

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____ 135906_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

TRPC1/TRPC3 通道介导溶血卵磷脂诱导的
人冠状动脉平滑肌细胞凋亡

王 渊

工作完成日期 2016 年 5 月

报告提交日期 2016 年 5 月

厦门大学

2016 年 5 月

TRPC1/TRPC3 通道介导溶血卵磷脂诱导的
人冠状动脉平滑肌细胞凋亡

TRPC1/TRPC3 channels mediate lysophosphatidylcholine-induced
apoptosis in cultured human coronary artery smooth muscles cells

博 士 后 姓 名 王 渊

流动站（一级学科）名称 生 物 学

专 业（二级学科）名称 细胞生物学

研究工作起始时间 2013 年 12 月

研究工作期满时间 2016 年 5 月

厦 门 大 学

2016 年 5 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版,有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅,有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索,有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于: 1、保密 (), 2、不保密 ()

纸本在 年解密后适用本授权书;

电子版在 年解密后适用本授权书。

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

内 容 摘 要

溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, lysoPC)是氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)的主要成分。早期的研究表明, lysoPC可诱导人冠状动脉平滑肌细胞(human coronary artery smooth muscle cells, HCASMCs)凋亡, 但具体机制尚不清楚。近期, 我们通过细胞活力测定, 流式细胞术, 共聚焦显微镜及分子生物学手段对 lysoPC 作用的分子机制进行研究发现, lysoPC可引发细胞外钙离子内流, 并显著抑制 HCASMCs 的生长。并且经典的钙离子阻滞剂 La^{3+} 、TRPC 通道阻滞剂 SKF-96365、TRPC3 通道阻滞剂 Pyr3, 或者是沉默细胞内 TRPC1 或 TRPC3 表达均可阻断 lysoPC 诱发的钙离子内流及细胞凋亡。免疫共沉淀实验发现, TRPC1 与 TRPC3 的结合形成了一个离子通道, 并介导了 lysoPC 诱导的钙离子内流及细胞凋亡。运用 siRNA 抑制 TRPC1 或 TRPC3 表达, 可抑制 lysoPC 诱导的促凋亡蛋白 Bax 的增加、caspase-3 的剪切, 并降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和 Akt 激酶活性。我们的研究充分表明, TRPC1/TRPC3 组成的离子通道可作为 lysoPC 诱导的相关疾病(如, 动脉粥样硬化)治疗的一个潜在靶点。

关键词: 溶血卵磷脂; 细胞存活; 凋亡; 瞬时受体电位通道

Abstract

Lysophosphatidylcholine (lysoPC) is a major component of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). Although an earlier study showed that lysoPC induced apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells (SMCs), the related molecular mechanisms are not fully understood. The present study investigated how lysoPC mediates apoptosis in cultured human coronary artery smooth muscle cells (SMCs) using cell viability assay, flow cytometry, confocal microscopy, and molecular biological approaches. We found that lysoPC remarkably reduced cell viability in human coronary artery SMCs, and significantly mediated Ca^{2+} influx. The effect was antagonized in cells pretreated with La^{3+} , SKF-96365, or Pyr3 as well as by silencing TRPC1 or TRPC3. Co-immunoprecipitation revealed that TRPC1 and TRPC3 combine with each other to form heterogeneous channels that mediate Ca^{2+} influx and apoptosis at early and late stages by lysoPC. Silencing TRPC1 or TRPC3 countered lysoPC-induced increase of the pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3 and decrease of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the survival kinase p-Akt. These results demonstrate the novel information that TRPC1/TRPC3 channels mediate lysoPC-induced Ca^{2+} influx and apoptosis via activating the pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3 and inhibiting the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the survival kinase p-Akt in human coronary artery SMCs, which implies that TRPC1/TRPC3 channels may be a potential therapeutic target of lysoPC-induced disorders such as atherosclerosis.

