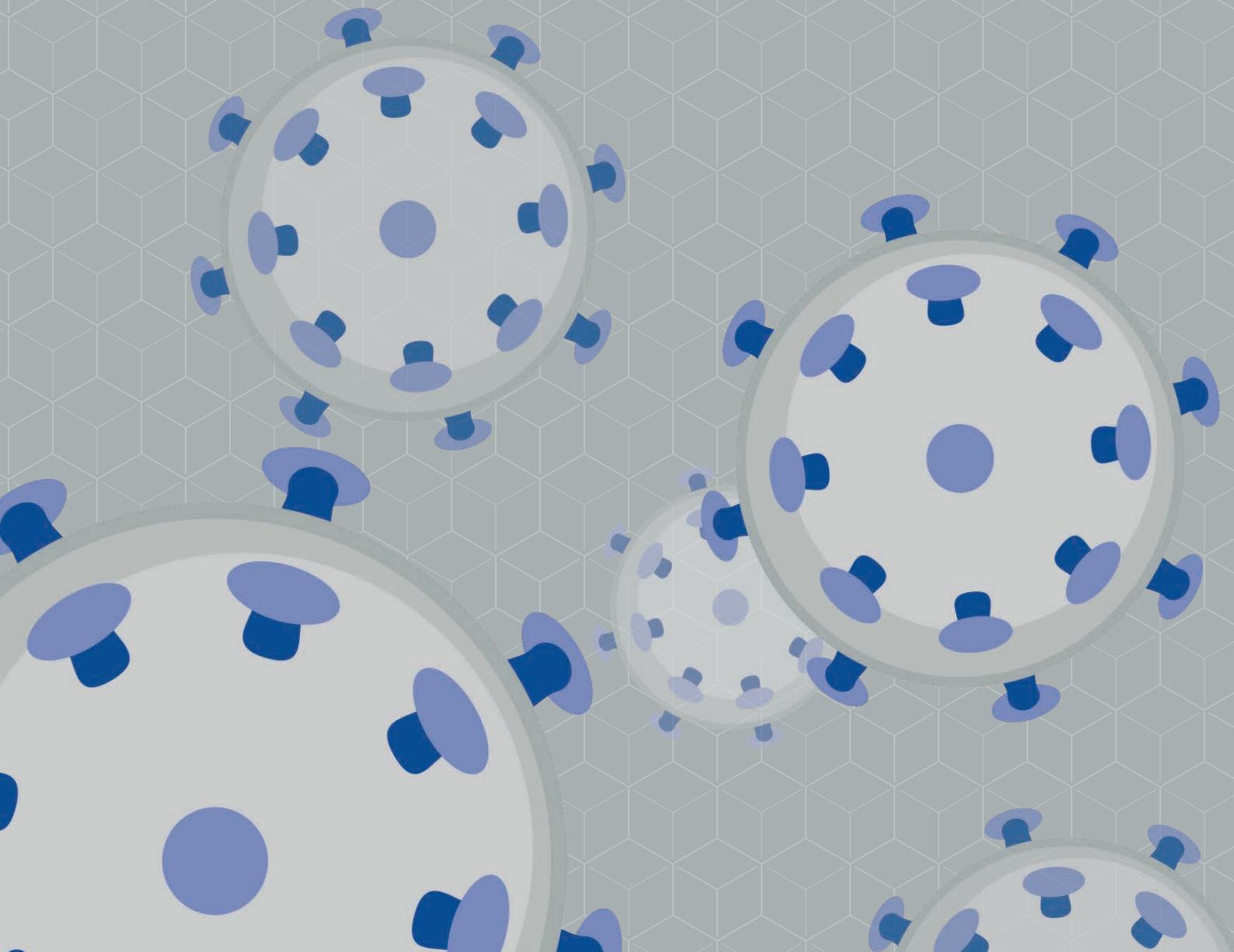


abcam

实验方案大全



目录

欢迎来到Abcam	1	
关于我们	1	
不仅仅是抗体	1	
信息全面	1	
Abreviews®	2	
注册Abcam账户	2	
实验方案	3	
第一章：抗体和抗体结构	3	
第二章：抗体形式及抗体纯化	6	
第三章：抗体选择和稀释比度	7	
第四章：荧光	9	
4.1 荧光染色—工作原理	9	
4.2 荧光染色表（激发和发射波长）	11	
第五章：蛋白质印迹	13	
5.1 样品准备	15	
裂解缓冲液	15	
蛋白酶和磷酸酶抑制剂	16	
细胞培养裂解物的制备	16	
组织裂解物的制备	16	
蛋白质浓度的测定	17	
凝胶上样准备	17	
5.2 电泳	18	
PAGE凝胶的制备	18	
阳性对照	19	
分子量标准	19	
上样和凝胶电泳	19	
内参的使用	20	
5.3 蛋白转膜和染色	20	
凝胶内蛋白的显像	20	
蛋白转膜	20	
膜上蛋白的显像：丽春红	22	
膜的封闭	22	
一抗的孵育	22	
二抗的孵育	23	
显色的方法	23	
5.4 蛋白质印迹参考文献	23	
5.5 蛋白质印迹疑难解答提示	23	
第六章：免疫组织化学	27	
6.1 IHC-石蜡包埋技术	27	
优化IHC-P新抗体	29	
固定	29	
脱蜡	29	
抗原修复	30	
免疫组织化学染色和检测实验方案	33	
相关资料	36	
6.2 IHC-冷冻切片	36	
6.3 免疫细胞学 (ICC)	37	
6.4 IHC/ICC 中的固定和通透技术	38	
6.5 灌注固定法	39	
6.6 鼠对鼠染色注意事项	40	
6.7 IHC/ICC 疑难解答提示	41	
第七章：ELISA	43	
7.1 间接ELISA	43	
7.2 直接ELISA	45	
7.3 夹心ELISA	46	
7.4 ELISA疑难解答提示	48	
第八章：流式细胞术	51	
8.1 流式细胞仪：射流系统	51	
8.2 流式细胞仪：前向和侧向散射光的检测	52	
8.3 流式细胞仪：散射光和荧光的检测	52	
8.4 抗体染色	57	
8.5 选择合适的荧光色素偶联物	57	
第九章：免疫沉淀 (IP) 实验方案	58	
9.1 裂解缓冲液	58	
9.2 裂解物制备	58	
9.3 预清除裂解物	59	
9.4 免疫沉淀	60	
9.5 选择合适的微珠	61	
9.6 使抗体与微珠交联的步骤	61	
9.7 用IgM抗体进行免疫沉淀	63	
9.8 蛋白L微珠	63	
9.9 IP疑难解答提示	64	
第十章：ChIP	65	
10.1 X-ChIP	65	
10.2 ChIP疑难解答提示	70	
第十一章：缓冲液和储备溶液	71	
11.1 标准PBS、TBS和TBS Tween	71	
11.2 蛋白质印迹	71	
11.3 IHC	73	
11.4 ELISA	74	
11.5 流式细胞术	74	
11.6 IP	74	
11.7 ChIP	74	
第十二章：抗体保存指南	75	
技术帮助	76	
在线资源	76	
数据表指南	77	
在线实验方案	77	
在线海报库	77	
Abcam博客	77	
订购与联系信息	78	
生化试剂介绍	78	
兔单抗介绍	79	

欢迎来到Abcam

关于Abcam

Abcam由Jonathan Milner博士创立于1998年，我们的使命在于生产和销售世界上最优质的抗体，同时提供最全面、最可信和最新的数据表。几年来推出数千种产品之后，我们涉足的领域已不局限于抗体，而这些价值不管是现在还是过去仍具有重要作用。我们仍然致力于提供以专业技术支持为依托的最新、最可靠的产品，从而有力保障科学家的研发需求。

不仅仅是抗体

我们的产品目录每月新增上百种新产品，包括越来越多的非抗体类产品：

- 蛋白质和多肽
- 生物染料和热可逆凝胶
- 细胞活力、细胞增殖和衰老测定试剂盒
- EasyLink 抗体偶联试剂盒
- ELISA、ELPAIR、ELISPOT 和 FLUOROSPOT 试剂盒
- 表观遗传试剂盒
- IHC 试剂盒和试剂
- 免疫印迹试剂
- 生化试剂
- 兔单抗 (RabMAbs)

信息全面

我们的产品附有大量的技术资料：

- 全面的数据表
- 客户评论 (Abreviews)
- 实验方案和疑难解答提示
- 常见问题

我们秉承诚信的政策，因此关于我们的产品，只要我们所知的，我们全部分享——一切尽在数据表中。



Abreviews® — 独立的客户评论

我们的 Abreviews 系统允许客户反馈我们的产品性能信息。不管评论是正面还是负面，我们都会将此信息在我们的数据表中与所有客户分享。这一最新信息提供了有关新应用的有用数据、最佳稀释条件以及产品使用时的图片。
更多信息，请访问：www.abcam.cn/Abreviews



注册Abcam帐户！

充分利用创建 Abcam 帐户的诸多好处：

- 直接得到专业的技术支持
- 创建并提交 Abreviews，赢取礼品
- 接收特价优惠、活动和新闻信息
- 查询和会议注册

注册请访问：<https://secure.abcam.cn/index.html?pageconfig=register&viapagetrap=register>

abcam

产品
定制
技术支持
活动通知
通路
联系我们
关于我们
招贤纳士

登录新的帐户

Already have an account? [Sign in](#)

Title*	<input type="text" value="Dr"/>
名字*	<input type="text"/>
姓氏*	<input type="text"/>
电子邮件*	<input type="text"/>
职位*	<input type="text" value="- 职位 -"/>
研究领域*	<input type="text" value="- 研究领域 -"/>
语言	<input type="text" value="English"/>
选择一个密码 <small>请输入密码,密码必须同时包含字母和数字且不少于6个字符，也可选择特殊字符和符号。</small>	

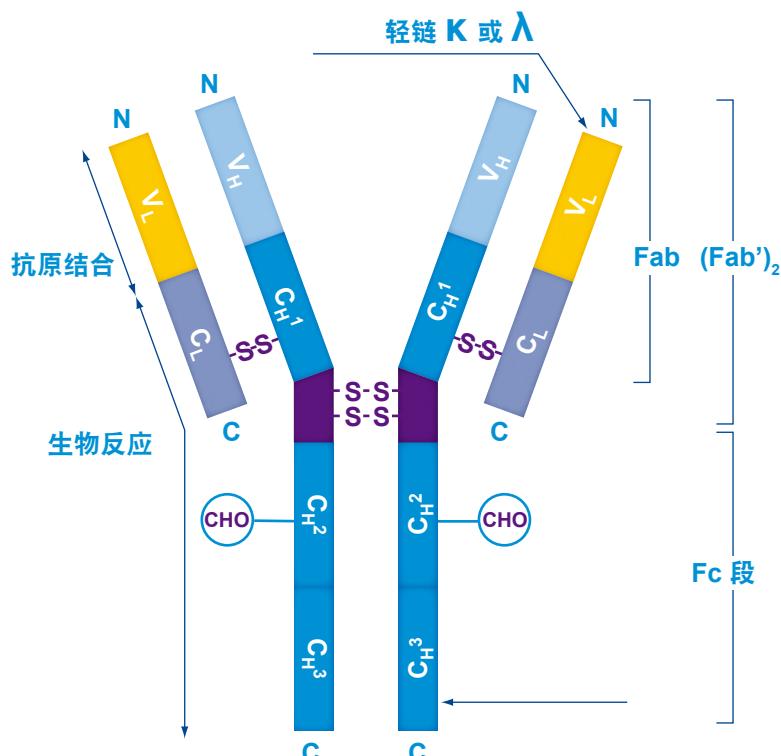
如果您需要进一步帮助您的帐户,
 请联系客户服务
 (852) 2603-6823
hk.orders@abcam.com

