



武汉金开瑞生物工程有限公司

多克隆抗体制备服务 结题报告

项目名称	橡胶 CENH3 基因多克隆抗体制备		
项目编号	PA1-24040010		
客户单位	中国热带农业科学院橡胶研究所		
客户姓名	吴挺开	实验室负责人	王粤
报告撰写人	王粤	报告确认人	陈思
报告生效日期	2024. 08. 07		

电话：027-87960366

邮箱：ma2@genecreate.com

网址：<http://www.genecreate.cn>

抗原纯化操作记录表

多抗

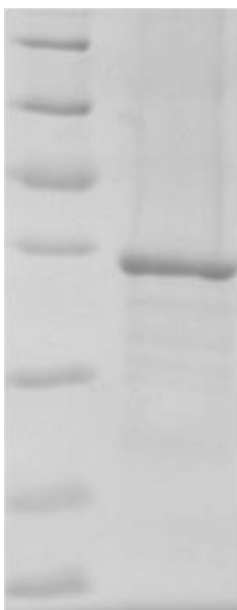
操作记录人	张成博
复核人	陈思
操作时间	20240522

抗原基本信息:

项目资料	项目编号	PA1-24040010-24141208
	基因名称	CENH3
	表达系统	大肠杆菌
	亚克隆载体	PET-B2M
	预计分子量	34.49kDa (标签大小~17kDa)
	抗原缓冲	6M 盐酸胍
	浓度	3mg/mL
	体积	2 mL
	Marker 分子量	116/66.2/45/35/25/18.4/14.5 kDa

1、数据处理:

抗原 SDS-PAGE 验证:

M. Marker (5 μ L, 0.1 mg/mL)

1. 纯化抗原(10 倍稀释)

2、结论:

SDS-PAGE 检测结果: 纯度 85%, 满足交付标准, 进入下一步。



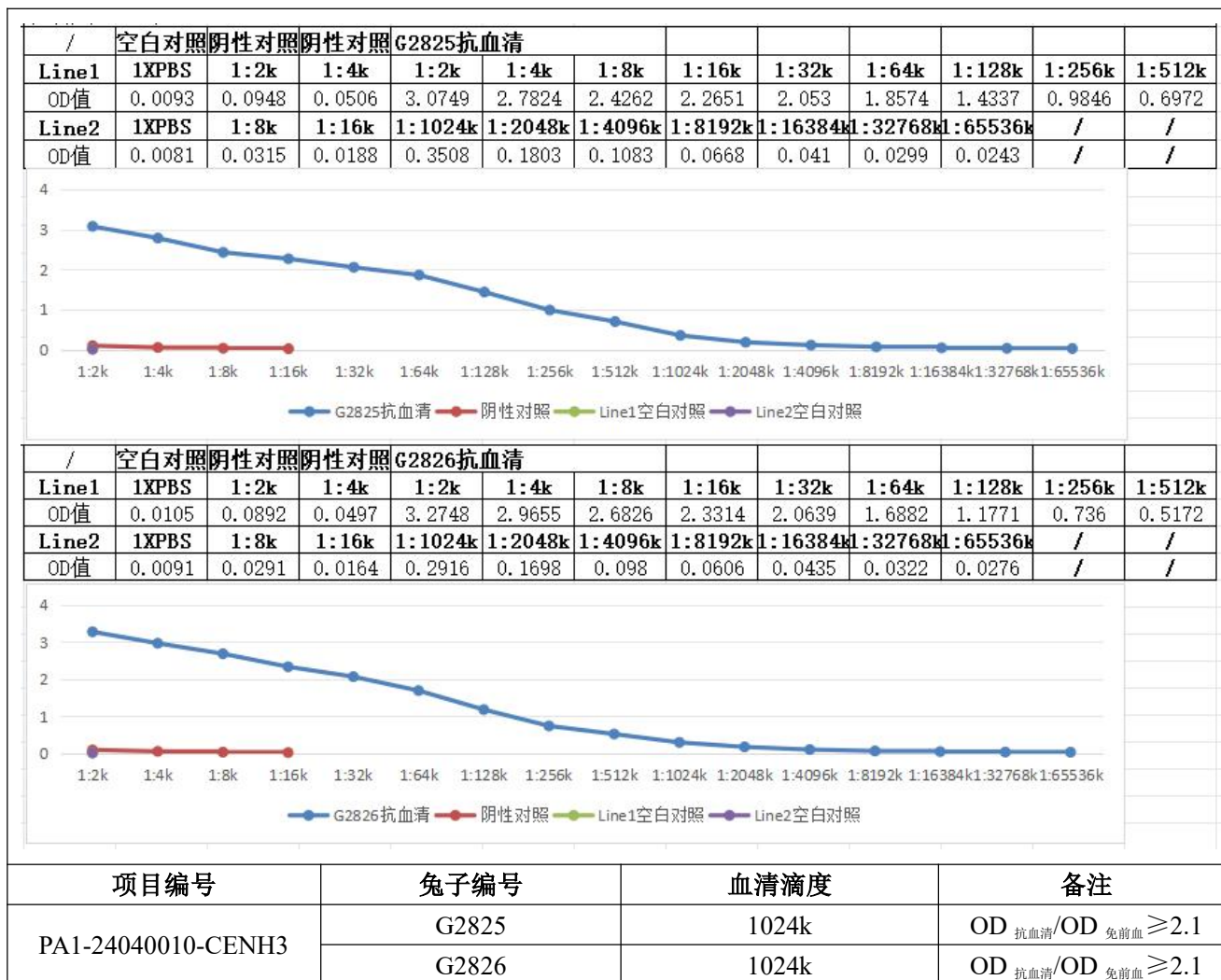
动物免疫及血清效价检测
操作记录表

			操作记录人	王粤
			复核人	杨婷
			操作时间	2024.05.23-2024.07.18
流程	试剂与操作（简要）		反应时间	
1.抗原名称	PA1-24040010 -CENH3 重组蛋白		/	
2.抗原包被	抗原以 2ug/ml 的浓度包被，4℃过夜包被		过夜	
3.样品名称	兔多抗血清		/	
4.样品稀释	样品用 PBS 以 1：2000,1:4000,1:8000,1:16000,1:32000 等稀 释度稀释		/	
5.一抗加样	样品以 100ul/孔加样		/	
6.温育	37℃温育		1h	
7.洗涤	用 TBST 以 200ul/孔，洗涤 3 遍		/	
8.加酶标二抗	羊抗兔-HRP 以 1:10000 稀释使用		/	
9.温育	37℃温育		45min	
10.洗涤	用 TBST 以 200ul/孔，洗涤 3 遍		/	
11.显色	以 100ul/孔加入单组份 TMB 显色液		20min	
12.读数（OD）	酶标仪测定 OD450 读数		/	

1、免疫流程：

免疫次数	免疫周期	免疫时间	免疫剂量	免疫佐剂	免疫动物状态
第一次免疫	1 天	2024/05/23	0. 5mg	完全弗氏佐剂	良好
第二次免疫	14 天	2024/06/06	0. 3mg	不完全弗氏佐剂	良好
第三次免疫	28 天	2024/06/20	0. 3mg	不完全弗氏佐剂	良好
三免取血	35 天	2024/06/27	/	/	采血正常
第四次免疫	42 天	2024/07/04	0. 3mg	不完全弗氏佐剂	良好
四免取血	49 天	2024/07/11	/	/	采血正常
终放取血	56 天	2024/07/18	/	/	采血正常

2、抗血清ELISA检测数据



3、结论:

PA1-24040010-CENH3 两只兔子血清效价依照 OD_{抗血清}/OD_{免前血} ≥ 2.1 的判断标准, G2825 在稀释到 1:1024K 时的 OD 值仍是阴性对照组的 2.1 倍以上, G2826 在稀释到 1:1024K 时的 OD 值仍是阴性对照组的 2.1 倍以上, 即 G2825 血清效价为 1024K, G2826 血清效价为 1024K。两只兔子血清效价超过 1:50K, 均符合合同交付预期, 下一步安排抗血清纯化。