Keywords: Lysophosphatidylcholine; cell viability; apoptosis; transient receptor potential channels

目 次

前 言	1
1.1. 血管平滑肌细胞（VSMCs）凋亡与动脉粥样硬化.....	1
1.2. 钙信号与离子通道蛋白.....	4
1.3. 立题意义.....	5
材料与方 法	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 细胞株	7
2.1.2 试剂耗材	7
2.1.3 仪器设备	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 siRNA 转染.....	8
2.2.2 蛋白提取及 Western Blot	9
2.2.3 MTT 测定细胞增殖	10
2.2.4 细胞周期测定	10
2.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡	10
2.2.6 TUNEL 染色.....	11
2.2.7 细胞内 Ca ²⁺ 测定.....	11
2.2.8 RNA 提取及 RT-PCR.....	12
2.2.9 免疫共沉淀	13
2.2.10 统计学分析	14
实验结果	15
3.1 LysoPC 诱导人冠状动脉平滑肌细胞 HCASMCs 凋亡	15
3.2 LysoPC 通过 TRPC 通道影响 HCASMCs 钙活动	19
3.3 TRPC1/TRPC3 复合物介导 lysoPC 诱导的 Ca ²⁺ 内流及细胞凋亡.....	24
3.4 LysoPC 诱导 HCASMCs 细胞凋亡的分子机制	30
讨 论	34

参考文献	37
致 谢.....	42
博士生期间发表的学术论文、专著	43
博士后期间发表的学术论文、专著	44
个人简历	45
联系地址	46

厦门大学博硕士论文摘要库

前言

动脉粥样硬化性疾病已经成为世界范围内导致人类死亡的主要病因，全球每年约有 2000 万人死于动脉粥样硬化性疾病^[1]。世界卫生组织预测，在世界范围内的传染性疾病死亡率得到有效控制之后，到 2020 年心血管疾病将成为全世界第一死因。在我国，随着生活水平的提高，近年来心血管疾病的发生率和死亡率也迅速增长^[2]。其中，动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 可引起许多严重的心血管疾病如冠心病和动脉血栓形成等，从而造成急性临床事件的发生和严重的并发症。

动脉粥样硬化是由多种遗传基因和环境危险因子相互影响所致的慢性、进展性疾病，是心脑血管疾病的主要病理基础。动脉粥样硬化性疾病，大部分都是由脂蛋白质过度沉积于动脉壁造成^[3]。血管内皮细胞受损是动脉粥样硬化发生的始动机制，继而招致单核细胞为主的白细胞沿血管壁滚动、黏附于血管内皮、移向内皮下间隙，进而转化为巨噬细胞，巨噬细胞无限制地摄取脂质，特别是摄取修饰的氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)，成为泡沫细胞；泡沫细胞的脂质内涵逐渐累积形成脂质条纹^[4]。接下来，脂质细胞在血管壁细胞与基质层间积累形成纤维帽。同时受损内皮细胞释放某些活性因子，在其影响下血管平滑肌细胞 (Vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增殖并向内皮迁移，亦摄取 ox-LDL 成为泡沫细胞^[4]。进而在新生血管和外渗的白细胞作用下，这种反应持续发生或反复发作进一步加剧使得斑块不断扩大，最终导致斑块破裂和血栓形成。

1.1. 血管平滑肌细胞 (VSMCs) 凋亡与动脉粥样硬化

VSMCs 是组成血管壁的基质细胞，参与了动脉粥样硬化进程的各个阶段，如脂质超载及对血管内环境应激的响应。大量的研究表明，动脉粥样硬化斑块中存在一定的凋亡^[5-7]。虽然 VSMCs 的凋亡在一定程度上抗衡了它的增殖，降低斑块形成的速率，但过度 VSMCs 凋亡却导致了斑块的不稳定。