帮助?
 我们不会出售或分发这些信息给任
 何第三方。我们只使用此信息在您
 选择 [您的帐户](#), 如果您担心, 请 [查
 看我们的隐私政策](#)。

第一章：抗体和抗体的结构

抗体，也叫免疫球蛋白 (Ig)，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。在体内，抗体是由于外源性分子的侵袭而产生的。抗体以一个或者多个Y字形单体存在，每个Y字形单体由4条多肽链组成，包含两条相同的重链和两条相同的轻链。轻链和重链是根据它们的分子量大小来命名的。Y字形结构的顶端是可变区，为抗原结合部位。任何一个抗体的轻链都可以分为κ或λ型（基于小分子多肽结构上的差异），每一个抗体的重链则决定了它的类或型。

抗体结构



重链

哺乳动物 Ig 的重链一共有五种，分别用希腊字母 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 来命名，相对应组成的抗体就称为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五种抗体。不同的重链在大小和组成上有所区别， α 和 γ 包含大约 450 个氨基酸，而 μ 和 ϵ 则有大约 550 个氨基酸。

每个重链有两个区：恒定区和可变区。所有同一型的抗体其恒定区都是相同的，不同型的抗体之间则存在差异。重链 γ 、 α 和 δ 的恒定区的组成为 3 个前后串联的 Ig 结构域，并有一个铰链区增加它的灵活性；重链 μ 和 ϵ 的恒定区则由 4 个 Ig 结构域组成。不同 B 细胞产生的抗体其重链的可变区不同，但同一种 B 细胞或细胞克隆产生的抗体其可变区则是相同的，每一个重链的可变区都是大约 110 个氨基酸长度，并组成一个单独的 Ig 结构域。

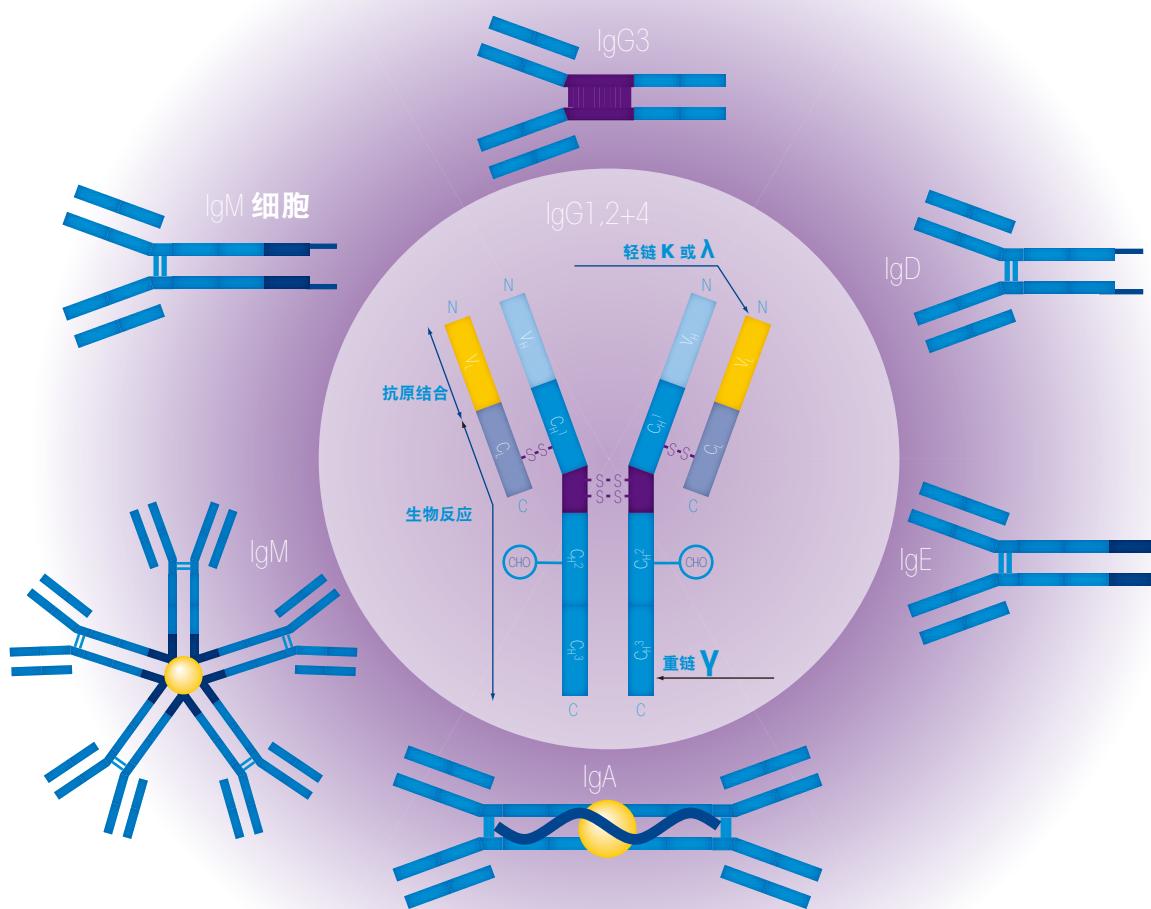
轻链

哺乳动物只有两种轻链： λ 型和 κ 型，每条轻链有两个前后相连的结构域：一个恒定区和一个可变区。轻链的长度大约为 211~217 个氨基酸，每个抗体包含的两条轻链总是相同的，对哺乳动物来说每一个抗体中的轻链只有一个型： κ 或 λ 型。在一些低等的脊椎动物中，像软骨鱼类（软骨鱼）和硬骨鱼类体内也会发现其他型的轻链如(iota)型。

Fab和Fc段

Fc 段可以直接结合酶或荧光染料来标记抗体，是在 ELISA 过程中抗体铆钉在板上的部位，也是在免疫沉淀、免疫印迹和免疫组化中识别并结合二抗的部位。抗体可以被蛋白水解酶如木瓜蛋白酶水解成 2 个 F(ab) 段和一个 Fc 段，或者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。IgG 抗体片段有时是非常有用的，由于缺少 Fc 段，F(ab) 段即不会和抗原发生沉淀，也不会在活体研究中被免疫细胞捕获。因为分子片段较小，且缺乏交联功能（由于 Fc 段的缺失），Fab 段通常用于功能性研究中的放射性标记，Fc 段则主要用做组织染色中的阻断剂。

抗体同型



根据Y形结构的数量和重链种类的不同，哺乳动物体内的抗体可以分为5类：IgG、IgM、IgA、IgD、IgE，它们的重链分别是 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 。各类抗体在生物学特性、功能区域以及结合不同抗原的能力上有所不同，如下表所列：

类/亚类	重链	轻链	分子量 (kDa)	结构	功能
IgA ₁	α_1	λ 或 κ	150-600	单体-四聚体	最常引发的免疫球蛋白主要产生于粘膜部位，如肠道、呼吸道和泌尿生殖系统，阻止病菌在黏膜的定居，能抵抗消化并可分泌至乳汁中。
IgD	δ	λ 或 κ	150	单体	功能不详；与 IgM 共同存在于 B 细胞发育的各个阶段；大部分与 B 细胞结合。
IgE	ϵ	λ 或 κ	190	单体	结合变应原引发巨噬细胞释放组胺，可引起变态反应，也可以对抗寄生虫感染。
IgG ₁	γ_1				
IgG _{2a}	γ_2	λ 或 κ	150	单体	血清中最主要的免疫球蛋白。在免疫反应中提供最主要的抗体以抵御病原菌的侵袭，温和的补体固定剂 (IgG3)；可通过胎盘。
IgG _{2b}	γ_3				
IgG ₃	γ_4				
IgG ₄					
IgM	μ	λ 或 κ	900	五聚体	最早产生的反应性抗体，在 B 细胞表面表达，分泌型有很高的亲和力。在 B 细胞介导的免疫反应早期、产生足够的 IgG 之前发挥作用，消除病原菌。

鸡的 IgY

在生产多克隆抗体时，选择鸡会比兔和羊有更大优势。

1. 鸡不是哺乳动物，因此更易产生针对哺乳动物抗原的高亲和性抗体（特别是高度保守的哺乳动物蛋白）。
2. 众所周知，这是产生多克隆抗体的最合乎伦理的途径，不需鸡血，只要简单收集鸡蛋就可以。我们的母鸡是以六只一组喂养，而我们有独特的辨认鸡蛋系统，使鸡能自由走动。
3. 一只鸡就可以产生大量抗体，每个月大约可达 3 克 IgY，是兔子的 10-20 倍，而且与兔子相比，鸡产生抗体的周期更快，早在第 25 天就可以从鸡蛋中获取高滴度的抗体。
4. 由于 IgY 存在于鸡蛋中，而鸡蛋可以收集起来并长期储存，还可以根据不同批次抗体的滴度和/或亲和力来追溯性的从鸡蛋中纯化我们想要的 IgY。
5. 喂养和修建鸡舍的费用低于兔子。
6. IgY 是一种很稳定的抗体，具有以下和哺乳动物 IgG 相似的特征：
 - 二价
 - 可被木瓜蛋白酶降解成二价 Fab 片段
 - 通过标准程序可以进行酶标记、生物素标记和金标记
7. IgY 的 Fc 片段与哺乳动物的 IgG 有明显的不同
 - 不会结合哺乳动物的类风湿因子或其它自然产生的抗哺乳动物抗体的抗体（如 HAMA），从而降低实验背景
 - 不会激活哺乳动物的补体系统
 - 不会结合哺乳动物的 Fc 受体
 - 不会结合金葡菌蛋白 A 或蛋白 G

第二章：抗体形式及抗体纯化

对于血清、腹水和组织培养上清的澄清，离心和过滤是基本的实验室技术。这些技术可以去除会阻塞层析柱的脂类和小颗粒物质。对于某些样品，缓冲液置换和除盐也是必要的步骤。硫酸铵沉淀作为更进一步的预处理步骤，经常用于浓缩腹水中的免疫球蛋白。

抗血清

多克隆抗体通常是未经纯化的，称为血清或抗血清。抗血清是指已经除去了凝血蛋白和血红细胞的免疫宿主的血液。抗血清包含所有种类的抗体/免疫球蛋白以及其它血清蛋白。它所包含的不仅有识别靶抗原的抗体，还有识别非靶抗原的抗体，在免疫分析中有时会发生非特异性反应。由于这个原因，粗制抗血清通常要进行纯化，以去除血清蛋白，增加能特异和靶抗原相结合的免疫球蛋白的比例。

组织培养上清

单克隆抗体可以通过杂交瘤细胞培养（细胞分泌性抗体）并收获杂交瘤组织培养上清来获得。

腹水

单克隆抗体可以通过在小鼠（或大鼠）的腹腔中生长杂交瘤细胞而产生。杂交瘤细胞注射入小鼠以后，就会在小鼠腹腔繁殖并产生液体（腹水）。这种腹水就包含了高浓度的可收获抗体，比杂交瘤细胞培养有更高的抗体产量。

抗体纯化

多克隆抗血清或单克隆腹水/组织培养上清通常通过下述三种方法中的一种来进行纯化：

1. 蛋白A/G纯化

蛋白 A/G 纯化是应用金黄色葡萄球菌的蛋白 A 或链球菌的蛋白 G 对免疫球蛋白 Fc 段的高亲和性。蛋白 A/G 纯化从粗制抗血清中去除了血清蛋白，但没有去除非特异的免疫球蛋白组分。结果蛋白 A/G 纯化的抗血清仍然具有一小部分不期待的交叉反应性。

2. 亲和纯化

亲和纯化就是通过相似性分离某一特定蛋白或具有相似特征的一组蛋白。这种分离蛋白的技术是基于在蛋白和耦合于层析介质上的特定配基之间的一种可逆的相互作用。抗原亲和纯化的优势是免疫球蛋白能够特异地同刺激它产生的抗原进行结合，结果消除了大量的非特异免疫球蛋白成分，将能特异与靶抗原相结合的免疫球蛋白成分富集。因此亲和纯化后获得的主要是含所期待的特异性免疫球蛋白。

3. 预吸附

多克隆抗体有时要经过预吸附。也就是说它们要被不同物种来源的其它蛋白或血清吸附，以消除可能的交叉反应的抗体。这样纯化后的抗体纯度和特异性应很高，任何交叉反应都被显著减少。

