



Proteintech 免疫学实验技术手册

第七版 (2024 年)

www.ptgcn.com



以【抗体组计划】为愿景

完成覆盖生命科学领域的抗体

超过**23**万次SCI文献引用

产品引用文献**1000**余次荣登顶尖期刊封面



Proteintech Group, Inc. 于 2001 年成立，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

- 免多抗 / 鼠单抗 / 修饰抗体
- 重组免单抗 / 羊驼纳米抗体
- 流式抗体 / 直标抗体
- 单细胞空间组学分析抗体
- 免疫磁珠细胞分选系列产品
- 重组二抗

验证技术完善

免疫学实验内源性验证
siRNA/CRISPR 特异性验证
改变靶蛋白修饰形式验证
多样本 / 阴性或阳性对照验证



ELISA 试剂盒 · ELISA kits

- AuthentiKine® 精品系列
- Human/Mouse/Rat 系列
- Antibody Pair Set

标准严格的双抗夹心法

4PL 拟合标曲 / 板内板间差 < 10%
线性范围 / 回收率均 80-120%
天然样本验证



蛋白 · Proteins

- Humankine® 天然活性蛋白
- 哺乳动物细胞表达真核重组蛋白
- 原核表达重组蛋白
- Active Motif 表观药物开发重组蛋白

Humankine® 系列

HumaXpress® 人源细胞表达系统专利
无标签纯化 / 无载体 / 无动物成分
科研级别 / GMP 级别



实验室常用试剂 · Reagents

- WB/IP/IHC/IF/FC 等实验全套试剂
- 血清 / 培养基 / 冻存液 / 细胞活性检测等
- 小分子化合物 (抑制剂 & 激动剂)

免疫学和细胞实验一站式解决方案

20+ 年内部使用及验证
严格的质量管控



2022 年 Proteintech 荣获
“研究者之选”奖



2019 年 Proteintech 荣获
“免疫学 - 明日之星”奖



2016 年 Proteintech 荣获
“最佳抗体验证开拓”奖



生产基地通过 ISO 9001:2015
和 ISO 13485:2016 双体系认证

目 录

第一部分 基础理论

| | |
|---------------------------|---|
| 第一章 抗体与抗原 | 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 |
| 第二章 抗体的选择和验证 | 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 |
| 第三章 抗体的保存和分装 | 4 |

第二部分 检测应用

| | |
|--|----|
| 第一章 免疫印迹 (Western blot, WB) | 5 |
| 如何让 WB 实验轻松又高效?..... | 5 |
| 1. 样本制备..... | 6 |
| Proteintech 裂解液选择表..... | 6 |
| Proteintech 蛋白酶抑制剂选择表..... | 6 |
| 样品制备的注意事项..... | 7 |
| 2. 上样和电泳..... | 8 |
| 超大 / 超小分子量蛋白质分离技巧..... | 8 |
| 何种情况下使用梯度胶?..... | 8 |
| 3. 转膜..... | 9 |
| 4. 膜的封闭..... | 10 |
| 灵敏度与背景 - 封闭剂的微妙作用..... | 10 |
| 5. 孵育一抗..... | 11 |
| 内参抗体的选择原则..... | 11 |
| 6. 孵育二抗..... | 12 |
| 7. 显影..... | 12 |
| 8. 免疫印迹疑难解析..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 第二章 免疫化学 (Immunochemistry) | 13 |
| 高质量染色的秘诀是什么? | 13 |
| 1.免疫组织化学操作步骤 | 14 |
| 抗原修复有利于抗原与抗体的结合 | 14 |
| 2. 免疫组织化学疑难解析 | 15 |
| 第三章 免疫荧光 (Immunofluorescence, IF) | 16 |
| 轻松打造绚烂多彩微世界..... | 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 |
| 第四章 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) | 18 |
| 如何实现精准捕获, 更高重复性? | 18 |
| 1.样品裂解液的制备 | 19 |
| IP 及 Co-IP 样本制备注意事项 | 19 |
| 抗体捕获 Beads 的选择 | 20 |
| 2.抗体捕获目的蛋白 | 19 |
| 3.SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 检测 | 20 |
| 免疫沉淀实验如何选择检测二抗? | 21 |
| 4.免疫沉淀疑难解析 | 21 |
| 第五章 酶联免疫吸附 (ELISA) | 22 |
| 蛋白准确定量的方法是什么? | 22 |
| 1.双抗夹心法 ELISA | 23 |
| 2.ELISA 实验疑难解析 | 24 |
| 第六章 流式细胞技术 (Flow Cytometry, FC) | 25 |
| 让 FC 实验变得更友好 | 25 |
| 1.常见样本的流式检测步骤 | 26 |
| 人外周血细胞表面抗原检测注意事项 | 26 |
| 2.荧光素的选择 | 27 |
| 3.对照设置 | 28 |
| 如何选择同型对照? | 28 |
| 4.抗体滴度实验 | 28 |
| 5.流式细胞术疑难解析 | 29 |
| 第七章 染色质免疫沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation,ChIP) | 30 |
| ChIP 实验一站式解决方案 | 30 |
| 1.操作步骤..... | 31 |
| 如何正确固定实验样本? | 31 |
| 超声法与酶切法的差异 | 31 |
| 抗体选择是 ChIP 成功与否的关键 | 32 |
| 如何确定 ChIP 实验是否成功? | 32 |
| 2.染色质免疫沉淀疑难解析..... | 33 |

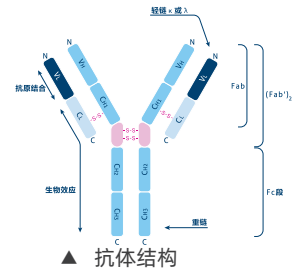
第一部分 基础理论

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。

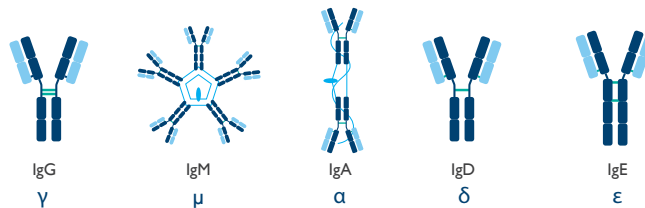
抗体的结构与特征

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。



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 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 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 γ 链有四种: $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$, 小鼠的 γ 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 λ 型和 κ 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 ι 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')₂ 段和一个 Fc' 段。F(ab')₂ 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。

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。

重组兔单抗原自可生成兔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。

纳米抗体：骆驼科动物（骆驼，羊驼及其近亲物种）以及鲨鱼体内天然缺失轻链的重链抗体可变区，相对分子量仅 15kDa，是传统抗体的十分之一，是目前已知的能够与抗原结合的最小功能单位。目前纳米抗体的制备方式为工程菌表达，具有易表达、易于基因工程改造的优点。基于其稳定性、穿透力等方面的优势，目前纳米抗体在疾病治疗、诊断及物质检测等领域广受关注。

Proteintech 可提供多种类型抗体，如兔多抗，鼠单抗，重组兔单抗以及羊驼纳米抗体。

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°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。

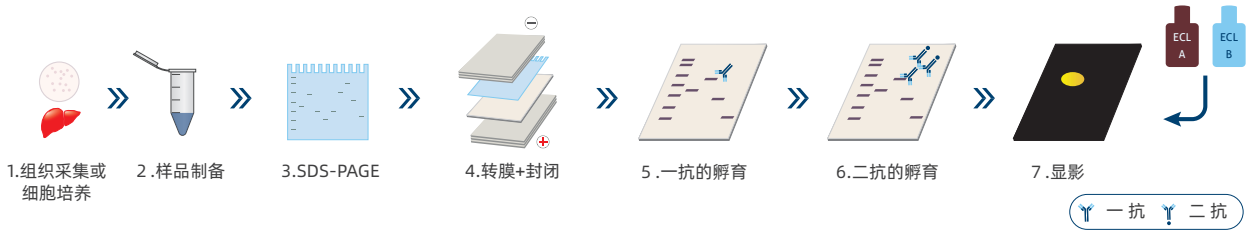
Proteintech 可以根据客户需求提供无甘油、无防腐剂、无保护蛋白的抗体产品。



