

3×5min);

- 4) 滴加加磷酸化 ERK1/2 多克隆抗体 (1: 100), 置 37℃1. 5h, PBS 冲洗 (3×5min);
- 5) 加 1 滴生物素标记的二抗(试剂 C), 37℃孵育 15min, PBS 冲洗(3×5min);
- 6) 加 1 滴链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液(试剂 D), 37℃孵育 15min, PBS 冲洗(3×5min);
- 7) 加 1 滴新鲜配制的 DAB 溶液中显色, 显微镜下观察至显示后中止染色;
- 8) 自来水充分冲洗, 苏木素浅染, 自来水冲洗返蓝, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。用 PBS (pH=7. 4)缓冲液代替一抗做阴性对照。

2.3.2 结果判定:

抗 ERK 抗体的胞核或胞浆呈程度不同基本均匀的棕黄色。

2.4 培养细胞 HE 染色

将已清洗并高温高压灭菌的盖玻片预先放到小培养皿中; 取生长良好的细胞, 用 0. 25%胰酶消化后, 以 1×10^5 个/孔细胞浓度接种到小培养皿中, 待细胞爬满盖玻片 80%后, 弃去培养基, PBS 充分冲洗, 4%多聚甲醛 (PBS 配制) 固定 30 分钟, PBS 洗 3 次, 每次 1 分钟, 浸入苏木素染液, 染色 5 分钟, 自来水充分冲洗; 浸入稀盐酸酒精溶液进行分色数秒钟, 自来水冲洗; 浸入浓氨水中, 使胞核蓝化 3 分钟, 自来水冲洗; 浸入伊红染液中染色 5 分钟, 自来水冲洗; 梯度酒精脱水, 每次 1 分钟, 二甲苯透明 3 次, 每次 1 分钟, 中性树胶封固。光镜下观察。

2.5 药物敏感性 MTT 测定法

2.5.1 PD98059配制

PD98059为黄色粉末, -20℃避光保存; 先用纯DMSO溶解, 再用无菌 PBS(细胞培养用)稀释到所需浓度。

2.5.2 MTT原理

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为难溶的蓝紫色结晶物 (Formazen) 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能, DMSO能溶解此结晶, 用酶联免疫检测仪测定的光吸收值 (OD值) 可间接反映活细胞数量。