



# Proteintech 实验技术手册

第五版

[www.ptglab.com](http://www.ptglab.com)



Proteintech已完成针对人类基因靶标的抗体

超过**13万**次SCI文献引用

产品引用文献**200**余次荣登顶尖期刊封面



Proteintech Group, Inc. 于 2001 年在美国芝加哥成立，作为专业的抗体生产商，Proteintech 一直致力于抗体、蛋白、ELISA 试剂盒以及相关产品的研发、生产和销售，并力争成为生物技术领域最优秀的产品供应商和生命科学工作者最信赖的朋友，为生命科学研究提供更多可能性。

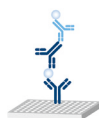


## 抗体 · Antibodies

- 鼠单抗 / 兔多抗
- 免重组单抗
- 磷酸化抗体
- 直标抗体
- 中和抗体
- 流式抗体
- 磁珠细胞分选系列产品
- 病理诊断抗体（即用型）

### 产品特点

自主研发  
全蛋白优质抗原  
覆盖人类基因组靶标  
RNA 干扰技术特异性验证  
检测数据皆可追溯与重复  
抗体类型齐全  
多种属多应用



## ELISA 试剂盒 · ELISA kits

- Human/Mouse/Rat 系列
- AuthentiKine® 精品系列

### 产品特点

多重技术鉴定精选抗体对  
NIBSC 标准品校正  
检测天然样本  
稳定性好 / 重复性强



## 蛋白 · Proteins

- Humankine® 天然活性蛋白
- 原核表达重组蛋白

### 产品特点

Humankine® 系列  
HumaXpress® 人源细胞表达系统专利  
无标签 \ 无载体 \ 无动物成分  
GMP 级别



## 实验室常用试剂 · Reagents

### 免疫学相关产品

- 亚细胞器分离试剂盒
- Western blot 相关试剂
- IP/Co-IP/ChIP 相关试剂
- IHC/IF/ICC 相关试剂
- ELISA 实验相关试剂
- 蛋白纯化相关试剂
- 单抗开发相关试剂

### 细胞实验相关产品

- 细胞培养相关试剂
- 细胞保存相关试剂
- 细胞检测相关试剂



2019 年获得 CiteAb“免疫学 - 明日之星奖”



2016 年获得 CiteAb“最佳抗体验证开拓奖”



2014 年获得 ISO9001 及 ISO13485 认证



# 目 录

## 第一部分 基础理论

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>第一章 抗体与抗原</b> .....    | 1 |
| 1. 抗体的结构与特征 .....         | 1 |
| 2. 重链和轻链 .....            | 1 |
| 3. Fab 和 Fc 片段 .....      | 1 |
| 4. 抗原和抗原分类 .....          | 1 |
| 🔍 制备好抗体第一步——抗原的选择 .....   | 2 |
| 5. 抗体来源 .....             | 2 |
| 6. 抗体纯化 .....             | 2 |
| 🔍 怎样纯化抗体才能提高特异性? .....    | 2 |
| <b>第二章 抗体的选择和验证</b> ..... | 3 |
| 1. 样品的种属 .....            | 3 |
| 2. 抗体宿主的种属 .....          | 3 |
| 3. 抗体的标记 .....            | 3 |
| 4. 抗体的应用 .....            | 3 |
| 🔍 抗体特异性验证方法 .....         | 3 |
| 5. 抗体的浓度和效价 .....         | 4 |
| <b>第三章 抗体的保存和分装</b> ..... | 4 |

## 第二部分 检测应用

|  |    |
|--|----|
| <b>第一章 免疫印迹 (Western blot, WB)</b> .....     | 5  |
| 1. 抗原样品的制备 .....                             | 5  |
| 🔍 Proteintech 改进版 RIPA lysis buffer 配方 ..... | 5  |
| 🔍 样品制备的注意事项 .....                            | 6  |
| 2. 上样和电泳 .....                               | 7  |
| 🔍 超大 / 超小分子量蛋白质分离技巧 .....                    | 7  |
| 🔍 何种情况下使用梯度胶? .....                          | 7  |
| 3. 转膜 .....                                  | 8  |
| 4. 膜的封闭 .....                                | 9  |
| 🔍 灵敏度与背景 - 封闭剂的微妙作用 .....                    | 9  |
| 5. 孵育一抗 .....                                | 9  |
| 🔍 内参抗体的选择原则 .....                            | 10 |
| 6. 孵育二抗 .....                                | 11 |
| 7. 显影 .....                                  | 11 |
| 8. 免疫印迹疑难解析 .....                            | 12 |



|   |    |
|---|----|
| <b>第二章 免疫化学 (Immunochemistry)</b> .....                       | 13 |
| 1.免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC).....                     | 13 |
| ☞ 抗原修复有利于抗原与抗体的结合 .....                                       | 14 |
| 2.免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC).....                      | 15 |
| 3.免疫化学疑难解析 .....  | 15 |
| <b>第三章 免疫荧光 (Immunofluorescence, IF)</b> .....                | 16 |
| 1.标本的处理 .....   | 16 |
| ☞ 选好固定剂, 蛋白定位更准确 .....  | 17 |
| 2.操作步骤 .....  | 17 |
| 3.免疫荧光疑难解析 .....  | 17 |
| <b>第四章 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)</b> .....               | 18 |
| 1.操作步骤 .....  | 18 |
| ☞ 免疫沉淀实验如何选择检测二抗? .....                                       | 20 |
| 2.免疫沉淀疑难解析 .....  | 20 |
| <b>第五章 酶联免疫吸附 (ELISA)</b> .....                               | 21 |
| 1.直接法 ELISA .....   | 21 |
| 2.间接法 ELISA .....   | 21 |
| 3.双抗夹心法 ELISA .....   | 22 |
| 4.ELISA 试剂盒疑难解析 .....   | 23 |
| <b>第六章 流式细胞技术 (Flow Cytometry, FC)</b> .....                  | 24 |
| 1.常见样本的流式检测步骤 .....   | 25 |
| ☞ 人外周血细胞表面抗原检测注意事项 .....                                      | 25 |
| 2.荧光素的选择 .....  | 26 |
| 3.对照设置 .....  | 27 |
| ☞ 如何选择同型对照? .....   | 27 |
| 4.抗体滴度实验 .....  | 27 |
| 5.流式细胞术疑难解析 .....   | 28 |
| <b>第七章 染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation,ChIP)</b> ..... | 29 |
| 1.操作步骤 .....  | 29 |
| ☞ 如何正确固定实验样本? .....   | 29 |
| ☞ 超声法与酶切法的差异 .....  | 30 |
| ☞ 抗体选择是 ChIP 成功与否的关键 .....                                    | 30 |
| ☞ 如何确定 ChIP 实验是否成功? .....                                     | 31 |
| 2.染色质免疫沉淀疑难解析 .....   | 32 |
| <b>第八章 Humankine<sup>®</sup> 人源活性蛋白的溶解注意事项</b> .....          | 33 |

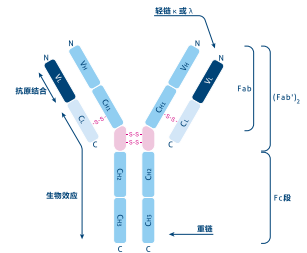
# 第一部分 基础理论

## 第一章 抗体与抗原

抗体 (Antibody, Ab), 也称作免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig), 是血液和组织液中发挥免疫应答功能的一类糖蛋白。抗体是一种能特异性结合抗原的糖蛋白, 是机体防御系统中重要的组成部分。

### 抗体的结构与特征

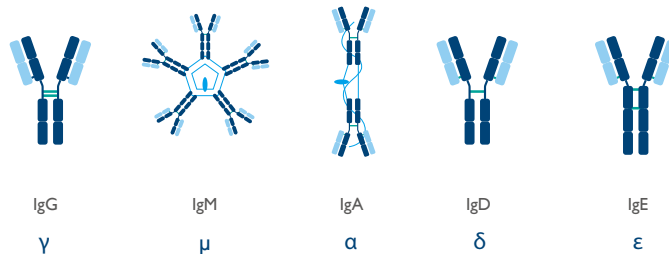
抗体的基本结构是一个Y型的四肽链, 由完全相同的两条重链 (heavy chain, HC) 和相同的两条轻链 (light chain, LC) 组成。重链和轻链是根据他们分子量大小来命名的, 其相对分子质量分别约为 50-75 kDa 和 25 kDa。在结构上, 重链和重链之间、重链和轻链之间以二硫键相连, 结合成一个轻重链配对的对称分子。



▲ 抗体结构

### 重链和轻链

哺乳动物 Ig 的重链一共有 5 种, 分别用希腊字母  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$  命名, 相对应组成的抗体就称为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五种抗体。其中有一些类别还可以再分为亚类, 例如人的  $\gamma$  链有四种:  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ , 小鼠的  $\gamma$  链也有四种:  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$  和  $\gamma 3$ , 少数品系的小鼠还有  $\gamma 2c$ 。每一个重链有两个区, 分别称为可变区和恒定区。重链的可变区大约含有 110 个氨基酸, 可变区和抗原识别有关, 决定抗体识别的特异性。恒定区和抗体效应功能相关, 同一类型抗体的恒定区组成上是相同的。



▲ 抗体种类

哺乳动物 Ig 轻链有两种类型, 即  $\lambda$  型和  $\kappa$  型, 但每一个抗体中轻链只有一个型。在一些低等的脊椎动物中, 轻链还存在另一种类型, 称为  $\iota$  型。每条轻链也包含恒定区和可变区两个结构域。轻链长度大约在 211-217 个氨基酸。

### Fab和Fc片段

以 IgG 为例, 通过木瓜蛋白酶水解的抗体会产生两个片段, Fab (fragment of antigen binding) 和 Fc (crystalline fragment)。其中 Fab 段是含有重链和轻链的可变区, 是抗体特定的两个“手臂”, 可以特异性识别和结合抗原。而 Fc 段是可结晶段, 相当于 Ig 的 CH2 和 CH3 结构域 (IgM/IgE 还包括 CH4 结构域), 是 Ig 与效应分子或者细胞相互作用的部位。在体内, Fc 是发挥 ADCC 等调理作用的片段, 在常规检测实验中, 是二抗结合的主要部位, 也可以直接结合酶和荧光染料来标记抗体的片段。

Ig 可以被木瓜蛋白酶水解成 2 个 Fab 段和 1 个 Fc 段, 也可以被胃蛋白酶从铰链区断开, 水解成一个 F(ab')<sub>2</sub> 段和一个 Fc' 段。F(ab')<sub>2</sub> 是由两个 Fab 和铰链区组成, 能同时结合两个表位, 可以产生沉淀和凝集反应。

### 抗原和抗原分类

使机体产生体液免疫和细胞免疫的物质称为免疫原 (immunogen)。免疫原诱发特异性免疫应答的特性称为免疫原性 (immunogenicity)。能和免疫应答产物 (抗体和免疫细胞抗原受体) 相结合的物质称为抗原 (antigen)。抗原和抗体等免疫应答产物起反应的特性称为抗原性 (antigenicity)。

通常情况下, 免疫原和抗原这两个名词使用时区分不严格, 我们一般所说的抗原默认是指具有免疫原性和抗原性的物质。

抗体或免疫细胞通常仅识别抗原大分子上的一个特定部位, 称为表位 (epitope) 或抗原决定簇 (antigenic determinant)。表位代表抗原分子上一个免疫活性区, 负责和免疫细胞表面的抗原受体和抗体分子相结合。

根据抗原是否具有免疫原性可以将抗原分为完全抗原和半抗原两类。

完全抗原具有良好免疫原性和抗原性。完全抗原中免疫原性最强的是蛋白质抗原。

半抗原本身不具有免疫原性，仅具有免疫反应性，又称为不完全抗原，类脂质与大多数多糖均为半抗原，需要和载体偶联方可具有免疫原性。小分子量的多肽就属于一类半抗原，往往需要和载体蛋白结合才可以刺激机体免疫应答，通常多肽含有的表位少，缺少空间构象表位。

## 制备好抗体第一步 —— 抗原的选择

常见抗原主要由以下途径获得：

### 1. 天然蛋白质或天然组织细胞

由于天然的蛋白质存在修饰，而且结构比较复杂（除了线性表位还有构象表位），因此天然蛋白质是优质抗原，但高纯度的天然蛋白质往往很难获取。大部分二抗是天然蛋白做抗原得到的。很多经典的流式抗体都是用细胞或组织作为抗原得到的，但天然蛋白制备的抗体可能对线性表位识别较差，从而难以用于 WB、IHC 等应用。

### 2. 重组蛋白

重组蛋白（或融合蛋白）抗原上往往带有多个不同的抗原决定簇。使用重组蛋白做抗原制备抗体是一种外源性抗原提呈诱导免疫应答的天然过程，通过在宿主体内筛选最佳抗原决定簇，启动免疫应答，产生相应的高亲和力抗体。利用该抗原免疫动物获得多克隆抗体是针对多个抗原决定簇的抗体的混合物，在一般应用中能够用于检测天然结构或变性的目标蛋白。相比多肽抗原，除了可用于 WB、IHC、ICC、IF，更适用于 IP、CO-IP、FACS、Neutralizing/Blocking 以及 ELISA 等检测天然蛋白质的实验方法。

### 3. 合成多肽

人工合成多肽只是一个线性序列，针对这个多肽的抗体能否识别天然蛋白质是不确定的，所以在制备抗体之前，多肽的设计很重要。在难以获得蛋白抗原或者有同源蛋白但只有少量序列存在差异，或是特定位点制备修饰性抗体时可以选择多肽抗原。

所以，用蛋白质作为抗原应是首选。针对家族成员同源性高的蛋白质，则可采用特异性多肽制备区分家族成员的特异性抗体。

Proteintech 抗体绝大多数采用全长的人源融合蛋白分子作为抗原，融合蛋白都是属于完全抗原，具有很强的免疫原性和抗原性，产生的抗体具有更高亲和力。

## 抗体来源

**单克隆抗体：**传统制备单抗是经过特定抗原刺激产生的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞通过细胞融合的方法得到杂交瘤细胞，然后再经过选择性培养和克隆化得到稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞，将细胞注入实验动物（一般为 BALB/c 小鼠）腹腔中诱导产生腹水，最后收集腹水纯化得到单克隆抗体。

重组单抗原自可生成免单克隆抗体的细胞系，分离及克隆特定抗体的重链和轻链 DNA 序列，通过表达系统表达靶抗体。

**多克隆抗体：**将抗原（纯度越高越好）直接注入到实验动物体内进行免疫，经过 3-4 次免疫，ELISA 测其效价合格后，收集血液待其凝血后离心得到抗血清，纯化后即能得到多克隆抗体。

## 抗体纯化

为了提高特异性结合目标抗原的免疫球蛋白浓度，抗血清、腹水或细胞上清需要进一步纯化以去除非目标抗原免疫球蛋白和其它血清蛋白。无论是多克隆抗体还是单克隆抗体，纯化方法的选择至关重要，其中单克隆抗体需要根据抗体亚型来选择合适的亲和介质或沉淀方法。多克隆抗体一般选择用抗原蛋白偶联亲和柱进行特异性抗体收集。

## 怎样纯化抗体才能提高特异性？

目前常用的亲和纯化方式主要是抗原亲和纯化和 Protein A 或 G 纯化。抗原亲和纯化是基于抗原 - 抗体可逆结合的特性产生的一种纯化免疫球蛋白的方法，通过交联到树脂上的抗原，纯化出与抗原有特异性反应的抗体，这一纯化方法大量的去除了非特异性的免疫球蛋白成分，得到的抗体特异性更高。而 Protein A 或 G 纯化是利用金黄色葡萄球菌的蛋白 A (Protein A) 或链球菌的蛋白 G (Protein G) 对免疫球蛋白 Fc 段的高亲和性，从抗血清中去除血清蛋白，这一方法无法去除非特异性免疫球蛋白。用 Protein A 或 G 纯化的多抗通常会有交叉反应，在实验中可能产生背景、杂信号甚至假阳性。

Proteintech 生产的多抗都是采用抗原亲和纯化，虽然得率较 Protein A 或 G 纯化的低，但抗体特异性得到很大提高。单克隆抗体大部分采用 Protein A 或 G 的纯化方法，因为小鼠腹水成分比抗血清简单且杂抗体含量比例小，采用这一方法得到的单抗浓度高且特异性不受干扰。



## 第二章 抗体的选择和验证

目前市面上大多数抗体公司的抗体总数量是靶抗原数量的数倍甚至数十倍，对于某一特定的靶抗原，存在不止一种商品化抗体，因此抗体的选择对实验需求来说十分重要。为了快速地选择合适的抗体，购买抗体时通常要注意以下几个选择原则。

### 样品的种属

系统发育树中亲缘关系较近的种属之间同一蛋白质往往具有很多同源氨基酸序列，抗体也往往可以和多个物种的同源靶蛋白反应，选择抗体时可以首先考虑已验证过样品物种的抗体。

### 抗体宿主的种属

在配合使用标记二抗和未标记一抗检测样品时，一定要十分注意一抗的宿主种属。一般而言，产生一抗的宿主应尽可能的和样品的宿主种类不同，以避免配套的二抗与样品中内源的免疫球蛋白发生潜在的交叉反应。有时对于不含有内源性免疫球蛋白样品的检测，如 WB 的细胞裂解液样品，一抗宿主选择可以不用这么严格。当一抗种属与检测样本相同时，如果常规二抗检测存在明显交叉反应，可以用只针对重链或轻链的二抗，也可以用 HRP-ProteinA/G/L 作为二抗。此外，对于间接免疫荧光双染实验，要求两种非标记一抗来源于不同物种的动物，而每一种二抗则特异性识别其中一种一抗。

### 抗体的标记

抗体的常用标记有酶标和荧光标记等。HRP 的酶标抗体可催化底物形成有色沉淀或发出荧光，用于 ELISA、免疫印迹、免疫沉淀和免疫组化等实验。荧光标记的抗体与抗原特异性结合后，借助于荧光显微镜观察会呈现明亮的特异荧光，用于免疫荧光、流式细胞术等实验。

### 抗体的应用

抗体常常用来检测和分离蛋白，在各种免疫学实验（ELISA，Western blot，IF，IHC 等）中扮演着不可或缺的角色，其中融合蛋白抗原产生的抗体比多肽抗原产生的抗体应用范围更为广泛，适用于多种应用检测。

### 抗体特异性验证方法

目前科学界公认的常用抗体特异性验证方法包括：RNA 干扰技术、Knock Out 技术、天然阴性样本、酶法检测技术。

抗体特异性从始至终备受 Proteintech 的重视，为了给全球科学家提供更多更好的优质特异性抗体，Proteintech 于 2014 年率先采用 siRNA（RNA 干扰技术）验证抗体的特异性，2015 年又陆续启动了 Knock Out（敲除）技术和免疫捕获结合质谱分析技术（IP-MS）等来验证抗体特异性。

#### RNA 干扰技术

RNA 干扰（RNA Interference）是与靶基因序列同源的双链 RNA（dsRNA）所诱导的一种特异性基因沉默，可以迅速阻断基因活性。siRNA（Small Interfering RNA）是一种小 RNA 分子（大约 21-25 核苷酸），siRNA 只降解与其序列互补配对的 mRNA，其调控的机制是通过互补配对来降低相应靶位基因的表达，所以是一种典型的负调控机制。

