



Antibodies | ELISA kits | Proteins

Proteintech 实验技术手册

第三版

www.ptglab.com

关于我们

Proteintech Group, Inc. 于 2002 年在美国芝加哥成立，作为专业的抗体生产商，Proteintech 一直致力于抗体、蛋白、ELISA 试剂盒以及相关产品的研发、生产和销售，并力争成为生物技术领域最优秀的产品供应商和生命科学工作者最信赖的朋友，为生命科学研究提供更多可能性。

只做最值得您信赖的产品

抗体 · Antibodies

全蛋白优质抗原
RNA干扰技术验证
检测数据皆可追溯与重复
覆盖人类基因组2/3靶标

ELISA试剂盒 · ELISA kits

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

蛋白 · Humankine® Active Proteins

HumaXpress®人源细胞表达系统专利
天然生物活性
无标签\无载体\无动物成分
GMP级别

您的成功才是我们的成功

超过48,000次的SCI文献引用

超过550次被Cell、Nature、Science文献引用

55次产品引用文献荣登顶尖期刊封面

已完成针对人类基因组2/3靶标的抗体
超过 48000 次SCI文献引用

Proteintech抗体引用文献55次荣登顶尖期刊封面



2019 年获得 CiteAb“免疫学 - 明日之星”



2016 年获得 CiteAb“最佳抗体验证开拓奖”



2014 年获得 ISO9001 及 ISO13485 认证

目 录

第一部分 基础理论

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	13
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	18
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 (Immunochemistry)	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	34
4. ELISA 试剂盒疑难解析	35
第六章 流式细胞技术 (Flow Cytometry, FC)	36
1. 液流系统	36
2. 光路系统	36
3. 监测分析系统	37
4. 流式细胞术的基本操作和技巧	37
第七章 Humankine® 人源蛋白的溶解注意事项	40
第八章 实验室常见化学试剂介绍	41

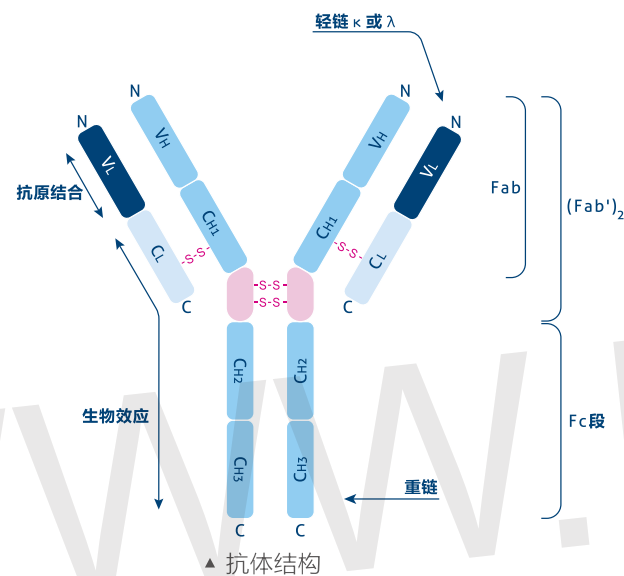
第一部分 基础理论

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。

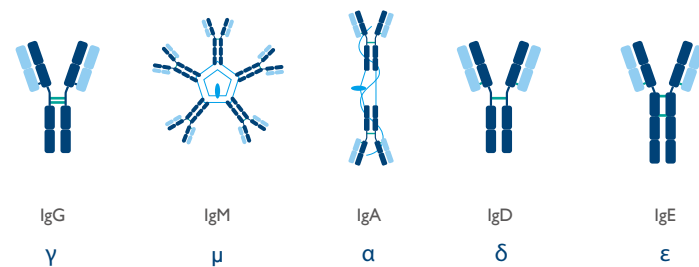
抗体的结构与特征

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, 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 i 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, 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 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
结构或存储稳定性	好	大部分易受理化条件影响
*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。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，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。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，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-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) 可准确鉴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、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℃ 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，必要时可通过透析或超滤去除抗体中的叠氮化钠。



微信推文精选

基因及蛋白查询常用数据库

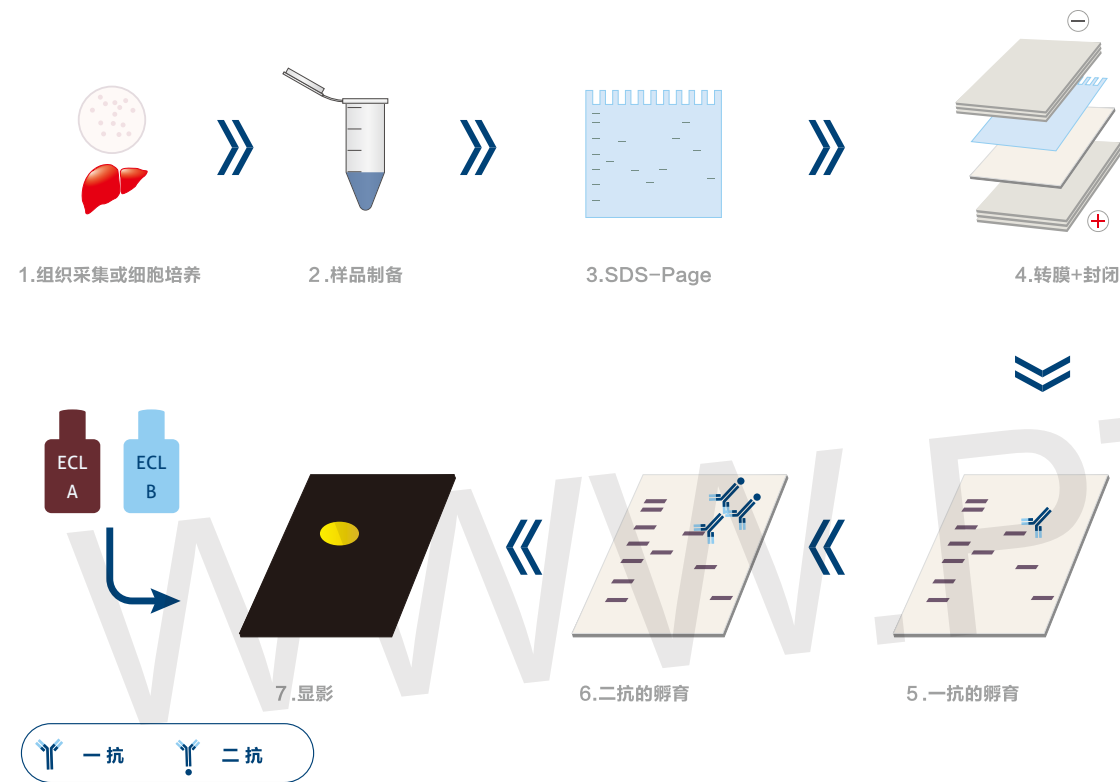


扫码阅读全文

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 操作步骤

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, 在做蛋白提取时有时可以用 6-8 M 尿素或 1 和 2 M 硫脲助溶。

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
金属蛋白酶抑制剂	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
其它	氨基肽酶抑制剂 天冬氨酸蛋白酶抑制剂 半胱氨酸蛋白酶抑制剂	bestatin pepstatin A E64	

▲ 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物, 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。值得注意的是二者均易受空气氧化影响, 建议现配现用。

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

5 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400 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 (原钒酸钠), PMSF 终浓度为 1 mM, 磷酸酶抑制剂 (原钒酸钠) 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。

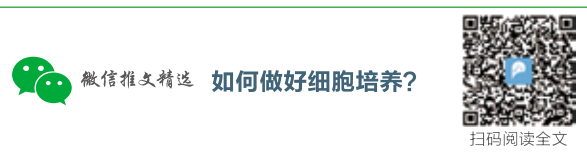
悬浮细胞 收集细胞, 在 4℃ 条件下 500 g 离心 5 min (最大离心力不超过 1000 g), 用手指把细胞用力弹散。

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。冰上超声, 180 w, 1-2 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)。

不管是悬浮细胞, 还是贴壁细胞或组织, 其裂解操作较一致: 加完裂解液后, 将细胞置于冰上 (但不要冻住) 使其充份裂解, 然后再冰浴超声以打断 DNA 分子, 取出少量以用于测定浓度, 其它均可加 Loading buffer 然后煮之, 离心弃去不溶物即可。(组织内经常富含结缔组织, 有些在常规裂解液中难以溶解, 因此不溶物通常比细胞样品多。)



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, 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。

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

2. 如何避免杂质干扰?

