



# 复习-DNA甲基化

邓晓蓓

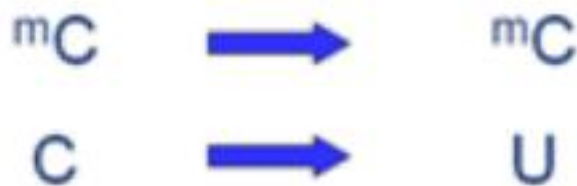
2016.6.20



# 复习-焦磷酸测序的技术原理

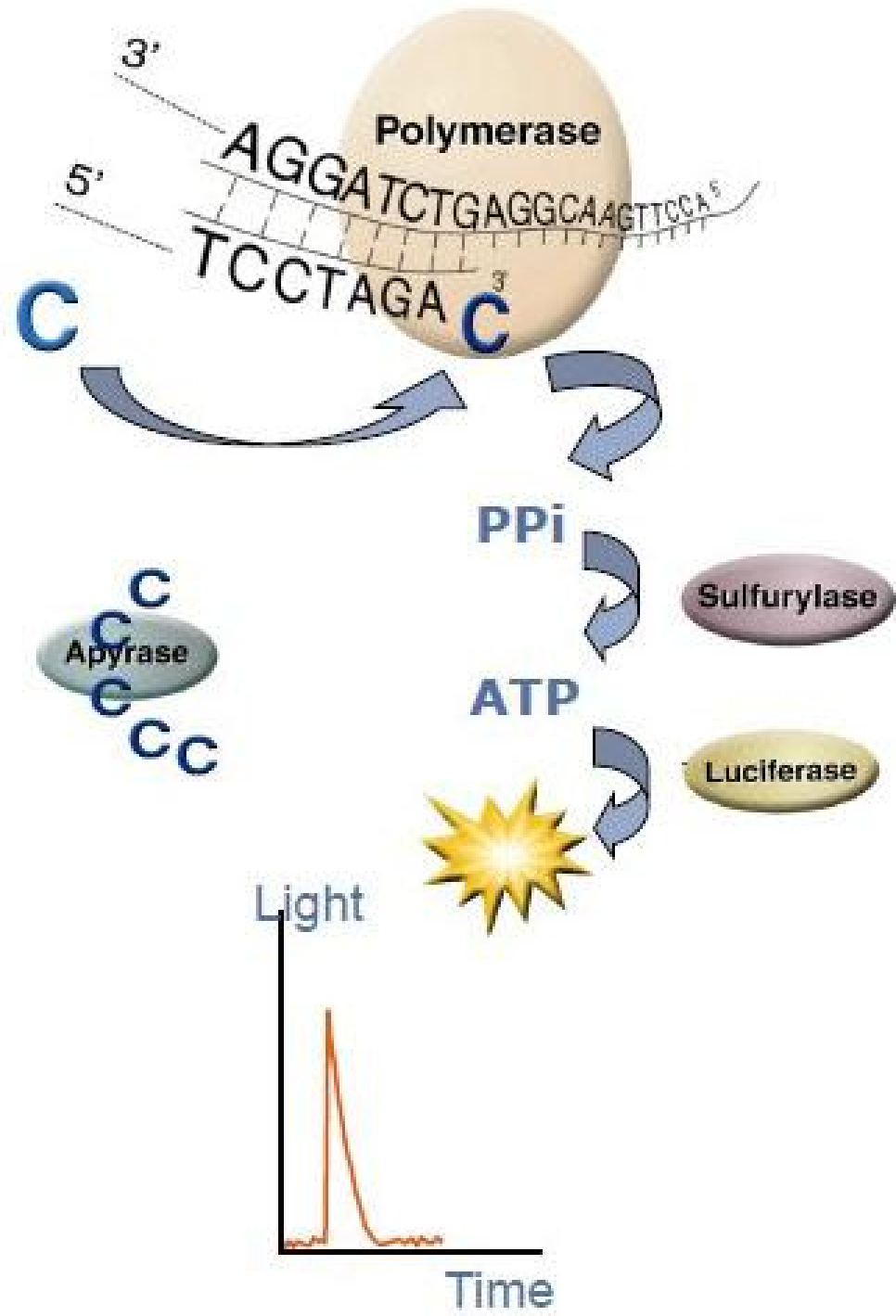
- 在**亚硫酸盐**的作用下，所有**未甲基化的胞嘧啶**发生**脱氨基反应**转变成了**尿嘧啶**，但是**5'-甲基胞嘧啶**不发生转变。