在抗体特异性检测中，可以通过这种“基因敲降”的方法来验证目标蛋白表达量降低时，抗体与抗原发生结合产生的目的条带是否会消除或降低。

#### Knock Out 技术

基因敲除（Knock Out，KO）是一种遗传工程技术，敲除目的基因，产生目的蛋白不表达的阴性样品，从而使部分功能丧失，并可进一步对生物体造成影响，进而推测出该基因的生物学功能。

在抗体特异性检测中，可以通过这种“基因敲除”方法来验证目标蛋白缺乏时，抗体是否会发生非特异性结合。

#### 天然阴性样本

部分蛋白质存在组织、细胞特异性，可以利用天然不表达的细胞或组织作为阴性对照：如 CD20 不在 T 细胞中表达，PAX8 不在 HeLa 细胞中表达。

此外，某些蛋白质在特定的生理条件下才表达，或降低表达，或表达量的改变，也可以作为特异性的参考依据。

#### 酶法检测技术

蛋白质通常会有一些修饰形式，如磷酸化，糖基化等，可以通过检测修饰前后 western blot 条带的变化来判断抗体的特异性，这时候就需要添加相应的酶来去除这些修饰形式，如磷酸酶，糖苷酶等。酶法检测是验证抗体特异性的较为迅速简便的方法。

## 抗体的浓度和效价

抗体浓度和效价通常是科研工作者关注的两个重要指标。抗体浓度是指一定体积溶液中免疫球蛋白的含量，与抗体性能无必然联系。而抗体效价反映抗体亲和力的强弱，与抗原 - 抗体的反应体系中抗原的用量关系更密切。

值得注意的是，Protein A 或 G 纯化原理是结合 IgG 的 Fc 段，因此捕获的 IgG 中可能会含有非目的抗原的 IgG 成分，所以与 IgG 的 Fab 段结合的抗原亲和纯化方法相比，后者捕获的抗体特异性方面更有优势。

## 第三章 抗体的保存和分装

通常情况下，蛋白质以较高浓度保存不易发生降解或失活，因此部分抗体公司会在产品中加入牛血清白蛋白（BSA）等蛋白质稳定剂从而提高蛋白质浓度来保存抗体，但是蛋白质稳定剂的加入在某些情况下会限制抗体的应用，比如需要进行抗体的准确定量或标记（稳定剂会和抗体一起竞争结合标记物）等。

由于有些实验会受到蛋白质稳定剂（如 BSA）的影响和干扰，选择抗体时需要注意其中是否含有蛋白质稳定剂，同时建议科研工作者切勿分装抗体产品，分装会由于蒸发、水蒸气冷凝稀释和管壁吸附等因素对有效抗体的浓度和效价造成一定影响，分装体积越小，损失量会越大。

反复冻融容易导致抗体变性，降低抗体和抗原结合能力，影响实验效率。为了避免抗体反复冻融，抗体中会添加终浓度 50%（体积百分比）甘油成分，可以有效避免抗体在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中发生冻结，因此可以解除反复冻融的顾虑。

为了防止微生物对抗体的污染，抗体溶液中会加入终浓度 0.02%-0.1%（质量百分比）的叠氮化钠。一般情况下，叠氮化钠不会影响基础的免疫学实验结果，但是在特殊使用情况下，如用于体内实验或活细胞时，必要时可通过透析或超滤去除抗体中的叠氮化钠。

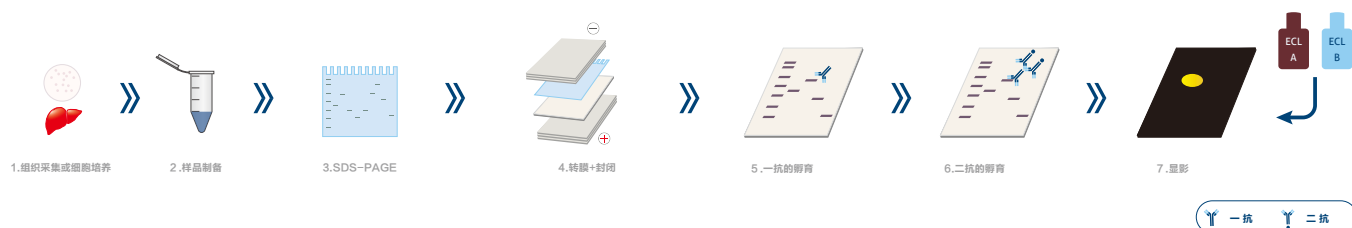
Proteintech 可以根据客户需求提供无甘油、无防腐剂、无保护蛋白的抗体产品。



## 第二部分 检测应用

### 第一章 免疫印迹(Western blot, WB)

免疫印迹 (Immunoblotting) 又称蛋白质印迹 (Western blot, WB), 是一种综合性的免疫学检测技术。它利用 SDS-PAGE 技术将生物样品中的蛋白质分子按分子量的大小在凝胶上分离开, 然后用电转移的方法将蛋白转移到固相膜上, 以固相膜上的蛋白质作为抗原, 与对应的抗体起免疫反应, 再与酶标记的第二抗体起反应, 经过底物显色或荧光成像等方法以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白质。该技术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。



▲ Western Blot 实验流程

### 抗原样品的制备

#### ◆ 裂解液的选择

一般裂解液包含以下几个组份：缓冲系统、盐离子、离液剂、还原剂和蛋白酶抑制剂。

| 类别                                    | 试剂                             | 说明   |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|
| 金属蛋白酶抑制剂                              | EDTA-2Na, EGTA-2Na等            | 1. 原钒酸钠需要经过激活才能有效发挥抑制作用 (调pH值至10左右, 然后加热至无色, 冷却后再调pH值至10, 如此反复至pH值稳定在10即可)<br>2. PMSF剧毒, 在水溶液中不稳定, 所以PMSF都是在有机试剂、异丙醇、DMSO中溶解的。需要注意的是, 在这些介质中溶解后并不需要低温保存, 这些环境中PMSF在室温就是稳定的 |
| 磷酸酶抑制剂                                | 原钒酸钠, 焦磷酸钠, β-甘油磷酸钠, 氟化钠等      |  |
| 丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶抑制剂                       | PMSF                           |  |
| 氨基酸蛋白酶抑制剂<br>天冬氨酸蛋白酶抑制剂<br>半胱氨酸蛋白酶抑制剂 | bestatin<br>pepstatin A<br>E64 |  |

▲ 蛋白酶抑制剂类型

### 👉 Proteintech 改进版RIPA lysis buffer配方

RIPA 裂解液 (RIPA lysis buffer) 是一种传统的细胞组织快速裂解液, 通常用来作为 western blot 提取蛋白首选裂解液。Proteintech 有一万余种抗体都经过 western blot 检测, 其中绝大部分蛋白都使用 RIPA lysis buffer 提取。

以下是 Proteintech 改进版 RIPA lysis buffer 配方

| RIPA裂解液 (配 1000 mL)                              |        |                            |        |
|--|--------|----------------------------|--------|
| Tris   | 6 g    | NaF                        | 0.42 g |
| NaCl   | 8.76 g | EDTA-2Na-2H <sub>2</sub> O | 1.86 g |
| Sodium Deoxycholate                              | 5 g    | Triton X-100               | 10 mL  |
| SDS  | 1 g    |                            |        |
| HCl调pH至7.4, 补充ddH <sub>2</sub> O定容至1000mL, 4℃保存。 |        |                            |        |

注: 使用前加蛋白酶抑制剂混合液 (PR20016/PR20032) (和磷酸酶抑制剂混合液 (PR20015))。

此 Lysis buffer 需配合如下的 Loading buffer 使用:

| 4X Loading Buffer                                       |                                 |
|---|---------------------------------|
| 12% SDS (wt/vol)  | 150 mM Tris/HCl (pH7.2-7.4)     |
| 20% beta-mercaptoethanol (vol/vol) 或者 400 mM DTT (现用现加) | 0.04% Bromophenol Blue (wt/vol) |
|   | 25% glycerol (vol/vol)          |

除了可以根据目标蛋白的表达部位选择不同的裂解液以获得较好的提取效果以外 (如膜蛋白或组蛋白), 任何组分提取均可使用 Proteintech 的 RIPA 裂解液。



## ◆ 裂解操作

取适量的裂解液，使用前裂解液中加入蛋白酶抑制剂。进行磷酸化蛋白检测时，请务必加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂！

(Proteintech 可提供磷酸酶抑制剂混合液 (100X, 货号: PR20015), 增强型蛋白酶抑制剂混合液 (EDTA-Free, 100X in DMSO, 货号: PR20016), 普通型蛋白酶抑制剂混合液 (100X, 货号: PR20032))

不管是悬浮细胞, 还是贴壁细胞, 均可按每  $10^6$  个细胞中加入 100  $\mu$ l 裂解液的比例加入适量的裂解液, 4 $^{\circ}$ C 持续振荡 30 min。冰上超声, 180 w, 1-2 min, 4 $^{\circ}$ C 10000 g 离心 5 min, 轻轻吸取上清并转移至新预冷的微量离心管中置于冰上, 即为蛋白样本。组织裂解需要先除去脂肪和血液等杂质, 并将其剪碎可以有效缩短研磨时间, 研磨完成后, 后续处理步骤可参照细胞样本处理方法。

## 🔗 样品制备的注意事项

### 1. 如何避免蛋白被降解？

一些组织和细胞内经常含有蛋白酶, 在提取蛋白质的过程中, 有可能消化目的蛋白, 总体上可以从以下几个方面来避免蛋白被降解:

a. 提取蛋白质时, 避开蛋白酶的最适活性温度。常见的哺乳动物组织或细胞的蛋白样品的制备都可在低温下完成, 所有的试剂都需预冷, 以降低蛋白酶活性, 防止蛋白降解。尤其是消化系统相关的组织样品尽量取新鲜的样品制备, 制备方法选用液氮研磨的方法, 将样品降解可能性降到最低。

对于斑马鱼等冷血动物, 低温时, 细胞内蛋白酶活性比较高, 蛋白质容易被降解, 在高温下 (50-60 $^{\circ}$ C左右), 其蛋白酶活性低, 蛋白质降解少。

b. 加快提取速度。对于组织来说, 取样顺序最先取消化系统和腺体相关的组织 (如胃、大小肠、肝脏、胰腺、胸腺、肾上腺等) 和富含巨噬细胞的组织 (如肺), 然后取生殖相关的组织 (如卵巢、子宫、睾丸等), 最后取心、脾、肾、脑等器官。取下的组织冻存在液氮或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱里。少数细胞系, 如 Raw 264.7、U-937 等, 也含较多蛋白酶, 在提取时也需要快速提取, 在不影响提取效果的前提下, 可考虑用高浓度 SDS 等强烈的裂解液以缩短裂解时间。

c. 对于膜蛋白, 如果是通过贴壁细胞获得, 则尤其要考虑胰蛋白酶对蛋白的剪切, 在传代过程中, 胰蛋白酶极有可能使目的蛋白被剪切, 从而在 WB 中检测出杂带或得到阴性结果, 因此, 推荐在最后一次传代时尽可能低密度传代, 使细胞有足够的时间表达新的膜蛋白, 在收集细胞时, 不建议用胰蛋白酶消化, 而在培养瓶或培养皿内直接裂解, 也可以刮细胞后再裂解。

### 2. 如何避免杂质干扰？

在蛋白提取中经常会混入一些杂质, 后期影响电泳分离效果。

| 杂质类型 | 处理方法                | 说明                                     |
|------|---------------------|--|
| 外来蛋白 | 处理工具务必洁净            | 不建议使用蛋白酶消化                             |
| 核酸   | 超声波                 | 用超声波打断成小片段而与蛋白分开                       |
| 脂类   | 低温放置, 吸取漂浮在液面上的油脂   | 吸取法达不到去除要求时可采用二氧化硅吸附                   |
| 盐离子  | 浓度不宜过高, 各样品之间离子浓度一致 | 过高浓度导致条带成笑脸状; 泳道间离子浓度不均导致相同分子量蛋白条带高低不一 |

▲ 蛋白提取中的常见杂质及处理方法

### 3. 如何处理特殊样本？

有些实验需要对细胞或者组织进行刺激后检测, 比如检测 TDP43 蛋白的磷酸化, 这是很多神经退行性疾病的一个指标。在制备裂解液时就需要加入磷酸酶抑制剂, 防止磷酸酶去掉 TDP43 的磷酸化修饰。其他如凋亡, 自噬, 内质网应激, 炎症等特殊样本的制备可参考 Proteintech 微信推文《常用细胞刺激方法汇总》。

Proteintech 可提供高品质核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒 (货号: PK10014), 细胞膜蛋白抽提试剂盒 (货号: PK10015) 和线粒体分离试剂盒 (货号: PK10016), 简化操作的同时可获得更好的实验结果。

## ◆ 蛋白定量

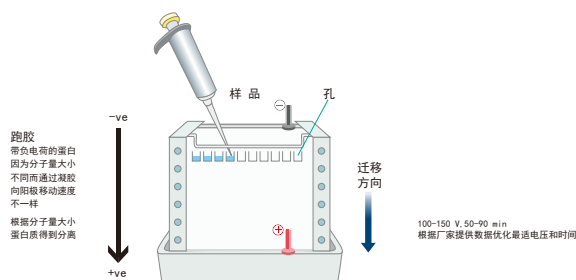
Bicinchoninic acid (BCA) 法是近来广为应用的蛋白质定量方法。除此以外还有 Bradford 和 Lowry 法定量蛋白质。BCA 法的测定原理是蛋白质将铜离子还原成亚铜离子, 后者在碱性溶液中与 BCA 结合生成紫红色复合物, 该复合物在 562 nm 处有吸光值且与蛋白质浓度成正相关性, 据此可测定蛋白质浓度。Lowry 法与 BCA 同属化学法, 但 BCA 法灵敏度高, 操作简单, 形成的颜色复合物稳定性强, 受干扰物质影响小。Bradford 属于染料结合法, 易受到去垢剂影响。

## 上样和电泳

### 1. 凝胶制备

聚丙烯酰胺凝胶电泳简称为 PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)，它有两种形式：SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 及非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE)。其中 Native-PAGE 主要用来分析复合物，使蛋白质在电泳过程中能够保持完整的状态。

凝胶对蛋白质的分离取决于凝胶所形成的孔径大小。不同分子量的蛋白质选择不同的凝胶浓度 (指分离胶浓度，即每 100 毫升凝胶溶液中含有单体和交联剂的总克数称凝胶浓度)。



▲ SDS-PAGE电泳示意图

| 浓缩胶浓度 (%) | 分离胶浓度 (%)  | 线性分离范围 (kDa) |
|-----------|------------|--------------|
| 4         | 10+15(三层胶) | 4-40         |
|           | 15         | 15-45        |
|           | 12.5       | 15-60        |
|           | 10         | 20-100       |
|           | 8          | 30-200       |

▲ 不同分子量的蛋白质选择不同的凝胶浓度

## 超大/超小分子量蛋白质分离技巧

对于大分子量蛋白质 (> 150 kDa) 转膜，建议采用湿法转移过夜 (4°C最佳)，一般采用恒压法：20-25 v 过夜。

对于小分子量蛋白质 (分子量一般低于 10 kDa) 一般使用 Tricine 胶 (三层胶)，Tricine 胶 (三层胶) 分别是浓缩胶，夹层胶和分离胶，其中夹层胶的作用是阻挡一些大分子量的蛋白质，从而使小分量的蛋白质或者肽段能够在分离胶内得到更好的呈现。

Tricine 胶 (三层胶) 一般使用 Tris-Tricine 电泳系统，在浓缩胶中电压一般为 60 v，夹层胶 100 v，分离胶 120v。Tricine 胶 (三层胶) 转移一般使用半干转移法，100 mA / 膜，120 min。

注意：

1. 转移大分子量蛋白质时，可在电转缓冲液中加入适量的 SDS (一般为 0.005% 的终浓度，不可超过 0.05%，否则会引起非特异性背景)；也可降低电转缓冲液中甲醇的含量，但是甲醇浓度一般不低于 10%。
2. 三层胶电泳时间较长 (大约 240 min)，发热较大，建议将电泳放置在冰水浴中或在 4°C 下进行。
3. 建议在使用前，将电泳缓冲液和电转缓冲液预冷，降低实验中的发热。

### 特殊凝胶配方 (Proteintech推荐使用三层胶)

| 试剂名称                   | 浓缩胶      | 间隙胶       | 分离胶      |
|------------------------|----------|-----------|----------|
| 胶浓度                    | 4%       | 10%       | 15%      |
| 体积                     | 2 ml     | 3 ml      | 6 ml     |
| 37% 甘油母液               | -        | -         | 1.63 ml  |
| ddH <sub>2</sub> O     | 1.51 ml  | 0.595 ml  | -        |
| 40% 丙烯酰胺母液             | 0.2 ml   | 0.375 ml  | 2.25 ml  |
| 3M Tris HCl (pH 8.5)母液 | -        | 0.5 ml    | 2.0 ml   |
| 1M Tris HCl (pH 6.8)母液 | 0.25 ml  | -         | -        |
| 10% SDS母液              | 0.02 ml  | 0.015 ml  | 0.06 ml  |
| 10% APS母液              | 0.02 ml  | 0.015 ml  | 0.06 ml  |
| TEMED                  | 0.002 ml | 0.0015 ml | 0.003 ml |

## 何种情况下使用梯度胶？

SDS-PAGE 梯度胶适用于分子量在 10-300 kDa 甚至更大范围的蛋白质检测。凝胶梯度是通过梯度混合器形成的，低浓度的丙烯酰胺溶液首先从底部灌入，而后溶液浓度呈梯度上升，因此在凝胶的顶部孔径较大，而在凝胶的底部孔径较小。梯度胶比单一浓度凝胶的分离范围宽，可以同时分离较大范围分子量蛋白质，降低多次制胶和转膜给实验带来的误差，更有利于实验结果的准确分析。

## 2. 电泳液的选择

常规的 Tris-SDS-PAGE 电泳适合分离大分子物质，对于相对分子量小的，尤其是 10 kDa 以下的蛋白分离效果较差，而 Tricine-SDS-PAGE 电泳可以较好的分离 30 kDa 以下的蛋白质。Proteintech 推荐检测小分子量蛋白 (MW < 15 kDa) 时使用 Tricine-SDS-PAGE 系统电泳液，其他可采用 Tris-Gly 系统电泳液。

Proteintech 抗体检测中常规 SDS-PAGE 采用的是 Tris-Gly 系统电泳缓冲液，配方如下：

| 1x Tris-Gly电泳缓冲液(配 1000 mL)            |         |
|--|---------|
| Tris                                   | 3.03 g  |
| 甘氨酸                                    | 18.75 g |
| SDS                                    | 1 g     |
| 充分溶解后，用ddH <sub>2</sub> O将体积补足到1000mL。 |         |

