



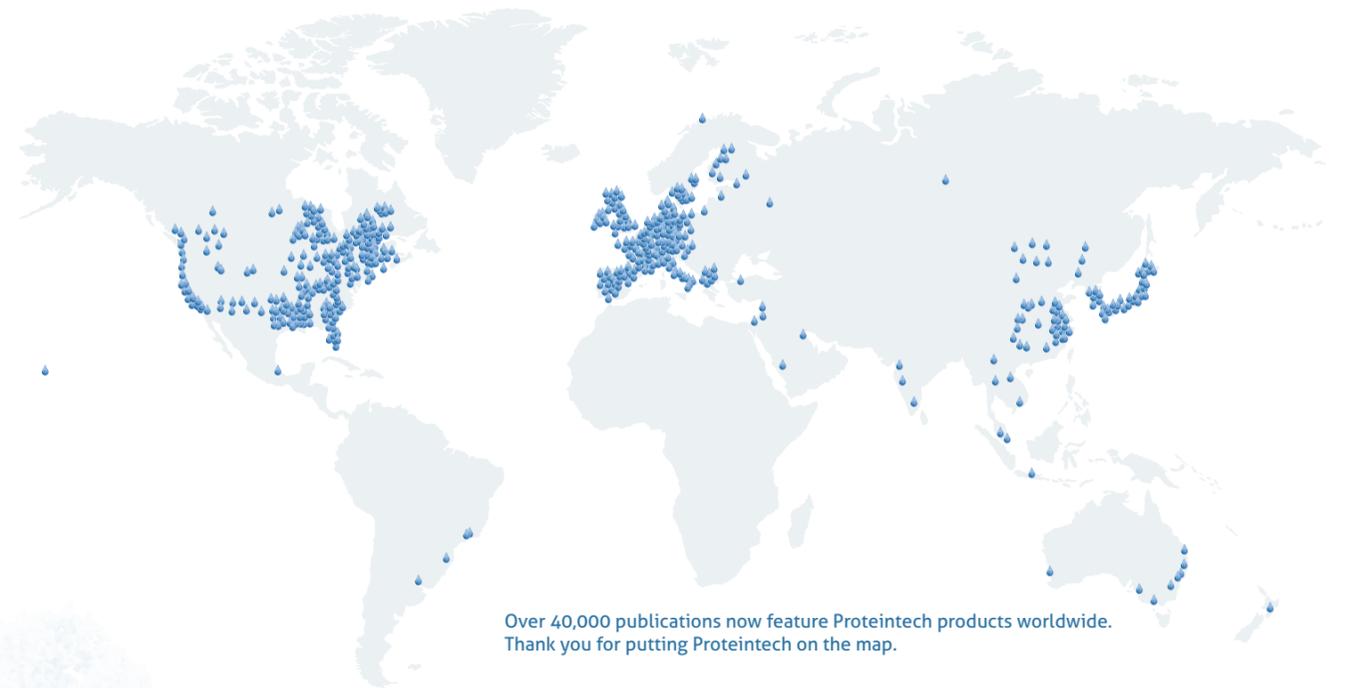
Proteintech 实验技术手册

第二版

www.ptglab.com



One day your
research
will on
the map



Over 40,000 publications now feature Proteintech products worldwide.
Thank you for putting Proteintech on the map.

As the silent partner in your research

关于我们

Proteintech Group, Inc. 于 2002 年在美国芝加哥成立，是一家拥有自主品牌，以专业研发、生产并销售抗体、重组蛋白和 ELISA 试剂盒等相关产品为主要业务的生物技术公司。作为全球最大的专业抗体生产商，Proteintech 凭借一支锐意进取的技术团队和稳定的技术平台，已完成针对人类基因组三分之二靶标的抗体。

Proteintech 公司于 2018 年 4 月正式收购世界上首家使用人源细胞生产人源蛋白的 Humanzyme 公司，其拥有多项专利的 HumaXpress® 表达系统生产的 Humankine® 系列产品具有明显的优势，较之 CHO、SF9 或 E.coli 等非人源表达系统生产的蛋白具有更高的生物活性和稳定性，同时突破了人源细胞表达蛋白量低的瓶颈，不仅可以提供实验室规模量，还可以大规模 GMP 生产，以满足临床前和临床需求。

如今，Proteintech 已建立了全球市场销售网络，美国、欧洲、中国和日本都建有现货库存，为生命科学研究及时提供优质的抗体和蛋白。

只做最值得您信赖的抗体和蛋白

Proteintech 采用人源融合蛋白作为免疫原，其产生抗体的过程更接近自然机体内的免疫反应，制备的抗体识别抗原的能力更强，亲和力更高，更适用于进行多种属、多功能和多应用的检测。同时，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优质的特异性抗体，2014 年 Proteintech 率先采用 siRNA 技术验证抗体的特异性，2015 年 Proteintech 又陆续启动了 Knock Out (敲除) 技术和免疫捕获结合质谱分析 (IP-MS) 等技术来验证抗体特异性。截止目前，经过上述三种技术验证的抗体发表文献已超过千篇。

Proteintech 新增的采用专有人源细胞表达系统生产的 Humankine® 人源蛋白具有真实天然的糖基化、磷酸化，正确折叠、二硫键及多亚基复合物形成等翻译后修饰，与天然蛋白成熟过程更接近，有效确保实验结果的可靠性和真实性。

您的成功才是我们的成功

从成立至今，Proteintech 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。我们坚信：您的成功才是我们的成功，高品质抗体才能久经市场考验。Proteintech 数千种抗体发表的文献被频繁引用，截止 2018 年 6 月底，SCI 文献引用次数已超过 40,000 次，且文献数量仍持续高速增长。文献引用不仅是对抗体品质的认可，也为您的实验带来很大的参考价值。

科学没有国界，我们秉承科研者的态度，对我们产品的检测数据实行全公开政策，在官网上展示我们所有的检测数据和产品信息，供全球客户查阅和参考。

关于本册

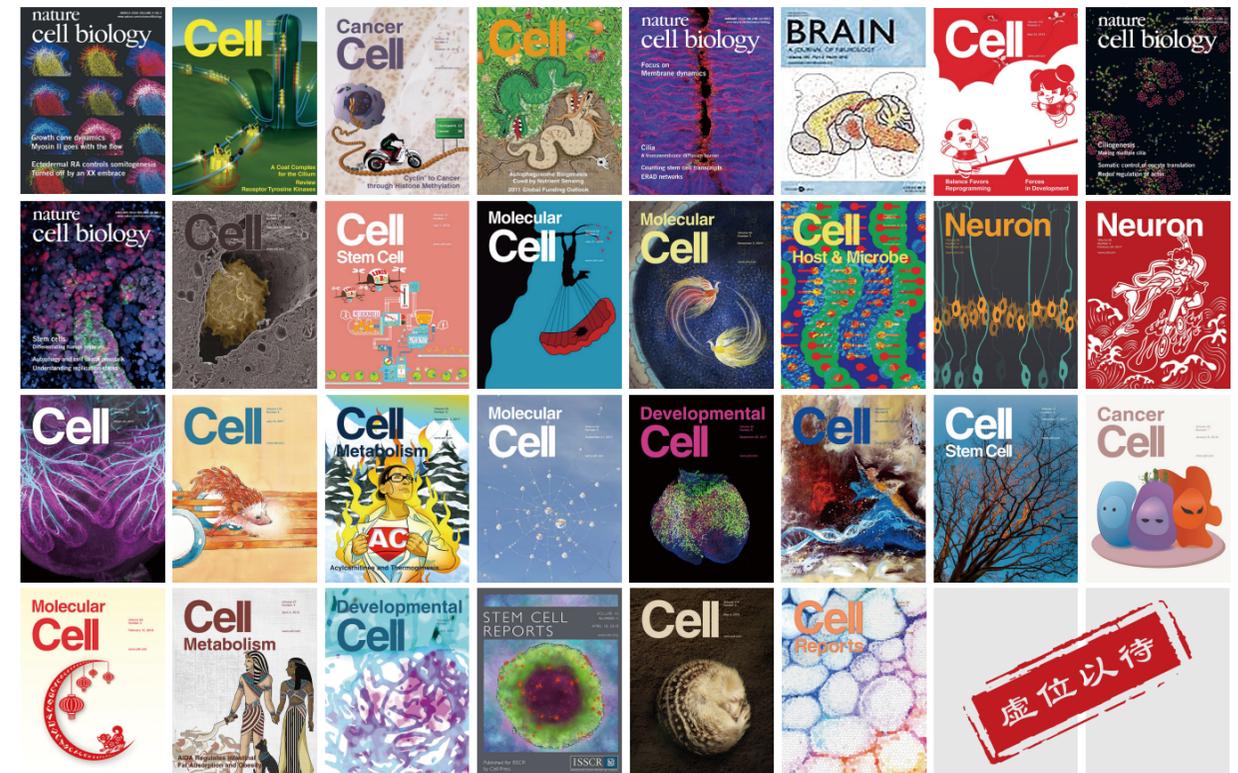
本手册涵盖了我们在进行抗体生产和验证过程中常用的实验方案和常见问题，以及疑难解析。我们愿意与您分享长期积累的经验 and 技巧，希望对您的实验有所帮助。



已完成针对人类基因组 2/3 靶标的抗体 超过 40000 次文献引用

- 细胞自噬 Autophagy
- 干细胞 Stem cell
- 内分泌与代谢 Endocrinology & metabolism
- 细胞凋亡 Apoptosis
- 神经生物学 Neuroscience
- 细胞器和亚细胞标记物 Organelle and subcellular markers
- 肿瘤 Cancer
- 心血管研究 Cardiovascular research
- Tag 标签及内参抗体 Tag and loading control antibodies