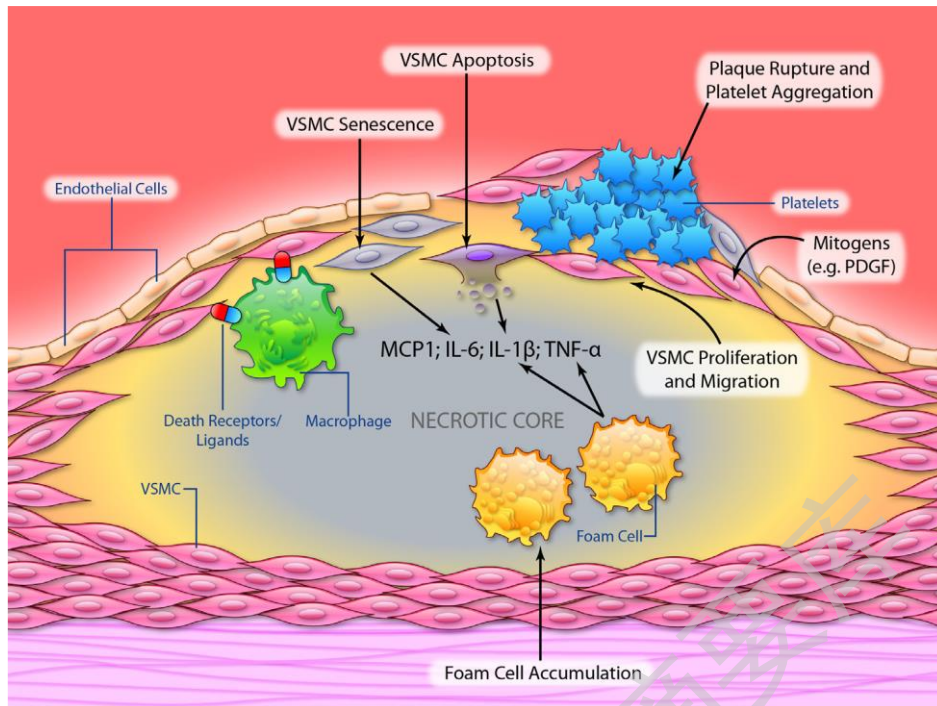


图 1.1 平滑肌细胞参与动脉粥样硬化示意图^[8]

Figure 1.1. Schematic illustration of several processes that vascular smooth muscle cells undergo in advanced atherosclerotic plaques.

动脉粥样硬化斑块的稳定性取决于纤维帽的厚度和炎症程度。随着 VSMCs 死亡、胶原蛋白及内皮基质受损，使得纤维帽变薄，加剧斑块破裂，最终可致后续的心肌梗死或中风。虽然 VSMCs 增殖能识别相关的血栓并修复斑块，从而预防斑块破裂的发生。但是 VSMCs 过度修复又将导致血管腔狭窄，严重干扰支架的治疗效果。因此保持 VSMCs 增殖、迁移、凋亡和衰老之间的平衡，控制 VSMCs 在动脉粥样硬化斑块处的数量，最终可调控动脉粥样硬化的进程和斑块的稳定性。

VSMCs 凋亡直接影响粥样斑块的形态结构和稳定性。动脉中膜细胞凋亡或坏死后的降解产物是血管钙化发生的起始点。VSMCs 来源的凋亡小体具有浓缩钙质，是磷灰石晶体钙的成核结构，可促进血管钙化^[9]。VSMCs 凋亡还导致 IL-1 α ，IL-8，MCP-1 等细胞因子的释放，使得斑块内炎症反应加重，促进巨噬细胞的浸润。而增加的炎症细胞又将导致脂核内粥样物质的增多，令斑块更不稳定^[10]。另外，诱导 VSMCs 凋亡会进一步加重粥样斑块脂质核心的发展及血管腔的正性重构^[11]。在动脉粥样硬化早期，VSMCs 在 TGF-B 及 PDGF 等刺激下增殖、迁

移，形成增生内膜，并转化为去分化表型，合成细胞外基质^[12]。而血管 VSMCs 和细胞外基质（extracellular matrix, ECM）是构成纤维帽的主要成分。纤维帽区的 VSMCs 凋亡将导致纤维帽细胞数量以及间质胶原纤维合成减少。同时炎症因子刺激巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶（MMP），弹性蛋白酶（elastase），胶原酶（collagenase）等可分解胶原和弹力纤维的基质成分。由于细胞外基质分泌减少及崩解增加，使斑块极不稳定而易于破裂或脱落。而纤维帽的降解以及 VSMCs 的凋亡则又加剧动脉粥样硬化斑块的不稳定，以致斑块更易于发生破裂^[13]。此外，动脉粥样硬化晚期时 VSMCs 的凋亡增加，使得斑块纤维帽尤其是斑块肩部炎性细胞浸润明显，易形成溃疡，又将加速斑块破裂^[10]。

虽然在动脉损伤早期细胞凋亡率很低，但随着损伤的加剧、坏死核心和纤维帽中 VSMCs 凋亡发生频率也相应增加。VSMCs 凋亡可能是巨噬细胞通过死亡配体/受体结合通路来诱导，这或许是斑块破裂及其后遗症发生的中心事件^[14, 15]。相对于稳定型斑块，致病性斑块与 VSMCs 凋亡水平增加具有相关性^[16]。斑块破裂常常发生在斑块肩部，而这一位置也是 VSMCs 减少、巨噬细胞增加的区域。