对于 Tris-Tricine-SDS-PAGE 采用的是 Tris-Tricine 系统电泳缓冲液，该缓冲液分为 Tris-Tricine 阴极电泳缓冲液和 Tris-Tricine 阳极电泳缓冲液，具体配方如下：

| 1x Tris-Tricine阴极电泳缓冲液(配 1000 mL) |        | 1x Tris-Tricine阳极电泳缓冲液(配 1000 mL)                     |         |
|-----------------------------------|--------|---|---------|
| Tris                              | 12.1 g | Tris  | 24.23 g |
| Tricine                           | 17.9 g |   |         |
| SDS                               | 1 g    |   |         |
| 充分溶解后，用超纯水将体积补足到1000mL。           |        | 充分溶解后，用浓盐酸将pH调到8.9，然后用ddH <sub>2</sub> O将体积补足到1000mL。 |         |

## 3. 蛋白 Marker

选择合适的 Marker 用于标示电泳中蛋白的大小和示踪 (Proteintech 公司可提供高品质预染蛋白 marker，货号 PL00001/PL00002/PL00003)。

## 4. 阳性对照

目的蛋白或明确表达目的蛋白的组织或细胞，用于检验一抗的正确性和有效性。

## 5. 上样及电泳

1. 上样前将上样孔中的气泡赶尽。
2. 使用特定的凝胶上样吸头在样品池中加入样品。
3. 电泳时间与所调电压有关系，一般为上层胶 80 V，下层胶 120 V。
4. 在溴酚蓝指示剂即将跑出胶时结束。



▲ 电泳以Bio-rad微型垂直电泳槽为例

## 转膜

### ◆ 蛋白转膜

#### 1. 膜的选择

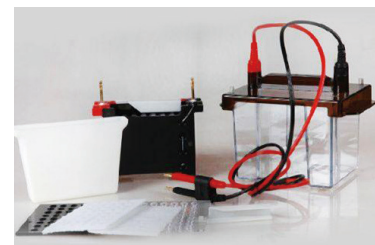
免疫印迹中常用的固相材料有 NC 膜、DBM、DDT、尼龙膜、PVDF 膜等。Proteintech 推荐选用 PVDF 膜 (聚偏二氟乙烯)，PVDF 膜可以提供更好的蛋白截留率、物理强度和广泛的化学兼容性。

针对不同分子量的蛋白质，PVDF 膜有两种规格：0.45 μm 的 Immobilon-P 适合检测 MW > 20 kDa 的蛋白质，0.2 μm 的 Immobilon-PSQ 适合检测 MW < 20 kDa 的蛋白质，而且 0.2 μm 的膜可以有效防止蛋白质在转移过程中直接穿透过膜。PVDF 膜使用之前需要在甲醇中浸泡 1-2 min 后再转入转移液中。

#### 2. 转膜方式

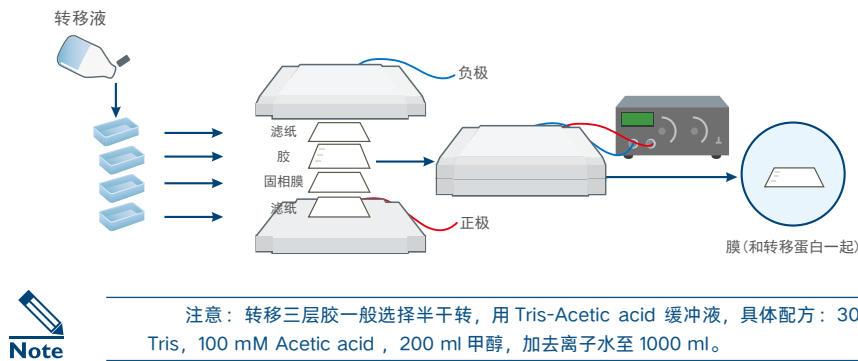
鉴于湿转效果比较稳定，除特定 Tricine 胶 (三层胶) 使用半干转以外，建议用湿转转膜蛋白质，尤其是大分子量蛋白质。常规 SDS-PAGE 胶检测 30-120 kDa 蛋白参数 (其他分子量可适当调整)：

|     | 转膜排列 (负极到正极)              | 检测参数 (30-100 kDa) |
|-----|---------------------------|-------------------|
| 湿转  | 海绵 / 滤纸 / 胶 / 膜 / 滤纸 / 海绵 | 200 mA, 90 min    |
| 半干转 | 滤纸 / 胶 / 膜 / 滤纸           | 60 mA, 90 min     |



▲ 湿式转膜仪





以上转移条件，湿转以天能 VE 186 转移电泳槽为例，半干转以 Bio-Rad Trans-Blot 半干转移系统转移槽为例。

### 3. 胶中蛋白的检测

如果凝胶中的蛋白质需要进行转膜则需采用可逆的铜染色，否则采用不可逆考马斯蓝染色。

### 4. 转膜效率的检测

为检测转膜是否成功，可用丽春红染色。

染色方法：将膜放入 TBST 洗一次，再置于丽春红染色工作液中，在室温下摇动染色 5 min 直至出现清晰条带，再用 TBST 洗膜直至背景干净，条带清晰。

## 膜的封闭

转移成功后的膜上有很多非特异性的蛋白质结合位点，为防止这些位点与抗体结合引起非特异的染色和背景，一般用惰性蛋白质或非离子去垢剂封闭膜上的未结合位点来减少抗体的非特异性结合。封闭剂应该封闭所有未结合位点而不替换膜上的靶蛋白、不结合靶蛋白的表位，也不与抗体或检测试剂有交叉反应。最常见的封闭剂是 BSA、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶和 Tween-20，其中 Tween-20 这种非离子型去垢剂在乳化蛋白质时，不破坏蛋白质的结构，可减少对蛋白质之间原有的相互作用的破坏。缓冲溶液选择 TBST 或者 PBST。

## 灵敏度与背景—封闭剂的微妙作用

1. 脱脂奶粉是最常用的封闭剂成分，通常使用 TBST+5% 脱脂奶粉，但是脱脂奶粉不能与生物素化的抗体一起使用，因为脱脂奶粉含有糖蛋白和生物素，在使用亲和素的标记物时，会直接与封闭液结合，此时可选择使用 BSA。另外，少数情况下，有些靶蛋白较高水平地表达在牛奶中，牛奶中的靶蛋白会竞争抗体，从而导致信号下降。
  2. 封闭和稀释磷酸化抗体建议使用实验级脱脂奶粉，因为非实验级奶粉中可能含有磷酸酶等杂质，磷酸酶与磷酸化蛋白接触可使之去磷酸化。
  3. 如果用辣根过氧化物酶 (HRP) 检测系统，封闭液及后续步骤不应加叠氮钠 ( $\text{NaN}_3$ )，因为叠氮钠对辣根过氧化物酶 (HRP) 有抑制作用。
  4. 如果二抗抗体是碱性磷酸酶 (AP) 标记的检测系统，可使用酪蛋白封闭，同时须选择 TBS 缓冲溶液，不可使用 PBS 缓冲溶液，因为 PBS 缓冲溶液干扰碱性磷酸酶。
- 一般使用 TBST (或 TBS) +5% 脱脂奶粉 (或 BSA) 作为封闭液以及抗体稀释液。选择 PBST (或 PBS) +5% BSA 作为封闭液以及抗体稀释液能获得更灵敏的检测效果，但同时也可能带来弱背景。封闭时，采用 37°C 封闭 1 h、室温封闭 1.5-2 h 或者 4°C 封闭过夜皆可，再用相应的 buffer 将封闭液清洗干净，进行下一步抗体的孵育。

## 孵育—抗

1. 配好 5% 的牛奶 (TBS 或者 PBS 溶液)，按要求稀释好抗体 (如需高比例稀释，最好采用梯度稀释)。Proteintech 建议您使用与封闭液相同成分的溶液作为抗体稀释剂。
  2. 孵育时间和温度：一抗的孵育时间可室温 1.5-2 h 或者 4°C 过夜。
- 使用 Proteintech 抗体，建议室温孵育 1.5-2 h 或 37°C 孵育 1 h，无需 4°C 过夜，既节约时间又可减少背景。

## 🔍 内参抗体的选择原则

内参抗体种类很多其中包含全细胞或胞浆内参、膜内参、核蛋白内参等，比如  $\beta$ -actin、 $\beta$ -tubulin、GAPDH、Lamin B 等，下面简单介绍下选择内参抗体应遵循的原则：

### 1、样本种属来源：

首先考虑实验样本来源于何物种。

a、哺乳动物的组织或者细胞样本，通常选择  $\beta$ -actin、 $\beta$ -tubulin、GAPDH、Lamin B、Histone H3 等。

b、其他稀少物种来源，可以参照文献指导或是选择高度保守管家基因表达的蛋白质相应的抗体作为内参。

### 2、目的蛋白分子量：

选择内参抗体时，应该考虑目的蛋白分子量的大小。通常应该保证目的蛋白与内参蛋白分子量相差 5 kDa 以上但勿差距太大。比如目的蛋白分子量为 45 kDa，此时不适宜选择  $\beta$ -actin 作为内参，可以考虑选择 GAPDH 或者  $\beta$ -tubulin 作为内参。

### 3、目的蛋白表达部位：

针对一般蛋白质检测，GAPDH、 $\beta$ -actin 或  $\beta$ -tubulin 可以满足要求，而如果需要检测亚细胞器蛋白时，适宜选择对应亚细胞器内参更能体现内部参照的准确性。比如常用的核内参抗体有 Lamin A、Lamin B、TBP、YY1、Histone H3。而对于膜蛋白检测，常用的内参抗体为 ATP1A1。对于线粒体蛋白的检测，常用 VDAC1 和 COX IV 作为内参抗体。

以上原则仅针对通常情况，需要特别注意的是内参的选择还须考虑实际实验环境状况，比如某些细胞或组织由于缺氧、糖尿病等因素会导致 GAPDH 的表达量增高，此种状况下 GAPDH 不适合做内参；在涉及细胞增殖相关实验中，c-Jun 由于自身表达变化就不适合做内参；在凋亡实验中，TBP、Lamin 等不适合作为核内参。因此在设计实验方案时应考虑这些因素的影响并查询相关文献，如果在实验过程中出现内参表达出现异常状况应及时分析原因并调整内参选择。

Proteintech公司提供优质而全面的内参抗体供您选择。

| 适用范围     | 内参抗体              |            |            |            |
|----------|-------------------|------------|------------|------------|
|          | 名称                | 分子量        | 抗体种类       | 货号         |
| 胞浆或全细胞   | GAPDH             | 36 kDa     | 鼠单抗        | 60004-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 10494-1-AP |
|          | $\beta$ -Actin    | 42 kDa     | 鼠单抗        | 66009-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 20536-1-AP |
|          | $\alpha$ -Tubulin | 50-55 kDa  | 鼠单抗        | 66031-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 11224-1-AP |
|          |                   |            | 重组兔单抗      | 80762-1-RR |
|          | $\beta$ -Tubulin  | 50-55 kDa  | 鼠单抗        | 66240-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 10094-1-AP |
|          |                   |            | 重组兔单抗      | 80713-1-RR |
| 细胞核膜     | Vinculin          | 117 kDa    | 鼠单抗        | 66305-1-Ig |
|          | Lamin A/C         | 65-75 kDa  | 兔多抗        | 10298-1-AP |
|          | Lamin B1          | 66-72 kDa  | 鼠单抗        | 66095-1-Ig |
|          |                   | 兔多抗        | 12987-1-AP |            |
| 细胞核      | TBP               | 33-43 kDa* | 鼠单抗        | 66166-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 22006-1-AP |
|          | PCNA              | 36 kDa     | 鼠单抗        | 60097-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 10205-2-AP |
|          | Histone-H3        | 15-17 kDa  | 兔多抗        | 17168-1-AP |
| 膜蛋白      | ATP1A1            | 97-110 kDa | 鼠单抗        | 66281-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 22156-1-AP |
|          |                   |            | 兔多抗        | 14418-1-AP |
|          |                   |            | 兔多抗        | 55187-1-AP |
| 线粒体      | VDAC1/Porin       | 31-37 kDa  | 鼠单抗        | 66345-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 10866-1-AP |
|          | COX4I1            | 17-20 kDa  | 鼠单抗        | 66110-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 11242-1-AP |
|          |                   |            | 兔多抗        | 11463-1-AP |
|          |                   |            | 兔多抗        | 11463-1-AP |
| 细胞增殖     | BrdU              | —          | 鼠单抗        | 66241-1-Ig |
|          |                   |            | 鼠单抗        | 66171-1-Ig |
| 全血/血浆/血清 | Transferrin       | 77 kDa     | 兔多抗        | 17435-1-AP |
|          |                   |            | 兔多抗        | 17435-1-AP |
|          | Albumin           | 66 kDa     | 鼠单抗        | 66051-1-Ig |
|          |                   |            | 兔多抗        | 16475-1-AP |

\*TBP在人类是37-43 kDa，在小鼠和大鼠是33-36 kDa

| 标记内参抗体    |                                      |             |
|-----------|--------------------------------------|-------------|
| 类别        | 鼠单抗名称                                | 货号          |
| HRP标记内参抗体 | HRP-anti GAPDH                       | HRP-60004   |
|           | HRP-anti $\beta$ -Actin              | HRP-66009   |
|           | HRP-anti $\alpha$ -Tubulin           | HRP-66031   |
| 荧光标记内参抗体  | CoraLite594-Conjugated Beta Actin    | CL594-66009 |
|           | CoraLite488-Conjugated Beta Actin    | CL488-66009 |
|           | CoraLite594-Conjugated Alpha Tubulin | CL594-66031 |
|           | CoraLite488-Conjugated Alpha Tubulin | CL488-66031 |

## 孵育二抗

1. 一抗孵育结束后，可以先用 TBST 先快速润洗三次，除去膜上牛奶再用 TBST 摇动洗膜 5 次，每次 5 min，去除残留的一抗，加入稀释后的二抗 37°C 孵育 1 h。

Proteintech 建议采用 HRP 标记的二抗，因为其灵敏度更高，可以避免较低稀释比导致高背景的情况出现。

2. 二抗孵育结束后，可以先用 TBST 先快速润洗三次，除去残余牛奶再用 TBST 摇动洗膜 5 次，每次 5 min，去除残留的二抗。

## 显影

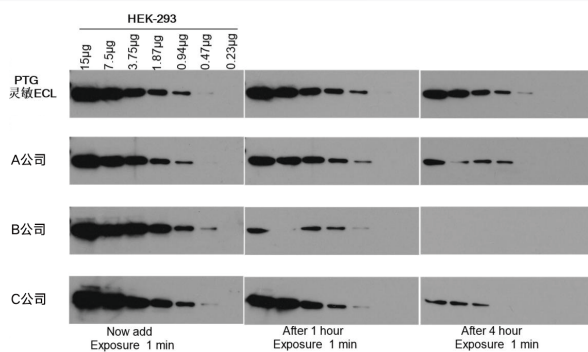
显色方法主要有以下四种：放射自显影，增强化学发光法 (ECL)，酶促底物 DAB 显色法和荧光二抗显影法。目前最常用的方法主要是后三种显影方法。

### 1. 增强化学发光法 (ECL)

ECL 显色原理：在 ECL 底物中，含有  $H_2O_2$  和鲁米诺（及其衍生物），在 HRP（辣根过氧化物酶）的作用下，发出荧光。

ECL 与 HRP 作用显色，稳定性好，灵敏度高，成像性好，是目前最常用的显影方法。

Proteintech 可提供普通型，灵敏型和超敏型 ECL 化学发光检测试剂盒（货号：PK10001；PK10002；PK10003），适配不同表达丰度蛋白的 western blot 检测，背景低，发光强度及其持久性大力增强。



◀ Proteintech 的灵敏 ECL 和其他公司相比稳定性更好，信号持续时间更长

样本: HEK-293

上样量: 0.23 µg-15 µg

抗体: RUVBL1

货号: 10210-2-AP

稀释度: 1: 2000

### 2. 酶促底物 DAB 显色法

DAB, 3,3'-Diaminobenzidine, 是 HRP（辣根过氧化物酶）的常用底物，在辣根过氧化物酶的催化下，DAB 与双氧水反应产生棕色沉淀，该棕色沉淀不溶于水和乙醇，因此在 DAB 显色后，还可以使用溶于乙醇的染料进行后续染色。DAB 和 HRP 作用形成褐色不溶性产物，灵敏度较弱，且成像性较差，不适合数据展示的需求，DAB 有一定的致癌性，使用时要格外注意。

Proteintech 增强型 DAB 显色试剂盒（货号：PK10005）在传统 DAB 法上引入增强剂，显色呈蓝色或蓝紫色，灵敏度得到了很大的提高。

### 3. 荧光二抗显影法

相比较于传统的显色法和化学发光法只能定性和半定量检测一个蛋白的局限性，荧光 WB 不仅能在定性的同时实现蛋白定量，而且还兼容多色荧光抗体的优越性，同时完成二个或者更多蛋白的检测。只要有合适的荧光标记抗体就可以实现荧光 WB 甚至多色荧光 WB 检测。

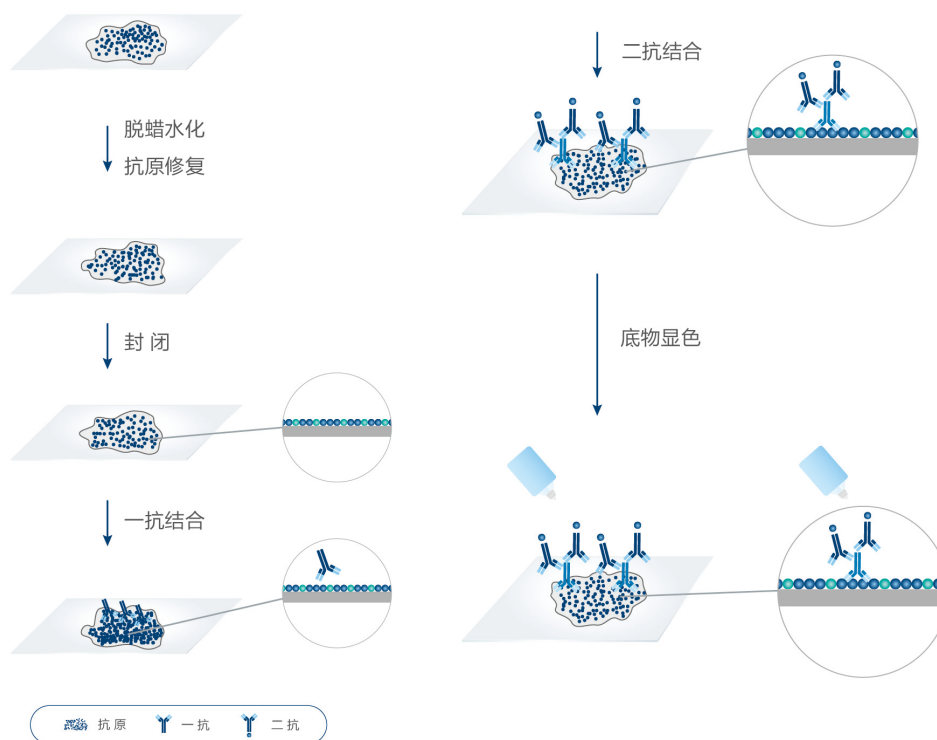


## 免疫印迹疑难解析

| 结果        | 可能原因及解析   |
|-----------|---|
| 无条带或者背景很弱 | 丽春红染膜, 排除转移问题                                     |
|           | 样本中无靶蛋白或靶蛋白含量过低                                   |
|           | 一抗二抗不匹配, 选择合适的一抗二抗                                |
|           | 抗体活性失效  |
|           | 显色系统中含有HRP抑制剂, 所用溶液和容器中避免含有叠氮钠                    |
|           | 显影液、定影液配制错误或放置时间太长; 成像仪器参数设置错误; 酶反应底物失效           |
|           | 可换用灵敏度更高的PBST (或PBS) +5%BSA作为封闭稀释液                |
| 高背景       | 封闭不充分或封闭试剂不合适                                     |
|           | 二抗非特异性结合  |
|           | 洗涤不充分   |
|           | 抗体浓度过高或者二抗孵育时间过长                                  |
|           | 干膜或者过度曝光  |
|           | 试剂污染  |
|           | 底物过于灵敏  |
|           | 在实验操作中, 膜被污染                                      |
|           | 换用灵敏度稍低的TBST (或TBS) +5%的脱脂奶粉作为封闭稀释液               |
| 非特异性条带    | 一抗/二抗浓度过高   |
|           | 一抗与其他蛋白质交叉反应                                      |
|           | 抗体浓度过高或孵育时间过长                                     |
|           | 换用灵敏度稍低的TBST (或TBS) +5%的脱脂奶粉作为封闭稀释液               |
| 条带分子量不对   | 翻译后修饰, 如糖基化、磷酸化、前体蛋白剪切、泛素化等                       |
|           | 蛋白质本身性质, 主要包括蛋白质本身的电荷影响、转录异构体的存在、同源或异源聚合体和复合体四个方面 |
|           | 实验体系的影响, 如分子量Marker不准、电泳影响、蛋白裂解提取过程中发生降解等         |
| 带型异常      | 条带呈现微笑状, 凝胶不均匀冷却, 中间冷却不好                          |
|           | 条带拖尾, 样品溶解不好                                      |
|           | 纵向条纹, 样品中含有不溶性颗粒                                  |
|           | 条带偏斜, 电极不平衡或者加样位置偏斜                               |
|           | 条带两边扩散, 样品中盐离子浓度过高                                |
|           | 暗片白条带, 一抗或二抗加入过多, 适当稀释抗体浓度                        |