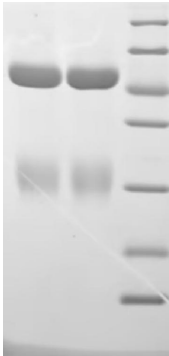


抗体纯化操作记录表

			操作记录人	王粤
			复核人	杨婷
			操作时间	2024.08.02
流程	试剂与操作（简要）			反应时间
1.项目编号	PA1-24040010-CENH3			/
2.亲和层析柱	ProteinG 柱			/
3.层析柱预处理	10 倍柱床体积的去离子水冲洗 3-5 遍，流速 1ml/min 10 倍柱体积的 0.02M PB+0.3M NaCL 冲洗 3-5 遍，流速 1ml/min			60min
4.样品上样	8ml 抗血清，用 0.02M PB 稀释后，0.22um 滤膜过滤后上柱，调整流速为 5-7s/滴			30min
5.洗杂	0.02M PB 冲洗至检测（G250 不变蓝）无蛋白流出为止，流速 2s/滴			90min
6.抗体洗脱	0.1MPH3.0 甘氨酸洗脱，收集洗脱物并用 G250 检测洗脱产物至不变蓝为止			60min
7.PH 值调节	2M Tris-HCL 调节洗脱产物 pH 至中性			30min
8.样品浓缩	10kDa 超滤管，超滤浓缩至 1-3ml 左右			60min
9.透析	5L,0.01M PH=7.4 PBS 透析过夜，第二天换液 1 次			过夜
10.层析柱洗涤	去离子水冲洗层析柱至中性			30min
11.层析柱贮存	5 倍柱床体积 20%乙醇冲洗层析柱后，4℃封存			30min
12.加防腐剂	/			/
13.加甘油/BSA	/			/

注：实际操作时间因抗血清体积不同而略有差异

1、抗体纯化 SDS 数据：

Marker 分子量: 116/66.2/45/35/25/18.4/14.5 kDa				
项目编号	兔子编号	样品体积	抗体得率	备注
PA1-24040010-CENH3	G2825	8ml	20mg	/
	G2826	8ml	20mg	/
<div>1 2 M</div> 		<div>M. Marker 5ul 0.1mg/ml</div> <div>1. PA1-24040010-CENH3 兔 G2825 纯化抗体 10 倍稀释</div> <div>2. PA1-24040010-CENH3 兔 G2826 纯化抗体 10 倍稀释</div>		