在蛋白提取中经常会混入一些杂质, 后期影响电泳分离效果。

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

▲ 蛋白提取中的常见杂质及处理方法



◆ 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。

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

- 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

- 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)
- 各孔加入200 μl BCA工作液,37℃放置20-30 min。
- 用酶标仪测定562 nm处的吸光度。
- 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

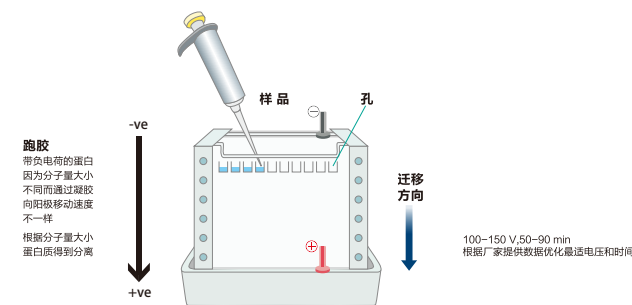
上样和电泳

◆ 电泳准备

1. 凝胶制备

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)。

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。



▲ 蛋白质电泳(SDS-PAGE)

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	20-100
8	30-200

▲ 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电泳适合分辨大分子物质,对于相对分子量小的,尤其是10 kDa以下的蛋白分辨率比较低,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 < 20 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 抗体检测使用的Tricine-SDS-PAGE系统和Tris-Gly系统电泳液配方如下:

Tricine-SDS-PAGE系统电泳液		Tris-Gly系统电泳液	
Tris	12.1 g (0.1 M)	Tris	3.03 g (0.025 M)
Tricine	17.9 g (0.1 M)	甘氨酸	18.7 g (0.25 M)
SDS	1.0 g (0.0035 M)	SDS	1.0 g (0.0035 M)
ddH ₂ O	加至体积1000 mL	ddH ₂ O	加至体积1000 mL
pH	8.3 (无需调)	pH	8.3 (无需调)

Proteintech三层胶配方

上层胶配方

试剂名	含量
2 × stacking buffer	1.5 ml
30% gel	0.4 ml
ddH ₂ O	1.1 ml
TEMED	3 μl
10% APS	30 μl

三层胶的下层胶和间隙胶

试剂名	Separation	Intermediate
Gel percentage	15 %	10 %
Gel volume	6 ml	1.5 ml
64% Glycerol solution	1 ml	-
ddH ₂ O	-	0.5 ml
30% gel	3 ml	0.5 ml
3.0M Tris.HCl(pH8.45)	2 ml	0.5 ml
10% SDS	60 μl	15 μl
10% APS	60 μl	15 μl
TEMED	6 μl	1.5 μl

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。

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. 内参对照

要用 Western Blot 比较不同条件下或者不同组织中，目的蛋白表达量的相对多少，前提条件是等量的细胞上样，才有比较的基础。当表达量不高时，上样量的差别就很可能影响结果的分析。所以严谨的 Western Blot 实验设计中要求有良好的参照体系，这对实验结果分析至关重要。

内参即是内部参照 (Internal Control)，对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白 (Housekeeping Proteins)，它们在各组织和细胞中的表达相对恒定，在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。在 Western Blotting 实验中，除了需要进行蛋白抽提、蛋白定量、等量蛋白上样电泳、转膜、靶蛋白抗体孵育、显色等步骤以外，还需要进行内参的检测，以校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。

🔍 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；在涉及细胞增殖相关实验中，c-Jun 由于自身表达变化就不适合做内参；在凋亡实验中，TBP、Lamin 等不适合作为核内参。因此在设计实验方案时应考虑这些因素的影响并查询相关文献，如果在实验过程中出现内参表达出现异常状况应及时分析原因并调整内参选择。

Proteintech公司提供优质而全面的内参抗体供您选择。

适用范围	名称	分子量	抗体种类	货号
胞浆或全细胞	GAPDH	36 kDa	鼠单抗	60004-1-Ig
			兔多抗	10494-1-AP
	β -Actin	42 kDa	鼠单抗	66009-1-Ig
			兔多抗	20536-1-AP
	α -Tubulin	50-55 kDa	鼠单抗	66031-1-Ig
			兔多抗	11224-1-AP
细胞核膜	β -Tubulin	50-55 kDa	鼠单抗	66240-1-Ig
			兔多抗	10094-1-AP
	Vinculin	117 kDa	鼠单抗	66305-1-Ig
细胞核	Lamin A/C	65-75 kDa	兔多抗	10298-1-AP
	Lamin B1	66-72 kDa	鼠单抗	66095-1-Ig
膜蛋白			兔多抗	12987-1-AP
	TBP	33-43 kDa*	鼠单抗	66166-1-Ig
			兔多抗	22006-1-AP
	PCNA	36 kDa	鼠单抗	60097-1-Ig
			兔多抗	10205-2-AP
	Histone-H3	15-17 kDa	兔多抗	17168-1-AP
线粒体	YY1	65-70 kDa	鼠单抗	66281-1-Ig
			兔多抗	22156-1-AP
细胞增殖	ATP1A1	97-110 kDa	兔多抗	14418-1-AP
			兔多抗	55187-1-AP
全血/血浆/血清	VDAC1/Porin	31-37 kDa	鼠单抗	66345-1-Ig
			兔多抗	10866-1-AP
	COX4I1	17-20 kDa	鼠单抗	66110-1-Ig
细胞增殖			兔多抗	11242-1-AP
	COX4I2	17-20 kDa	兔多抗	11463-1-AP
全血/血浆/血清	BrdU	—	鼠单抗	66241-1-Ig
	Transferrin	77 kDa	鼠单抗	66171-1-Ig
			兔多抗	17435-1-AP
	Albumin	66 kDa	鼠单抗	66051-1-Ig
		兔多抗	16475-1-AP	

*TBP在人类是37-43 kDa，在小鼠和大鼠是33-36 kDa

微信推文精选 如何解释 β -actin 的两条带?