在动脉粥样硬化中，VSMCs 凋亡与炎症发生也密切相关。正常情况下，凋亡的 VSMCs 将在 48 小时内通过自体吞噬作用从血管壁清除^[17]。然而，在高血脂状态下，VSMCs 将转为巨噬样细胞，使得胞内 IL-1 依赖的炎性因子增加，最终导致 VSMCs 的吞噬作用削弱。近期研究还表明，人染色体 9p21 位点与心血管疾病的恶化密切相关。9p21 位点上的周期性依赖的激酶抑制因子 2B（cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, CDKN2B）和钙网蛋白，是激活吞噬细胞上吞噬受体所必须的配体^[18]。CDKN2B 缺失的凋亡小体将导致邻近的巨噬细胞吞噬作用削弱^[18]，进一步扩大脂质坏死核心的大小及复杂度，加剧了动脉粥样硬化的病程。

此外，动脉粥样硬化中广泛存在的 VSMCs 凋亡使得纤维帽变薄、坏死核心变大及巨噬细胞浸润入纤维帽等^[10, 19]。慢性 VSMCs 凋亡将使已有损伤部分扩大、细胞钙化和血管中间层细胞退化，并加速动脉粥样硬化的发生^[20, 21]。最重要的是，只要发生 VSMCs 凋亡就足以诱发后续的心血管事件发生。这说明 VSMCs 凋亡是后续心血管疾病发生的基本的早期事件。

1.2. 钙信号与离子通道蛋白

Ca^{2+} 是生物体内最普遍的一种信号转导因子，也是功能最为复杂的第二信使。细胞内 Ca^{2+} 动态平衡受众多钙效应蛋白和精致、多层次的体系结构调控。钙信号参与基因转录、细胞迁移、增殖、分化和凋亡等多种细胞过程^[22-24]。

细胞中， Ca^{2+} 在细胞间质、细胞浆、内质网（endoplasmic reticulum, ER）或肌浆网（sarcoplasmic reticulum, SR）之间存在浓度梯度差异。当细胞受到细胞外应激反应时，细胞内外 Ca^{2+} 通过细胞膜特异性 Ca^{2+} 通透通道，经由跨细胞膜以及 ER/SR 膜电化学梯度快速动员启动。细胞膜特异性 Ca^{2+} 通透通道主要由经典的电压门控 L-型 Ca^{2+} 通道（voltage gated calcium channel, VGCC），钠钙交换体（ Na^+ - Ca^{2+} exchanger, NCX）和瞬时受体电位（transient receptor potential, TRP）等通道组成^[25-28]。

1.2.1. TRPC 通道

根据通道结构、氨基酸序列的不同，TRP 通道可分为 TRPC、TRPV、TRPM、TRPM、TRPP、TRPA 和 TRPN 七个亚家族^[29]。各亚家族之间还可依据序列同源性和功能倾向性把亚族分为不同亚型。其中，瞬时受体电位通道 C 亚族（canonical transient receptor potential, TRPC）是位于细胞膜上的一种非选择性阳离子通道蛋白。

TRPC 通道是非电压依赖性通道， Na^+ 和 Ca^{2+} 可由其中通过。不同的 TRPC 通道对 Na^+ 和 Ca^{2+} 的选择比值有所不同，因此 TRPC 通道也为非选择性阳离子通道。TRPC 通道有 TRPC1-7 七个亚型，根据氨基酸序列及功能的相似性，分成 4 个亚类：TRPC1、TRPC2、TRPC4/TRPC5（65% 同源性）；TRPC3/TRPC6/TRPC7（70%~80% 同源性）^[30]。其中 TRPC2 在人类是个假基因，没有蛋白表达。

TRPC 通道的激活受到多种因素的调节，包括氧化应激、机械力及一些细胞信号分子。TRPC 通道被磷脂酶 C（phospholipase C, PLC）耦联的膜受体激活是其发挥作用的主要机制。当激动剂与 G 蛋白耦联受体/酪氨酸受体结合后，激活 PLC，使 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol bisphosphate, PIP₂）水解产生 1,4,5-三磷酸肌醇（inositol trisphosphate, IP₃）和二酰甘油。之后根据激活通道刺激物的不同，TRPC 通道可分为受体操纵性通道（receptor-operated

channels, ROC) 和储存操纵性通道 (store-operated channels, SOC)。ROC 直接被二酰甘油激活, 不受细胞内钙库排空的影响^[31]; SOC 则是通过 IP3 作用, 使钙库释放 Ca^{2+} , TRPC 通道被细胞内钙库 Ca^{2+} 耗竭所激活。近年来研究发现, TRPC 通道的激活与高血压、肺动脉高压、心室重构、扩张性心肌病及动脉粥样硬化等心血管疾病发生、发展关系密切。血管紧张素 II、三磷酸腺苷、内皮素、去甲肾上腺素、加压素、乙酰胆碱、多种生长因子、钙库的衰竭及膜牵张等诸多因素都能够激活 TRPC 通道。

