发放日期	
归档日期	
指导教师（签字）	
第 1 本	共 本

苏州大学研究生科研记录本

（自然科学类专业用）

论文题目：ACSL1改善心肌梗死后心脏纤维化的分子机制

培养单位：苏州大学附属第三医院

专　　业：内科学(心血管病学)

姓　　名：陈　晶

学　　号：20245235007

指导教师：陶丽婷

使用起止时间：

记录起止页码：

科研名称：Western Blot（蛋白质免疫印迹法）　　日期：2024 年 8 月 3 日

（自制胶 / 预制胶）

WB可用自制胶或预制胶进行实验，仅初始步骤不一致，转膜后步骤均一致

使用福建斯 15孔/12孔 预制胶，货号 CAT: FMS-PB420 ⇒ 2~8°C保存

一、WB大致流程/原理

①制胶/预制胶 ⟶ 蛋白上样 → 电泳 → 转膜 → 封闭 → 一抗 → TBST漂洗 → 二抗-曝光

②原理：待测样蛋白根据其性质（分子量大小）采用电泳方法将蛋白分离，再通过电流将凝胶上的蛋白质转移到PVDF膜，利用一抗与目的蛋白结合，二抗与一抗结合，最后在曝光仪下使蛋白显影。

二、过程

1. 物品准备

WB仪器、电泳液、无水乙醇、快速转膜液、1×TBST、牛奶、BSA、PVDF膜 {0.45mm / 0.22mm}

一抗、二抗、~~曝光~~ TBST（1×，10×）、吐温

2、过程

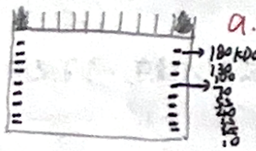
①制胶（见前）　预制胶 = 1L ddH₂O + 电泳粉

②配制电泳液（1L电泳液 = 900ml ddH₂O + 100ml 电泳液），将自制胶从ddH₂O中取出，夹到电泳夹上，并倒入电泳液（中间倒满），自制胶处于极相对夹住，并垂直缓慢拔出齿梳

（两自制胶中间必须加入新电泳液，外周可加回电泳液）

1°电泳 下

③加样：



a. 先加对照组，再加实验组，最后加 marker（2ml）→ prestained protein ladder

金从-20°C取出后，先震荡，再离心上样

上

④ 开始电泳，电泳夹上红色电极方向 红对红，黑对黑，~~对电泳~~

自制胶 先 80V 30min ~ 1h 压，再按stop，调压 120V 至 最后

凝胶间准备事物　a. 裁 PVDF膜，长6cm，宽9cm；左上角切掉三角形

b. 配转膜液　{小分子 0.22mm PVDF / 大分子 0.45mm}

c. 活化 PVDF膜

d. 因转膜快产冰水浴，所以先冷水加冰块

科研名称：　　日期：　年　月　日

2°转膜

a. 当电泳结束后，主动甲醇乙醇平衡 PVDF膜
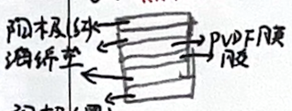
b. 配转膜液 = 700ml ddH₂O + 200ml 无水乙醇 + 100ml 转膜缓液

c. 海绵垫（预湿两面）用转膜缓液浸湿，找到转膜夹

↓

成1面负、转膜1反

d. 黑胶白膜



撬开1夹缓冲板取膜，切除浓缩胶，特胶方向正面海绵垫上，盖上PVDF膜（必须赶上所有气泡），夹上转膜夹，特转膜夹插放在冰盒中，

（转膜夹与槽中一黑对黑，红对红）

加满转膜液，盖上盖子，放满冰1夹，　400mA 40min

3°封闭

2.5g 牛奶 + 50ml TBST(1X) 振荡，摇床上摇 1h~2h，

封闭结束后，1×TBST 洗3遍，每遍5min

{10×TBST 等天天，粉状 + 1L ddH₂O / 配1×TBST = 100ml 10× + 900ml ddH₂O + 1ml吐温}

4°敷一抗

不同一抗有不同稀释比例；先配 BSA（2.5g BSA + 50ml TBST

a. GAPDH：武汉三鹰　1:1000　（1ml 5%BSA in TBST + 1μl 抗体）

b. 4-HNE：　1:1000　　10X

4°C 平放 敷 夜

5。敷二抗

冰箱拿出来后，加 1X TBST 洗 3遍，每次5min，

查所敷一抗所对应需敷的二抗 {兔二抗 1:1000，敷 1~2h，1×TBST洗3遍，每次5~10min / 鼠二抗 1:1000}

6°显影+曝光

①曝光液（避光）= 1ml Buffer A + 1ml Buffer B

②将泡在 TBST 中的膜取出，正面（蛋白面朝上）方向入曝光液中，化学发光法显条

科研名称：动物组织Trizol法提RNA　　日期：2024 年 8 月 5日

1. 准备：4℃ PBS、无水乙醇、trizol（棕黑瓶，强腐蚀性）、氯仿（4℃预冷）、
切组织前，EP管先编好号　无酶EP管（1.5ml）、冰盒和研磨盒、氧化锆研磨珠（含组织用钢珠）
离心机、DEPC水（4℃）、异丙醇（棕黑瓶，常温或预冷）

