50 ug/ml RNase 及 200 ug/ml Dnase, 在 4 °C 放置 15 分钟。
- 4) 15, 000 转, 4 °C 离心 60 分钟(或 40, 000 转, 4 °C 离心 30 分钟)。
- 5) 收集上清。
- 6) 测定蛋白浓度(采用 BioRad RC/DC protein assay kit)。
- 7) 分装样品, 冻存于 -70 °C。

3. 组织样品

- 1) 碾钵碾磨组织, 碾至粉末状。
- 2) 将适量粉末状组织转移至匀浆器, 加入适量裂解液, 进行匀浆。
- 3) 加 50 ug/ml RNase 及 200 ug/ml DNase, 在 4 °C 放置 15 分钟。
- 4) 15, 000 转, 4 °C 离心 60 分钟(或 40, 000 转, 4 °C 离心 30 分钟)。
- 5) 收集上清, 测定蛋白浓度。
- 6) 分装样品, 冻存于 -70 °C。

注意事项:

- 1) 8 mmol/L PMSF 必须在添加还原剂之前用, 否则 PMSF 会失去活性。
- 2) 40 mmol/L 浓度以下的 Tris 可使有些蛋白酶在高 pH 值下失活。
- 3) 细胞清洗——大多用 PBS, 若 PBS 残留于细胞表面会造成胶上出现水平条纹, 则可利用(10 mmol/L Tris, 250 mmol/L sucrose pH 7.0)来解决此问题。

4. 双向电泳操作步骤

- 1) 从冰箱中取出 IPG 胶条, 室温放置 10 min。

- 2) 沿水化盘槽的边缘从左向右线性加入样品，槽两端各 1 cm 左右不加样，中间的样品液一定要连贯。**注意：**不要产生气泡，否则会影响胶条中蛋白质的分布。
- 3) 用镊子轻轻撕去 IPG 胶条上的保护层。**注意：**碱性端较脆弱，应小心操作。
- 4) 将 IPG 胶条胶面朝下轻轻置于水化盘中样品溶液上。**注意：**不要将样品溶液弄到胶条背面，因为这些溶液不会被胶条吸收；还使胶条下面的溶液产生气泡。如产生了气泡，用镊子轻轻地提起胶条的一端，上下移动胶条，直到气泡被赶走。
- 5) 放置 30~45 min 大部分样品被胶条吸收，沿着胶条缓慢加入矿物油，每根胶条约 3 ml(17 cm IPG)，防止胶条水化过程中液体蒸发。
- 6) 置等电聚焦仪于-20 °C水化 11~15 h。

5. 第一向 等电聚焦

- 1) 将纸电极置于聚焦盘的正负极上，加 ddH₂O 5~8 μl 润湿。
- 2) 取出水化好的胶条，提起一端将矿物油沥干，胶面朝下，将其置于刚好润湿的滤纸片上杂交以去除表面上的不溶物。
- 3) 将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘中，胶条的正极(标有+)对应于聚焦盘的正极，确保胶条与电极紧密接触。
- 4) 在每根胶条上覆盖 2-3 ml 矿物油。
- 5) 对好正、负极，盖上盖子。设置等电聚焦程序。
- 6) 聚焦结束的胶条，立即进行平衡、第二向 SDS-PAGE 电泳。或将胶条置于样品水化盘中，-20 °C冰箱保存，电泳前取出胶条，室温放置 10 分钟，使其溶解。

6. 第二向 SDS-PAGE 电泳

- 1) 配制 12%的丙烯酰胺凝胶。
- 2) 待凝胶凝固后，倒去分离胶表面的 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇，用 MilliQ 水冲洗。
- 3) 配制胶条平衡缓冲液 I。
- 4) 在桌上先放置干的厚滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上。将另一份厚滤纸用 MilliQ 水浸湿，挤去多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品，这样可以减少凝胶染色时出现的纵条纹。
- 5) 将胶条转移至样品水化盘中，加入 6 ml(17 cm IPG)平衡缓冲液 I，在水平摇床上缓慢摇