1.2.2. TRPC 通道与动脉粥样硬化

目前的研究显示, TRPC 通道与动脉粥样硬化有一定的相关性。在猪冠状动脉上安置支架后, TRPC1 基因表达也上调^[32]。冠脉搭桥中获取的隐静脉中, 新生内膜上的 TRPC1 表达有所上调, 而使用 TRPC1 特异抗体和 TRPC 通道抑制剂 2-APB 能抑制新生内膜生成^[33]。

研究还发现, TRPC 通道介导的炎症反应也在动脉粥样硬化中发挥重要作用。三磷酸腺苷可诱导人冠状动脉内皮细胞中血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 的表达, 同时伴随 TRPC3 介导的 Ca^{2+} 内流增加; 运用 siRNA 抑制 TRPC3 表达则降低 Ca^{2+} 内流, 抑制单核细胞在内皮细胞上黏附^[34]。另外, 溶血卵磷脂 (lysophosphatidylcholine, lysoPC) 刺激单核细胞聚集迁移到内膜下的机制与激活 TRPC6 通道有关, 因为 TRPC6 通道的激动剂氟芬那酸可增强这一作用^[35, 36]。另外, lysoPC 还通过 TRPC6/TRPC5 激活机制, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 抑制内皮细胞迁移并抑制损伤的内皮细胞愈合^[37]。

TRPC1 表达还与脂质代谢异常相关。TRPC1 和细胞膜上小窝蛋白的结合与 oxLDL 诱导的 VSMCs 凋亡的关系密切, 沉默 TRPC1 可减少 oxLDL 毒性, 使得 VSMCs 凋亡减少^[38]。

虽然上述研究都提示 TRPC 通道参与动脉粥样硬化的各个环节, 但具体的作用机制仍需进一步探讨。

1.3. 立题意义

ox-LDL 是导致动脉粥样硬化的原凶, 它可引起 VSMCs 内脂平衡和 Ca^{2+} 紊乱, 以及 VSMCs 凋亡等损伤。lysoPC 是 oxLDL 的主要成份, 具有细胞毒性,

能诱导血管内皮细胞、VSMCs 凋亡。然而，其中的分子机制目前仍不明确。

研究发现 VSMCs 内 Ca^{2+} 作为第二信使对于 VSMCs 的功能调节起关键作用。TRP 通道参与了细胞内外 Ca^{2+} 交流活动。TRP 家族由 TRPC、TRPV、TRPM、TRPP、TRPML 和 TRPA 这 6 个亚家族组成，其中各家族成员也分别由不同的异构体构成。早前的研究表明，lysoPC 可诱发冠状动脉平滑肌细胞、脐带内皮细胞中 Ca^{2+} 持续性增加。但到底是哪个亚型的通道蛋白介导了 lysoPC 诱导的 VSMCs 内 Ca^{2+} 内流及细胞凋亡，目前仍无定论。

因此我们在人原代冠状动脉平滑肌细胞（human coronary artery SMCs, HCASMCs）中，通过 TRPC 通道抑制剂及沉默 TRPC 通道蛋白的表达，来阐明究竟是哪个 TRPC 通道蛋白介导了 lysoPC 诱导的 Ca^{2+} 内流及细胞凋亡。

材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞株

人原代冠状动脉平滑肌细胞 (human coronary artery SMCs, HCASMCs) 购自美国ScienCell Research Laboratories公司。细胞培养在含10% α -MEM/F12 (1:1) 培养液中, 含100 U/ml 青霉素和100U/ml 链霉素。实验选取3-8代的细胞进行, 并在药物实验前将培养液换成含5%血清的培养液。

2.1.2 试剂耗材

化学试剂LysoPC (#L1381), MTT (#M2128), nifedipine (#N7634), KB-R7943 (#K4144), LaCl₃ (#449830), ruthenium red (#R2751), RN1734 (#0658), SKF96365 (#S7809)及Pyr3 (#P0032) 购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

一抗anti-TRPC1 (sc-133076), anti-TRPC3 (sc-514670), anti-TRPC4 (sc-15063), anti-Bax (sc-6236)和anti-Bcl 2 (sc-7382)购自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。Anti-caspase 3 (#9662), anti-Akt (#9272) and anti-pAkt S473 (#4060) 购自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)。