2. 切动物组织（20~50mg），在预冷的PBS中漂洗2次，滤纸吸干样本上残留液体，
用镊子转移样本至冰盒的研磨管中，分次入2步次氧化锆研磨珠，
加入1ml预冷trizol，设置参数上机研究

心脏组织
同研磨不充分再次研磨

3. 离心机先预冷至4℃，12000rpm，离心10min，吸上清至已预冷离心管，静置
分离5min

4. 加氯仿（Trizol：氯仿=5:1），即每管加200μl氯仿（氯仿密度大，会分层-下层，且快
单次加样，再用涡旋机振荡15~30s，常温静置10min
（上层无色，下层粉红有机层，中层是无色水相层，RNA主要在水相层）

5. 离心；4℃，12000rpm，15min，离心后轻轻取出，中间层白色是RNA，遇热会降解，
因为是离心管下层（粉红色层）

6. 收集上清，即白色液体，转移至新无酶EP管中，
→ 在用移液枪时，为避免吸到下层红色用250μl吸2次，每次吸取更换枪头）

7. 加异丙醇（上清：异丙醇=2:1），异丙醇可沉淀RNA，500μl/管加入异丙醇，
上下颠倒轻轻混匀，常温静置10min，（等待期间可配置75%乙醇）
400ml 75%乙醇 = 300ml 无水乙醇 + 100ml ddH₂O

8. 离心：4℃，12000rpm，10min，离心后弃上清（可直接倒吸倒），底部白色沉淀为RNA

9. 加入预冷 75% 乙醇 1ml/管，洗涤沉淀蛋白质和有机类物质

100μl枪头低行吹打，悬浮沉淀，4℃，12000rpm，10min后弃上清（尽量避免手
触碰到沉淀处）

10. 室温通风干燥EP管，开盖倒置5min，正置10min（最后为底部成闪亮状）

11. 20μl的DEPC溶解RNA沉淀（轻轻沉淀底部加，若打在管壁上会使底部无法完全溶解）
加速RNA溶解，→ 加入DEPC后冰上放置，防RNA降解　若沾上有机溶剂，会导致RNA降解

12. 55℃，5min加热（促进RNA溶解）-80℃保存备用

科研名称：　　日期：　　年　月　日

09 参数设置及研磨珠参考

蛋白质提取

产品名称	研磨珠	频率	研磨时间	暂停时间	循环数	建议提取液
植物茎、叶	钢制研磨珠 3mm*3 4mm*1	60Hz	60s	15s	3	蛋白提取液
大小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑	钢制研磨珠 3mm*2 4mm*1	60Hz	30s	15s	2	蛋白提取液
大小鼠的胃、肠、肌肉、脂肪	钢制研磨珠 3mm*2 4mm*1	60Hz	45s	15s	2	蛋白提取液
大小鼠的皮肤、耳、尾巴、血管	钢制研磨珠 3mm*3 4mm*2	70Hz	60s	20s	3	蛋白提取液
大小鼠的软骨、毛发、硬骨骼	钢制研磨珠 3mm*4 4mm*2	70Hz	90s	20s	3	蛋白提取液

（该条件仅作参考，实验时可根据研磨效果随时调整。）

RNA 提取

产品名称	研磨珠	频率	研磨时间	暂停时间	循环数	建议提取液
植物茎、叶	氧化锆研磨珠 3mm*3 4mm*1	60Hz	60s	15s	3	RNA 提取液
大小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑	氧化锆研磨珠 3mm*2 4mm*1	60Hz	30s	15s	2	RNA 提取液
大小鼠的胃、肠、肌肉、脂肪	氧化锆研磨珠 3mm*3 4mm*2	60Hz	45s	15s	2	RNA 提取液
大小鼠的皮肤、耳、尾巴、血管	氧化锆研磨珠 3mm*4 4mm*2	70Hz	60s	20s	3	RNA 提取液
大小鼠的软骨、毛发、硬骨骼	氧化锆研磨珠 3mm*3 4mm*4	70Hz	90s	20s	3	RNA 提取液