在Abcam进行抗体纯化



第三章：抗体选择和稀释比度

对于任何一种特定的靶抗原，都有不止一种有效抗体。为了缩小选择范围，实验中通常要考虑以下几个方面：

1. 分析或者应用类型
2. 样品的性质
3. 样品的种类
4. 抗体宿主的种类
5. 抗体的标记和检测

Abcam 网站有一个搜索功能。在搜索框中输入蛋白或其它靶物质的名称，就会出现一个列表，可以通过产品类型、目的、实际用途、特异反应性、宿主种类、克隆性和结合情况进行筛选。

用途

抗体数据表所显示的用途都是已经得到检测证明可以发挥作用的。如果某项用途没有列出，并不意味着抗体不合适，而是还没有检测是否有该项用途或不知道抗体如何发挥作用。如果已经检测并证明无效也会在表中列出。

样品的性质

样品的性质会告诉您哪个抗体最合适，至少要考虑以下两个方面：

1. 要检测的蛋白区域。刺激宿主动物产生抗体的具有免疫原性的物质种类繁多，包括全长的蛋白、蛋白片段、多肽、整个生物机体（例如细菌）或细胞。免疫原通常在数据表中会有显示（尽管在很多例子中由于专利原因找不到关于免疫原的详细描述）。如果要检测的是一个蛋白片段或全长蛋白的异构体或特定区域，那就要求选择的抗体是由该特异片段或区域或者包含该特异片段或区域的免疫原刺激产生的。如果要通过 FACS 去检测活细胞表面蛋白，则要求选择的抗体是由蛋白的细胞外区域刺激产生的。

2. 样品的处理工艺。有些抗体要求样品先进行特殊处理。例如，许多抗体只识别降解或变性蛋白，可能因为这样会暴露藏在二次或三次折叠后蛋白内部的抗原表位。另一方面，有些抗体仅识别自然折叠状态蛋白上的表位。（Abcam 公司用于 western blotting 的抗体，样品都需进行降解和变性处理，除非在数据表中特殊标明）。当搜寻用于免疫组化的抗体时，则应注意有些抗体只适合用于未固定冷冻组织。有时，抗原修复步骤则必不可少，这样可以消除由福尔马林固定所引起交联，因为有些抗体不能结合福尔马林固定和石蜡包埋组织中的靶目标。在数据表的应用章节会明确指出上述限制。

样品种类

尽管由于具有足够多的同源氨基酸序列，抗体可以和其它物种的同一靶蛋白反应，但是我们选择的抗体仍然应该是来源于同一物种的抗原刺激产生的。如果样品不是来自于列表所示的物种之一，也不能说明该抗体不可以用来检测这种样品，而可能是来自该物种的样品没被检测过，因此我们很难推荐它的适用性。根据序列相似性可以预测交叉反应性：值得骄傲的是 Abcam 在数据列表里有 ExPASy 和 NCBI BLAST 的链接，可以比对不同物种来源氨基酸序列的同源性。

选择一抗宿主的类别

一般来说，当用标记二抗来检测非标记一抗时，产生一抗的宿主动物的类别就非常重要。对于免疫组化，产生一抗的宿主应尽可能的和样品的宿主种类不同，以避免二抗的免疫球蛋白与样品中内在的免疫球蛋白发生潜在的交叉反应。例如，用于检测鼠源蛋白的一抗就不应来源于鼠或大鼠，来源于兔则是比较适合的选择，接下来用检测分子（酶、荧光、生物素等）标记的抗兔 IgG 的二抗进行结合。如果有已标记的一抗则可以直接避免上述交叉反应发生。对于不含内源性免疫球蛋白样品的检测，宿主的种类选择不用很严格。例如进行 western blotting 的细胞裂解液就被认为不包含 IgG。而组织溶解液和组织培养上清（包括血清）则被认为是含免疫球蛋白的。Western blotting 时 IgG 会以 50 和 25kDa 的条带出现在降解和变性样品中，分别相当于 IgG 分子的重链和轻链。

选择二抗

二抗应来源于抗一抗的物种。举例来说，如果您的一抗来源于鼠，那么二抗就应该选择抗鼠的。我们建议仔细核对二抗数据表以确定您要使用的二抗。

Abcam 提供有大量标记各种荧光物质和染色物质的二抗。

检查您所用的一抗数据表的底部，将会显示一些合适的二抗。

为了找到您自己的二抗，可以使用我们的导航框或通过主页中心的链接来选择产品类型，然后选择您一抗的种类，这样会显示大量适用于一抗种类的二抗。

双重染色抗体的选择

对细胞培养液或组织上清液进行双免疫染色要求非标记一抗来源于不同物种的动物，而二抗则特异性识别其中一种一抗。二抗如果与其他动物来源的免疫球蛋白有交叉吸附，则会在数据表中明确说明。

荧光和染料标签

标签结合在抗体上使抗体的结合可见。标签的选择依据以下几个方面

1. 检测方法：荧光或有色沉淀。荧光标签会在特定波长的光激发下发光。根据它们自己激发和发光性质不同，有一些荧光标签是可用的。在结合了合适的底物时，酶标签HRP和AP可以形成有色沉淀。
 2. 有效的封固剂（只限免疫组化）：AEC、Fast Red、INT 或是其它的水溶性染色剂均溶于酒精，因此要求使用水溶性封固剂。以上提到的其他有机物要想得到较好的折射率，最好使用有机封固剂封固。
- 荧光素标签需要水溶性封固剂。胆藻素蛋白（藻青蛋白/藻红蛋白）需要不加甘油的水溶性封固剂，否则会产生淬灭效应。
3. 生物素标记的抗体对于信号的放大是很有效的，比如可应用于亲和素-生物素-酶或荧光复合物（通常缩写为ABC试剂）或者亲和素或链霉亲和素结合酶或荧光染料检测法。

未纯化抗体的建议稀释和浓缩

未纯化抗体在某一特定抗体浓度下会发生很显著的变化。如果不清楚给定的未纯化抗体样品的浓度，就可以参考下面的“特殊范围”作为估计的指导。

	组织培养上清	腹水	全抗血清	纯化的抗体
WB/斑点杂交	1/100	1/1000	1/500	1µg/ml
IHC/ICC	纯度达到 1/10	1/100	1/50-1/100	5µg/ml
EIA/ELISA	1/1000	1/100000	1/500	0.1µg/ml
FACS/流式细胞术	1/100	1/1000	1/500	1µg/ml
IP	-	1/100	1/50-1/100	1-10 µg/ml
浓度估计	1-3 mg/ml	5-10 mg/ml	1-10 mg/ml	

第四章：荧光

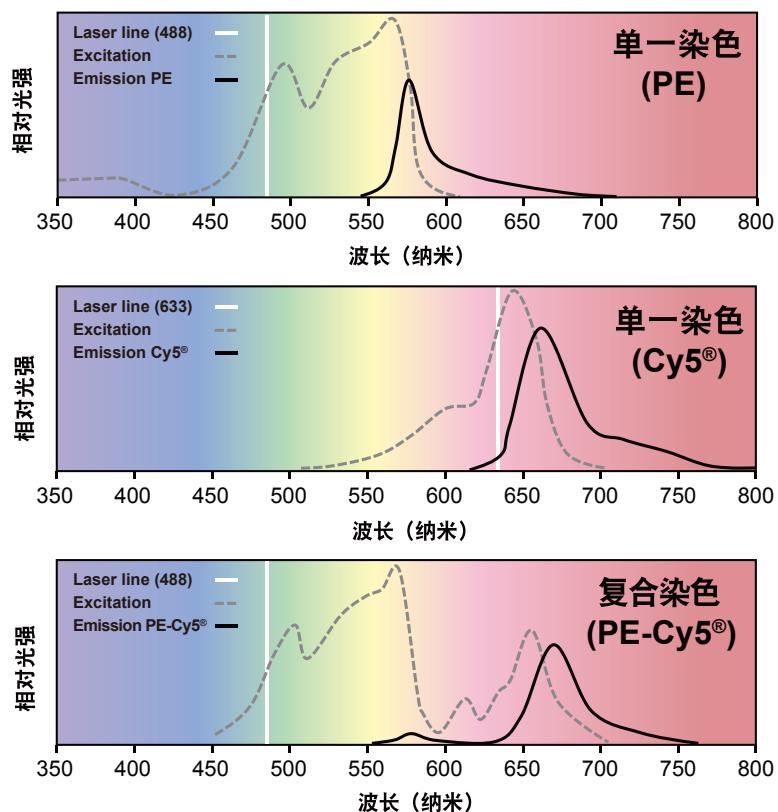
4.1 荧光染色—工作原理

由于其独特的电子构型，荧光物具有典型的吸收（激发）和发射光谱。

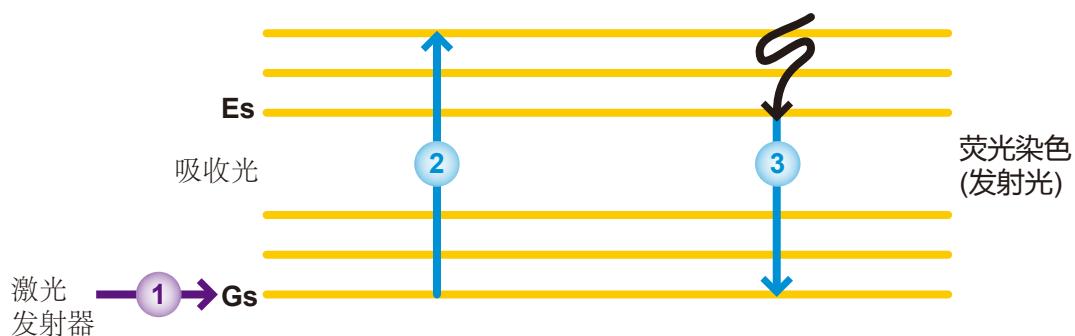
单一染色在特定波长被激发，在另外一个波长发射光子。

复合染色由距离非常近的、能量可以在彼此之间传递的一个供体及一个受体荧光物分子所组成。复合染色在受体分子的激发波长被激发，在供体分子的发射波长发射一个光子。

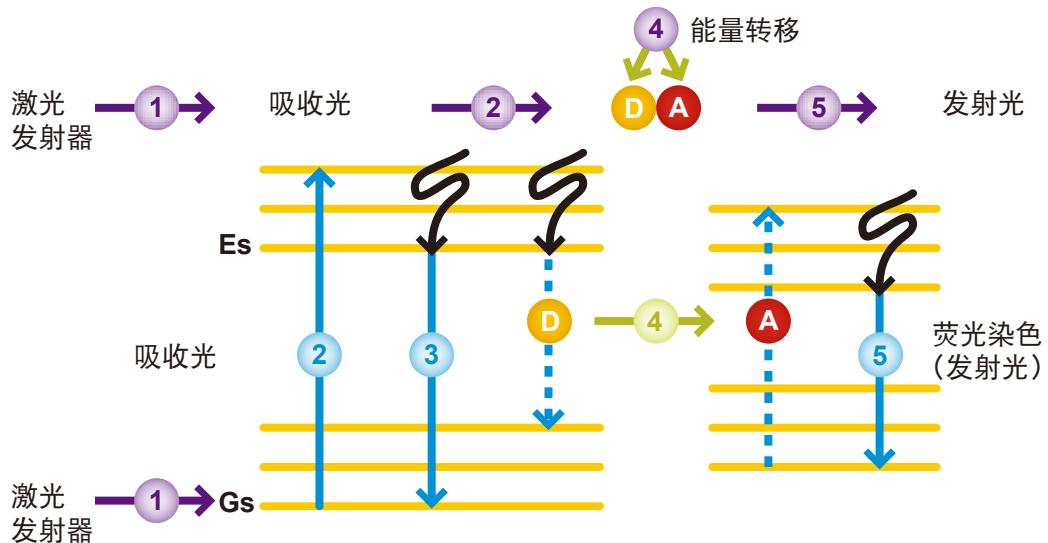
激发和发射光谱图



单一染色能量水平图解



单一染色能量水平图解



单一染色:

- ① 为染色而设置在激发波长的激光为荧光物分子中的电子提供电磁能量。
- ② 电子在下一个能级(Es)跃迁至一个激发状态。
- ③ 能量被以光子(荧光)的形式释放, 电子移回至较低的能级(Gs)。