扫码阅读全文

◆ 蛋白处理

1. 变性, 还原蛋白样本

为了使抗体接近抗原表位, 必须将蛋白质的三维构型打开, 将蛋白质变性, 同时让蛋白质泳动速度仅与蛋白质分子量成正比, 而与形状和结构无关。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°C 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。

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。

◆ 上样及电泳

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



▲ 电泳以Bio-rad微型垂直电泳槽为例

转膜

◆ 蛋白转膜

1. 膜的选择

免疫印迹中常用的固相材料有 NC 膜、DBM、DDT、尼龙膜、PVDF 膜等。Proteintech 推荐选用 PVDF 膜 (聚偏二氟乙烯), 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 Tricine 胶 (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。

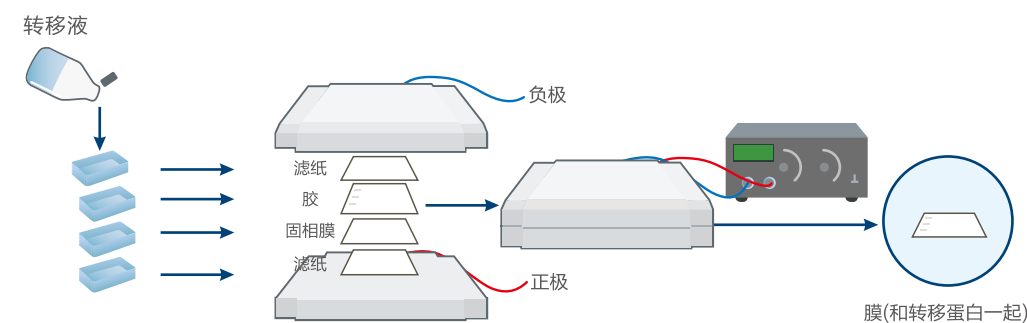
湿转用于检测 30-100 kDa 分子量蛋白质时通常采用恒流法: 180 mA, 90 min。

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, 当转移小分子量蛋白或是 Tricine 胶 (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: 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。

超大/超小分子量蛋白质分离技巧

对于大分子量蛋白质 (> 150 kDa) 转膜, 建议采用湿法转移过夜 (4℃最佳), 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 Tricine 胶 (三层胶), Tricine 胶 (三层胶) 分别是浓缩胶, 夹层胶和分离胶, 其中夹层胶的作用是阻挡一些大分子量的蛋白质, 从而使小分量的蛋白质或者肽段能够在分离胶内得到更好的呈现。

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

注意:

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

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 TBST 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 (或 BSA), 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。

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% 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℃ 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 或 37℃ 孵育 1-1.5 hrs, 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, 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 甚至多色荧光 WB 检测。

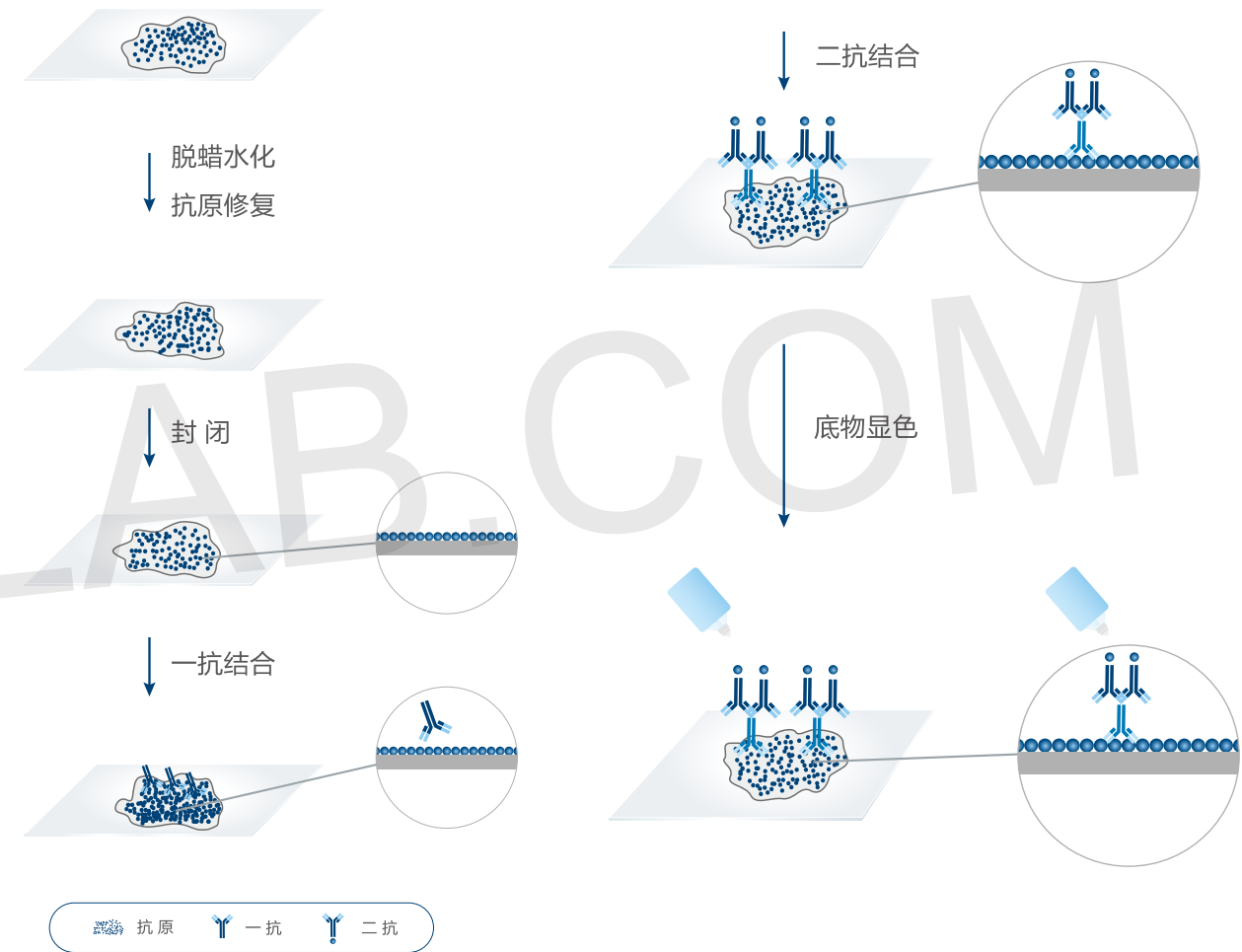
免疫印迹疑难解析

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



第二章 免疫化学(Immunochemistry)

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



▲ 免疫组织化学操作步骤

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。

◆ 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. 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, 比如柠檬酸钠修复缓冲液 (pH 6.0) 不但成本低, 且染色背景清晰, 易于保存, 还不易引起组织块脱落。但是, 像 CD3、p53 等需要使用 EDTA (pH 8.0) 液或 Tris-EDTA 缓冲液 (pH 9.0) 来修复。

3. 染色

- 取出切片, 用去离子水浸洗3次, 每次1 min;
- 洗净后, 将切片浸入装有3% 双氧水的溶液中, 盖上盖子, 室温密闭下, 浸泡10 min;
- 取出切片, 将切片用去离子水浸洗3次, 每次1 min;
- 甩干、擦净, 滴加适量3% BSA, 室温封闭1 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1% CuSO₄ (无水) 溶液室温5 min。
- 滴加一滴Mayer's 苏木素 (hematoxylin), 复染1.5-2 min, 用TBS溶液冲洗干净, 然后在TBS溶液中浸泡5-10 min;
- 用去离子水浸洗3次, 每次1 min。

4. 脱水

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

5. 封片

从二甲苯 IV 号缸中取出切片, 沥干二甲苯, 然后用中性树胶封片。

6. 成像

结果观察, 图像采集与结果分析。

免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC)

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

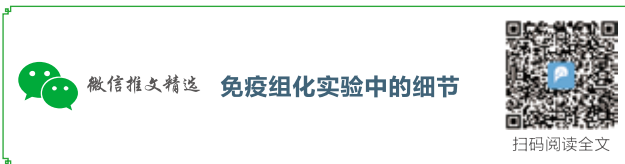
◆ 操作步骤

- 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。

9. PBS 冲洗 4-5 次, 每次 30 sec。
10. 甩干、擦净, 滴加适量 DAB 溶液, 2-5 min 后迅速用去离子水冲洗干净。(DAB 工作液现配现用)
11. 滴加一滴 Mayer's 苏木素 (hematoxylin), 复染 1.5 min-2 min, 用 PBS 溶液冲洗干净, 然后在 PBS 溶液中浸泡 5-10 min。
12. 用去离子水浸洗 3 遍, 每遍 1 min。
13. 脱水 (参考上述 IHC 操作)。
14. 封片 (参考上述 IHC 操作)。
15. 镜检 (参考上述 IHC 操作)。