（该条件仅作参考，实验时可根据研磨效果随时调整。）

1ml trizol 最多裂解 100mg 组织

科研名称：细胞传代　　日期：2024 年 8 月 18 日

传代贴壁细胞NIH 3t3（小鼠胚胎成纤维细胞），T25 cm²培养瓶进行细胞传代（大瓶所依试剂量是小瓶2倍）

物品准备：4℃冰箱取出 10%FBS（高糖 4.5g/L DMEm培养基）、PBS、0.25% trypsin-EDTA 胰酶
T25培养瓶、枪头、废液缸

1、先查看细胞生长情况：75%酒精擦洗枪头、台子，人从37℃ CO_2 孵育箱中取出需传代培养瓶（不可握住培养瓶头部，这里不是密闭处，故应握住瓶底部，且后底部依次朝上）
显微镜下先 4x 观察细胞密度，10x 观察有无污染
细胞均匀铺至 70%-80% 培养瓶，即生长情况良好，则可传代

2、配液
10% FBS = 45ml 高糖DMEm + 5ml 血清
1% FBS = 5mL 10% FBS + 450 ml 空DMEm

3、弃液：a打开培养瓶盖，将培养液倾倒于废液缸
b. 加2~3ml PBS，大瓶加4~6 ml PBS冲洗原瓶中FBS，冲瓶口打入，不可冲出细胞
手动晃动冲洗残留培养液

4、T25小瓶加入 1ml 胰酶，放入37℃箱中，1min后加4 ml 10% FBS 终止消化；轻轻弃液并轻轻左右反复吹洗底面，冲掉未脱落细胞，并将液体移到 15ml 离心瓶中离心不观察是否完全消化

5、离心，1000rpm，5min

6、重悬：倾倒离心后上清液，加3~4ml 10% FBS 培养液重悬；轻轻吹打细胞团块混匀（尽量不要吹出气泡）

7、培养瓶准备：根据需要按 1:5 或 1:10 进行传代，在培养瓶中加入 5-7 ml 10% FBS 培养液
每个瓶贴号写好标记 eg：Pt 3t3 1:5 0818 cj
（一般复为按1:4传，否则会导致细胞太稀，无法生长）

8、加好后，井字晃动 10~20s，使细胞均匀分布于培养瓶，并轻轻将培养瓶放入37℃孵箱，隔日查看细胞生长情况

9、整理：将多余所有试剂用封口膜封住，放回冰箱
量程调至最大量程，收拾实验废弃物，酒精棉球擦洗超净台、拍打开紫外线，倒垃圾

科研名称：布板　　日期：2024 年 8 月 20 日

物品准备：4块6孔板、10% FBS 培养液、PBS 缓冲液、0.25% Trypsin（消化酶）
计数板（红色盒装着）、计数器

过程：① 收集细胞，制成单细胞悬液
② 细胞计数
③ 细胞铺板

1、取出细胞：将细胞从孵育箱中取出，放在显微镜下看生长情况及是否被污染

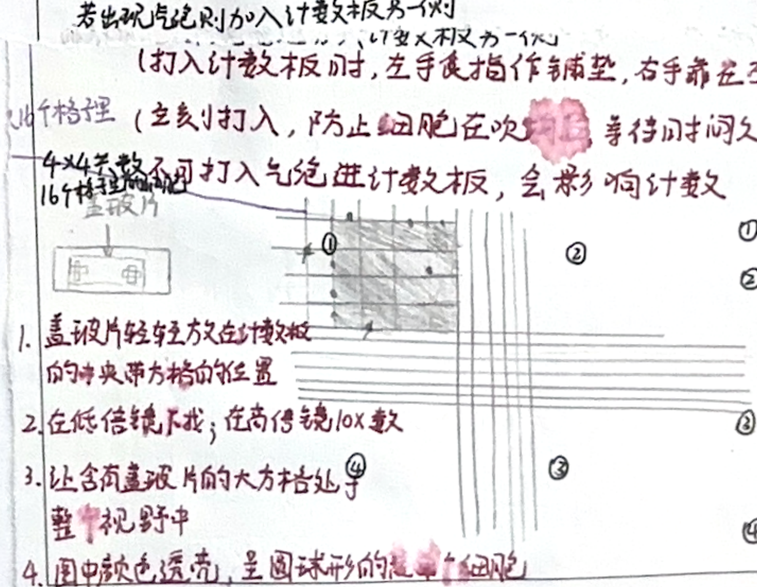
2、弃液：弃去培养液，加入2ml PBS缓冲液于小瓶清洗，后弃液
洗去培养基中的杂质（血清、死细胞），防止影响胰酶消化

3、消化、终止消化：依次倒完PBS后，迅速加入1ml胰酶每于小瓶培养瓶中，
手指点#字晃动，放入37℃孵育箱消化 60s~120s，取出后立显微镜下观察细胞是否完全消化（呈圆形），后加入4ml 10% FBS终止消化后轻吹并瓦壁瓶