## 1. Bisulfite treatment of denatured DNA

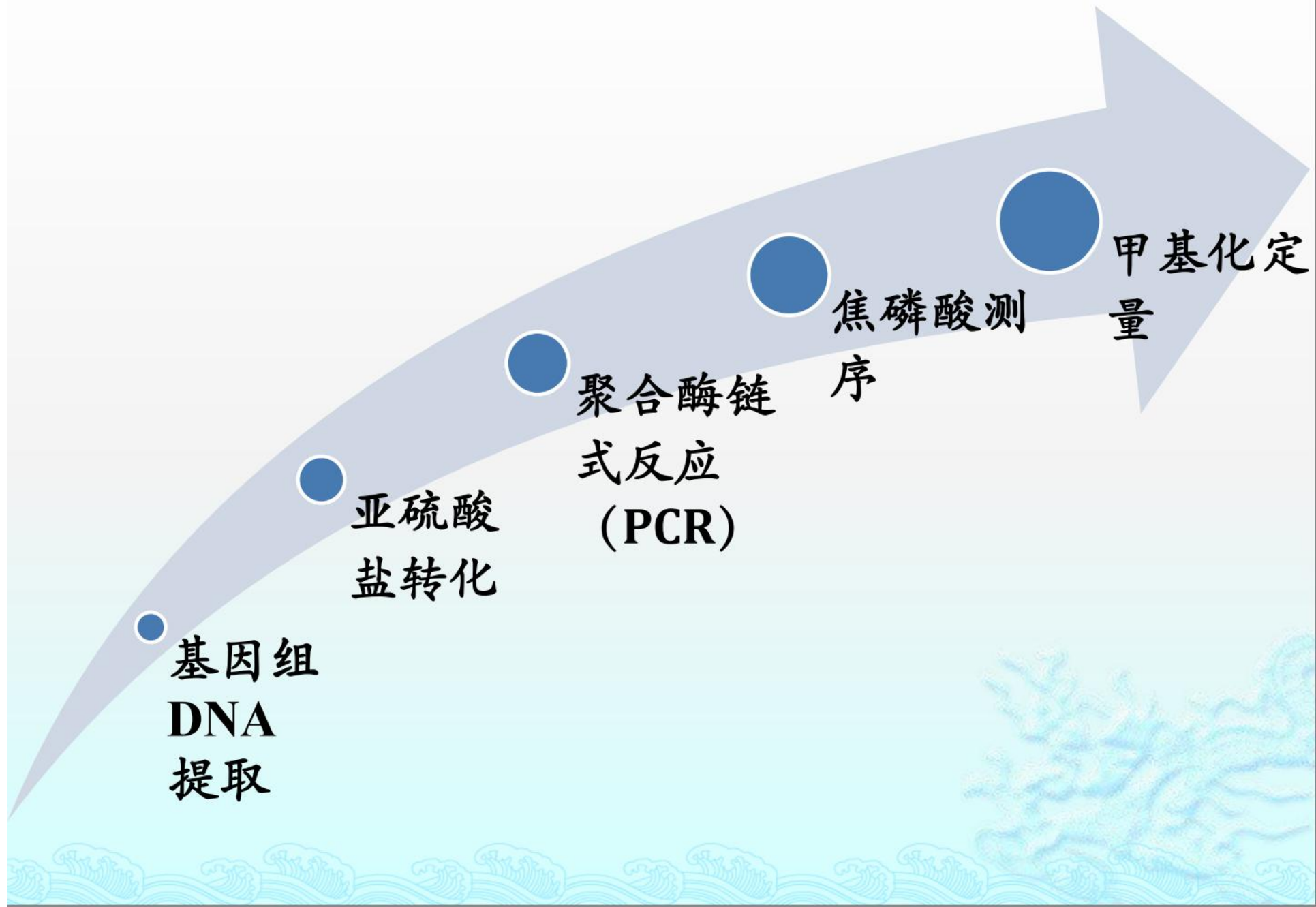


## 2. PCR amplification



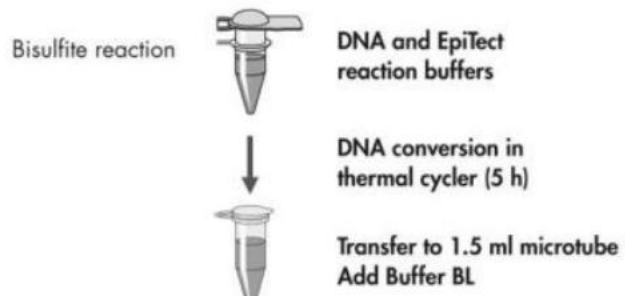


Qiagen Q96 ID





## EpiTect Bisulfite Conversion Procedure

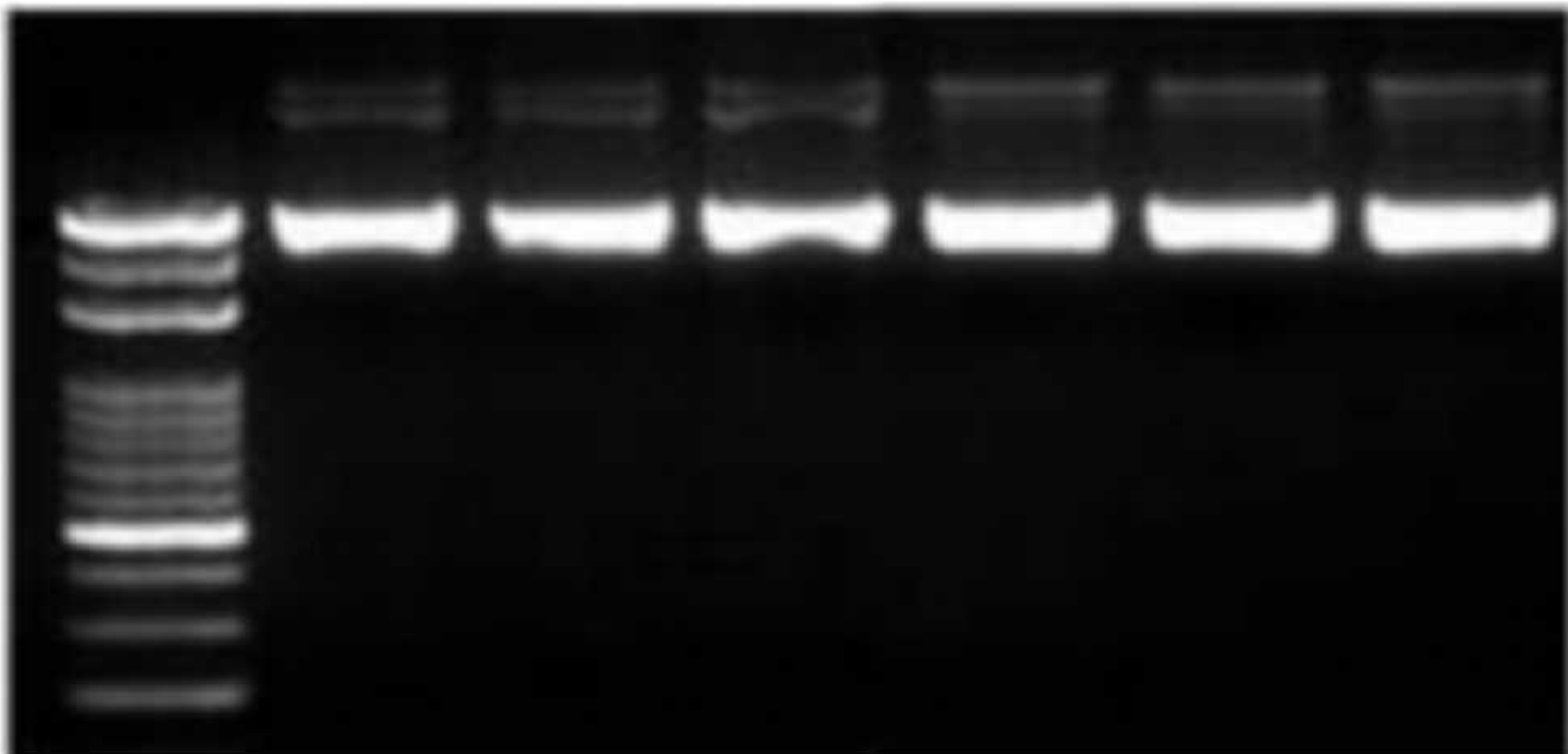


亚硫酸盐转化

纯化



marker 第一组 第二组 第三组 第四组 第五组 第六组





# 免疫印迹技术

-Western blotting

邓晓蓓

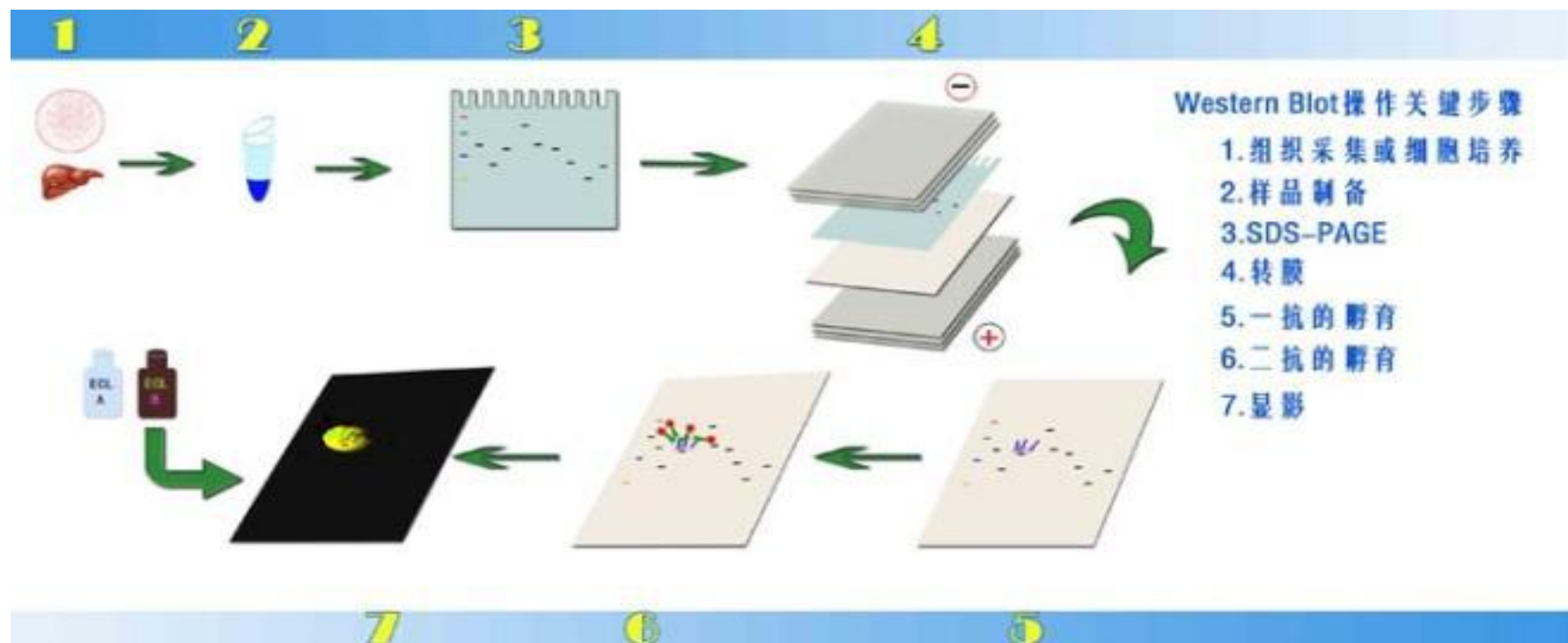
2016.6.20





# 复习-免疫印迹技术-western blotting

● **基本原理**：将SDS-PAGE电泳分离后的**细胞或组织总蛋白质**从凝胶转移到**固相支持物NC膜或PVDF膜**上，然后用**特异性抗体检测某特定抗原的一种蛋白质检测技术**，现已广泛应用于基因在蛋白水平的表达研究、抗体活性检测和疾病早期诊断等多个方面。







# 复习-SDS-聚丙烯酰胺凝胶制备原理

- 聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的一种常用电泳技术。
- 聚丙烯酰胺凝胶由**单体丙烯酰胺**和**甲叉双丙烯酰胺**聚合而成，聚合过程由自由基催化完成。
- 化学聚合以**过硫酸铵（APS）为催化剂**，以**四甲基乙二胺（TEMED）为加速剂**。
- 在聚合过程中，TEMED催化过硫酸铵产生自由基，后者引发丙烯酰胺单体聚合，同时甲叉双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联，从而形成三维网状结构。