2、结论：

SDS 质检结果：PA1-24040010-CENH3 兔 G2825/G2826 抗体纯化浓度均为 10mg/ml，纯度为 90%以上，符合预期！
--



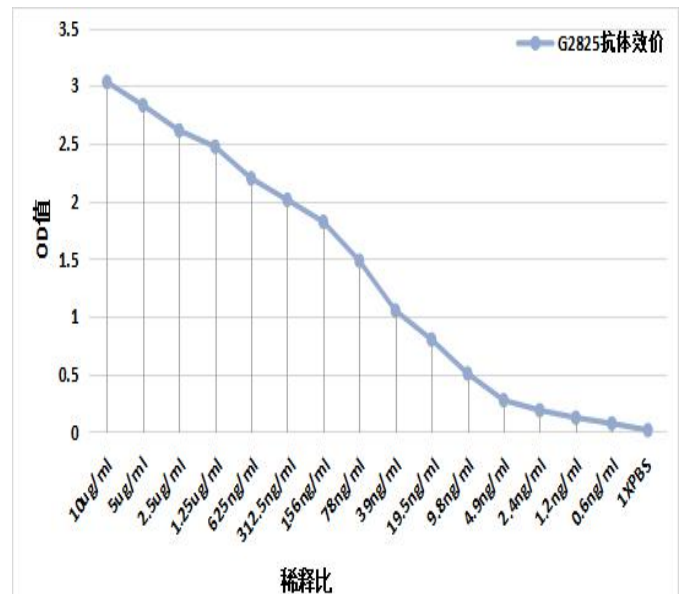
抗体成品质量检测报告

项目名称	PA1-24040010-CENH3	动物编号		兔 G2825
抗体类型	兔多克隆抗体	抗体批号		20240802
抗体体积	2ml	抗体浓度		10mg/ml
检测标准 1	检测方法 1:	间接 ELISA 法，通过对抗体的梯度稀释，直观反映了抗体的效价和灵敏度		
	检测结果 1:	稀释比例	检测值	结果判断
		9.8ng/ml	0.5036	符合预期
检测标准 2	检测方法 2:	WB 杂交印记，验证抗体特异性的同时，也对抗体的稀释比例做了推荐		
	检测结果 2:	稀释比例	检测结果	抗体推荐稀释比例
		2ug/ml	约 34.49 kDa,符合预期	1ug/ml-10ug/ml
项目名称	PA1-24040010-CENH3	动物编号		兔 G2826
抗体类型	兔多克隆抗体	抗体批号		20240802
抗体体积	2ml	抗体浓度		10mg/ml
检测标准 1	检测方法 1:	间接 ELISA 法，通过对抗体的梯度稀释，直观反映了抗体的效价和灵敏度		
	检测结果 1:	稀释比例	检测值	结果判断
		9.8ng/ml	0.4396	符合预期
检测标准 2	检测方法 2:	WB 杂交印记，验证抗体特异性的同时，也对抗体的稀释比例做了推荐		
	检测结果 2:	稀释比例	检测结果	抗体推荐稀释比例
		2ug/ml	约 34.49 kDa,符合预期	1ug/ml-10ug/ml

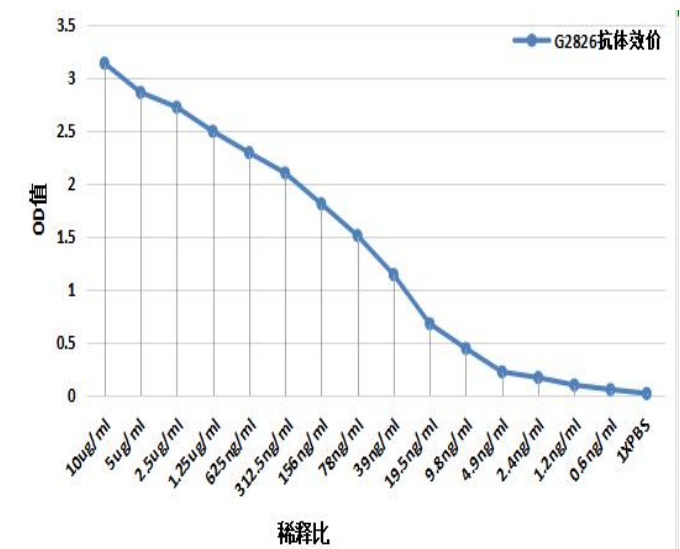
1、数据展示:

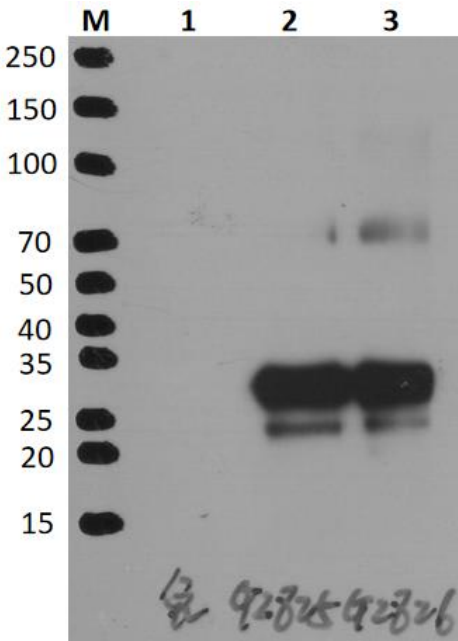
①间接 ELISA 抗体效价结果:

稀释比	G2825 抗体效价
10ug/ml	3.0311
5ug/ml	2.8299
2.5ug/ml	2.6122
1.25ug/ml	2.4708
625ng/ml	2.1962
312.5ng/ml	2.0103
156ng/ml	1.8195
78ng/ml	1.4812
39ng/ml	1.0501
19.5ng/ml	0.7987
9.8ng/ml	0.5036
4.9ng/ml	0.2721
2.4ng/ml	0.1851
1.2ng/ml	0.1206
0.6ng/ml	0.0705
1XPBS	0.0126



稀释比	G2826 抗体效价
10ug/ml	3.138
5ug/ml	2.8619
2.5ug/ml	2.722
1.25ug/ml	2.4932
625ng/ml	2.2921
312.5ng/ml	2.0993
156ng/ml	1.8076
78ng/ml	1.5075
39ng/ml	1.1378
19.5ng/ml	0.6735
9.8ng/ml	0.4396
4.9ng/ml	0.2178
2.4ng/ml	0.1639
1.2ng/ml	0.0935
0.6ng/ml	0.0509
1XPBS	0.0138



②WB 检测结果:	
	<p>Lane 1: 重组蛋白 PA1-24040010-CENH3 50ng, 兔前抗体 2ug/ml 孵育</p> <p>Lane 2: 重组蛋白 PA1-24040010-CENH3 50ng, 抗体 G2825 2ug/ml 孵育</p> <p>Lane 3: 重组蛋白 PA1-24040010-CENH3 50ng, 抗体 G2826 2ug/ml 孵育</p> <p>Marker: 250/150/100/70/50/40/35/25/20/15 (kDa)</p>

2、结果讨论:

PA1-24040010-CENH3 多克隆抗体的制备由我公司根据客户提供的基因序列制备重组蛋白, 免疫日本大耳兔 2 只制备抗血清。抗血清效价均超过 1:50K, 与重组抗原 WB 检测中在约 34.49 kDa 处有特异性识别, 与预期信号相符, 满足合同交付要求, 予以结题。

产品质量检测结论: ☒合格 ☐不合格 ☐让步放行

QC 签字/日期: 王粤 2024.08.07 放行人员签字/日期: 杨婷 2024.08.07

附件一: 实验主要试剂

试剂名称	厂家
Protein marker	Fermentas
亲和层析柱料	汇研生物
酶标二抗	Jackson
TMB	索莱宝

附件二: 主要仪器设备

LDZX-75KBS	不锈钢立式灭菌器	上海申安医疗器械厂
PAC3000	双稳定时电泳仪	BIO-RAD



CXG-1	恒温层析柜	上海泸西分析仪器厂有限公司
AKTA Purifier UPC 100	快速蛋白纯化系统	GE Healthcare
Avanti J-26XP	高速冷冻离心机	贝克曼
1CSP1	全波长酶标仪	PectraMax
XDS-1B	光学显微镜	重庆光电
TDZ5-WS	低速多管架自动平衡离心机	湖南湘仪

附件三：基本效价检测-间接 ELSIA

- 3.1 抗原包被：用包被液稀释抗原到 2ug/ml，100 μ L/孔加入 96 孔酶标反应板中，4℃过夜包被。
- 3.2 洗涤：次日弃掉孔内的液体，洗涤液洗 3 次。
- 3.3 封闭：加 200 μ L/孔封闭液，37℃温育 2h。
- 3.4 洗涤：用洗涤液洗 3 次。
- 3.5 加待测样品（一抗）：加入抗血清（取血 4℃ 4000rpm 离心 10min 取上清），用稀释液将血清按 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000..... 进行倍比稀释（空白血清同比稀释做阴性对照），每孔 100 μ L，37℃孵育 1h。
- 3.6 洗涤：用洗涤液洗 3 次。
- 3.7 加酶标抗抗体：加入 HRP 标记 IgG 二抗，100 μ L /孔，37℃孵育 40min。（羊抗小鼠-HRP 1: 5000-1: 10000, 羊抗兔-HRP 1: 5000-1: 10000）
- 3.8 洗涤：用洗涤液洗 5 次后拍干。
- 3.9 显色：加新鲜配制的底物溶液 100 μ L/孔，37℃遮光放置 5~20min。
- 3.10 终止反应、比色：加 50 μ L/孔终止液。颜色变黄；用酶标仪测定 450nm 处各孔的吸光值。