4、离心：将小瓶培养瓶中5ml液体移入离心管，配平，1000 rpm，5min

5、重悬：弃掉离心后上清液，加0.4ml 1% FBS于离心管中重悬，轻轻吹打吹匀（尽量不要有气泡）

6、准备计数板、盖玻片：吹均后，立刻小吸 10ul 沿玻片与计数本反相插前出的边缘，缓慢打出细胞悬液，打入计数板一侧，打入时不可出现气泡；
若出现气泡则加入计数板另一侧
（打入计数板前时，左手食指作辅垫，右手靠在左手食指上，倾斜45°）
16个格理（立刻打入，防止细胞在吹[illegible]等待时间久出现下沉）
4×4共数不同打入气泡进计数板，会影响计数



1. 盖玻片轻轻方文在计数板的两夹带方格的位置
2. 在低倍镜下找；在高倍镜10x数
3. 让含有盖玻片的大方格处于④整个视野中
4. 图中颜色透亮，呈圆球形的是单个细胞而不规则形状，且黑色的一般是死细胞或其他杂质

① 只计算四周4个的细胞数，不计中间格
② 若在四周出现①中，则计上不计下
计下不计上
③ 良好的细胞计数又时一个格 80~100
一块板则是 320~400
④ 计算4个区域细胞数 / 4 = 每块板所须细胞数

科研名称：测RNA浓度　　日期：2024 年 9 月 13日

注：1、全程注意温度，RNA不稳定，全程冰上保存

2、RNA不稳定，不可在震荡机上震，且放在 -80°C 冰箱

3、加样时先吹匀，不要吹出气泡否则会影响浓度

4、吸样，不同样一定要换枪头，并标记好加样顺序

1、取出RNA，从 -80°C 冰箱中取出RNA

2、倒出一管DEPC水，1.5ml EP无酶管，~~每个RNA管内加 2ml DEPC水~~（~~每次加样吹匀~~）用于清洗机器，和后面测出RNA（ng/ul）后加量

~~冰上放置~~

3、仪器：①打开仪器，开整机，

测前与测完后用DEPC水清洗，

中间不管是组内还是不同组间上样前一定要用无纺布擦拭

② 选择 RNA选项

③ 清洗底部、镜头，在测样品前，用2ml DEPC水清洗3次，轻轻夹（加DEPC水，加样呈45°，左手作接头，右手加，保证底部黑点处有样品）对时

④加上DEPC清洗的每一次，DEPC水加在黑点盖上，比用打印在清洗又在测量

⑤上一个样与下一个样加样前一定要用无纺巾拭擦，单次加样，

加加减减 加DEPC水清洗也是要拭擦（第一个清洗的DEPC不记录）

⑥ 一定要记好加样顺序和不同组内之间加DEPC水测，每次吸2ul样测量

加样前吹打几下混匀样本，

因DEPC水内所含核酸(ng/ul)很低，很难区别各组

A260/280

eg: sham1 2 3 4 5 DEPC，MI 1 2 3 4 5 6 7 DEPC，MItsh 1 2、3.4、5.6、7

⑦数据中 $\frac{A260}{A280}$ 在1.8～2.0数据较好，各别数据核酸(ng/ul)过大，可用DEPC水吹打、混匀进行稀释后，再次测量

4、若测完RNA，不进行PCR，则将RNA放入 -80°C；若进行PCR，即变成cDNA（较稳定）放

5、计算：测RNA*机器插入U盘，导出为CUS　前置U盘导出，导出前先拍照防电脑

↓

在D盘中改为exls，用WPS处理

6、加RNA量；不同体系会加不同量

科研名称：　　日期：　　年　　月　　日

拟采用 500ng 或 400ng / RNA浓度 ng/ul = 所需RNA量 ul

一个体系为10ul = 7.5ul体系 { 500ng 或 400ng / RNA(本实验浓度) ng/ul = 所需取RNA量(ul)；再用7.5-RNA(ul) = 所需加DEPC水(ul) }