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

如何让 WB 实验轻松又高效？

Proteintech 的 Western blot 一站式解决方案

| WB实验流程 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|---------------------------------------|------------------|------------------|---------|
| 样本制备 | 全蛋白提取试剂盒 | 细胞总蛋白提取试剂盒 | PK10020 |
| | | 动物组织总蛋白提取试剂盒 | PK10021 |
| | 细胞器及其蛋白提取试剂盒 | 核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒 | PK10014 |
| | | 细胞膜蛋白抽提试剂盒 | PK10015 |
| | | 线粒体分离及蛋白提取试剂盒 | PK10016 |
| | | 组蛋白抽提试剂盒 (不适用IP) | PK10022 |
| | 特殊蛋白提取试剂盒 | 外泌体分离及蛋白提取试剂盒 | PK10028 |
| | | 磷酸化蛋白提取试剂盒 | PK10023 |
| | | 易降解蛋白提取试剂盒 | PK10024 |
| | 裂解液 | 血浆血清白蛋白去除试剂盒 | PK10025 |
| | | SDS裂解液 | PR20002 |
| | | RIPA裂解液 (强) | PR20035 |
| | | RIPA裂解液 (中) | PR20001 |
| | | RIPA裂解液 (弱) | PR20036 |
| | | Co-IP裂解液 | PR20037 |
| 磷酸酶抑制剂混合液 (100X) | | PR20015 | |
| 增强型蛋白酶抑制剂混合液 (EDTA-Free,100X in DMSO) | | PR20016 | |
| 酶抑制剂 | 普通型蛋白酶抑制剂混合液100X | PR20032 | |
| | 蛋白浓度测定 | BCA蛋白浓度检测试剂盒 | PK10026 |

| WB实验流程 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 | |
|--------------|----------------|---------------------------|-------------------|---------|
| 上样及电泳 | 上样缓冲液 | SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (4x) | PR20003 | |
| | | 蛋白质常规分子量标记(10-180kDa) | PL00001 | |
| | | 宽范围分子量预染蛋白质标记 (3-245 kDa) | PL00002 | |
| | 蛋白marker | 超宽分子量预染蛋白质标记 (10-310 kDa) | PL00003 | |
| | | 电泳液 | SDS-PAGE 电泳液 (1X) | PR20004 |
| | 染色脱色 | SDS-PAGE 电泳液(10X) | PR20005 | |
| | | 考马斯亮蓝染色液 | PR20006 | |
| 转膜 | 转膜液 | 考马斯亮蓝脱色液 | PR20007 | |
| | | Western Blot半干法转膜液 | PR20008 | |
| | | Western Blot 半干法转膜液 (10X) | PR20009 | |
| | | Western Blot 湿法转膜液 | PR20010 | |
| 膜的封闭 | 封闭液 | Western Blot 封闭液 | PR20011 | |
| | | Western Blot 快速封闭液 | PR20034 | |
| 抗体孵育 | 抗体及标记试剂盒 | Western blot抗体稀释液 | PR20013 | |
| | | 一抗 | 查询 | |
| | | 内参标签抗体 | 查询 | |
| | | FlexAble抗体标记试剂盒 | 查询 | |
| | | HRP抗体/蛋白标记试剂盒 | PK20001 | |
| | | 二抗 | 查询 | |
| 显影 | 洗涤液 | Western Blot 洗涤液 (10X) | PR20012 | |
| | | ECL发光试剂盒 | 普通ECL化学发光检测试剂盒 | PK10001 |
| | | | 灵敏ECL化学发光检测试剂盒 | PK10002 |
| | 超敏ECL化学发光检测试剂盒 | | PK10003 | |
| 显影 | DAB显色试剂盒 | 增强型DAB显色试剂盒 (WB) | PK10005 | |

样本制备

裂解液和蛋白酶抑制剂

裂解液和酶抑制剂是蛋白提取不可缺少的重要试剂。裂解液可以快速裂解组织或者细胞，让其中的蛋白暴露出来，酶抑制剂可以有效预防内源性蛋白酶降解目标蛋白。

Proteintech 提供齐全的裂解液及蛋白酶抑制剂产品，使用便捷，满足不同实验需求。

Proteintech 裂解液选择表



*注意

1. 制备植物、细菌等其他样本，请参照相关文献或资料的操作。
2. 需要同时应用于 WB、IP 和 Co-IP 实验，可选择 RIPA 裂解液（中）（货号：PR20001）。
3. SDS 裂解液不可应用于 IP 实验。
4. Proteintech 可提供齐全的蛋白提取及检测相关试剂盒产品，可登录中文官网 ptgcn.com 查询。

推文：
裂解液如何决定
样本质量



Proteintech 蛋白酶抑制剂选择表

| 样本类型 | 酶抑制剂名称 | 货号 | 说明 |
|-----------|--|---------|-----------------------------|
| 易降解或不确定样本 | 增强型蛋白酶抑制剂混合液 (EDTA-Free, 100X in DMSO) | PR20016 | 磷酸化抗体检测务必同时添加蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂！ |
| 不易降解样本 | 普通型蛋白酶抑制剂混合液 (100X) | PR20032 | |
| 检测磷酸化蛋白 | 磷酸酶抑制剂混合液 (100x) | PR20015 | |

注意：PMSF主要针对丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶。

裂解操作

裂解液使用之前添加相应蛋白酶抑制剂。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 $100 \mu\text{l}$ 裂解液的比例加入适量的裂解液， 4°C 持续振荡 30 min。冰上超声，180 w，1-2 min， 4°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。

详细操作可参考 Proteintech 细胞总蛋白提取试剂盒（货号：PK10020）及动物组织总蛋白提取试剂盒（货号：PK10021）说明书。

样品制备的注意事项

1.为什么要超声处理？

用于 WB 的样品务必对样品进行超声波处理，充分将核酸打断成小片段而与蛋白质分开，切勿直接丢弃粘稠部分。用于超大分子（如 >250 kDa）或 Co-IP 实验，为了保持蛋白完整的复合结构可以不进行超声波处理。

2.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。**Proteintech 推荐使用易降解蛋白提取试剂盒（货号：PK10024）有效防止蛋白在制备过程中的降解。**另外，也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°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°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。

3.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，如胰蛋白酶 |
| 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以采用二氧化硅吸附 |
| 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 |
| 血液 | 动物采样前提前放血，组织剪成小块按压清洗 | 血液残留量较高时，高含量的IgG重链容易被识别形成杂带，同时血液中的铁离子会催化ECL反应形成高背景 |

▲ 蛋白提取中的常见杂质及处理方法

4.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 提供齐全蛋白提取试剂盒，操作简便，提取的蛋白纯度更高。

| 应用 | 产品名称 | 货号 | 说明 |
|----------|---------------|---------|---------------------------|
| 全蛋白提取 | 细胞总蛋白提取试剂盒 | PK10020 | 适用所有细胞样本 |
| | 动物组织总蛋白提取试剂盒 | PK10021 | 适用新鲜/冷冻样、无脊椎/脊椎动物样本 |
| 细胞器及蛋白提取 | 核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒 | PK10014 | 分离彻底 |
| | 细胞膜蛋白提取试剂盒 | PK10015 | 细胞膜及亚细胞器膜蛋白均可提取 |
| | 线粒体分离及蛋白提取试剂盒 | PK10016 | 可保留线粒体完整及活性 |
| | 组蛋白抽提试剂盒 | PK10022 | 可提取H1、H2A、H2B、H3、H4及其修饰形式 |
| 特殊蛋白提取 | 外泌体分离及蛋白提取试剂盒 | PK10028 | 适用于细胞培养上清或尿液 |
| | 磷酸化蛋白提取试剂盒 | PK10023 | 适用所有磷酸化蛋白样本 |
| | 易降解蛋白提取试剂盒 | PK10024 | 有效防止蛋白在制备过程中的降解 |
| | 血浆血清蛋白去除试剂盒 | PK10025 | 去除效率达90%以上 |

推文：
样本制备与杂带的羁绊



蛋白定量

蛋白定量有助于确保每个泳道总上样量一致，同时也有助于提高实验的重复性。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 结合生成紫红色结合物，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。

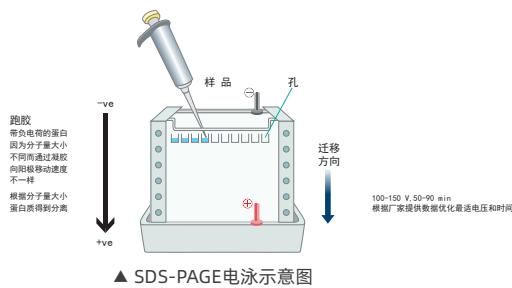
Proteintech 提供精准定量的 BCA 蛋白浓度检测试剂盒（货号：PK10026）。

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）。



| 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

1. 分子量在 $150 \text{ kDa} < MW \leq 250 \text{ kDa}$ 的蛋白质，使用 Tris-Glycine 凝胶体系，选择 4% 浓缩胶和 6% 分离胶，转膜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%。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。
2. 分子量 $MW > 250 \text{ kDa}$ 的蛋白质，推荐使用 Tris-Acetate 凝胶体系。
3. 分子量 $MW < 10 \text{ kDa}$ 的蛋白质一般使用 Tricine 胶。Tricine 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。转移时推荐使用半干转移法，100 mA / 膜，120 min。

推文：
大分子蛋白的WB技巧



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蛋白质，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，配方如右：

| 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 ₂ O 将体积补足到 1000mL。 | |
| 推荐使用 Proteintech SDS-PAGE 电泳液 (货号：R20004/PR20005) | |

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) | |
|-----------------------------------|--------|
| Tris | 12.1 g |
| Tricine | 17.9 g |
| SDS | 1 g |
| 充分溶解后，用超纯水将体积补足到 1000mL。 | |

| 1x Tris-Tricine阳极电泳缓冲液(配 1000 mL) | |
|---|---------|
| Tris | 24.23 g |
| 充分溶解后，用浓盐酸将pH调到8.9，然后用ddH ₂ O将体积补足到1000mL。 | |