Proteintech 抗体引用文献荣登顶尖期刊封面



以上封面中引用的抗体列表

抗体名称	货号	抗体名称	货号	抗体名称	货号	抗体名称	货号
ABHD15	22526-1-AP	CEP65	16268-1-AP	METTL3	15073-1-AP	SLC22A5	16331-1-AP
AGPAT9	20603-1-AP	COX2	55070-1-AP	MOGAT2	19514-1-AP	SLC3A1	16343-1-AP
AIDA	23724-1-AP	CP110	12780-1-AP	MUTED	24015-1-AP	TARDBP	10782-2-AP
ALKBH5	16837-1-AP	CPT1B	22170-1-AP	myosin II	customized	TAX1BP1	14424-1-AP
APOB	20578-1-AP	CUL4B	12916-1-AP	NDUFB10	15589-1-AP	TCTN1	15004-1-AP
ARL13B	17711-1-AP	DACH1	10914-1-AP	NRCAM	21608-1-AP	TROAP	13634-1-AP
ATF4	10835-1-AP	EXOC5	17593-1-AP	OPTN	10837-1-AP	Tubulin-Alpha	66031-1-Ig
BBS2	11188-2-AP	FABP2	21252-1-AP	PALS1	17710-1-AP	VAPA	15275-1-AP
BBS5	14569-1-AP	Fabp4	51035-1-AP	PAX8	10336-1-AP	VCP	10736-1-AP
beta actin	60008-1-Ig	GAPDH	10494-1-AP	PTPIP51	20641-1-AP	YTHDF1	17479-1-AP
CALCOCO2	12229-1-AP	GST	10000-0-AP	RBM3	14363-1-AP	YTHDF2	24744-1-AP
Calnexin	10427-2-AP	HRD1	13473-1-AP	RPL4	11302-1-AP		
CENPJ	11517-1-AP	IFT57	11083-1-AP	SDHA	14865-1-AP		
Centrin 1	12794-1-AP	M6PRBP1	10694-1-AP	SIX2	11562-1-AP		

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	2
4. 抗原和抗原分类	2
🔗 制备好抗体第一步——抗原的选择	2
5. 抗体来源	3
🔗 单抗多抗如何选, 实验需求来定夺	3
6. 抗体纯化	3
🔗 怎样纯化抗体才能提高特异性?	3
第二章 抗体的选择和验证	4
1. 样品的种属	4
2. 抗体宿主的种属	4
3. 抗体的标记	4
4. 抗体的应用	4
5. 抗体的浓度和效价	4
6. 抗体特异性验证方法	5
🔗 RNA 干扰技术	5
🔗 Knock Out 技术	5
🔗 免疫捕获结合质谱分析技术	5
第三章 抗体的保存和分装	6

第二部分 检测应用

第一章 免疫印迹 (Western blot, WB)	7
1. 抗原样品的制备	7
🔗 Proteintech 改进版 RIPA buffer 配方	9
🔗 样品制备的注意事项	10
2. 上样和电泳	11
🔗 何种情况下使用梯度胶?	12
🔗 内参抗体的选择原则	14
3. 转膜	16
🔗 超大 / 超小分子量蛋白质分离技巧	17
4. 膜的封闭	17
🔗 灵敏度与背景 - 封闭剂的微妙作用	17
5. 孵育一抗	18
6. 孵育二抗	18
7. 显影	18
8. 免疫印迹疑难解析	19

第二章 免疫化学 (Immunocytochemistry, IHC)	20
1. 免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC)	20
🔗 抗原修复做得巧, 抗体抗原结合好	21
操作步骤	21
2. 免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC)	22
操作步骤	22
3. 免疫化学疑难解析	23
第三章 免疫荧光 (Immunofluorescence, IF)	24
1. 标本的处理	24
2. 细胞固定	25
🔗 选好固定剂, 蛋白定位更准确	25
3. 操作步骤	26
4. 免疫荧光疑难解析	26
第四章 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)	27
1. 操作步骤	27
2. 免疫沉淀常用试剂	29
3. 实验注意事项	29
★ 4. 免疫沉淀实验如何选择检测二抗?	30
5. 免疫沉淀疑难解析	30
第五章 酶联免疫吸附 (ELISA)	31
1. 直接法 ELISA	31
原理	31
操作步骤	31
2. 间接法 ELISA	32
原理	32
操作步骤	32
3. 双抗夹心法 ELISA	33
原理	33
操作步骤	33
4. 酶联免疫吸附疑难解析	34
第六章 流式细胞技术 (Flow Cytometry, FC)	35
1. 液流系统	35
2. 光路系统	35
3. 监测分析系统	36
4. 流式细胞术的基本操作和技巧	36
🔗 固定试剂不一样, 后续操作大不同	37
操作步骤	38
5. 流式细胞术疑难解析	38
第七章 Humankine® 人源蛋白的溶解注意事项	39

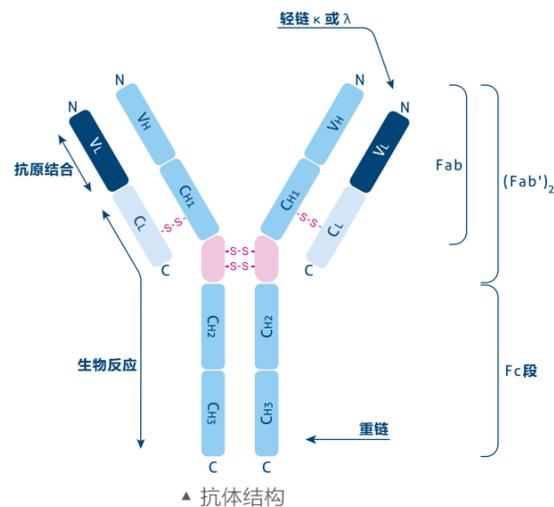
第一部分 基础理论

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, 而抗原是在易感染动物体内引发抗体产生的物质。抗体是机体防御系统中重要的组成部分。

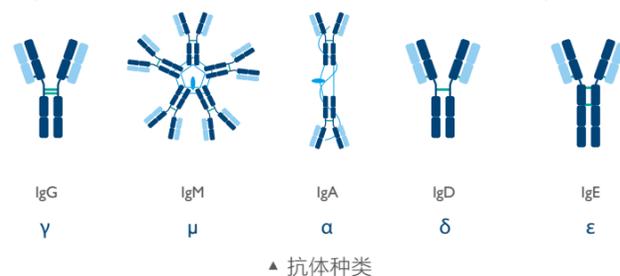
抗体的结构与特征

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, H) 和相同的两条轻链 (light chain, L) 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。



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在分为亚类, 例如人的 γ 链有四种: γ1、γ2、γ3、γ4, 小鼠的 γ 链也有四种: γ1、γ2a、γ2b 和 γ3, 少数品系的小鼠还有 γ2c。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。



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不同抗原。而 Fc 段是可结晶段, 相当于 Ig 的 CH2 和 CH3 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, 因为分子量小仅显示抗原性, 又称为不完全抗原, 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

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。大部分二抗是使用这种抗原得到的。

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。除了可用于 WB、IHC、ICC、IF, 更适用于 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, 产生的抗体具有最高亲和力, 大大提高科研工作者的实验效率。

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。

多克隆抗体：将抗原（纯度越高越好）直接注入到动物体内进行免疫，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。

🔍 单抗多抗怎么选，实验需求来定夺

类别	多克隆抗体	单克隆抗体
稳定性	好	易受理化条件影响
*表位识别	多个	单一
*灵敏性	强	较强
交叉反应	可能有	较少
凝集反应	可能有	较少
制备难度	易	较难
制备周期	短	长

* 表位识别

识别的表位多，更有助于 IP/CHIP 实验中的蛋白富集

* 灵敏性

- 多抗有助于放大低表达水平的靶蛋白信号，因为靶蛋白可在多个表位上结合不止一个抗体分子，而单抗只能检测一个靶表位，检测低水平的靶蛋白容易受到限制；
- 多抗相对于单抗而言更容易识别出与免疫原具有高同源性的蛋白质，或从非免疫原物种的组织样品中筛选靶蛋白；
- 多抗相对于单抗而言更容易检测到某些表位有突变、修饰和有剪切体的靶蛋白，有助于蛋白新功能或者新亚型的发现。

单抗和多抗都有各自的特点与优势，需要针对不同的实验需求选择最佳的抗体类型。

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，纯化出与抗原具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，从粗制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。因此 Protein A 或 G 纯化的多抗会有部分交叉反应发生，虽然仍可以满足大多数实验要求，如 WB, ELISA 等，但由于其中保留了全部的非特异性抗体杂质，对于一些要求比较高的实验仍然存在较大的干扰，如免疫组化、抗体标记实验等。

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，而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目的抗体含量比例高，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。例如，当检测样品是鼠源蛋白时，推荐使用兔源的一抗，对应的二抗就应选择抗兔 IgG 标记的二抗。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。含有血清成分的细胞培养上清或含有组织液成分的组织裂解液，一抗需要根据上述原则选择。当一抗种属与检测样本相同时，可以用 HRP-Protein A/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

抗体的标记一般有酶标和荧光标记两种。HRP 的酶标抗体在结合底物之后可以形成有色沉淀或发出荧光，用于免疫印迹、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，不能准确反映有效抗体的含量。而抗体效价代表了参与抗原 - 抗体反应体系中抗体的使用量，能够更好的反映抗体的亲和力强弱。

值得注意的是，如果采用 Protein A 或 G 纯化获得的多克隆抗体，实际上抗体浓度往往会高于有效抗体（针对目标抗原的抗体）浓度；但有效抗体的效价和亲和力也会大打折扣。采用蛋白质抗原，合适的免疫周期，以及抗原亲和纯化抗体等方式方法，可以提高抗体的亲和力和特异性。