2.5体系 { RNA酶（黄盖）>-20℃ 0.5ul；5X reaction（蓝盖） 2ul }

①先用一个1.5ml EP管，写好每个样名称，然后加DEPC水，一次性连续加完所有样的DEPC水量

②再从所提取的RNA各中吸入7.5ul体系所需的RNA至对应的DEPC各中

（加RNA时，各个加样应对应到下面样品，吹2下，打出一个小泡然后拔出）

2.5ul体系即mix体系 { RNA酶（黄盖 100ul） 0.5ul；5X reaction（蓝盖 400ul） 2.0ul }

~~盖~~盖回，连续取样法取

若有38个样，保险是再乘44倍

44个样 ⇒ { RNA酶 0.5ul×44 = 22ul；5X reaction 2.0ul×44 = 88ul }

↓

a.先拿好mix体系，然后加入一个事先准备的1.5ml EP管

b.先加5X reaction 蓝盖（因液体粘稠，且用量大），采用连续加样法加，避免因液体粘稠，引起管壁上的残留

c.再在EP管中加入RNA酶（黄盖），加完后充分混匀

d.最后在每个7.5体系中即(RNA+DEPC)水中加入2.5ul mix，沿壁加，手动打匀

最后按紧放入掌中宝内离心，充分混匀

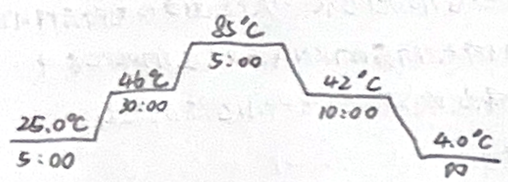
科研名称：逆转录　　日期：2024 年 9月14日

1、打开机器

2、选 Browse method → TLC 2（即普通PCR）

3. Reaction volumn 10ul
   Cover Temberature 106.0

4. 程序



5、先把程序点好，再放样品（防止上一个没跑完，温度高影响）

6. start Run

7. 逆转录完后，变成CDNA，较稳定，放入 -20℃

引物第一次跑PCR需要跑溶解曲线
且观察是否出现单峰，单峰才能证明引物正常

科研名称：qPCR　　日期：2024 年 9月15日

注：1、跑目的时一定也要跑内参

2、内参：β-actin、GAPDH、HPRT
（跑动物内参：GAPDH、HPRT）
GAPDH、HPRT配

3、生工片段：引物母液 = 10ul 前导段 + 10ul 后导段 + 180ul DEPC水
（配一次即是配成 200ul，用不完则提分装，避免反复动刚）

端粒家族物：前导段：后导段 = 1:1（按多少配多少，且不用DEPC水配）

1、体系

根据逆转录来算，用400ng逆转录
放大时，可缺成

1个体系 10ul	最初体系		现在（改进）10.5个体系，当DNA	现CDNA每一个样为 10ul	
5ul	0.5ul	CDNA	1ul CDNA → 0.5ul	1ul×10 = 10ul	CDNA
	4.5ul	DEPC	4ul DEPC 4.5ul	40ul	DEPC
5ul	0.5ul	引物母液	1ul 引物母液	10ul	引物母液
	4.5ul	SYBR	4.5ul SYBR	45ul	SYBR

离心

19个样+误差 ⇒ 24个样，

5ul × 24个样 ⇒ 即
- 1ul × 24 = 24ul 引物母液（GAPDH、HPRT、CD36、FA2H引物母液）
- 4.5×24 = 108ul SYBR（油状物，连续加样）

