附录一主要仪器设备

1. 动态光散射仪（Dynamic light scattering，DLS）：英国Malvern公司，型号 Zetasizer Nanao ZS90；配备He-Ne光源，波长为633 nm，于90°C散射角下检测；
2. 透射电子显微镜（Transmission electron microscope，TEM）：日本电子株式会社，型号JEOL-2010，检测电压为200 kV；
3. 凝胶成像系统：上海天能科技有限公司，型号GIS 2009；
4. 分析天平：岛津（中国）有限公司，AUY 120；
5. 二氧化碳细胞培养箱：美国赛默飞世尔公司，Scientific 3110；
6. 垂直流双人超净工作台（Clean bench）：上海智诚分析仪器制造有限公司，ZHJH-1109B；
7. p H 酸度计：瑞士托利多公司，Delta 320；
8. 电子数显游标卡尺：都江堰市大阳量具有限公司，1131-201；
9. 激光共聚焦扫描显微镜（Confocallaser scanning microscope，CLSM）：德国卡尔蔡司公司，LSM 710；
10. 流式细胞仪（Flow cytometer）：美国BD Bioscience公司，FACSCalibur；
11. 生物化学发光检测仪：美国普洛麦格生物技术有限公司，GloMAX 96；
12. 冷冻高速离心机：美国赛默飞世尔公司公司，Thermo Scientific Biofuge Stratos；
13. 垂 直 电 泳 槽：上 海 天 能 科 技 有 限 公 司，V E-1 8 0；
14. 转移电泳槽：上 海 天 能 科 技 有 限 公 司，VE-186；
15. 超低温冷冻储存箱：中科美菱低温科技有限责任公司，DW-HL328；
16. 小型高速离心机：德国Eppendorf公司，型号为5418；

附录二　常规试剂

1. 胰蛋白酶：美国Invitrogen公司；
2. EDTA-4Na：美国Sigma-Aldrich公司；
3. 溴化乙锭（EB）：上海生工生物工程有限公司；
4. Gibco®细胞培养基冻干粉：美国Invitrogen公司；
5. HyClone胎牛血清：美国Thermo Scientific公司；
6. 氯仿：上海国药集团化学试剂有限公司；
7. *N,N*-二甲基甲酰胺（DMF）：上海国药集团化学试剂有限公司；
8. 二甲亚枫（DMSO）：美国Sigma-Aldrich公司；
9. 3-(4，5-二甲基噻唑-2-)-2，5-二苯基四唑溴盐（MTT）：上海生工生物工程有限公司；
10. 多聚甲醛：美国Sigma-Aldrich公司；
11. 抗荧光淬灭封片剂：美国S i g m a -A l d r i c h公司；
12. 蛋白酶抑制剂：美国罗氏公司；
13. BCA总蛋白浓度测定试剂盒：美国Thermo Scientific公司；
14. 过硫酸铵：上海生工生物工程有限公司；
15. 丙烯酰胺：美国Sigma-Aldrich公司；
16. *N,N'*-甲叉双丙烯酰胺：美国Sigma-Aldrich公司；
17. 聚偏二氟乙烯膜（PVDF膜）：美国Millipore公司；
18. 十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate，SDS）：上海生工生物工程有限公司；
19. 三羟甲基氨基甲烷（Tris(hydroxymethyl)metyl aminomethane，Tris base）：上海生工生物工程有限公司；
20. *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺（TEMED）：上海生工生物工程有限公司；
21. ECL显色系统Western Blot底物试剂盒：美国Pierce公司；
22. DAB显色液：北京中杉金桥生物技术有限公司；
23. 通用型两步法检测试剂盒：北京中杉金桥生物技术有限公司；
24. 两步法抗山羊检测试剂盒：北京中杉金桥生物技术有限公司。