附件四：抗体纯化

- 4.1 层析柱预处理：10 倍柱床体积的去离子水冲洗 3-5 遍，流速 1ml/min
10 倍柱体积的 0.02M PB+0.3M NaCl 冲洗 3-5 遍，流速 1ml/min。
- 4.2 样品上样：4-10ml 抗血清/腹水，用 0.02M PB 稀释后，0.22 μ m 滤器过滤后上柱，调整流速为 5-7s/滴
- 4.3 洗杂：0.02M PB 冲洗至检测（G250 不变蓝）无蛋白流出为止，流速 2s/滴
- 4.4 抗体洗脱：0.1M PH=3.0 甘氨酸以 3-5s/滴过柱洗脱，收集洗脱物并用 G250 检测洗脱产物至不变蓝为止
- 4.5 PH 值调节：2M Tris-HCL 调节洗脱产物 pH 至中性



- 4.6 超滤浓缩：10kDa 超滤管，超滤浓缩至 1-3ml 左右
- 4.7 透析：5L, 0.01M PH=7.4 PBS 透析过夜，第二天换液 1 次后再透析 4-6h 左右后跑 SDS 胶并测定抗体浓度后装入标记好 EP 管，可暂存于 4℃ 备用或直接保存于 -20℃
- 4.8 层析柱洗涤与贮存：去离子水冲洗层析柱，5 倍柱床体积 20% 乙醇冲洗层析柱后，4℃ 封存

附件五：Western Blot

5.1 聚丙烯酰胺凝胶的制备

- 5.1.1 配制浓度为 12%（分离胶浓度可根据目的蛋白大小不同再进行调整）的分离胶溶液（10ml）：依次加入去离子水 3.3ml、30% 丙烯酰胺 4ml、PH8.8 的 Tris 2.5ml、10% 过硫酸铵 100μL、10% SDS 100μL、TEMED 6μL（加入 TEMED 后，分离胶马上开始聚合，故应立即快速混匀）。
- 5.1.2 迅速在两玻璃板的间隙中加入分离胶溶液，留出灌注浓缩胶所需空间，小心地在分离胶溶液上加入 1ml 异丙醇（贴壁加入）。
- 5.1.3 分离胶聚合完全后（25℃ 约 30min），尽可能排去凝胶上的液体，再用滤纸的边缘吸净残留液体。
- 5.1.4 配制浓度为 5% 的浓缩胶溶液（4ml）：依次加入去离子水 2.7ml、30% 丙烯酰胺 670μL、PH6.8 的 Tris 500μL、10% 过硫酸铵 40μL、10% SDS 40μL、TEMED 6μL（加入 TEMED 后，分离胶马上开始聚合，故应立即快速混匀）。
- 5.1.5 快速在已聚合的分离胶上直接灌注浓缩胶，立即在浓缩胶溶液中插入干净的梳子（小心避免混入气泡）。
- 5.1.6 浓缩胶聚合完全后（25℃ 约 30min），小心移出梳子，向电泳槽内加入蛋白质电泳缓冲液。

5.2 样品的制备

- 5.2.1 若样品为重组蛋白，则用 8M 尿素将蛋白稀释至 10ng/ul（蛋白稀释浓度可根据上样量不同来调整），取 2.5ul（可适当调整蛋白上样量）至 0.5ml 的 EP 管中，然后加 7.5ul 8M 尿素（根据蛋白上样量来调整，2 者的总体积为 10ul 左右），再加 10ul 2X Loading buffer 混匀，沸水浴 5-10min，2500rpm 离心 2min，将管壁溶液离心下来。
- 5.2.2 若样品为内源样本，则 5-30ul 抽提好的样本裂解液+1-6ul 6X Loading buffer 混匀后，沸水浴 5-10min，2500rpm 离心 2min，将管壁溶液离心下来。