①先取出一个1.5ml EP管，采用连续加样法，先加黑色SYBR（避光）+后加引物母液 ⇒在1个管中避光

②5ul × 24个样 ⇒ 即
- 1×10 = 10ul CDNA（CDNA量少应先离心）
- 4×10 = 40ul DEPC

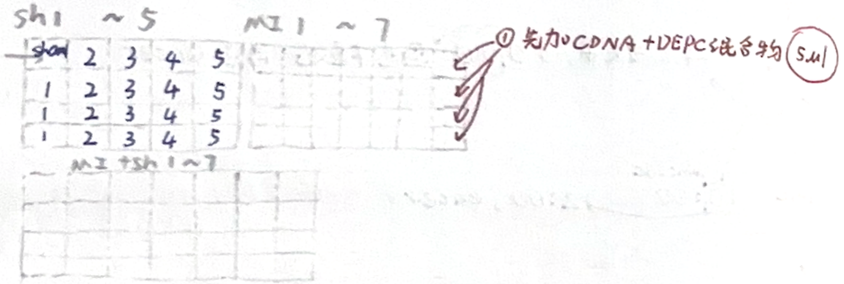
在逆转录完的管子内，即含CDNA管内加DEPC水，先手动混匀（上下混）

2、加样，

有特定板子，在加样前应先布局好

eg：现在有 sh 1～5　　MI 1～7　　MI+shram 1～7（高表达）

有四个引物：GAPDH、HPRT（内参）、CD36、FA2H（目的）

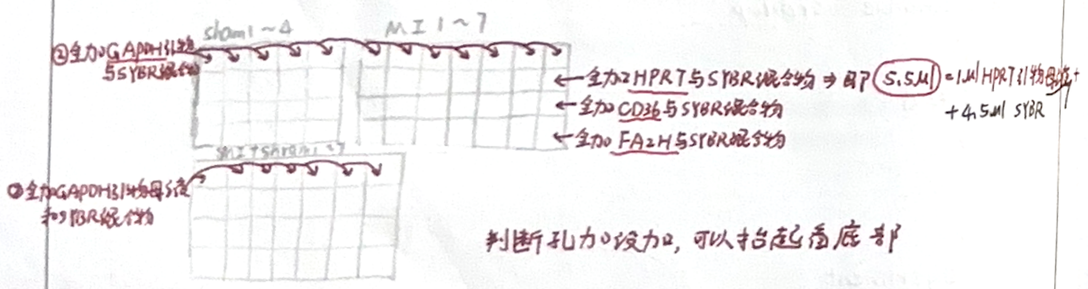


步骤：①先在特定板里先加 cDNA和DEPC水混合物 5μl，一列4个孔 连续加样，点在壁上加样前先轻吹，取出5μl

②盛型加完之后（即cDNA和DEPC水加完每个孔后），先将96孔板拍一下，将型上液体拍到96孔板底部

加样前先离心，做匀 连续加样

③加 5.5μl = 1μl引物母液 + 4.5μl SYBR 混合物，一次加样，此时将一打排，点在壁上不能有虫泡到原先加样处



④加完样后，盖板膜，用一张用膜，只可盖膜的四边和四角，不可角膜膜的中间

将膜下面纸撕掉，覆盖在96孔上，并将四边边和角压实，

（中间膜不可用手角虫碰，用撕掉的纸覆上，小枪头（10μl枪头顶部来压）按住纸覆上处，在用力压住板边撕掉的色纸

⑤盖住之后，~~将板再拍一下，使液体全部在底部~~，并在底部看孔是否加上样的

3、离心　一定要面对手

在用完加完样后，用纸盖住96孔，再离心

①斜着拿出来，再斜着放下去

②不能晃动96孔板，防止下面残体沉淀到用夹上

离心后前

③~~sprecit~~ 上机

a. Real-Time PCR software ⇒ 软件

b. GUEST ok

c. ignore & continue startup

D. open 选程序

d. yes

e. New experiment

d. Experiment Name：自其用命名 → 7500 (96 wells)　　7500 Fast (96 well)

Quantitation - comparative Cr (ΔΔCr)

SYBR Green Reagents

E. plate setup

1. define Targets and samples

add New Target
增加引物要对应（一块板上）

Targets
GAPDH
HPRT
CD36
FA2H

add New sample
sham
MI
MI+sham

2. Assign Targets and sample

① 96孔上各位置对应的引物 → Assign targets to the selected wells

② 96孔上各孔所对应的盘对照 sham 或实号空 MI

Assign sample to the selected wells

科研名称：　　日期：　　年　月　日

3. 最后铿头放在一个孔上，确保出现 { 是否引物 Target：GAPDH ; 是否样本 Sample：M1

4. select the dye to use as the passive reference
选None
↓
F. Run Method
1. open Run method 选 TLC → ok → yes
2. Melt Curve stage 中鼠标放在空白处 点"Delete selected"
↓
G. 把板子放进机器，点 start Run
↓ 一直需设置好直到④，然后 Save；下次点 open → D盘 → 找到已设置好的程序
H. 等2min后可出现时间，出现 remain 剩余时间
↓
I. 保存数据
先点96孔上面框 → export → Browse位置 → 放入自己文档 → open
↓
start export
↓
然后又拼
↓
导出 exsl 文档

科研名称：　　日期：　　年　月　日

1. peptide 抑制纤维化
2. 探索 LMO7 抑制纤维化（在成纤维细胞里）

图：
血管纤维化中已证明
(LMO7分子量150kDa) ① LMO7是转化生长因子(TGFβ)和纤维化的关反馈调节因子
② TGFβ可诱导组织、损伤并调节组织重型和伤口愈合
但信号失调导致过量的ECM沉积和纤维化
③证明 TGFβ在体外SMC损伤后诱导LMO7，
LMO7可通过TGFβ通路对关反馈调节限制血管纤维化反应
↓
是TGFβ的靶已基因
(LMO7在正常血管中表达较低，但在血管损伤后被诱导表达)

第一次qPCR结果及解读

内参 Actin 引物	C1~6	LMO7 1~6
	C+TGFβ 1~6	LMO7si+TGF 1~6
LMO7引物	C1~6	LMO7si
	C+TGFβ1~6	LMO7si+TGFβ
peptide 引物		
postn 引物		
α-SMA		
Col1α1		
Col3α1		
cTGFβ		

科研名称：检测纤维化、OE-ACSL1后 ATP　　日期：2026 年 02 月 05日

260205　1. 布板，24孔板，7.5万/ml　3t3

260206　2. 给药

	原浓度	作用浓度	
ACSL1质粒	708.6 ng/ml	0.5 ng/ml	(分装 5ml/管)
ACSL1阴性对照	1344.9 ng/ml	0.5 ng/ml	(分装 2.8ml/管)