## 第二章 免疫化学(Immunochemistry)

免疫化学 (Immunochemistry), 包含免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 和免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC), 是利用抗原与抗体之间的结合具有高度特异性的原理, 通过抗原抗体结合及呈色反应, 显示组织或细胞中的化学成分, 对组织切片或细胞标本中某些化学成分进行定性、定位或者定量研究。



▲免疫组织化学实验流程

### 免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC)

免疫组化具有特异性强、灵敏度高、显著特点, 且能将形态研究与功能研究有机地结合在一起, 这门技术被广泛应用于生物学和医学研究的许多领域。

#### ◆ 操作步骤

##### 1. 脱蜡

- |                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| a. 在二甲苯I号缸中浸泡20 min;  | e. 在95%乙醇中浸泡5 min;     |
| b. 在二甲苯II号缸中浸泡20 min; | f. 在80%乙醇中浸泡5 min;     |
| c. 在无水乙醇I号缸中浸泡5 min;  | g. 在60%乙醇中浸泡5 min;     |
| d. 在无水乙醇II号缸中浸泡5 min; | h. 用去离子水浸洗3遍, 每遍1 min。 |

此处 I 号和 II 号缸是指不同的容器, 但是内容物一致。

##### 2. 抗原修复

在常规的石蜡切片制作过程中, 多用福尔马林液来固定组织。福尔马林固定时, 甲醛使组织中的蛋白发生了交联形成网络结构, 掩盖了抗原决定簇, 使抗体不能较好的识别和结合抗原。采用抗原修复可以将被掩盖的抗原决定簇暴露出来, 利于抗原抗体的特异性结合。

## 抗原修复有利于抗原与抗体的结合

### 1. 抗原修复常见方法

#### a. 高压加热法

在不锈钢高压锅内加入适量 Tris-EDTA9 (pH9.0)、EDTA (pH8.0) 或者柠檬酸 (pH6.0) 修复缓冲溶液。加热修复液至沸腾, 将切片置于染色架上放入沸腾的修复液中, 锁紧锅盖, 关闭压力阀, 继续加热。当温度达 121°C 时计时 1.5-2.0 min, 停止加热, 然后将压力锅室温冷却。本方法适用于较难检测或核抗原的修复。

若组织不适于直接强烈的高压加热也可采用隔水加热的方法, 即用较大的压力锅内先加入纯水, 再把切片架装在盛有修复缓冲液的修复盒内以上步骤修复。

#### b. 水煮加热法

电炉或者水浴锅加热 Tris-EDTA9 (pH9.0)、EDTA (pH8.0) 或者柠檬酸 (pH6.0) 修复缓冲溶液至 95°C 左右, 放入组织切片加热 10-15 min。

#### c. 酶消化法

常用 0.1% 胰蛋白酶和 0.4% 胃蛋白酶液。胰蛋白酶使用前预热至 37°C, 切片也预热至 37°C, 消化时间约为 10-40 min, 对于某些陈旧的组织可适当延长消化时间; 胃蛋白酶 37°C 消化时间因样品不同而不同, 以不脱片为宜。

### 2. 抗原修复技巧

#### a. 采用自然降温

当高温中的抗原蛋白分子链脱离了束缚或联结, 需要有一个自然的降温过程让其慢慢恢复到原来的形态和构型, 如果采用冰块或冷水强行降温, 则可能松开后的蛋白分子肽链骤冷固定, 无法恢复原有的构型, 达不到预想的效果。

#### b. 使用过量的抗原修复液

抗原修复大多是高温状态, 液体容易挥发干涸, 造成不可逆的切片损伤, 因此, 在做抗原修复时要使用过量的抗原修复液, 延缓液体挥发, 将抗原修复进行彻底。

每种抗原都有合适的修复方法, 所对应的抗体也都有适宜的稀释度和染色方法, 可以根据自己的需要做出选择, 比如柠檬酸修复缓冲液 (pH 6.0) 不但成本低, 且染色背景清晰, 易于保存, 还不易引起组织块脱落。但是, 像 CD3、p53 等需要使用 EDTA (pH 8.0) 液或 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 9.0) 来修复。

Proteintech 可提供柠檬酸抗原修复液 (50X, 货号: PR30001), Tris-EDTA 抗原修复液 (50X, 货号: PR30002), 适用石蜡切片, 冰冻切片等样品。

### 3. 染色

- 取出切片, 用去离子水浸洗3次, 每次1 min;
- 洗净后, 将切片浸入装有3% 双氧水的溶液中, 盖上盖子, 室温密闭下, 浸泡10 min;
- 取出切片, 将切片用去离子水浸洗3次, 每次1 min;
- 甩干、擦净, 滴加适量3% BSA, 室温封闭1 h;
- 用吸水纸吸去多余液体, 滴加稀释好的一抗 (抗体用抗体稀释液稀释), 室温孵育1 h或4°C过夜, 同时用一抗来源动物未免疫前的血清作为阴性对照;  
推荐使用Proteintech免疫组化笔 (货号: PR30013), 防止液体扩散或流走, 有利于减少试剂 (如抗体、显色物质等) 的使用量, 还可以方便同时处理单个玻片上的多个样本。
- 1X TBST冲洗4-5次, 每次30 sec;
- 甩干、擦净, 滴加适量二抗, 室温孵育30 min;
- 1X TBS冲洗4-5次, 每次30 sec;
- 甩干、擦净, 滴加适量DAB溶液, 2-5 min后迅速用去离子水冲洗干净; (DAB工作液现配现用)
- 滴加一滴Mayer's 苏木素 (hematoxylin), 复染1.5-2 min, 用TBS溶液冲洗干净, 然后在TBS溶液中浸泡5-10 min;
- 用去离子水浸洗3次, 每次1 min。

### 4. 脱水

- 在60%乙醇中浸泡5 min;
- 在80%乙醇中浸泡5 min;
- 在95%乙醇中浸泡5 min;
- 在无水乙醇I号缸中浸泡5 min;
- 在无水乙醇II号缸中浸泡5 min;
- 在二甲苯III号缸中浸泡5 min;
- 在二甲苯IV号缸中浸泡5 min。

### 5. 封片

从二甲苯 IV 号缸中取出切片, 沥干二甲苯, 然后用中性树脂胶封片。

### 6. 成像

结果观察, 图像采集与结果分析。

## 免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC)

细胞中的任何分子，只要具有抗原性，能作为抗原或半抗原，都能作为靶分子，用该技术检测。

### ◆ 操作步骤

- 1.在培养板中将已爬好细胞的玻片用PBS浸洗3次，每次3 min。
- 2.在4%多聚甲醛（选择合适的固定剂固定细胞）常温固定20 min，PBS洗三次，每次3 min。
- 3.在0.2% Triton X -100室温通透5 min（细胞膜上表达的抗原省略此步骤），PBS洗三遍，每次3 min。
- 4.封闭：将样片置于干燥的培养皿内，滴加3% BSA-PBS将样片完全浸没于湿盒中，室温1 h或者4℃过夜。
- 5.用吸水纸将多余BSA-PBS溶液吸去，注意不要干片。
- 6.在样片上滴加50-100 μl稀释后的一抗（参照抗体说明书推荐稀释比），将完全浸没于一抗的样片室温孵育2 h或4℃过夜。
- 7.用PBS清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
- 8.甩干、擦净，滴加适量二抗，室温孵育 30 min。
- 9.PBS 冲洗 4-5 次，每次 30 sec。
- 10.甩干、擦净，滴加适量 DAB 溶液， 2-5 min 后迅速用去离子水冲洗干净。（DAB 工作液现配现用）
- 11.滴加一滴 Mayer's 苏木素（hematoxylin），复染 1.5 min-2 min，用 PBS 溶液冲洗干净，然后在 PBS 溶液中浸泡 5-10 min。
- 12.用去离子水浸洗 3 遍，每遍 1 min。
- 13.脱水（参考上述IHC操作）。
- 14.封片（参考上述IHC操作）。
- 15.镜检（参考上述IHC操作）。

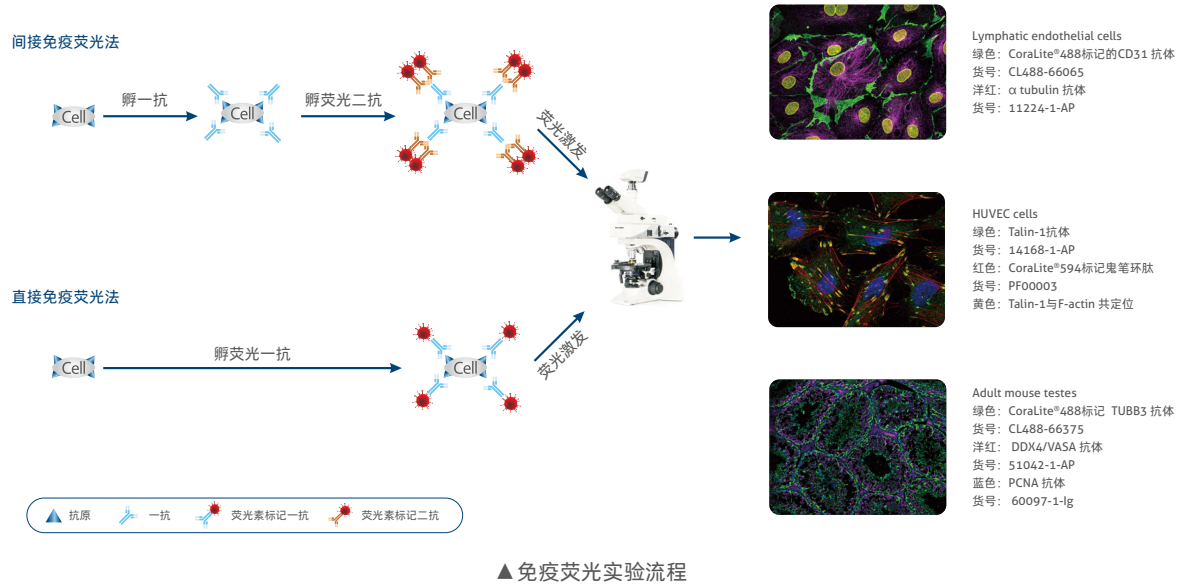
### 免疫化学疑难解析

| 结果       | 原因   | 解析   |
|----------|--|--|
| 染色过深     | 抗体浓度过高或者孵育时间太长   | 降低抗体浓度或减少抗体孵育时间，室温1 h或4℃过夜                           |
|          | 孵育温度过高，超过37℃   | 孵育温度一般室温20-28℃或37℃                                   |
|          | DAB显色时间过长或DAB浓度过高  | 显色时间不能超过10 min，以显微镜下观察为准                             |
|          | 一抗或二抗孵育前组织片干涸  | 孵育盒保证水平放置，防止孵育液外流，保持孵育盒湿度，加DAB之前防止干片                 |
| 非特异性背景染色 | 冲洗不充分  | 适当增加冲洗次数或者延长冲洗时间，但要注意不要过久，防止冲掉组织切片                   |
|          | 切片脱蜡不彻底  | 使用新鲜的二甲苯或其替代品进行脱蜡                                    |
|          | 组织中含过氧化物酶未阻断   | 配制新鲜3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 封闭，孵育时间延长       |
|          | 组织中含内源性生物素   | 不用ABC法，改用EnVision法或者在热修复后加一抗前/后用20%蛋清37℃封闭30 min     |
|          | 二抗检测系统浓度过高、孵育时间过长或孵育温度过高                                 | 降低试剂浓度，按照试剂说明书中建议的孵育方式进行实验                           |
|          | 血清蛋白封闭不充分  | 延长血清蛋白封闭时间   |
|          | 使用错误的封闭血清  | 封闭血清一般与二抗检测系统种属相同，或者使用无血清蛋白封闭，但是不能选择与一抗种属相同的血清       |
|          | 载玻片中粘附剂过厚  | 重新配制粘附剂，制作新的防脱玻片                                     |
| 染色弱      | 抗体浓度过低，孵育时间过短  | 提高抗体浓度，孵育时间不能少于60 min                                |
|          | 试剂超过有效使用期  | 及时更换试剂   |
|          | 操作中滴加试剂时缓冲液未沥干，致使试剂稀释                                    | 每步滴加试剂前沥干切片中多余的缓冲液（但防止切片干燥）                          |
|          | 孵育温度过低   | 放在37℃培养箱中孵育30-60 min                                 |
|          | 抗原修复方式不正确或遗漏。如修复时间、温度，修复液的pH值没有达到要求或要求进行抗原修复的却没有进行抗原修复   | 按照一抗说明书中建议的抗原修复方式进行抗原修复。修复过程要正确：修复温度、时间要达到要求，修复液选择恰当 |
| 染色阴性     | 操作步骤不当   | 重新实验，设立阳性对照  |
|          | 组织中无抗原   | 设立阳性对照，以验证实验结果                                       |
|          | 一抗与二抗种属不匹配   | 仔细确定一抗与二抗的种属   |
|          | 抗原修复操作不当   | 按照一抗说明书中建议的抗原修复方式，进行正确的抗原修复操作                        |
|          | 抗原含量过低   | 使用放大效应更高的二抗检测系统进行实验                                  |
|          | 试剂浓度过低、过高或不合适的孵育时间和温度                                    | 选择浓度合适的试剂，按照说明书中建议的孵育方式进行实验                          |
|          | 水溶性色原显色后使用了含醇的复染液或用乙醇脱水、二甲苯透明（如AEC、BCIP/NBT、AP-Red等显色试剂） | 重新染色，并使用水溶性的复染液和封片剂                                  |



## 第三章 免疫荧光(Immunofluorescence, IF)

免疫荧光染色 (Immunofluorescence, IF) 的主要原理是利用抗原抗体之间的特异性结合来显示目的蛋白, 主要包括直接法和间接法。直接法是蛋白和标记荧光素一抗结合, 间接法是蛋白和一抗结合, 然后再与带有荧光基团的二抗识别, 荧光显微镜下即可观察到荧光。



### Proteintech为科研工作者提供绚丽多彩的CoraLite®系列荧光直标抗体

- 1. 可直接用于 IF 实验, 无需加入二抗;
- 2. 光稳定性和荧光强度显著提升;
- 3. 可与其他荧光染料共同染色进行多重检测;
- 4. 较宽的pH适应性, 能完美胜任科研实验要求。

### 标本的处理

#### ◆ 细胞爬片

1. 在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 快洗 3 次。
2. 在 4% 多聚甲醛或其他固定液常温固定 20 min, PBS 洗三次, 每次 3 min (固定方法不唯一, 具体可参考后续“细胞固定”部分)。
3. 在 0.1% Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 洗三次, 每次 3 min。

#### ◆ 冰冻切片

1. 冰冻切片放 PBS 里室温平衡 10-20 min。
2. 在 4% 多聚甲醛常温固定 30 min, PBS 洗三次, 每次 3 min。
3. 在 0.1% Triton X-100 室温通透 15min, PBS 洗三次, 每次 3min。

#### ◆ 石蜡切片

##### 1. 脱蜡

请参考 IHC 操作步骤

##### 2. 抗原修复

取适量的 Tris-EDTA9 (pH9.0)、EDTA (pH8.0) 或者柠檬酸 (pH6.0) 于烧杯中 (修复液能没过切片架即可), 盖上盖子, 待修复液煮沸后, 将切片放入其中, 盖上盖子, 继续煮沸修复液 15 min。通风厨中自然冷却。

## 细胞固定

固定剂大体可分为两大类：有机溶剂和交联剂。有机溶剂如丙酮和乙醇能去除脂类物质使细胞脱水，把蛋白质沉淀在细胞结构上。交联剂一般通过自由氨基基团把生物分子桥连起来，形成一个相互连接的抗原网。

### 选好固定剂，蛋白定位更清晰！

为在细胞免疫荧光实验固定过程中最大限度地减少固定剂对抗原和细胞结构的破坏，使免疫荧光反应清晰可靠。Proteintech 以多年的经验总结的针对不同细胞器采用的首选固定方法方法见下表。

| 亚细胞器   | 首选固定剂 | 亚细胞器 | 首选固定剂 | 亚细胞器       | 首选固定剂 |
|--------|-------|------|-------|------------|-------|
| 细胞膜    | A     | 高尔基体 | A     | 溶酶体        | A或者B  |
| 细胞质    | A或者B  | 内质网  | A     | 线粒体        | A     |
| 细胞核    | A     | 中心体  | B     | 核糖体        | B     |
| 细胞核膜   | B或者A  | 纤毛   | A     | 自噬体        | B     |
| 细胞核仁   | B     | 纺锤体  | A     | 细胞骨架（微管）   | A     |
| 过氧化物酶体 | A或者B  | 黏着斑  | B或者A  | 细胞骨架（微丝）   | AB    |
|        |       |      |       | 细胞骨架（中间纤维） | B     |