晃 15 分钟。

- 6) 配制胶条平衡缓冲液 II。
- 7) 第一次平衡结束后, 取出胶条将之竖在滤纸上沥去多余的液体, 放入平衡缓冲液 II 中, 继续在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。
- 8) 用滤纸吸去 SDS-PAGE 胶上方玻璃板间多余的液体, 将二向凝胶放在桌面上, 凝胶的顶部面对自己。
- 9) 将琼脂糖封胶液加热溶解。
- 10) 在 100 ml 量筒中加入 TGS 电泳缓冲液。
- 11) 第二次平衡结束后, 取出胶条, 用滤纸吸去多余的平衡液(将胶条竖在滤纸上, 以免损失蛋白或损坏凝胶表面)。
- 12) 用镊子夹住胶条的一端使胶面完全浸末在 1×电泳缓冲液中漂洗数次。
- 13) 将胶条背面朝向玻璃板, 轻轻放在长玻板上, 加入低熔点琼脂糖封胶液。
- 14) 用适当厚度的胶片, 轻轻地将胶条向下推, 使之与聚丙烯酰胺凝胶胶面完全接触。**注意:**不要在胶条下方产生气泡, 应推动凝胶背面的支撑膜, 不要碰到胶面。
- 15) 放置 5 分钟, 使低熔点琼脂糖封胶液凝固。
- 16) 打开二向电泳制冷仪, 调温度为 15 °C。
- 17) 将凝胶转移至电泳槽中, 加入电泳缓冲液, 接通电源, 起始时用的低电流(5 mA~10 mA/gel/17 cm), 待样品在完全走出 IPG 胶条, 浓缩成一条线后, 再加大电流(20-30 mA/gel/17 cm)待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。
- 18) 电泳结束后, 轻轻撬开两层玻璃, 取出凝胶, 并切角以作记号(戴手套, 防止污染胶面)。
- 19) 进行染色。

35.SDS-PAGE 胶染色

1. 考马斯亮蓝染色

CBB 染色液

0.5%考马斯亮蓝 G250 或 R250

40%甲醇

10%乙酸

将 CBB 溶于甲醇中并不停的搅拌 15 min。加入乙酸与 ddH₂O

脱色液：30% 甲醇

10%乙酸

染色方法：

- 1) 在摇床上染色 30 min.
- 2) 脱色至蛋白点或条带清晰可见
- 3) ddH₂O 洗 3-5 次

2. 胶体考马氏亮蓝染色 Colloidal Coomassie Staining(Cambridge centre for proteomics)

- 1) 固定：甲醇/醋酸/H₂O(45:1:54)至少 20 min.
- 2) 染色 12-18 hr.

染色液 17% (w/v) 硫酸铵, 34% 甲醇, 0.5% 醋酸, 0.1% (w/v) Coomassie G250

- 3) 脱色：用 H₂O 脱色至蛋白点和背景清晰。

36.双向电泳蛋白点的切取和保存

- 1) 用 PDQuest 软件或肉眼比对, 找出感兴趣的蛋白点, 并做好标记和记录。
- 2) 用 MilliQ 水冲洗胶 2 次。
- 3) 用色谱纯甲醇和 MilliQ 水冲洗 EP 管
- 4) 将枪头(200 μ l)下端剪去, 使其内径略小于蛋白斑点的直径, 用色谱纯甲醇和 MilliQ 水冲洗枪头。
- 5) 对准斑点中央小心将蛋白切割下来, 放入 EP 管, MilliQ 水漂洗 2 次, 如胶块太大, 将其切成 1*1 mm 的胶片。
- 6) 将切好的点做好标记和记录, 置-80 °C 保存或冻干后-20 °C 存放。

注意事项:

- 1) 尽量避免皮肤和头发的角蛋白的污染, 在操作过程中应戴一次性的 PE 手套(不用乳胶手套)和帽子。
- 2) 不要将胶长期存放于乙酸溶液中。

- 3) EP 管及染胶的容器必须用甲醇和水充分清洗, 尤其应与进行 Western blotting 的容器分开, 以避免 Casein 或 BSA 的污染。

37.数据库搜索(Databases search)

一般来说, 利用质谱数据鉴定蛋白质主要有两种方法: 肽质量指纹图谱(PMF)和肽序列标签分析(Sequence tag analysis)。这两种方法较传统的 N 端测序或内部 Edman 测序法敏感数百倍, 其检测低限为飞摩尔(fmol)水平(如银染的 2D 胶点或 1D 胶带)。然而, 足够多的样品蛋白量可以增加识别的成功率, 这是因为增大样品蛋白量可以克服一些污染物的干扰(如角蛋白, 在样品中的存在非常常见)。数据库的检索是利用计算机程序算法将实验测得的肽质量数据与蛋白质序列数据库中的蛋白质的肽质量计算值进行相关性比较分析, 从而得出可能蛋白质的概率并将相关性最好的结果排序, 这是凝胶分离蛋白质鉴定的最常用手段。

这种检索途径有一个明显的限制, 就是被鉴定的蛋白质必须在序列数据库(蛋白质数据库和核酸序列翻译数据库)中存在。PMF 检索鉴定蛋白质是依据实验中所获得的蛋白质的多个肽段质量数据与同一蛋白质肽段质量理论计算值的之间的相关性比较。因此, 这一技术不适用于检索 EST 翻译序列, 也不适用于鉴定蛋白质的混合物。而肽序列标签分析(Sequence tag analysis)可适用于检索 EST 数据库。

对PMF数据, 主要搜索Swiss Prot (速度快但不全面)和NCBI (速度虽慢但包含更多的信息)数据库。如果你认为你的蛋白质可能为新的蛋白质, 选择NCBI数据库, 标准搜索选择Swiss Prot 数据为好。如果需要, 也可搜索EST数据库(用MS/MS数据按搜索更有效)。

检索条件的设置与结果判断:

- 1) 肽片段质量选择在 800-4000 Da 范围。
- 2) 氨基酸残基的修饰(Modifications): 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(Carbamidomethyl-Cys), 蛋氨酸选择可变修饰—氧化。
- 3) 最大允许的肽质量误差(Mass Tolerances), 与仪器性能和数据质量有关, 一般设为 ± 0.1 Da, 最大为 ± 0.5 Da, 质量误差愈小, 搜索的特异性愈高。
- 4) 不完全酶解位点数目(Missed cleavages): 每个肽允许有 2 个不完全裂解位点, 一般选 1(如果蛋白充分变性且酶解完全)。

- 5) 参考蛋白质表观分子量和等电点, 表观 PI 误差范围为 ± 0.5 pH, 表观 Mr 误差为范围为 $\pm 20\%$ 。一般情况下不选此项, 在判读结果时参考。
- 6) 物种选择: 限定物种。
- 7) 离子选择: $[M+H]^+$, 单同位素
- 8) 最少匹配肽片段规定为 4。

38.主要的公共数据库及网址

1. Mascot

<http://www.matrixscience.com/home.html>

2. MOWSE

<http://www.seqnet.dl.ac.uk/Bioinformatics/Webapp/mowse/>

3. Peptide Search

<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/>

4. Protein Prospector

<http://prospector.ucsf.edu/>

5. Prowl

<http://prowl.rockefeller.edu/>

6. EXPASY 中国镜像站点(BI peptident)

<http://www.pku.edu.cn>

39.蛋白质的序列分析流程

1. 蛋白质序列的检索

1) 从 NCBI 检索蛋白质序列

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?db=Protein>

2) 利用 SRS 系统从 EMBL 检索蛋白质序列

<http://srs.ebi.ac.uk/>

2. 蛋白质序列的基本性质分析

1) 蛋白质序列的信号肽分析

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

2) 蛋白质序列的跨膜区分析

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>

http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

3) 蛋白质序列的亚细胞定位分析

http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl/nnpsl_mult.cgi

3. 蛋白质序列的同源性分析

1) 基于 NCBI/Blast 软件的蛋白质序列同源性分析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