复合染色:

- ④ 在通过激光(图示中1-2)提供了能量的电子激发状态下, 能量被供体分子中的一个电子释放后, 被受体分子中的一个电子所吸收。
- ⑤ 受体分子中的电子在下一个能级(Es)跃迁到激发状态, 和单一染色一样, 能量被以光子(荧光)的形式所释放, 然后电子回到较低能级(Gs)的状态。

在线查看我们
所有的实验方案:
www.abcam.cn/protocols

4.2 荧光染料表

荧光染料	激发光波长 (nm)	发射光波长 (nm)	激发光束 (nm)
甲氨基香豆素	360	410	
DyLight® 405	400	420	
Alexa Fluor® 405	402	421	
Brilliant Violet 421™	407	421	
HiLyte Fluor™ 405	404	428	
DyLight® 350	353	432	
Alexa Fluor® 350	346	442	
氨基香豆素 (AMCA)	350	445	
BD Horizon™ V450	404	448	
Pacific Blue™	404	456	360,405,407
EviTag™ quantum dots-Lake Placid Blue	470	490	
AMCyan	457	491	
BD Horizon™ V500	415	500	
Cy2®	489	506	488
Chromeo™ 488	488	517	
DyLight® 488	493	518	
Alexa Fluor® 488	495	519	488
FAM	494	519	
异硫氰酸荧光素(FITC)	495	519	488
EviTag™ quantum dots-Adirondack Green	505	520	
Chromeo™ 505	505	526	
HiLyte Fluor™ 488	501	527	
Alexa Fluor® 514	518	540	
EviTag™ quantum dots-Catskill Green	525	540	
Alexa Fluor® 430	434	541	
Pacific Orange™	403	551	
Alexa Fluor® 532	532	554	
HEX	535	556	
EviTag™ quantum dots-Hops Yellow	545	560	
Chromeo™ 546	545	561	
Cy3®	548	561	488,514
Alexa Fluor® 555	555	565	
HiLyte Fluor™ 555	550	566	
5-TAMRA	541	568	
Alexa Fluor® 546	556	573	532
DyLight® 550	562	576	
藻红蛋白(PE)	496,566	576	488
四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)	557	576	
EviTag™ quantum dots-Birch Yellow	560	580	
Cy3.5®	576	589	568,543
罗丹明红 X	570	590	
PE-Dyomics® 590	488	599	
EviTag™ quantum dots-Fort Orange	585	600	
ROX	575	602	
Alexa Fluor® 568	578	603	532
Red 613	480,565	613	
Texas Red®	595	613	568,543,514
HiLyte Fluor™ 594	593	616	
PE-Texas Red®	566	616	
Alexa Fluor® 594	590	617	
DyLight® 594	593	618	
EviTag™ quantum dots-Maple-Red Orange	600	620	
Alexa Fluor® 610	612	628	
Chromeo™ 494	494	628	
Alexa Fluor® 633	632	647	
SureLight® APC	652	657	
DyLight® 633	638	658	
别藻蓝蛋白(APC)	650	660	595,633,635,647
Chromeo™ 642	642	660	
Quantum Red	488	660	
SureLight® P3	614	662	
Alexa Fluor® 647	650	665	
Cy5®	647	665	595,633,635,647
PE-Cy5®	565	666	633,635
SureLight® P1	545	666	488
PE-Alexa Fluor® 647	567	669	
PE-Dyomics® 647	488	672	
DyLight® 650	654	673	
HiLyte Fluor™ 647	650	675	
多甲藻叶绿素(PerCP)	477	678	488
IRDye® 700DX	680	687	
Alexa Fluor® 660	663	690	
PE-Cy5.5®	565	693	488
APC-Cy5.5®	650	694	595,633,635,647
Cy5.5®	675	694	647
TruRed	490,675	695	
HiLyte Fluor™ 680	678	699	
Alexa Fluor® 680	679	702	
DyLight® 680	692	712	
Alexa Fluor® 700	702	723	
APC-Cy7®	650	774	595,633,635,647
Alexa Fluor® 750	749	775	
Cy7®	753	775	
PE-Dyomics® 747	488	776	
DyLight® 755	754	776	
HiLyte Fluor™ 750	753	778	
PE-Cy7®	566	778	488
IRDye® 800RS	770	786	
DyLight® 800	777	794	
IRDye® 800CW	778	794	
Alexa Fluor® 790	782	805	

核酸探针

氨基酸染料	激发光波长 (nm)	发射光波长 (nm)	激发光束 (nm)
DAPI	359	461	325,360,405,407
Hoechst 33258	352	461	
Hoechst 33342	350	461	
SYTOX Blue	431	480	
YOYO-1	491	509	
SYTOX Green	504	523	
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533	
光辉霉素	450	570	
SYTOX Orange	547	570	
色霉素A3	445	575	
CyTRAK Orange™*	457,488,549	615	
溴化乙锭	493	620	
碘化丙啶 (PI)	305,540	620	325,360,488
DRAQ5™	647	681,697	
DRAQ7™	599, 644	>678 to <697	

*CyTRAK Orange™ 可对细胞核和细胞质染色

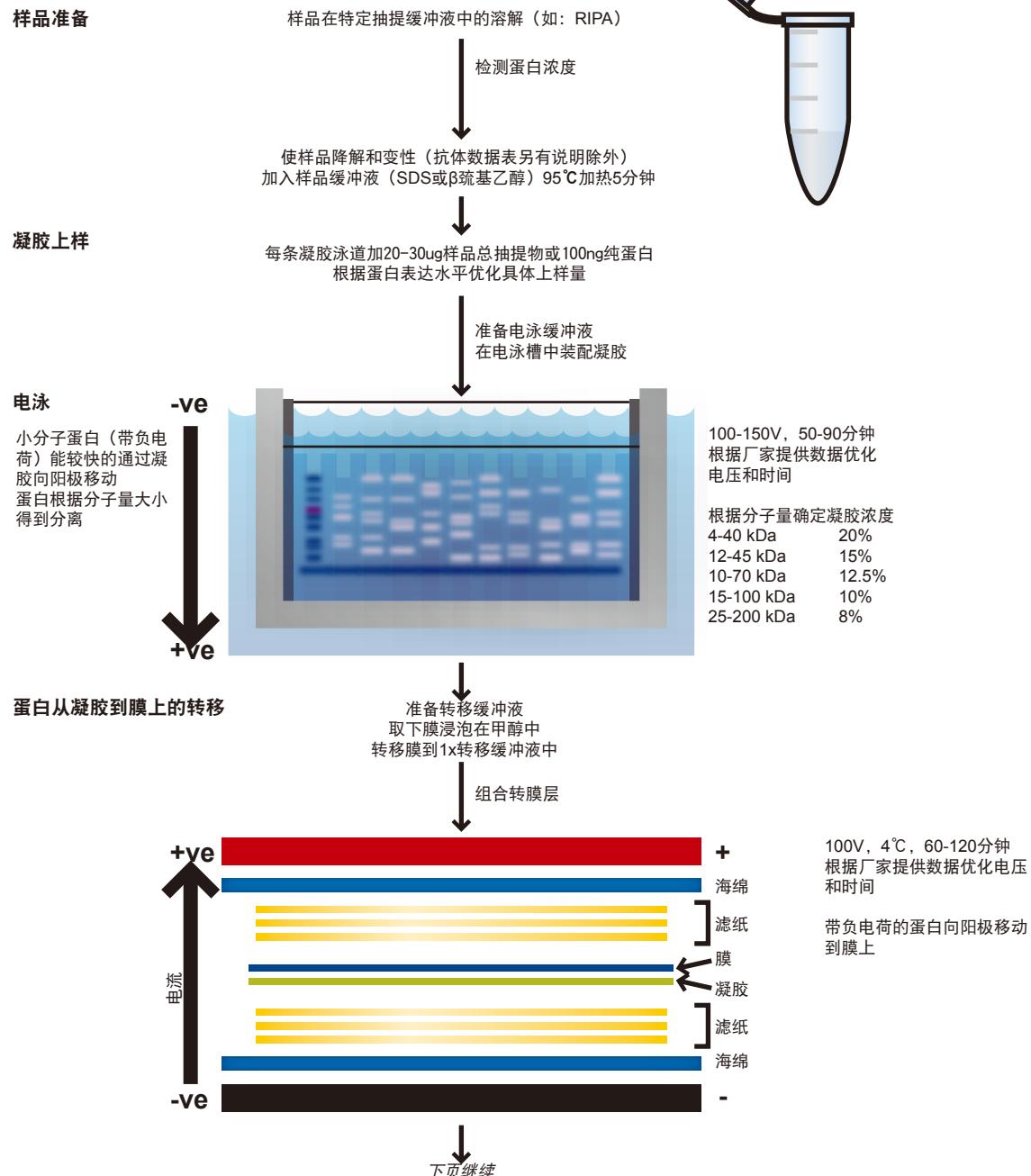
在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第五章：蛋白质印迹

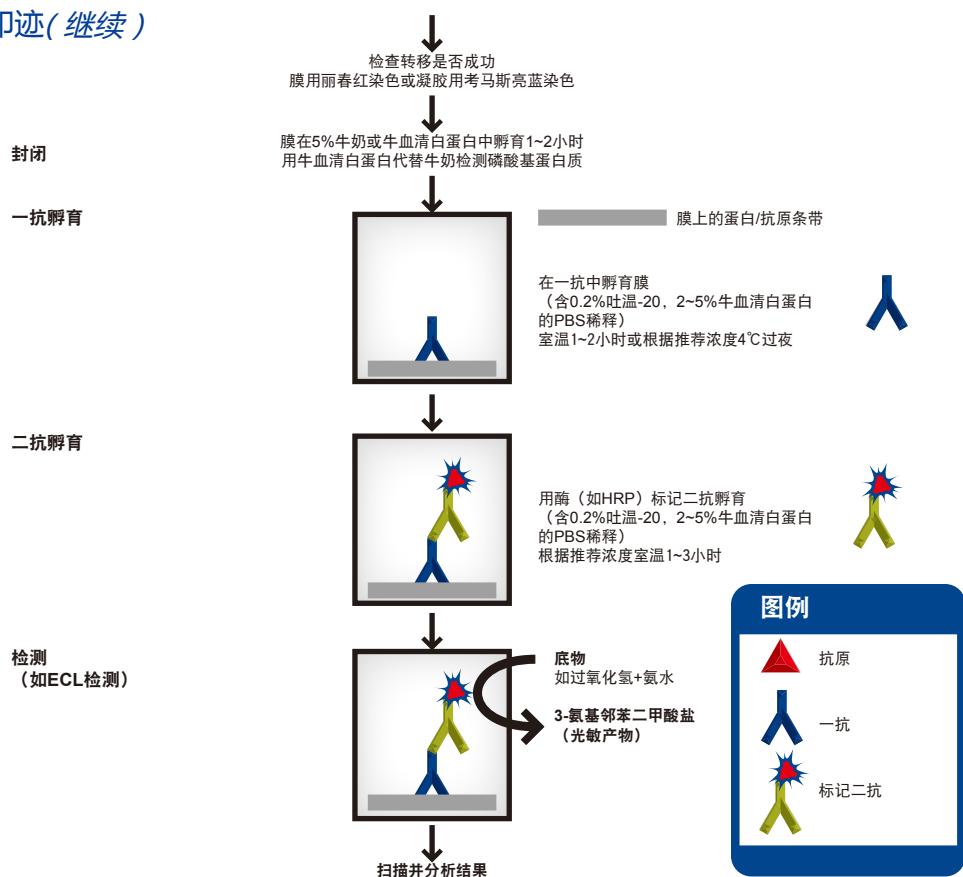
免疫印迹是利用聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测特定样品或提取物中某种特定蛋白的方法。聚丙烯酰胺凝胶紧贴着膜放置，常用的膜是硝酸纤维素或PVDF（聚偏乙烯氟化物），在电流的作用下蛋白质从凝胶迁移到膜上并且被固定。膜是凝胶蛋白质的复制品，然后可以与抗体结合后进行染色。