注：A：交联固定剂，多聚甲醛等；B：有机溶剂，丙酮、甲醇、乙醇等。

固定剂的选择没有通用规则，倘若没有达到预期效果，可以更换另一种固定剂。

## 操作步骤

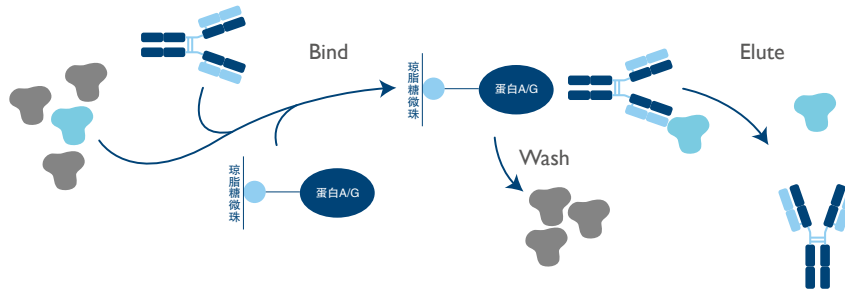
1. 将固定好的样片置于装有PBS的培养皿中清洗3次，每次5 min。每次清洗后要用吸水纸将多余的液体吸去，再在下一培养皿中清洗，注意不要干片。
2. 封闭：将样片置于干燥的培养皿内，滴加3% BSA PBST (0.1% Tween) 将样片完全覆没放于湿盒中，室温1 h或者4℃过夜。
3. 用吸水纸将多余PBST溶液吸去，注意不要干片。
4. 在样片上滴加适量1%BSA PBS (0.1%Tween)（参照抗体说明书的推荐稀释比），将完全浸没于一抗的样片室温孵育2 h或4℃过夜。
5. 用PBST (0.1% Tween) 清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
6. 在样片上滴加50-100 μl标记有荧光素的稀释后的二抗（参照抗体说明书的推荐稀释比），将完全浸没于二抗的样片放于湿盒中室温孵育1 h（避光）。
7. 用PBST (0.1% Tween) 清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
8. 在样片上滴加50-100 μl的DAPI-PBS (1 μg/ml)，完全浸没于DAPI的样片放于湿盒中室温孵育5-10 min（避光）。
9. 用PBS清洗样片，洗涤2次，每次5 min。
10. 滴加封片剂，确定样品在盖玻片与载玻片之间。
11. 用荧光显微镜观察。根据不同的染料选择不同波段的激发光。

## 免疫荧光疑难解析

| 效果     | 原因                    | 解析                                       |
|--------|-----------------------|--|
| 染色浅或无  | 封闭时间过长                | 封闭时间应保持常温1 h左右，或者4℃过夜                    |
|        | 抗体浓度过低，孵育时间较短         | 提高抗体浓度，孵育时间不可少于1 h                       |
|        | 抗体孵育温度不当              | 25-30℃孵育时间1-2 h，如需过夜孵育应置于4℃冰箱内           |
|        | 操作过程中缓冲液残留较多，间接稀释抗体浓度 | 每步用于冲洗的缓冲液尽量沥干                           |
|        | 滤光片选择不合适              | 更换滤光片                                    |
| 染色深    | 封闭时间过短                | 封闭时间应保持常温1 h左右，或者4℃过夜，可适当提高封闭液浓度         |
|        | 抗体浓度过高或者孵育时间过长        | 降低抗体浓度，抗体孵育时间：室温1-2 h或者4℃过夜              |
|        | 洗涤不充分                 | 增加缓冲液洗涤次数和时间                             |
| 染色定位不对 | 组织细胞中无抗原              | 设立阳性对照，以验证实验结果；换其他组织细胞检测                 |
|        | 固定方法不当                | 固定试剂大体可分为交联固定剂和可溶性溶剂固定剂，尝试换不同类的固定剂处理抗原样品 |

## 第四章 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 是利用抗原抗体特异性反应纯化富集目的蛋白的一种方法。基于抗体对抗原 (靶蛋白) 的特异性结合, 通过偶联在琼脂糖上的亲和蛋白 (如 Protein A sepharose beads) 对抗体-抗原复合物进行亲和吸附, 形成三联体, 经洗涤去除未结合的杂蛋白, 然后煮沸或酸性洗脱的方式使抗体、抗原一起脱落下来, 得到的抗体抗原混合物经 Western Blotting 检测, 最终依据显影后的胶片上是否有目的大小条带, 来判断该抗体是否成功捕获沉淀了目的抗原。



▲ 免疫沉淀原理

### 操作步骤

#### ◆ 样品裂解液的制备

##### 1. 培养细胞裂解液的制备

- 收集细胞: 细胞刮收集细胞于离心管中, 4°C 400-500 g 离心5 min后弃上清; 预冷1 x PBS洗细胞1-2次, 4°C 400-500 g 离心5 min并弃上清。
- 裂解: 加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的预冷裂解液, 重悬细胞, 冰上裂解30 min, 每10 min轻柔颠倒一次。
- 超声破碎: 冰浴超声破碎2 sec、停2 sec, 总时长1-2 min, 功率180 w。
- 冰浴继续静置20 min, 进一步裂解。
- 4°C 10000 g 离心20 min, 取上清测蛋白浓度, 剩余按上清400 μl/管分装于1.5 ml EP管中, 冻存于-80°C冰箱。

##### 2. 组织样裂解液的制备

解剖实验动物、取组织; 液氮研磨或冰浴玻璃匀浆 (较难研磨或耗时较长的组织, 建议液氮研磨)。后续步骤与处理细胞时相似 (超声破碎时间可稍长, 但一般不超过5 min)。

##### 3. 蛋白浓度的测定

参见本手册 “免疫印迹-蛋白定量”。

#### ◆ IP与捕获

##### 1. 酸洗脱法 (可配合使用Proteintech免疫沉淀试剂盒, 货号: PK10007; PK10008)

- 根据实验需要, 取-80°C相应的裂解液若干管, 每管裂解液 (约400 μl) 加320 μl孵育液 (含蛋白酶抑制剂), 转移至纯化柱。  
注: 冰盒上操作; 孵育液配制: 1 ml孵育液+10-15 μl 100mM PMSF+10-15 μl 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>。
- 加入3-5 μg一抗, IP阴性对照用同型对照的IgG, 4°C旋转过夜。
- 取一定量protein A或G (具体根据捕获抗体的亚型选择) sepharose beads (一般每个样约50-100 μl), 用1×PBS离心洗涤5次 (500 g 离心30 sec静置1 min, 最后加孵育液重悬beads至原体积)。通常来说, 如果捕获抗体是兔抗体, 小鼠IgG2a/IgG2b/IgG3, 则选择beads-Protein A, 如果是小鼠IgG1, 则选择beads-Protein G。
- 向步骤 b 中每管抗原-抗体混合物中, 加入50 μl 洗涤好的beads-Protein A或G, 4°C旋转4 h。
- 现配洗涤液, 每个样洗涤5-6次 (自然滤干), 待最后一次洗涤后, 500 g离心1 min, 弃尽残液, 加堵帽封上。
- 新取1.5 ml EP管, 编号, 每管加10 μl碱中和液和23 μl 5 x Sample buffer, 备用。
- 每个柱中加入40 μl洗脱液 (pH 2.0的酸性洗脱液), 震荡混匀数秒, 静置10 min。
- 去掉堵帽, 将柱子按编号对应放入1.5 ml EP管中, 4°C, 9000 g 离心1 min, 收集洗脱液。
- 再次加入新的洗脱液, 重复步骤 g - h 一次。
- 沸水浴5 min, 直接用于SDS-PAGE上样或冻存在-20°C备用。

## 2. SDS sample buffer洗脱法

- 根据实验需要, 取-80°C相应的lysate若干管, 每管裂解液 (约400  $\mu$ l, 1-4 mg总蛋白) 加320  $\mu$ l孵育液 (含蛋白酶抑制剂P/V液)。
- 加入3-5  $\mu$ g一抗, 4°C旋转过夜。
- 取一定量Protein A或G sepharose beads (一般每个样50-100  $\mu$ l), 用1xPBS离心洗涤5次 (500 g离心30 sec静置1min, 最后加孵育液重悬beads至原体积)。
- 向步骤 b 中每管抗原-抗体混合物中, 加入50 $\mu$ l洗涤好的beads-Protein A 或G, 4°C旋转4 h。
- 现配洗涤液, 按4-5次/管进行洗涤 (500 g离心30 sec, 静置1 min), 最后一次洗涤液约留50  $\mu$ l。
- 每个EP管中加入50 $\mu$ l 2 x sample buffer震荡混匀数秒, 100°C沸水浴10 min。
- 4°C, 9000 g 离心1 min, 新取1.5 ml EP管, 将离心后上清按编号对应转移至1.5 ml EP管中, 直接用于SDS-PAGE上样或冻存在-20°C备用。

**酸洗脱法:** 洗脱更温和, 背景较干净。**SDS sample buffer洗脱法:** 洗脱更彻底, 信号会更强, 但容易产生高背景。可根据实验需求进行选择。

## ◆ SDS-PAGE电泳

### 1. 配胶

根据待分离的目的蛋白大小, 选择合适浓度的分离胶, 分离胶和浓缩胶分别灌注 30-60 min 后即可凝固完全。

### 2. 点样电泳

将经过 IP 制备的样品取出, 同时与阴性对照、阳性对照裂解液 100°C煮沸 5 min, 再恒压电泳约 1.5 h (具体时长与目的蛋白大小有关, 浓缩胶一般 80 V, 进入分离胶后可调高至 120-130 V, 以溴酚蓝带作为电泳指示)。

转膜、封闭及后续部分请参考本手册 Western blot 部分

## 免疫沉淀常用试剂配方

| 裂解液 (1000 ml)                             |        |
|---|--------|
| NaCl                                      | 8.76 g |
| Sodium deoxycholate                       | 5 g    |
| SDS                                       | 1 g    |
| Tris                                      | 6 g    |
| EDTA-2Na · 2H <sub>2</sub> O              | 1.86 g |
| NaF                                       | 0.42 g |
| Triton X-100                              | 10 ml  |
| 加ddH <sub>2</sub> O至1000 ml, 调pH至 7.2-7.4 |        |

| 洗脱液 (500 ml)                       |        |
|------------------------------------|--------|
| NaCl                               | 14.6 g |
| Glycine                            | 5.625g |
| 加ddH <sub>2</sub> O至500ml, 调pH至2.0 |        |

| 孵育液 (1000 ml)   |        |
|---|--------|
| KCl   | 0.2 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.2 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 1.14 g |
| NaCl  | 8 g    |
| EDTA-2Na · 2H <sub>2</sub> O                          | 1.86 g |
| NaF   | 0.42 g |
| 加ddH <sub>2</sub> O至1000 ml, 调pH至7.2-7.4              |        |

| 洗涤液                     |  |
|-------------------------|--|
| 1X TBST 中加入终浓度1 mM的PMSF |  |

| 5 X Sample buffer (200 ml)                            |       |
|---|-------|
| SDS   | 30 g  |
| Glycerol  | 70 ml |
| Tris (1M母液, pH 7.2-7.4)                               | 50 ml |
| 溴酚蓝   | 0.1 g |
| 加 ddH <sub>2</sub> O至150 ml                           |       |
| 取适量上述buffer, 补加25% $\beta$ -巯基乙醇或25% DDT (2M母液, 现用现加) |       |

## 实验注意事项

### 1. 裂解缓冲液

理想的裂解液可以保留蛋白质的天然构象, 将抗体结合位点变性减到最少, 同时从样本中释放足够量的蛋白, 以满足实验需求。常规 IP 实验通常可用 RIPA 做裂解液; 对于 Co-IP 实验, 则建议优先尝试更温和的 NP-40 或 Triton X-100 裂解液 (RIPA 裂解液可作为备选)。

### 2. 根据蛋白质分子量大小的不同, 选择合适的实验条件

#### a. 转膜时膜的选择

分子量大于等于 20 kDa 的靶蛋白, 选用 0.45 $\mu$ m 孔径的 PVDF 膜; 分子量小于 20 kDa 的靶蛋白, 选用 0.2 $\mu$ m 孔径的 PSQ 膜。

#### b. 转膜电流大小

一般分子量大于 100 kDa 可用 200 mA 恒流转膜 100 min (按一个转膜槽计算), 分子量小于 100 kDa 宜减小电流, 可用 160-180 mA 转膜 90 min。

### 3. 抗体捕获beads的选择

Beads-proteinA 适合一般兔抗体和鼠单抗 (IgG2a/2b/3 亚型), beads-proteinG 则适合鼠单抗 (IgG1 亚型)。



## 🔍 免疫沉淀实验如何选择检测二抗

| IP捕获抗体类型 | WB检测时一抗类型 | WB检测时二抗类型                                 | 备注说明  |
|----------|-----------|---|---|
| 小鼠单抗/多抗  | 小鼠单抗      | HRP-标记Protein A<br>或HRP-标记抗小鼠IgG<br>二抗    | WB 检测时一般的 HRP-标记抗小鼠 IgG 二抗可产生严重的重链轻链干扰信号;<br>HRP-标记 Protein A 可以有效降低重链信号强度, 消减轻链信号;<br>WB一抗若为 mouse IgG1/IgG3 亚型, HRP-标记 Protein A 亲和力较低, 可适当降低其稀释度 (也可先尝试HRP-标记抗小鼠IgG二抗);<br>WB一抗若为小鼠 IgM/IgA 亚型, 则避免选择 HRP-标记 Protein A, 因其不结合。 |
|          | 小鼠多抗      |   |   |
|          | 兔抗        | HRP-标记抗兔IgG二抗                             | 由于 IP 捕获抗体与 WB 检测一抗属于不同种属来源抗体, 故WB 检测时使用 HRP-标记抗兔 IgG 二抗可以有效避免重链轻链信号的影响。  |
| 兔抗       | 小鼠单抗      | HRP-标记抗小鼠IgG二抗                            | 由于IP捕获抗体与WB检测一抗属于不同种属来源抗体, 故WB检测时使用HRP-标记抗小鼠IgG二抗可以有效避免重链轻链信号的影响。   |
|          | 小鼠多抗      |   |   |
|          | 兔抗        | 1、HRP-标记Protein A<br>2、HRP-标记抗兔IgG轻链特异性抗体 | 1、WB 检测时 HRP-标记抗兔 IgG 二抗会产生很强的重链轻链信号, 以及背景信号, 对结果分析有一定影响;<br>2、HRP-标记 Protein A 可以有效降低重链信号以及消减轻链信号的影响, 背景干净, 适用于检测目的蛋白大小除 45-55 kDa 之外的所有目的蛋白, 而目的蛋白大小在45-55 kDa 之间时, 推荐使用HRP-标记抗兔 IgG 轻链特异性二抗。                                   |

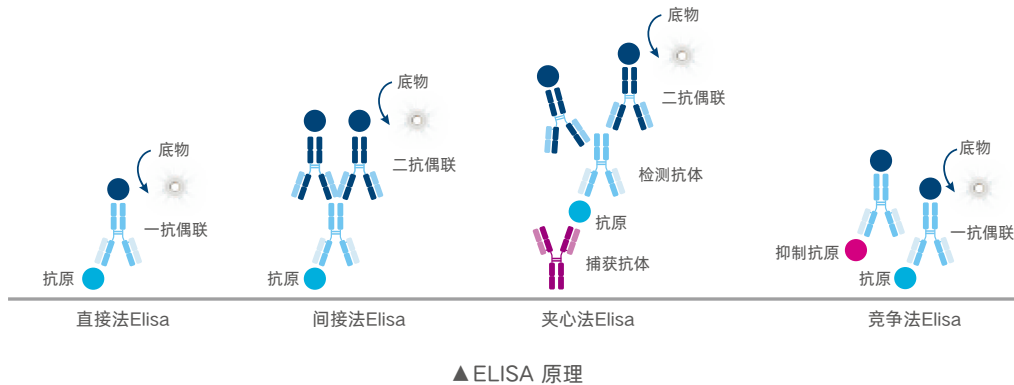
## 免疫沉淀疑难解析

| 结果                     | 原因   | 解析   |
|------------------------|--|--|
| 显影信号整体很弱, 荧光信号淬灭       | 显影液失效  | 通过检查显影液清澈度初判, 并通过立即更换新显影液后再曝   |
|                        | 底物失效   | TBST润洗膜几次, 重新加合格的底物  |
|                        | 二抗孵育过多   | 如果操作较快, 会出现第1张胶片曝光后信号极强, 而第2张起可能信号淬灭; 如果操作稍慢点, 甚至第1张胶片起信号基本淬灭, 这种情况建议重做, 降低二抗浓度、减少孵育时间 |
| 条带正确, 但显影过强或过弱         | 目的蛋白或抗体用量过大  | 可减少上样量、提高一抗稀释度并缩短曝光时间  |
|                        | 目的蛋白或抗体用量过小  | 可增加上样量、降低一抗稀释度并延长曝光时间  |
| 背景杂乱厚重, 大片“黑区”, 导致无法分析 | 封闭不充分、一抗孵育时间过长或浓度过高  | 4°C封闭过夜; 提高一抗稀释度, 缩短孵育时间, 并可适当增加洗膜时间   |
| Input泳道无目的带, 而IP泳道有    | 目的蛋白丰度不高, 无法直接 Western blot 检出, 而 IP 能进行浓缩富集                       |  |
| Input泳道有目的带, 而IP泳道无    | 该种一抗主要识别和结合靶蛋白内部的线性表位、而非暴露在外表的线性或空间表位, 故IP制样时无法有效捕获住组织或细胞中的天然结构靶蛋白 |  |
|                        | 抗体亲和力低。一般而言, 相比于WB, IP实验需要更高亲和力的抗体                                 |  |

## 第五章 酶联免疫吸附(ELISA)

酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 是目前应用最广泛的免疫学检测技术, 是将抗原 - 抗体反应的特异性与酶催化作用的高效性相结合, 通过酶作用于底物后的显色反应判定结果。一般用酶标测定仪测定吸光度 (OD 值) 来反映抗原或抗体含量, 灵敏度可达每毫升纳克 (ng) 水平甚至皮克 (pg) 水平。由于酶的催化效率很高, 间接地放大了免疫反应的结果, 使测定方法达到很高的灵敏度。