2) 基于 WU/Blast2 软件的蛋白质序列同源性分析

<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>

3) 基于 FASTA 软件进行蛋白质序列同源性分析

<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>

4) 两条蛋白质序列之间的同源性分析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>

4. 蛋白质序列的结构功能域分析

1) 蛋白序列的 motif 和 Prosite 分析

http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html

2) 蛋白质的结构功能域分析

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan/ipsearch.html>

5. 蛋白质家族分析及其进化树的构建(方案)

WEB RESOURCES FOR PROTEIN SCIENTISTS

<http://www.faseb.org/protein/docs/WWWResources.html>

蛋白质数据库(Protein databank, PD)由美国自然科学基金会、能源部和国立卫生研究院共同

投资建立，主要由 X-射线晶体衍射和核磁共振(NMR)测得的生物大分子三维结构所组成，用户可直接查询、调用和观察库中所收录的任何大分子三维结构。该数据库同时提供蛋白质序列及其三维空间晶体学原子坐标。其中受体-配体、抗原-抗体、底物-酶复合物等相互作用分子的共结晶图谱是基于同源比较的分子设计所需的最佳模型，因此 PDB 数据库为初步的蛋白质合理设计提供了重要的知识来源。由于 PDB 主要由生物大分子三维结构所组成，它具有以下几种功能：

- 1) 能够查找目的蛋白质的结构；
- 2) 可进行一级或高级结构的简单分析；
- 3) 与互联网上的其它一些数据库，如 GDB、GenBank、SWISS-PROT、PIR 等链接，从而可查询蛋白质的其它信息；
- 4) 可下载有关结构信息以供进一步使用。可通过关键词，PDB 标识符等进行查询；
- 5) 在序列分析中，PDB 主要可应用于蛋白质结构预测和结构同源性比较。其中 NRL-3D 数据库则是 PDB 数据库中所有蛋白质序列的信息。该数据库允许进行基于结构的序列比较，网址为：<http://www.rcsb.org/pdb/>。

40.聚丙烯酰胺凝胶的配制

表 1 配制 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所用溶液

溶液成分	不同体积(ml)凝胶液中各成分所需体积(ml)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6%								
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30%丙烯酰胺溶液	1	2	3	4	5	6	8	10
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								

水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30%丙烯酸酰胺溶液	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
水	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30%丙烯酸酰胺溶液	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯酸酰胺溶液	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯酸酰胺溶液	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5

TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	------

41.分子生物学常用溶液配制

1. 分子生物学常用贮存液的配制

1) 30%丙烯酰胺溶液

将 29 g 丙烯酰胺和 1 g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60 ml 的水中。加热至 37 °C 溶解之, 补加水至终体积为 100 ml。用滤器(0.45 μm 孔径)过滤除菌, 查证该溶液的 pH 值应不大于 7.0, 置棕色瓶中保存于室温。

丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可以通过皮肤吸收, 其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒, 但也应谨慎操作, 因为它还可能会含有少量未聚合材料。

一些价格较低的丙烯酰胺和双丙烯酰胺通常含有一些金属离子, 在丙烯酰胺贮存液中加入大约 0.2 体积的单床混合树脂(MB-1 Mallinckrodt), 搅拌过夜, 然后用 Whatman 1 号滤纸过滤以纯化之。

在贮存期间, 丙烯酰胺和双丙烯酰胺会缓慢转化成丙烯酰胺和双丙烯酸。

2) 40%丙烯酰胺

把 380 g 丙烯酰胺(DNA 测序级)和 20 g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 600 ml 的蒸馏水中。继续按上述配制 30% 丙烯酰胺溶液的方法处理, 但加热溶解后应以蒸馏水补足至终体积为 1 L。