下面的免疫印迹模式图包括样品准备、凝胶电泳、凝胶到膜的转移以及检测蛋白的免疫染色。根据使用的电泳和转移设备，实验方案需要优化，建议读者参照厂家的说明书。

蛋白质印迹



蛋白质印迹(继续)



目录

5.1. 样品准备

裂解缓冲液
蛋白酶和磷酸酶抑制剂
细胞培养裂解物的制备
组织裂解物制备
蛋白质浓度的测定
凝胶上样准备

5.2. 电泳

PAGE凝胶的制备
阳性对照
分子量标准
上样和跑凝胶
内参的使用

5.3. 蛋白转膜和染色

凝胶内蛋白的显像
蛋白转膜
膜上蛋白的显像：丽春红
膜的封闭
一抗的孵育
二抗的孵育
显色方法

5.4. 参考文献

5.5. 疑难解答提示

5.1. 样品准备

裂解缓冲液

准备凝胶电泳的样品，需要对细胞和组织进行裂解以释放目的蛋白，这些可溶性蛋白能够穿过分离胶单独移动。裂解缓冲液有很多种，但用 来做 WB 试验的仅有少数几种。简单来说，它们溶解蛋白的能力不同，含有十二烷基硫酸钠和其他离子型去污剂的溶解能力最强。

大部分 Abcam 抗体能够识别降解和变性蛋白质，因此应该在降解和变性条件下使用该类抗体。需要注意的是一些抗体仅仅识别天然的、非变 性蛋白质，故不能识别经去污剂（SDS、脱氧胆酸盐、弱降解作用的 Triton X-100 和 NP40）作用的蛋白质。

选择裂解缓冲液首先要考虑选择的抗体是否识别变性的样品。如果不能，有关资料会列在抗体说明书上，应该使用不含去污剂的缓冲液或者 是相对温和的非离子型缓冲液（NP-40，吐温 X-100）。

蛋白定位和裂解液的选择

关于缓冲液的配方请参照 71 页缓冲液章节十一。

样品类型	裂解液
全细胞	NP-40或RIPA
细胞质（可溶性的）	Tris-HCl
细胞质（细胞骨架）	Tris-Triton
膜结合部分	NP-40或RIPA
细胞核	RIPA或核裂解液
线粒体	RIPA或线粒体分离方案

*专门或主要表达在亚细胞结构区域的蛋白在亚细胞裂解物中比在全细胞和组织裂解物中更为富集。这对于提取弱表达蛋白非常重要。例如，相对于全细胞或全组织裂解物来说，核表达蛋白在细胞核裂解物总蛋白中占有相当大的比例，这样凝胶条带中可以载入更多的目的蛋白。另一个优点是排除了杂质成分潜在的交叉反应。请参考我们的亚细胞结构分离技术方案。

Nonidet – P40 (NP40) 缓冲液

这是研究细胞质蛋白、膜结合蛋白或者全细胞抽提物等常用的一种缓冲液。如果目标蛋白不能完全从不溶性或凝集物中提取，RIPA 缓冲液将 会更合适，它包含的离子型去污剂能更好溶解蛋白。

RIPA缓冲液（放射免疫沉淀分析缓冲液）

这种缓冲液对全细胞提取物和膜结合蛋白都非常有用，对提取细胞核蛋白来说，这种缓冲液比只含有 NP40 或 Triton X-100 的缓冲液更受欢 迎。但它会破坏蛋白与蛋白之间的相互作用，因此这在免疫沉淀测定中会有些问题。

在需要保存蛋白与蛋白相互作用，或者将蛋白变性降到最低（例如，抗体只能识别一个非变性表位）时，应该使用不含离子型去污剂（SDS）的缓冲液和不含非离子型去污剂（Triton X-100）的缓冲液。用不含去污剂的裂解液，一般需配合机械剪切来裂解细 胞，常用的 Dounce 均浆器 或者将细胞反复通过注射器针头。这时简单的Tris缓冲液就足够了，但是对于膜结合蛋白或细胞骨架蛋白则需要含有去污剂的缓冲液。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

蛋白酶和磷酸酶抑制剂

一旦裂解发生，水解、去磷酸化和变性就开始了。如果样本在冰上或始终在 4° C 存放以及一开始就往裂解液中加入适当抑制剂的话，这些反应将可以大大减缓。

混合（“鸡尾酒”）的蛋白酶和磷酸酶抑制剂已经商品化，也可以自己研制抑制剂的配比。

抑制剂	蛋白酶或磷酸酶	在裂解液中的终浓度	贮备液（保存在 -20° C）
抑酶肽	胰岛素、胰凝乳蛋白酶、血纤维蛋白溶酶	2µg/ml	水稀释至 10mg/ml 一旦融化不能再使用
亮肽酶素	溶酶体	5-10µg/ml	水稀释，一旦融化不能再使用
抑肽素A	天冬氨酸蛋白酶	1µg/ml	甲醇稀释，1mM
苯甲基磺酰氟化物(PMSF)	丝氨酸半胱氨酸蛋白酶	1mM	乙醇稀释，可重复使用
乙二胺四乙酸 (EDTA)	需要 Mg++ 和 Mn++ 的金属蛋白酶	5mM	水稀释至 0.5M 调节 pH8.0
乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸 (EGTA)	需要 Ca++ 的金属蛋白酶	1mM	水稀释 0.5M 调节 pH 8.0
氟化钠	丝氨酸/苏氨酸磷酸酶	5-10mM	水稀释，一旦融化不能再使用
原钒酸钠	酪氨酸磷酸酶	1mM	水稀释，一旦融化不能再使用

原钒酸盐准备

所有步骤均在通风橱中进行。

1. 用双蒸水溶解原钒酸钠至 100mM。
2. 用盐酸调 pH 值至 9.0。
3. 加热至无色。为尽量减少由于蒸发所致体积减小，加热时加盖。
4. 冷却至室温。
5. 调 pH 值至 9.0。
6. 再次加热至无色。
7. 再次加热冷却重复以上循环直至加热冷却后溶液 pH 值保持在 9.0。
8. 用水补至起始体积。
9. -20° C 分装保存，若变黄则废弃。

细胞培养裂解物的制备

1. 将细胞培养皿放置冰上并用冰冷的 PBS 洗涤细胞。
2. 吸干 PBS 后，再加入冰冷的裂解液（每 107 细胞 / 100mm² 培养皿 / 150cm² 培养瓶加 1ml，每 5x10⁶ 细胞 / 60mm² 培养皿 / 75cm² 培养瓶加 0.5ml）。
3. 用预冷的塑料细胞刮刀将贴壁细胞从培养皿上刮下，然后轻轻将细胞悬液转移到预冷的小离心管中。
4. 4° C 持续振荡 30 分钟。
5. 4° C 预冷微型离心机中 16,000 × g 离心 20 分钟。
6. 从离心机中轻轻地取出离心管放置在冰上。将上清液吸出转移到预冷的新管（放在冰上）中，弃沉淀。

组织裂解物的制备

1. 用干净器械解剖所需的组织，最好在冰上，并快速操作以防止蛋白酶降解。
2. 将组织放入圆底离心管或 Eppendorf 管中，浸入液氮中“速冻”。样本在 -80° C 储存备以后使用或放在冰上立即匀浆。
- 对于约 5mg 组织，向管中迅速加入约 300µl 裂解液并用电动匀浆器均浆，裂解液冲洗刀片两次，每次 300µl，然后 4° C 持续振荡 2 小时（将回旋振荡器放入冰箱）。裂解液的体积根据组织总量来决定。蛋白提取物不宜过于稀释，以避免蛋白质损失，并尽量减少样品体积以便凝胶上样。最小浓度为 0.1mg/ml；最佳浓度为 1-5mg/ml。
3. 微型离心机 4°C 16,000rpm 离心 20 分钟。从离心机中轻轻地取出离心管放置在冰上。吸出上清液放入预冷的新管（放在冰上）中，弃沉淀。



缓冲液（含抑制剂）在匀浆前需预冷。

蛋白质浓度的测定

用 Bradford、Lowry 或 BCA 方法测定蛋白质含量，牛血清白蛋白是常用的蛋白标准。

一旦确定了每管的蛋白浓度就可以在 -20° C 或 -80° C 冷冻样品备用，或为免疫沉淀反应或凝胶上样做准备。

凝胶上样：变性的和天然的，还原的和非还原的

a) 变性、还原样品

抗体特异性识别目标蛋白的部位（即抗原表位）可能存在于蛋白的三维构型内部。为了能使抗体接近抗原表位，必须将蛋白的三维构型打开，即使蛋白变性。

要使蛋白质变性，使用含阴离子变性去污剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 的上样缓冲液，95-100° C 煮沸 5 分钟，或者在 70° C 加热 5-10 分钟，尤其是研究跨膜蛋白时，因为煮沸更易聚集，聚集物不能有效的进入胶中。

标准品上样缓冲液叫做2倍Laemmli缓冲液，最初描述在《自然》杂志上 (1970 Aug 15;227(5259):680-5.)。也可以用4倍和6倍的样品缓冲液，可以减少缓冲液对样品的稀释。2倍的样品缓冲液和样品以 1:1 的比例混合。

使用 SDS，通过 SDS 阴离子的粘附作用，所有的蛋白质都带负电荷，SDS 通过“缠绕”多肽链使蛋白变性。SDS 以 1.4:1 的比例结合到蛋白上，SDS 赋予多肽的负电荷数与蛋白的长度成比例，即变性的多肽成为负电荷云的“棒”，每一单位长度的多肽带有相同的电荷数或电荷云密度。

在变性 SDS-PAGE 中，迁移率不是由多肽固有的电荷数目来决定，而是由多肽的分子量来决定。SDS 的纯度尤为重要，蛋白质被染色的背景与蛋白条带能显示出 SDS 质量的好坏。

通过加入β巯基乙醇或二硫苏糖醇 (DTT)，按照分子量大小进行分离，在蛋白形成自由弯曲之前减少二硫键的形成是非常必要的。

上样缓冲液中加入甘油能增加样品的密度，使样品停留在样品池的底部，防止外溢和使凝胶上样不规则。

为了能看到蛋白的迁移，通常在上样缓冲液中加入小分子的离子型染料（如溴酚蓝）。染料在混合物中的迁移速度最快，能够提供一个迁移前沿来监测分离的过程。

蛋白质样品处理时，加热前后都要用漩涡振荡器彻底混匀样品，使溶解彻底。

b) 天然的未降解样品

有些抗体识别的抗原表位在抗原的天然构型中由非临近氨基酸组成。虽然这些氨基酸在原始序列中是彼此分开的，但它们在蛋白的三维结构中是相互靠近的。抗体只能辨认在折叠结构表面上的抗原。

在这样的情况下进行非变性条件 WB 是不可避免的，这一点会在产品的数据表上的应用部分提到。总之，非变性条件就意味着样品和电泳缓冲液中不加入 SDS，以及不加热样品。

有些抗体仅仅识别非还原形式的蛋白质，如氧化形式（特别是半胱氨酸残基）的蛋白质。引起降解的试剂β巯基乙醇和 DTT 必须从上样缓冲液和电泳缓冲液中除去。

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



拇指原则：只要数据表中没有指明就进行还原和变性。

5.2. 电泳

电泳可以是单相的（即一维分离）也可以是双相的。单相电泳常用来进行蛋白和核酸的分离，蛋白的双相电泳用于指纹-识别（即总蛋白成分分析）和细胞里所有蛋白的精确定位。

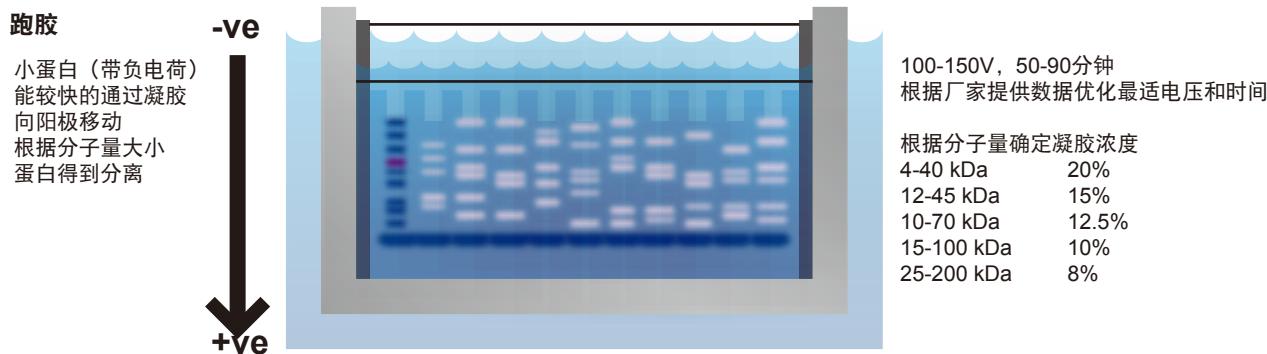
这里我们所描述的是单相电泳技术。我们推荐《Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach》（第三版，B. D. Hames 和 D. Rickwood 主编，实用方法系列，牛津大学出版社，1998年）这本书作为理解双相电泳的参考。