🔍 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 技术和 MS 质谱分析等。

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。

免疫捕获结合质谱分析技术

质谱 (Mass Spectrometry) 分析是一种鉴定技术，将未知蛋白质进行酶解，用质谱仪测定每个酶解片段的分子量，然后通过质谱数据库比对，可以准确的鉴定出蛋白质。它能快速而极为准确地测定生物大分子的分子量，使蛋白质组研究从蛋白质鉴定深入到高级结构研究以及各种蛋白质之间的相互作用研究。采用免疫沉淀与 MS 分析结合的方法 (IP-MS) 可准确识别与抗体直接发生相互作用的目标蛋白以及可能与目标蛋白形成复合物的蛋白质。在抗体特异性检测中，可以通过 IP-MS 来检测分析经抗体富集纯化之后的抗原蛋白是否是目标蛋白，从而判断验证抗体特异性。

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、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。

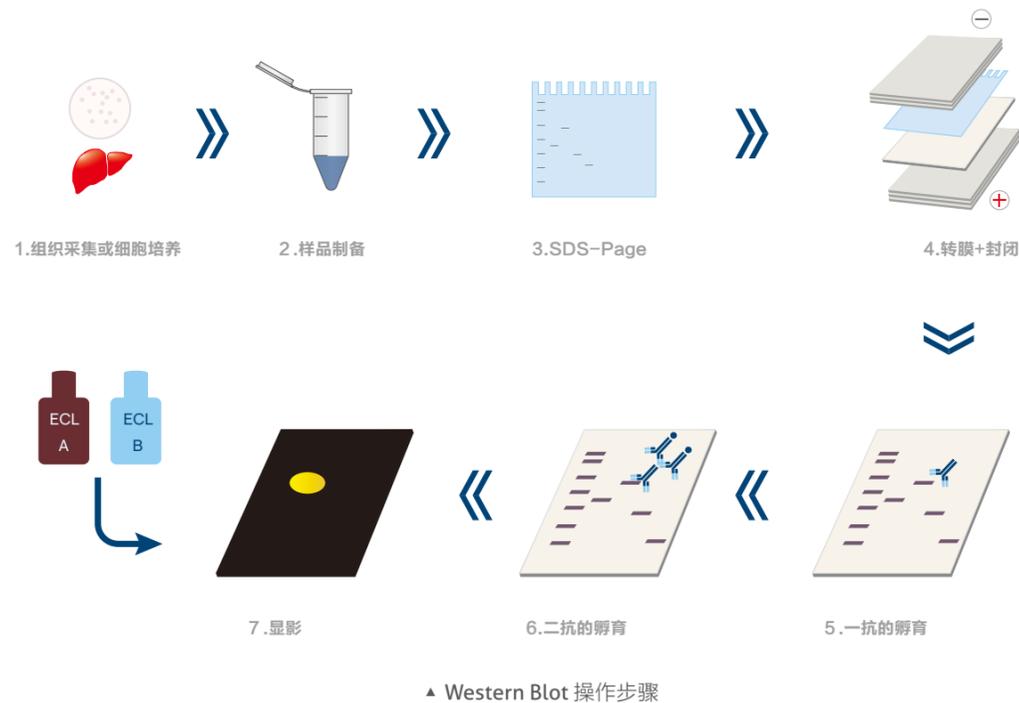
反复冻融容易导致抗体变性，降低抗体和抗原结合能力，影响实验效率。为了避免抗体反复冻融，抗体中会添加终浓度 50%（体积百分比）甘油成分，可以有效避免抗体在 -20℃ 冰箱中发生冻结，因此可以解除反复冻融的顾虑。

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%（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，需要去除抗体中的叠氮化钠，通常的去除方法有透析法和超滤法。

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。



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 通常采用近似生理 pH 的缓冲体系来制作裂解液, pH 过高或过低都可能导致蛋白质变性析出或水解。Tris-HCl 缓冲液因其不易与其他离子形成不溶物且与整个电泳系统兼容性好而成为裂解的首选缓冲液。但是, 制样体系中尽量避免可与 SDS 形成沉淀的高浓度钾离子。

盐离子 通常以生理盐水浓度作为裂解液的盐离子浓度, 即 150 mM NaCl。在提胞浆蛋白等易溶组分时, 会借助低盐而实现低渗, 从而使细胞胀破以实现质膜分离, 这种情况下一般使用不超过 50 mM 的 NaCl。

当盐离子浓度过高时, 部分蛋白质可能会因盐析而出现沉淀, 此外过高的离子浓度会导致泳道内局部电流过大, 从而跑出笑脸状条带, 即使有少数蛋白质可能需要高盐提取的, 或借助盐析除去干扰蛋白的, 最终 NaCl 浓度一般也不高于 500 mM。

离液剂 离液剂是一类可以弱化蛋白质疏水性的试剂。常用的离液剂有两类, 一类是以尿素或硫脲为代表的离液剂, 另一类则是各种表面活性剂 (俗称去垢剂)。

尿素和硫脲性质类似, 其对蛋白质的助溶可能是通过与蛋白质之间形成大量氢键实现的, 在做蛋白提取时一般可以用 6-8 M 尿素或 1 和 2 M 硫脲助溶, 这个组合在制备电泳的样本中被普遍使用。

表面活性剂则是一大类性质相似的分子, 总体上它们都含有一个亲水性的头部和一个疏水性的尾部, 它们可以通过疏水性的尾部与蛋白质疏水部分结合, 而亲水性的头部暴露给液体环境, 从而实现助溶作用。

	类别1	类别2	举例
表面活性剂	非离子型表面活性剂	-	Triton X-100, Triton X-114, Tween-20, NP40, C8APG (辛基葡萄糖苷) 等
	离子型表面活性剂	阴离子表面活性剂	SDS (十二烷基硫酸钠), DOC (脱氧胆酸钠), SLS (十二烷基肌氨酸钠) 等
		阳离子表面活性剂	绝大多数是含氮有机化合物, 少数是含磷或含硫有机化合物。主要是季铵化合物, 如苯扎溴铵
		两性离子表面活性剂	CHAPS, CHAPSO, Zwittergent 等

▲ 表面活性剂类型

蛋白酶抑制剂 组织或细胞内通常含有大量的蛋白酶, 在提取过程中这些蛋白酶被释放出来, 有可能消化目的蛋白, 因此抑制这些蛋白酶的活性对于防止目的蛋白的降解极有帮助。

类别	功能	试剂	说明
金属离子螯合剂	许多蛋白酶需要二价金属离子才具有活性, 因此可以使用金属离子螯合剂来达到抑制蛋白酶活性的作用	EDTA-2Na, EGTA-2Na 等	-
磷酸酶抑制剂	避免磷酸化蛋白发生去磷酸化	原钒酸钠, 焦磷酸钠, β-甘油磷酸钠, 氟化钠等	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)
丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶抑制剂	进入丝氨酸蛋白酶催化中心, 并与催化中心的丝氨酸反应, 将丝氨酸的羟基取代, 生成苯甲酰磺酰丝氨酸	PMSF	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

▲ 蛋白酶抑制剂类型

还原剂 许多蛋白质在天然条件下存在二硫键会形成多个分子的聚合体, 另有少数蛋白质在制样的过程中也会自发形成二硫键, 在裂解液中引入还原剂可以有效地还原二硫键, 使得蛋白质都以单体形式存在。

常见的还原剂有 DTT (二硫苏糖醇) 和 BME (beta-巯基乙醇), 在蛋白制备中这两种还原剂都具有较好的效果。值得注意的是 DTT 溶液不稳定, 一般需要现配现用; BME 取用方便但容易挥发, 使用时应做好防护。

Proteintech 改进版RIPA buffer配方

RIPA 裂解液 (RIPA 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 buffer 提取。

以下是Proteintech 改进版RIPA buffer配方

Lysis Buffer (pH 7.2-7.4):

150 mM Sodium Chloride

1% Triton X-100

0.5% Sodium Deoxycholate

0.1% SDS

50 mM Tris

1 mM EDTA

10 mM Sodium Fluoride

1 mM Sodium Orthovanadate (现用现加)

Add PMSF to 1 mM before use (现用现加)

此Lysis buffer需配合如下的Loading buffer使用:

4 × Loading Buffer:

12% SDS (wt/vol)

20% beta-mercaptoethanol (vol/vol)或者100 mM DTT (现用现加)

25% glycerol(vol/vol)

150 mM Tris/HCl (pH 7.2-7.4)

0.03% Bromophenol Blue (wt/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, 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 (PMSF) 和磷酸酶抑制剂 (sodium orthovanadate), PMSF 终浓度为 1 mM, 磷酸酶抑制剂 (原矾酸钠) 终浓度为 1 mM。

贴壁细胞 先用细胞刮收集细胞, 连同培养液一起, 在 4℃ 条件下 500 g 离心 5 min (最大离心力不超过 1000 g), 取沉淀, 用预冷的 PBS 洗涤两次, 在 4℃ 条件下 500 g 离心 5 min, 倒掉上清。

悬浮细胞 收集细胞, 在 4℃ 条件下 500 g 离心 5 min (最大离心力不超过 1000 g), 用手指把细胞用力弹散。

按每 10⁶ 个细胞中加入 100 μl 裂解液的比例加入适量的裂解液 (细胞中的蛋白质含量不同, 加入的裂解液比例可以适当调整), 4℃ 持续振荡 30 min。4℃ 10000 g 离心 20 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 首先除去脂肪和血液等杂质, 尤其是脾脏、肝脏、心脏和胎盘等富含血液的组织, 一定要洗净血液, 防止后续因内源 IgG 产生干扰。取好组织后在研磨前将组织块剪碎可以有效的缩短研磨时间。

现在实验室常用的研磨方法主要有两种: 液氮研磨和玻璃匀浆器 (另还有电动匀浆器适合大规模样品制备)。

组织样品研磨完成之后, 后续处理步骤与细胞样品处理类似。

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, 在低温提取其细胞内蛋白质时, 细胞内蛋白酶活性比较高, 蛋白质容易被降解, 然而在高温下 (50-60℃ 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相关的组织 (如胃、大小肠、肝脏、胰腺等) 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℃ 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。

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

◆ 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 结合生成紫红色络合物, 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, 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。