免疫化学疑难解析

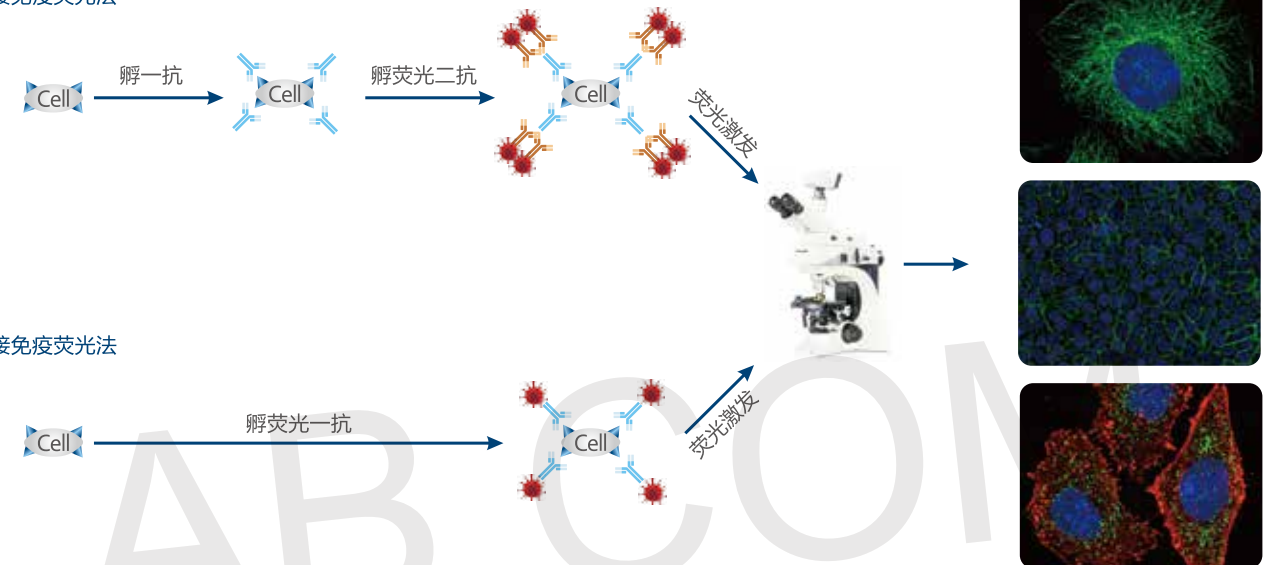
结果	原因	解析
染色过深	抗体浓度过高或者孵育时间太长	降低抗体浓度或减少抗体孵育时间, 室温 1 hr 或 4℃ 过夜
	孵育温度过高, 超过 37℃	孵育温度一般室温 20-28℃ 或 37℃
	DAB 显色时间过长或 DAB 浓度过高	显色时间不能超过 5-10 min, 以显微镜下观察为准
	一抗或二抗孵育前组织片干了	孵育盒保证水平放置, 防止孵育液外流, 保持孵育盒湿度, 加 DAB 之前防止干片
非特异性背景染色	冲洗不充分	适当增加冲洗次数或者延长冲洗时间, 但要注意不要过久, 防止冲掉组织切片
	切片脱蜡不彻底	使用新鲜的二甲苯或其替代品进行脱蜡
	组织中含过氧化物酶未阻断	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
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)
	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
水溶性原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	



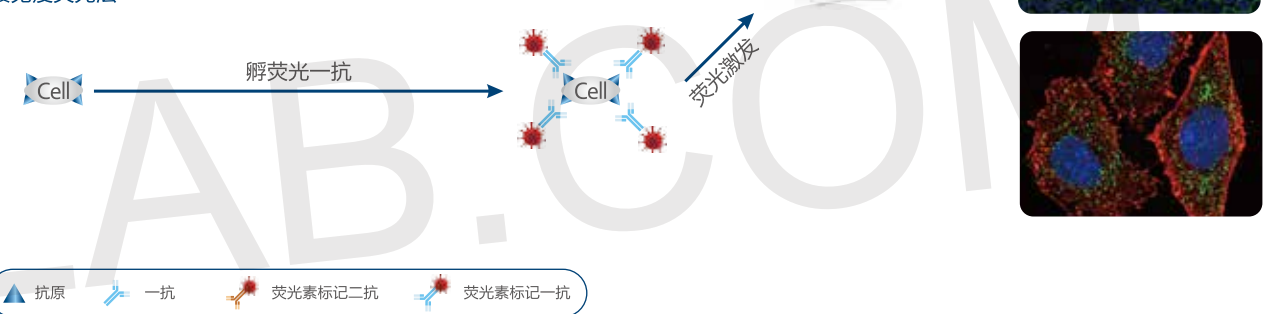
第三章 免疫荧光(Immunofluorescence, IF)

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。

间接免疫荧光法



直接免疫荧光法



▲ 免疫荧光操作步骤

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% 多聚甲醛或其他固定液常温固定 20 min, PBS 洗三次, 每次 3 min (固定方法不唯一, 具体可参考后续“细胞固定”部分)。
3. 在 0.2% 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

请参考 IHC 操作步骤 (P21)

2. 抗原修复

取适量的柠檬酸钠修复液 (pH 6.0) 或 Tris-EDTA 修复液 (pH 9.0) 于烧杯中 (修复液能没过切片架即可), 盖上盖子, 待修复液煮沸后, 将切片放入其中, 盖上盖子, 继续煮沸修复液 15 min。通风厨中自然冷却。

细胞固定

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

🔍 选好固定剂, 蛋白定位更清晰!

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

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

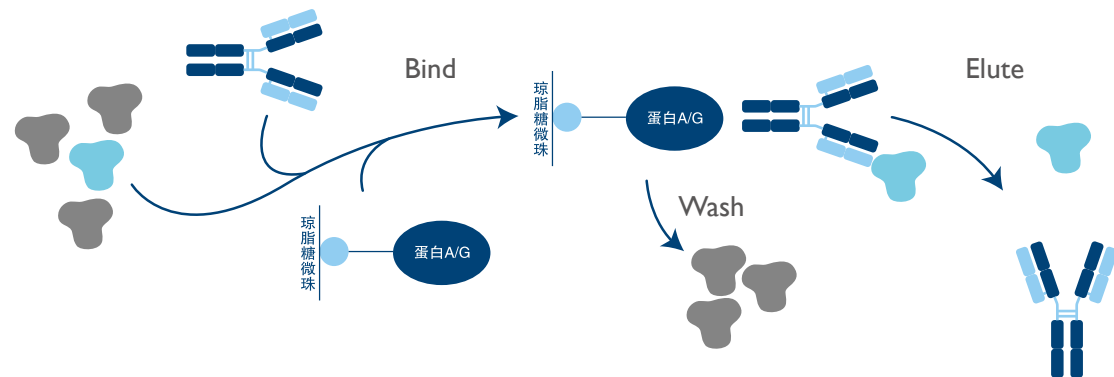
1. 将固定好的样片置于装有PBS的培养皿中清洗3次, 每次5 min。每次清洗后要用吸水纸将多余的液体吸去, 再在下一培养皿中清洗, 注意不要干片。
2. 封闭: 将样片置于干燥的培养皿内, 滴加3% BSA-PBS将样片完全覆没放于湿盒中, 室温1 hr或者4℃过夜。
3. 用吸水纸将多余BSA-PBS溶液吸去, 注意不要干片。
4. 在样片上滴加50-100 μl稀释后的一抗 (参照抗体说明书的推荐稀释比), 将完全浸没于一抗的样片室温孵育2 hrs或4℃过夜。
5. 用PBS清洗样片, 洗涤3次, 每次5 min。
6. 在样片上滴加50-100 μl标记有荧光素的稀释后的二抗 (参照抗体说明书的推荐稀释比), 将完全浸没于二抗的样片放于湿盒中室温孵育1 hr (避光) 或4℃过夜。
7. 用PBS清洗样片, 洗涤3次, 每次5 min。
8. 在样片上滴加50-100 μl的DAPI-PBS (1 μg/ml), 完全浸没于DAPI的样片放于湿盒中室温孵育5-10 min (避光)。
9. 用PBS清洗样片, 洗涤2次, 每次5 min。
10. 滴加封片剂, 确定样品在盖玻片与载玻片之间。
11. 用荧光显微镜观察。根据不同的染料选择不同波段的激发光。