PAGE 凝胶的制备

聚丙烯酰胺凝胶电泳，英文简称是 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)，是根据蛋白质分子量来分离 蛋白质的基本方法。

聚丙烯酰胺凝胶由两种复合物混合而成，丙烯酰胺和 N,N-亚甲基丙烯酰胺（简称bis）。Bis 是凝胶的交联剂。通过加入过硫酸铵和 DMAP 或 TEMED 启动交联聚合作用。凝胶是中性，水溶性三维网状结构（通过亚甲基交联的碳氢化合物）。

凝胶对分子的分离取决于凝胶所形成的孔径大小。凝胶孔径的大小由两个因素决定：丙烯酰胺的总量 (%T) 和交联的数量 (%C)，当丙烯酰胺的比例升高，孔径降低。5% C 时孔径最小。C% 增加或减少，孔径也随之增大或减少。凝胶以百分比进行设计，并且有二个重要的参数。总丙烯酰胺指的是丙烯酰胺加上 bis 丙烯酰胺所占的百分比(w/v)。例如，7.5% T 表示 100ml 凝胶中有 7.5 g 丙烯酰胺和 bis。



凝胶可以商业购买或在实验室自己制备（配方可以在实验室手册上找到）。胶凝体的百分比对蛋白质迁移率和分离度至关重要。



拇指原则：目标蛋白分子量越小，mono/bis百分比越高；目标蛋白分子量越大，mono/bis的百分比越低。

蛋白大小 (kDa)	凝胶百分比 (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

丙烯酰胺是潜在的有累积作用的神经毒素：操作时要一直佩戴手套。

按照厂家说明将凝胶放在电泳槽中并且浸泡在电泳缓冲液中。

阳性对照

阳性对照裂解物用来表明试验是有效的并且是正确的，及可证明目标蛋白不在样本中表达。



当设定一个新实验时，我们强烈推荐使用阳性对照裂解物，这将提高试验的可信度。

分子量标准

跑在样品旁边的分子量标准能测定蛋白分子量的大小并且能监测电泳的进展。市面上有许多分子量标准可供选择。

Abcam有下列分子量标准：

货号 ab48854 (MW 70, 57, 40, 28, 18, 13.5 and 8.5 kDa)

货号 ab115832, Prism Protein Ladder (10-175 kDa)

货号 ab116027, Prism Ultra Protein Ladder (10-180 kDa)

货号 ab116028, Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa)

货号 ab116029, Prism Ultra Protein Ladder (3.5-245 kDa)

上样和跑凝胶

使用特定的凝胶上样吸头或微型注射器在狭窄的样品池中加入全部样品，注意不要用尖头刺破池的底部，否则会形成扭曲的条带。不要过度填充样品池，如果样品溢入旁边的样品池，将会影响结果。每个样品池装载 20-40 μ g 蛋白。

将凝胶浸泡在电泳缓冲液中，这些缓冲液通常包含 SDS，天然的凝胶电泳除外。

一个标准的 PAGE 电泳缓冲液，又叫运行 (running) 缓冲液，是1×氨基乙酸-甘氨酸（参见第 71 页的缓冲液章节）。

跑凝胶时按照厂家推荐的时间进行，这些可以随着仪器的改变而变更（根据电压，1 小时至过夜）。

当染料分子（“迁移前沿”）到达凝胶的底部，关闭电源。此时蛋白会从凝胶上慢慢的洗脱，因此不要保存在凝胶里，要迅速进行下一步的转移操作。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

内参的使用

内参是用来检测凝胶中的泳道是否载有相同的上样量。在比较不同样品的蛋白表达水平时这一点尤其重要。这对检查整个凝胶的平均转膜亦十分重要。如有上样或转膜不平均的情况，内参对照可用来定量每条泳道的蛋白量。对于准备发表出版的试验，加入对照是绝对必需的。

内参	样品类型	分子量 (kDa)	注意事项
β肌动蛋白	全细胞/细胞质	43	不适用于骨骼肌样品，细胞生长条件的改变和细胞外基质成分的相互作用可能会改变肌动蛋白的合成 (Farmer et al, 1983)
GAPDH	全细胞/细胞质	30-40	一些生理因素例如缺氧症和糖尿病会增强 GAPDH 在特定细胞中的表达
微管蛋白	全细胞/细胞质	55	微管蛋白的表达随着抗菌和抗有丝分裂活性药物而改变 (Sangrajrang S. et al, 1998; Prasad V et al, 2000)。
VDCA1/膜孔蛋白	线粒体	31	-
COXIV	线粒体	16	许多蛋白像 COXIV 出现在 16kDa 的位置
核纤层蛋白 B1	细胞核	66	不适合核膜被除去的样本
TATA 结合蛋白TBP	细胞核	38	不适合 DNA 被除去的样本

5.3. 蛋白转膜和染色

凝胶内蛋白的显色

蛋白显色的阶段非常重要，可以知道蛋白迁移的是否均匀、平坦。如果分离后的蛋白需要转膜，就用铜染，因为考马斯蓝染色是不可逆的。考马斯蓝染色只用来检测转移的有效性，或者蛋白不需要转膜时，只用于观测蛋白 SDS-PAGE 分离的结果。

a) 考马斯蓝染色

电源关闭，分离的蛋白带就会扩散，因为蛋白在溶液中是可溶的，为了防止扩散，凝胶中加入 40% 双蒸水、10% 醋酸、50% 甲醇，能使蛋白质沉淀（变成不溶性的）。在上述溶液中加入 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 使被固定的蛋白染色，在摇床上保持摇动，室温，4 小时至过夜。转移凝胶至 67.5% 双蒸水、7.5% 醋酸、25% 甲醇混合物中（染料混合物保存起来，可多次重复使用）润洗，一直在摇床上震荡，中间更换润洗液，直到洗去多余染料。染料不会结合到丙烯酰胺上，凝胶背景清晰，凝胶中的蛋白条带染成深蓝色。

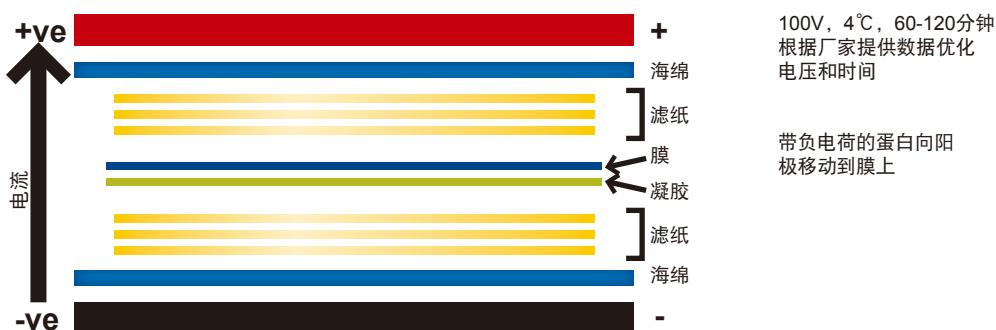
b) 铜染法

电泳凝胶用蒸馏水清洗数秒钟（最多 30 秒），然后转移至 0.3 M CuCl₂ 溶液中染色 5-15 分钟，再用去离子水洗一次，在暗背景下观察，在蓝色胶背景下蛋白出现透明条带。

将胶置于 0.1-0.25 M Tris/0.25 M EDTA pH 8.0 缓冲液中漂洗凝胶完全脱色，根据厂家说明再置于电转缓冲液中开始转膜。

蛋白转膜

- 详细的转膜操作可以在电转仪厂家的网页上找到，不同的系统操作也有区别。蛋白从凝胶至膜的转移应用的原理是电荷在电场中的迁移。
- 转膜方式分为半干转移和湿转移两种，半干式转膜速度快，而湿式转膜不会因为膜的干燥而失败，因此成功率高并特别适合用于分子量大于 100kDa 的蛋白。两种转膜方式都是膜紧贴凝胶，位于两层吸收材料之间，固体夹板夹在外面以保证膜和凝胶的紧密接触。
- 湿式转膜中膜和凝胶的三明治结构位于滤纸和海绵体之间（海绵/纸/胶/膜/纸/海绵），全部紧密排列，特别是胶/膜之间不能留有气泡。整个三明治结构浸泡在转移缓冲液中，然后施加电场。带负电荷的蛋白向阳极移动。但膜阻挡了它们，并与其进行结合，从而阻止了它们的继续移动。凝胶一般在 100V 条件下运行 1~2 小时，时间和电压可以优化，我们推荐根据厂家的说明进行操作。



4. 标准的湿转缓冲液和电泳缓冲液一样，为不含 SDS 的 1X Tris-gly 缓冲液，加入甲醇至终浓度 20%。如果转膜的蛋白分子量大于 80kDa，则推荐加入 SDS 使之终浓度为 0.1%。

5. 半干式转膜中，三明治结构纸/凝胶/膜/纸用转移缓冲液浸湿，直接置于电转仪的正负极之间。在进行转移时，要注意一定要使膜紧贴阳极而胶紧贴阴极。所用的电转缓冲液中 Tris 和甘氨酸的比例不一定和湿转的相同，需参考厂家的仪器说明书。标准配方是：48mM Tris、39mM 甘氨酸、0.04% SDS、20% 甲醇。

6. 两类膜可供选择：硝酸纤维素膜和 PVDF 膜（正电荷尼龙膜）。PVDF 膜需要小心地进行前处理：剪出大小合适的膜，在甲醇中浸泡 1-2 分钟，再孵育于冰冷的电转缓冲液中 5 分钟。胶也需在冰冷的电转缓冲液中平衡 3-5 分钟，否则转膜时会起皱导致条带变形。

大蛋白和小蛋白转膜时的注意事项

电转移缓冲液中 SDS 与甲醇的平衡、蛋白大小、胶浓度都会影响转膜效果，如下调整可以增加转膜效果。

大蛋白（大于100 kDa）

1. 对于大蛋白而言，其在凝胶电泳分离迁移较慢，而从凝胶转出也非常慢，因此对于这种大分子量蛋白应该用低浓度的凝胶，8% 或更低，但因低浓度的胶非常易碎，所以操作时需十分小心。

2. 大蛋白易在凝胶里形成沉淀，从而影响转膜。转膜时在电转移缓冲液加入 SDS 至终浓度 0.1%，避免出现这种情况。甲醇易使 SDS 从蛋白上脱失，因此相应降低甲醇的浓度至 10% 或更低，以防止蛋白沉淀。

3. 降低电转移缓冲液中甲醇的比例，这样可以促进凝胶的膨胀，更易于大蛋白的转出。

4. 只有使用硝酸纤维素膜时，甲醇才是必需的。如果是 PVDF 膜，甲醇可以不必加入电转移缓冲液中，但转膜前 PVDF 需用甲醇活化。

5. 选择湿式，4°C 转膜过夜，以取代半干式转膜。

小蛋白（小于100 kDa）

1. SDS 阻止蛋白与膜的结合，小蛋白更是如此。因此，对于小分子的蛋白，电转移缓冲液中可以不加 SDS。

2. 保持 20% 的甲醇浓度

对于大于 500kDa 的蛋白，请参考下述文献：

Bolt and Mahoney, High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide, gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 247, 185 – 192 (1997).



