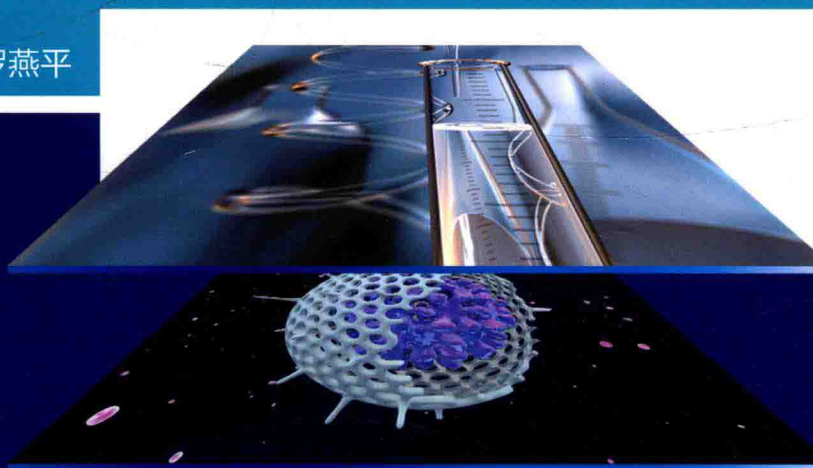


KANGZHONGLIU YAOWU
YAOLIXUE SHIYAN ZHINAN

抗肿瘤药物 药理学实验指南

——符合CFDA临床研究申报要求的实验方法

主 编 徐寒梅
副主编 李梦玮 罗燕平



中国医药科技出版社

抗肿瘤药物药理学实验指南

——符合CFDA临床研究申报要求的实验方法

主 编	徐寒梅		
副主编	李梦玮	罗燕平	
编 委	(以姓氏笔画为序)		
	王文静	王佳艺	白丽森
	任印玲	刘振东	杨永晶
	李 策	李永兵	何俊劲
	张 弛	张晓娟	陈巨冰
	聂彩辉	浦春艳	程 涛

中国医药科技出版社

内 容 提 要

在新药的研究与开发过程中,首先需要对先导分子进行成药性评价,只有安全、有效、质量可控,加之药物代谢动力学评价结果符合新药开发特征,才可以进行系统的临床前研究。实验工作人员在进行抗肿瘤多肽新药研究和开发过程中,参照《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》建立了适合于蛋白质多肽类药物的药代动力学评价方法。本书中的实验方法真实、可靠,能够为从事肿瘤治疗药物、蛋白质多肽类药物研究与开发的科研人员、博士及硕士研究提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

抗肿瘤药物药理学实验指南:符合CFDA临床研究申报要求的实验方法/徐寒梅主编. —北京:中国医药科技出版社,2015.10

ISBN 978-7-5067-7822-0

I. ①抗… II. ①徐… III. ①抗癌药-药理学-实验-指南 IV. ①R979.1-62

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第229817号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 710×1000mm^{1/16}

印张 8^{1/4}

字数 121千字

版次 2015年10月第1版

印次 2015年10月第1次印刷

印刷 三河市百盛印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7822-0

定价 24.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

在新药的研究与开发过程中，首先需要对先导分子进行成药性评价，只有安全、有效、质量可控，加之药物代谢动力学评价结果符合新药开发特征，才可以进行系统的临床前研究。新药研究与开发与基础研究不同，无论化学新药、生物技术新药还是中药创新药物的临床前研究均需要按照国家颁布的各项临床前研究指导原则进行评价。

针对抗肿瘤药物的临床前研究，国家颁布了《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》。在进行抗肿瘤多肽新药研究和开发过程中，参照《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》，结合多肽类药物特征，建立了系统的对肿瘤治疗药物体内活性评价方法，以及适合于蛋白多肽类药物的药代动力学评价方法。对药物分子机制初步研究方法以及系统的蛋白质多肽药物药学评价方法，因不同的药物药学研究内容要求不同，且涉及药物的商业秘密，本书不阐述此部分研究内容。

本书内容的是实验室工作人员 6 年实验经验的积累，书中的实验方法真实、可重复。每章节的〔注意事项〕能够提醒新入手的学生在实验中可能出现的问题。希望本书能够为从事肿瘤治疗药物、蛋白质多肽类药物研究与开发的科研人员、博士及硕士研究生提供参考。

