

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

24. Western Blot 实验

一、实验目的

通过 Western Blot (WB) 实验，对从耐药 RC48 细胞系 T24-RC48 和野生型 T24 细胞系中提取的相关蛋白进行鉴定。使用先前孵育的一抗，并结合相应的二抗进行孵育和显影，以确定耐药蛋白 RBPJ、PD-1 和 VEGF2 的表达变化。

二、材料与试剂

2.1 材料

微量移液器：购自 Eppendorf

EP 管：购自 Axygen

无 RNase 移液器吸头：购自 AxyGen

封口膜、冰盒、细胞刮刀

人膀胱移行细胞癌细胞系 (T24)

高耐药 T24-RC48 细胞系

从高 RC48 耐药性 T24-RC48 细胞系和野生型 T24 细胞系中提取的蛋白质

制胶试剂盒：购自 Yase 公司

抗体 1 (Tau 抗体, p-Tau 抗体)：购自 Proteintech

一抗 (BAD 抗体, phospho-GSK3 beta 抗体, GSK3 beta 抗体, phospho-BAD 抗体) 及内参 (GAPDH 抗体)：购自 Affinity Biosciences LTD.

上一步骤中已孵育一抗的膜

2.2 试剂

PBS：购自美国 Gibco

细胞裂解液：购自 Thermo Fisher Scientific

蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物：购自 Yase 公司

乙醇（无水）、去离子水

转膜液、洗脱液、一抗稀释液、二抗稀释液、电泳液、封闭液、TBST：均购自 Yase 公司

显影液 A 和显影液 B：购自 Millipore

三、实验仪器

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

抗体孵育盒、摇床、化学发光成像仪

通风橱

-80 度冰箱

台式低温高速离心机：购自 Eppendorf

BioRAD 凝胶套装、电泳套装、转膜套装、离心机

四、实验步骤

4.1 蛋白质提取

4.1.1 观察细胞形态，吸弃培养基，用 PBS 洗涤两次，注意避免洗掉细胞。



图 1 吸弃培养基

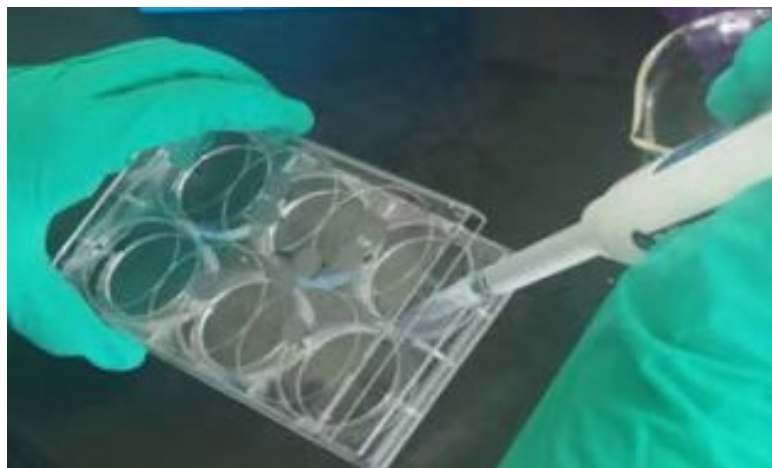


图 2 用 PBS 洗涤细胞

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

4.1.2 裂解混合液制备：根据磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物的说明书，将两者与细胞裂解液按 1:100 的比例混合（1.5ml 细胞裂解液，15ul 磷酸酶抑制剂混合物，15ul 蛋白酶抑制剂混合物）。

4.1.3 细胞裂解：向六孔板的四个孔中，每孔加入 100ul 裂解混合液，轻轻摇动混匀，冰上放置 5 分钟。

4.1.4 细胞收集：用细胞刮刀将经裂解混合液处理过的细胞刮下，并将四个孔的混合液分别装入对应的四个 EP 管中并标记。



图 3 用细胞刮刀刮下细胞

4.1.5 离心：将上述 4 个 EP 管放入离心机中进行离心， $14000\times g$ ， 4°C ，10 分钟。

4.1.6 蛋白质收集：将四个 EP 管中的上清液转移到四个新的离心管中，标记并保存在 -80°C 冰箱中。

4.2 制胶

4.2.1 清洗玻璃板，夹紧并检查是否漏液。

4.2.2 制备下层胶（分离胶）5ml：取 2.5ml 下层胶溶液和 2.5ml 下层胶缓冲溶液。加入 60ul 催化剂。加入下层胶，用去离子水压平，等待下层胶凝固。

4.2.3 制备上层胶（浓缩胶）1.5ml：取 0.75ml 下层胶溶液和 0.75ml 下层胶缓冲液。加入 20ul 催化剂。倒掉去离子水，加入上层胶，插入梳子，等待上层胶凝固。