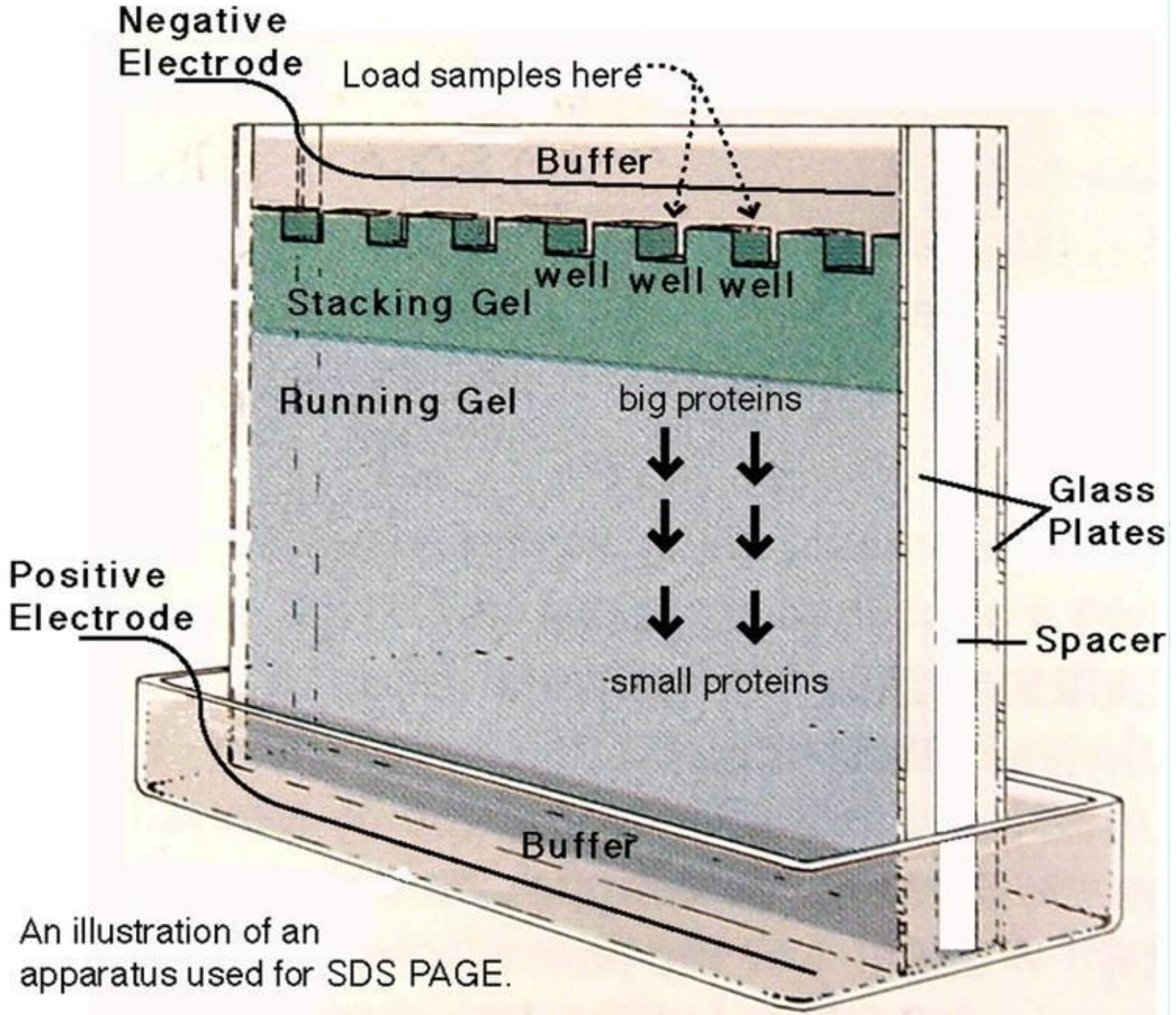




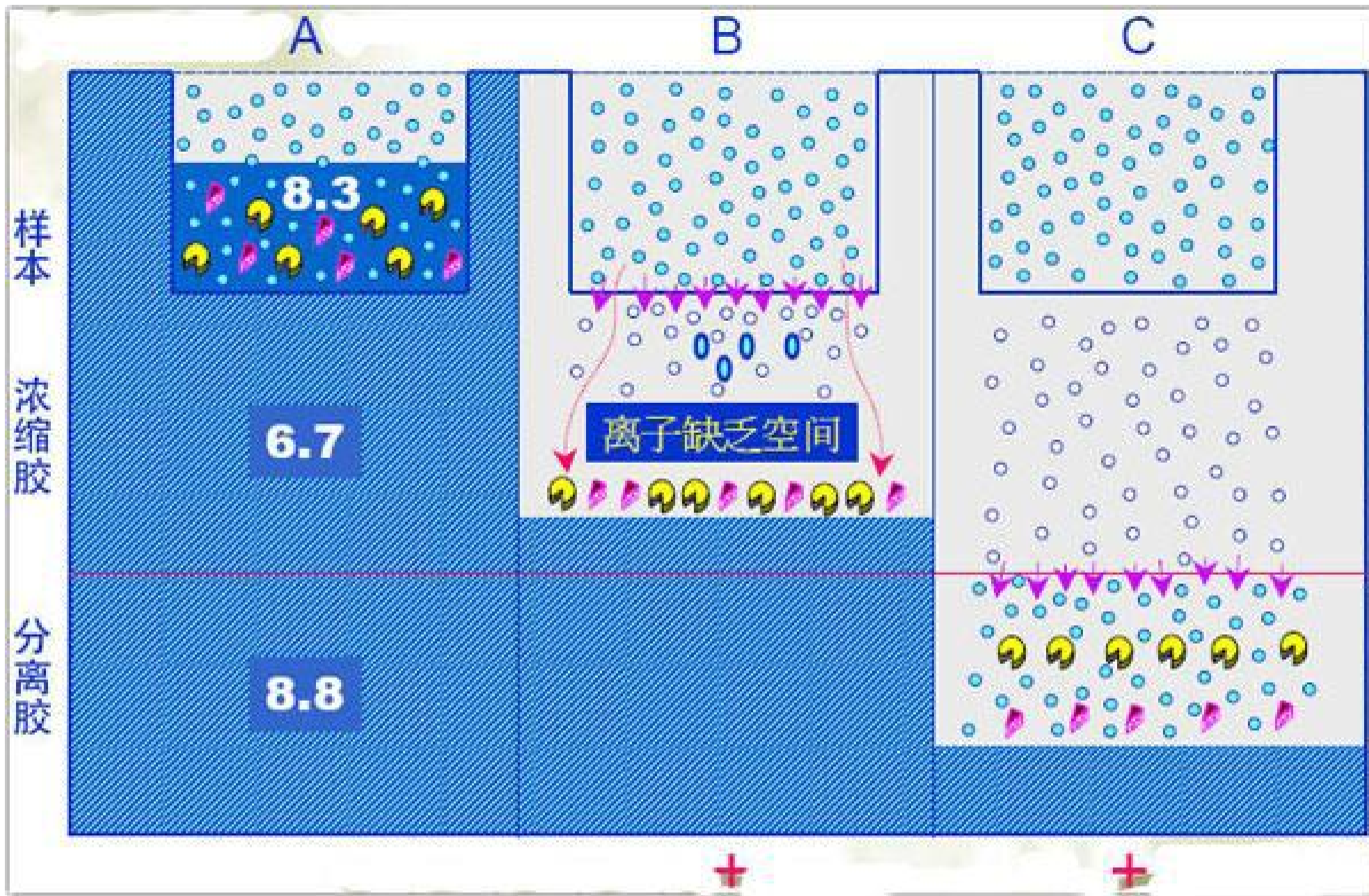
| 各种组份名称                 | 各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量 |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                        | 1 ml               | 2 ml  | 3 ml  | 4 ml  | 5 ml  | 6 ml  | 8 ml  | 10 ml |
| H <sub>2</sub> O       | 0.68               | 1.4   | 2.1   | 2.7   | 3.4   | 4.1   | 5.5   | 6.8   |
| 30% Acrylamide         | 0.17               | 0.33  | 0.5   | 0.67  | 0.83  | 1.0   | 1.3   | 1.7   |
| 1.0 M Tris-HCl (pH6.8) | 0.13               | 0.25  | 0.38  | 0.5   | 0.63  | 0.75  | 1.0   | 1.25  |
| 10% SDS                | 0.01               | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.05  | 0.06  | 0.08  | 0.1   |
| 10% 过硫酸铵               | 0.01               | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.05  | 0.06  | 0.08  | 0.1   |
| TEMED                  | 0.001              | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.008 | 0.01  |

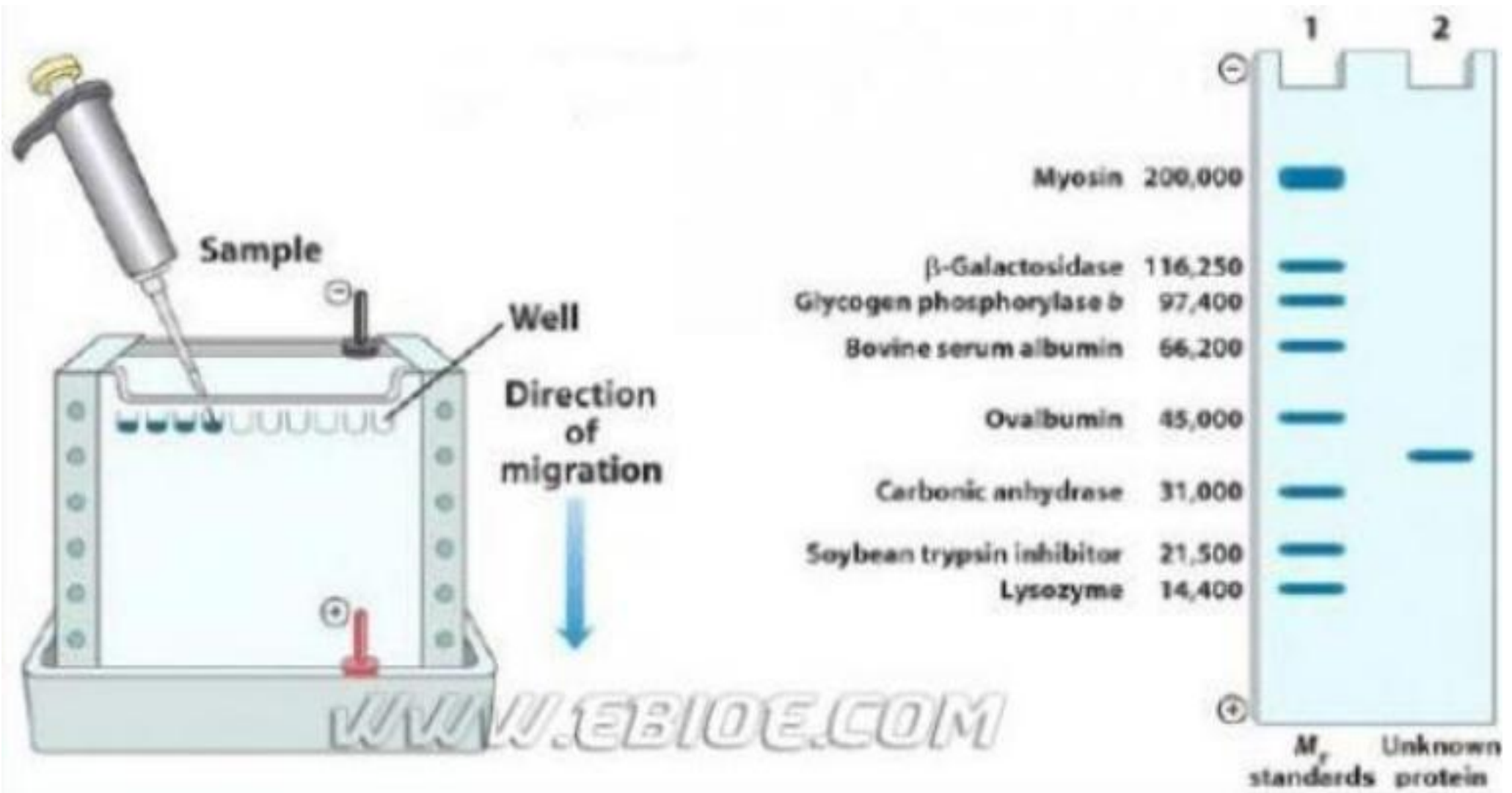
|               |           |          |          |            |            |
|---------------|-----------|----------|----------|------------|------------|
| 丙烯酰胺浓度<br>(%) | 15        | 12.5     | 10       | 7.5        | 5.0        |
| 线性分离范围        | 15-435kDa | 15-60kDa | 18-75kDa | 30-120 kDa | 60-212 kDa |





An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.



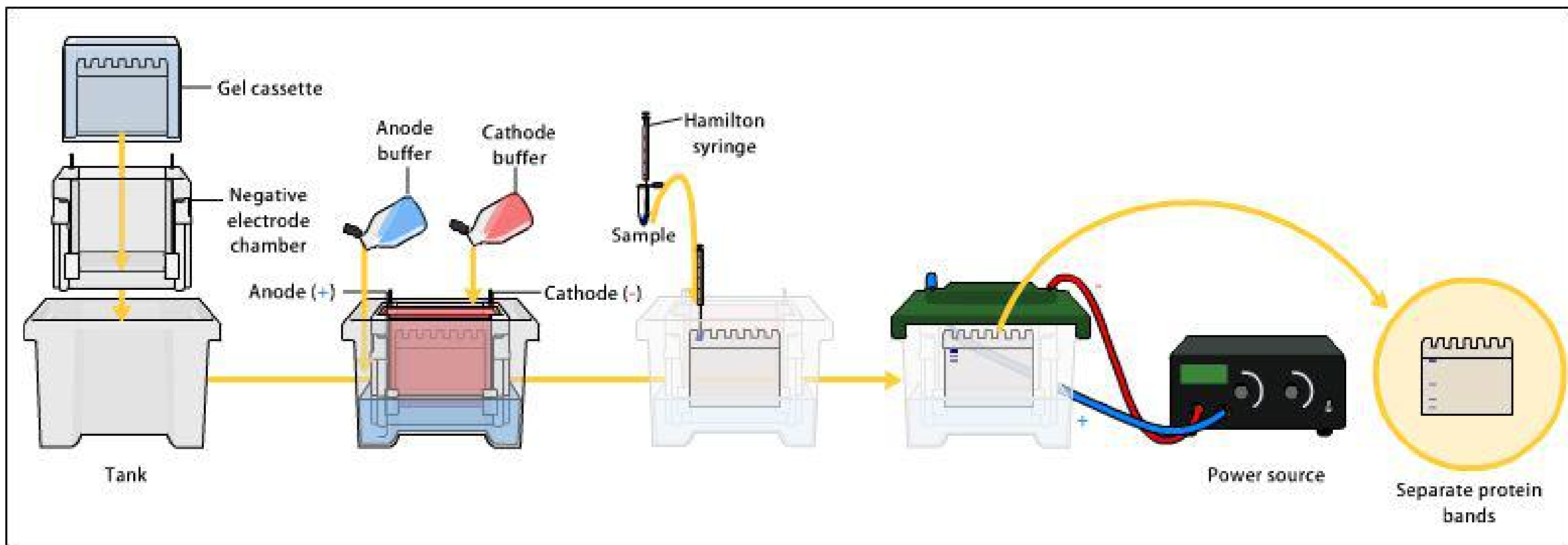


SDS-PAGE介绍视频 (4分钟)



# SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

- **基本原理**：聚丙烯酰胺凝胶为网状结构，具有分子筛效应。
- SDS-PAGE仅根据蛋白质亚基分子量的不同就可以分开蛋白质。

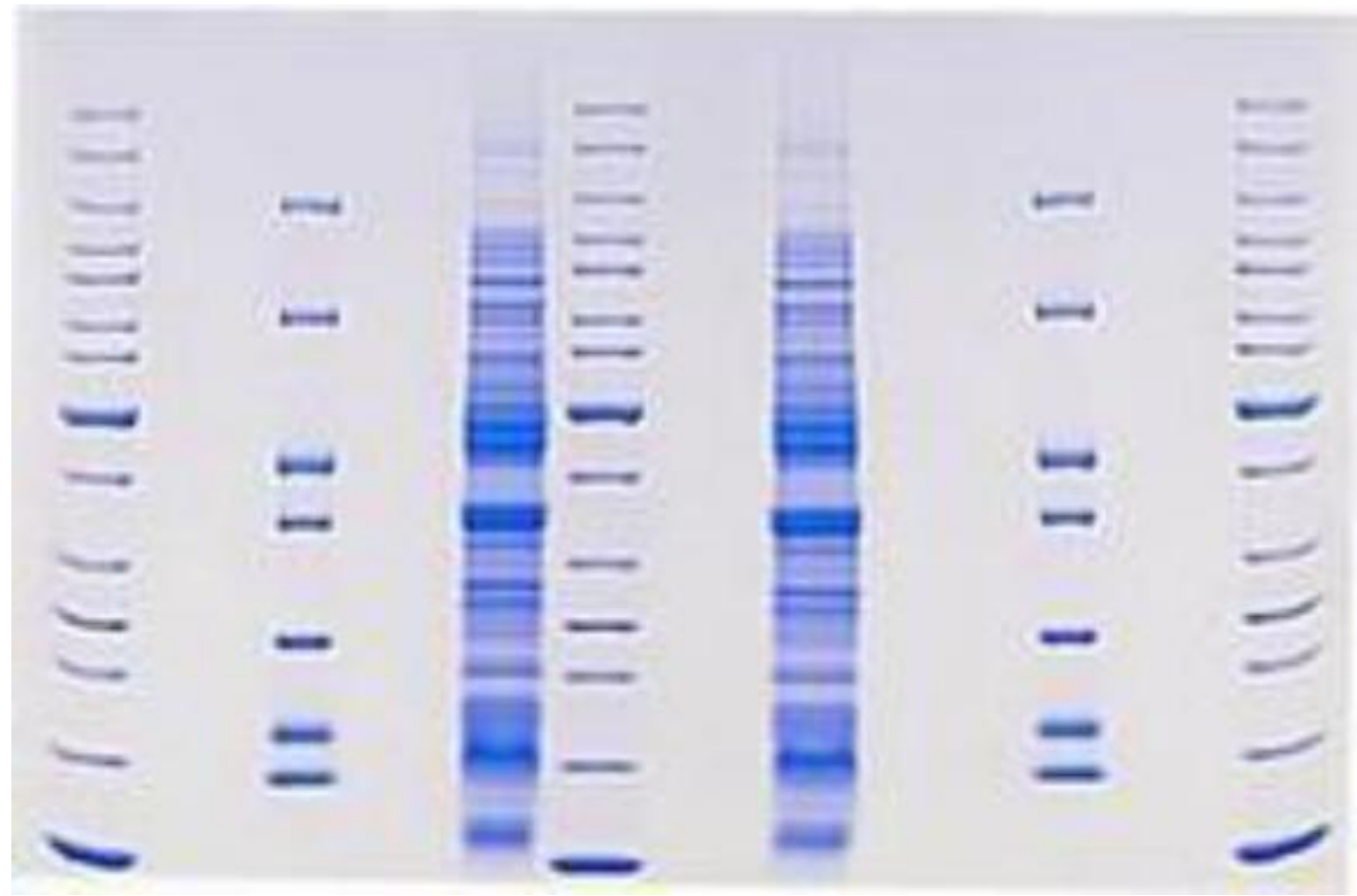


SDS-PAGE视频 ( 2分钟 )