第一章 分子机制研究	1
第一节 基因芯片技术初步筛选药物作用的信号通路	2
一、实验目的及原理	2
二、实验材料	2
三、实验方法	2
四、实验结果	6
第二节 蛋白质印迹法	8
一、实验目的及原理	8
二、实验材料	9
三、实验方法	11
第三节 慢病毒的构建、包装与转染	20
一、实验目的及原理	20
二、实验材料	21
三、实验方法	22
第四节 流式细胞仪分析药物与靶点的结合情况	27
一、实验目的及原理	27
二、实验材料	27
三、实验方法及步骤	28
第二章 肿瘤治疗药物体外模型研究方法	32
第一节 细胞培养实验基本操作	33
一、实验目的及原理	33
二、实验材料	33
三、实验方法	33
第二节 MTT 法检测细胞增殖实验	47
一、实验目的及原理	47
二、实验材料	47
三、实验方法	47

第三节 体外肿瘤转移模型	50
一、细胞侵袭实验	50
二、细胞黏附实验	54
三、细胞骨架检测实验	56
四、明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 (MMPs) 活性	59
第四节 血管生成模型	61
一、HUVEC 细胞迁移实验	61
二、HUVEC 细胞小管形成实验	65
三、大鼠动脉环血管形成实验	67
第三章 肿瘤药治疗物体内模型研究方法	70
第一节 鸡胚绒毛尿囊膜实验	71
一、实验目的及原理	71
二、实验材料	71
三、实验方法	72
第二节 实验动物的给药剂量及其计算方法	74
一、实验目的及原理	74
二、实验方法	74
第三节 实验动物编号和分组方法	77
一、实验目的及原理	77
二、实验方法	77
第四节 CFDA 要求——抗肿瘤药物药效学指导原则	79
一、基本原则	79
二、体外抗肿瘤活性试验	80
三、体内抗肿瘤试验	81
四、抗肿瘤药物的特殊要求	85
第五节 C57BL/6 黑鼠移植瘤 B16F10 的抗肿瘤药效实验	89
一、实验目的	89
二、实验材料	89
三、实验方法	89
第六节 血管抑制剂联合奥沙利铂对肝癌裸鼠移植瘤模型的药效实验研究	91
一、实验目的及原理	91
二、实验材料	91
三、实验方法	92

第七节 乳腺癌肺转移模型的建立	96
一、实验目的及原理	96
二、实验材料	96
三、实验方法	96
第四章 蛋白多肽药物临床前药物代谢动力学研究	99
第一节 ELISA 法检测蛋白多肽及 PEG 修饰蛋白多肽药物浓度的方法学建立	100
一、实验目的及原理	100
二、实验材料	102
三、实验方法	103
第二节 药代动力学参数测定及药物组织分布与排泄	108
一、实验目的及原理	108
二、实验材料	109
三、实验方法	109
四、实验结果	111
第三节 体外探针法测定 L-02 细胞体系中药物对人 CYP 亚型活性影响	114
一、实验目的及原理	114
二、实验材料	115
三、实验方法	115
四、实验结果	118

肿瘤治疗药物的作用机制复杂，细胞水平上药物可以通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移、分化、凋亡等方面发挥抗肿瘤作用；分子水平上可以通过影响核酸生物合成包括破坏 DNA 结构和功能、抑制转录过程阻止 RNA 合成，影响蛋白质合成与功能，影响体内激素平衡等发挥抗肿瘤活性。近些年来科学家还发现有的药物可以通过组织水平抑制肿瘤新生血管生成，从而阻断肿瘤细胞的营养和氧气而达到抗肿瘤的效果。

以整合素为靶点的抗肿瘤多肽分子主要通过抑制内皮细胞迁移和血管新生发挥抗肿瘤作用。由于所设计的分子中加入整合素配体序列，因此在机制研究中，首先通过流式细胞仪分析其是否与已知的靶点相结合及结合程度；然后采用基因芯片对其结合靶点相关的信号通路进行初步筛选；在此基础上，通过 Western blot 技术验证基因芯片结果的可靠性，从而获得药物的初步分子机制信息，以上是从正面获得药物作用的分子机制的方法。同时还要从反面加以验证，比如采用 RNAi 技术，将药物作用信号通路中某个关键节点的分子进行基因敲除，观察药物作用的活性变化及其他相关信号分子的变化情况。