0.5 ng/ml × 7ml = 3.5 ng

$\frac{3.5}{X_A(X_C)} = \frac{708.6\,ng/ml\ (1344.9\,ng/ml)}{\cancel{7X_A(X_C)}\ 1000}$ ⟹ $X_A = 4.94\,\mu l$

$X_C = 2.6\,\mu l$

转染 X_A = 4.94μl 质粒 + 700μl opti-men

X_C = 2.6μl 质粒 + 700μl opti-men

B液 = 2×16 + 16×100 = 32μl lipo3000 + 1600μl opti-men

5min后 → X_A + 714μl；X_C + 714μl

15min后 → 加 558.1ml 细胞

260207　3. 12h后换液；收板前24h给TGFβ(1:1000)　24孔 0.5ml/孔

260208　4. 收板，识别ATP

试剂：ATP Assay kit (cat: HY-K0314, MCE)　size: 100T

-20℃, 6month; -80℃ 1year.

试剂冰上裂融：

内含：A液 (100X) 100μl　　标准液(0.5mM) 250μl

B (100X) 1ml　　缓冲液(20X) 1.8ml ⇒ 1X

C (10X) 3ml 裂解液

D (100X) 100μl

标曲：标品浓度梯度 0.5mM → (100X) → 0.5μM = 10ml ddH₂O + 10μl

0μM、0.01μM、0.03μM、0.1μM、0.3μM、0.5μM

0μM = 1ml ddH₂O

0.01μM = 980μl ddH₂O + 20μl (0.5mM)

0.03μM = 940μl + 60μl (100X 0.5mM)

0.1μM = 800μl ddH₂O + 200μl ↑

0.3μM = 400μl ddH₂O + 600μl (100X、0.5mM)

0.5μM = 10ml ddH₂O + 10μl (100X、0.5mM)

科研名称：　　日期：　年　月　日

配制：配后放入-20℃.

缓冲液(1X) = 1.5ml (20X) + 28.5ml ddH₂O

裂解液(1X) = 3ml (C, 10X) + 27ml 缓冲液(ddH₂O)

↓

配 2.5ml (C, 10X) + 22.5 ddH₂O

工作液(1ml) = 40μl A (100X) + 400μl B (10X) + 40μl D (100X) + 880μl 缓冲液 (1ml)

现配现用

24孔板 + 6个标品 ⇒ 30个样，配~~36个~~ 2重复　60个样 → 配 6.6ml

6.6ml = 66μl A (100X) + 660μl B (10X) + 66μl D (100X) + 5808μl 缓冲液

过程：① 吸干培养基(可不用洗板子)，6孔板 200μl/孔 裂解液，反复吹打充分裂解　24孔板 50μl/孔　(吹成绝球)

② 收集至1.5ml EP管

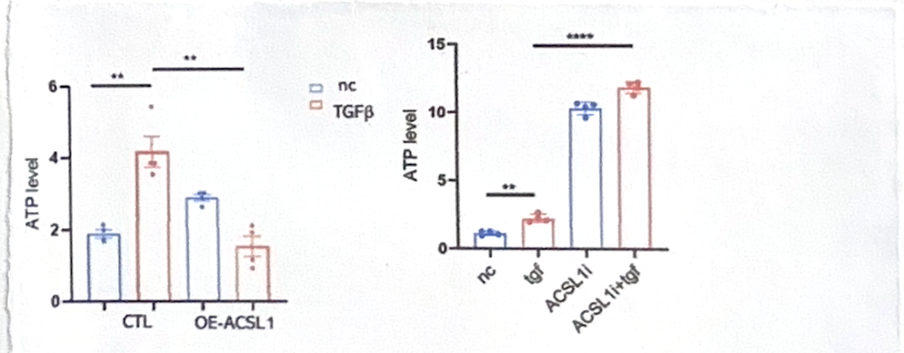
4℃, 12000rpm, 5min 离心

③ 取 珍云天 ATP专用避光黑板 96孔，加 100μl 工作液/孔 至需要加样品、标品孔室温，摇匀，3~5min (中途立刻打开 BCA机)

放置→ABS→

④ 5min后，取样品、标品至加工作液 96孔，二重复，10μl/孔 (样/标品)

⑤ 立即测 OD值，化学发光法



elisa 检测

科研名称：ACSL1 Elisa kit (EK7667)　　日期：2025 年 5 月 31 日

1、物品准备

① 40例健康人血清 (250μl) VS 40例 糖心患者血清 ⇒ 误差50μl，2重复

② 试剂盒内含：

	96孔板 (1块)		
	Sample Diluent	样本稀释液	20ml
	Standard 10ng/ml	标准品	2
✓	Biotin-Conjugate (100X) ✓	120μl	生物素偶联物 (100X)
○	streptavidin-HRP (100X) ○	120μl	链霉素和素-辣根过氧化物酶
✓	Biotin-Conjugate (12ml) ✓	12ml	生物素偶联物稀释液 12ml
○	streptavidin-HRP Diluent ○	12ml	链霉素和素-辣根过氧化物酶稀释液 (12ml)
	wash buffer Concentra	25X 20ml	浓缩洗涤液 (25X)
	stop Solution	6ml	终止液
	Substrate solution	10ml	底物溶液