4.2.4 凝胶凝固后，用夹子夹住放入电泳槽中。用电泳液检查是否漏液。若无漏液，继续倒

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

入电泳液直至没过梳子部分。

4.3 蛋白定量

取出之前提取的蛋白质样品，解冻并在机器上进行检测。结果如下图所示。



图 4 蛋白定量结果

4.3.1 样品制备：根据每个蛋白样品的上样量为 15μg 的标准配置，按蛋白质样品体积：缓冲液 = 1:4 的比例上样。每个蛋白质样品对应一管，具体数据见表 4-1。此外，用两管进行平衡配平。配置完成后，对样品进行离心。

表 1 Western Blot 上样量计算

编号	蛋白样品浓度 (μ g/ μ l)	蛋白样品体积 (μ L)	缓冲液体积 (μ l)	总体积 (μ l)
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

4.3.2 上样并开始电泳：

- ① 拔出梳子，从左到右按 marker、样品 1-4 的顺序上样。同时，为避免边缘效应，可在未上样的孔中加入等量的样品缓冲液。
- ② 开始电泳并设置参数：恒压 V，200V，45 分钟。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

4.4 转膜

- ① 准备两张黑色滤网、两张滤纸和一块夹板。将它们全部放入白色瓷盘中，用转膜液浸泡。
- ② 取大小合适的 PVDF 膜，浸入白色瓷盘中的转膜溶液中。
- ③ 取出完成电泳的凝胶，以三明治结构夹好：夹板黑面 + 黑色滤网 + 滤纸 + 凝胶 + PVDF 膜 + 滤纸 + 黑色滤网 + 夹板透明面。
- ④ 将夹好的三明治结构放入转膜槽中，夹板黑面对转膜槽黑面，透明面对红面，倒入转膜液，并将整个装置置于冰浴中进行转膜。

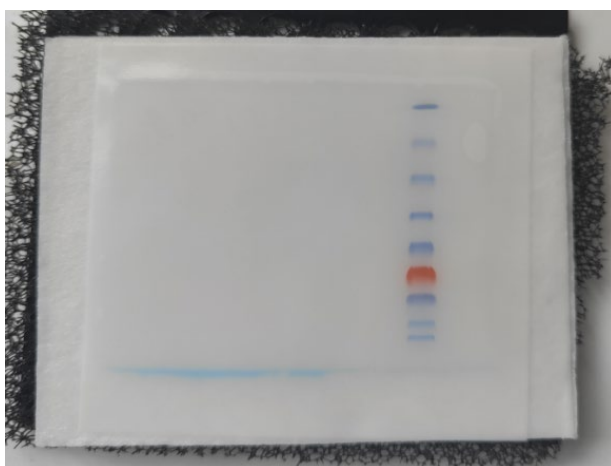


图 5 转膜

4.5 封闭

- ① 以 TBST 为溶剂，配制 5% 脱脂奶粉溶液。
- ② 将膜浸入 5% 脱脂奶粉溶液中，在摇床上以 40r/min 的速度摇动 60 分钟。



2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

图 6 封闭

4.6 一抗孵育

- ① 用 TBST 洗涤封闭后的膜 3 次，每次 3 分钟，摇床速度 60r/min。
- ② 加入相应的一抗。对于分子量差异较大的目标蛋白，可在孵育前将膜切开；对于分子量相近的目标蛋白，可用洗脱液剥离膜后，再用另一种抗体重新孵育。
- ③ 在 4℃ 冰箱中孵育过夜。

表 2 目标蛋白、预期条带大小及对应二抗

编号	蛋白	预期条带分子量 (估算范围)	对应二抗类型
1	phospho-GSK3 beta	46KD	抗兔
2	phospho-BAD	24KD	抗兔

4.7 二抗孵育

- ① 回收一抗溶液以备后续可能使用，用 TBST 洗涤 3 次，摇床速度 60rpm/分钟，每次 3 分钟。
- ② 按下表加入相应的二抗。每种蛋白对应的二抗见表 3。
- ③ 在摇床上孵育膜，40rpm/分钟，60 分钟。

表 3 目标蛋白、预期条带大小及对应二抗

编号	蛋白	预期条带分子量 (估算范围)	对应二抗类型
1	phospho-GSK3 beta	48KD	抗兔
2	phospho-BAD	24KD	抗兔

五、实验结果

Western Blot 蛋白表达分析表明：与对照组相比，RBPJ 蛋白在中等耐药组 ($P < 0.05$) 和高耐药组 ($P < 0.0001$) 中的表达水平均显著升高。相反，各耐药组中的 VEGF 水平与对照组相比均无显著变化。此外，PD-L1 蛋白在中等耐药组中的表达也显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