针对 Tris-Acetate 凝胶的电泳缓冲液配方如下：

| Tris-Acetate电泳缓冲液(1X) (配1000mL) | |
|---|--------|
| Tris | 6.057g |
| Tricine | 8.96g |
| SDS | 1g |
| Sodium bisulfite | 0.25g |
| HCL 调 pH 值至 8.2, ddH ₂ O 定容至 1000mL。(现配现用效果最佳) | |

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 (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。(SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 4x, 货号: PR20003)。
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。
5. 胶中蛋白染色及脱色。考马斯亮蓝染色液，(货号: PR20006)；考马斯亮蓝脱色液，(货号: PR20007)。



▲ 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

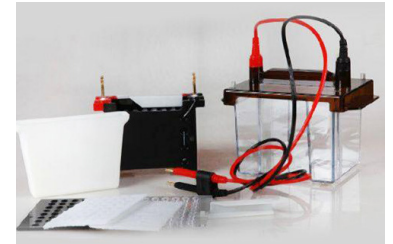
免疫印迹中常用的固相材料有 NC 膜、DBM、DDT、尼龙膜、PVDF 膜等。Proteintech 推荐选用 PVDF 膜 (聚偏二氟乙烯)，PVDF 膜可以提供更好的蛋白截留率、物理强度和广泛的化学兼容性。

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膜，但是 PSQ 膜上的免疫检测可能产生较高背景。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。

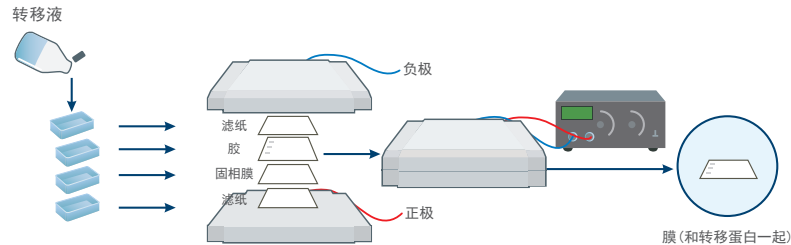
2. 转膜方式

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):

| 转膜方式 | 负极到正极排列 | 检测参数 (30-100 kDa) | Proteintech转膜液 |
|------|-----------------|----------------------|---|
| 湿转 | 海绵/滤纸/胶/膜/滤纸/海绵 | 200 mA, 90 min | 湿法转膜液(货号: PR20010) |
| 半干转 | 滤纸/胶/膜/滤纸 | 60 mA, 90 min | 半干法转膜液(货号: PR20008) 半干法转膜液(10X)(货号: PR20009) |



▲ 湿式转膜仪



注意: 转移三层胶一般选择半干转, 用 Tris-Acetic acid 缓冲液, 具体配方: 300 mM Tris, 100 mM Acetic acid, 200 ml 甲醇, 加去离子水至 1000 ml。

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. 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 (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, 但同时也可能会带来弱背景。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。

推荐使用 Proteintech WB 快速封闭液 (货号: PR20034), 可用于封闭 PVDF 膜和 NC 膜, 也可用于磷酸化抗体检测, 有效降低背景, 增强信噪比。

孵育一抗

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溶液作为抗体稀释剂或使用 Proteintech WB 抗体稀释液 (货号: PR20013)。
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。Proteintech 可提供 HRP 标记抗体 / 蛋白试剂盒 (货号: PK20001)。

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 β -actin、 β -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 β -actin、 β -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 β -actin 作为内参, 可以考虑选择 GAPDH 或者 β -tubulin 作为内参。

3、目的蛋白表达部位:

针对一般蛋白质检测, GAPDH、 β -actin 或 β -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 | 靶点名称 | 分子量 | 抗体类型 | 货号 | 应用 |
|----------|-------------------|------------|------------|---------------------------|---|
| 胞浆或全细胞 | GAPDH | 36 kDa | 鼠单抗 | 60004-1-Ig | WB, IF, FC, IP, IHC, ChIP, CoIP, Cell Treatment |
| | | | 兔多抗 | 10494-1-AP | IHC, WB, IP, IF, FC, CoIP, RIP |
| | β -Actin | 42 kDa | 重组兔单抗 | 81115-1-RR | IF, WB |
| | | | 兔多抗 | 20536-1-AP | FC, IF, IHC, WB, IP |
| | | | 鼠单抗 | 66031-1-Ig | CoIP, IF, IHC, IP, WB, FC |
| | α -Tubulin | 50-55 kDa | 重组兔单抗 | 80762-1-RR | IF, WB |
| | | | 兔多抗 | 11224-1-AP | WB, IP, IHC, FC, IF, CoIP |
| | | | 鼠单抗 | 66240-1-Ig | WB, IHC, IF, IP |
| | β -Tubulin | 50-55 kDa | 重组兔单抗 | 80713-1-RR | FC, IF, IP, WB |
| | | | 兔多抗 | 10094-1-AP | FC, IF, IHC, WB |
| 兔多抗 | | | 26520-1-AP | WB, IF, IP, IHC, FC, CoIP | |
| 细胞核膜 | Lamin A/C | 65-75 kDa | 兔多抗 | 10298-1-AP | IP, FC, WB, IF, IHC |
| | Lamin B1 | 66-72 kDa | 鼠单抗 | 66095-1-Ig | FC, IF, IHC, IP, WB |
| | | | 兔多抗 | 12987-1-AP | IHC, IP, WB, FC, IF, ChIP |
| | TBP | 33-43 kDa* | 鼠单抗 | 66166-1-Ig | WB, IP, IHC, IF, FC |
| 细胞核 | PCNA | 36 kDa | 鼠单抗 | 60097-1-Ig | WB, IP, IF, IHC |
| | | | 兔多抗 | 22006-1-AP | WB, IP, IF, IHC |
| | Histone-H3 | 15-17 kDa | 兔多抗 | 10205-2-AP | Cell Treatment, CoIP, IF, IHC, WB, FC, IP |
| | | | 兔多抗 | 17168-1-AP | ChIP, CoIP, IF, IP, WB, IHC, FC |
| | YY1 | 65-70 kDa | 鼠单抗 | 68345-1-Ig | IF, IHC, IP, WB |
| 膜蛋白 | ATP1A1 | 97-110 kDa | 鼠单抗 | 66281-1-Ig | WB, IF, IP, IHC, ChIP, CoIP |
| | | | 兔多抗 | 22156-1-AP | ChIP, IF, IHC, IP, WB, CoIP |
| | VDAC1/2 | 31-37 kDa | 兔多抗 | 14418-1-AP | CoIP, IF, IHC, IP, WB |
| 线粒体 | VDAC1/Porin | 31-37 kDa | 兔多抗 | 55187-1-AP | WB, IHC, FC, IF |
| | | | 兔多抗 | 10866-1-AP | CoIP, IF, IHC, WB |
| | COX4I1 | 17-20 kDa | 鼠单抗 | 10866-1-AP | CoIP, IF, IHC, WB |
| | | | 兔多抗 | 66345-1-Ig | IF, IHC, IP, WB |
| 全血/血浆/血清 | Transferrin | 77 kDa | 鼠单抗 | 55259-1-AP | CoIP, FC, IF, IHC, IP, PLA, WB |
| | | | 兔多抗 | 66110-1-Ig | FC, IF, IHC, WB |
| | Albumin | 66 kDa | 鼠单抗 | 11242-1-AP | FC, IF, IHC, IP, WB, ChIP |
| | | | 兔多抗 | 66171-1-Ig | IHC, WB, IF |
| Albumin | 66 kDa | 兔多抗 | 17435-1-AP | WB, IHC, IF, IP | |
| | | 兔多抗 | 66051-1-Ig | WB, IP, IHC, IF | |
| Albumin | 66 kDa | 兔多抗 | 16475-1-AP | CoIP, IF, IHC, WB, IP | |

*TBP 在人类是 37-43 kDa, 在小鼠和大鼠中是 33-36 kDa

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。

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。

Proteintech 可提供 Western Blot 洗涤液 (10×, 货号: PR20012) 适用于一抗或酶标二抗孵育后的洗涤。适当的洗涤可以降低背景, 增强信噪比。

显影

显影方法主要有四种: 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)

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) 的作用下产生化学发光。ECL 法稳定性好, 灵敏度高, 成像性好, 是目前最常用的显影方法。(注意: ECL 现配现用效果最佳, 通常不推荐重复使用或回收。)

Proteintech 可提供普通型 / 灵敏型 / 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, 有效增强发光强度及其持久性。

2. 酶促底物 DAB 显色法

DAB, 3,3'-Diaminobenzidine, 是 HRP 的常用底物, 在 HRP 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。

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

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。

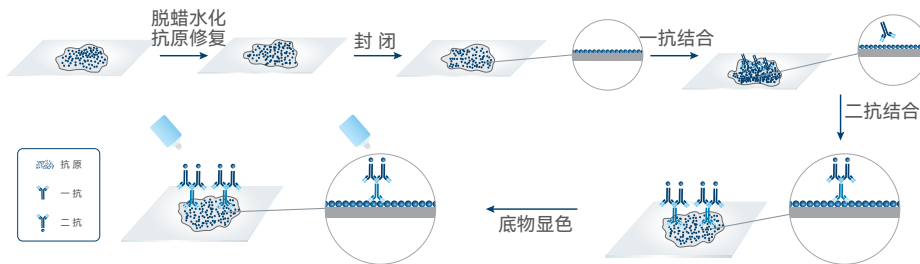
Proteintech 可提供齐全的荧光二抗产品。

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 | 样本制备不成功 |
| | 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 |
| | 抗原/一抗/二抗用量过高 |
| | 封闭不充分或封闭试剂不合适 |
| 高背景 | 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 |
| | 一抗/二抗浓度过高 |
| | 一抗与其他蛋白质交叉反应 |
| 非特异性条带 | 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 |
| | 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 |
| 条带分子量不对 | 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 |
| | 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 |
| 带型异常 | 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。IHC 是直接对组织切片进行分析, ICC 需要培养细胞爬片再固定通透后进行相应操作。



▲ 免疫组织化学实验流程

高质量染色的秘诀是什么?