目前药物作用机制研究的手段不断更新，进行药物开发时，对某种药物分子的机制研究应尽量结合分子生物学、细胞生物学的最新研究手段和技术，以阐明药物的靶点及相关信号转导通路，这对于药物上市及上市后的临床应用将提供重要参考。

第一节 基因芯片技术初步筛选药物作用的信号通路

一、实验目的及原理

目的：为确定药物的胞内信号通路及关键节点分子，首先需要通过基因芯片进行初筛，根据结果进一步验证。目前与信号通路相关的基因芯片发展较成熟，可以根据不同的用途选择合适的基因芯片。

原理：基因芯片又称为 DNA 微阵列 (DNA microarray)，是在基因探针的基础上研制出的。根据碱基互补的原理，利用基因探针识别基因混合物中的特定基因。它将大量探针分子固定于支持物上，然后与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号的强度及分布进行分析。基因芯片通过应用平面微细加工技术和超分子自组装技术，把大量分子检测单元集成在一个微小的固体基片表面，可同时对大量的核酸和蛋白质等生物分子实现高效、快速、低成本的检测和分析。

二、实验材料

1. 实验器材

CO₂ 细胞培养箱，倒置显微镜，超净台，微型漩涡混合仪，台式冷冻型离心机，数显恒温水浴锅，离心管，6 孔细胞培养板，PCR 仪，紫外分光光度计。

2. 实验试剂

磷酸盐缓冲液 (PBS)，三氯甲烷，异丙醇，乙醇，无 RNase 的超纯水，TRIZOL 试剂盒。

3. 受试细胞

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)。

三、实验方法

以下主要以药物对 HUVEC 细胞信号通路的影响为例。

(一) 样品制备及 RNA 的提取

(1) HUVEC 细胞在 6 孔板中培养至 80% 以上融合后，用适量浓度的药物 (test 组) 或 PBS (control 组) 在 37 ℃ 处理 24 h。

(2) 两组样品各取 1×10^7 个细胞，加入 TRIZOL 裂解液，室温静置

5 min。

(3) 每 1 ml 的 TRIZOL 试剂匀浆的样品中加入 0.2 ml 的三氯甲烷, 用力振荡使溶液充分乳化, 呈透明胶质样, 室温放置 3 min。

(4) 4 ℃, 12000 r/min, 离心 15 min。

(5) 小心取出离心管, 吸取体积约为 TRIZOL 试剂起始剂量 1/2 的上清至另一不含 RNA 酶的离心管。

(6) 在上清中加入异丙醇, 轻轻颠倒混匀离心管内液体, 室温放置 30 min。

(7) 4 ℃, 12000 r/min, 离心 10 min。

(8) 小心吸弃上清, 缓慢沿管壁加入 75% 乙醇 1 ml, 轻轻颠倒洗涤离心管管壁, 小心吸弃乙醇。

(9) 再加入 75% 乙醇 1 ml, 在涡旋振荡器上短暂涡旋, 使沉淀悬浮于 75% 乙醇中。

(10) 4 ℃, 7500 r/min, 离心 5 min。

(11) 小心吸弃上清, 短暂离心, 吸弃全部上清, 在超净台中干燥 RNA 沉淀 5 min 至乙醇挥发。

(12) 加入适量无 RNA 酶的超纯水, 轻轻吹打沉淀, 使 RNA 悬浮于超纯水中, 50 ℃ 保温 10 min, 待 RNA 沉淀完全溶解后置于 -70 ℃ 保存。

(二) RNA 样品处理

配制反应液见表 1-1。

表 1-1 RNA 样品消化液配制

种类	含量
RNA	20 μg
10 × DNase I 缓冲液	10 μl
DNase	5 μl
RNase Inhibitor	1 μl
无 RNA 酶的水	至 100 μl
总体积	100 μl