BCA测定方法如下: (参考碧云天蛋白浓度测定试剂盒增强型)

1. 蛋白标准品的准备

- 取 1.2 ml 蛋白质标准配制液加入到一个管蛋白标准 (30 mg BSA) 中, 充分溶解后配置成 25 mg/ml 的蛋白质标准液。配置后可立即使用, 也可以 -20℃ 长期保存。
- 取适量 25 mg/ml 蛋白质标准液, 稀释至终浓度为 0.5 mg/ml。例如取 20 μl 的 25 mg/ml 蛋白标准液, 加入 980 μl 稀释液即可配置成 0.5 mg/ml 蛋白标准液 (蛋白样品溶解于何种溶液中, 标准品也应用该溶液稀释)。但是为了操作简便, 也可以用 0.9% NaCl 或 PBS 稀释标准品。稀释后的 0.5 mg/ml 蛋白标准液可以 -20℃ 长期保存。

2. BCA工作液的配制

根据样品数量, 按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液, 充分混匀。例如 5 ml BCA 试剂 A 加 100 μl BCA 试剂 B, 混匀, 配制成 5.1 ml BCA 工作液。(BCA 工作液室温 24 小时内稳定)

3. 蛋白浓度检测

- a. 将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 μl 加到96孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到20 μl，相当于标准品浓度分别为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml。

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μl)	0	1	2	4	8	12	16	20
标准品浓度 (mg/ml)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

▲ 蛋白标准品浓度说明

- b. 加适当体积样品到96孔板的样品孔中。如果样品不足20 μl，加标准品稀释液补足到20 μl。(请注意记录样品体积)
 c. 各孔加入200 μl BCA工作液，37℃放置20-30 min。
 d. 用酶标仪测定562 nm处的吸光度。
 e. 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

上样和电泳

◆ 操作步骤

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。



▲ 以上电泳以Bio-rad微型垂直电泳槽为例。

◆ 凝胶上样

1. 变性，还原蛋白样本

为了能使抗体接近抗原表位，必须将蛋白质的三维构型打开，因此需要将蛋白质变性。一般使用含阴离子变性去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)的上样缓冲液，95-100℃煮沸5 min；对于核蛋白，除了在提取时增加裂解液体积和超声破碎的次数外，煮样时间应适当延长至10-15 min。

2. 非变性，还原样本

某些抗体识别的表位是非连续氨基酸构成的蛋白质三维结构，此种情况则需要进行非变性的WB，这种非变性电泳不加SDS，样本也不需煮沸。

蛋白状态	凝胶条件	上样缓冲液	电泳缓冲液
变性-氧化	非还原，变性	有SDS，无β-巯基乙醇或DTT	有SDS
变性-还原	还原，不变性	SDS和β-巯基乙醇或DTT	有SDS
天然-氧化	非还原，天然	无SDS，无β-巯基乙醇或DTT	无SDS
天然-还原	还原，不变性	无SDS，β-巯基乙醇或DTT	无SDS

▲ 不同类型蛋白质的缓冲液说明

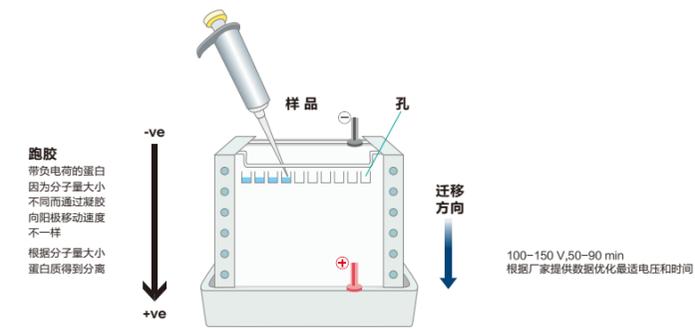
另外还有某些抗体仅识别蛋白质的非还原态，如某些半胱氨酸的氧化态，因此上样缓冲液中不加入β-巯基乙醇或者DTT。

◆ 电泳

1. 聚丙烯酰胺凝胶的制备

聚丙烯酰胺凝胶电泳简称为PAGE(Polyacrylamide gel electrophoresis)，是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的一种常用电泳技术。聚丙烯酰胺凝胶由单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成，聚丙烯酰胺凝胶为网状结构，具有分子筛效应。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)。

SDS-PAGE具有较高的灵敏度，根据蛋白质亚基分子量的不同即可分离蛋白质，一般只需要不到微量级的蛋白质；Native-PAGE主要用来分析蛋白质结构，保持其活性，使蛋白质在电泳过程中能够保持完整的状态。



▲ 蛋白质电泳

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)，凝胶浓度和线性分离范围的关系参照下表：

分离胶浓度 (%)	线性分离范围 (kDa)
10+15(三层胶)	4-40
15	15-45
12.5	15-60
10	15-100
8	25-200

▲ 不同分子量的蛋白质选择不同的凝胶浓度

👉 何种情况下使用梯度胶?

SDS-PAGE 梯度胶适用于分子量在30-150 kDa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。

Proteintech公司提供优质而全面的内参抗体供您选择。

适用范围	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
			免多抗	10494-1-AP
	β - Actin	42 kDa	鼠单抗	60008-1-Ig
			免多抗	20536-1-AP
	α - Tubulin	50-55 kDa	鼠单抗	66009-1-Ig
			免多抗	11224-1-AP
			免多抗	14555-1-AP
	β - Tubulin	50-55 kDa	鼠单抗	66240-1-Ig
			免多抗	10068-1-AP
			免多抗	10094-1-AP
	Vinculin	117 kDa	鼠单抗	66305-1-Ig
			免多抗	10298-1-AP
细胞核膜	Lamin A/C	65-75 kDa	免多抗	10298-1-AP
	Lamin B1	66-72 kDa	鼠单抗	66095-1-Ig
细胞核	TBP	33-43 kDa*	免多抗	12987-1-AP
			鼠单抗	66166-1-Ig
	PCNA	36 kDa	免多抗	22006-1-AP
			鼠单抗	60097-1-Ig
	Histone H3	15-17 kDa	免多抗	10205-2-AP
			鼠单抗	17168-1-AP
YY1	65-70 kDa	免多抗	66281-1-Ig	
		鼠单抗	22156-1-AP	
膜蛋白	ATP1A1	97-110 kDa	免多抗	14418-1-AP
			免多抗	55187-1-AP
线粒体	VDAC1 / Porin	31-37 kDa	鼠单抗	66345-1-Ig
			免多抗	10866-1-AP
			免多抗	55259-1-AP
	COX41	17-20 kDa	鼠单抗	66110-1-Ig
			免多抗	11242-1-AP
	COX42	17-20 kDa	免多抗	11463-1-AP
鼠单抗			66241-1-Ig	
细胞增殖	BrdU	-	鼠单抗	66241-1-Ig
全血/血浆/血清	Transferrin	77 kDa	鼠单抗	66171-1-Ig
			免多抗	17435-1-AP
	Albumin	66 kDa	鼠单抗	66051-1-Ig
			免多抗	16475-1-AP

*TBP在人类是37-43 kDa, 在小鼠和大鼠是33-36 kDa

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), 因为蛋白质与 PVDF 膜以疏水力结合, 从而将亲水部位暴露到液相, 使抗体更容易与之结合。

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

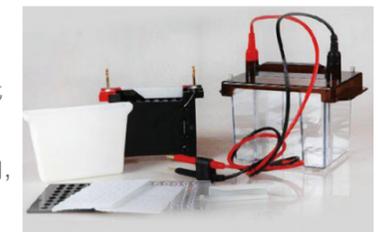
鉴于湿转效果比较稳定, 除特定三层胶使用半干转以外, 建议用湿转转移蛋白质, 尤其是大分子量蛋白质。

湿转: 湿式转膜三明治排列为: 海绵 / 滤纸 / 胶 / 膜 / 滤纸 / 海绵, 全部紧密排列, 特别是胶 / 膜之间不能留有气泡, 胶位于负极而膜置于正极。

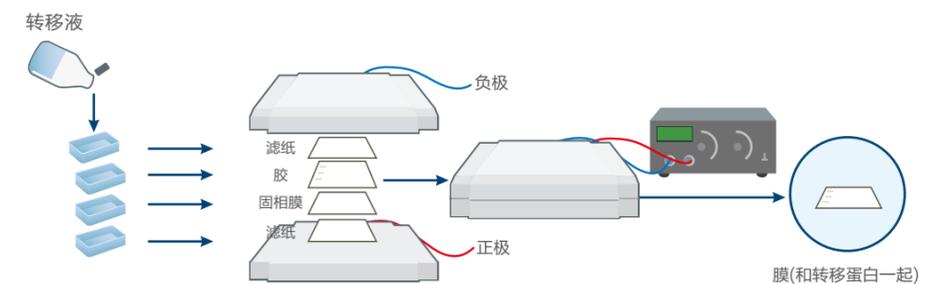
湿转用于检测 30-100 kDa 分子量蛋白质时通常采用恒流法: 180 mA, 90 min。

半干转: 半干式转膜中, 三明治的排列为: 滤纸 / 胶 / 膜 / 滤纸, 用电转缓冲液浸湿后, 直接置于电转仪的正负极之间。胶位于负极而膜置于正极。

半干转用于检测 30-100 kDa 分子量蛋白质时通常采用电流为 60 mA, 90 min, 当转移小分子量或是三层胶时, 电流提高到 100 mA, 120 min。



▲ 湿式转膜仪



▲ 半干式转膜



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: 100 mM Tris, 300 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。

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, 建议采用湿转转移过夜 (有条件的客户可在 4℃ 下进行), 一般采用恒压法: 20 V 过夜。

对于小分子量蛋白质 (分子量一般低于 10 kDa) 一般使用三层胶, 使用 Tris-Tricine 电泳液系统恒流 120 mA, 120min, 而后选择 PSQ 膜并使用半干转移法。三层胶分别为浓缩胶, 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, 从而使小分子量的蛋白质或者肽段能够在分离胶内得到更好的呈现。