Proteintech 的 IHC 实验一站式解决方案

| IHC实验步骤 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|-----------------|---------------|--|-------------------|
| 全流程 (含一抗工作液) | IHCeasy即用型试剂盒 | IHCeasy免疫组化试剂盒 | 查询 |
| | | √ 一抗 √ 可选配对照切片 √ 抗原修复液 √ 封闭液 √ 洗涤液 √ 二抗 √ 显色液 √ 复染液 √ 信号增强剂 √ 封片剂 第一次实验就能获得发表级数据 | |
| 全流程 (自主搭配一抗) | IHC自主全应用试剂盒 | 抗兔自主全应用免疫组化试剂盒 | PK10017 |
| | | 抗小鼠自主全应用免疫组化试剂盒 | PK10018 |
| | | 抗小鼠/兔通用型自主全应用免疫组化试剂盒 | PK10019 |
| 样本制备 | 抗原修复 | 柠檬酸钠抗原修复液 (50X) | PR30001 |
| | | Tris-EDTA 抗原修复液 (50X) | PR30002 |
| | | 蛋白酶K抗原修复液 | PR30014 |
| | | 免疫组化笔 | IHC免疫组化笔 |
| 抗体孵育 | 抗体稀释液 | 免疫组化抗体稀释液 | PR30003 |
| | | 一抗 | 验证IHC的一抗 |
| | 即用型二抗 | 即用型HRP标记羊抗兔二抗 | PR30011 |
| | | 即用型 HRP标记重组羊抗兔二抗 (H+L) | RGAR011 |
| | | 即用型HRP标记羊抗小鼠二抗 | PR30012 |
| | | 即用型 HRP标记重组羊抗小鼠二抗 (H+L) | RGAM011 |
| | | 即用型HRP标记羊抗兔/小鼠二抗 | PR30009 |
| | 二抗 | CoraLite® Polymer HRP标记羊抗兔重组二抗 (H+L) | RGAR011 |
| | | CoraLite® Polymer HRP标记羊抗小鼠重组二抗 (H+L) | RGAM011 |
| | | 二抗试剂盒 (含一抗稀释液) | 抗小鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒 |
| 染色 | 染色液 | 抗兔免疫组化试剂盒 | PK10009 |
| | | 抗鼠免疫组化试剂盒 | PK10010 |
| | | Mayer's 苏木素染色液 | PR30004 |
| | | DAB染色液 (IHC) | PR30010 |

免疫组织化学操作步骤

1. 脱蜡

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

b. 水煮加热法

电炉或者水浴锅加热 Tris-EDTA (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. 微波炉修复

用免疫组化修复盒装适量 Tris-EDTA (pH9.0)、EDTA (pH8.0) 或者柠檬酸 (pH6.0) 修复缓冲溶液, 将切片插入染色架放于修复液中, 放入微波炉中大火煮沸加热 5 min, 关火 1 min, 再中火加热 5 min 后放置室温自然冷却, 30-40 min 后, 即可进行下步实验。

d. 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, 可以根据抗体说明书的推荐来选择。

Proteintech 可提供柠檬酸钠抗原修复液 (50X, 货号: PR30001), Tris-EDTA 抗原修复液 (50X, 货号: PR30002), 蛋白酶 K 抗原修复液 (货号: PR30014), 满足不同样本的修复需求。

3. 染色

- a. 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;
 b. 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;
 c. 用吸水纸吸去多余液体, 滴加稀释好的一抗 (免疫组化抗体稀释液, 货号: PR30003), 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。

- d. 1X TBS 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;

Proteintech 推荐使用多聚酶联二抗。该二抗利用最新的聚合技术将多个过氧化物酶 (HRP) 分子及二抗偶联到多聚物上, 形成的聚合物 (二抗) 具有放大信号增加敏感度、减少非特异性背景特点。该反应体系不含生物素和链霉亲和素, 不受内源性生物素影响, 有效降低非特异性背景染色。

| 即用型 HRP 标记二抗 | | | 免疫组化检测试剂盒 | | |
|--------------|---------|---------------------|-------------------|---------|-----------------------|
| 二抗名称 | 货号 | 说明 | 试剂盒名称 | 货号 | 说明 |
| 羊抗兔二抗 | PR30011 | | 抗兔免疫组化检测试剂盒 | PK10009 | |
| 羊抗小鼠二抗 | PR30012 | 适用于常规福尔马林液固定石蜡包埋切片。 | 抗小鼠免疫组化检测试剂盒 | PK10010 | 配有一抗稀释液、DAB 以及多聚酶联二抗。 |
| 羊抗兔/小鼠二抗 | PR30009 | | 抗小鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒 | PK10006 | |

- e. 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)
- f. 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;
- g. 用去离子水浸洗3次, 每次1 min.

4.脱水

- a. 在60%乙醇中浸泡5 min;
- b. 在80%乙醇中浸泡5 min;
- c. 在95%乙醇中浸泡5 min;
- d. 在无水乙醇 I 号缸中浸泡5 min;
- e. 在无水乙醇 II 号缸中浸泡5 min;
- f. 在二甲苯 III 号缸中浸泡5 min;
- g. 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, 然后用中性树胶封片。

6.成像

结果观察, 图像采集与结果分析。

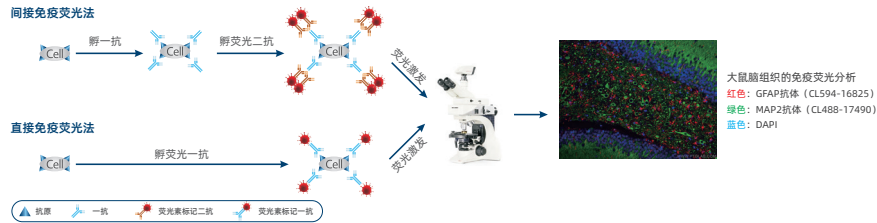


免疫组织化学疑难解析

| 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°C过夜 |
| | 孵育温度过高, 超过37°C | 孵育温度一般室温20-28°C或37°C |
| | 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 ₂ O ₂ 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°C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 |
| 染色弱 | 载玻片中粘附剂过厚 | 重新配制粘附剂, 制作新的防脱玻片 |
| | 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°C培养箱中孵育30-60 min |
| 染色阴性 | 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 |
| | 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。



▲ 免疫荧光实验流程

轻松打造绚烂多彩微世界

Proteintech 的多重染色解决方案

| IF实验步骤 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|--------|--|-----------------------|---|
| 直标抗体 | CoraLite® 直标抗体 ·16000+种高品质抗体 ·引入新型明亮荧光染料CoraLite® | | 查询 |
| | FlexAble抗体标记试剂盒 ·微量标记专利技术 ·不限抗体浓度 ·不限抗体品牌 ·兼容各种抗体buffer ·10 min完成标记 | | 查询 |
| 细胞培养 | 胎牛血清 | 特级胎牛血清 | PM00001 |
| | | 高级胎牛血清 | PM00011 |
| | 基础细胞培养基 | DMEM高糖培养基 | PM00031 |
| | | RPMI 1640 培养基 | PM00032 |
| | | F-12K培养基 | PM00033 |
| 细胞刺激 | 抗生素 | 青霉素-链霉素溶液 (100X) | PR40022 |
| | 小分子化合物 | 抑制剂/激动剂 | 查询 |
| 细胞计数 | 台盼蓝 | 0.4% 台盼蓝溶液 | PR40016 |
| | 洗涤 | PBS 磷酸盐缓冲液(10×) (无菌) | PR20014 |
| 样本处理 | 固定 | 超低内毒素PBS | PR40008 |
| | | 免疫染色固定液 | PR30006 |
| | 抗原修复 (脱蜡后的石蜡切片) | 柠檬酸钠抗原修复液 (50X) | PR30001 |
| | | Tris-EDTA 抗原修复液 (50X) | PR30002 |
| | | 蛋白酶K抗原修复液 | PR30014 |
| 通透 | 免疫染色通透剂 | PR30007 | |
| 抗体孵育 | 一抗 | 验证IF应用的抗体/直标抗体 | 查询 |
| | | 定位肌动蛋白 | CoraLite® Plus 488标记鬼笔环肽 CoraLite® 594标记鬼笔环肽 |
| | 二抗 | 荧光标记二抗 | 查询 |
| | | 羊驼纳米二抗 | 查询 |
| 封片 | 封片剂 | 水性封片剂 | PR30005 |