免疫荧光疑难解析

效果	原因	解析
染色浅	封闭时间过长	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
	封闭时间过短	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。



▲ 免疫沉淀原理

操作步骤

◆ 样品裂解液的制备

1. 培养细胞裂解液的制备

- 收集细胞: 细胞刮收集细胞于离心管中, 4℃ 400-500 g 离心5 min后弃上清; 预冷1 x PBS洗细胞1-2次, 4℃ 400-500 g 离心 5 min并弃上清。
- 裂解: 加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的预冷裂解液, 重悬细胞, 冰上裂解30 min, 每10 min轻柔颠倒一次。
- 超声破碎: 冰浴超声破碎2 sec、停2 sec, 总时长1-2 min, 功率180 w。
- 冰浴继续静止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与制样

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+10-15 μl 100mM PMSF+10-15 ul 100 mM。
- 加入3-5 μg一抗, IP阴性对照用同型对照的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 (500 g 约20 sec 静置2 min, 最后加孵育液重悬beads至原体积)。

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

▲ 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), 待最后一次洗涤后, 500 g离心1 min, 弃尽残液, 加堵帽封上。
- 新取1.5 ml EP管, 编号, 每管加10 μl碱中和液和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1xPBS离心洗涤5次 (500 g离心20 sec, 静置2 min, 最后加孵育液重悬beads至原体积)。
- 向步骤 b 中每管抗原-抗体混合物中, 加入50 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 瞬间约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

1. 配胶

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

2. 点样电泳

将经过 IP 制备的样品取出, 同时与阴性对照、阳性对照裂解液 100℃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·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	1 X TBST中加入终浓度1 mM PMSF			
Triton X-100	10 ml	加ddH ₂ O至1000 ml, 调pH至7.2-7.4		取适量上述buffer, 补加25% β-巯基乙醇或25% DDT (2M母液, 现用现加)			
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。煮脱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100 kDa可用200 mA转膜100 min(按一个转膜槽计算), 分子量小于100 kDa宜减小电流, 可用160-180 mA转膜90 min。

3. 抗体捕获beads的选择

Beads-proteinA 适合一般兔多抗和鼠单抗(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 抗轻链或抗重链	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	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	目的蛋白或抗体用量过大	可减小上样量、提高一抗稀释度并缩短曝光时间
	目的蛋白或抗体用量过小	可增加上样量、降低一抗稀释度并延长曝光时间
背景杂乱厚重, 大片“黑区”, 导致无法分析	封闭不充分、一抗孵育时间过长或浓度过高	4℃封闭过夜; 提高一抗稀释度, 缩短孵育时间, 并可适当增加洗膜时间
Input泳道无目的带, 而IP泳道有	目的蛋白丰度不高, 无法直接Western blot检出, 而IP能进行浓缩富集	
Input泳道有目的带, 而IP泳道无	该种一抗主要识别和结合靶蛋白内部的线性表位、而非暴露在外表的线性或空间表位, 故IP制样时无法有效捕获住组织或细胞中的天然结构靶蛋白	
	该蛋白丰度极低, 导致捕获过程并未起到富集作用, 反而因为过多洗涤操作, 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; 或洗脱体积过大	



微信推文精选 免疫沉淀实验中的细节要点

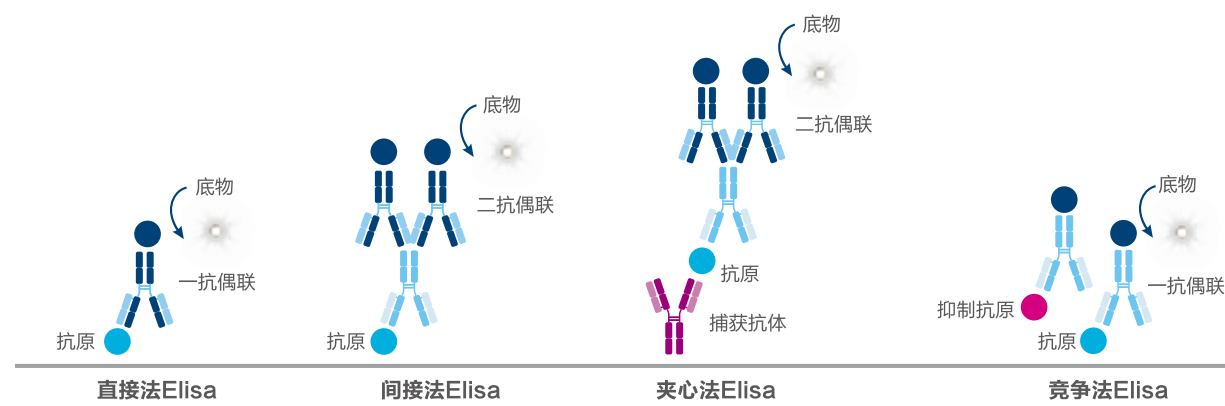


扫码阅读全文

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。在测定蛋白质等大分子时常用双抗夹心 ELISA 方法。



▲ 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

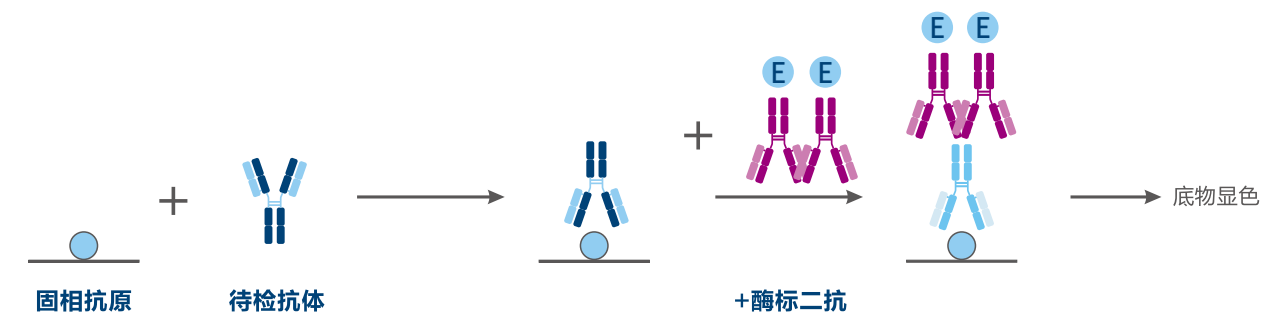
1. 包被抗原: 用碳酸盐缓冲液 (CBS) 或者磷酸盐缓冲液 (PBS) 将抗原浓度稀释到 $0.2-20 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$ /孔包被, 37°C 2 hrs 或者 4°C 过夜。
2. 洗板: 弃孔内液体, 甩干, PBS+0.05% Tween-20 洗板3次, 每次浸泡1-2 min, $350-400 \mu\text{l}$ /孔, 甩干 (也可轻拍将孔内液体拍干)。
3. 封闭: 含1% BSA 或者5% 脱脂牛奶的PBST (PBS+0.05% Tween-20) 做封闭液, $200 \mu\text{l}$ /孔, 37°C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