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可逆的铜染法, 否则采用不可逆考马斯蓝法染色。

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, 再用大量的水洗膜直至水变清无色蛋白条带清晰。

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% 的脱脂奶粉, 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, 此时可选择使用 BSA。

2. 分析磷酸化蛋白须用 BSA。封闭与稀释抗体不建议使用脱脂奶粉, 因为奶粉中的磷酸酶与膜上的磷酸化蛋白接触可使之去磷酸化, 脱脂奶粉同时也不适用于碱性磷酸酶 (AP) 检测系统。

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 (NaN₃), 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%BSA (或脱脂奶粉) 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℃ 封闭 1 hr、室温封闭 1.5-2 hrs 或者 4℃ 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 hrs 或者 4℃ 过夜。使用 Proteintech 抗体, 建议室温孵育 1.5-2 hrs 即可, 无需 4℃ 过夜, 既节约时间又可减少背景。

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℃ 孵育 1 hr。

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, 酶促底物 DAB 显色法, 增强化学发光法 (ECL) 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. 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: B500030; B500031) 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。

2. 增强化学发光法 (ECL)

ECL 显色原理: 在 ECL 底物中, 含有 H₂O₂ 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, 适合永久保存和重复标记, 是目前最常用的显影方法。

3. 荧光二抗显影法

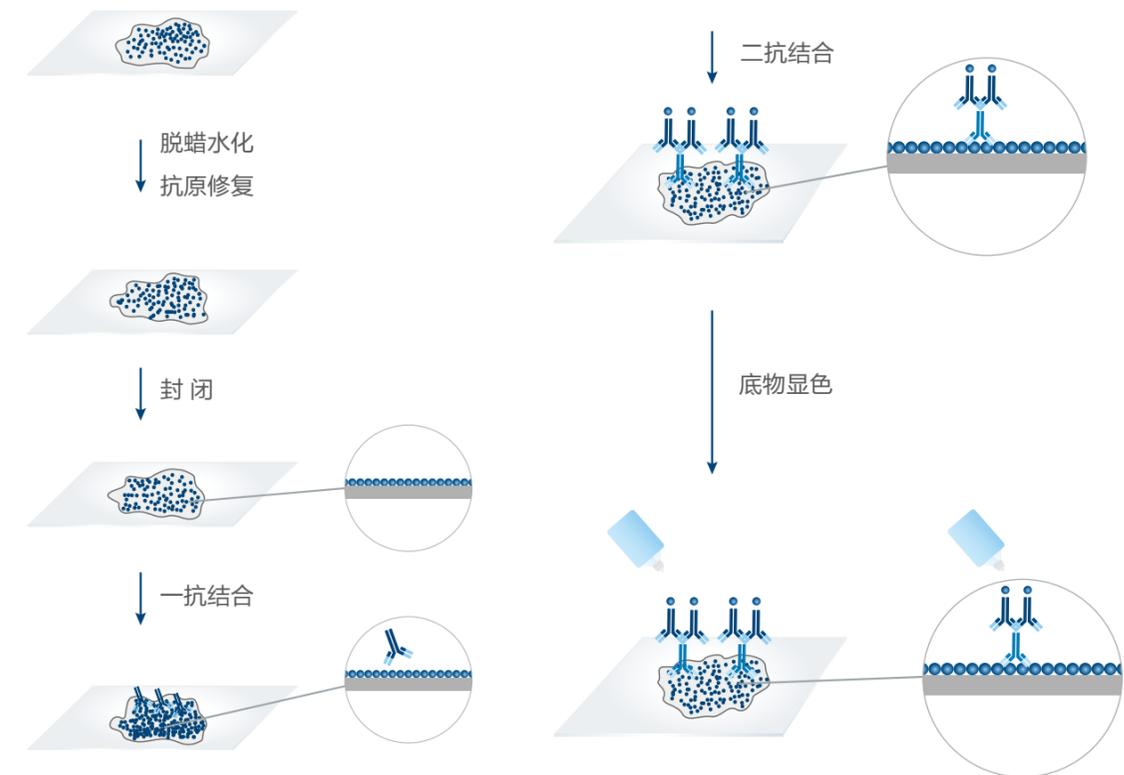
相比较于传统的显色法和化学发光法只能定性和半定量检测一个蛋白的局限性, 荧光 WB 不仅能在定性的同时实现蛋白定量, 而且还兼容多色荧光抗体的优越性, 同时完成二个或者更多蛋白的检测。只要有合适的荧光标记抗体就可以实现荧光 WB 甚至双色荧光 WB 检测。

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
	使用灵敏度更高的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
非特异性条带	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
条带分子量不对	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、前体蛋白剪切等
带型异常	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的影响, 电泳的影响等
	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
	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。



▲ 免疫组织化学操作步骤

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。

◆ 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。

抗原修复做得巧，抗体抗原结合好

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(pH 9.0) 或 0.01 M 柠檬酸钠 (pH 6.0) 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℃ 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-EDTA(pH 9.0) 或 0.01 M 柠檬酸钠 (pH 6.0) 修复缓冲溶液至 95℃ 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℃，切片也预热至 37℃，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℃ 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. 尽量采用自然降温

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. 尽量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，在做抗原修复时尽量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，比如柠檬酸盐缓冲液 (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 (10 mM Tris, 1 mM EDTA 溶液) 来修复。

◆ 操作步骤

1. 脱蜡

- 在二甲苯 I 号缸中浸泡 20 min；
- 在二甲苯 II 号缸中浸泡 20 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 95% 乙醇中浸泡 5 min；
- 在 80% 乙醇中浸泡 5 min；
- 在 60% 乙醇中浸泡 5 min；
- 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. 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 hr；
- 用吸水纸吸去多余液体，滴加稀释好的一抗（抗体用 1 X pH 8.0 的 TBS 缓冲溶液稀释），室温孵育 1 hr，同时用一抗来源动物未免疫前的血清作为阴性对照；
- 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；
- 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。

3. 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。

4. 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。

5. 镜检

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

- 在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次，每次 3 min。
- 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。
- 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。
- 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 hr 或者 4℃ 过夜。
- 用吸水纸将多余 BSA-PBS 溶液吸去，注意不要干片。
- 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 hrs 或 4℃ 过夜。
- 用 PBS 清洗样片，洗涤 3 次，每次 5 min。
- 甩干、擦净，滴加适量二抗，室温孵育 30 min。
- TBS 冲洗 4-5 次，每次 30 sec。

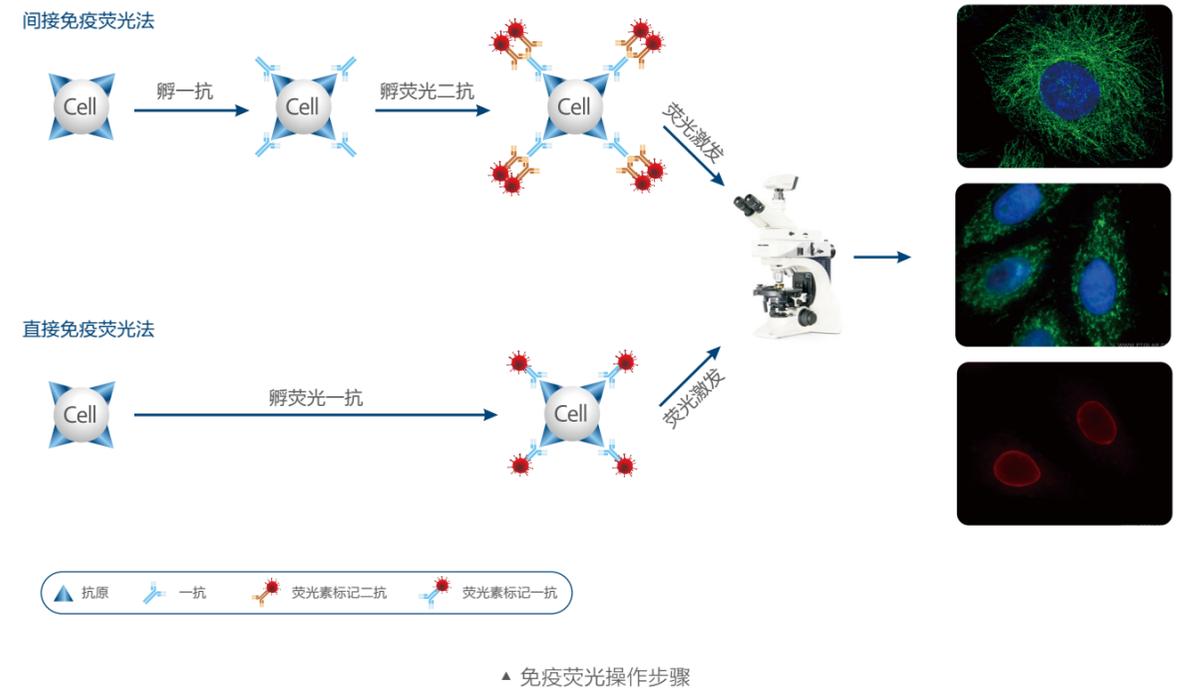
10. 甩干、擦净，滴加适量 DAB 溶液，2-5 min 后迅速用去离子水冲洗干净。(DAB 工作液现配现用)
11. 滴加一滴 Mayer's 苏木素(hematoxylin)，复染 1.5 min-2 min，用 TBS 溶液冲洗干净，然后在 TBS 溶液中浸泡 5-10 min。
12. 用去离子水浸洗 3 遍，每遍 1 min。
13. 脱水（参考上述IHC操作）。
14. 封片（参考上述IHC操作）。
15. 镜检（参考上述IHC操作）。

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	降低抗体浓度和抗体孵育时间，室温1 hr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5-10 min，以显微镜下观察为准
	一抗或二抗孵育前组织片干了	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℃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）
	室温太低，低于15℃	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
	重复使用抗原修复液（可能导致修复液的pH值发生改变或夹杂杂质，进而影响抗原修复效果）	每次使用新鲜配制的抗原修复液，并将其pH值调整至要求范围内
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。



