

苏州大学转化医学研究院

# 研究生科研记录簿

学院 转化医学研究院 专业 生物学

研究生类别 博士

(博士/学术型硕士/专业学位硕士)

课题名称: NIN1介导的质膜裂解影响皮肤炎症的机制

研究生姓名: 时玉珠 学号: 20254050010

导师姓名: 时玉舫 李培山

使用日期: 自 2025年 6月起至 2025年 12月止

不得缺页改号, 用毕归档

(请使用碳素或蓝黑墨水)

2025年7月18日

NINJI antibody 纯化 (Semm)

### 一、偶联柱:

溴化氰活化琼脂糖凝胶 4B (CNBr-Activated Agarose, C500099-0005)

基本特征: 基质 高度交联4%琼脂糖

平均粒径 40-165  $\mu\text{m}$

功能基团 -CN

偶联效率 (18-30 mg/ml BSA) / (25-60 mg/ml 乳凝蛋白酶)

偶联条件 pH 8-10 (水相/有机相)

配体 多糖、蛋白、核酸、抗体及其他 -NH<sub>2</sub> 配基

耐受条件 4-45 $^{\circ}\text{C}$ ; 8M 尿素, 6M 盐酸胍; 70% EtOH

偶联时间 1-16h

最大流速指标 80cm/h 0.1 bar

保存时间 4 $^{\circ}\text{C}$ -8 $^{\circ}\text{C}$  18个月; -20 $^{\circ}\text{C}$  保存24个月

步骤: 1. 称取 2mg NINJI peptide 溶于 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中 (pH 8.3);

2. 用 5倍体积 (5 mL) 1mM HCl 平衡浸泡填料;

3. 将清洗后的填料加入溶解后的多肽, 在摇床上震荡;

4 $^{\circ}\text{C}$  偶联 2h; 1.5 mL

4. 封闭未反应位点: 直接加入 20mg 甘氨酸粉末加入填料上清液

或偶联后的上清液抽滤后加入 3 mL 0.1M Tris-HCl (pH 8.3)

摇床上震荡 3h 封闭

5. 偶联后的条带用 0.5M NaCl 加 10 mL 洗, 再用 ddH<sub>2</sub>O 洗 10 mL 体积,

6. 保存用 20% 乙醇。

### 二、偶联血清中的抗体:

1. 采血、血清, 3000 rpm, 30min 预先离心; 10000 rpm, 5min 再离

2. 取 3 mL 含抗体血清, 56 $^{\circ}\text{C}$  加热 30min 灭活补体

3. 加血清入填料柱, 4 $^{\circ}\text{C}$  旋转过夜

4. 去上清液, 保留。

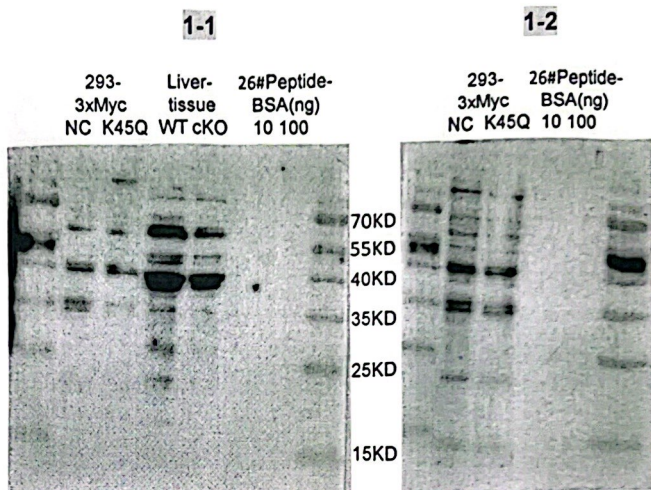
4. 用 PBS (PH 7.4) 洗涤 4 次
5. 用 1mM Tris-HCl (PH 7.8) 洗脱两次, 加入 50uL 1M Tris-HCl (PH 9.5) 将 PH 调至 7-8. 测蛋白浓度
6. 用 PBS 大量冲洗偶联柱, 4℃ 保存. PBS 1ml 洗后也保留

三、测抗原步骤 4.5.6. 蛋白浓度

三、浓缩抗体:

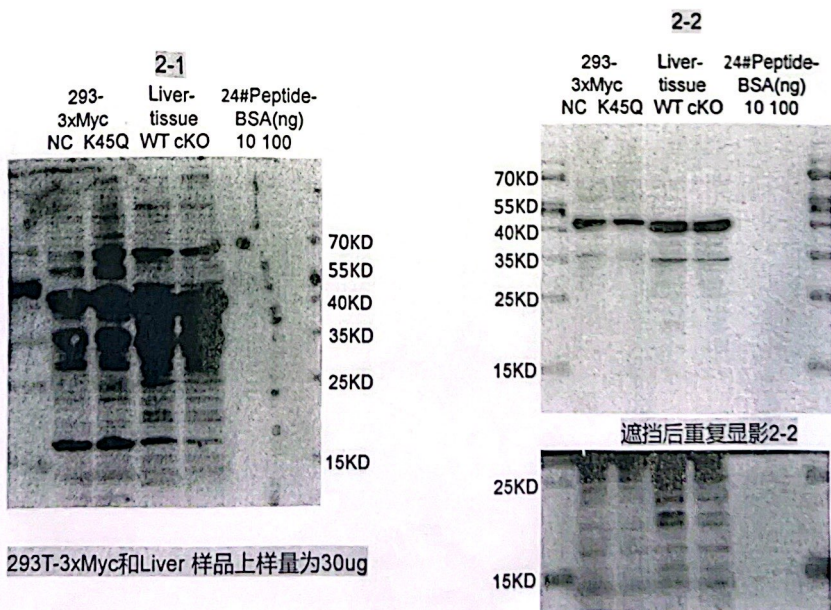
1. 超滤管 5kd, 2ml 抗体, + 3ml PBS. 收集得到 900uL 左右  
3000g, 5min x 2次
2. 收集后加 20mg BSA, 10% 甘油, 保存于 -20℃