直接法 ELISA 由于操作简单, 仅需一步反应即可完成, 故对实验的干扰因素相对较少。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 $0.2-20 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$ /孔包被, 37°C 2 hrs 或者 4°C 过夜。
2. 洗板: 弃孔内液体, 甩干, PBST洗板3次, 每次浸泡1-2 min, $350-400 \mu\text{l}$ /孔, 甩干 (也可轻拍将孔内液体拍干)。
3. 封闭: 含1% BSA 或者5% 脱脂牛奶的PBST做封闭液, $200 \mu\text{l}$ /孔, 37°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, $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 1 hr。
6. 洗板, 同步骤2。
7. 加HRP标记的二抗: PBST做稀释液, 稀释二抗 (1:2000到1:20000 根据实验条件而定), $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 1 hr。
8. 每孔加TMB显色液 $100 \mu\text{l}$, 室温避光显色15-20 min, 显蓝色, 若颜色偏浅, 可放在 37°C 显色, 不超过30 min。
9. 每孔加终止溶液 $100 \mu\text{l}$, 此时蓝色变为黄色。
10. 以 630 nm 为校正波长, 用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD值)。在加终止液后5 min内进行读数。
11. 结果判断。

双抗夹心法 ELISA

◆ 原理

双抗体夹心法是检测大分子抗原最常用的方法。双抗夹心法 ELISA 是将特异性抗体结合到固相载体上形成固相抗体，然后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

A. 血清

全血标本自然凝集 30 min 后 1000 × g 离心 15 min，取澄清，即可检测。澄清可存放于 -20℃，避免反复冻融。

B. 血浆

可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 min 内于 2-8℃ 1000 × g 离心 15 min，或将标本放于 -20℃，避免反复冻融。（注意：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测）

C. 细胞上清

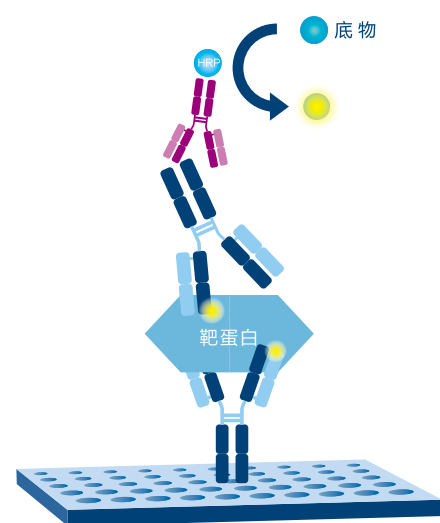
收集细胞培养液，离心取上清，-20℃存放，避免反复冻融。

D. 细胞裂解样本

1. 收集细胞后，用预冷的 10 mM PBS 洗 3 次，5000 × g 离心 5 min。
2. 细胞计数，离心弃上清；
3. 加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1 mM；
4. 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；
5. 4℃，10000 × g 离心 10 min；
6. 检测细胞裂解样本总蛋白浓度；
7. 整个过程需在冰上操作，防止蛋白降解。

E. 组织裂解样本

1. 加 PMSF 至细胞裂解液中，终浓度为 1 mM；
2. 预先将待检组织用剪刀剪碎，液氮研磨，再按每 100 mg 组织加 1 mL 裂解液，用研磨器进行研磨，得到的匀浆液可利用超声破碎处理；
3. 4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清，-80℃存放；
4. 检测组织裂解样本总蛋白浓度；
5. 整个过程需在冰上操作，防止蛋白降解。



▲ 双抗夹心法原理

F. 尿液

收集尿液后，1000 × g 离心 20 min，取上清，-20℃或者 -80℃存放，避免反复冻融。

G. 人乳

收集样本后，10000 × g 离心 15 min，取澄清部分，浑浊液再次离心，取澄清，收集澄清部分，-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。

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 h 或者 4℃ 过夜。
2. 洗板：弃孔内液体，甩干，10 mM PBST(10 mM PBS+0.05% Tween-20)洗板2次，每次浸泡1-2 min，350 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10 mM PBST(10 mM PBS+0.05% Tween-20)做封闭液，350-400 μl/孔，37℃ 2 h。
4. 洗板：同步步骤2。（备注：商品化的试剂盒一般已经预包被了包被抗体在酶标板上，不需要进行1-4步骤）。
5. 加样：分别设零孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 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-120 min。为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
6. 洗板：弃孔内液体，甩干，10 mM PBST（10 mM PBS+0.05% Tween-20）洗板4次，每次浸泡1-2 min，350-400 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 h。
8. 洗板：同步步骤6。
9. 加二抗：根据实验需要，将二抗用10 mM PBST稀释到一定的稀释度，100 μl/孔，37℃ 1 h。
10. 洗板：同步步骤6。
11. 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。
12. 结果判断：
 - a. 每个标准品和样本的OD值须减去零孔的OD值，如设置复孔，则应取其平均值；
 - b. 以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业制作曲线软件进行四参数拟合（4-PL），如 Origin、ELISACalc等，根据样品的OD值由标准曲线推算出相应的拟合浓度，再乘以稀释倍数即为样本的测定浓度。

ELISA 试剂盒疑难解析

重复平行孔结果不一致	
原因	解决方案
酶标板或样本等被唾液污染	操作过程中佩戴口罩
加不同样品时未更换吸头	使用新的吸头转移不同样品或试剂
包被了抗体的酶标板孔底被吸头刮擦	禁止吸头触碰孔底
移液器出现偏差	校准移液器
洗涤不充分	按说明书推荐的体积和浸泡时间充分洗涤
样品浑浊、不均匀	样本需要预处理，具体方法参阅操作手册
孔底脏污	检查板底，并擦拭干净
未使用封板膜	使用试剂盒提供的封板膜
标准曲线不理想	
原因	解决方案
标准品稀释操作不当	按照说明书推荐的稀释液稀释对应的标准品
不同批号，不同试剂盒的试剂混用（如样本稀释液、抗体稀释液）	每个试剂盒使用其对应的试剂
标准品移液等步骤中出错	仔细检查操作步骤，保证移液器正常工作，再次实验测定
拟合方式不恰当	优先选择四参数曲线拟合，其次是双对数拟合
显色弱或无	
原因	解决方案
试剂没有充分平衡至室温	检测之前，试剂平衡至室温
试剂盒组份储存不当	按照标签上温度储存所有组份
试剂过期	收到试剂盒后查看有效日期，不使用过期产品
读板波长设置不正确	使用TMB底物读取ELISA的正确波长为450nm，校正波长是630nm。推荐使用双波长读数。
显色底物失效	未使用过的TMB溶液为无色透明状，若已变蓝或浑浊表明该产品已被污染
实验加样顺序不正确，孵育条件不准确	检查实验步骤，重做实验
显色液或终止液使用不当	仅使用试剂盒中对应的显色液和终止液
信号很强/全板蓝色/标准曲线没有梯度	
原因	解决方案
显色底物被污染，加样前已变蓝	避光存放底物，确保底物加样前是无色透明状
加样槽不洁净，未用纯水冲洗	加样槽需要用纯水反复冲洗几次，避免其与显色底物反应
反复使用了封板膜	使用酶标二抗后务必更换新的封板膜
标准曲线理想但样本无信号	
原因	解决方案
样本中的待测物浓度低或不在标曲的检测范围	调整浓度，再次重复实验
样本的处理方式不恰当	参照试剂盒操作手册推荐的方式处理样本
样本不新鲜	取新鲜样本，避免反复冻融

微信推文精选 如何挑选及使用 ELISA 试剂盒?



