

Western Blot (-)

一、实验目的

对高度耐药细胞株T24-RC48及T24野生型细胞株中的蛋白质进行抽提，为后续进行Western blot实验提供材料。

二、材料与试剂

2.1 材料

移液器：购自Eppendorf公司

印管：购自Axygen公司

无酶Tip枪头：购自Axygen公司

封口膜、冰盒、细胞刮刀

人膀胱移行细胞癌细胞株(T24) 高度耐药 T24-RC48 细胞株

2.2 试剂

PBS：购自美国Gibco公司

细胞裂解液：购自thermo fisher公司

蛋白酶抑制剂混合液、磷酸酶抑制剂混合液：均购自雅尊公司

无水酒精、去离子水

三、实验仪器

通风橱，-80度冰箱，台式低温高速离心机(购自 Eppendorf公司)

四、实验步骤

4.1 提取蛋白

4.1.1 观察细胞形态，吸去培养基，PBS清洗两遍，注意尽量不要冲去细胞。



图 1 吸去培养基

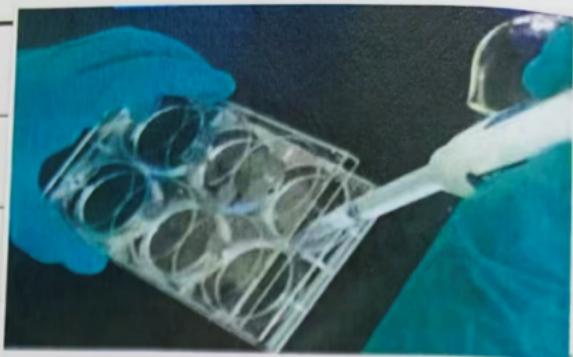


图 2 PBS 清洗

4.1.2 裂解液混合物配制：按照磷酸酶抑制剂混合物、蛋白酶抑制剂混合物说明书，将二者按1:100的比例与细胞裂解液混合（细胞裂解液1.5mL，磷酸酶抑制剂混合液15μL，蛋白酶抑制剂混合液15μL）。

4.1.3 裂解细胞：在六孔板中四个孔，每孔加100μL裂解液混合物，轻摇混匀，置于冰上5min。

4.1.4 收集细胞：用细胞刮刀，将裂解液混合物处理后的细胞刮下，四个孔的混合物分别装入对应的四个印管中，并做好标记。



图 3 细胞刮刀刮取细胞

4.1.5 离心：将上述4个印管放入离心机离心，1400×g，4℃，10min。

4.1.6 收集蛋白：将4个印管中的上清移取至4个新的离心管，做好标记，放-80℃保存。

4.2 制胶 4.2.1 将玻璃板清洗干净，夹好，检漏。

4.2.2 配制下层胶(分离胶)5ml: 下层胶溶液、下层胶缓冲液各2.5ml。加促凝剂60μl。加入下层胶, 用去离子水压平, 等待下层凝固。

4.2.3 配制上层胶(浓缩胶)1.5ml: 下层胶溶液、下层胶缓冲液各0.75ml。加促凝剂20μl。倒去去离子水, 加入上层胶, 插入齿梳, 等待上层胶凝固。
4.2.4 待胶凝固后, 用夹板夹好, 将其放入电泳槽, 用电泳液检漏, 不漏液则可继续倒入电泳液至没过齿梳部位。

五. 实验结果 5.1 得到经过相应处理后的细胞的蛋白样本。

5.2 制备出一块SDS-PAGE胶用于分离蛋白。



图4 所得蛋白样本

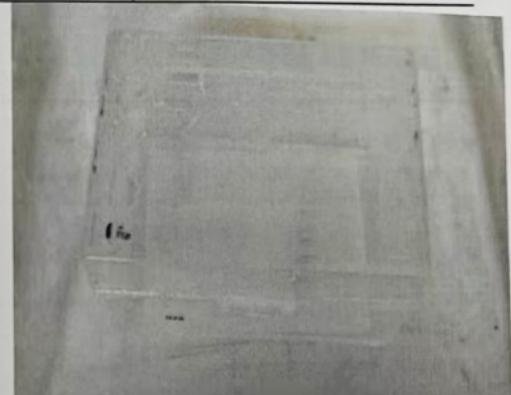


图5 所制得 SDS-PAGE 胶

六. 结果分析

本次实验成功从T24-RC48耐药细胞株及T24野生型细胞株中提取了蛋白样本, 并通过SDS-PAGE凝胶制备获得了结构清晰的所需胶。蛋白提取过程中, 裂解液与抑制剂的配比合理, 离心后上清液透明无沉淀, 表明蛋白裂解充分且杂质去除效果良好。后续通过Western Blot进一步检测目标蛋白的表达水平差异, 以验证耐药细胞株与野生型细胞株间的潜在分子机制。