将配制好的消化液加入 RNA 样品中, 37℃ 温育 30min, 使 DNase 与样品充分反应, 以去除 RNA 样品中可能含有的 DNA。

(三) RNA 纯化

采用 RNeasy® MinELute™ 纯化试剂盒 (Qiagen) 按照说明书进行纯化。

(四) 质量检测

(1) 取 $1\ \mu\text{l}$ 总 RNA 样品, 用无 RNA 酶的超纯水稀释 20 倍, 用紫外分光光度计进行定量。

(2) 取 $1\ \mu\text{g}$ 总 RNA 样品, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 检测总 RNA 样本的质量。

(3) 浓度测定: $260\ \text{nm}$ 处读值为 1 时表示 $40\ \text{ng RNA}/\mu\text{l}$ 。样品 RNA 浓度计算公式为: $A_{260} \times 40\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 。

(4) 纯度检测: 用紫外分光光度法, RNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 的比值是一种 RNA 纯度检测方法, 比值范围在 $1.8 \sim 2.1$ 。

(五) 合成 cDNA

(1) 配制溶液 (表 1-2)。

表 1-2 cDNA 合成反应液配制

种类	含量
$500\ \text{ng}/\mu\text{l}$ oligo (dT) 18	$1\ \mu\text{l}$
总 RNA	$1.5\ \mu\text{g}$
$10\ \text{mmol/L}$ dNTP Mix	$1\ \mu\text{l}$
灭菌水	至 $13\ \mu\text{l}$

(2) $65\ ^\circ\text{C}$ 水浴 5 min 后, 冰浴放置至少 1 min。

(3) 短暂离心后, 在离心管中依次加入反应液 (表 1-3)。

表 1-3 反应液配制

种类	含量
$5 \times \text{First-Strand Buffer}$	$4\ \mu\text{l}$
$0.1\ \text{mmol/L}$ DTT	$1\ \mu\text{l}$
RNase Inhibitor	$1\ \mu\text{l}$
SuperScript. III RT	$1\ \mu\text{l}$

(4) 移液枪轻轻吸打几次, 使其充分混合。

(5) $50\ ^\circ\text{C}$ 温育 60 min。

(6) $70\ ^\circ\text{C}$ 温育 15 min 使酶失活。

(7) 每 $20\ \mu\text{l}$ cDNA 加 $91\ \mu\text{l}$ 灭菌水混匀, 置冰浴备用或 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。

(六) 实时定量 PCR

1. 样品准备 (表 1-4)

表 1-4 样品混合液配制

种类	含量
2 × SuperArray PCR master mix (含 SYBR 绿色荧光染料)	550 μl
已稀释的 cDNA	102 μl
ddH ₂ O	448 μl
总体积	1100 μl

2. 加样

- (1) 小心打开 PCR Array 上的膜。
- (2) 加 10 μl 混合液到 PCR Array 对应的每个孔中。
- (3) 小心盖上盖子密封 PCR Array。
- (4) 在设置 PCR 程序前, 将准备好的 PCR Array 置于冰浴上。
- (5) 实时定量 PCR 程序设置完成后, 将 PCR Array 置于实时定量 PCR 仪内进行反应。

所设置的程序如表 1-5。

表 1-5 PCR 反应程序

循环数	时间	温度
1	10 min	95 °C
40	15 s	95 °C
	1 min	60 °C

3. 数据分析

采用 $\Delta\Delta C_t$ 方法

- (1) 计算每个处理组中的每个通路相关基因的 ΔC_t 。

ΔC_t (实验组) = 实验组每个基因平均 C_t 值 - 管家基因的评估 C_t 值

ΔC_t (test) = average C_t - average of housekeeping genes C_t for test array

ΔC_t (对照) = 对照组每个基因平均 C_t 值 - 管家基因的平均 C_t 值

ΔC_t (control) = average C_t - average of housekeeping genes C_t for control array

- (2) 计算 2 组 PCR Array 中每个基因的 $\Delta\Delta C_t$ 。

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (test) - ΔC_t (control)

- (3) 计算 test 组和 control 组的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值并分析 test 与 control 对应基因的表

达差异。当基因信号的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 >1 时,判定为该基因在 test 组表达上调; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值 ≤ 1 时,判定为该基因在 test 组表达下调。另外,筛选出差异较大的基因进行基因分类 (GO) 分析,探讨药物作用后主要影响的信号通路。