540/570纳米酶标仪，吸水纸、洗涤槽、37℃孵育箱、排枪

(双位点夹心酶联免疫吸附法)

Y Y

2. 使用前所有试剂恢复至室温；小瓶试剂均先离心

3、试剂自己制

可以摇 ← a. wash buffer (洗涤缓冲液) = 20ml (wash buffer concentrate 25X) + 480ml ddH2O　(洗涤缓冲液浓缩液；先加热至结晶完全溶解 (放37℃力加热?))

(500ml)

离心 b. Biotin-conjugate (1X) = 10ml Biotin-Conjugate (100X) + 990μl Biotin-Conjugate Diluent

生物素偶联物 (1X) = 120μl (100X) + 11880 ml

轻摇，摇会起泡沫 C. streptavidin-HRP (1X) = 10μl streptavidin-HRP (100X) + 990μl streptavidin-HRP Diluent

链霉素和素-辣根过氧化物酶 (1X) = 120ml (100X) + 11880 ml

d. Acsl1 standard ⇒ ① 先6000~10000 rpm 离心 30s

(Acsl1 标准品) ② 加入 1ml Sample Diluent 稀释

↓ 10ng/ml ③ 轻轻涡旋，确保完全且均匀溶解

④ 复溶后必须立即使用

标准品梯度稀释步骤

e. 配制不同浓度的标准品溶液 (ng/mL)

S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
10	5	2.5	1.25	0.625	0.31	0.156	0

科研名称：　　日期：　　年　月　日

4. ①盒子中取出96孔布局表，先写上每个孔对应血清编号(在人血清盖上标明序号)



96孔-2×8=80人(1重复)

第一次操作至2重复

②标好后在每孔加入100μl标准品/样品，再用粘性薄膜覆盖，于37℃孵育2小时

③倒掉96孔板内液体，每孔加250μl wash buffer，洗3遍，倒掉后在纸巾上拍干
(1min/遍)　(洗干净很重要)

5. 洗完3遍后，用排枪每孔加100μl Biotin-Conjugate(1X)，用薄膜覆盖，于37℃孵育1个小时

6. 1h后倒净尽，洗3遍，在纸上擦干，
(wash buffer 250μl/孔)

7. 排枪 100μl/孔加入 streptavidin-HRP(1X)，用薄膜覆盖，于37℃孵育1小时

8. 倒尽，加250μl/孔wash buffer，洗5次，每遍纸上擦尽

9. 每孔加100μl substrate solution，37℃孵育15~20min

10. 20min后，每孔加50μl stop solution (此程中打开酶标仪)，加终止液得迅速测量

11. 5min内，在450nm 570nm酶标仪下测量

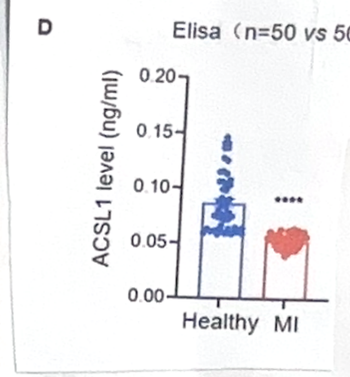
(加终止液前无需倒掉底物溶液)
全程排枪加，除50μl终止液单次加样
连续加样

注：①加样品避免产生泡沫，尽可能别碰触孔壁
②总加样尽量控制在10分钟内
③洗涤很重要，尽量彻底去除液体(用纸吸干液体)，加wash buffer浸泡30s
充分混匀
统计见后

① S7中加250μl储备液(10ng/ml)，S6~S0每管预先加入250μl样本稀释液
② S6：从S7中吸取250μl溶液+S6(原先加250μl稀释液中)，制成S6浓度=5ng/ml
S5：S6混匀后取250μl溶液加入S5　混匀，制成S5浓度=2.5ng/ml
S4：S5
S3
S2
S1
S0：仅含250μl样本稀释液，浓度为0ng/ml

24h内行PCI血清

科研名称：Elisa法识别AMI人血清　　日期：　　年　月　日



人血清中，与正常人相比，MI患者血清中ACSL1↓
与动物、细胞纤维化模型中ACSL1↓一致

在来源心与健康人血清中识别ACSL1；来源心小鼠动物组织PCR识别Acsl1