更多的转膜技巧：

避免手指直接接触膜，应使用镊子，手指上的油脂与蛋白会封闭转膜效率并易产生背景污斑。

在滤纸间排列凝胶和膜时，尽量用移液器或 15ml 试管赶除胶与膜之间的气泡，或在转移缓冲液中进行以防止气泡产生，请戴手套！

确认裁剪的膜和滤纸与凝胶尺寸相同，边缘太大会导致在进行半干式转膜时电流不能通过膜。

鸡抗体易与 PVDF 膜和其它尼龙膜结合，导致高背景，请替换成硝酸纤维素膜以降低背景。

膜上蛋白的显像：丽春红

为检测转膜是否成功，用 TBST 洗膜（TBST 溶液的配制详见 71 页缓冲液章节）。准备贮备液：2% 丽春红 S 溶于 30% 三氯乙酸和 30% 碘基水杨酸，室温下震荡 5 分钟。1:10 稀释贮备液。

然后将膜浸泡在水中直至水变清且蛋白条带清晰。

用 TBST 或水重复洗膜直至膜完全脱色，PVDF 膜需用甲醇活化后再用 TBST 洗。

膜的封闭

有两种传统封闭液：脱脂奶粉或 BSA（Cohn 因子 V），脱脂奶粉成本低但不能用于磷酸化蛋白（因脱脂奶粉含有酪蛋白，该蛋白本身就是一种磷酸化蛋白，会结合磷酸化特异性抗体而易产生高背景。）

为防止一抗或/和二抗与膜的非特异性结合，需要进行膜的封闭。

某些抗体用 BSA 封闭时可能会产生比脱脂奶粉更强的信号，请仔细阅读说明书，以确定有无特殊封闭膜方法。

用封闭缓冲液封闭 1 小时，4° C 震摇，封闭后用 TBST 洗 5 秒。

一抗的孵育

孵育缓冲液

按抗体说明书建议的稀释倍数，用 TBST 稀释一抗。如果说明书没有建议稀释倍数，则参照一般推荐的稀释倍数 (1:100-1:3000) 进行预试验，根据试验结果选择合适稀释倍数，一抗浓度过高会导致产生非特异性条带。

某些实验室传统上在封闭液中孵育抗体，而有些实验室用不含封闭剂的 TBST 来孵育抗体，结果因抗体而异，有时两者结果相同，有时结果不同。



如果不存在高背景的问题，某些抗体用含低浓度 (0.5 – 0.25%) 脱脂奶粉或 BSA 的封闭液甚至二者都不含的封闭液来稀释，可产生相对更强的信号条带。

孵育时间

一抗的孵育时间可从几小时至过夜（一般不超过 18 小时）不等，具体取决于抗体与蛋白的亲和性和蛋白的丰度，建议使用较高的抗体稀释倍数和较长的孵育时间来保证特异性结合。

孵育温度

如果在封闭液中孵育过夜，应在 4°C 进行，否则污染会导致蛋白降解（特别是磷酸基团）。孵育一抗时需保持适当的摇动使之均匀覆盖膜，防止结合不均匀。

二抗的孵育

一抗孵育结束后，用 TBST 摆动洗膜数次，每次 5 分钟或更长，去除残留的一抗。

孵育缓冲液和稀释：

按说明书推荐的倍数用 TBST 稀释二抗，如果说明书没有标出稀释倍数，则按常规的倍数稀释 (1:1000- 1:20,000) 预实验，二抗的浓度过高 也会导致非特异性条带。

可以在封闭液中孵育二抗（和一抗），但可能在降低背景同时导致特异性条带的信号也减弱，可能是封闭剂阻碍了抗体与靶蛋白的结合。

孵育时间和温度：

室温振荡 1-2 小时。

标记物：推荐使用 HRP 标记二抗，不建议使用 AP（碱性磷酸酶）标记二抗，因其不够灵敏。

显色方法

检测试剂盒：

HRP 标记二抗：传统上使用 ECL 和 ECL+（自制或购买），推荐使用后者。对于新一代检测仪器例如 Genegnome，请用仪器制造商推荐的试剂盒。

我们不推荐 ECL 或 BCIP/NBT 试剂盒，因为不够灵敏。

X-ray 胶片：

传统上使用手工曝光的方法，可控制 X-ray 胶片在曝光剂和定影剂的时间。而全自动 X-ray 胶片曝光器已经广泛使用且操作简便。



**过度曝光的胶片不适合用于分析，因为不能判定相对蛋白量。
过度曝光导致全暗的背景没有反差和/或产生大量的非特异性条带。**

数字图像显影：

新一代的胶片显色方法是使用数码相机在暗室中拍摄膜上的化学发光，将其转成数字信号，再通过仪器自带的软件进行分析。

一系列的数字成像仪都已经商品化。新一代数字成像仪不使用 HRP 标记抗体（即化学发光），如 STORM 分析仪只检测荧光标记二抗， Odyssey 红外线成像系统探测红外线荧光。

5.4. 参考文献

Harlow, Ed, and David Lane. Using Antibodies. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

B.D. Hames and D. Rickwood. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach 3rd Edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press, 1998.

Bolt and Mahoney, High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide, gel electrophoresis. Analytical Biochemistry **247**, 185 – 192 (1997).

5.5. 蛋白印迹疑难解答提示

无信号

一抗和二抗不匹配

二抗需和一抗宿主的物种相同（如一抗来自兔，二抗为抗兔抗体）。

没有足够的一抗或二抗结合目标蛋白

使用高浓度抗体，延长 4°C 孵育时间（如过夜）。

封闭剂与一抗或二抗有交叉反应

使用温和的去污剂如吐温-20，或更换封闭剂（常用的脱脂奶粉、BSA、血清或明胶）。

一抗不识别检测物种的蛋白

参照说明书，比对免疫原序列和蛋白序列以确保抗体和目的蛋白会发生反应，设置阳性对照。

抗原量不足

每泳道蛋白上样量不低于 20-30 µg，使用蛋白酶抑制剂并设置阳性对照。

组织中目的蛋白含量低

浓缩使信号最大化（例如检测核蛋白要用核裂解物）。

转膜不充分

使用可逆染色剂例如丽春红 S 检测转膜效果，检查转膜操作是否正确。PVDF 膜需预先浸在甲醇中，然后浸到转移缓冲液中。

洗膜过度

勿过度洗膜。

过度封闭使目标蛋白不能显色

代替 5% 脱脂奶粉，使用含 0.5% 脱脂奶粉或无脱脂奶粉的抗体稀释液，或更换封闭剂，减少封闭时间。

一抗失效

使用新鲜抗体，重复使用有效浓度会降低。

二抗受叠氮钠抑制

避免叠氮钠和 HRP 标记抗体一起使用。

检测试剂盒过期和底物失活

使用新鲜的底物。

背景高**未进行非特异性封闭或封闭不充分**

延长封闭时间，考虑更换合适的封闭剂。Abcam 推荐 5% 脱脂奶粉、3% BSA 或血清封闭 30 分钟。这些可以包含在抗体缓冲液中。

一抗浓度过高

稀释抗体至合适浓度，以更高稀释度抗体孵育更长时间（耗时长但特异性结合最好）。

抗体孵育温度过高

4°C 孵育。

二抗与封闭剂非特异性结合或反应

设置二抗对照(不加一抗)。

一抗或二抗与封闭剂有交叉反应

在孵育和洗涤液中加入温和去污剂如吐温 -20。脱脂奶粉含有酪蛋白，该蛋白本身就是一种磷酸化蛋白，会结合磷酸化特异性抗体而易产生高背景。使用 BSA 代替奶粉作为封闭剂。

未结合蛋白质洗涤不充分

增加洗涤次数。

膜的选择导致的高背景

NC 膜比 PVDF 膜背景低。

膜干燥

在孵育过程中防止膜变干，在任何步骤都保证膜有充分的反应液，放入搅拌子不断搅动或轻轻振荡使膜浸在溶液中，避免出现干膜现象。

多带现象**细胞传代次数过多，使其蛋白表达不同**

使用原始未传代的细胞株，和现在的细胞株一起做平行对照实验。

体内表达的蛋白样本具有多种修饰形式如乙酰化、甲基化、烷基化、磷酸化、糖基化等

查阅文献，使用试剂使样品去磷酸化、去糖基化来验证翻译后的修饰。

蛋白样本降解（蛋白质分子量降低）

在样品缓冲液中加入足够的蛋白酶抑制剂。

检测到未经报道过的新蛋白或同一蛋白家族中具有相似表位而结构不同的蛋白

查阅其它文献报道，或 BLAST 搜寻，使用说明书推荐的细胞株或组织。

一抗浓度过高，高浓度时常出现多条蛋白带

降低抗体浓度和/或孵育时间。

二抗浓度过高，高浓度产生非特异性结合

降低抗体浓度，增加二抗对照（不加一抗）。

抗体未经纯化

使用亲和纯化的抗体，减少非特异条带。

条带为非特异性条带

应用封闭多肽来区分特异性和非特异条带，只有特异条带能被封闭从而消失。

靶蛋白形成多聚体

SDS-PAGE 电泳上样前，煮沸 10 分钟而不是 5 分钟，使蛋白质解聚。

背景有不均匀的白色斑点

转膜时膜上有气泡或抗体在膜上分布不均

转膜过程中尽量去除气泡，抗体孵育时保持摇动。

背景有黑色斑点

抗体结合了封闭剂

过滤封闭剂。

深背景出现白色条带（非预期背景）

一抗或二抗加入过多

稀释抗体的浓度。

分子量蛋白标准条带呈黑色

抗体和分子量蛋白标准发生了反应

在分子量蛋白标准和第一个样品之间增加一个空白条带。

目的条带染色过低/过高

分离不彻底

改变凝胶比例：分子量大的蛋白用低浓度胶，分子量小的蛋白用高浓度胶。

“微笑”条带

迁移过快

电泳温度过高（改变了 pH 值和迁移速度）

降低迁移速度或低温电泳(冷库或冰上)。

相同的蛋白杂交出现大小不均匀条带

制备凝胶时凝胶凝固太快，致使泳道中丙烯酰胺的比例不均匀

参照凝胶的配方，在凝胶中加入适量 TEMED，放置时在凝胶顶部加入适量 0.1% SDS（水稀释）以防凝胶变干。

凝胶染色不均匀

细菌污染

4°C 保存抗体并使用新鲜的缓冲液浸泡凝胶。

抗体量不足

确保在振荡孵育时抗体充分浸没膜。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

更多关于 WB 的实验程序

在我们的网页中还有许多更重要 WB 的操作，参考以下地址以获得更多的信息：

用免疫肽进行封闭

www.abcam.cn/blockingwithimmunizingpeptide

去磷酸化作用

www.abcam.cn/dephosphorylation

组蛋白印迹

www.abcam.cn/histoneblotting

组蛋白提取

www.abcam.cn/histoneextraction

线粒体纯化

www.abcam.cn/mitochondrialpurification

核分离

www.abcam.cn/nuclearfractionation

磷酸化蛋白质

www.abcam.cn/phosphoproteins

可溶物(S-100)分离

www.abcam.cn/solublefractionation

再杂交洗提

www.abcam.cn/strippingforreprobing

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第六章：免疫组织化学和免疫细胞化学

6.1 IHC-石蜡技术指南 (IHC-P)

免疫组织化学 (IHC) 是确定组织切片上蛋白的存在与否及存在位置的一种方法。尽管这种方法在定量分析时灵敏度较免疫印迹法或 ELISA 等免疫测定方法低，但是它能观察到整个组织的情况。适用于评估癌症等疾病的发展及治疗情况。因此，从 IHC 获得的信息结合显微技术提供了一副“宏图”，使来自其它方法的数据有据可依。

免疫组织化学染色是抗体识别靶抗原的过程。因为抗体是高度特异的，因此它只与组织切片上相应的蛋白结合。应用显色检测法即能看到抗原-抗体反应，一种显色方法是将与酶结合的抗体作为底物在蛋白位点产生一种色素沉着，另外一种方法是荧光检测法，即将荧光染料结合到抗体上，应用荧光显微技术检测。