四、实验结果

1. 总 RNA 的提取

所提取的细胞总 RNA 经纯化后进行琼脂糖凝胶电泳见图 1-1 (A), 当出现 28s、18s 和 5s 三条带, 且 28s 带比 18s 的带亮 2 倍, 无拖尾现象, 证明所提取的总 RNA 没被降解, 完整性好; 用紫外分光光度计测定 RNA 溶液的 OD 值, 计算 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.1 内, 说明提取的 RNA 样品纯度高, 符合下一步检测要求。

2. 扩增曲线

S 形曲线表明 PCR 反应正常进行, 有反应产物产生, 因此能检测出荧光信号, 且信号强度呈指数增长后进入平台期; Ct 值集中在 15 ~ 35 Ct 之间, 处于实时定量 PCR 的 Ct 值的可信值区间 (图 1-1B 和 C)。

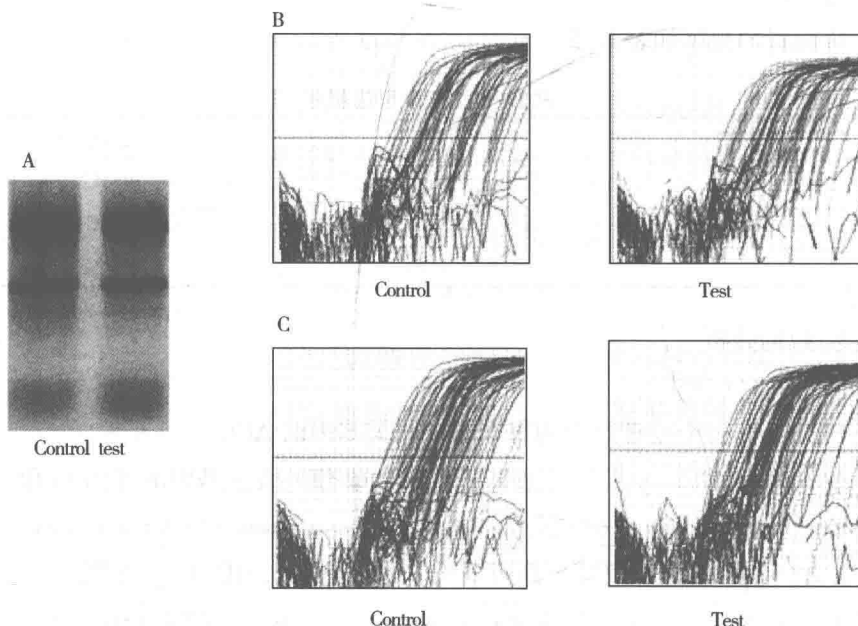


图 1-1 样品总 RNA 的 RT²-PCR 电泳结果 (A);
PCR 芯片检测样品中不同基因的表达量变化 (B, C)

3. 差异表达基因散点图分析

分别用所需的相关基因芯片对相关基因表达的差异情况进行分析,并用散点分布趋势进行直观判断(图1-2 A和B)。图1-2中45°对角线为 $\lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) = 1$, 两侧两条分界线分别为 $\lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) = 4$ 和 $\lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) = -4$ 。图1-2中沿45°对角线方向分布的基因,表示其在两样本中表达量基本相同。距对角线的垂直距离越远,表示该基因在两样本中的表达差异越大。图中上分界线上方的点代表 $\lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) \geq 4$, 即与空白对照组相比药物作用后的HUVEC中表达上调大于4倍的基因;而下分界线右下的点代表 $\lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) \leq -4$, 即与空白对照组相比药物作用后的HUVEC中表达下调超过4倍的基因;分界线中间的点代表 $-4 < \lg(2^{-\Delta\Delta Ct}) < 4$, 即实验组与对照组相比表达量比较接近的基因。由图1-2中可看出,表达下调的基因远远多于上调基因,其中偏离对角线越远的基因越值得我们关注。