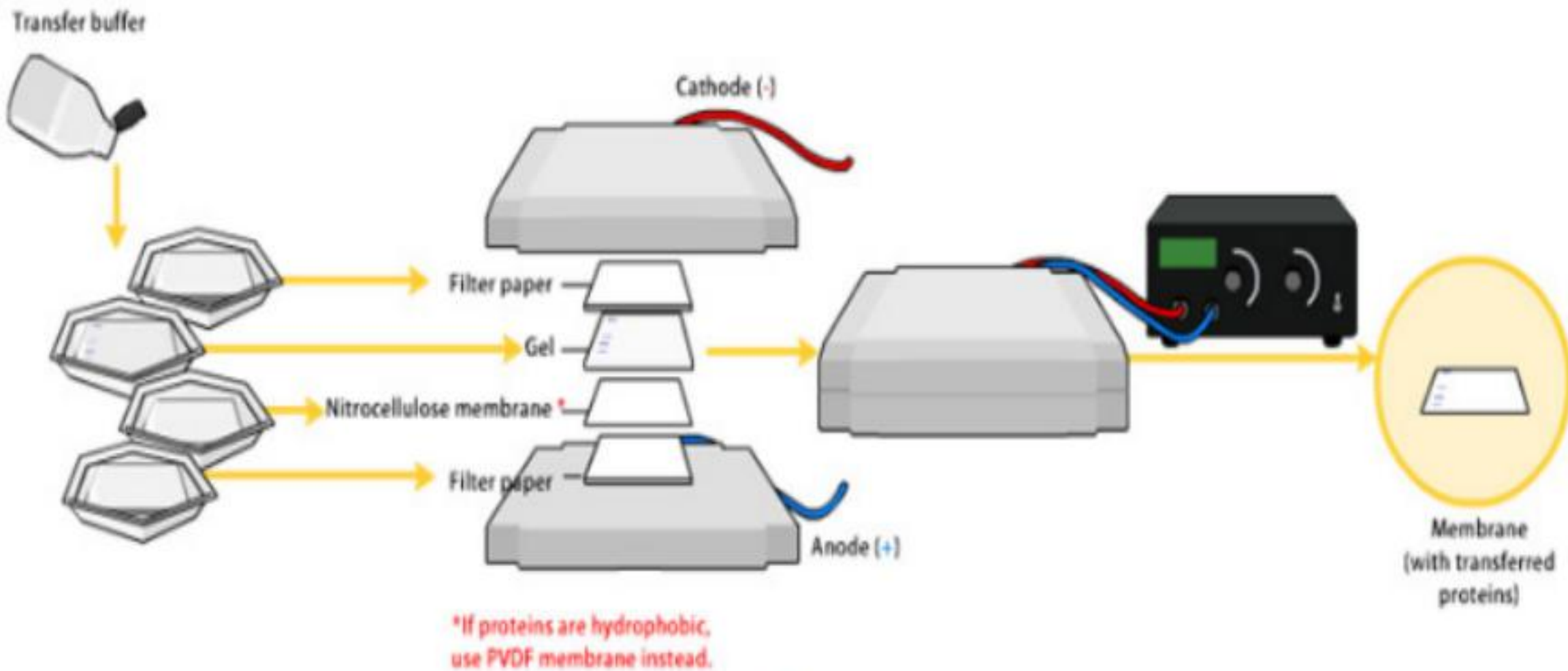


# 考马斯亮蓝染色结果





# 转膜



转膜及免疫杂交视频（5分钟）



垂直槽剥胶铲

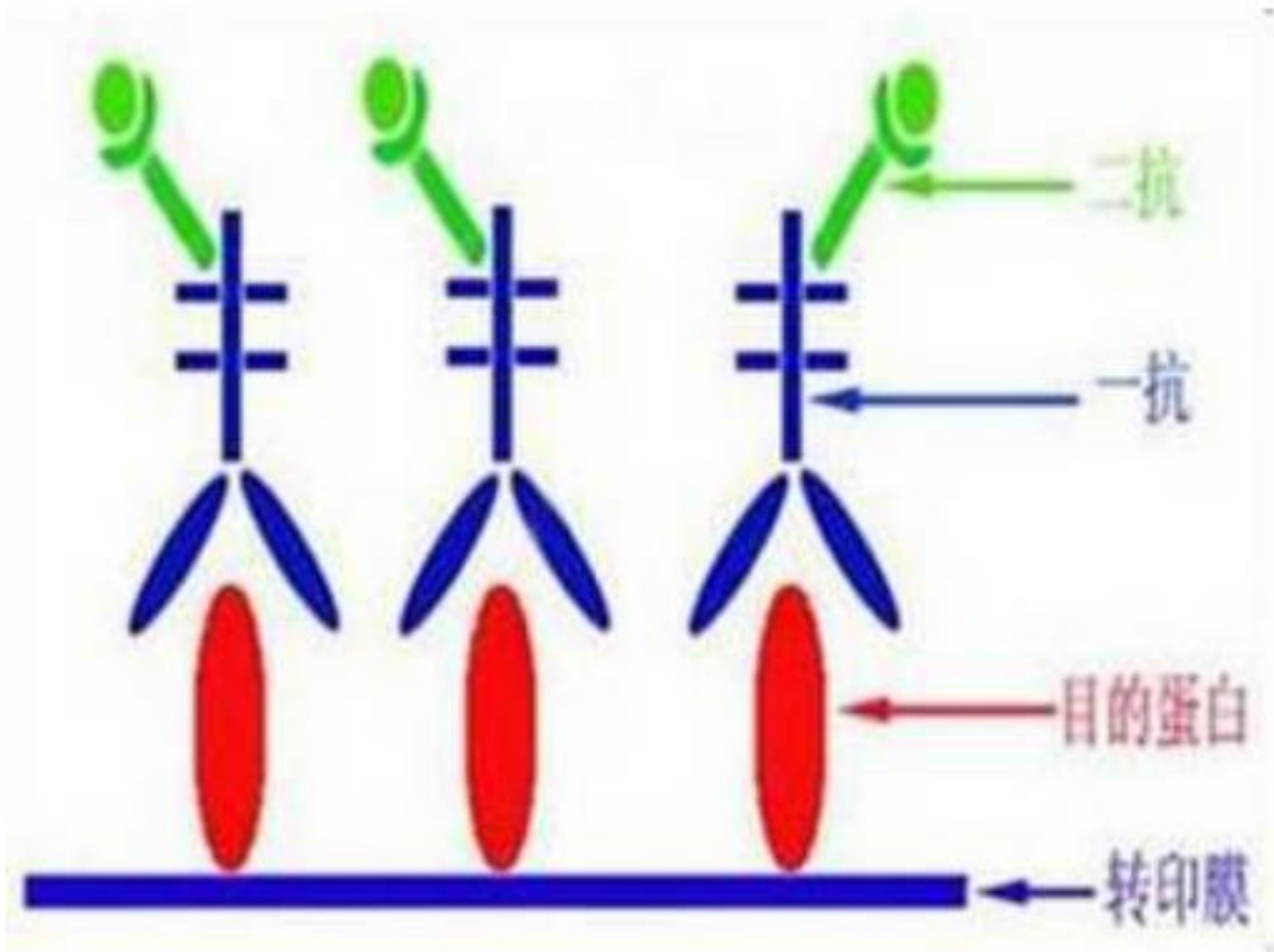


半干转膜仪





# 免疫杂交

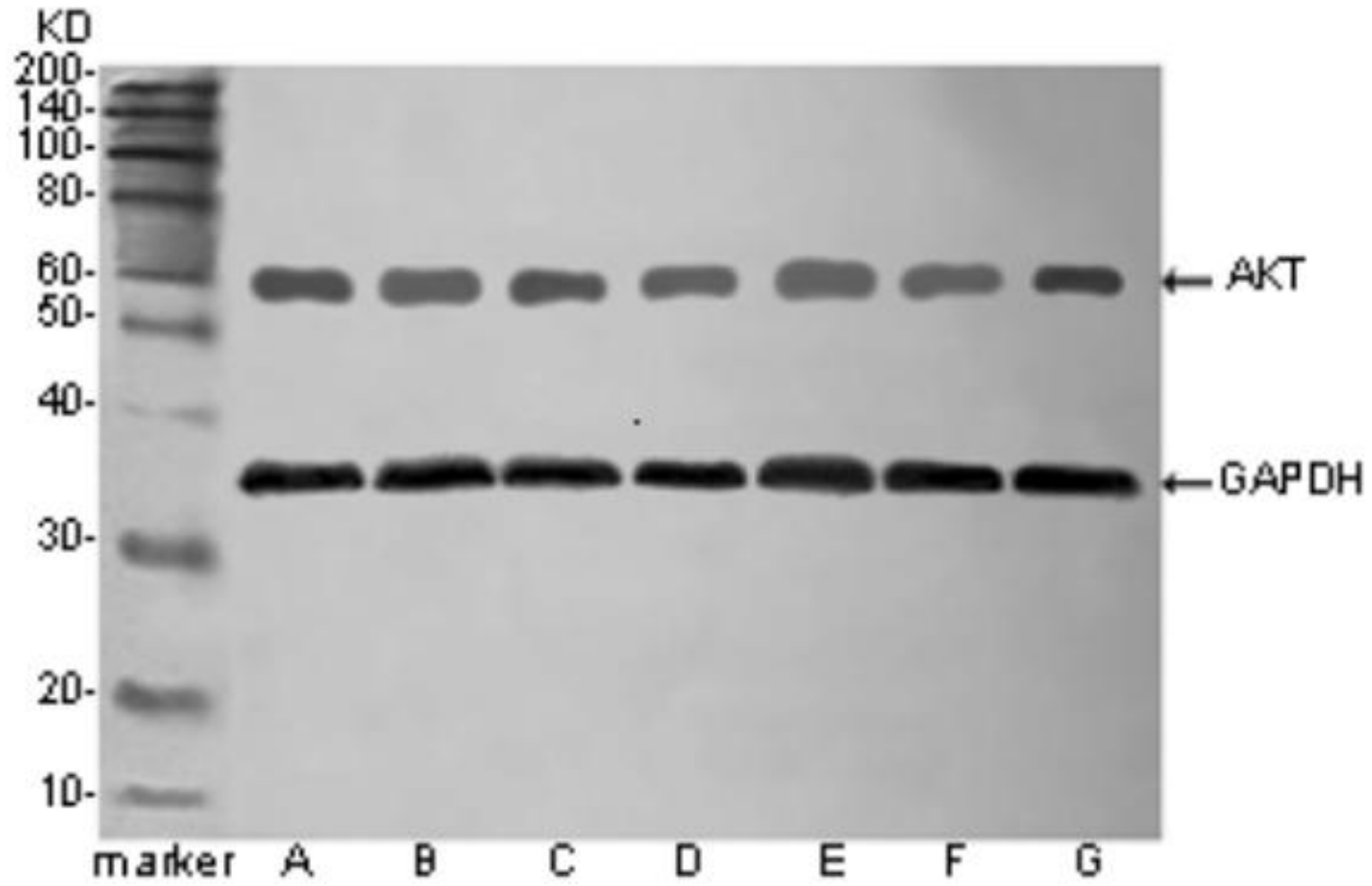




荧光



# 曝光结果





# 结果分析

## Image J软件

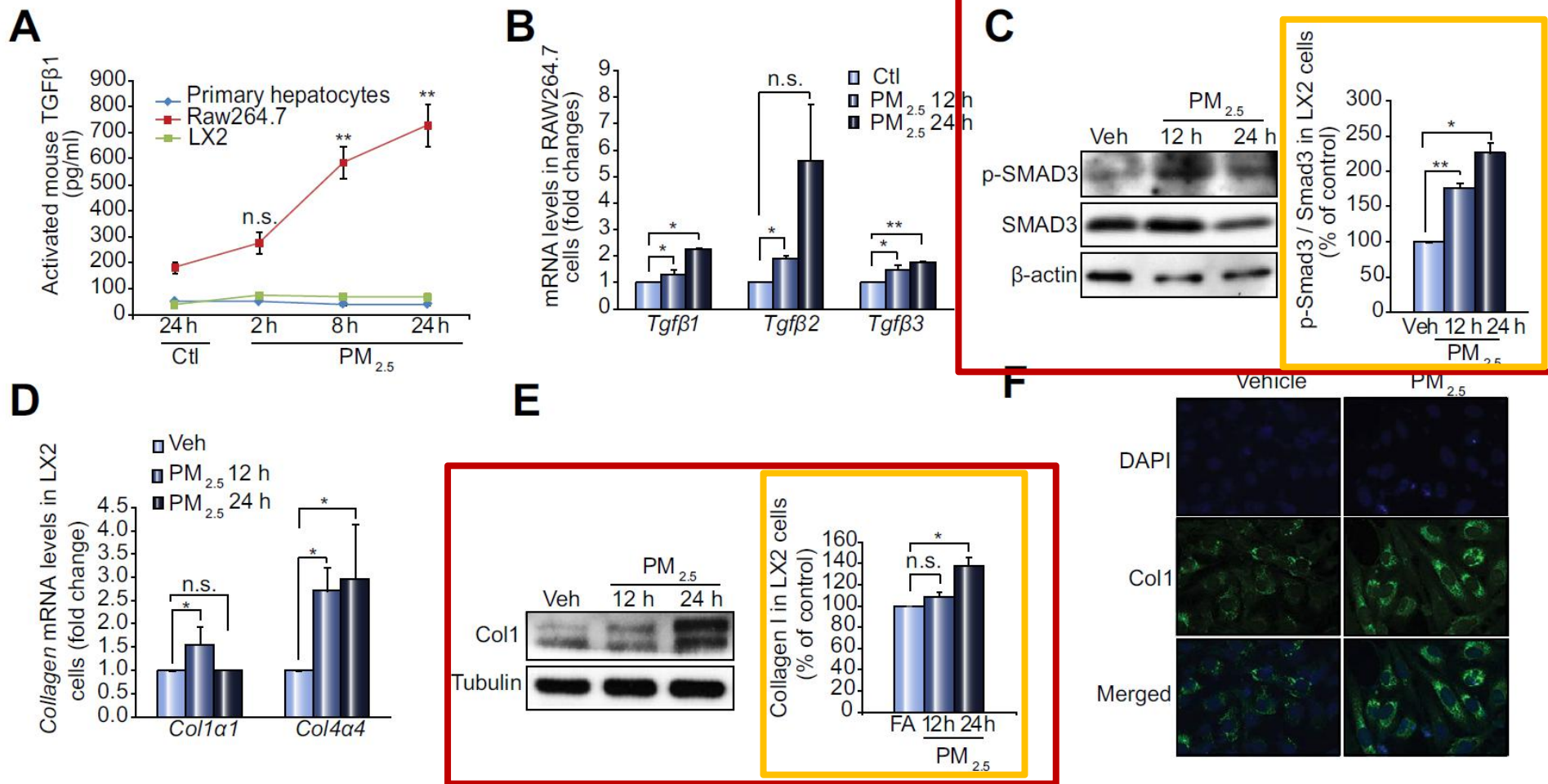




# Image J 软件分析Western Blot结果方法



# 举例—PM<sub>2.5</sub>导致巨噬细胞TGF-β信号通路激活，肝脏细胞中胶原水平升高

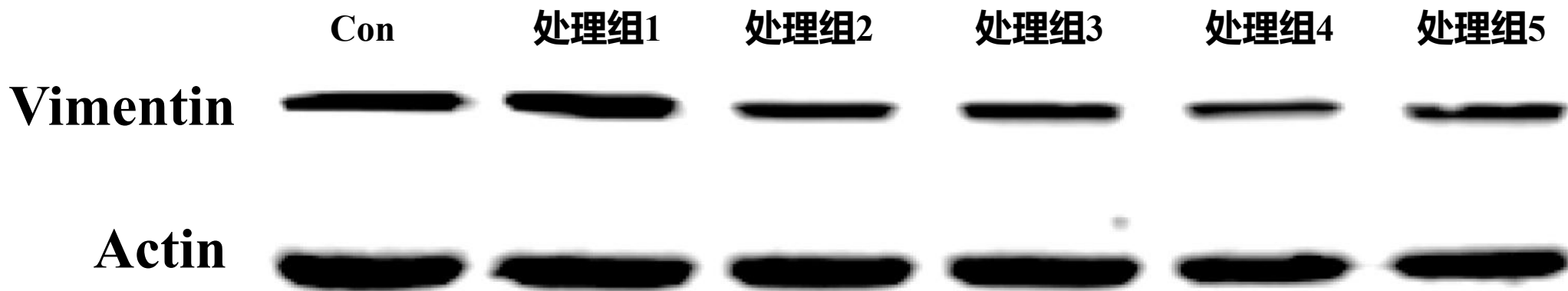


SCI论文中，western blot的实验结果一般需要进行灰度和统计分析（图中黄色框标注）。

- LX-2, a human HSC cell line; **p-SMAD3**: a key mediator of TGFβ-triggered fibrotic response.