标本的处理

细胞爬片

- 在培养板中将已爬好细胞的玻片用PBS快洗3次, 推荐使用PBS磷酸盐缓冲液(10×, 无菌, 货号: PR20014) 或超低内毒素PBS (货号: PR40008)。
- 在4%多聚甲醛或其他固定液 (免疫染色固定液, 货号: PR30006) 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)。
- 在0.1% Triton X-100室温通透 (免疫染色通透剂, 货号: PR30007) 10 min, PBS洗三次, 每次3 min。

冰冻切片

- 冰冻切片放置PBS里室温平衡10-20 min。
- 在4%多聚甲醛常温固定30 min, PBS洗三次, 每次3 min。
- 在0.2% Triton X-100室温通透15 min, PBS洗三次, 每次3 min。

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-EDTA (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。

抗原修复技巧见免疫组化 - 抗原修复。

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 | A或者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磷酸盐缓冲液(10×, 无菌, 货号: PR20014) 或超低内毒素PBS (货号: PR40008) 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°C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), 将完全浸没于一抗的样片室温孵育2 h或4°C过夜。
Proteintech 推荐使用 CoraLite[®] Plus 488 标记鬼笔环肽 (货号: PF00001) 及 CoraLite[®] 594 标记鬼笔环肽 (货号: PF00003) 定位肌动蛋白。
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, 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, 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 (水性封片剂, 货号: PR30005), 确定样品在盖玻片与载玻片之间。
11. 用荧光显微镜观察。根据不同的荧光染料选择不同波段的激发光。

推文:
自发荧光的解决办法

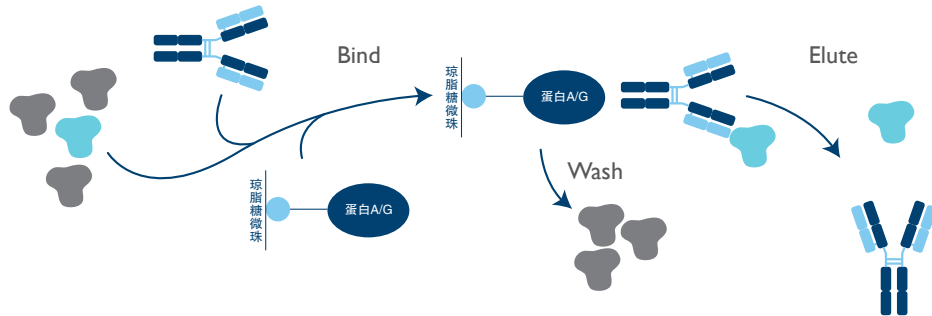


免疫荧光疑难解析

| 效果 | 原因 | 解析 |
|---------|------------------------|--|
| 荧光信号弱或无 | 封闭时间过长 | 封闭时间应保持常温1 h左右, 或者4°C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°C孵育时间1-2 h, 如需过夜孵育应置于4°C冰箱内 |
| | 操作过程中缓冲液残留较多, 间接稀释抗体浓度 | 尽量沥干每步冲洗后的缓冲液 |
| | 滤光片选择不合适 | 更换滤光片 |
| 非特异性背景高 | 封闭时间过短 | 封闭时间应保持常温1 h左右, 或者4°C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°C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。首先抗体对抗原 (目的蛋白) 进行特异性结合, 接着通过偶联在微珠上的亲和蛋白 (如 Protein A sepharose beads) 对抗体 Fc 端的结合形成 “beads- 抗体 - 目的蛋白” 三联体, 经洗涤去除未结合的杂蛋白, 然后 SDS sample buffer 或酸性洗脱的方式使抗体、目的蛋白一起脱落下来, 最后经 Western Blot 检测, 胶片显影或仪器成像, 观察是否有目的蛋白带, 来判断抗体是否成功捕获了目的蛋白。



▲ 免疫沉淀原理

如何实现精准捕获, 更高重复性?

Proteintech 的 IP 实验解决方案

| IP实验步骤 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|--|---------------------|---|------------|
| 样本制备 | 参考本手册Western blot部分 | | |
| 抗体捕获目的蛋白 | 试剂盒 | 免疫沉淀试剂盒 (HRP标记蛋白A) | PK10007 |
| | | 免疫沉淀试剂盒 (HRP-抗兔 IgG 轻链) | PK10008 |
| | 亲和琼脂糖珠/磁珠 | Nano-Trap · 纳米抗体偶联beads · 5000+SCI文献使用 · 免疫沉淀金牌伴侣  | 查询 |
| | 填料 | protein A -Agarose | PR40023 |
| | | protein G-Agarose | PR40024 |
| | | protein A/G-Agarose | PR40025 |
| | 捕获抗体孵育 | 验证IP应用的一抗 | 查询 |
| | 同型对照抗体 | Mouse IgG1 isotype control | 66360-1-Ig |
| | | Mouse IgG2a isotype control | 66360-2-Ig |
| | | Mouse IgG2b isotype control | 66360-3-Ig |
| Mouse IgG3 isotype control | | 66360-4-Ig | |
| Rabbit IgG control Polyclonal antibody | | 30000-0-AP | |
| Mouse IgG | | B900620 | |
| Goat IgG | B900630 | | |
| SDS -Page及WB检测 | 参考本手册Western blot部分 | | |

样品裂解液的制备

推荐使用Proteintech全系列蛋白提取试剂盒，获得高质量蛋白样本。参加本手册“免疫印迹-样本制备注意事项”

1. 培养细胞裂解物的制备

- 收集细胞：细胞刮收集细胞于离心管中，4°C 500 g离心5 min后弃上清；然后用预冷1 x PBS离心洗涤细胞2次，每次4°C 500 g离心5 min并弃上清。
- 裂解：加入预冷的裂解液（现加蛋白酶抑制剂/磷酸酶抑制剂），重悬细胞，冰上裂解30 min，每10 min轻柔颠倒混匀一次。
- 超声破碎：冰浴超声2 sec/停2 sec，总时长约1 min（实际10 sec- 2 min不等，与样品量有关），功率约180 w。
- 冰浴继续静置20 min，进一步裂解。
- 4°C 10000 g- 14000 g离心10 min，取部分上清用于测蛋白浓度及制备Input对照。其余上清可立即用于后续IP实验，如暂时不用则建议按400 µl/管分装小份冻存。

IP及Co-IP样本制备注意事项

- 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实验通常可使用RIPA裂解液；对于Co-IP实验，则建议使用商品化Co-IP裂解液或更温和的NP-40或Triton X-100裂解液。
 - 常规IP实验，制备裂解物一般可作适当超声处理，以充分打断染色质片段和细胞碎片，促进蛋白释放溶解。但对于Co-IP实验，为了避免对蛋白互作的破坏，尽量不超声，实在有必要也只做短时超声处理。
- 推荐使用 Proteintech 适用 IP 及 Co-IP 的裂解液及蛋白酶 / 磷酸酶抑制剂，获得高质量蛋白样本。参加本手册“免疫印迹 - 样本制备”。

2. 组织裂解物的制备

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

推荐使用BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：PK10026），参见本手册“免疫印迹-蛋白定量”。

抗体捕获目的蛋白

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

- 取新鲜制备或分装冻存的裂解物若干管，每管加入350 µl孵育液（现加蛋白酶抑制剂/磷酸酶抑制剂），转移至纯化柱。然后加入1-10 µg特异性抗体，4°C旋转孵育过夜或2-4 hrs。
注：最佳抗体用量并不恒定，需自行摸索，建议初始实验可按4 µg进行；推荐使用垂直旋转混合仪，低速旋转。
- 设置IgG对照组——另取一份等量裂解物，加入相同孵育液及等量同型抗体IgG（与特异性抗体同种属/类型），转移至纯化柱中，同步4°C旋转孵育。
- 准备Beads：取一定量protein A/G 通用型beads（一般单管IP反应按50 µl beads计算），用1 x PBS离心洗涤3次，每次500 g离心30 sec，最后用PBS重悬beads至原体积。
- 抗体孵育结束后，加入50 µl步骤c中洗涤好的Protein A/G beads，4°C旋转1-4 hrs。
- 抗体孵育结束后，加入50 µl步骤c中洗涤好的Protein A/G beads，4°C旋转1-4 hrs。
- 准备预冷的洗涤液（即1 x TBST中现加蛋白酶抑制剂，见下文“免疫沉淀常用试剂配方”），取下纯化柱下端堵帽，洗涤5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5-10 min。
- 去掉堵帽，将柱子按编号对应放入EP管中，4°C，10000 g离心1 min，收集洗脱产物。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上样或冻存于-20°C备用。