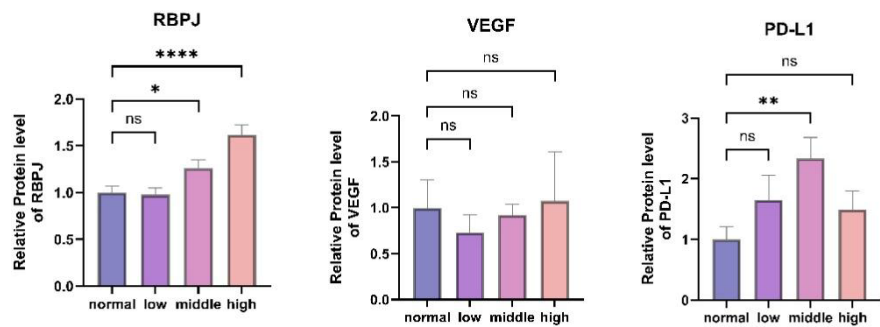


图 7 不同组别间目标蛋白的相对表达水平 (ns, 不显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

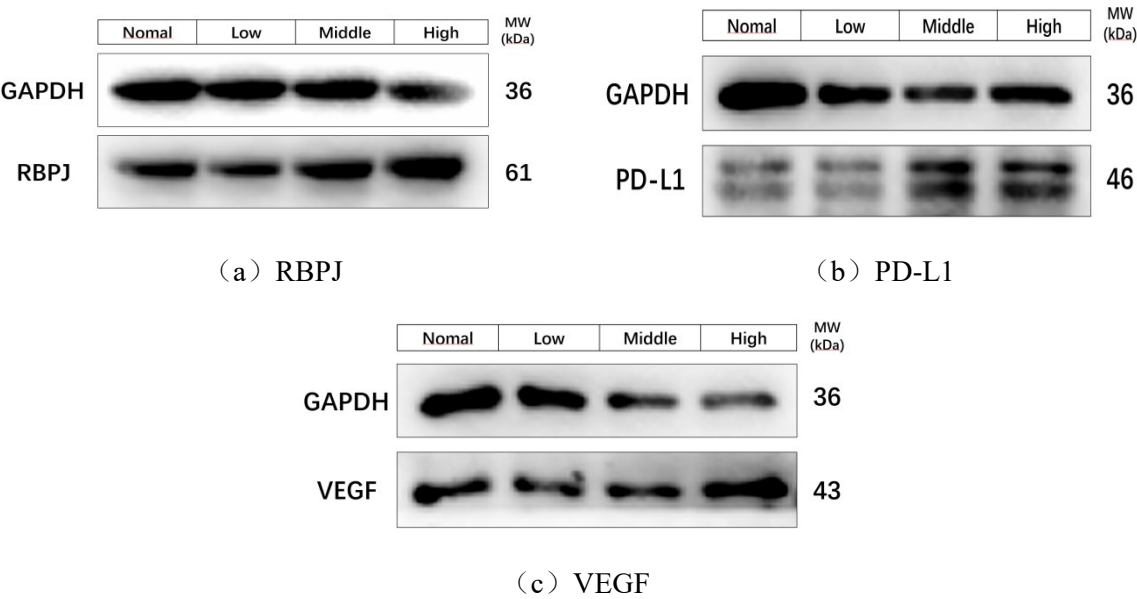


图 8 各组别目标蛋白的代表性 Western Blot 图像

七、结果分析

RBPJ 的表达在中等耐药组 ($P < 0.05$) 和高耐药组 ($P < 0.0001$) 中均显著上调。该结果清晰地证实了 RBPJ 在耐药模型中被成功激活, 其表达水平与耐药程度呈正相关, 为后续机制研究奠定了坚实基础。

与预期不同, 在各耐药组中, 细胞内的 VEGF 相对蛋白表达水平与对照组相比均未呈现显著上升。这一现象可能与 VEGF 作为一种主要分泌蛋白的特性有关。由于 Western Blot 检测的是细胞内蛋白, 它可能无法准确反映分泌到细胞外环境中的 VEGF 蛋白动态。此结果得到了组学数据的侧面支持: 在转录组测序中, VEGF mRNA 虽呈现上调趋势, 但在蛋白质组

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 7 月 13 日 18:00 — 2025 年 9 月 14 日 21:30

学数据中却未能有效检测到该蛋白。这进一步提示细胞内 VEGF 的稳态水平可能因其持续分泌而维持不变。因此，为了更全面地评估 VEGF 在耐药过程中的作用，后续研究有必要收集细胞培养上清液进行分析（例如通过 Western Blot 或更灵敏的 ELISA），并结合血管形成实验等功能验证，以获得更科学的结论。

PD-L1 的表达在中等耐药组中显著上调 ($P < 0.01$)，但在高耐药组中未达到统计学显著性。为确保该结果的可靠性并排除偶然因素，需要对 PD-L1，特别是高耐药组，进行进一步的独立实验重复。