# 课程举例

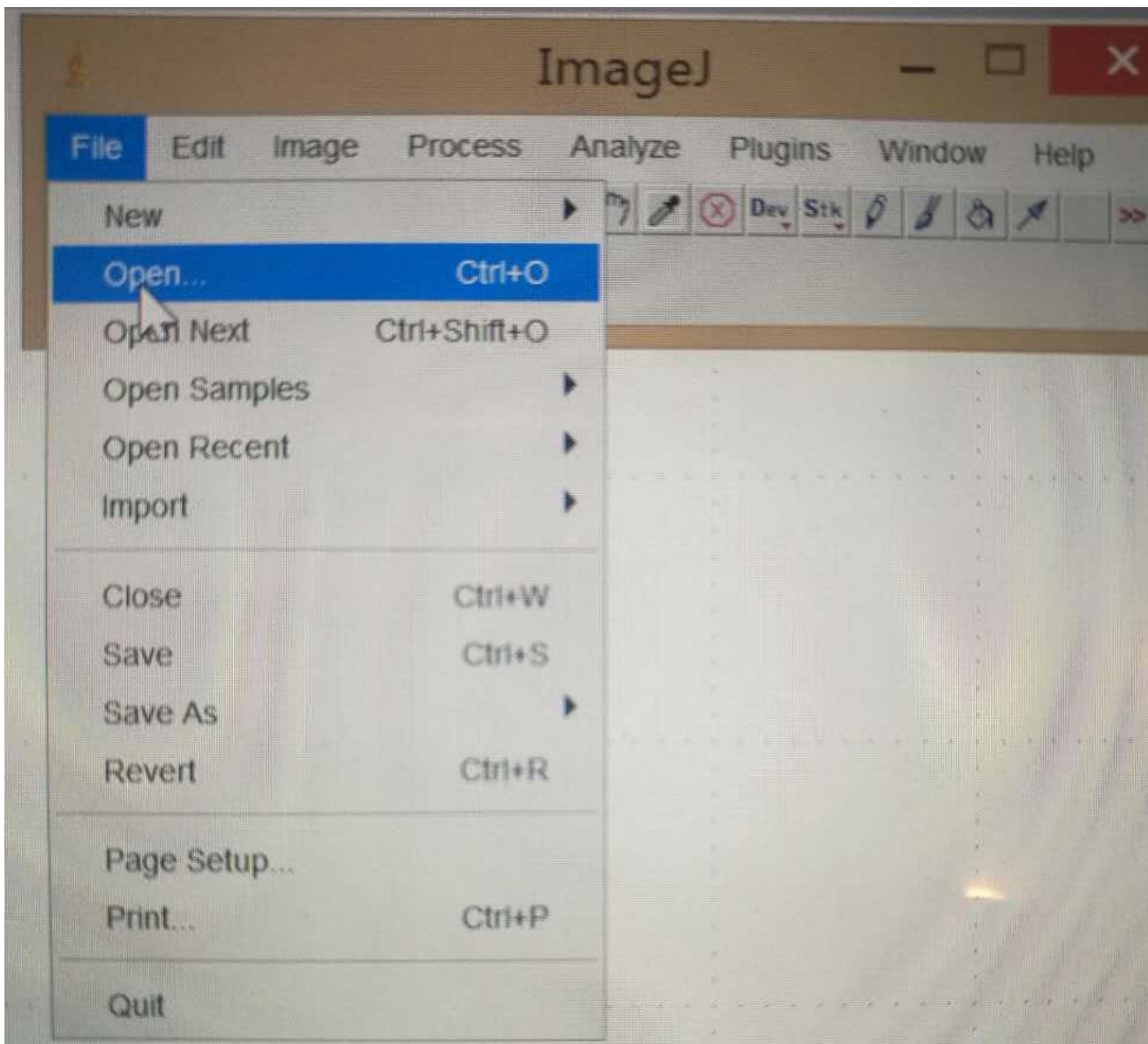


**一般Western blot实验结果中，需要同时做目的蛋白（如图中的Vimentin）和内参蛋白（如图中的Actin、GAPDH、Tublin）的WB。其中，内参蛋白用于矫正上样量，避免因蛋白量的不同，导致目的蛋白表达水平出现误差。**

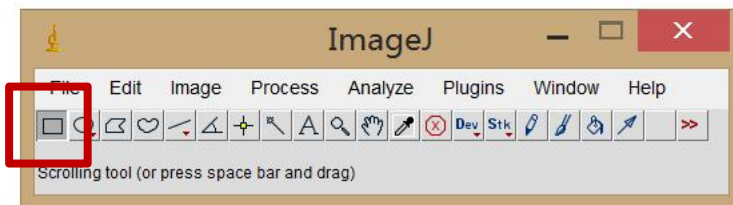


# 使用ImageJ软件分析条带

- 分别分析目的蛋白、内参蛋白条带的灰度，然后进行比对。
- 请大家按照下面步骤进行操作。



**首先打开Image J软件，选择Open，打开我们要分析的图片。打开之后，就是下面一张PPT中的模式。**

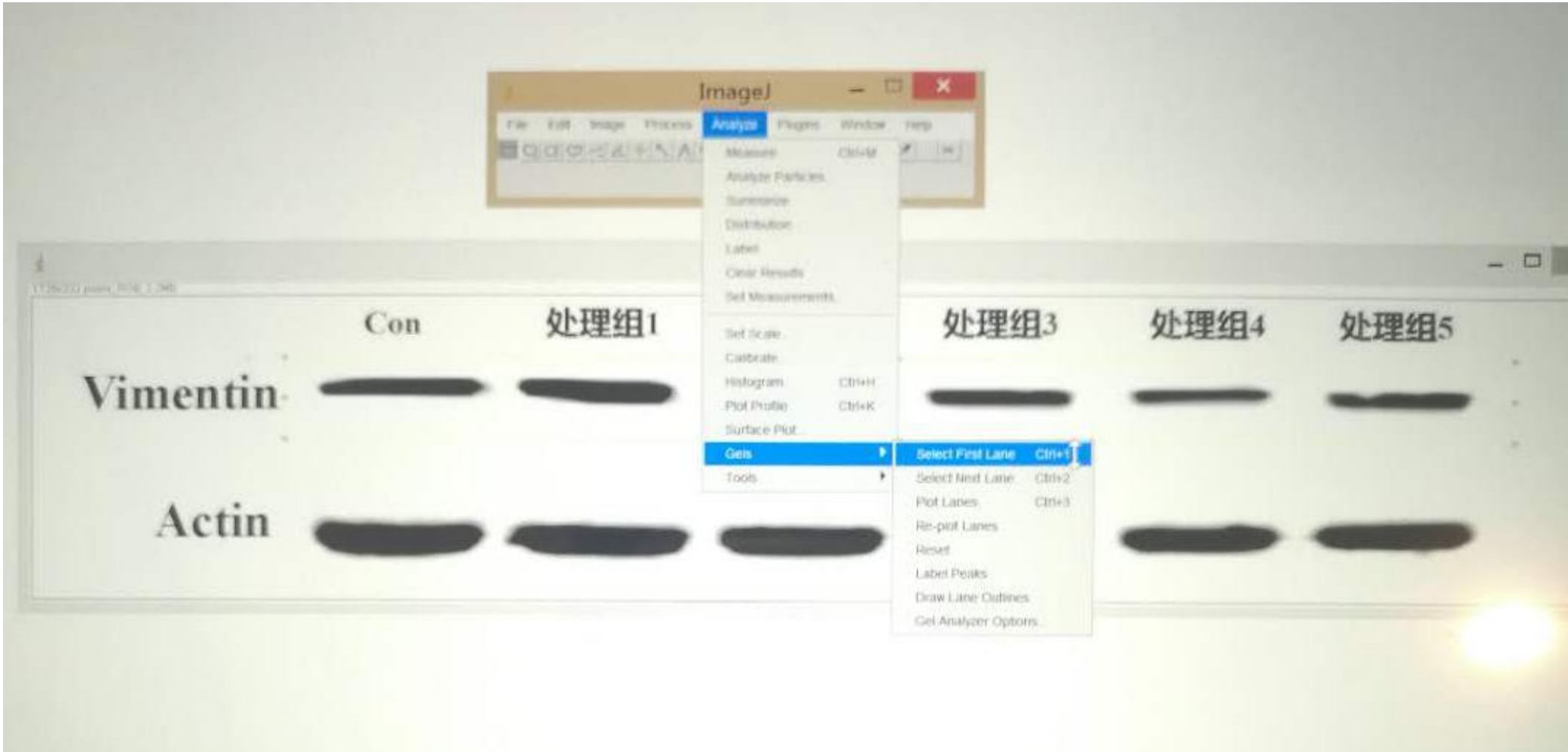


点击下面一行最左边的框框。

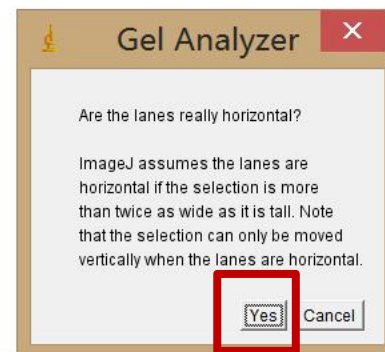
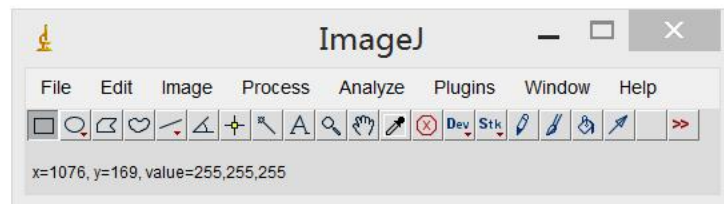