(Western blot (二): 蛋白定量、敷一抗)

一、实验目的

通过WB实验对从RC48耐药细胞T24-RC48细胞株及野生型T24细胞株提取的蛋白中的相关蛋白进行鉴别和半定量分析，鉴别相关PD-1, VEGF2表达量的变化。

二、材料与试剂

2.1 材料

高度耐药T24-RC48细胞株及野生型T24细胞株中提取的蛋白。

制胶试剂盒购自雅赛公司 一抗(Tau, p-Tau抗体): 购自 protein tech 公司
一抗(BAD抗体, phospho-GSK3 beta抗体, GSK3 beta抗体, phospho-BAD抗体)
与内参(gadph抗体)均购自 Affinity Biosciences LTD 公司。

2.2 试剂

转膜液、剥离液、一抗稀释液、二抗稀释液、电泳液、封闭液、
TBST 均购自雅赛公司 显影A液、显影B液：购自 Millipore 公司。

三、实验仪器与设备

Biorad 制胶套装、电泳套装、转膜套装、离心机、摇床。

四、实验步骤

4.1 蛋白定量

将先前提取的蛋白样品取出，解冻后上机检测，结果如下图所示：

(Western blot (二): 蛋白定量、敷一抗)

一、实验目的

通过WB实验对从RC48耐药细胞T24-RC48细胞株及野生型T24细胞株提取的蛋白中的相关蛋白进行鉴别和半定量分析，鉴别相关PD-1, VEGF2表达量的变化。

二、材料与试剂

2.1 材料

高度耐药T24-RC48细胞株及野生型T24细胞株中提取的蛋白。

制胶试剂盒购自雅赛公司 一抗(Tau, p-Tau抗体): 购自 protein tech 公司

一抗(BAD抗体, phospho-GSK3 beta抗体, GSK3 beta抗体, phospho-BAD抗体)与内参(gadph抗体)均购自 Affinity Biosciences LTD 公司。

2.2 试剂

转膜液、剥离液、一抗稀释液、二抗稀释液、电泳液、封闭液、TBST 均购自雅赛公司 显影A液、显影B液：购自 Millipore 公司。

三、实验仪器与设备

Biorad 制胶套装、电泳套装、转膜套装、离心机、摇床。

四、实验步骤

4.1 蛋白定量

将先前提取的蛋白样品取出，解冻后上机检测，结果如下图所示：



图 1 蛋白定量结果

4.1.2 配制样品

按照每种蛋白样品上样 $15\mu\text{g}$, 蛋白样品体积: buffer = 1:4 的标准配置上样样本。每个蛋白样本对应一个管, 具体数据如表 4-1, 另外自己置两个管压平, 而后离心。

表 1 Western blot 上样量计算

编号	蛋白样本浓度 (ug/ml)	需加蛋白样品量 (ul)	Buffer 量 (ul)	上样总体积 (ul)
对照 1	3.272	4.28	1.07	5.35
对照 2	3.066	4.89	1.22	6.11
耐药 1	4.008	3.74	0.94	4.68
耐药 2	3.631	4.13	1.03	5.16

4.1.2 上样、开始电泳

① 拔出齿梳, 按照从左到右依次为: marker、样品 1~4 的顺序上样, 同时为避免边缘效应, 可在未加样的孔中加入等量的样品缓冲液。

② 开始电泳, 设置参数: constant V, 200V, 45 min.

4.2 转膜 ① 准备两块黑色滤网、两张滤纸、一块夹板, 放进白瓷盘, 加转膜液浸泡。

② 取适宜大小的 PVDF 膜, 移入白瓷盘转膜液中浸泡。

③ 取出电泳完成的胶, 按照三明治结构: 夹板黑色一面 + 黑色滤网 + 滤纸

十胶+PVDF膜+滤纸+黑色滤网+夹板透明一面，夹紧。

④将三明治入转膜槽，夹板黑色一面朝向槽的黑色一面，透明面对槽的红色一面，倒入转膜液，另整体系在水中转膜。

参数设置：

constant A,

250mA,

60min.