目前常用的 ELISA 方法有直接法、间接法、双抗夹心法、竞争法。在测定蛋白质等大分子时常用双抗夹心方法。



### 直接法ELISA

#### ◆ 原理

利用固相抗原与酶标一抗之间抗原抗体的反应来检测抗原含量的一种实验方法。因为是酶标抗体直接与固相抗原的反应, 故称为直接法。

#### ◆ 操作步骤

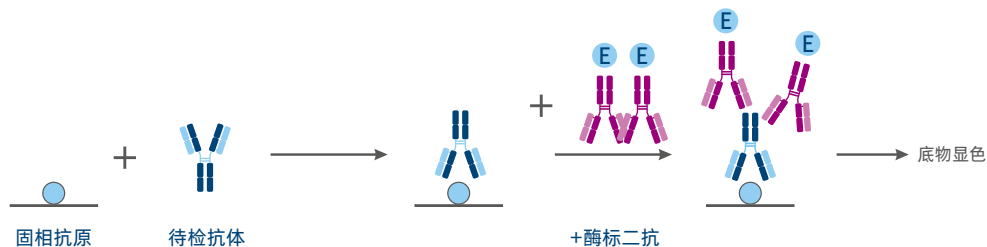
1. 包被抗原: 用碳酸盐缓冲液 (CBS) 或者磷酸盐缓冲液 (PBS) 将抗原浓度稀释到 0.2-20  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{l}$ /孔包被, 37 $^{\circ}\text{C}$  2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。
2. 洗板: 弃孔内液体, 甩干, PBS+0.05%Tween-20 洗板 3 次, 每次浸泡 1-2 min, 350-400  $\mu\text{l}$ /孔, 甩干 (也可轻拍将孔内液体拍干)。
3. 封闭: 含 1%BSA 或者 5% 脱脂牛奶的 PBST(PBS+0.05% Tween-20) 做封闭液, 200  $\mu\text{l}$ /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  2 h。
4. 洗板, 同步骤 2。
5. 加 HRP 标记一抗: 将抗体梯度稀释, 例如: 1:500、1:5000、1:50000, 100  $\mu\text{l}$ /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  1 h。
6. 洗板, 同步骤 2。
7. 每孔加 TMB 显色液 100  $\mu\text{l}$ , 室温避光显色 15-20 min, 显蓝色, 若颜色偏浅, 可放在 37 $^{\circ}\text{C}$  显色, 不超过 30 min。
8. 每孔加终止溶液 100  $\mu\text{l}$ , 此时蓝色变为黄色。
9. 以 630 nm 为校正波长, 用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。在加终止液后 5 min 内进行读数。
10. 结果判断。

直接法 ELISA 由于操作简单, 仅需一步反应即可完成, 故对实验的干扰因素相对较少。

### 间接法ELISA

#### ◆ 原理

间接法 ELISA 是检测抗体常用的方法。其原理为利用酶标记二抗以检测与固相抗原结合的受检抗体, 故称为间接法。



## ◆ 操作步骤

1. 包被抗原：用碳酸盐缓冲液（CBS）将抗原浓度稀释到 0.2-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，100  $\mu\text{l}$ /孔包被，37 $^{\circ}\text{C}$  2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。
2. 洗板：弃孔内液体，甩干，PBST 洗板 3 次，每次浸泡 1-2 min，350-400 $\mu\text{l}$ /孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。
3. 封闭：含 1%BSA 或者 5% 脱脂牛奶的 PBST 做封闭液，200 $\mu\text{l}$ /孔，37 $^{\circ}\text{C}$  2 h。
4. 洗板，同步骤 2。
5. 加一抗：将抗体梯度稀释，例如：1:500、1:5000、1:50000，100  $\mu\text{l}$ /孔，37 $^{\circ}\text{C}$  1 h。
6. 洗板，同步骤 2。
7. 加 HRP 标记的二抗：稀释二抗（1:2000 到 1:20000 根据实验条件而定），100 $\mu\text{l}$ /孔，37 $^{\circ}\text{C}$  1 h。
8. 每孔加 TMB 显色液 100  $\mu\text{l}$ ，室温避光显色 15-20 min，显蓝色，若颜色偏浅，可放在 37 $^{\circ}\text{C}$  显色，不超过 30 min。
9. 每孔加终止溶液 100  $\mu\text{l}$ ，此时蓝色变为黄色。
10. 以 630 nm 为校正波长，用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度（OD 值）。在加终止液后 5 min 内进行读数。
11. 结果判断。

## 双抗夹心法 ELISA

### ◆ 原理

双抗体夹心法是检测大分子抗原最常用的方法。双抗夹心法 ELISA 是将特异性抗体结合到固相载体上形成固相抗体，然后待检样本中的相应抗原结合形成免疫复合物，洗涤后再加酶标记抗体，与免疫复合物中抗原结合形成酶标抗体—抗原—固相抗体复合物，加底物显色，判断抗原含量。

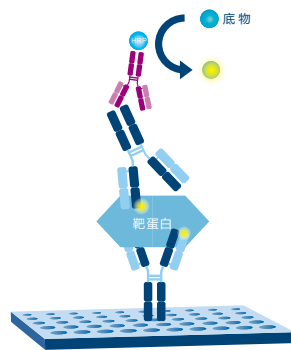
### ◆ 样本准备

1. 血清：全血标本室温凝固 30 min 后 1000 $\times\text{g}$  离心 15 min，取上清立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
2. 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 1000 $\times\text{g}$  离心 15 min，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。
3. 细胞上清：收集细胞培养液，500 $\times\text{g}$  离心 5 min 取上清，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
4. 尿液：收集尿液后，1000 $\times\text{g}$  离心 20 min，取上清，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
5. 唾液：收集唾液后 10000 $\times\text{g}$  离心 5 min，取上清立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
6. 母乳：收集样本后，在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  条件下 1000 $\times\text{g}$  离心 15 min，取澄清部分，重复此过程 2 次，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
7. 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）的 1 $\times$ PBS 洗 3 次，500 $\times\text{g}$  离心 5 min。细胞计数，离心弃上清；加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1 mM；按每 1 $\times 10^7$  个细胞，加入 1 mL 细胞裂解液（含 PMSF），冰上裂解 30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000 $\times\text{g}$ -10000 $\times\text{g}$  离心 5 min，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
8. 组织裂解液
  - a. 使用预冷的 1 $\times$ PBS 清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液（100 mg 组织加入 1 mL 裂解液，不同样本需自行优化）；
  - b. 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约 20-30 下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；
  - c. 匀浆 20-30 次后取约 2-3  $\mu\text{L}$  细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有 70-80% 的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆 10-30 次直到细胞至少 90% 已经破碎；
  - d. 细胞破碎后 8000 $\times\text{g}$ -10000 $\times\text{g}$  离心 5 min，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
9. 组织匀浆：使用预冷的 1 $\times$ PBS 清洗组织去除多余的血液，用剪刀剪碎至 1-2 mm，加入 5-10 mL PBS 至组织中进行匀浆处理，-80 $^{\circ}\text{C}$  条件下冻存 5 min，经过两个冻融周期后破坏细胞膜，5000 $\times\text{g}$  离心 5 min 去除杂质，取上清立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。
10. 脑脊液：收集脑脊液样本，1000 $\times\text{g}$  离心 15 min 取上清，立即使用或分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放，避免反复冻融。

### ◆ 操作步骤

实验开始前，各试剂均应平衡至室温（试剂不能直接在 37 $^{\circ}\text{C}$  溶解）。试剂或样品稀释时，确保混匀，同时尽量避免起泡。

1. 包被抗体：用碳酸盐缓冲液（CBS）或者磷酸盐缓冲液（PBS）根据实验需要，将包被抗体稀释到一定的浓度，100  $\mu\text{l}$ /孔包被，37 $^{\circ}\text{C}$  2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。
2. 洗板：弃孔内液体，甩干，10 mM PBST（10 mM PBS+0.05% Tween-20）洗板 2 次，每次浸泡 1-2 min，350  $\mu\text{l}$ /孔，甩干（也可以轻拍将孔内液体拍干）。



▲ 双抗夹心法原理

3. 封闭：含 1%BSA 或者 5% 脱脂牛奶的 10 mM PBST 做封闭液，350-400 $\mu$ l/ 孔，37 $^{\circ}$ C 2 h。
4. 洗板：同步骤 2。(备注：商品化的试剂盒一般已经预包被了包被抗体在酶标板上，不需要进行 1-4 步骤)。
5. 加样：分别设零孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100  $\mu$ l，余孔分别加标准品或待测样品 100  $\mu$ l。(注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，一块板要在 10 min 内上完样品。)酶标板加上盖或覆膜，37 $^{\circ}$ C 反应 60 min-120 min。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
6. 洗板：同步骤 2。
7. 加检测抗体：根据实验需要，将检测抗体用 PBST 稀释到一定的稀释度，100  $\mu$ l/ 孔，37 $^{\circ}$ C 1 h。
8. 洗板：同步骤 2。
9. 加二抗：根据实验需要，将二抗用 10 mM PBST 稀释到一定的稀释度，100  $\mu$ l/ 孔，37 $^{\circ}$ C 40 min。
10. 洗板：同步骤 2。
11. 酶标仪读数：以 630 nm 为校正波长，用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)，在加终止液后 5 min 内进行读数。
12. 结果判断：
  - a. 每个标准品和样本的 OD 值须减去零孔的 OD 值，如设置复孔，则应取其平均值；
  - b. 以标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，使用专业制作曲线软件进行四参数拟合 (4-PL)，如 Origin、ELISACalc 等，根据样品的 OD 值由标准曲线推算出相应的拟合浓度，再乘以稀释倍数即为样本的测定浓度。

## ELISA 试剂盒疑难解析

| 重复平行孔结果不一致                     |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 原因                             | 解决方案                              |
| 酶标板或样本等被唾液污染                   | 操作过程中佩戴口罩                         |
| 加不同样品时未更换吸头                    | 使用新的吸头转移不同样品或试剂                   |
| 包被了抗体的酶标板孔底被吸头刮擦               | 禁止吸头触碰到孔底                         |
| 移液器出现偏差                        | 校准移液器                             |
| 洗涤不充分                          | 按说明书推荐的体积和浸泡时间充分洗涤                |
| 样品浑浊、不均匀                       | 样本需要预处理，具体方法参阅操作手册                |
| 孔底脏污                           | 检查板底，并擦拭干净                        |
| 未使用封板膜                         | 使用试剂盒提供的封板膜                       |
| 标准曲线不理想                        |                                   |
| 原因                             | 解决方案                              |
| 标准品稀释操作不当                      | 按照说明书推荐的稀释液稀释对应的标准品               |
| 不同批号，不同试剂盒的试剂混用 (如样本稀释液、抗体稀释液) | 每个试剂盒使用其对应的试剂                     |
| 标准品移液等步骤中出错                    | 仔细检查操作步骤，保证移液器正常工作，再次实验测定         |
| 拟合方式不恰当                        | 优先选择四参数曲线拟合，其次是双对数拟合              |
| 显色弱或无                          |                                   |
| 原因                             | 解决方案                              |
| 试剂没有充分平衡至室温                    | 检测之前，试剂平衡至室温                      |
| 试剂盒组份储存不当                      | 按照标签上温度储存所有组份                     |
| 试剂过期                           | 收到试剂盒后查看有效日期，不使用过期产品              |
| 显色底物失效                         | 未使用过的TMB溶液为无色透明状，若已变蓝或浑浊表明该产品已被污染 |
| 实验加样顺序不正确，孵育条件不准确              | 检查实验步骤，重做实验                       |
| 显色液或终止液使用不当                    | 仅使用试剂盒中对应的显色液和终止液                 |
| 信号很强/全板蓝色/标准曲线没有梯度             |                                   |
| 原因                             | 解决方案                              |
| 显色底物被污染，加样前已变蓝                 | 避光存放底物，确保底物加样前是无色透明状              |
| 加样槽不洁净，未用纯水冲洗                  | 加样槽需要用纯水反复冲洗几次，避免其与显色底物反应         |
| 反复使用了封板膜                       | 使用酶标二抗后务必更换新的封板膜                  |
| 标准曲线理想但样本无信号                   |                                   |
| 原因                             | 解决方案                              |
| 样本中的待测物浓度低或不在标曲的检测范围           | 调整浓度，再次重复实验                       |
| 样本的处理方式不恰当                     | 参照试剂盒操作手册推荐的方式处理样本                |
| 样本不新鲜                          | 取新鲜样本，避免反复冻融                      |

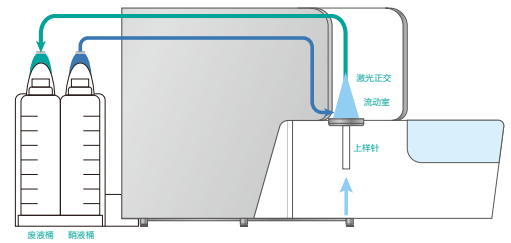
## 第六章 流式细胞技术(Flow Cytometry, FC)

流式细胞技术 (Flow Cytometry, FC) 是一种对液流中排成单列的细胞或其它生物微粒 (如微球、细菌、小型模式生物等) 逐个进行快速定量分析和分选的技术。其特点是通过快速测定库尔特电阻、荧光、光散射和光吸收来定量测定细胞 DNA 含量、细胞体积、蛋白质含量、酶活性、细胞膜受体和表面抗原等许多重要参数。根据这些参数将不同性质的细胞分开, 以获得供生物学和医学研究用的纯细胞群体。流式细胞仪 (Flow cytometer) 是对细胞进行自动分析和分选的装置, 主要是由液流系统、光学系统、电子系统和细胞分选系统构成。

### 液流系统

流式细胞仪的液流系统是由鞘液流和样品流这两套紧密联系而又相互独立的液流组成。

悬浮缓冲液细胞样品通过流式细胞仪时, 由于鞘液的作用, 细胞被限制在液流的轴线上, 从而能通过一个非常小的喷嘴。细胞 / 颗粒通过通道时所散射的光线将被多个检测器检测到。荧光检测器是用作检测由阳性染色的细胞 / 颗粒散发的荧光。

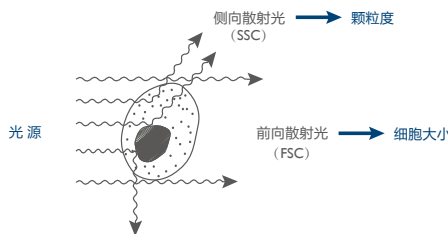


▲ 液流系统示意图

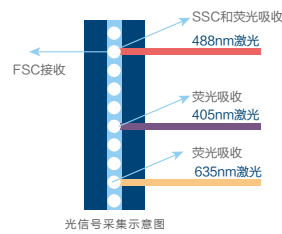
### 光路系统

光信号分为散射光信号和荧光信号, 是流式细胞仪的关键。光路系统始于激光器, 不同激光器发出的激光照射到细胞后产生的光信号会经过不同的光路系统被不同的通道接收。

激光照射到样品流中的细胞后会发出散射光, 而如果细胞上结合了荧光素, 这种荧光素又刚好可以被这种波长的激光激发, 则荧光素向四周发射荧光。流式细胞仪采集的光信号是散射光信号和荧光信号, 其中散射光信号包含向前角散射光 (forward scatter, FSC) 和侧向角散射光 (side scatter, SSC) 。

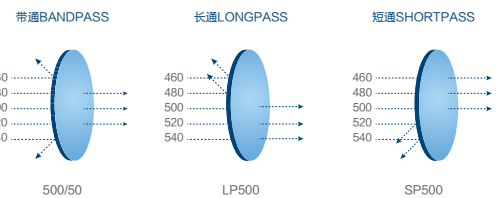


▲ 光路系统原理



光信号采集示意图

另外, 流式细胞仪的光路系统由一系列透镜、滤光片和小孔组成, 根据不同的波长将光信号进行分离。其中滤光片最为重要, 按照功能滤光片可以分为长通滤光片、短通滤光片和带通滤光片三种。

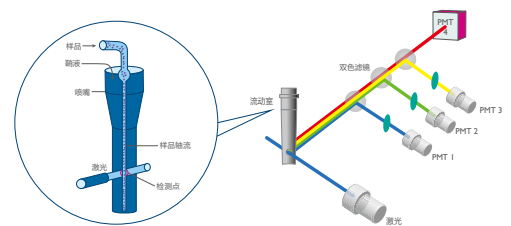


▲ 滤光片类型

### 监测分析系统

流式细胞仪的检测分析系统需要将细胞的各个通道的光信号分析汇总然后得出样品中的细胞的物理化学特征。光电倍增管能将光信号转变为电子信号, 同时通过一定的比例将信号放大。通道这个概念是和光电倍增管紧密联系在一起的, 可以说流式细胞仪有多少个光电倍增管就有多少个通道, 一个光电倍增管实际上就是一个通道。

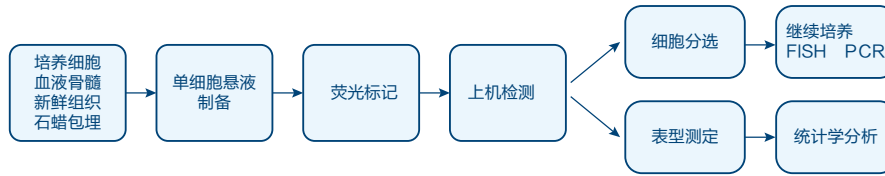
检测分析系统的另一个重要组成部分是计算机分析系统, 计算机分析系统通过特定的软件实时反映收集到的信息, 并且控制流式细胞仪的工作, 用户则通过相应软件操控流式细胞仪进而分析仪器采集到的信息。



▲ 监测分析系统



## 流式细胞术的基本操作和技巧



▲ 流式细胞术实验流程

### 常见样本的流式检测步骤

#### ◆ 常规单细胞流式检测步骤

1. 制备单细胞悬液：贴壁细胞可用胰酶消化成单细胞后收集于离心管中，悬浮细胞可直接收集，离心 (2000 r, 5 min) 去除残留培养基，1×PBS 重悬沉淀制成单细胞悬液。
2. 离心沉淀细胞并去除上清液，按每  $1 \times 10^6$  个细胞大约 100  $\mu\text{l}$  固定剂的密度重悬细胞，室温下 (20-25°C) 固定约 20 min。
3. 离心 (3000 r, 5 min) 去除固定剂，使用通透剂洗涤两遍。(若通透剂效果过程可逆则后续步骤需一直存在)
4. 按每  $1 \times 10^6$  个细胞大约 100  $\mu\text{l}$  通透剂的密度重悬细胞，静置 10 min。
5. 在每 100  $\mu\text{l}$  细胞重悬液中，4°C 避光孵育直接偶联抗体 45-60 min，抗体的使用浓度根据建议或者滴定结果。(直接标记法可以进入第 9 步)。
6. 若使用间接标记法，一抗孵育步骤与步骤 5 一致。
7. 离心沉淀细胞并丢弃上清液，重复操作。
8. 150  $\mu\text{l}$  稀释的荧光物质偶联的二抗 (二抗稀释度使用建议浓度) 重悬细胞，4°C 避光孵育 45-60 min。
9. 离心沉淀细胞，丢弃上清液。200  $\mu\text{l}$  通透剂重悬细胞，并在流式细胞分析仪上进行分析。

#### ◆ 人外周血细胞表面抗原的流式检测步骤

1. 在每个 2 mL EP 管或流式检测管中加入 100  $\mu\text{L}$  全血。
2. 按照抗体说明书中指定条件加入抗体后，轻轻混匀。
3. 避光室温孵育 15-30 min。
4. 裂解红细胞之前，应使裂解液恢复至室温。
5. 将待裂解全血轻轻混匀后，每 100  $\mu\text{L}$  全血加入适量裂解液立即在涡旋仪上震荡 1 s。(推荐使用 Proteintech 红细胞裂解液，货号：PF00014/PF00015)
6. 室温下避光裂解 10 min 左右。
7. 加入 PBS 终止裂解。
8. 室温下 300-400 g 离心 5 min，弃红色上清。
9. 加入 2 mL PBS 颠倒混匀后，室温下 300-400 g 离心 5 min，弃上清。
10. 加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 混匀后，尽快上机检测。