扫码阅读全文

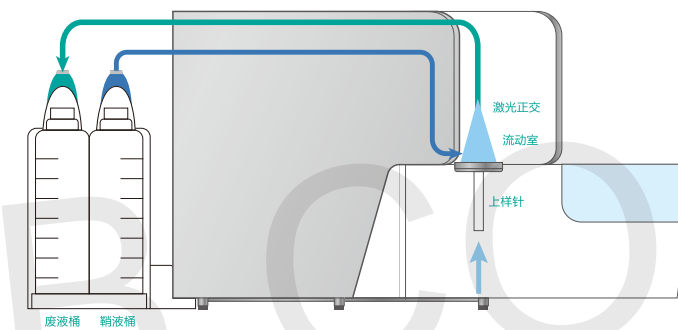
第六章 流式细胞技术(Flow Cytometry, FC)

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

液流系统

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

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

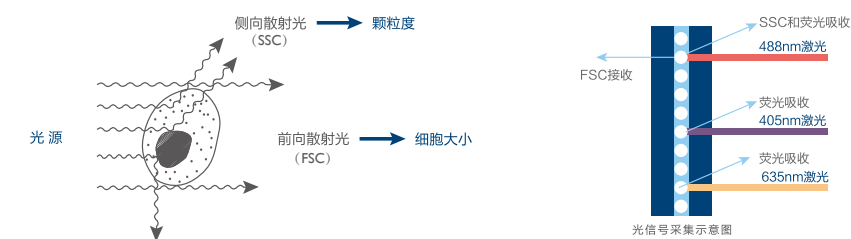


▲ 液流系统示意图

光路系统

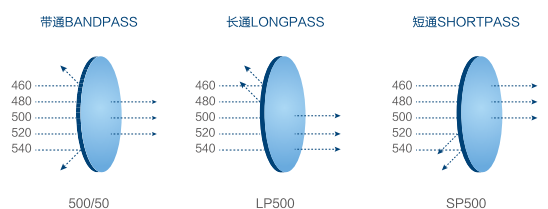
光信号分为散射光信号和荧光信号, 是流式细胞仪的关键。光路系统始于激光器, 不同激光器发出的激光照射到细胞后产生的光信号会经过不同的光路系统被不同的通道接收。

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



▲ 光路系统原理

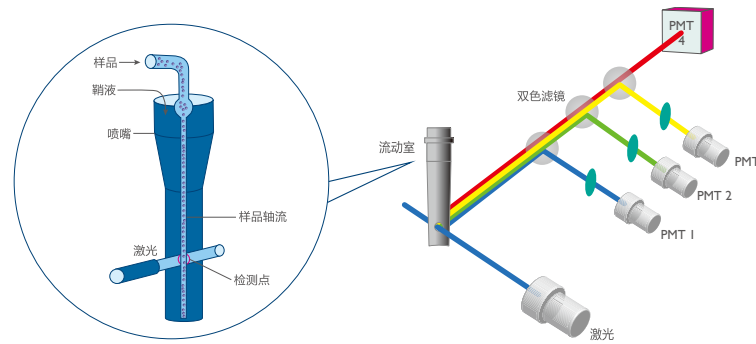
另外, 流式细胞仪的光路系统由一系列透镜、滤光片和小孔组成, 根据不同的波长将光信号进行分离。其中滤光片最为重要, 按照功能滤光片可以分为长通滤光片、短通滤光片和带通滤光片三种。



▲ 滤光片类型

监测分析系统

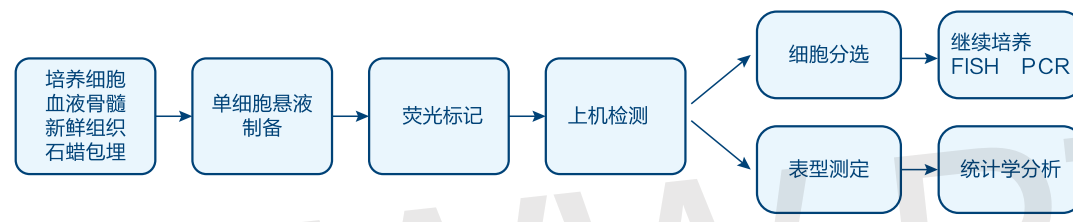
流式细胞仪的检测分析系统需要将细胞的各个通道的光信号分析汇总然后得出样品中的细胞的物理化学特征。光电倍增管能将光信号转变为电子信号，同时通过一定的比例将信号放大。通道这个概念是和光电倍增管紧密联系在一起，可以说流式细胞仪有多少个光电倍增管就有多少个通道，一个光电倍增管实际上就是一个通道。



▲ 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 10^5 - 10^7 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、脑脊液等体液中细胞，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 $\mu\text{g/ml}$ 。用大于组织量 30-50 倍的胰蛋白酶液或胶原酶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

◆ 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 Brefeldin A。细胞与 Brefeldin 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的激发光和发射光，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	报告基因
GFP	绿色荧光蛋白	488	507	报告基因
YFP	黄色荧光蛋白	488	527	报告基因
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

1. 空白对照

空白对照即不进行标记的细胞。有些细胞内物质会被激发而产生自发荧光，如肿瘤细胞、含颗粒较多的细胞或长期培养的细胞等有相对较强的自发荧光。

空白对照主要用于确定待测样本的基础荧光阈值或检测染色方法是否正确。

2. 阴性对照

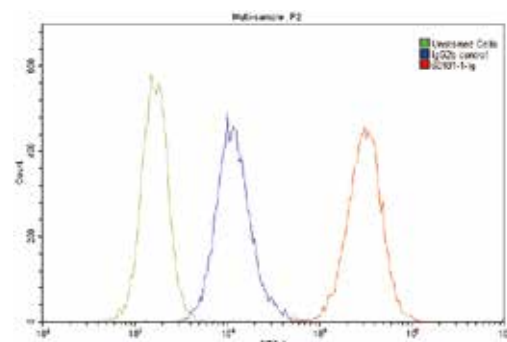
对照的设置，特别是阴性对照的设置，是流式细胞术中非常重要的一个步骤，每次流式分析时都必须设置阴性对照。而阴性对照中最重要的是同型对照的设置。

同型对照是与实验染色抗体特异性无关的免疫球蛋白亚型，用于排除由于抗体非特异性结合到细胞上而产生的背景荧光信号的干扰，以划定阴阳性细胞群的分界线。

同型对照需要选择与实验染色抗体相同种属、相同 IgG 亚型、相同轻链、相同荧光素偶联，另外使用时需要保证与实验染色抗体相同工作浓度而非相同稀释倍数。对于直标抗体染色标本，建议选择试剂公司提供的与抗体配套的同型抗体作为阴性对照；对

于间接免疫染色样本，设置以同型抗体作为一抗再加荧光二抗的平行管作为阴性对照。

(注：单核细胞、B细胞、DC细胞、NK细胞、巨噬细胞、粒细胞、肿瘤细胞等细胞高表达FcR，同型抗体与细胞高度结合，会造成基础阈值较高而影响实验的准确性，需要封闭FcR，避免出现假阴性的结果。)



绿色：未染色细胞

蓝色：Proteintech IgG2同型对照

红色：Proteintech CD3鼠单抗（货号：60181-1-Ig）

细胞个数： 1×10^6

一抗用量：0.2 ug/样

二抗：CoraLite488-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)