附录三　主要溶液配制

1. 磷 酸 盐 缓 冲 液（P B S）：称取8 g N aCl、1.44 g Na2HPO4⋅7H 2O、0.2 g KCl和0.24 g KH2PO4 溶于1 L Milli-Q水中，过滤除菌后分装保存于4℃冰箱。
2. 培养基：将培养基干粉（Invitrogen，美国）溶于1 L Milli-Q超纯水中，按说明书加入适量NaHCO3，充分溶解后，将pH值调整为6.8左右，用0.22 μm 滤器过滤除菌，分装后保存在4℃冰箱。
3. 细胞完全培养基：在已配制好的培养基中加入10% 胎牛血清，混匀后保存在4℃冰箱。
4. 细 胞 裂 解 液（用于MTT实验）：称取20 g SDS，配制100 mL 50% DMF的水溶液后，然后往里面加入SDS，置于磁力搅拌器上搅拌溶解，分装后室温保存。
5. 1%琼脂糖凝胶：配制100 mL pH为8.0的TE缓冲液，溶解完全后加入质量 为1 g的 琼 脂 糖。加 热 溶 液 使 得 琼 脂 糖 充 分 溶 解，然后加入 终 浓 度为 万分之一的溴 化 乙 锭。将 配 制 好 的 溶 液 趁 热 倒 入 制 胶 槽 中，并在卡槽中 插 入 相 应 大 小 的 梳 子。
6. 4% 多 聚 甲 醛 溶 液：称取4 0 g多 聚 甲 醛，加 入 1 L P B S溶 液，并 加 入 适 量N aOH以促进多聚甲醛溶解。待 溶 解 完 全 后 ，将 溶 液 的 p H 值 调 节 为 7 .2，置于室 温 环 境 中 保 存。
7. We s t e r n B l o t相关试剂：
8. 细 胞 裂 解 液： 称 取0.79g T ris-base、0.88 g N a C l、0.02 g叠氮钠、0.10 g S D S、0.01 g Aprotin、1.00 g NP-40、0.50 g去氧胆酸钠，使用超纯水定 容 到1 0 0 m L，分装后置于超低温冰箱保存。
9. 30%丙烯酰胺溶液：称取0.8 g *N,N'*-甲叉双丙烯酰胺和29.2 g 丙烯酰胺。使用Milli-Q超纯水定容至100 mL，充分溶解后使用0.22 μm 滤器过滤，以除去杂质，4℃冰箱中避光储存。
10. 10% 过硫酸铵（APS）：称取10 mg过硫酸铵，然后溶解于1 mL Milli-Q超纯水中，4℃冰箱中保存。
11. SDS-PAGE电泳缓冲液：称3.02 g Tris-base，14.42 g甘氨酸和1 g SDS，用Milli-Q超纯水定容至1000 mL。
12. 5×上样缓冲液：称取2 g SDS，加入0.6 mL Tris-HCl溶液（1 M，pH 6.8）、5 mL 甘油（50%）、1 mL 1%溴酚蓝溶液，充分混匀后用Milli-Q水定容至10 mL，分装以后室温中储存，使用前按照5%的比例加入 β-巯基乙醇。
13. 转膜液（Transfer buffer）：取200 mL甲醇，加入SDS-PAGE电泳缓冲液定容至1000 mL。
14. 洗脱液（TBST）：称取1.21 g Tris-base和4 g NaCl，用Milli-Q超纯水定容至500 mL，然后用HCl将pH调为7.2，最后加入0.25 mL Tween-20，充分混匀后室温中保存。
15. 封闭液：称取2 g BSA或脱脂奶粉，然后加至40 mL的 TBST溶液中。
16. 常用SDS-PAGE浓缩胶(5% 丙烯酰胺)及分离胶配方表：

浓缩胶配方（6 mL）：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 990 μL |
| 1M Tris-HCl (pH 6.8) | 750 μL |
| ddH2O | 4.14 mL |
| 10% SDS | 60 μL |
| 10% APS | 60 μL |
| TEMED | 6 μL |

12%分离胶配方（10 mL）：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 4 mL |
| 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) | 2.5 mL |
| ddH2O | 3.3 mL |
| 10% SDS | 100 μL |
| 10% APS | 100 μL |
| TEMED | 6 μL |

10%分离胶配方（10 mL）：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 3.3 mL |
| 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) | 2.5 mL |
| ddH2O | 4 mL |
| 10% SDS | 100 μL |
| 10% APS | 100 μL |
| TEMED | 6 μL |
|  |  |

8%分离胶配方（10 mL）：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 2.7 mL |
| 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) | 2.5 mL |
| ddH2O | 4.6 mL |
| 10% SDS | 100 μL |
| 10% APS | 100 μL |
| TEMED | 6 μL |