抗体捕获beads的选择

1. 针对 IP 实验中最常用的兔抗或小鼠单抗，相应的 beads 选择如下

| IgG类型 | Protein A beads | Protein G beads | Protein A/G beads |
|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Rabbit IgG | √ | | √ |
| Mouse IgG1或IgG3 | | √ | √ |
| Mouse IgG2a,IgG2b | √ | | √ |
| beads 货号 | PR40023 | PR40024 | PR40025 |

当捕获抗体亚型为 mouse IgM，可以使用 Protein L beads，也可以选择采用 ProteinA/G- 轻链抗体 -IgM- 目的蛋白四联体的方式。其中的轻链抗体，Proteintech 推荐使用 mouse IgG Kappa chain Recombinant antibody (货号：80015-1-RR)。

2. 捕获 GFP- 融合蛋白推荐使用 **GFP-Trap(货号:gta/gtma)**。源于纳米抗体，亲和力高，无轻链重链干扰。其他标签 - 融合蛋白捕获，推荐使用 Nano-trap，可登录 Proteintech 中文官网查询。

2.SDS sample buffer洗脱法

a ~d. 步骤基本同前面“酸洗脱法”，不过孵育全程在EP管中进行，不需要用纯化柱。

e. 准备预冷的洗涤液（洗涤液即1 x TBST中现加蛋白酶抑制剂，见下文“免疫沉淀常用试剂配方”），洗涤5次，每次500 g离心30 sec并小心吸弃上清，最后一次洗涤后留约80 μl上清。

f. 每个EP管中加入20 μl 5 x sample buffer（含还原剂）震荡混匀数秒，100°C沸水浴5 min。

g. 4°C，10000 g 离心1 min，将离心后上清按编号对应转移至新EP管中，直接用于SDS-PAGE上样或冻存于-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电泳及Western Blot检测

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 IP 实验组洗脱产物，与 IgG 对照组洗脱产物、Input 对照（原始细胞裂解物，补加 sample buffer）100°C煮沸 5 min，再恒压电泳约 1.5 h（具体时长与胶浓度及目的蛋白大小有关，浓缩胶一般 80 V 30 min，进入分离胶后可调高至 120-130 V，以溴酚蓝带作为电泳指示）。

3. Western blot检测：

转膜、封闭及后续操作，请参考本手册“免疫印迹（Western blot）”部分。

免疫沉淀常用试剂配方

| 裂解液 (1000 ml) | | 孵育液 (1000 ml) | | 5 X Sample buffer (200 ml) | |
|---|--------|---|--------|--|-------|
| NaCl | 8.76 g | KCl | 0.2 g | SDS | 30 g |
| Sodium deoxycholate | 5 g | KH ₂ PO ₄ | 0.2 g | Glycerol | 70 ml |
| SDS | 1 g | Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 1.14 g | Tris (1 M母液, pH 7.2-7.4) | 50 ml |
| Tris | 6 g | NaCl | 8 g | 溴酚蓝 | 0.1 g |
| EDTA-2Na·2H ₂ O | 1.86 g | EDTA-2Na·2H ₂ O | 1.86 g | 加 ddH ₂ O至150 ml | |
| NaF | 0.42 g | NaF | 0.42 g | 取适量上述buffer, 补加25% β-巯基乙醇或25% DDT (2M母液, 现用现加) | |
| Triton X-100 | 10 ml | 加ddH ₂ O至1000 ml, 调pH至7.2-7.4 | | | |
| 加ddH ₂ O至1000 ml, 调pH至 7.2-7.4 | | | | | |
| 洗脱液 (500 ml) | | 洗涤液 | | | |
| NaCl | 14.6 g | 1X TBST 中加入终浓度1 mM的PMSF | | | |
| Glycine | 5.625g | | | | |
| 加ddH ₂ O至500ml, 调pH至2.0 | | | | | |

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 或HRP-标记抗小鼠IgG 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； HRP-标记 Protein A 可以有效降低重链信号强度，消减轻链信号； 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）； 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 | | |
| | 兔多抗/重组兔单抗 | HRP-标记抗兔IgG二抗 | |
| 兔多抗/ 重组兔单抗 | 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-标记抗兔IgG二抗可以有效避免重链轻链信号的影响。 |
| | 小鼠多抗 | | |
| | 兔多抗/重组兔单抗 | 1、HRP-标记Protein A 2、HRP-标记抗兔IgG轻链特异性抗体 | |

免疫沉淀疑难解析

| 结果 | 原因 | 解析 |
|------------------------|---|--|
| 没有信号、 信号弱 | 目的蛋白在样品中不表达；低表达 | 查阅蛋白表达谱，更换为其它有表达的细胞/组织；增加IP捕获时lysate用量 |
| | 蛋白提取不充分或降解 | 选择合适强度的裂解液；现加合适的酶抑制剂；保持低温 |
| | 抗体和珠子没有发生很好的结合 | 选择合适类型的微珠 |
| | 抗体选择不当 | 购买合适的抗体（IP/WB验证+） |
| | 抗体使用量太少 | 增加抗体使用量 |
| | 目的蛋白没有被洗脱下来 | 使用SDS sample buffer洗脱；检查酸洗脱液的PH值是否失效 |
| | WB检测环节灵敏度不够 | 优化抗体用量/ECL类别，提高WB检测环节灵敏度 |
| 高背景、 非特异性信号 | 样品中有不完全溶解的细胞碎片或大的蛋白复合体 | 制备样品后进行超声处理，然后高速离心，取上清进行后续试验 |
| | 样品发生降解 | 裂解液中现加足量合适的酶抑制剂；尽量用新鲜制备样本进行IP实验，避免样本反复冻融 |
| | 洗涤不彻底 | 提高洗涤时间和/或洗涤次数；提高洗涤液中NaCl和去垢剂浓度，增强洗涤严谨度 |
| | 微珠非特异性结合蛋白 | beads对样本进行预吸附处理；适当减少beads用量和缩短孵育时间 |
| | 抗体特异性不好 | 更换抗体 |
| 抗体用量太多 | 减少抗体用量 | |
| 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 | 电泳点样时，增加Input上样量； 优化WB检测体系灵敏度 |
| 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制样时无效捕获住组织或细胞中的天然结构靶蛋白 | 更换抗体 |
| | 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 | 更换抗体 |

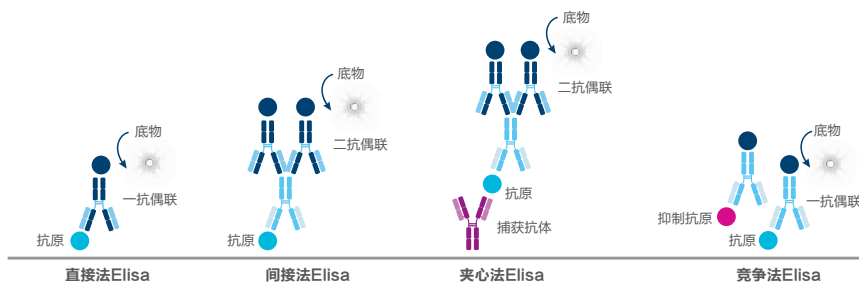
推文：
免疫沉淀案例分享



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敏感度。

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。



▲ ELISA 原理

蛋白准确定量的方法是什么？

Proteintech 的 ELISA 实验解决方案

| ELISA实验步骤 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|-----------|--|---|---------|
| 全流程实验 | 双抗夹心ELISA试剂盒 严格的试剂盒开发标准 1.采用4PL参数拟合标准曲线; 2.控制板间板内差异<10%; 3.回收率范围80-120%; 4.检测线性范围80-120%。 | Authentikine®双抗夹心法ELISA试剂盒 精选Humankine®人源细胞表达高活性蛋白免疫的抗体对, 更适合检测天然样本。 | 查询 |
| | | 经典双抗夹心法Human/Mouse/Rat ELISA试剂盒 | 查询 |
| 抗体对 | 抗体对 | 抗体对 | 查询 |
| 抗体对辅助试剂 | 试剂盒 | 抗体对辅助试剂盒 | PK10029 |
| 样本准备 | 洗涤 | PBS磷酸盐缓冲液 (10×) (无菌) | PR20014 |
| | | 超低内毒素1XPBS | PR40008 |
| | 裂解液 | RIPA裂解液 (中) | PR20001 |
| | 包被液 | ELISA包被液 (5×) | PR10006 |
| ELISA实验试剂 | 洗涤液 | ELISA洗涤液 (20×) | PR10007 |
| | 稀释液 | ELISA通用稀释液 (5×) | PR10008 |
| | 终止液 | ELISA终止液 | PR10009 |
| | 保护剂 | 抗体保护剂 (适用ELISA) | PR10004 |
| 显色 | 显色剂 | 双组分TMB显色试剂盒 | PK10004 |
| 二抗稳定剂 | 抗体稳定剂 | HRP-protect 酶标抗体稳定剂 | PR10005 |