（货号：SA00013-1） 稀释度1:1000

3. 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。

此外对于多色流式实验，可设置缺一对照（FMO），即标记除某一通道荧光抗体外的其他所有通道荧光抗体。通过FMO管可以更准确设门，更清楚地区分出阳性和阴性细胞群。

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°C 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）。（该固定步骤可选）
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。

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，以使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 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，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。

第八章 实验室常见化学试剂介绍

多聚酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)	
化学试剂	介绍
氯仿	无色透明液体、有特殊气味、极易挥发，中度毒性，可经消化道、呼吸道、皮肤接触进入机体，主要急性毒性作用是对中枢神经系统有麻醉作用，对眼及皮肤有刺激作用。
苯酚	常温下无色针状晶体，熔点43℃，易挥发，有特殊气味，对皮肤、粘膜有强烈的腐蚀作用。接触后会使其局部蛋白质变性，可用酒精洗涤，使用时务必佩戴手套。
DEPC (焦碳酸二乙酯)	RNA酶的强抑制剂。易挥发，对眼睛和呼吸道粘膜有强刺激，在操作中应尽量在通风的条件下进行。高温可以使DEPC分解。(DEPC水：含0.1% DEPC的蒸馏水，可用于去除枪头和离心管上的RNA酶；DEPC处理水：DEPC处理过的蒸馏水，水中RNA酶被灭活，随后高温灭菌使DEPC分解，水中不再含DEPC，可用于RNA沉淀的溶解。)
EB (溴化乙锭)	核酸染料，在紫外下发光。高度毒性，可嵌入碱基分子中，导致错配。是强诱变剂，具有高效致癌性。(但EB粉末溶解后，不易挥发，且见光易分解，避免直接接触即可。)
免疫印迹 (Western Blot, WB) / 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)	
化学试剂	介绍
丙烯酰胺 甲/甲叉双丙烯酰胺	均有神经毒性，前者中度毒性，后者高度毒性，均可通过呼吸或者皮肤接触而吸收。二者皆有累积效应，在体内代谢慢，长期使用务必戴手套。(凝固后交联的聚丙烯酰胺没有毒性，但其中残留的单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺依旧有毒性，所以胶凝固后也要有手套防护。)
SDS (十二烷基硫酸钠)	表面活性剂。白色粉末状，对眼、皮肤和呼吸道粘膜有刺激作用，可引起呼吸系统过敏反应。
APS(过硫酸铵)	催化丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的聚合。中度毒性，对皮肤粘膜有刺激性和腐蚀性，长期皮肤接触可引起变应性皮炎。
TEMED (N,N,N',N'-四甲基乙二胺)	催化APS产生自由基。液体，挥发性强，有淡淡的臭味。具有强神经毒性，取用时，在通风橱、屏气、开盖吸取打出封存，呼气。
NaN ₃ (叠氮钠)	杀菌剂。粉末状，溶于水。叠氮化合物和氰化物一样可以阻断生物氧化呼吸链的最后一步，剧毒。叠氮钠易和金属反应、和酸反应，生成爆炸性更强的其他叠氮物，称量时务必使用塑料量勺。
β-巯基乙醇	还原剂。液体，可燃，高度毒性，臭味，吸入、摄入或经皮肤吸收后会中毒，有强烈刺激性，可引起角膜混浊。接触后，用弱碱性肥皂水及清水彻底冲洗。使用时可换成毒性较小的还原剂DTT。
PMSF (苯甲基磺酰氟)	蛋白酶抑制剂。水中不稳定，一般用异丙醇或无水乙醇配置，是一种高毒性胆碱酯酶抑制剂，对呼吸道黏膜，眼睛和皮肤有非常大的破坏性。可因吸入、咽下或皮肤吸收而致命。
甲醇	无色透明液体，挥发性强，低毒，对呼吸道、胃肠道粘膜和眼睛有刺激作用，能引起失明。
免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) / 免疫荧光 (Immunofluorescence, IF)	
化学试剂	介绍
甲醛	高毒，对粘膜，上呼吸道，眼睛和皮肤有强烈刺激性，已经被世界卫生组织确定为致癌和致畸物质。(实验使用时要始终在通风橱内进行操作。)
多聚甲醛	白色无定形粉末，有甲醛气味。对呼吸道有强烈刺激性，引起鼻炎、咽喉炎、肺炎和肺水肿。眼直接接触可致灼伤。直接接触会引起皮肤红肿。遇明火、高热或与氧化剂接触，有引起燃烧的危险。通常做水溶液使用，毒性同甲醛。
二甲苯	无色液体，易燃，挥发性一般，中度毒性。二甲苯对眼及上呼吸道有刺激作用，高浓度时，对中枢系统有麻醉作用。长期接触会导致神经衰弱综合症。
DAB (二氨基联苯胺)	显色剂。作为过氧化物酶最常用的底物，DAB广泛被用于生物学实验中，对科研贡献巨大。现已被证实具有免疫毒性、生殖毒性、遗传毒性以及潜在致癌性。(DAB溶液虽然挥发性不强，但配置和使用时要注意防护。)
H ₂ O ₂ (双氧水)	纯过氧化氢是淡蓝色的粘稠液体，可任意比例与水混溶，是一种强氧化剂，水溶液俗称双氧水，为无色透明液体。由于双氧水的腐蚀性，皮肤接触大量双氧水后，可能会发白。
其他	
化学试剂	介绍
DMF (二甲基甲酰胺)	无色易燃液体，有微弱的特殊臭味，中等毒性，可经呼吸道、皮肤及消化道吸收，对眼、皮肤和呼吸道有刺激作用。
丙酮	色透明液体，有特殊的辛辣气味，易燃、易挥发，毒性较低，皮肤长期反复接触可致皮炎。
TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)	TMB是过氧化物酶的底物。中度毒性，遇明火、氧化剂或暴露于空气中有引起燃烧的危险。
DMSO (二甲基亚砜)	多用于细胞融合。是一种含硫有机化合物，常温下为无色无臭的透明液体，是一种吸湿性的可燃液体。毒性较小，对人体皮肤有渗透性，对眼有刺激作用。用的时候要避免其挥发，皮肤沾上之后要用大量的水洗以及1%-5%的氨水洗涤。
氟化钠	是一种磷酸酶抑制剂，为无色发亮晶体或白色粉末状化合物，中度毒性，有强刺激性，氟化钠粉尘和蒸气对皮肤有刺激作用，可以引起皮炎。
硼酸	多用于配置缓冲液，本品不燃，具刺激性，易被损伤皮肤吸收引起中毒，受高热分解放出有毒的气体。
液氮	多用于细胞保存。在常压下，液氮温度为-196℃，皮肤接触液氮可致冻伤，取用时务必做好防冻保护。
乙醇胺	用于抗体纯化，在室温下为无色透明的粘稠液体，有吸湿性和氨臭，可燃，遇明火、高温有燃烧的危险，蒸汽有毒，眼、鼻有刺激性。
异丙醇	无色透明具有乙醇气味的可燃性液体，微毒，高浓度蒸气具有明显麻醉作用，对眼、呼吸道的粘膜有刺激作用，能损伤视网膜及视神经。
氨基硼氢化钠	用于亲和素标记，遇水释放极易燃烧的气体。吸入、皮肤接触及吞食有极高毒性，与酸接触释放极高毒性气体。
戊二醛	用于活化BSA及偶联多肽。带有刺激性气味的无色透明油状液体，溶于热水。对眼睛、皮肤和粘膜有强烈的刺激作用
氨基蝶呤	用于筛选融合细胞。氨基蝶呤是叶酸的拮抗剂，可阻断瘤细胞利用正常途径合成DNA，可燃，燃烧产生有毒氮氧化物烟雾。





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