四、Western 验证. 2025年7月19日跑 Western, 20日验证显影结果



293T-3xMyc和Liver 样品上样量为30ug

1# 与抗体无明显条带  
血清无效



293T-3xMyc和Liver 样品上样量为30ug

2# 1  
mouse liver 可能有  
293T 瞬转 无  
↓  
不确定, 需重复

2025年7月21日 抗体纯化 (重复)

样品: 抗体纯化早期收集的 serum. (5月25日 1# Rb, 6月11号的 2# Rb)

共 10ml,

实验步骤 = 同前 (使用已偶联的 CNBr 柱) 超滤之前使用脱盐柱。

脱盐柱步骤: 1. 将滤液使用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤,

2. 脱盐柱平衡 (体积扩大 2ml  $\rightarrow$  5ml) 重力法. 移除脱盐柱的下堵头, 将脱盐柱的下堵头浸润到 PBS (抗体的 buffer), 从上倾口倒出多余液体.

3. 向脱盐柱加入 5ml PBS, 重力流出, 3-5次.

4. 向脱盐柱上筛板中央加入 2ml 样品液, 补加 0.5ml PBS, 使加总 2.5ml. (不回收)

5. 加入 6ml PBS (收集), 收集到 5ml.

2ml  $\rightarrow$  5ml

超滤离心: 50kd 离心管, 3000g, 10min 收集到 400-500  $\mu$ l 抗体.

保存: 1. 加入 400  $\mu$ l 甘油, 使终浓度为 50%

2. 测浓度 0.596 mg/ml

3.  $-20^{\circ}\text{C}$  保存.

抗体验证: WB. - 2025年7月25日

蛋白样品: 293T  $\langle$  Nc  $\rangle$  ; liver  $\langle$  WT  $\rangle$   $\langle$  CKO  $\rangle$   $\langle$  K50  $\rangle$

收到血清样品: (mouse) 2025年7月25日

多肽抗原: 1# KLH-0023; BSA-0024

免疫血清: 23-1#, 23-2#, 23-3#

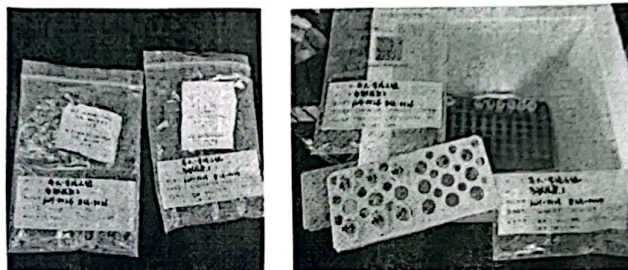
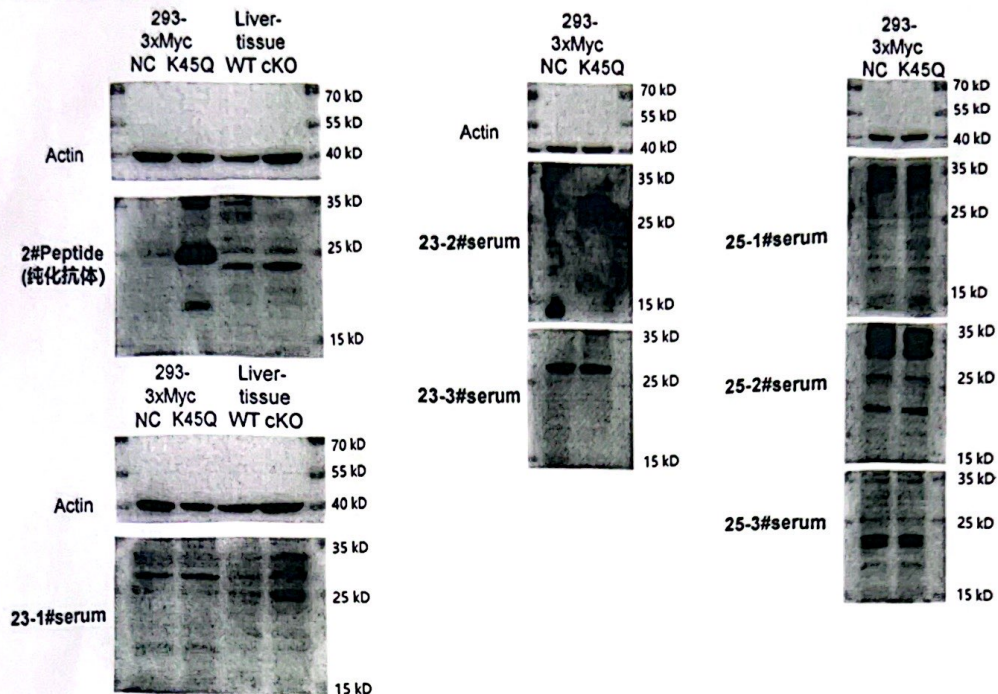
多肽抗原: 2# KLH-0025; BSA-0026

免疫血清: 25-1#, 25-2#, 25-3#

2025年7月25日

接7月21日抗体纯化、WB验证结果。

20250725-26 WB



多肽抗原1#: KLH-0023; BSA-0024  
 免疫血清(mouse): 23-1#; 23-2#; 23-3#

多肽抗原2#: KLH-0025; BSA-0026  
 免疫血清(mouse): 25-1#; 25-2#; 25-3#