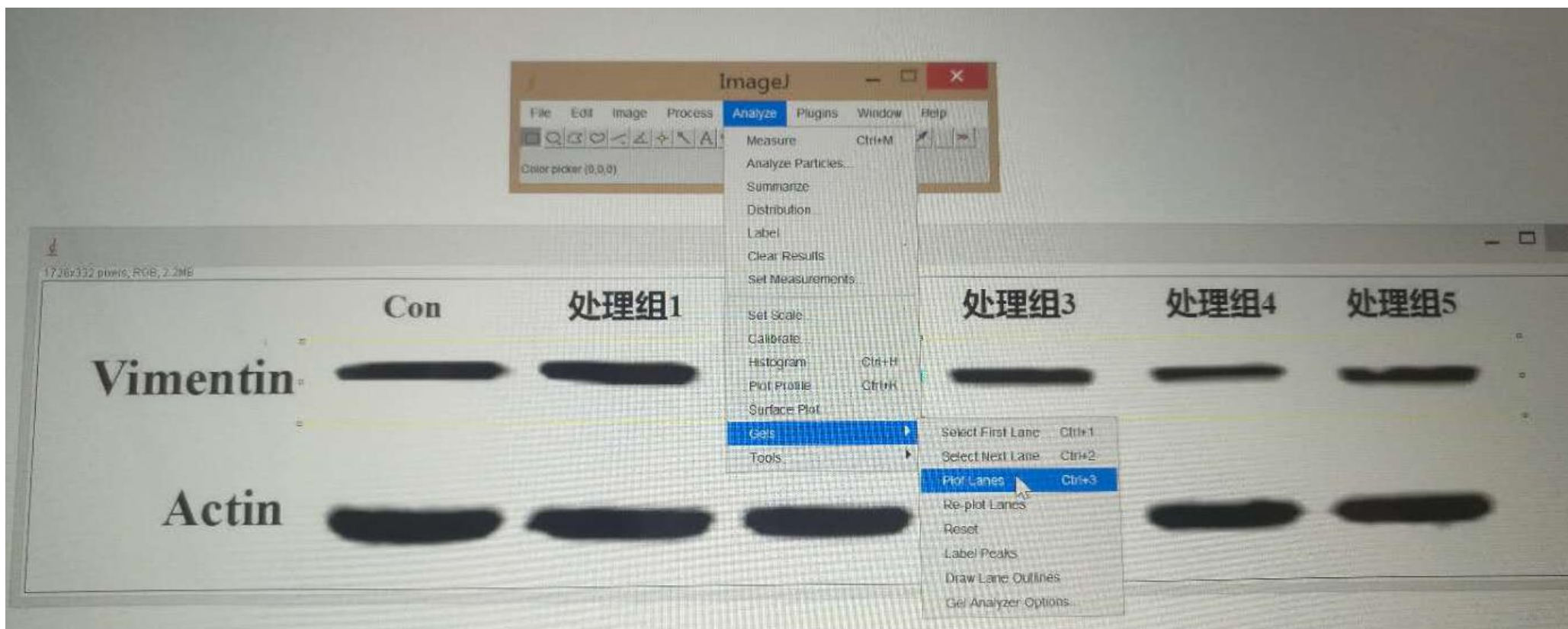




**点击Analyze--Gels--Select lane**



**出现这个界面，点击“Yes”**

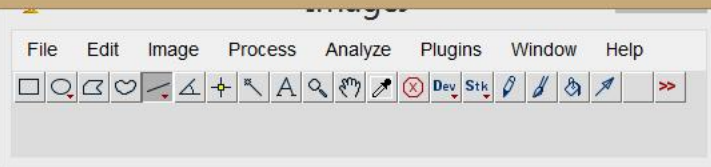
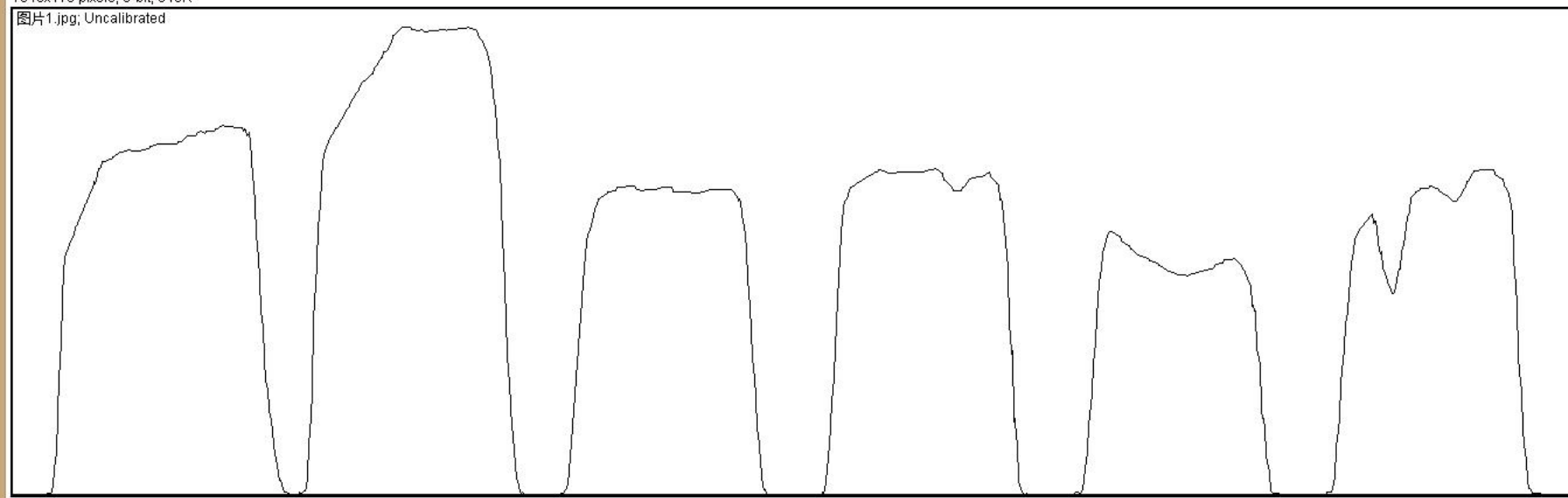


**点击Analyze--Gels--Plot lanes，出现下面的界面**

Plots of 图片1

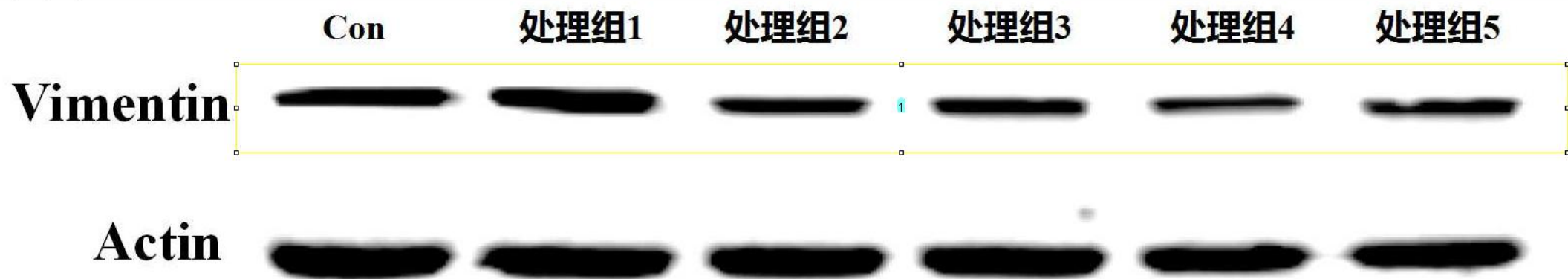
1343x418 pixels; 8-bit; 548K

图片1.jpg; Uncalibrated



图片1.jpg

1726x332 pixels; RGB; 2.2MB







**挨个点击，会出现一系列数字。  
这个就是条带的灰度值。**

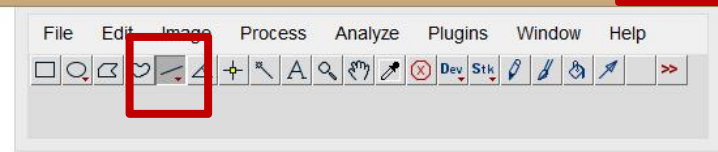
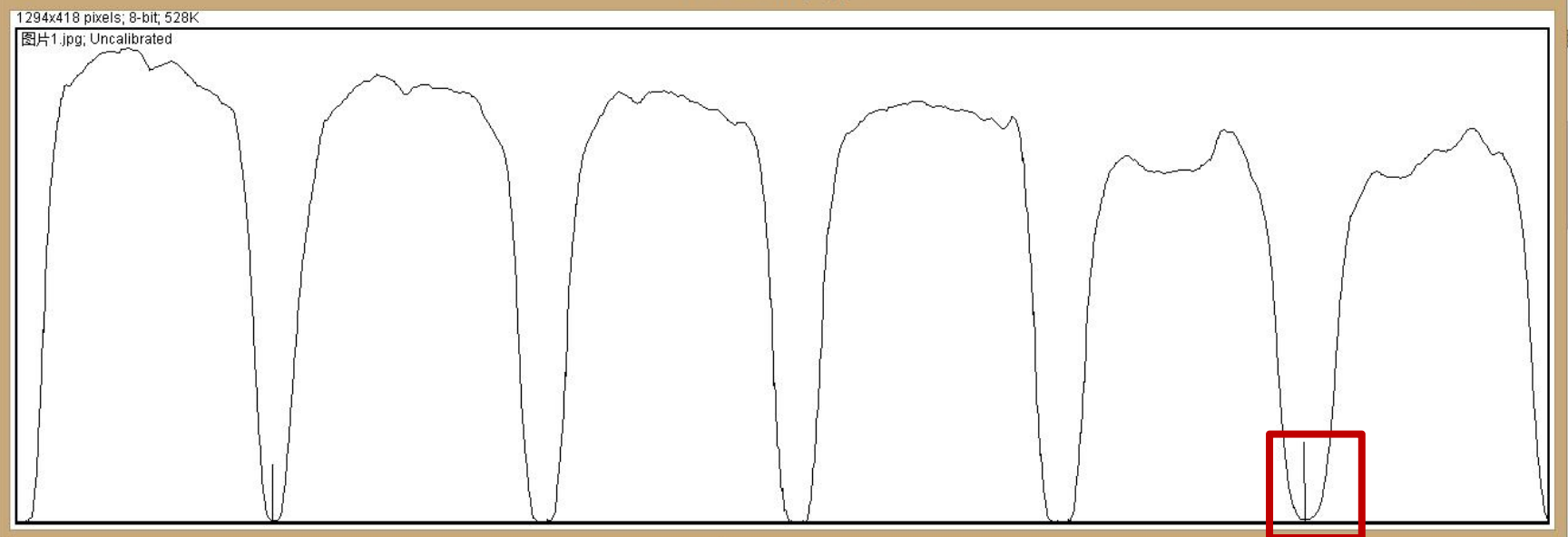
**数据拷贝到EXCEL中。**