5.3 电泳

- 5.3.1 用移液枪慢慢将样品混合物加至样品槽中，预染 Marker 一般加 10μL。
- 5.3.2 打开电源，采用 80V 电泳 30min，换电压至 120V 电泳直至溴酚蓝上样缓冲液在凝胶中迁移至凝胶底部。

5.4 湿转转膜

- 5.4.1 取胶并浸入转膜 buffer 中。
- 5.4.2 将 PVDF 膜（6%-12% 的胶膜是 0.45um，15% 的胶是 0.2 um）浸泡于甲醇 1min 后用滤纸吸干后再转入转



膜 buffer 中，将滤纸也浸入转膜 buffer 中（PVDF 膜和滤纸均剪成与胶相同大小，5.5cm*8.5cm）。

5.4.3 制作转膜三明治：（负极黑面）转印滤纸 3 张+凝胶+PVDF 膜+转印滤纸 3 张（正极白面），每铺一层都要赶尽气泡。

5.4.5 将转膜三明治放入转膜槽中，黑面对黑面，白面对红面，恒流 200mA 60min（12%的胶是 200mA 60min，15%的胶是 100mA 45min，6%的胶是 360mA 120min）。

5.5 封闭

5.5.1 将膜取出，TBS 洗 1 次，每次 5min（水平摇床上震荡）。

5.5.2 将膜取出，浸没于封闭液中 25℃，1h 或 4℃过夜（封闭液为 500ml 的 1*TBS+5g 酪蛋白配制）。

5.6 结合抗体

5.6.1 将膜取出，TBST 洗 1 次，每次 5min（水平摇床上震荡）。

5.6.2 将膜取出，浸泡于用 稀释液稀释的一抗稀释液中，25℃，2h 或 4℃过夜。（一般抗血清稀释 1: 2000 抗体稀释至 1-10ug/ml）。（稀释液为 500ml 的 1*TBS+2.5g 的酪蛋白+250ul 吐温）

5.6.3 将膜取出，TBST 洗 5 次，每次 5min（水平摇床上震荡）。

5.6.4 将膜取出，浸泡于用 稀释液稀释的二抗中，25℃，1h。羊抗兔-HRP 1:5000）。

5.7 ECL 曝光

5.7.1 将 A、B 发光液等比例稀释混合（各 500ul/膜），将膜至于保鲜膜上，AB 混合液均匀滴至膜上，盖上保鲜膜，避光反应 1min；

5.7.2 将膜放在滤纸上吸干液体（无液体流出即可，膜不可干透），转移至洁净保鲜膜中包好（保持正面平整），固定于暗盒中；

5.7.3 将暗盒至于暗室中，取出胶片迅速至于暗盒内膜上，关闭暗盒，根据所见荧光强度曝光（一般曝光时间为 1min，若条带较弱可选择压片过夜）；

5.7.4 打开暗盒，取出胶片立即完全浸入显影液中 1min；

5.7.5 取出胶片，去离子水漂洗后浸入至定影液中 1min；

5.7.6 取出胶片，去离子水漂洗后晾干，标定 Marker，分析实验结果。

（备注：根据目的蛋白大小，一般 20kDa 以下的用 15%的胶，20-100kDa 之间的用 12%的胶，100kDa 以上的用 6%的胶。）

不同浓度的分离胶配方：

成分	15%分离胶	12%分离胶	6%分离胶
PAGE	5ml	4ml	2ml
去离子水	2.3ml	3.3ml	5.3ml
Tris(PH8.8)	2.5ml	2.5ml	2.5ml
10%SDS	0.1ml	0.1ml	0.1ml
APS	0.1ml	0.1ml	0.1ml
TEMED	6ul	6ul	6ul



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENECREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

科研 诊断 医疗 一站式技术服务供应商

www.genecreate.cn www.genecreate.com

地址:武汉市东湖高新区高新大道666号生物城创新园B4栋2楼

邮编:430206 电话:027-88189683 传真:027-88189683