### 人外周血细胞表面抗原检测注意事项

1. 结合能力较弱的抗体可以适当延长孵育时间，建议进行预实验。
2. 血液样本个体差异较大，裂解时间可能会有细微变化。如果全血红细胞含量较高，可以用适量的 PBS 稀释全血。
3. 当孵育完抗体后，有可能红细胞会沉淀在底部，没有混匀的话可能会导致裂红不充分。
4. 裂解方法可以根据实际情况进行调整，适当增减工作液体积或裂解时间均可。
5. 用肉眼评估裂解效果，如果外观浑浊或者光散射直方图异常，可能为裂解不完全。
6. 若使用不含固定剂的裂解液裂解红细胞后，完成实验后不能立即上机检测时，可以用固定剂固定细胞后再上机检测。防止放置时间过长细胞死亡导致细胞分群较差。(固定剂 1%-4% 多聚甲醛均可)。
7. 若使用的一抗不是标记荧光抗体，则在上述检测步骤 9 后加入适量的二抗稀释液。避光孵育 15-30 min。重复上述步骤 9 洗涤细胞 1-2 次后，进行上述步骤 10。
8. 若要对多个细胞表面抗原进行多色标记时，可以同时加入荧光标记抗体后按照以上步骤进行孵育和细胞洗涤。实验操作尽量保持在避光的条件下进行，防止荧光淬灭。

## ◆ 小鼠脾组织细胞(表面&核内胞内)流式检测步骤

### 1. 样本制备

- 取材: 利用急性大失血法将小鼠处死, 泡在 75% 的酒精中 5min 后, 放入超净台, 取出小鼠脾脏, 置于平皿中, 放冰上。  
注意: 摘眼球法将小鼠处死时, 要尽量将血液放干净, 防止在制样时红细胞过多, 离心弃上清后, 细胞聚团无法吹散导致样本的损失较大。
- 用 PBS 缓冲液洗涤, 并且剔除脾脏周围脂肪, 结缔组织等。
- 利用钢网研磨法: 将洗净的脾脏放置不锈钢网 (200 目) 上, 用注射器针芯或用弯头组织镊子轻轻碾压脾脏, 获取细胞悬液。
- 碾压完毕后, 用细胞筛网过滤悬液两次。以除去未碾压充分的组织。
- 将过滤后的悬液 300-400 g, 离心 5-10min, 弃上清。
- PBS 缓冲液 5 mL, 轻轻冲散细胞, 再离心一次, 弃上清。
- 每管视细胞量加入红细胞裂解液 1-3 mL, 冰上孵育 10-15min 后直接离心。  
注意: 裂解红细胞时, 时间不宜过长以免破坏其他细胞。如果需要继续培养和诱导分化的, 不建议裂红。
- 视细胞量加入 1-2 mL PBS。取小样, 台盼蓝染色后, 用血球计数板计数。
- 将细胞调整到  $10^7$ /mL 左右, 分在 5 mL EP 管或者流式检测管中。

### 2. 细胞表面染色

- 每个 2 mL EP 管内分别加入 100 分别加入表型抗体, 4°C 孵育 15-30 min。
- 加入 2 mL PBS 洗涤, 400-500 g 离心 5min, 弃上清, 洗涤 2-3 次。
- 加入 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞后, 上机检测。(有荧光抗体存在的情况下注意避光操作)  
注意: 若来不及进行检测, 可以加入固定剂后 4°C 过夜 (固定剂 1%-4% 多聚甲醛均可)。建议尽快上机检测以防止信号减弱或固定剂对某些荧光素或蛋白的影响。

### 3. 细胞核内染色(胞内染色)

- 先根据需要对细胞表面标记进行染色, 步骤如上。
- 最后一次洗涤完后, 弃上清。保留残余体积, 大概 100  $\mu$ L 左右涡旋仪上涡旋细胞使沉淀完全解离。
- 向每个管中加入适量的 Foxp3 固定 / 破膜工作溶液并涡旋细胞混匀。
- 在室温下避光孵育 30-60min。
- 每管加入 2 mL 1X 破膜液, 在室温下 400-600g 离心 5min, 弃上清。
- (可选) 重复第 5 步。
- 加入 100  $\mu$ L 1X 破膜液重悬细胞, 不洗涤, 加入推荐量的荧光标记抗体以检测核内抗原, 并在 4°C 避光孵育 45min。
- 每管加 2 mL 1X 破膜液, 在室温下 400-600g 离心 5min, 弃上清。
- 重复步骤 8。
- 加入 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞后, 上机检测。

## 荧光素的选择

荧光染料有应用差别, 常用荧光素参数如下:

| 荧光素               | 亮度 | 检测抗原表达量 | 背景                             | 使用频率 |
|-------------------|----|---------|--------------------------------|------|
| BV421             | 5  | 最低      |                                | 最高   |
| FITC/CoraLite®488 | 3  | 低到中     | 渗出到PE                          | 高    |
| APC/CoraLite®647  | 5  | 低到中     |                                | 高    |
| BV570             | 4  | 中       | 渗出到PE和BV421                    | 中    |
| Percp-Cy5.5       | 3  | 中       | Crossbeam到AF700                | 中    |
| PE                | 5  | 低到中     |                                | 中    |
| PE-Cy7            | 4  | 低到中     | 渗出到大部分PE的耦合荧光素及Crossbeam到AF700 | 中到低  |
| AF700             | 2  | 中到低     |                                | 中    |
| APC-Cy7           | 2  | 中       | 渗出到APC                         | 低    |

亮度数字仅用于性能描述: 5 表示相对最强。

注意: 荧光亮度并不是荧光素选择的唯一要素!

### 1. 荧光染料选用的特性

- 串联荧光素: Percp-Cy5.5、PE-Cy7、APC-Cy7 等, 对光稳定性差, 固定破膜后易断裂, Cy 系列为花青素染料, 极易结合死细胞, 或造成非特异性着色;
- FITC 对较低的 PH 敏感;
- 避免使用冻融后的单标。

### 2. 根据抗原表达强弱合理选择荧光素

- 高表达的抗原可以根据实验需求选用合适的流式荧光抗体, 低表达抗原一般需要用较亮的荧光素检测;
- 多色搭配时, 亮度高的荧光素用于低表达的蛋白, 亮度弱的用于高表达蛋白;
- 如果对所检测的抗原表达量不清楚, 对于 Panel 内重要的抗原选择最强的荧光素。

## 对照设置

设置合理的对照组是整个流式实验成功的关键，流式对照至少有 4 种：空白对照，同型对照，荧光减一对照和生物学对照，主要目的是为了减少出现假阳性或假阴性结果。

| 对照   | 用途  |
|--|---|
| 空白对照<br>(Blank control)                          | 未染色的细胞，用以区分细胞的背景荧光或自发荧光，避免假阳性的结果。可以用来调节FSC和SSC，以及尤其是荧光通道。                     |
| 同型对照<br>(Isotype control)                        | 使用与实验抗体相同种属来源、相同剂量及同种免疫球蛋白的相同亚型的抗体作为对照，用于区分抗体非特异性结合到细胞上而产生的背景荧光。              |
| 荧光减一对照<br>(Fluorescence minus one (FMO) control) | 即实验组中除了目标荧光抗体以外添加其他所有荧光素抗体，这样可以使各种荧光素对未标记通道的渗漏体现出来，能够将门放在合适的位置，是多色实验设门所必需的对照。 |
| 生物学阴性对照<br>(Biological control)                  | 除研究对象外，其他条件均保持一致的对照实验组，用来确定染色特异性和实验结果的可靠性，如检测刺激后抗原表达量，以未刺激的样本做对照。             |

## 🔍 如何选择同型对照？

- 一般选择与一抗的成分完全相同种属来源、相同免疫球蛋白及亚型、相同荧光素标记的F/P值、相同剂量和浓度的抗体。
- 如果抗体的组合形式是纯化的一抗 + 荧光标记的二抗，那么应该选择一抗的同型对照。

## 抗体滴度实验

当首次使用抗体，或者采用不同染色条件或组织时，建议进行梯度稀释，以测定最佳的抗体稀释倍数。

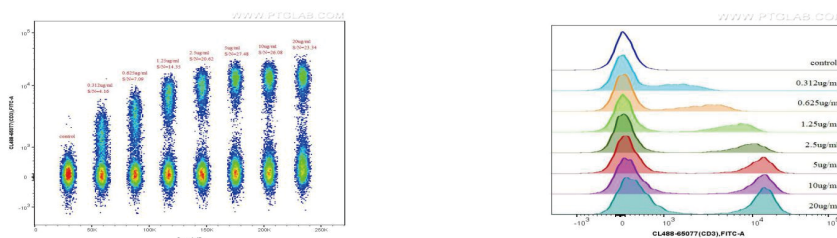
1. 准备 8 个 EP 管 (编号 1-8)，每管加入 50 $\mu$ L 细胞悬液 (约 10<sup>6</sup> 个细胞)。
2. 第 1 管加入 50 $\mu$ L PBS (作为未染色对照)，最终体积为 100 $\mu$ L。
3. 根据抗体浓度确定加入的抗体量。

如：抗体浓度是 0.1mg/mL，并且假设我们设置的抗体浓度梯度为 0.312 $\mu$ g/mL (第 2 管)，0.625 $\mu$ g/mL (第 3 管)，1.25 $\mu$ g/mL (第 4 管)，2.5 $\mu$ g/mL (第 5 管)，5 $\mu$ g/mL (第 6 管)，10 $\mu$ g/mL (第 7 管)，20 $\mu$ g/mL (第 8 管)，最终体积为 100 $\mu$ L。那么这 7 管加入的抗体依次为：0.31 $\mu$ L (0.031 $\mu$ g)，0.63 $\mu$ L (0.063 $\mu$ g)，1.25 $\mu$ L (0.125 $\mu$ g)，2.5 $\mu$ L (0.25 $\mu$ g)，5 $\mu$ L (0.5 $\mu$ g)，10 $\mu$ L (1 $\mu$ g)，20 $\mu$ L (2 $\mu$ g)。

|      | 第1管        | 第2管           | 第3管           | 第4管           | 第5管          | 第6管        | 第7管        | 第8管        |
|------|------------|---------------|---------------|---------------|--------------|------------|------------|------------|
| 细胞悬液 | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L    | 50 $\mu$ L    | 50 $\mu$ L    | 50 $\mu$ L   | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L |
| 抗体   | 0          | 0.31 $\mu$ L  | 0.63 $\mu$ L  | 1.25 $\mu$ L  | 2.5 $\mu$ L  | 5 $\mu$ L  | 10 $\mu$ L | 20 $\mu$ L |
| PBS  | 50 $\mu$ L | 49.69 $\mu$ L | 49.37 $\mu$ L | 48.75 $\mu$ L | 47.5 $\mu$ L | 45 $\mu$ L | 40 $\mu$ L | 30 $\mu$ L |

注：先将抗体加入到 PBS 中，再与细胞悬液混合。

4. 各管加入 PBS，最终体积为 100 $\mu$ L。混合均匀后避光孵育 15-30 分钟。
5. 400-500g 离心 5 分钟，去上清，加入 200 $\mu$ L PBS 重悬细胞。上机检测，获取 10000 个有效事件。
6. 数据结果如下：



7. 数据分析：上图是采用 CD3 进行检测，阳性与阴性分群清楚。通过计数信噪比得到 5 $\mu$ g/mL 的信噪比最高，那么这个浓度的抗体用量是最佳抗体用量。

8. 如果分群不清，可以根据未染色对照设置一条虚线作为阴性群原本的位置，然后查看阴性细胞群荧光基本上在虚线下时，而分群延伸程度最长的就是最佳抗体用量。

## 🔍 ug和test，不同规格的抗体有什么区别？

1. 标注test规格的抗体，一般摸索过最佳浓度，可按照说明书推荐用量根据实验需求略微调整即可；
2. 标注ug规格的抗体，说明书一般显示小于某剂量，使用前需根据实验样本进行抗体滴度实验，确认最佳浓度。

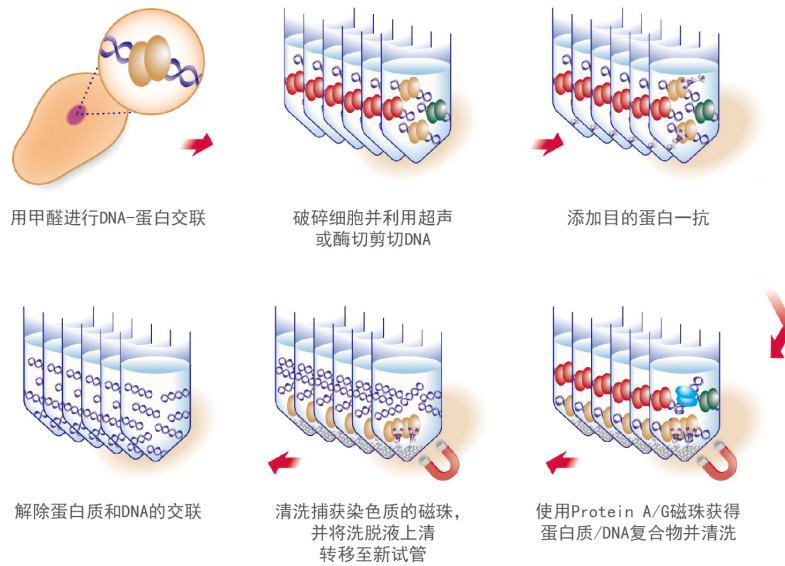
## 流式细胞术疑难解析

| 常见问题         | 原因                  | 解析   |
|--------------|---------------------|--|
| 荧光强度高        | 阻断不充分               | 更换阻断剂或者增加阻断的时间   |
|              | 抗体浓度过高              | 通过滴定抗体以确定最佳浓度；设置阳性和阴性（未染色）对照以验证抗体性   |
|              | 洗涤不充分               | 适当增加洗涤次数；如果是胞内靶标，可在洗涤缓冲液中加入Tween-20或Triton-X，以确保未结合的抗体不会被困在细胞内   |
|              | 亮度高的荧光素被用于检测含量丰富的抗原 | 更换亮度弱的荧光素  |
|              | 电压太高/信号超出范围         | 确认仪器设置的正确；加入对照管以优化每个荧光素的仪器设置，再使用对照进行电压优化、以确定检测器的最佳设置   |
|              | 增益过高                | 确保使用适当的阳性对照进行仪器设置；在仪器操作界面上降低增益以降低信号强度。   |
|              | 激光功率过高              | 降低激光功率（在仪器允许的情况下），从而降低信号强度   |
| 荧光强度弱或无信号    | 靶抗原含量低              | 确认靶抗原丰度；使用新鲜分离的细胞，避免冻融；标记抗体时将亮度强的荧光素与含量低的抗原搭配；可考虑对细胞进行富集   |
|              | 抗体对靶标的亲和力较差         | 确认抗体是否经过验证；换抗体   |
|              | 过度固定                | 尝试使用不同的固定剂或减少固定时间/浓度   |
|              | 抗体浓度过低              | 通过滴定抗体确认最佳浓度；适当的增加孵育时间   |
|              | 荧光素已降解/串联染料已分解      | 更换荧光素；荧光素抗体和染色样品储存时需要避光；避免使用串联染料进行长时间实验  |
|              | 抗体无法结合细胞内抗原         | 优化细胞破膜操作；通过使用蛋白质转运抑制剂（如brefeldinA）防止细胞内蛋白质被分泌出去；在冰上进行所有操作，以避免细胞表面抗原内化；尽可能的选择低分子量荧光素检测细胞内靶标   |
|              | 荧光素与仪器激光器和检测器不兼容    | 实验之前检查荧光素的激发和发射特性是否与流式细胞仪的激光器和检测器兼容，避免仪器激发器无法激发荧光素   |
|              | 获取细胞速度太高/信号丢失       | 在仪器操作界面调整仪器收集细胞的速度；在上机前将细胞调整到适当的密度   |
|              | 信号未正确补偿             | 检查补偿对照是否调整正确；确认设门是否正确（阴性门内的细胞务必均为阴性。阳性门内的细胞均为阳性）；若靶抗原信号较弱，可考虑使用补偿微球以确保补偿值的正确计算   |
|              | 增益过低或阈值过高           | 确保使用适当的阳性对照进行仪器设置；在仪器操作界面调整阈值确保荧光信号不被切掉；适当增加增益提高信号强度   |
|              | 激光未校准               | 进行质控（使用校准微球自动校准仪器）   |
| 荧光背景强        | 封闭不充分               | 更换阻断剂或者增加阻断的时间；可选用无需Fc受体阻断的抗体  |
|              | 洗涤不充分               | 适当增加洗涤次数；如果是做胞内靶标时，可在洗涤缓冲液中加入Tween-20或Triton-X，以确保未结合的抗体不会被困在细胞内   |
|              | 非特异性染色              | 设置同型对照以排除与Fc受体、荧光团或其他细胞成分结合的非特异性抗体   |
|              | 死细胞、粘连体、碎片引起        | 在实验之前将细胞用过滤器去除团块；细胞样本保持在4℃或冰上；加入活性染料，如碘化丙啶(P)或7-AAD，排除死细胞；尽可能使用新鲜分离的细胞，避免冻融；重悬时，使用不含Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 的2%FBS缓冲液；在样本中加入DNase |
|              | 自发荧光                | 避免过度固定；用未染色对照确定背景自发荧光水平  |
| 散射光不正常       | 细胞被污染               | 对细胞进行严格的无菌培养；妥善存放试剂和染色后的细胞，防止细菌生长；始终使用新鲜的封闭和洗涤缓冲液；清洗进样针以确保没有被之前的样品污染   |
|              | 细胞受损                | 优化样品制备；避免剧烈的涡旋和离心或反复冻融；已染色的样本在获取之前不要长时间放置  |
|              | 死细胞数过多              | 加入活性染料，例如碘化丙啶(P)或7-AAD，以排除死细胞；尽可能使用新鲜分离的细胞，避免冻融；可考虑使用死细胞去除试剂   |
|              | 血浆或血清样本中存在红细胞       | 在显微镜下检查样本来确认RBC裂解是否完成；制备新鲜的RBC裂解缓冲液；在RBC去除过程中增加洗涤次数  |
|              | 活化方法改变了细胞特性         | 查询文献，确保使用了正确的活化方法  |
| 上机时细胞获取速率不正常 | 细胞数量过多/过少           | 检查细胞计数（通常建议使用1x10 <sup>6</sup> 细胞/ml）；轻轻吹打悬液，确保细胞充分混合  |
|              | 死细胞、粘连体、碎片引起        | 在实验之前将细胞用过滤器去除团块；细胞样本保持在4℃或冰上；加入活性染料，如碘化丙啶(P)或7-AAD，排除死细胞；尽可能使用新鲜分离的细胞，避免冻融；重悬时，使用不含Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 的2%FBS缓冲液；在样本中加入DNase |
|              | 进样管堵塞               | 疏通流式进样针  |
|              | 流动室有气泡              | 排空气泡   |
| 细胞分群异常       | 多种细胞均能表达靶抗原         | 参阅文献，确认有关靶抗原表达的信息；调整染色策略，尽量消除分析中不需要的的细胞类型  |
|              | 死细胞、粘连体、碎片引起        | 在实验之前将细胞用过滤器去除团块；细胞样本保持在4℃或冰上；加入活性染料，如碘化丙啶(P)或7-AAD，排除死细胞；尽可能使用新鲜分离的细胞，避免冻融；重悬时，使用不含Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 的2%FBS缓冲液；在样本中加入DNase |
|              | 荧光信号补偿不足            | 补偿对照中阳性群的荧光强度需要与样品一样强或更强；尽量自动补偿；如果需要手动调整补偿，请使用平均荧光强度（MFI）作为判断标准  |