1. 组化染色相关溶液配制：
2. 蛋白酶K储液：称取10 mg蛋白酶K，溶于5mL PBS中，分装后超低温冰箱中储存。
3. 穿膜液：配制浓度为0.1%的Triton X-100的穿膜液，然后按照0.1%的质量体积比加入柠檬酸钠固体，充分溶解后4℃冰箱中保存。
4. TUNEL抗体稀释液：将TUNEL检测试剂盒中的溶液A按照1:50的比例加至50 μL溶液B中，然后混合均匀，现配现用。
5. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液：称取3 g柠檬酸三钠和0.4 g柠檬酸，加入1 L Milli-Q超纯水，充分溶解后使用。

附录四常规实验方法

1. Western Blot

按照下面的步骤来完成Western Blot实验：

1. 样品制备：按照蛋白浓度测定结果，取出含100 μg蛋白的细胞裂解液，加水补足体积至10 μL，加入5 μL 5×电泳上样缓冲液，置于PCR仪上99°C加热处理10分钟，置冰上待用；
2. 蛋白胶配置：按照附录三中的方法配制浓度为12%的分离胶、5%的浓缩胶，厚度均为0.75 mm；
3. 上样：待配制好的蛋白胶完全凝固后，将梳子拔下并转入电泳槽中，加入约400 mL的SDS-PAGE电泳缓冲液，注意内槽一定要全部加满，然后把变性好的蛋白样品和marker按照分组顺序加入到各样品槽中；
4. 电泳：对应好正负极后，将电极插上，浓缩胶使用稳压70 V进行电泳；当蛋白条带到达浓缩胶和分离胶的界限时，使用电压90 V进行电泳；
5. 转膜：待溴酚兰刚跑出胶时，终止电泳。小心取下胶，在水下小心切去浓缩胶和两边未加样的泳道，同时在凝胶底部第一个上样槽切去一角，以显示电泳方向和加样方向。按照附录三的方法配制转膜液。裁剪大小合适的两张PVDF膜和十张滤纸。将PVDF膜置于无水甲醇中活化2 min，再放于超纯水中浸泡2 min，最后转至转膜液中平衡10 min以上。按照转膜装置的说明放置滤纸、PVDF膜、胶、滤纸，注意在放置的过程中不要引入气泡，尤其是膜与胶之间的气泡一定要除尽。转膜电流设置为恒流300 mA，转膜时间约20分钟；
6. 封闭：按照附录二的方法配制封闭液。转膜完成后，小心取出PVDF膜，在与胶相同的位置剪去一角，以显示电泳方向和吸附有蛋白的膜面。将PVDF膜置于小培养皿中，然后加入约15 mL 5%BSA溶液。置脱色摇床上室温封闭1 h；
7. 一抗孵育：按照1：1000的稀释比例配制一抗的5%BSA溶液。待封闭结束后，参照Marker条带判断β-actin及目的蛋白Ctr1所在位置，其中，β-actin为42 kDa，Ctr1蛋白为22 kDa。小心剪开膜，然后将膜分别置于不同的一抗稀释液中，脱色摇床上室温孵育1 h；
8. 二抗孵育：按照1：10000的稀释比例配制二抗的5%BSA溶液。待一抗孵育结束后，使用PBST洗涤膜3次，每次5分钟。然后将膜转到HRP标记的二抗稀释液中，脱色摇床上室温孵育约45分钟；
9. 曝光：二抗孵育结束后，使用使用PBST充分洗涤膜3次，每次5分钟。然后通过ECL显色反应将蛋白条带曝光在底片上；对曝光结果进行数据分析。
10. 组织病理学（H&E）染色