见上述配制 30% 丙烯酰胺的说明, 40% 丙烯酰胺溶液用于 DNA 序列测定。

3) 放线菌素 D 溶液

把 20mg 放线菌素 D 溶解于 4 ml 100%乙醇中, 1:10 稀释贮存液, 用 100%乙醇作空白对照读取 OD₄₄₀ 值。放线菌素 D(分子量为 1255)纯品在水溶液中的摩尔消光系数为 21, 900, 故而 1 mg/ml 的放线菌素 D 溶液在 440 nm 处的吸光值为 0.182, 放线菌素 D 的贮存液应放在包有箔片的试管中, 保存于-20 °C。

放线菌素 D 是致畸剂和致癌剂，配制该溶液时必须戴手套并在通风橱内操作，而不能在开放于实验桌面上进行，谨防吸入药粉或让其接触到眼睛或皮肤。

药厂提供的作治疗用途的放线菌素 D 制品常含有糖或盐等添加剂。只要通过测量贮存液在 440 nm 波长处的光吸收确定放线菌素 D 的浓度，这类制品便可用于抑制自身引导作用。

4) 0.1 mol/L 腺苷三磷酸(ATP)溶液

在 0.8 ml 水中溶解 60 mg ATP，用 0.1 mol/L NaOH 调至 pH 值至 7.0，用蒸馏水定容 1 ml，分装成小份保存于 -70 °C

5) 10 mol/L 乙酸酐溶液

把 770 g 乙酸酐溶解于 800 ml 水中，加水定容至 1 L 后过滤除菌。

6) 10%过硫酸铵溶液

把 1 g 过硫酸铵溶解于终量为 10 ml 的水溶液中，该溶液可在 4 °C 保存数周。

7) BCIP 溶液

把 0.5 g 的 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸二钠盐(BCIP)溶解于 10 ml 100%的二甲基甲酰胺中，保存于 4 °C

8) 2×BES 缓冲盐溶液

用总体积 90 ml 的蒸馏水溶解 1.07 g 盐溶液 BES[N, N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸]、1.6 g NaCl 和 0.027 g Na₂HPO₄，室温下用 HCl 调节该溶液的 pH 值至 6.96、然后加入蒸馏水定容至 100 ml，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成小份，保存于 -20 °C。

9) 1 mol/L CaCl₂ 溶液

在 200 ml 蒸馏水中溶解 54 g CaCl₂·6H₂O，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 10 ml 小份贮存于 -20 °C。

制备感受态细胞时，取出一小份解冻并用蒸馏水稀释至 100ml，用 Nalgene 滤器(0.45μm 孔径)过滤除菌，然后骤冷至 0°C。

10) 2.5 mol/L CaCl₂ 溶液

在 20 ml 蒸馏水中溶解 13.5 g CaCl₂·6H₂O，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 1 ml 小份贮存于 -20 °C。

11) 1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)溶液

用 20 ml 0.01 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2)溶解 3.09 g DTT, 过滤除菌后分装成 1 ml 小份贮存于-20 °C。

DTT 或含有 DTT 的溶液不能进行高压处理。

12) 脱氧核苷三磷酸(dNTP)溶液

把每一种 dNTP 溶解于水至浓度各为 100 mmol/L 左右, 用微量移液器吸取 0.05 mol/l Tris 碱分别调节每一 dNTP 溶液的 pH 值 7.0(用 pH 试纸检测), 把中和后的每种 dNTP 溶液各取一份作适当稀释, 在下表中给出的波长下读取光密度计算出每种 dNTP 的实际浓度, 然后用水稀释成终浓度为 50 mmol/L 的 dNTP, 分装成小份贮存于-70 °C。

13) 0.5 mol/l EDTA(pH8.0)溶液

在 800 ml 水中加入 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2H₂O), 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0(约需 20 g NaOH 颗粒)然后定容至 1 L, 分装后高压灭菌备用。

EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将溶液的 pH 值调至接近 8.0, 才能完全溶解。

14) 溴化乙锭(10 mg/ml 溶液)