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，然后和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

- 血清：全血标本室温凝固 30 min 后 1000×g 离心 15 min，取上清立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 1000×g 离心 15 min，取澄清部分，立即使用或分装后 -20℃ 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）。
- 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心 5 min 取上清，立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 尿液：收集尿液后，1000×g 离心 20 min，取上清，立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 唾液：收集唾液后 10000×g 离心 5 min，取上清立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 母乳：收集样本后，在 2-8℃ 条件下 1000×g 离心 15 min，取澄清部分，立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷 (2-8℃) 的 1×PBS 洗 3 次，500×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 1×10^7 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×g-10000×g 离心 5 min，立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 组织裂解液
 - 使用预冷的 1×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）；
 - 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；
 - 匀浆 20-30 次后取约 2-3 μ 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；
 - 细胞破碎后 8000×g-10000×g 离心 5 min，立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 组织匀浆：使用预冷的 1×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℃ 条件下冻存 5 min，经过两个冻融周期后破坏细胞膜，5000×g 离心 5 min 去除杂质，取上清立即使用或分装后 -20℃ 存放，避免反复冻融。
- 脑脊液：收集脑脊液样本，1000×g 离心 15 min 取上清，立即使用或分装后 -20℃ 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℃ 溶解）。试剂或样品稀释时，确保混匀，同时尽量避免起泡。

- 包被抗体：用碳酸盐缓冲液（CBS）或者磷酸盐缓冲液（PBS），将包被抗体稀释到一定的浓度，100 μ L/孔包被，37℃ 2 h 或者 4℃ 过夜。
- 洗板：弃孔内液体，甩干，10 mM PBST (10 mM PBS+0.05% Tween-20) 洗板 2 次（或使用 ELISA 洗涤液（5X），货号：PR10002），每次浸泡 1-2 min，350 μ L/孔，甩干（也可以轻拍将孔内液体拍干）。
- 封闭：含 1% BSA 或者 5% 脱脂牛奶的 10 mM PBST 做封闭液（推荐使用 ELISA 封闭液，货号：PR10001），350-400 μ L/孔，37℃ 2 h。
- 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）。
- 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 μ L，余孔分别加标准品或待测样品 100 μ 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℃ 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。
- 洗板：同步骤 2。
- 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，（推荐使用 ELISA 抗体稀释液，货号：PR10003）。
- 洗板：同步骤 2。
- 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，（推荐使用 ELISA 抗体稀释液，货号：PR10003）。
- 洗板：同步骤 2。
- 每孔加 TMB 显色液 100 μ L，室温避光显色 15-20 min，显蓝色，若颜色偏浅，可放在 37℃ 显色，不超过 30 min。（双组分 TMB 显色试剂盒，货号：PK10004）
- 每孔加终止溶液 100 μ L，此时蓝色变为黄色。

13. 酶标仪读值：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。

14. 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。

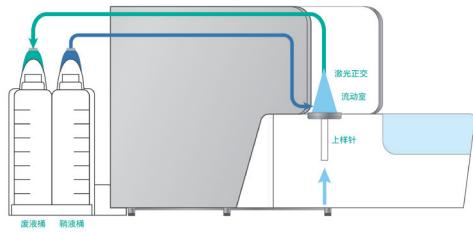
Proteintech 可提供适用 ELISA 实验的 HRP 标记抗体 / 蛋白试剂盒（货号：PK20001）以及长臂或短臂生物素标记试剂盒（货号：PK20005/PK20004）。

ELISA 实验疑难解析

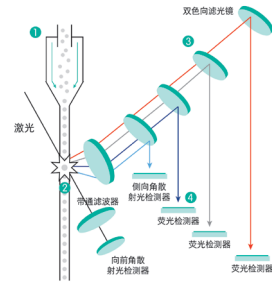
| 问题 | 原因 | 解决方案 |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 重复平行孔结果不一致 | 酶标板或样本等被唾液污染 | 操作过程中佩戴口罩 |
| | 加不同样品时未更换吸头 | 使用新的吸头转移不同样品或试剂 |
| | 包被了抗体的酶标板孔底被吸头刮擦 | 禁止吸头触碰孔底 |
| | 移液器出现偏差 | 校准移液器 |
| | 洗涤不充分 | 按说明书推荐的体积和浸泡时间充分洗涤 |
| | 样品浑浊、不均匀 | 样本需要预处理，具体方法参阅操作手册 |
| | 孔底脏污 | 检查板底，并擦拭干净 |
| 标准曲线不理想 | 未使用封板膜 | 使用试剂盒提供的封板膜 |
| | 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 |
| 显色弱或无 | 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 |
| | 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 |
| 信号很强/全板蓝色/标准曲线没有梯度 | 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 |
| | 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 |
| 标准曲线理想但样本无信号 | 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 | 样本中的待测物浓度低或不在标曲的检测范围 | 调整样本稀释度，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)

流式细胞术 (Flow Cytometry, FC) 是一种对液流中排成单列的动物、植物细胞或其它生物微粒 (如微粒、细菌、病毒等) 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散射光信号和荧光信号来分析细胞的大小、颗粒度、细胞膜上及胞内抗原的表达情况、DNA 含量等许多重要参数。根据这些参数可以从混合细胞群中鉴别出不同的亚群。具有分选功能的流式细胞仪可以从大量细胞中分选出感兴趣的亚群进行生物学和医学研究。



▲ 流式细胞仪



▲ 流式细胞仪工作原理

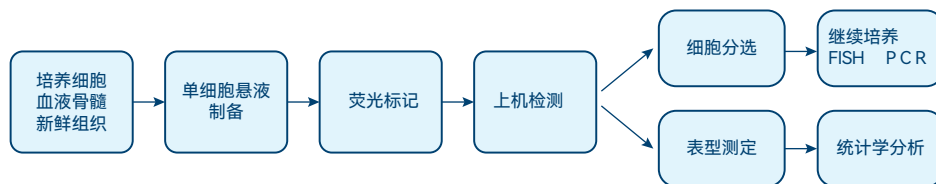
流式细胞仪 (Flow cytometer) 是对细胞进行自动分析 (和分选) 的装置, 主要是由液流系统、光学系统、电子系统 (和细胞分选系统) 构成。当细胞悬液通过流式细胞仪时, 从小喷嘴中流出的细胞悬液在鞘液的流体力学作用下向中心聚拢。形成的液流可使细胞或颗粒依次通过激光束, 一次仅一个细胞或颗粒, 当细胞通过激光束时, 检测器会检测细胞或颗粒的散射光及荧光, 整个仪器用多道脉冲高度分析器处理光散射信号和荧光脉冲信号。

让 FC 实验变得更友好

Proteintech 的 FC 实验解决方案

| FC实验步骤 | 试剂类型 | 中文名称 | 货号 |
|--------------------------|--|--|-------------------------|
| 流式抗体 | 流式抗体 ·表面/胞内流式抗体 ·覆盖靶标广 ·源于经典克隆株 ·引入新型荧光染料CoraLite® | | 查询 |
| | Flow Cytometry Panels | 多色流式抗体组合 1.由Proteintech流式专家设计 2.即用型5-6色通道组合 3.提供齐全的设门策略和验证数据 4.PE通道开放, 便于灵活检测兴趣靶点 | 查询 |
| 裸抗标记 | FlexAble抗体标记试剂盒 ·微量标记专利技术 ·不限抗体浓度 ·不限抗体品牌 ·兼容各种抗体buffer ·10 min完成标记 | | 查询 |
| | 样本制备 | 单细胞悬液 | 0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液 (含酚红) |
| 0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液 (不含酚红) | | | PR40021 |
| 红细胞裂解液 | | 红细胞裂解液 (10X) | PF00014 |
| | | 红细胞裂解液 (1X) | PF00015 |
| 刺激样本小分子化合物 | | PMA | CM00437 |
| | | Brefeldin A | CM03062 |
| 细胞分选 | 离子霉素 | CM06928 | |
| 洗涤 | 洗涤液 | 磁珠细胞分选系列产品 | 查询 |
| | | 流式细胞染色缓冲液 (1X) | PF00018 |
| 固定 | 固定和通透 | 流式细胞固定液 | PF00016 |
| | | 流式细胞通透剂 | PF00017 |
| FC受体封闭 | 小鼠FC受体封闭抗体 | Anti-Mouse CD16/32 (93) | 65057-1-Ig |
| | | Anti-Mouse CD16/32 (2.4G2) | 65080-1-Ig |
| 抗体孵育 | 直标抗体 | 流式抗体 | 查询 |
| | | 同型对照抗体 | 同型对照抗体 |