人源 TRPC1 siRNA (sc-42664), TRPC3 siRNA (sc-42666), TRPC4 siRNA (sc-42668)及negative control siRNA (sc-37007)购自Santa Cruz Biotech。

细胞培养使用的培养液干粉、胎牛血清购自Gibco公司; 无钙S-MEM培养液 (#11380037) 购自Gibco公司; Annexin V检测试剂盒购自BD公司; TUNEL assay 检测试剂盒购自Beyotime公司; RNA 提取试剂盒购自QIAGEN 公司; DNA引物及生物标记探针由Invitrogen公司合成。

其余生化试剂购自Sigma, BBI 或使用国产分析纯。

2.1.3 仪器设备

仪器名称	公司名称
细胞培养盘	NEST
PVDF 膜	GE

医用 X 光胶片	柯达
酶标仪	Tecan
蛋白电泳电转印系统	Bio-Rad
微量离心机	Hettich
Diaphot300 倒置显微镜	Nikon
CO2 培养箱	Thermo
电子分析天平	Sartorius
pH 计	Thermo
PCR 仪	Bio-Rad
微波炉	格兰仕
分光光度计	Eppendorf
脱色摇床	海门麒麟
超声破碎仪	Materials inc
恒温摇床	深圳国华仪器厂
封口机	浙江温州东风电器厂
台式真空泵	上海之信仪器有限公司
液氮罐	Thermolyne
EPICS XL 流式细胞仪	Beckman Coulter
共聚焦显微镜	Leica
荧光显微镜	Nikon
移液枪	Eppendorf

2.2 实验方法

2.2.1 siRNA 转染

Lipofectamine 2000 转染方法参照说明书，简述如下：

- (1) 转染前细胞用不含血清及抗生素的 OptiM 换液。在 1.5ml 离心管中分别配置以下两种溶液：① 稀释 1-2 μg RNA oligo 于 100 μl 无血清 DMEM 中；② 稀释 2-8 μl Lipofectamine 2000 于 100 μl 无血清 DMEM 中，室温放置 5min。

- (2) 混合两种溶液，室温放置 15-30 min，使 DNA---脂质体复合物形成。
- (3) 再次混匀，然后缓慢均匀加到培养液。6-8 h 后，更换新鲜的完全培养液，并于 24~48 h 后收集细胞用于后续实验。

2.2.2 蛋白提取及 Western Blot

(1) 细胞的裂解(以直径六孔板为例): 弃上清。每孔中加入含有 1 mM 的 PMSF, 100X 蛋白酶抑制剂 Pepstain A, Leupeptin, Aprotinin (抑制剂存于 -20 °C, 临用前加) 的 ELB 细胞裂解液 300 μ l, 4 °C 冰箱中裂解 10 分钟。

(2) 收集裂解液, 4 °C, 13000 rpm 离心 30 min 收集上清液, 测蛋白浓度。

(3) 蛋白浓度的测定

a. 96 孔板中每孔加 200 μ l Bradford 蛋白测定液, 每组设 3 个平行样;

b. 空白: 每孔加 2 μ l ELB 裂解液混匀;

c. 标准: 每孔加 2 μ l 浓度为 1 mg/ml 的 BSA (溶于 ELB 裂解液);

d. 样品: 每孔加 2 μ l 混匀;

e. 于酶标仪测 OD 595 读取吸光度, 计算样品浓度。

(4) 蛋白电泳

取足量的蛋白样品, 加入等体积 2 \times SDS 样品缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 于 SDS-PAGE 胶中电泳, 电压 100 V, 待样品进入分离胶后电压调为 150 V。

(5) 电转移

电转液于 -20 °C 预冷, 切好与胶同样大小的 PVDF 膜, 甲醇浸润 PVDF 膜后置于电转液中待用; PVDF 膜贴于胶后, 两面覆盖滤纸 (滤纸厚度以刚好能夹紧电转夹为宜), 赶尽气泡, 按膜朝正极的顺序装于电转槽中, 于 -20 °C 电转 (100 V, 60 min)。

(6) 抗原抗体反应

a. 封闭: 使用 5% 脱脂奶粉或 BSA 作为封闭液, 室温封闭 1 h;

b. 一抗反应: 封闭后膜与相应一抗室温孵育两小时, TBST 洗 3 次, 每次 5 min;

c. 二抗反应: 加入相应的二抗, 室温孵育一小时, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。

(7) ECL 检测

ECLA 液和 B 液以 1:1 的体积比混匀, 于暗室中滴加于膜表面, 孵育 20 秒后曝光。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.