在 100 ml 水中加入 1 g 溴化乙锭, 磁力搅拌数小时以确保其完全溶解, 然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中, 保存于室温。

小心: 溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性, 使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套, 称量染料时要戴面罩。

15) 2×HEPES 缓冲盐溶液

用总量为 90 ml 的蒸馏水溶解 1.6 g NaCl、0.074 g KCl、0.027 g Na₂PO₄·2H₂O、0.2 g 葡聚糖和 1 g HEPES, 用 0.5 mol/l NaOH 调节 pH 值至 7.05, 再用蒸馏水定容至 100 ml。用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装成 5 ml 小份, 贮存于-20 °C。

16) IPTG 溶液

IPTG 为异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(分子量为 238.3), 在 8ml 蒸馏水中溶解 2 g IPTG 后, 用蒸馏水定容至 10 ml, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装成 1 ml 小份贮存于-20 °C。

17) 1 mol/L 乙酸镁溶液

在 800 ml 水中溶解 214.46 g 四水乙酸镁, 用水定容至 1 L 过滤除菌。

18) 1 mol/L MgCl₂ 溶液

在 800 ml 水中溶解 203.4 g MgCl₂·6H₂O, 用水定容至 1 L, 分装成小份并高压灭菌备用。

MgCl₂ 极易潮解, 应选购小瓶(如 100 g)试剂, 启用新瓶后勿长期存放。

19) β-巯基乙醇(BME)溶液

一般得到的是 14.4 mol/L 溶液, 应装在棕色瓶中保存于 4 °C。

BME 或含有 BME 的溶液不能高压处理。

20) NBT 溶液

把 0.5 g 氯化氮蓝四唑溶解于 10 ml 70%的二甲基甲酰胺中, 保存于 4 °C。

21) 酚/氯仿溶液

把酚和氯仿等体积混合后用 0.1 mol/L Tris·HCl(pH7.6)抽提几次以平衡这混合物, 置棕色玻璃瓶中, 上面覆盖等体积的 0.01 mol/l Tris·HCl(pH=7.6)液层, 保存于 4 °C。

酚腐蚀性很强, 并可引起严重灼伤, 操作时应戴手套及防护镜, 穿防护服。所有操作均应在化学通风橱中进行。与酚接触过的部位皮肤应用大量的水清洗, 并用肥皂和水洗涤, 忌用乙醇。

22) 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)溶液

用异丙醇溶解 PMSF 成 1.74 mg/ml(10 mmol/L), 分装成小份贮存于-20 °C。如有必要可配成浓度高达 17.4 mg/ml 的贮存液(100 mmol/L)。

PMSF 严重损害呼吸道粘膜、眼睛及皮肤, 吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。一旦眼睛或皮肤接触了 PMSF, 应立即用大量水冲洗之。凡被 PMSF 污染的衣物应予丢弃。

PMSF 在水溶液中不稳定。应在使用前从贮存液中现用现加于裂解缓冲液中。PMSF 在水溶液中的活性丧失速率随 pH 值的升高而加快, 且 25 °C 的失活速率高于 4 °C。pH 值为 8.0 时, 20 μmmol/l PMSF 水溶液的半寿期大约为 85 min, 这表明将 PMSF 溶液调节为碱性(pH>8.6)并在室温放置数小时后, 可安全地予以丢弃。

23) 磷酸盐缓冲溶液(PBS)溶液

在 800ml 蒸馏水中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄和 0.24 g KH₂PO₄, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4 加水定容至 1 L, 在 15 lbf/in²(1034×10⁵ Pa)高压下蒸气灭菌 20 min。保存于室温。

24) 1 mol/L 乙酸钾(pH=7.5)溶液

将 9.82 g 乙酸钾溶解于 90 ml 纯水中, 用 2 mol/L 乙酸调节 pH 值至 7.5 后加入纯水定容到 1 L, 保存于-20 °C。

25) 乙酸钾溶液(用于碱裂解)