按照下面的方法对石蜡切片进行处理，并进行H&E染色：

1. 脱蜡：将石蜡切片置于烘箱中，设置温度为70℃，烘烤约90分钟，然后按照二甲苯、二甲苯、二甲苯、无水乙醇、无水乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70% 乙醇、PBS 的顺序，依次放置5分钟；
2. 染色：将切片放置于苏木精染液中进行染色，约20分钟后取出。在蒸馏水下冲洗，以去除浮色；
3. 返蓝：配制好0.1%的盐酸乙醇溶液，然后将切片放置其中浸泡数秒，取出后用蒸馏水冲洗，当切片颜色变为蓝色后停止；
4. 把切片放置于1%的伊红溶液中浸泡1分钟，然后取出用蒸馏水冲洗，以去除粘附在切片表面的伊红染料；
5. 分化颜色：按照70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇的顺序依次放入切片，各放置2分钟；
6. 脱色：将切片按照无水乙醇、无水乙醇的浸泡顺序进行脱色，每次放置8分钟；
7. 透明：配制无水乙醇与二甲苯等体积混合的溶液，然后将切片放置其中浸泡约5分钟，取出后按照二甲苯、二甲苯的浸泡顺序再次进行透明处理，每次放置5分钟；
8. 使用中性树脂进行封片，置于通风橱中进行晾干，待二甲苯挥发完全后，在倒置显微镜下观察实验结果。
9. TUNEL染色检测A549R肿瘤组织中细胞凋亡情况

按照下面的方法对石蜡切片进行处理，并进行TUNEL染色：

1. 脱蜡：将石蜡切片置于烘箱中，设置温度为60℃，烘烤约2 h，然后按照二甲苯、二甲苯、二甲苯、无水乙醇、无水乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70% 乙醇、PBS 的顺序，依次放置5分钟；
2. 将切片置于新鲜配置的3%的双氧水中，室温孵育约10分钟，然后使用PBS缓冲液洗涤3次，每次5分钟；
3. 使用20 mg/mL的蛋白酶K的PBS溶液孵育切片，37°C约15分钟，然后使用PBS缓冲液洗涤3次，每次5分钟；
4. 在切片上滴加TUNEL工作液，37℃孵育约60分钟，然后使用PBS缓冲液洗涤3次，每次5分钟；
5. 在切片上滴加1×DAPI染液，RT染色2 min，然后使用PBS缓冲液洗涤3次，每次5分钟；
6. 脱水：按照70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇 、无水乙醇、二甲苯、二甲苯的顺序，依次放入切片，各放置5分钟；
7. 使用抗淬灭剂进行封片，置于通风橱中进行晾干，待二甲苯挥发完全后，使用激光共聚焦显微镜观察实验结果。
8. PCNA染色检测乳腺癌原位肿瘤细胞增殖

按照下面的方法对石蜡切片进行处理，并进行PCNA蛋白染色：

1. 脱蜡：将石蜡切片置于烘箱中，设置温度为60℃，烘烤约2 h，然后按照二甲苯、二甲苯、二甲苯、无水乙醇、无水乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70% 乙醇、PBS 的顺序，依次放置5分钟；
2. 配制柠檬酸缓冲液，将切片浸泡其中，使用高压加热法修复抗原，保持高压90 s，自然降温，PBS缓冲溶液洗涤3次，每次5分钟；
3. 将切片置于新鲜配置的3%的双氧水中，室温孵育约10分钟，然后使用PBS缓冲液洗涤3次，每次5分钟；
4. 封闭：在切片上滴加非免疫来源的牛血清或者1%BSA的PBS溶液，37℃孵育10分钟；
5. 一抗孵育：按照1：200的稀释比例配制PCNA抗体的稀释液；甩去切片上的封闭液，每张切片上滴加约40 μL配置的PCNA抗体稀释液，然后将切片转移至湿盒，37℃孵育60分钟；
6. 二抗孵育：一抗孵育结束后，使用PBS缓冲液洗涤切片3次，每次5分钟。然后使用通用型二步法检测试剂盒进行二抗染色，室温染色10 min；
7. DAB显色：使用PBS缓冲液洗涤切片3次，每次5分钟，然后在切片上滴加DAB进行显色。注意在显微镜下观察显色过程，约显色2分钟左右以后，使用PBS漂洗切片以终止反应；
8. 复染：在切片上滴加苏木素，室温孵育约30秒，然后使用蒸馏水干净；
9. 脱水：按照70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇 、无水乙醇、二甲苯、二甲苯的顺序，依次放入切片，各放置5分钟；
10. 使用中性树脂进行封片，置于通风橱中进行晾干，待二甲苯挥发完全后，在倒置显微镜下观察实验结果。