## 第七章 染色质免疫沉淀(Chromatin Immunoprecipitation,ChIP)

染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation) 简称 ChIP，是一种研究细胞内 DNA 和蛋白质相互作用的方法。利用甲醛交联细胞核中的蛋白-DNA，接着打断染色质，再通过抗体捕获目的蛋白、偶联有 protein A 或 protein G 的磁珠 / 琼脂糖珠捕获抗体，与目的蛋白存在互作并交联在一起的 DNA 片段便一起被捕获下来，然后解交联、纯化该 DNA 片段，最终通过 PCR、Q-PCR、测序等方法便可鉴定互作情况。



▲ 染色质免疫沉淀实验流程(来自Active Motif公司)

### 操作步骤 (以Active Motif ChIP kit 为例，货号：53008/53009)

#### 1. 交联和收集细胞 (以处理单个15 cm平皿细胞为例)

1. 当单个15 cm平皿的细胞长至70%~80%时，弃去原培养基，加入含有终浓度1%甲醛的20 ml基础培养基 (20 ml培养基中加入540 ul 37%甲醛，混匀)，室温水平摇床10 min以固定细胞。(10 min一般情况比较合适，但也可根据具体情况作优化调整。)
2. 弃去上述固定液，用10 ml预冷 1 X PBS润洗一次。
3. 弃去PBS，加入10 ml甘氨酸终止液 (10 ml 1 X PBS中，含终浓度为125 mM的甘氨酸)，稍晃匀，室温水平摇床5 min。
4. 弃甘氨酸终止液，加10 ml预冷 1 X PBS润洗细胞一次。
5. 加入5 ml 预冷1 X PBS (含终浓度0.5 mM PMSF，用前添加)，刮下细胞，收集至15 ml圆锥底离心管中，4℃，2500 rpm (约720 g) 离心10 min，移弃上清。

注意：此时细胞可冻存-80℃备用，或直接进行后续试验。

### 👉 如何正确固定实验样本？

1. ChIP 实验可使用细胞或者组织样本，不同的样本对应的起始量也不同。
2. 交联中甲醛浓度和交联时间都有严格要求，一般选用 1% 的甲醛浓度，室温固定 10-15 min，时间太短，蛋白和 DNA 结合不牢固，时间太长易造成超声困难，破坏蛋白结构。
3. 对于组织一般建议切成 1-3 mm<sup>3</sup> 大小，交联时间延长至 15 min。

#### 2. 断裂染色质：超声法或酶消化法都可。

##### A. 超声法

1. 加入1 ml预冷的细胞裂解液 (含终浓度0.5 mM PMSF及0.5 x PIC，用前添加)，重悬细胞，冰上静置30 min。



2. 转移至冰预冷的杜恩斯匀浆器，研磨10下，以释放细胞核。（可取10 ul镜检，如果未释放充分，可继续研磨后观察。）
3. 转移至1.5 ml离心管中，4℃、5000 rpm (2400 g) 离心10 min收集细胞核。
4. 小心吸弃上清，用350 ul剪切液（含终浓度0.5 mM PMSF及0.5 x PIC，用前添加），重悬细胞核，冰上放置。
5. 根据以前已经优化好的超声实验条件，超声剪切DNA。（超声条件优化——3 mm探头，25%功率，超声20s、停30s，分别进行5次/10次/20次等超声梯度摸索。）
6. 超声后，4℃、15000 rpm (16000 g) 离心10 min，转移上清至新1.5 ml管中，直接进行后续试验，或冻存-80℃备用。

### B. 酶消化法

1. 加入1 ml预冷的细胞裂解液（含终浓度0.5 mM PMSF及0.5 x PIC，用前添加），重悬细胞，冰上静置30 min。
2. 转移至冰预冷的杜恩斯匀浆器，研磨10下，以释放细胞核。（可取10 ul镜检，如果未释放充分，可继续研磨后观察。）
3. 转移至1.5 ml离心管中，4℃、5000 rpm (2400 g) 离心10 min收集细胞核。
4. 小心吸弃上清，用350 ul剪切液（含终浓度0.5 mM PMSF及0.5 x PIC，用前添加），重悬细胞核，37℃孵育5 min。
5. 酶消化：加入一定量（已预实验确定合适用量）的微生物核酸酶，37℃ 20 min，中间混匀几次。（酶合适用量，应预先做梯度摸索。）
6. 加入7 ul 0.5 M EDTA，终止酶消化。
7. 4℃、15000 rpm (16000 g) 离心10 min，转移上清至新1.5 ml管中，直接进行后续试验，或冻存-80℃备用。

## 超声法与酶切法的差异

| 属性 | 超声法                        | 酶切法  |
|----|----------------------------|--|
| 定位 | 无偏差随机打断，物理作用超声，无碱基偏好性      | 具有碱基偏好性，高GC含量或紧密结构DNA区域消化不完全，易造成酶切位点附近的核苷酸发生突变 |
| 成本 | 超声所需设备成本较高，操作需要一定经验        | 酶切法成本较低，简单易上手                                  |
| 批次 | 设备处理性能稳定，相同参数处理批次差异小       | 酶切法人工操作步骤多，需要计算酶浓度，样本浓度等，样本间批次差异较大             |
| 片段 | 超声后片段若还大于所需片段大小，可继续超声至目的大小 | 终止反应后若片段不达标要求，可能需要重新计算或重做酶切实验                  |
| 操作 | 原理固定，需要调整超声时间，频率等参数        | 不同的酶需要不同试剂和酶切条件，酶切原理和效果不一                      |

### 3. 检测染色质断裂效果 (200-1500 bp较合适)

1. 取50 ul染色质上清，加入150 ul ddH<sub>2</sub>O，10 ul 5M NaCl，65℃ 4h或过夜，解交联。
2. 加入1 ul RNaseA，37℃，15 min。
3. 每管中加入10 ul Proteinase K，42℃，1.5 h。
4. 苯酚/氯仿抽提法纯化或试剂盒纯化DNA片段。
5. 取10 ul，1%琼脂糖胶电泳检测，观察大小分布；紫外分光光度计测量浓度。

### 4. 免疫沉淀

1. 先取10 ul染色质作为Input对照，冻存留待后续纯化DNA。
  2. 准备单个ChIP反应：25 ul protein G磁珠，加入10 ul ChIP buffer 1，7~25 ug 染色质（一般不超过60 ul），1~3 ug抗体，1 ul 100 X PIC，补水至100 ul总体积。4℃旋转孵育4 h（有时过夜孵育，可能提高灵敏度）。
- 注意：除了待测目的抗体，应另外准备2份同样用量的染色质，一份加入阳性抗体对照及磁珠等至100 ul，另一份加入阴性同型抗体及磁珠等至100 ul。同步进行免疫沉淀。
3. 瞬时离心后，磁性分离，弃上清。
  4. 依次用800 ul ChIP buffer 1洗涤1次、800 ul ChIP buffer 2洗涤2次。磁性分离弃上清。
  5. 加入50 ul ChIP洗脱液，室温混合15min。

## 抗体选择是ChIP成功与否的关键

为ChIP实验选择抗体时，最重要的是评估它是否在固定条件下以高度特异性识别靶蛋白（靶蛋白的立体表位及甲醛交联后的立体表位）以及是否能够经受长时间的IP和清洗步骤保持高结合力；

- A. 优先选择文献报道可以用于ChIP实验的抗体或抗体公司提供的ChIP-qPCR或ChIP-seq数据的抗体。
- B. 如果没有满足上述条件的抗体，可以参考已经在交联实验中应用过的抗体，如IF或者IHC抗体，虽然这样的抗体可在IF或IHC固定条件下识别蛋白表位，但ChIP实验过程中的其他因素可能会阻止抗体发挥良好作用。

## 5.解交联、回收纯化DNA

1. 继续加入50 ul解交联液，混合后磁性分离，转移上清于新1.5 ml管中。
2. 取出前面留存的Input对照，加入88 ul ChIP buffer 2和2 ul 5 M NaCl，65°C 2.5 h。
3. 加2 ul Proteinase K，混匀后37°C 1 h。再加入2 ul 终止液。
4. 试剂盒纯化DNA片段。

## 6.Q-PCR检测

1. 配液体系按照商业化Q-PCR试剂盒说明书进行，通过参考文献/网络数据库或针对待检测基因互作区段设计引物，扩增片段一般控制在50-150 bp。

取2 ul上述抗体捕获并最终纯化的DNA，用作PCR模板；

取Input对照最终纯化的DNA，分别做10倍比稀释，一般做3~5个梯度，然后各取2 ul作PCR模板，用于建立标准曲线。

2. Q-PCR扩增程序：

94°C 3min  
94°C 20s——(50°C~60°C不等) 30 s——72°C 30 s (此步收集荧光)；40个循环  
72°C 10 min  
65°C 5 s——95°C，0.5°C (导入溶解曲线程序)  
10°C End

3. 根据Input不同稀释梯度的DNA模板的扩增曲线，可建立标曲（Input纯化后的DNA含量可测量得到）。对目的抗体及阴性抗体捕获并最终纯化的DNA，可将Ct值代入标曲分别计算出其含量（软件可自动计算），标记为X、Y。
4. 计算富集倍数：富集倍数=X÷Y

## 如何确定ChIP实验是否成功？

### 1. 设立正确的对照

ChIP 实验涉及的对照种类较多，包括阳性对照和阴性对照，每种对照又分别包括抗体对照和引物对照。

| 对照类型        | 描述   | 作用               |
|-------------|--|------------------|
| 阳性对照抗体      | 样本中丰富高，易做靶点的抗体，比如RNA pol II（用于对照转录因子）或H3K4me3（用于对照组蛋白修饰） | 排除整个实验流程问题，防止假阴性 |
| 阴性对照抗体（IgG） | IP使用抗体同种属来源IgG   | 排除抗体非特异性结合产生的假阳性 |
| 阳性对照引物      | 目的蛋白确定结合区域设计引物   | 初步判断目的片段是否成功富集   |
| 阴性对照引物      | 目的蛋白确定不结合区域设计引物  | 排除IP富集的背景DNA     |
| Input       | 超声处理之后未经过IP的染色质样本  | qPCR及NGS分析时作为参照  |

### 2. 通过富集度判断是否成功

一般只有通过 ChIP-qPCR 或 ChIP-PCR 验证才能确定 ChIP 成功与否。

通过 ChIP-qPCR 判断是通过比较目的蛋白在阳性区域和阴性区域的富集度差异来判断。阳性区域比阴性区域富集度高 4-8 倍以下（2-3 个 cycles），可认为 ChIP 没有成功；如果在 4-8 倍以上，说明目的蛋白在阳性区域有富集，可以初步认为 ChIP 成功了，但具体还要依蛋白而定。一般对于已有报道的蛋白的 ChIP，可参考文献；没有文献报道的蛋白 ChIP，可以认为 4-8 倍的差异是初步成功。

## 染色质免疫沉淀实验疑难解析

| 问题                            | 解析   |
|-------------------------------|--|
| 哪些步骤时，可暂停实验？                  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 细胞经“交联和收集细胞”步骤后，细胞可冻存-80℃备用。</li> <li>2. 染色质断裂后（超声法或酶消化法），离心并转移的上清染色质，可冻存-80℃备用。</li> <li>3. 染色质解交联后（DNA回收纯化前），可冻存于-20℃备用。DNA回收纯化后，可冻存于-20℃备用。</li> </ol>  |
| 染色质断裂后，经解交联和纯化发现DNA浓度低        | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 细胞裂解不充分。结合镜检，适当增加匀浆器研磨次数，以更充分释放细胞核。</li> <li>2. 减少甲醛固定时间。如降为5 min。</li> <li>3. 采用超声法断裂染色质时，发生了乳化（产生很多空气泡沫），影响了超声效果。可小心控制超声功率和操作，避免乳化；若已乳化，可4℃ 8000 rpm离心4min排掉空气泡沫。</li> <li>4. 用新鲜甲醛固定交联。</li> <li>5. ChIP捕获时，如需放大反应规模，加大染色质用量时，其它试剂用量也应同步适当增加。</li> <li>6. 解交联不充分。可解交联过夜。</li> </ol> <p>DNA纯化不佳。解交联后染色质，依次加RNase A降解RNA、Proteinase K消化蛋白，然后经苯酚/氯仿法纯化（“检测染色质断裂效果”时，染色质样品中杂蛋白很多，建议采用该法纯化）或DNA纯化试剂盒纯化（ChIP捕获后DNA可用此法）。</p>  |
| 染色质断裂后，经解交联和纯化发现DNA大小不合适      | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. DNA片段太大：增加超声时长（超声法）或酶用量（酶消化法）。</li> <li>2. DNA片段太小：减少超声时长（超声法）或酶用量（酶消化法）。</li> </ol>   |
| 目的抗体ChIP富集度很弱，甚至无富集           | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 增加染色质用量。一般单个ChIP反应用7~25 ug染色质，可酌情增加至50 ug。</li> <li>2. 增加抗体用量。一般单个ChIP反应用1~3 ug抗体捕获，可酌情增加至10 ug。</li> <li>3. 抗体亲和力低。ChIP捕获时，抗体可以孵育过夜。</li> <li>4. 抗体与protein G beads结合弱。某些特定鼠单抗可能存在这种情况，此时可换用Active Motif公司的ChIP桥连抗体捕获目的抗体（能很好结合所有类型鼠单抗）。</li> <li>5. 目的抗体不适合ChIP。未经ChIP验证的抗体，可能因不能有效识别与交联后蛋白或表位被掩盖。换用其它来源抗体，最好是经过ChIP验证的抗体。</li> <li>6. 引物不佳。重新设计引物。</li> </ol>   |
| 核酸PCR/Q-PCR检测，发现阴性IgG对照存在高背景？ | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 染色质断裂不充分，片段过大。可增加增加超声时长（超声法）或酶用量（酶消化法），控制片段大小在200-1500 bp。</li> <li>2. 抗体过量。减少用量。</li> <li>3. PCR模板DNA过多。减少用量。</li> <li>4. 增加ChIP捕获后洗涤操作。可尝试增加1~2次ChIP buffer 1和/或ChIP buffer 2洗涤次数；在ChIP buffer 1洗涤和ChIP buffer 2洗涤步骤间，增加高盐溶液洗涤1次。</li> </ol> <p>注意：高盐溶液配方—20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, pH 7.4。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. 染色质与beads存在非特异结合。Beads封闭后再使用：加入终浓度2.5 ug/ul BSA和终浓度2.5 ug/ul Salmon Sperm DNA，封闭beads。或更换不同来源beads。</li> </ol> |

咨询和订购Active motif 表观遗传学研究相关产品，请联系Proteintech当地授权代理商。

## 第八章 Humankine®人源活性蛋白的溶解注意事项

Proteintech 的 Humankine® 系列细胞因子均为冻干粉（仅个别特殊的重组蛋白为液体），冻干粉运输方便，活性稳定，在 -20℃或 -80℃条件下可以保存数年。用户在进行科学研究时，需要将冻干粉在使用前进行溶解，然后按照一定的浓度，以液体形式加到培养体系或是注射入动物体内。

溶解步骤非常关键，因溶解不当而导致细胞因子失活或是浓度不准确，将会影响用户的实验结果，给科研工作带来困扰。溶解过程中的注意事项，详述如下：

### 1、开盖前离心试剂管，10000-12000rpm离心30s或3000-3500rpm离心5min。

Humankine® 系列的重组蛋白产品中不含有载体蛋白或其他添加剂（如 HSA、BSA 或蔗糖、甘露醇、海藻糖等），通常以最少量的盐来进行冻干处理，盛放于无菌塑料管内，微量的蛋白在冻干过程中会沉积在管壁内，形成很薄或不可见的蛋白膜，冻干粉在运输过程中可能会因颠簸而飘散并粘贴于管壁或管盖上，所以在打开塑料管盖前，需将冻干粉通过离心收集到管底，以便用很小体积的液体即可将冻干粉完全溶解。

### 2、用无菌水或合适的溶剂重悬至0.1-1.0mg/mL，不可振荡（溶解关键步骤）。

1. 务必使用说明书中推荐的溶剂来溶解/重悬冻干粉。
2. 常用溶解液有：无菌水；无菌1XPBS；无菌 10 mM 醋酸；无菌 20% 乙醇 + 50 mM 醋酸钠 + 75 mM 醋酸；无菌 4 mM 盐酸溶液（新鲜配制）。
3. 蛋白的溶解性与很多因素有关，比如pH值和离子强度等，说明书上推荐的溶解液均经过严格测试，是能够将该细胞因子或重组蛋白完全溶解的液体。
4. 蛋白在一定的浓度范围内可以保持良好的活性和稳定性。低于或高于该浓度范围，可能会导致蛋白无法完全溶解，甚至出现蛋白质聚集现象，或是活性减弱甚至丧失。
5. 不能用涡旋仪进行快速振荡，一般用移液枪的枪头轻吹几下，即可使细胞因子或重组蛋白完全溶解。有些不易溶解或是溶解缓慢的蛋白质，可以将其放置于水平摇床上低速摇一段时间，或是将重悬液在4℃静置2小时以上。对于不易溶解的细胞因子，请参考说明书的溶解方法。

### 3、保存条件

重悬后的细胞因子或重组蛋白溶液在 2-8℃最长可保存一周，如要长期保存，则需用终浓度为 0.1% HSA 或是 0.1% BSA 的缓冲液来稀释，细胞因子浓度不得低于 10μg/mL，然后分装冻存于 -20℃至 -80℃。分装时每管工作液的体积最好是一次实验的用量，以实现每次实验用完一支工作液，避免反复冻融引起蛋白活性的降低。如果实验中不允许含有 HSA 或是 BSA 等人或动物蛋白成分的，可以使用 5% 海藻糖作为保护剂，稀释分装。

## Humankine® 蛋白系列



- |          |         |                 |
|----------|---------|-----------------|
| ✓ 人源细胞表达 | ✓ 无血清培养 | ✓ 无动物源性 & 无异源成分 |
| ✓ 无载体    | ✓ 无标签纯化 | ✓ 正确折叠          |
| ✓ 真实糖基化  | ✓ 高稳定性  | ✓ 批次一致性         |









# READING THE BOOK OF LIFE



WeChat Official Account

Proteintech Group, USA,  
5400 Pearl Street, Suite 300,  
Rosemont, IL 60018, USA  
t. 1-888-478-4522  
e. [proteintech@ptglab.com](mailto:proteintech@ptglab.com)

Proteintech Europe,  
Manchester Science Park, Kilburn House,  
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SE  
t. (+44)-161-22-66-144  
e. [europe@ptglab.com](mailto:europe@ptglab.com)

San Ying Biotechnology, China,  
D3-3, No.666 Gaoxin Avenue, Wuhan East Lake  
Hi-tech Development Zone, Wuhan, P.R.C.  
t. 86-27-87531629  
e. [Proteintech-CN@ptglab.com](mailto:Proteintech-CN@ptglab.com)