在 60 ml 5 mol/L 乙酸钾溶液中加入 11.5 ml 冰乙酸和 28.5 ml 水, 即成钾浓度为 3 mol/L 而乙酸根浓度为 5 mol/L 的溶液。

26) 3 mol/L 乙酸钠(pH5.2 和 pH7.0)溶液

在 80 ml 水中溶解 408.1 g 三水乙酸钠, 用冰乙酸调节 pH 值至 5.2 或用稀乙酸调节 pH 值至 7.0, 加水定容到 1 L, 分装后高压灭菌。

27) 5 mol/L NaCl 溶液

在 800 ml 水中溶解 292.2 g NaCl 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

28) 10%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液

在 900 ml 水中溶解 100 g 电泳级 SDS, 加热至 68 °C助溶, 加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2, 加水定容至 1 L, 分装备用。

SDS 的微细晶粒易扩散, 因此称量时要戴面罩, 称量完毕后要清除残留在称量工作区和天平上的 SDS, 10% SDS 溶液无须灭菌。

29) 20×SSC 溶液

在 800 ml 水中溶解 175.3 g NaCl 和 88.2 g 柠檬酸钠, 加入数滴 10 mol/l NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0, 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

30) 20×SSPE 溶液

在 800 ml 水中溶解 17.5 g NaCl、27.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 7.4 g EDTA, 用 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.4(约需 6.5 ml 10 ml/L NaOH), 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

31) 100%三氯乙酸溶液

在装有 500 g TCA 的瓶中加入 227 ml 水, 形成的溶液含有 100%(M/V)TCA。

32) 1 mol/L Tris 溶液

在 800 ml 水中溶解 121.91 g Tris 碱, 加入浓 HCl 调节 pH 值至所需值。

应使溶液冷至室温后方可最后调定 pH 值, 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

如 1 mol/L 溶液呈现黄色, 应予丢弃并置备质量更好的 Tris。

尽管多种类型的电极均不能准确测量 Tris 溶液的 pH 值, 但仍可向大多数厂商购得合适的电极。

Tris 溶液的 pH 值因温度而异, 温度每升高 1 °C, pH 值大约降低 0.03 个单位。例如: 0.05 mol/L 的溶液在 5 °C、25 °C、和 37 °C 时的 pH 值分别为 9.5、8.9 和 8.6。

33) Tris 缓冲盐溶液(TBS)(25 mmol/l Tris)

在 800 ml 蒸馏水中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl 和 3 g Tris 碱, 加入 0.015 g 酚并用 HCl 调至 pH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1 L, 分装后在 15 lbf/in²(1.034×10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 min, 于室温保存。

34) X-gal 溶液

X-gal 为 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D 半乳糖苷。用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成的 20 mg/ml 的贮存液。保存于一玻璃管或聚丙烯管中, 装有 X-gal 溶液的试管须用铝箔封裹以防因受光照而被破坏, 并应贮存于 -20 °C。X-gal 溶液无须过滤除菌。

2. 常用抗生素溶液

抗生素	贮存液 ^a		工作浓度	
	浓度	保存条件	严紧型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	50 mg/ml(溶于水)	-20 °C	20 μg/ml	60 μg/ml
羧苄青霉素	50 mg/ml(溶于水)	-20 °C	20 μg/ml	60 μg/ml
氯霉素	34 mg/ml(溶于水)	-20 °C	25 μg/ml	170 μg/ml
卡那霉素	10 mg/ml(溶于水)	-20 °C	10 μg/ml	50 μg/ml
链霉素	10 mg/ml(溶于水)	-20 °C	10 μg/ml	50 μg/ml
四环素 ^b	5 mg/ml(溶于水)	-20 °C	10 μg/ml	50 μg/ml

a: 以乙醇为溶剂的抗生素溶液无须除菌处理。所有抗生素溶液均应放于不透光的容器保存。

b: 镁离子是四环素的拮抗剂, 四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基(如 LB 培养基)。