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 浸洗 3 次，每次 3 min。
2. 在 4% 多聚甲醛常温固定 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 0.2% Triton X-100 室温通透 5 min，PBS 洗三次，每次 3 min。

◆ 冰冻切片

1. 冰冻切片室温平衡 10-20 min。
2. 在 4% 多聚甲醛常温固定 20 min，PBS 洗三次，每次 3 min。
3. 在 0.2% Triton X-100 室温通透 5 min，PBS 洗三次，每次 3 min。

◆ 石蜡切片

1. 脱蜡

时间不能太长，否则在切片时容易碎片，切不完整。操作步骤如下：

- 在二甲苯 I 号缸中浸泡20 min；
- 在二甲苯 II 号缸中浸泡20 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95%乙醇中浸泡5 min；
- 在80%乙醇中浸泡5 min；
- 在60%乙醇中浸泡5 min；
- 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

取适量的柠檬酸修复液或 Tris-EDTA 修复液于烧杯中（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不同固定方法见下表。

细胞结构	首选固定剂	细胞结构	首选固定剂
细胞膜	A或者B	中心体	B
细胞质	A或者B	纺锤体	A
细胞核	A	溶酶体	B
细胞核膜	B	线粒体	A
细胞核仁	B	核糖体	B
高尔基体	A	细胞骨架	A或者B
内质网	A	自噬体	B
纤毛	A		

注：A：交联固定剂，多聚甲醛等；B：可溶性溶剂，丙酮、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

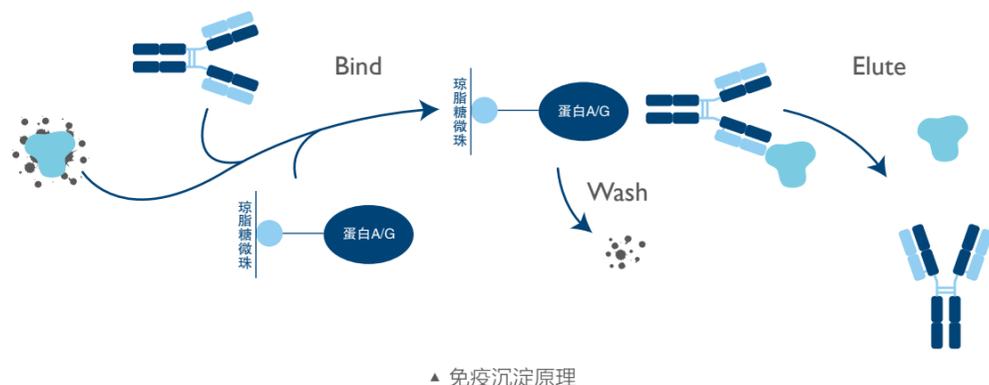
- 将固定好的样片置于装有PBS的培养皿中清洗3次，每次5 min。每次清洗后要用吸水纸将多余的液体吸去，再在下一培养皿中清洗，注意不要干片。
- 封闭：将样片置于干燥的培养皿内，滴加3% BSA-PBS将样片完全覆没放于湿盒中，室温1 hr或者4℃过夜。
- 用吸水纸将多余BSA-PBS溶液吸去，注意不要干片。
- 在样片上滴加50-100 μl稀释后的一抗（参照抗体说明书的推荐稀释比），将完全浸没于一抗的样片室温孵育2 hrs或4℃过夜。
- 用PBS清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
- 在样片上滴加50-100 μl标记有荧光素的稀释后的二抗（参照抗体说明书的推荐稀释比），将完全浸没于二抗的样片放于湿盒中室温孵育1 hr（避光）或4℃过夜。
- 用PBS清洗样片，洗涤3次，每次5 min。
- 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）。
- 用PBS清洗样片，洗涤2次，每次5 min。
- 滴加封片剂，确定样品在盖玻片与载玻片之间。
- 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	封闭时间不当	封闭时间应保持常温1 hr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 hr
	抗体孵育温度不当	25-30℃孵育时间1-2 hrs，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
染色深	滤光片选择不合适	更换滤光片
	封闭时间不当	封闭时间应保持常温1 hr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 hrs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。



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℃ 500 g 离心 5 min 后弃上清; 预冷 1 x PBS 洗细胞 1-2 次, 4℃ 500 g 离心 5 min 并弃上清。
- 裂解: 加入含蛋白酶抑制剂的预冷裂解液, 用枪头吹散, 冰浴 40 min。
- 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℃ 10000 g 离心 20 min, 取上清测蛋白浓度, 剩余按 400 μl/管分装于 1.5 ml EP 管中, 冻存于 -80℃ 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 制样

1. 柱式纯化法 (配合使用 Proteintech 免疫沉淀试剂盒)

- 根据实验需要, 取 -80℃ 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 + 15 μl 100mM PMSF + 7.5 μl 200 mM Na₃VO₄。
- 加入 3-5 μg 一抗, IP 阴性对照用同种属来源的 IgG, 4℃ 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), 用孵育液洗涤 5 次 (350 g 约 20 sec 静置 2 min, 最后孵育液留约一定量用于重悬 beads)。

捕获抗体	Beads
兔抗体	Beads-Protein A
小鼠 IgG2a	
小鼠 IgG2b	
小鼠 IgG3	
小鼠 IgG1	Beads-Protein G

▲ 免疫沉淀中 beads 的选择

- 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, 4℃ 旋转 4 hrs。
- 现配洗涤液, 每个样洗涤 5-6 次 (自然滤干), 待最后一次洗涤时, 用吸耳球加压滤干、洁净纸擦干水渍、加堵帽封上。
- 新取 1.5 ml EP 管, 编号, 每管加 10 μl 碱中和液和 25 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℃, 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℃ 备用。

2. 煮沸法

- 根据实验需要, 取 -80℃ 相应的 lysate 若干管, 每管裂解液 (约 400 μl, 1-4 mg 总蛋白) 加 320 μl 孵育液 (含蛋白酶抑制剂 P/V 液)。
- 加入 3-5 μg 一抗, 4℃ 旋转过夜。
- 取一定量 Protein A sepharose beads (一般每个样 50-100 μl), 用孵育液洗涤 5 次 (350 g 离心 20 sec, 静置 2 min, 最后孵育液留一定量用于重悬 beads)。
- 向步骤 b 中每管抗原-抗体混合物中, 加入 50 μl 洗涤好的 beads-proA, 4℃ 旋转 4 hrs。
- 现配洗涤液, 按 4-5 次/管进行洗涤 (100 g 离心约 10 sec, 静置 2 min), 最后一次洗涤液约留 50 μl。
- 每个 EP 管中加入 50 μl 2 x sample buffer 震荡混匀数秒, 100℃ 沸水浴 10 min。
- 4℃, 9000 g 离心 3 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℃ 备用。

SDS-PAGE电泳

◆ 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。

◆ 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℃煮沸 5 min，再恒压电泳约 1.5 hrs（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

裂解液(1000 ml)		孵育液(1000 ml)		5 X Sample buffer(200 ml)		洗脱液(500 ml)	
NaCl	8.76 g	KCl	0.2 g	SDS	30 g	NaCl	14.6 g
脱氧胆酸钠	5 g	KH ₂ PO ₄	0.2 g	甘油	70 ml	Gly	5.625 g
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	加ddH ₂ O至500 ml, 调pH至 2.0	
Tris	6 g	NaCl	8 g	溴酚蓝	0.1 g	洗涤液	
EDTA-2Na	1.86 g	EDTA-2Na	1.86 g	加 ddH ₂ O 至 150 ml		1 X TBS中加入终浓度 1 mM PMSF	
NaF	0.42 g	NaF	0.42 g	加 β-巯基乙醇至200 ml(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		加ddH ₂ O至1000 ml, 调pH至 7.2-7.4					

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。见本手册“免疫印迹 - 裂解液的选择”部分。

2. 根据蛋白质分子量大小的不同，选择合适的实验条件

a. 制样方法

推荐使用过柱纯化（洗脱法），背景更干净。煮沸法适合分子量不小于50 kDa的靶蛋白，洗脱法适合所有大小的靶蛋白。

b. 转膜时膜的选择

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

c. 转膜电流大小

一般分子量大于等于 50 kDa 可用 180 mA 转膜 90 min（按一个转膜槽计算），分子量小于 50 kDa 宜减小电流，可用 150 mA 转膜 90 min。

3. 抗体捕获beads的选择

Beads-proteinA 适合一般兔多抗和鼠单抗（IgG2a/2b/3 亚型），beads-proteinG 则适合鼠单抗（IgG1 亚型）。（参见上述“免疫沉淀中 beads 的选择”）

★ 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	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（HRP-标记抗小鼠IgG二抗作备选）； 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	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。
兔多抗	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		
	兔多抗	1、HRP-标记Protein A 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； 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。

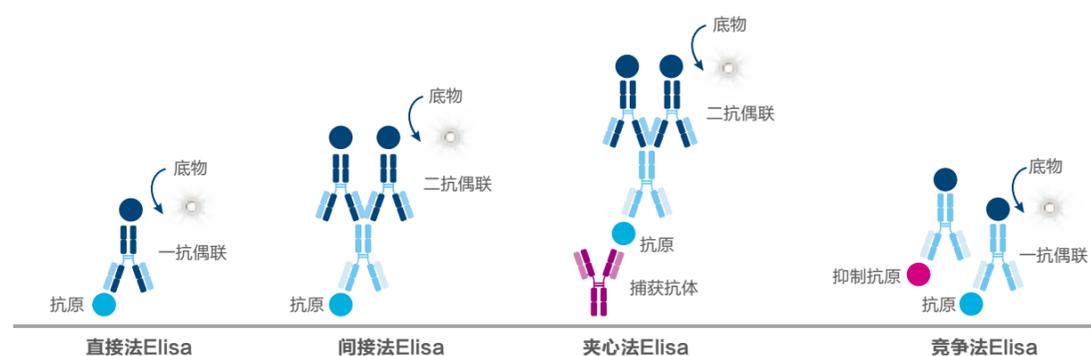
免疫沉淀疑难解析

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	将PVDF膜重新TBST略洗几次，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	上样量过大	可减小上样量、提高一抗稀释度并缩短曝光时间
	上样量过小	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	一抗孵育时间过长或浓度过高	4℃封闭过夜，一抗孵育1 hr，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完整结构靶蛋白 该蛋白浓度极低，导致捕获过程不仅未起到富集作用，反而因为洗涤操作，使靶蛋白损失殆尽，最后几乎无靶蛋白被洗脱下来；或lysis buffer过强；或选用了不正确的beads；或一抗亚型为 IgM 或 IgA	