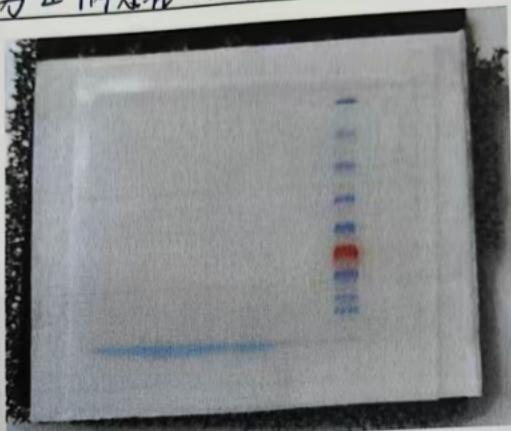


图2 转膜

4.3 封闭 ① TBS-T为溶剂，配制

5% 脱脂奶粉溶液。

② 将膜浸泡在5%的脱脂奶粉溶

液里，在摇床上40r/min, 60min.



图3 封闭

4.4 一抗孵育

① 将封闭好的膜用TBS-T洗三次，每次3min，摇床60r/min。

② 加入对应的一抗，分子量差异大的剪开孵育，分子量差异小的，采用剥离液剥离后重复孵育另外的抗体。

③ 在4℃冰箱中过夜孵育。

表2 各蛋白对应条带及二抗类型

表 2 各蛋白对应条带及二抗类型

编号	蛋白	对应显影条带分子量（估计范围）	对应二抗类型
1	phospho-GSK3 beta	46KD	anti-rabbit
2	phospho-BAD	24KD	anti-rabbit

五、结果分析

本次实验基本达到了预期目的，成功实现了对之前提取样品的蛋白定量。实验流程规范，操作误差较小：提取出的蛋白含量和纯度可以满足此次的 WB 实验。而从结果上看转膜后的样本呈现出均匀一条 marker，未观察到明显的扭曲叠加。实验结果符合预期为后续裹育二抗，显影提取做了良好充足的准备。

Western Blot(三): 增二抗、显影

一、实验目的 同Western Blot(二)

二、材料与试剂

2.1 材料与试剂

先前孵育好一抗的样品；制胶试剂盒购自雅梅公司。

2.2 试剂

二抗稀释液、电泳液、封闭液、TBST均自雅梅公司。

显影A液、显影B液购自Millipore公司。

三、实验仪器与设备

抗体孵育盒、摇床、曝光机。

四、实验步骤

4.1 二抗孵育 ①回收一抗，TBST清洗三次，每次摇床60rpm/min, 3min。

②加入显影A液、显影B液1:1配制显影液。

③加入显影液，将膜在Bio-Rad ChemiDoc XRS+化学发光凝胶成像仪上曝光。

五、实验结果

表1 各蛋白对应条带及二抗类型

编号	蛋白	对应显影条带分子量（估计范围）	对应二抗类型
1	phospho-GSK3 beta	46KD	anti-rabbit
2	phospho-BAD	24KD	anti-rabbit

由图可知显影不充分，且只有marker有显影痕迹，相关蛋白条带不可见。
失败原因可能由于洗涤不充分，孵育时孵育液不足，未使用BCA法测
量蛋白使得配置缓冲液错误等原因。

六、反思与改进

我们进行了深刻的反思，同时经过小组成员的讨论与分析，逐步发
掘出实验过程中，确保膜、滤纸、胶完全浸湿无气泡。在孵育抗体过
程中，进行抗体浓度梯度测试（尤其是一抗），找到最佳信噪比的
浓度；确保孵育液体积足够覆盖膜，优先选择4℃过夜（提高
特异性结合）。对于显影而言，优先解决最可能导致无信号/弱信号
的问题（抗体、转膜）。

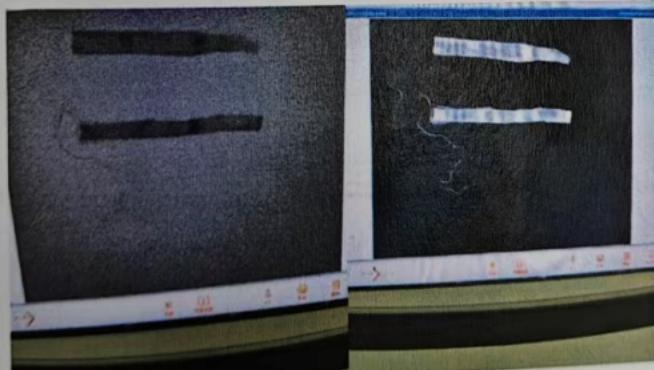


图 1 实验结果