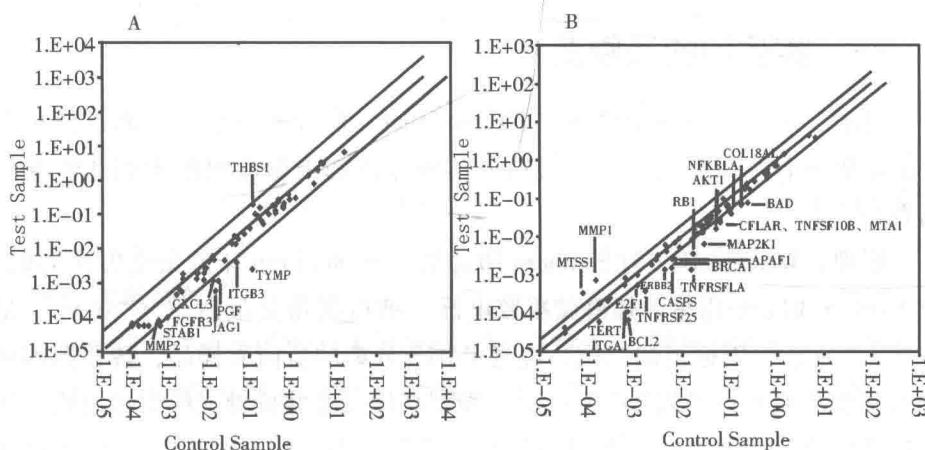


图1-2 84个血管生成相关基因和84个肿瘤相关基因的相对表达量比较, X-空白样本, Y-检测样本

4. 差异基因的生物信息学分析

在基因芯片的相关基因中找取表达量差异变化至少有2倍的信号分子进行研究,整理出相关的上调基因和下调基因,并且根据研究需要挑选相关的基因进行进一步验证,通过Western Blot确定相关通路。

【本节注意事项】

(1) TRIZOL试剂含有苯酚,具有毒性和刺激性,操作时应做好防护措施。

(2) TRIZOL 的用量应根据培养板面积而定,不取决于细胞数。TRIZOL 加量不足可能导致提取的 RNA 存在 DNA 污染。

(3) RNase 污染的主要来源是操作过程中手和空气中的浮尘,注意配戴手套,样品尽可能密封好。

(4) 细胞裂解必须充分且操作迅速,裂解不全会降低最后得率,因为一部分 RNA 会残留在未裂解的细胞中。细胞裂解之后保证看不见颗粒状物质(结缔组织和骨除外)。在清洗和裂解细胞时最好在低温下操作,防止在操作过程中释放的内源 RNase 降解 RNA。

(聂彩辉)

第二节 蛋白质印迹法

一、实验目的及原理

目的:掌握蛋白质印迹法(Western Blot)的操作方法,并通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。

原理:Western Blot 与 Southern 印迹杂交或 Northern 印迹杂交方法类似,但 Western Blot 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品,转移到固相载体(例如硝酸纤维素 NC 膜)上,固相载体以非共价键式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体进行免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体反应,经过底物显色或放射自显影,检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。

Western Blot 显色的方法主要有以下 4 种:放射自显影、底物化学发光 ECL、底物荧光 ECF 和底物 DAB 呈色。现常用的有底物化学发光 ECL 和底物 DAB 呈色,其中底物化学发光 ECL 试剂盒,操作较简单,原理如下(二抗用 HRP 标记):反应底物为过氧化物和鲁米诺(发光氨),如遇到 HRP,即发光,可使胶片曝光,并可洗出条带。详见图 1-3。

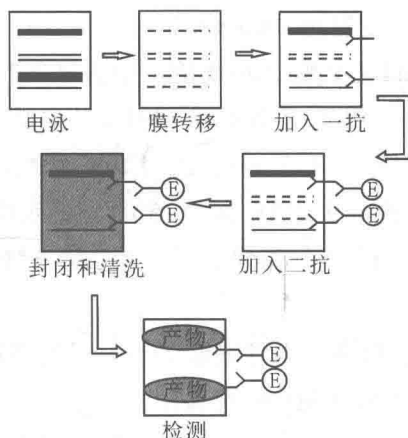


图 1-3 Western Blot 实验步骤

二、实验材料

1. 实验器材

全自动高压蒸汽灭菌锅, CO_2 细胞培养箱, 倒置显微镜, 超净台, 酶标仪, 小型离心机, 电泳仪, VE-186 转移电泳槽, 恒温振荡器, 台式冷冻型离心机, 凝胶成像仪, 封口机, pH 计, 恒温水浴锅, 制冰机, 多用脱色摇床, X-光片, 硝酸纤维素膜 (NC 膜), 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜)。