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 ELISA。其中直接法和竞争法应用较少, 应用较多的主要是双抗夹心法 ELISA 以及间接法 ELISA。



▲ ELISA 原理

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

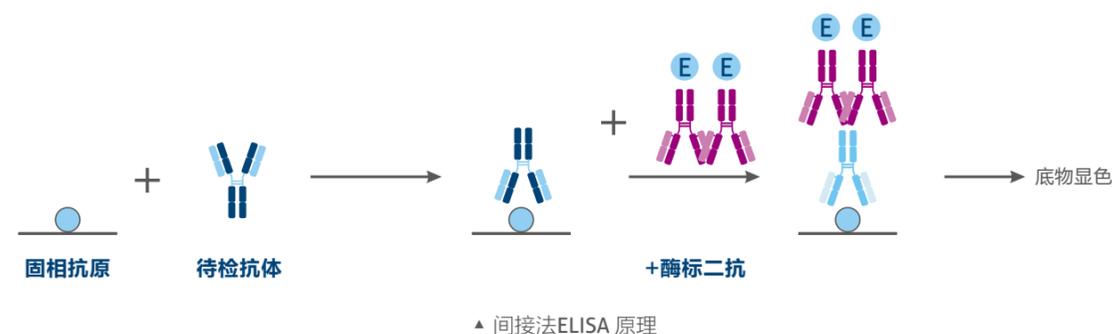
1. 包被抗原: 用碳酸盐缓冲液(CBS)或者磷酸盐缓冲液(PBS)将抗原浓度稀释到0.2-20 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl /孔包被, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 hrs或者4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
2. 洗板: 弃孔内液体, 甩干, PBS+0.05%Tween-20洗板3次, 每次浸泡1-2 min, 300 μl /孔, 甩干 (也可轻拍将孔内液体拍干)。
3. 封闭: 含1%BSA或者5%脱脂牛奶的PBST(PBS+0.05% Tween-20)做封闭液, 200 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 hrs。
4. 洗板, 同步骤2。
5. 加酶标一抗: PBST做稀释液, 将抗体梯度稀释, 例如: 1:500、1:5000、1:50000, 100 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 hr。
6. 洗板, 同步骤2。
7. 每孔加TMB显色液100 μl , 室温避光显色15-20 min, 若颜色偏淡, 可放在37 $^{\circ}\text{C}$ 显色, 不超过30 min。
8. 每孔加终止溶液100 μl , 此时蓝色变为黄色。
9. 在加终止液后, 立即用酶标仪在450 nm波长测量各孔的吸光度 (OD值)。
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。但是直接 ELISA 实验的应用范围有限, 原因在于: 缺少放大系统, 灵敏度较差。

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。



▲ 间接法ELISA 原理

◆ 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 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl /孔包被, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 hrs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, 300 μl /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 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 hrs。
4. 洗板, 同步骤2。
5. 加一抗: PBST做稀释液, 将抗体梯度稀释, 例如: 1:500、1:5000、1:50000, 100 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 hr。
6. 洗板, 同步骤2。
7. 加二抗: PBST做稀释液, 稀释二抗 (1:2000到1:20000 根据实验条件而定), 100 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 hr。
8. 每孔加TMB显色液100 μl , 室温避光显色15-20 min, 若颜色偏淡, 可放在37 $^{\circ}\text{C}$ 显色, 不超过30 min。
9. 每孔加终止溶液100 μl , 此时蓝色变为黄色。
10. 用酶标仪在450 nm波长依序测量各孔的吸光度 (OD值), 在加终止液后立即进行检测。
11. 结果判断。

双抗夹心法 ELISA

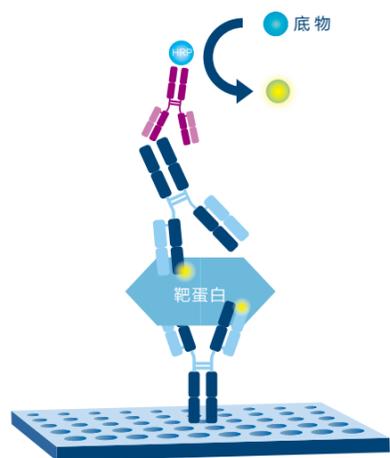
◆ 原理

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。

◆ 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。

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稀释度，100 μl/孔包被，37℃ 2 hrs 或者4℃过夜。
2. 洗板：弃孔内液体，甩干，PBST(PBS+0.05% Tween-20)洗板2次，每次浸泡1-2 min，300 μl/孔，甩干（也可以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，300 μl/孔，37℃ 2 hrs。
4. 洗板：同步骤2。
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 μl，余孔分别加标准品或待测样品100 μl。（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。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：弃孔内液体，甩干，PBST(PBS+0.05% Tween-20)洗板4次，每次浸泡1-2 min，300 μl/孔，甩干（也可以轻拍将孔内液体拍干）。
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 μl/孔，37℃ 1 hr。
8. 洗板：同步骤6。
9. 加二抗：根据实验需要，将二抗用PBST稀释到一定的稀释度，100 μl/孔，37℃ 1 hr。
10. 洗板：同步骤6。
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）。在加终止液后立即进行检测。
12. 结果判断：
 - a. 每个标准品和样品的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浓度，再乘以稀释倍数。



▲ 双抗夹心法原理

酶联免疫吸附疑难解析

问题	可能的原因	解决方法
阴性对照产生了阳性的结果	试剂或者耗材污染	更换试剂，使用一次性耗材
	洗板不充分	更换更强配方的洗涤液，增加洗板次数，延长洗板时间
	如果是在双抗体夹心法中出现，有可能是包被抗体与二抗间有交叉反应	更换包被抗体或二抗
	使用了过多的抗体	减少抗体使用量
整板出现高背景	二抗产生了非特异性吸附	减少二抗使用量，缩短二抗反应时间
	显色液不新鲜	使用现配的显色液
	显色反应时间过长没有终止	控制显色反应时间，及时终止反应
	试剂或者耗材污染	更换试剂，使用一次性耗材
	反应温度过高导致的非特异性吸附	严格控制反应在最适温度下进行
	封闭条件不佳导致的非特异性吸附	更换封闭能力更强的封闭液，延长封闭时间
反应信号偏低	包被条件不合适	提高包板浓度，延长包板时间
	抗原抗体反应不够充分	延长反应时间，确保反应在最适温度下进行
	显色液配方不恰当	增加显色底物的量
	二抗结合不够	提高二抗浓度，延长反应时间，更换效果更好的二抗
梯度稀释做ELISA时产生跳孔现象	酶标板叠放导致传热不均匀，各孔反应温度有差异	尽量避免酶标板叠放在一起
	移液器稀释时未能保持连续性	定期校准移液器，确保移液器的正确使用
	反应溶液蒸发	酶标板用封条密封或者加盖
	洗板不均匀	确定洗板机能够正常工作
	酶标板底有杂物或者水珠	读板时清理干净酶标板底部

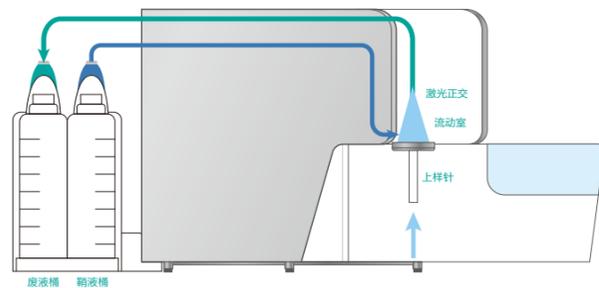
第六章 流式细胞技术(Flow Cytometry, FC)

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 (如微粒、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

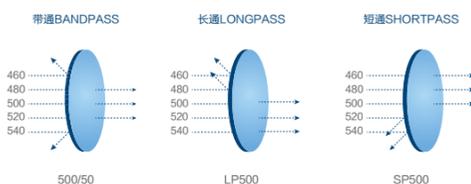
光信号分为散射光信号和荧光信号, 是流式细胞仪的关键。光路系统始于激光器, 不同激光器发出的激光照射到细胞后产生的光信号会经过不同的光路系统被不同的通道接收。

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

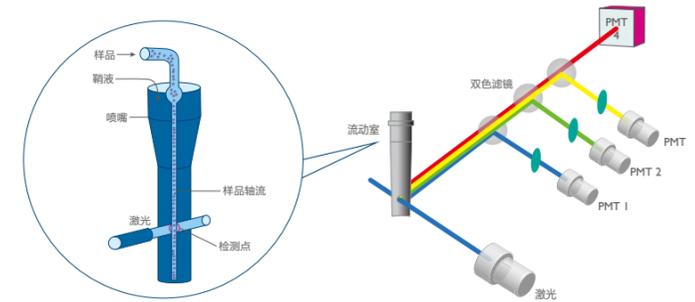
另外, 流式细胞仪的光路系统由一系列透镜、滤光片和小孔组成, 根据不同的波长将光信号进行分离。其中滤光片最为重要, 按照功能滤光片可以分为长通滤光片、短通滤光片和带通滤光片三种。