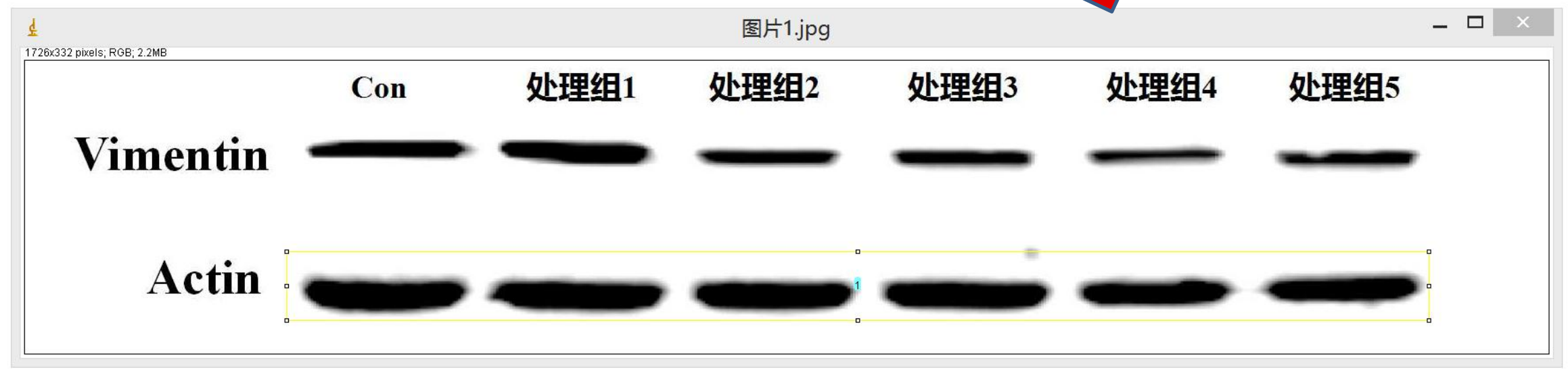
- 然后按照上面的步骤，将内参蛋白Actin的灰度进行分析。

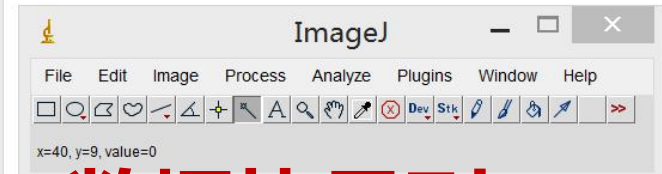
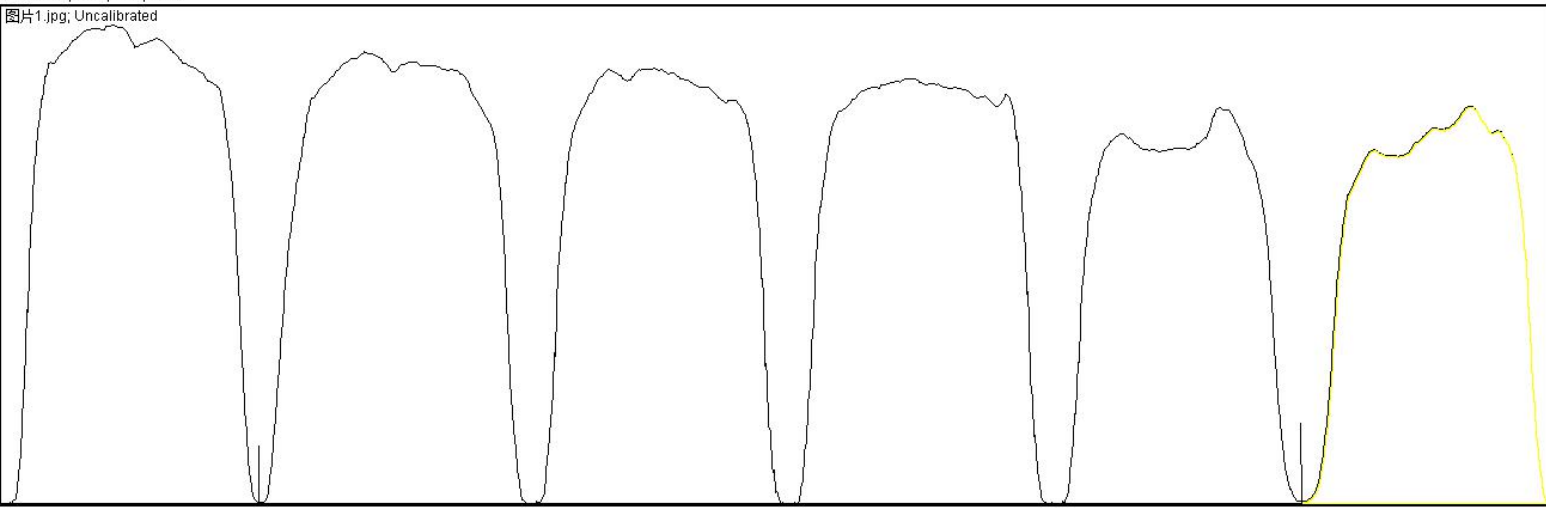


Plots of 图片1



如果相邻条带中间没有分开的话，使用下面一系列中的直线按钮，进行隔开。

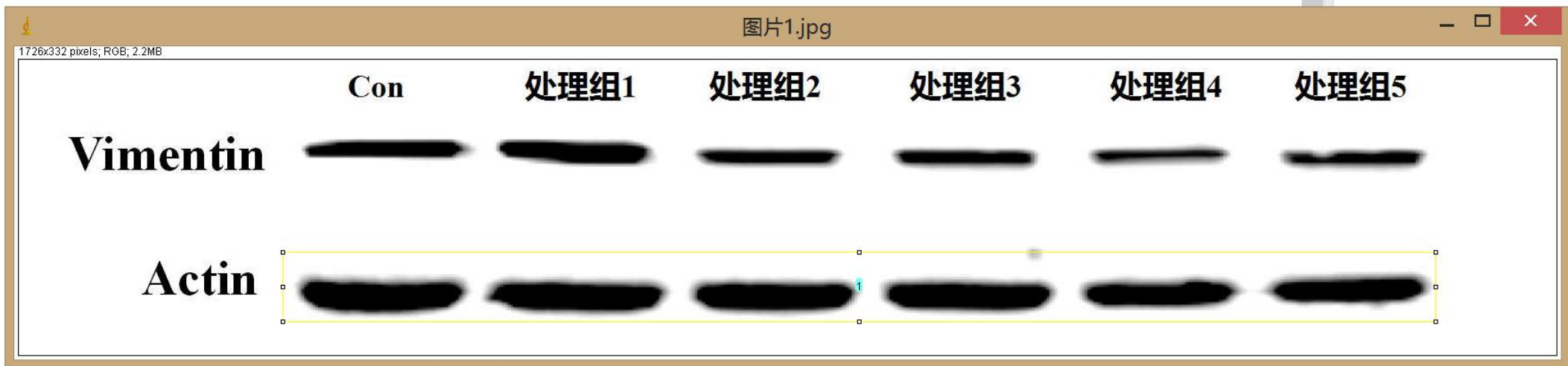




数据拷贝到EXCEL中。

Results window showing a table with 6 rows and 2 columns. The first column contains numbers 1 through 6, and the second column contains area values.

|   | Area      |
|---|-----------|
| 1 | 65815.430 |
| 2 | 65676.673 |
| 3 | 59469.187 |
| 4 | 60846.288 |
| 5 | 48476.480 |
| 6 | 49541.551 |





| Vimentin |          | actin |           | Vimentin/actin |
|----------|----------|-------|-----------|----------------|
| 1        | 50550.68 | 1     | 65807.43  | =F12/J12       |
| 2        | 60272.29 | 2     | 65665.673 |                |
| 3        | 38455.23 | 3     | 59458.773 |                |
| 4        | 40664.25 | 4     | 60970.288 |                |
| 5        | 28681.2  | 5     | 48476.894 |                |
| 6        | 36884.53 | 6     | 49523.844 |                |

**将Vimentin的灰度数值比Actin的灰度数值，进行校正。**



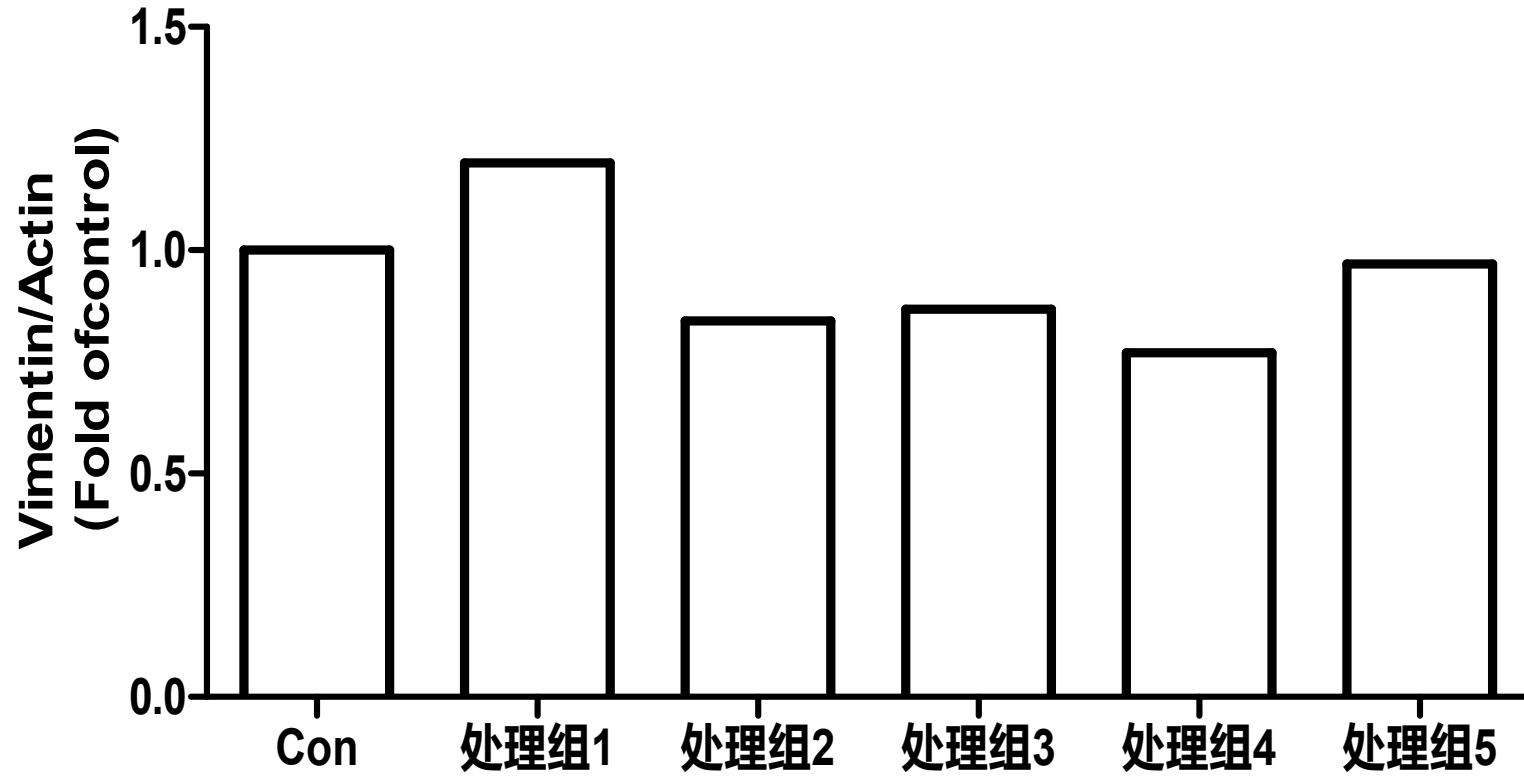
|   | Vimentin |  |  | actin       | Vimentin/actin | 将Control组的数据 |
|---|----------|--|--|-------------|----------------|--------------|
| 1 | 50550.68 |  |  | 1 65807.43  | 0.768160692    | =L12/0.768   |
| 2 | 60272.29 |  |  | 2 65665.673 | 0.917865991    |              |
| 3 | 38455.23 |  |  | 3 59458.773 | 0.646754433    |              |
| 4 | 40664.25 |  |  | 4 60970.288 | 0.666951844    |              |
| 5 | 28681.2  |  |  | 5 48476.894 | 0.591646734    |              |
| 6 | 36884.53 |  |  | 6 49523.844 | 0.74478326     |              |

**校正后的数值，比上Control组的数值，进行归一处理。**



|   | Vimentin |   | actin     | Vimentin/actin | 将Control组的数据归一 |
|---|----------|---|-----------|----------------|----------------|
| 1 | 50550.68 | 1 | 65807.43  | 0.768160692    | 1.000209235    |
| 2 | 60272.29 | 2 | 65665.673 | 0.917865991    | 1.195138009    |
| 3 | 38455.23 | 3 | 59458.773 | 0.646754433    | 0.842128168    |
| 4 | 40664.25 | 4 | 60970.288 | 0.666951844    | 0.86842688     |
| 5 | 28681.2  | 5 | 48476.894 | 0.591646734    | 0.770373351    |
| 6 | 36884.53 | 6 | 49523.844 | 0.74478326     | 0.96976987     |

**此数据可以用于组图啦！因为咱们没有提供三次重复的图片结果，所以，做出来的图没有办法做统计学分析。**







# 数据结果