2. 实验试剂

磷酸盐缓冲液 (PBS), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 胰酶, 结晶紫, 考马斯亮蓝 R250, 牛血清白蛋白 (BSA), 甲醇, 乙酸, 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 甘氨酸, 过硫酸铵 (APS), Tris, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 脱脂奶粉, Ecl 化学发光方式试剂盒, 十二烷基硫酸钠 (SDS), 二硫苏糖醇 (DTT), N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)。

3. 主要试剂的配制

(1) PBS: 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4 , 以 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.4, 高压灭菌。

(2) 胰酶消化液: 0.25 g 胰蛋白酶, 100 ml PBS 缓冲液, 0.22 μm 过滤除菌。

(3) 0.2% 结晶紫染液: 0.1 g 结晶紫, 溶于 50 ml (10%) 乙醇。

(4) 1% BSA: 1 g BSA 溶于 100 ml PBS。

(5) 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 15.1 g Tris, 94 g 甘氨酸, 50 ml 10%

SDS, 900 ml 去离子水, 定容至 1000 ml。

(6) 染色液: 100 ml (甲醇/乙酸溶液) 中溶解 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250, 滤纸过滤去除颗粒。(注: 甲醇/乙酸溶液—甲醇: 冰醋酸: 水 = 50: 10: 40)。

(7) 脱色液: 甲醇 30% (15 ml), 乙酸 10% (5 ml), 蒸馏水 30 ml。

(8) 10% SDS: 称取 2.5 g SDS 溶于 25 ml 蒸馏水中。

(9) 10% 过硫酸胺 (APS) 溶液: 过硫酸胺 0.1 g, 超纯水 1.0 ml 溶解后, 4 °C 保存。

(10) 30% 丙烯酰胺溶液: 丙烯酰胺 29 g, 甲叉双丙烯酰胺 1 g, ddH₂O 100 ml, 37 °C 水浴, 4 °C 棕色瓶中储存备用。

(11) 1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8): 45.413 g Tris, 溶于 200 ml 蒸馏水中, 用 HCl 调 pH 值至 8.8, 定容至 250 ml。

(12) 1 mol/L Tris-HCl (pH6.8): 30.275 g Tris, 溶于 200 ml 蒸馏水中, 用 HCl 调 pH 值至 6.8, 定容至 250 ml。

(13) SDS-PAGE 上样缓冲液 (5×): 1.0 mol/L Tris 缓冲液 (pH 6.8) 1.25 ml, 甘油 2.5 ml, SDS 50 g, 溴酚蓝 25 mg, 定容至 5 ml, 0.077g DTT/ml。

(14) Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (10×): 30.3 g Tris, 188 g 甘氨酸, 10 g SDS, 用蒸馏水定容至 1000 ml, 得 0.25 mol/L Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 临用前稀释 10 倍。

(15) 1×TBS 缓冲液: 2.42 g Tris, 29.2 g NaCl, 溶于 900 ml 去离子水中, HCl 调 pH 值至 7.5, 定容至 1000 ml, 室温保存。

(16) 1×TBST 缓冲液: 1×TBS 缓冲液中加入 250 μl Tween-20, 室温保存。

(17) 封闭液 (5% 脱脂奶粉): 5 g 脱脂奶粉溶于 100 ml TBST 缓冲液中, 于 4 °C 保存。

(18) 转膜液: 3.03 g Tris, 14.4 g 甘氨酸, 200 ml 甲醇, 蒸馏水定容至 1000 ml。

(19) PMSF: 称取 17.4 mg PMSF 溶于 1 ml 异丙醇 (终浓度为 100 mmol/L), 分装后于 -20 °C 保存。

(20) 显影液: 将显影粉溶于 250 ml 50 °C 蒸馏水中, 置于棕色瓶室温保存。

(21) 定影液: 将定影粉溶于 250 ml 25 °C 蒸馏水中, 置于棕色瓶室温保存。