▲ 滤光片类型

监测分析系统

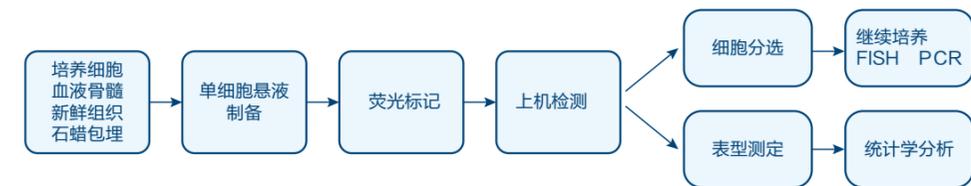
流式细胞仪的检测分析系统需要将细胞的各个通道的光信号分析汇总然后得出样品中的细胞的物理化学特征。光电倍增管能将光信号转变为电子信号, 同时通过一定的比例将信号放大。通道这个概念是和光电倍增管紧密联系在一起, 可以说流式细胞仪有多少个光电倍增管就有多少个通道, 一个光电倍增管实际上就是一个通道。



▲ 监测分析系统

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。

流式细胞术的基本操作和技巧



▲ 流式细胞术基本步骤

◆ 样品制备

流式细胞术的实验检测对象是单细胞悬液。在组织化学和免疫组织化学实验中欲对待测样品细胞进行分类计数, 通常需把样品制备成细胞悬液, 并要求被检细胞大小为 0.2-80 μm, 每个样品中至少有 20000 个细胞, 细胞浓度为 10⁵-10⁷ 个 / ml。制备成的单细胞悬液经荧光或免疫荧光标记即可上机检测。

1. 独立细胞样品制备

如果是悬浮细胞 (贴壁细胞需要用胰酶消化 2-3 min 显微镜观察细胞有脱落趋势就立刻弃去胰酶), 则直接收集细胞于离心管中, 离心沉淀细胞, 然后用 PBS 重悬, 取适量细胞于 EP 管中, 标记相应荧光素偶联抗体然后上样分析。

如果是外周血, 对于不含中性粒细胞的外周单个核细胞, 采用 Ficoll-hypaque 密度梯度离心法。如果是包括中性粒细胞的外周白血细胞, 可采取红细胞裂解液裂解红细胞的方法, 再多次低速离心去除红细胞碎片。

如果研究的对象是胸水、腹水、脑脊液等体液内细胞, 则只需将体液标本离心, 弃上清后用 PBS 重悬, 就可以标记荧光素偶联抗体, 然后上样分析。

2. 实体脏器样品制备

先将脏器剪碎后用胰蛋白酶或胶原酶消化组织块, 胰蛋白酶适用于消化细胞间质较少的软组织, 如胚胎、上皮、肝、肾等组织。胰蛋白酶工作浓度一般为 0.1%-0.5%。对于纤维较多的组织或较硬的癌组织常用 0.25% 胶原酶, 胶原酶对组织中胶原蛋白类结构消化作用强, 它仅对细胞间质有消化作用而对上皮细胞影响不大。胶原酶常用剂量为 0.1-0.3 μg/ml。用大于组织量 30-50 倍的胰蛋白酶液或胶原酶液在 37℃ 条件下消化组织, 需每隔一定时间摇动一次。消化时间的长短依组织类型而定, 一般来说, 胰蛋白酶需作用 20-60 min, 胶原酶需 4-48 hrs。在消化过程中, 如发现组织块已分散而失去块状形状, 经摇动即可成为絮状悬液, 则可取出少量液体在显微镜下观察, 可见分散的单个细胞和少量的细胞团, 可认为组织已消化充分。

🔗 固定试剂不一样，后续操作大不同

细胞固定是为了在保持细胞形态和结构完整的前提下使抗原固定，同时方便抗体与细胞膜或者其他亚细胞结构组充分接触。固定剂可快速穿过细胞质膜，并将细胞中的生物大分子固相化，从而使死细胞的结构接近原生活状态，方便后续抗体抗原的结合以及检测。

固定试剂主要有 2 类：

1. 变性试剂：通过将蛋白变性再固定在细胞结构上的有机溶剂，如 90% 甲醇、70% 乙醇等，变性试剂一般与细胞膜磷脂双分子层有相互作用，因此同时具有破膜作用。如果采用变性试剂固定细胞，而抗体用来标记胞内蛋白，则不需要另外破膜。
2. 交联试剂：通过自由氨基基团使蛋白分子交联起来固定蛋白，如 4% 多聚甲醛、10% 福尔马林溶液等，如果采用交联试剂固定细胞，而抗体用来标记胞内蛋白，则需要另外破膜。

◆ 荧光标记

1. 直接标记和间接标记

直接免疫染色指的是细胞与直接偶联有荧光染料的一抗孵育。

间接染色指的是细胞与没有偶联荧光素的一抗孵育后再与带有荧光素标记的二抗进行孵育检测。

2. 细胞内标记和检测分泌蛋白

细胞内标记需要固定、通透等步骤，分泌型蛋白需要使用高尔基体阻断剂，例如 Brefaldin A。细胞与 Brefaldin A 孵育后，可以使表达后的蛋白停留在高尔基体内，然后采用胞内蛋白的检测方法即可。如果需要同时标记细胞膜和细胞内抗原，则首先标记表面抗原，再对胞膜和核膜进行固定破膜后再标记胞内或核内抗原。

◆ 荧光素的选择

不同的荧光素有不同激发光和发射光，所以在利用流式分析时可以利用不同波长荧光的荧光素进行标记。

荧光素	中文名	激发光波长/nm	发射光波长/nm	基本用途
FITC	异硫氰酸荧光素	488	525	抗原分子检测
PE	藻红蛋白	488	575	抗原分子检测
PE-TxRed	藻红蛋白德克萨斯红	488	612	抗原分子检测
PerCP	多甲藻叶绿素蛋白	488	677	抗原分子检测
PE-Cy5	藻红蛋白-花青素5	488	670	抗原分子检测
PE-Cy7	藻红蛋白-花青素7	488	770	抗原分子检测
APC	别藻青蛋白	650	660	抗原分子检测
APC-Cy7	别藻青蛋白-花青素7	647	774	抗原分子检测
CFP	蓝色荧光蛋白	408	475	指示蛋白
GFP	绿色荧光蛋白	488	507	指示蛋白
YFP	黄色荧光蛋白	488	527	指示蛋白
Alexa Fluor 488	--	495	519	稳定的绿色荧光素，可替代FITC
Alexa Fluor 647	--	650	665	与APC共用一个荧光通道，荧光较稳定
Alexa Fluor 750	--	702	723	可以替代Cy7，荧光较稳定

▲ 流式细胞术常用荧光素

◆ 对照设置

对照的设置，特别是阴性对照的设置，是流式细胞术中非常重要的一个步骤，每次流式分析时都必须设置阴性对照。

1. 阴性对照

除了荧光素能够在激光激发下产生荧光，细胞表面的一些分子或者结构也能产生荧光，这种荧光相对于荧光素产生的荧光很弱，而且与细胞表面的特异抗原分子没有相关性，这种荧光被称为非特异性荧光。通常使用偶联了荧光素的同型对照作为阴性对照，例如 IgG1-PE。

这种同型对照因为不能与细胞表面抗原分子结合，所以细胞表面不会结合有 IgG1-PE，最后得到的荧光信号也不是 PE 荧光素产生的特异性荧光信号，仅仅只代表本身的非特异性荧光，此对照可用于排除荧光素的影响。

2. 阳性对照

设置阳性对照是为了在使用某种荧光素偶联抗体前检测该抗体是否有效。一般在使用新的荧光素偶联抗体，且该抗体之前未使用过，或者虽然使用过但是批号不同时，需要设置阳性对照，对于储存时间较长的荧光素偶联抗体也可设置阳性对照。

◆ 操作步骤

1. 选择生长状态良好的细胞，收集并计数。
2. 90%冰甲醇固定20 min，-20℃保存（或以10%福尔马林溶液固定20 min，再以0.2% Triton 通透5分钟）。
3. 固定完成的细胞离心，PBS洗两遍，3%BSA封闭1 hr，每0.5 hr混匀一次。
4. 细胞离心，PBS洗一遍，再加入适量的PBS混匀，每管样品分 1×10^6 细胞，加入0.2 μg抗体，做好阴性对照，体积补齐到150 μl，室温孵育2 hrs，每隔0.5 hr混匀一次，使细胞上的抗原与抗体充分接触。
5. 离心弃去上清，PBS洗两遍，在光线较暗的房间取荧光素标记的二抗，按照1:1500的比例稀释，每孔150 μl，在暗室中室温孵育1 hr，每0.5 hr混匀一次。
6. 离心弃去上清，PBS洗一遍。加入150 μl的PBS混匀准备上机。

流式细胞术疑难解析

效果	原因	解析
膜相关蛋白检测无阳性信号	贴壁细胞消化过程中膜蛋白损伤	建议使用0.03% EDTA溶液进行消化减少膜蛋白损失
胞内蛋白无阳性信号	细胞没有进行破膜处理，导致大分子抗体无法进入细胞	使用甲醛或多聚甲醛进行固定后可以0.1% Triton 进行通透，或以70%乙醇或90%甲醇固定不需额外通透
实验组信号与对照组重叠	样品未进行封闭	以适当 3% BSA或样本相同种属无特异性反应IgG溶液进行封闭
	一抗或二抗浓度过低	调整一抗或二抗浓度
对照信号强于实验组	同型对照IgG可能与细胞中某些蛋白存在交互反应	建议使用空细胞做阴性对照或换一个同型对照

第七章 Humankine® 人源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°C 或 -80°C 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附于管壁或管盖上，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。

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）。

②. 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。

③. 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。

④. 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°C 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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 $10\ \mu\text{g/mL}$ ，然后分装冻存于 -20°C 至 -80°C 。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。





The Experimental Technical Guide



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