常见样本的流式检测步骤



▲流式细胞术实验的基本操作（以表面染色为例）

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（0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液（不含酚红 / 含酚红），货号：PR40021/PR40020）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（300-400 g，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 1×10^6 个细胞大约 100 μl 固定剂（流式细胞固定液，货号：PF00016）的密度重悬细胞，室温下（20-25°C）固定约 20 min。
3. 离心（400-600 g，5 min）去除固定剂，使用通透剂（流式细胞通透剂（10×），货号：PF00017）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 1×10^6 个细胞大约 100 μl 通透剂的密度重悬细胞，静置 10 min。
5. 在每 100 μl 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 μl 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 μl 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 μL 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 μL 全血加入适量裂解液立即在涡旋仪上震荡 1 s。（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 μL 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。

Proteintech 提供细胞分选或 T 细胞活化相关免疫磁珠分选试剂盒产品以及刺激免疫细胞产生细胞因子相关小分子化合物产品。

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（货号：PR20014）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。
- 研压完毕后，用细胞筛网过滤悬液两次。以除去未研压充分的组织。
- 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。
- 每管视细胞量加入不含固定剂的红细胞裂解液（货号：PF00014）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。
- 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 100ul 细胞悬液后分别加入表型抗体，4°C 孵育 15-30 min。
- 加入 2 mL 流式细胞染色缓冲液（货号：PF00018）洗涤，400-500 g 离心 5min，弃上清，洗涤 2-3 次。
- 加入 200 μ L 流式细胞染色缓冲液（货号：PF00018）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（货号：PF00016）4°C 过夜。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 μ 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 μ 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 μ 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，主要目的是为了避免出现假阳性或假阴性结果。

| 对照 | 用途 |
|--|---|
| 空白对照 (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 (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 (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 (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。

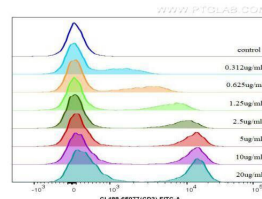
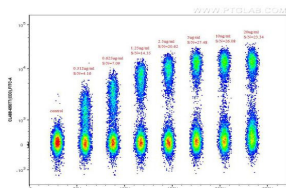
1. 准备 8 个 EP 管 (编号 1-8)，每管加入 50 μ L 细胞悬液 (约 10⁶ 个细胞)。
2. 第 1 管加入 50 μ L PBS (作为未染色对照)，最终体积为 100 μ L。
3. 根据抗体浓度确定加入的抗体量。

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 μ g/mL (第 2 管)，0.625 μ g/mL (第 3 管)，1.25 μ g/mL (第 4 管)，2.5 μ g/mL (第 5 管)，5 μ g/mL (第 6 管)，10 μ g/mL (第 7 管)，20 μ g/mL (第 8 管)，终体积为 100 μ L。那么这 7 管加入的抗体依次为：0.31 μ L (0.031 μ g)，0.63 μ L (0.063 μ g)，1.25 μ L (0.125 μ g)，2.5 μ L (0.25 μ g)，5 μ L (0.5 μ g)，10 μ L (1 μ g)，20 μ L (2 μ 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 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L |
| 抗体 | 0 | 0.31 μ L | 0.63 μ L | 1.25 μ L | 2.5 μ L | 5 μ L | 10 μ L | 20 μ L |
| PBS | 50 μ L | 49.69 μ L | 49.37 μ L | 48.75 μ L | 47.5 μ L | 45 μ L | 40 μ L | 30 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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，说明书一般显示抗体用量小于某剂量，使用前需根据实验样本进行抗体滴度实验，确认最佳浓度。

Proteintech流式抗体均经过准确检测，可以提供准确的用量参考。

推文：
流式实验案例分享

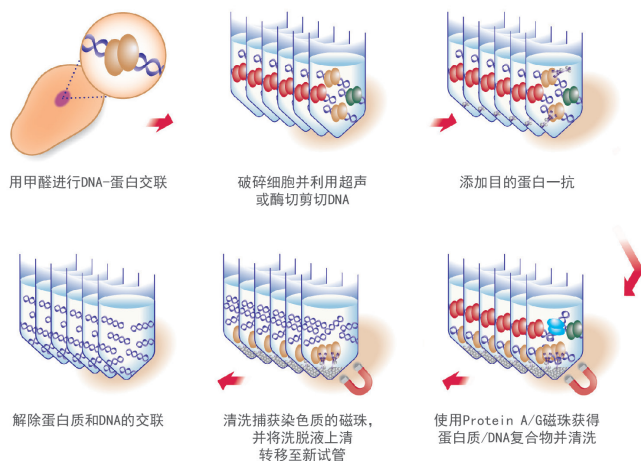


流式细胞术疑难解析

| 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）对照以验证抗体特异性 |
| | 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。阳性门内的细胞应均为阳性）；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 |
| 荧光背景强 | 激光未校准 | 进行质控（使用校准微球自动校准仪器） |
| | 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°C或冰上；加入活性染料，如PI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 ²⁺ /Mg ²⁺ 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 |
| | 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 |
| 散射光不正常 | 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PI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 |
| | 细胞数量过多/过少 | 检查细胞计数（通常建议使用1×10 ⁶ 细胞/ml）；轻轻吹打悬液，确保细胞充分混合 |
| 上机时细胞获取速率不正常 | 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°C或冰上；加入活性染料，如PI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 ²⁺ /Mg ²⁺ 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 | 参考文献，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°C或冰上；加入活性染料，如PI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 ²⁺ /Mg ²⁺ 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)

Active Motif 表观遗传学专家

ChIP 实验一站式解决方案

培养细胞样本

| | | | | | |
|-------------|---------------------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------|
| 样本类型 | 培养细胞 | | | | |
| 是否有ChIP验证抗体 | 有 | | | 没有 | |
| 样本量 | 转录因子TFs: 50-100K 组蛋白: 1-100K | 100K | | 6M | |
| 样本剪切方式 | 超声 | 超声 | 酶切 | 超声 | |
| 主要特点 | 低细胞量 | 低丰度蛋白/转录因子 | 1天内完成 | 1天内完成 | 没有ChIP验证抗体 |
| 推荐试剂盒 | Low cell ChIP-Seq 货号: 53084 | ChIP-IT High Sensitivity® 货号: 53040 | ChIP-IT® Express 货号: 53008 | ChIP-IT® ExpressEnzymatic 货号: 53009 | Tag ChIP-IT® 货号: 53022 |

组织样本或FFPE/PBMCs

| | | | | |
|-------|-----------------------------------|--|-------------------------------|---|
| 样本类型 | 新鲜/冷冻组织 | | FFPE | PBMCs |
| 样本量 | 转录因子TFs: 10-20mg 组蛋白: 0.2-20mg | 100+ mg | 200 ng 染色质 | 10 M |
| 主要特点 | 低样本量 | 低丰度蛋白/转录因子 | 1天内完成 | FFPE样本兼容 PBMC兼容 |
| 推荐试剂盒 | Low cell ChIP-Seq 货号: 53084 | ChIP-IT High Sensitivity® 货号: 53040 | ChIP-IT® Express 货号: 53008 | ChIP-IT® FFPE II 货号: 53047 ChIP-IT® PBMC 货号: 53042 |

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°C, 2500 rpm (约720 g) 离心10 min, 移弃上清。

注意: 此时细胞可冻存-80°C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 mm³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°C、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°C、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°C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°C、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°C孵育5 min。
5. 酶消化: 加入一定量 (已预实验确定合适用量) 的微球菌核酸酶, 37°C 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°C、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°C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, 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 ddH₂O, 10 ul 5M NaCl, 65°C 4h或过夜, 解交联。
2. 加入1 ul RNaseA, 37°C, 15 min。
3. 每管中加入10 ul Proteinase K, 42°C, 1.5 h。
4. 苯酚/氯仿抽提纯化或试剂盒纯化DNA片段。
5. 取10 ul, 1%琼脂糖胶电泳检测, 观察大小分布; 紫外分光光度仪测量浓度。

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°C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"> 1. 细胞经“交联和收集细胞”步骤后, 细胞可冻存-80°C备用。 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°C备用。 3. 染色质解交联后(DNA回收纯化前), 可冻存于-20°C备用。DNA回收纯化后, 可冻存于-20°C备用。 |
| 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"> 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。 2. 减少甲醛固定时间。如降为5 min。 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°C 8000 rpm离心4min排掉空气泡沫。 4. 用新鲜甲醛固定交联。 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。 6. 解交联不充分。可解交联过夜。 <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"> 1. DNA片段太大: 增加超声时长(超声法)或酶用量(酶消化法)。 2. DNA片段太小: 减少超声时长(超声法)或酶用量(酶消化法)。 |
| 目的抗体ChIP富集度很弱, 甚至无富集 | <ol style="list-style-type: none"> 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。 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。 3. 抗体亲和力低。ChIP捕获时, 抗体可以孵育过夜。 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)。 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。 6. 引物不佳。重新设计引物。 |
| 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"> 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。 2. 抗体过量。减少用量。 3. PCR模板DNA过多。减少用量。 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。 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。 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。 |

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

Humankine®人源细胞表达高活性蛋白溶解注意事项请查看官网产品页面《溶解液及溶解说明》文件。



扫码查看更多实验干货





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

Proteintech Europe,
Manchester Science Park, Kilburn House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SE
t. (+44)-161-22-66-144
e. 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