IHC-P 涉及到固定（通常在中性甲醛溶液中固定）组织的染色，然后是在切割之前的石蜡包埋。下面是 IHC-P 技术的基本步骤：

1. 组织的固定和包埋
2. 切割并封固切片
3. 脱蜡复水
4. 抗原修复
5. 免疫组织化学染色
6. 复染（如果需要）
7. 脱水并用封固剂封固
8. 显微镜下观察染色

目录

优化 IHC-P 新抗体

1. 抗原修复
2. 一抗浓度
3. 检测

固定

脱蜡

抗原修复

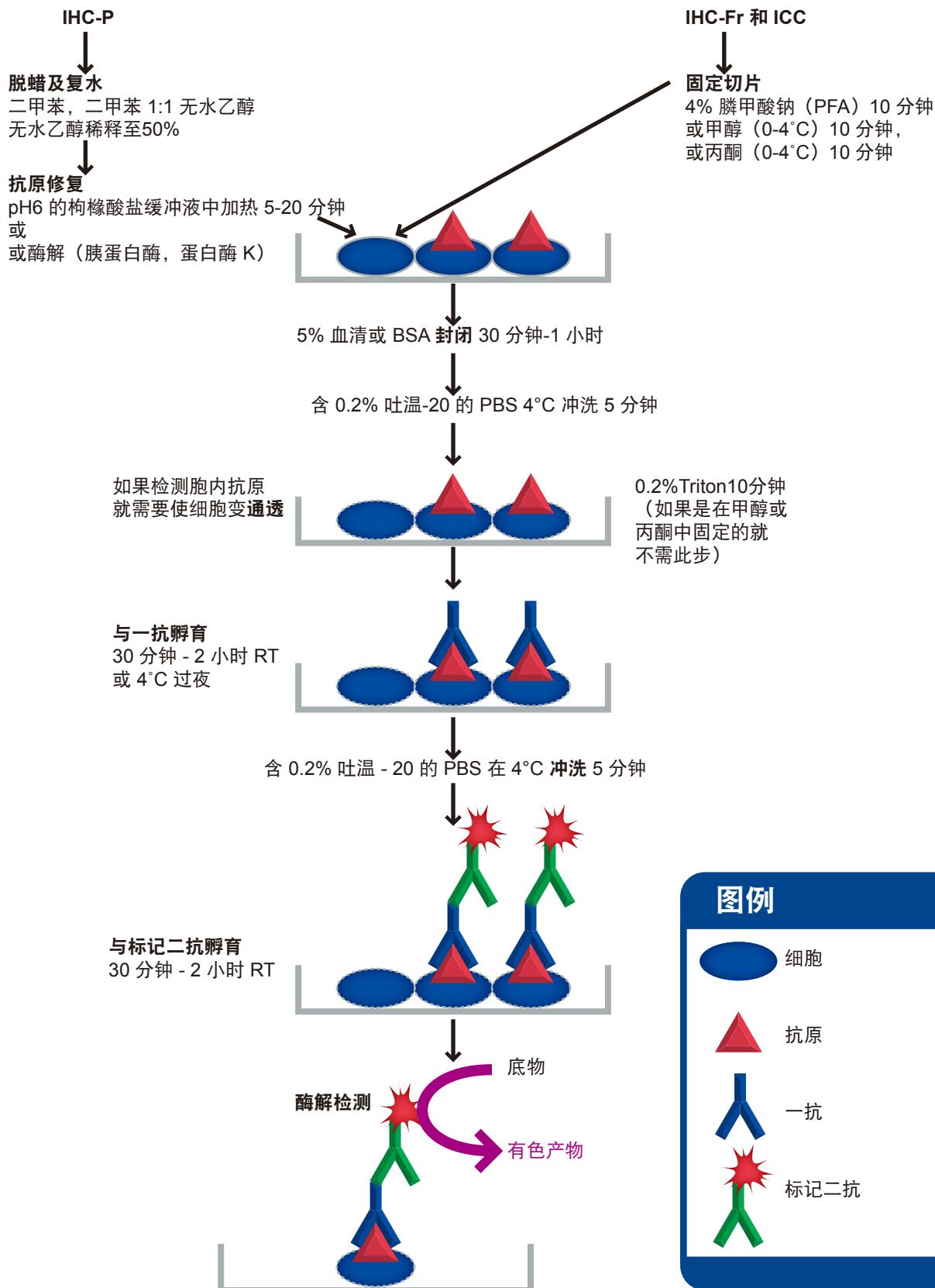
1. 热诱导抗原表位修复的缓冲溶液
2. 热诱导抗原表位修复方法
3. 具有酶活性抗原的修复

免疫组织化学染色和检测实验方案

1. 一般指南
2. 手册
3. 对照
4. 信号放大

相关资料

免疫组织化学染色



优化 IHC-P 新抗体

一种新抗体要应用到 IHC-P 中，就必须找到适宜这种抗体的染色条件。每种抗原都有一个最佳修复方法。每种抗体都有一个最佳稀释浓度。

抗原修复

试着在没有抗原修复和应用下列抗原修复方法修复抗原的情况下染色，详细操作见抗原修复部分（第 30 页）。

1. 热修复：枸橼酸钠 10 mM, pH 6.0
2. 热修复：Tris/EDTA pH 9.0
3. 酶解：胰蛋白酶、胃蛋白酶或其它蛋白酶。

抗原修复的最佳方法确定后，就可以进行最佳抗体浓度的确定了。

一抗浓度

如果抗体浓度未知，我们建议用 0.5 µg/ml 和 5 µg/ml 4° C 过夜。如果抗体未经纯化，我们建议开始时使用下面的初始稀释度，也可以尝试 20 倍的高倍稀释度。

1. 全抗血清：1/50
2. 腹腔积液：1/100
3. 组织培养上清：不稀释（也指“neat”）

检测

我们建议使用辣根过氧化物酶 (HRP)，在光学显微镜下观察。过氧化物/DAB 作为底物和色素原。荧光显微镜方法中有多种荧光染料标记的抗体，具体用哪一种要根据试验需要来进行选择。

固定

正确的固定是免疫组织化学方法的关键。最常用的是 10% 中性甲醛溶液 (NBF)。Abcam 说明书推荐 IHC-P 使用该固定剂，除非另有说明。其它不常用的固定剂如多聚甲醛 (PFA) 或 Bouin's 液（甲醛/苦味酸）等。这些固定剂的配方详见缓冲液部分，第 71 页。

理想的固定时间取决于组织块的大小和类型。对于大多数组织来说，通常固定时间在 18-24 小时之间较为理想。固定不足会导致组织切片因边缘染色而信号强，中间未染上而无信号。固定过度将会屏蔽抗原表位。抗原修复有助于克服屏蔽作用，但是如果固定时间太长（比如一个星期）那么抗原修复也无济于事。

固定后，将组织块包埋于石蜡中，用切片机切成理想厚度（依据组织一般大约在 5-20 微米），然后将切片附着在玻片上，封固最好用正电荷吸附或 3-氨基-丙酯-三-乙氧基-硅烷 (APES)，室温过夜脱水并彻底干燥。如果切片不能很好的附着在玻片上，可以将其至于 60° C 放置数小时。

脱蜡

在开始染色之前，切片必须先脱蜡至水。脱蜡不彻底，就会使切片很难染上色。

材料及试剂

- 二甲苯
- 无水乙醇
- 95% 乙醇

方法

将切片置于架子上，依据下列方法冲洗：

1. 二甲苯：2 X 3 分钟
2. 二甲苯与无水乙醇 1:1 混匀：3 分钟
3. 无水乙醇：2 X 3 分钟
4. 95% 乙醇：3 分钟
5. 70 %乙醇：3 分钟
6. 50 % 乙醇：3 分钟
7. 冷的自来水小水流冲洗

在开始抗原修复前确保切片一直浸没在水中以防变干，否则特异抗体不易结合且会有很高的染色背景。

抗原修复

大多数甲醛固定的组织在开始染色之前都需要先修复抗原，这是由于在固定过程中产生了亚甲基桥使蛋白之间交联屏蔽了抗原位点。两种抗原修复方法为热修复法（称之为热诱导抗原表位修复或 HIER）和酶解法。

这些修复方法原理都是将亚甲基桥打断，使抗原表位暴露出来，以便于抗体结合。有的抗原适合酶解修复，有的抗原适合热修复。酶解修复有时会损坏组织的形态结构，因此需要摸索酶浓度和作用时间。Tris/EDTA pH 9.0 的缓冲液适合于大多数抗原，pH 6.0 的枸橼酸钠缓冲液较为常用。以下网站解释了为什么 Abcam 建议首选 Tris/EDTA pH 9.0 的缓冲液而不是 pH 6.0 的枸橼酸钠缓冲液。www.nordiqc.org/Techniques/Epitope_retrieval.htm

热抗原修复需要高压锅、微波炉或蒸煮锅。另外，一些实验室将玻片置于修复溶液中 60° C 水浴过夜。除非抗原修复方法在抗体数据表中可以找到，否则必须通过实验来确定适宜的修复。Abcam 建议尝试多种方法来确定适宜的修复方法，以便于获得理想的染色。

1. 热修复缓冲溶液

下面是三种HIER较为常用的缓冲溶液，对于一个特定的抗体，在没有其他研究者建议的情况下，要通过实验确定选用哪种修复缓冲液。

1. 枸橼酸钠缓冲液 (10 mM Sodium Citrate, 0.05% 吐温- 20, pH 6.0)
2. 1 mM EDTA, 调至 pH 8.0
3. Tris/EDTA 缓冲液 (10mM Tris, 1 mM EDTA 溶液, 0.05% 吐温-20, pH 9.0)

2. 热修复法

a) 高压蒸汽法

玻片要置于金属架上

材料及试剂

- 家用不锈钢高压锅
- 加热板
- 玻片架放置容器（容量大约 400-500ml）
- 抗原修复缓冲液（如 Tris/EDTA pH 9.0, 枸橼酸钠 pH 6.0）

方法

1. 将合适的抗原修复缓冲液加入高压锅内，然后将锅置于加热板并开至最大功率，此时不要把盖子盖紧。在等待煮沸过程中，按前面描述进行脱蜡至水。
2. 煮沸后，将玻片从自来水中取出放入高压锅内。小心热溶液 - 使用镊子。依照说明书加上加压阀。
3. 高压锅达到最大压力后（见操作手册），维持 3 分钟（见注意事项 1）。
4. 3 分钟过后，关掉加热板，将高压锅取下放置。
5. 打开高压锅阀门（见操作手册），冷水冷却锅身。压力降下后，打开锅盖，冷水冷却 10 分钟。小心热溶液使用注意事项（见注意事项 2）。
6. 参照手册继续染色。

注意事项：

1. 3 分钟只是抗原修复的建议时间。低于 3 分钟可能会使修复不彻底，导致染色较弱。而超过 3 分钟可能会使修复过度，导致非特异性背景染色，同时增加切片离解的几率。因此需要做对照试验，同样的组织切片分别修复 1、2、3、4、5 分钟后开始染色，针对所用的特异抗体选择最佳修复时间。
2. 确保玻片彻底冷却可以便于下一步操作，而且使抗原表位在经历高温后复原。

b) 微波法

不建议使用家用微波炉。因为它会导致抗原修复时冷热不均。而且由于没有高压环境，修复时间较长，会使切片解离。建议使用科研专用微波炉较为合适。大多品牌的科研专用微波炉都有加压装置，能持续保持 98° C 从而避免切片解离。唯一的缺陷就是它的价格昂贵。

使用该方法时，修复缓冲液煮沸会大量蒸发，要确保缓冲液的量，不能使切片变干。



玻片要置于塑料架子和塑料容器内，玻璃架和玻璃容器在加热时会破裂。

材料和试剂

- 家用 (850W) 或科研专用微波炉
- 微波炉专用玻片放置架及容器（容量大约 400-500ml）或染色缸
- 抗原修复缓冲液（如 Tris/EDTA pH 9.0, 枸橼酸钠溶液 pH 6.0, 等等）

方法

1. 按前面描述将切片脱蜡至水。
2. 向微波炉专用容器中加入合适的修复缓冲液（见注意事项 1）
3. 从自来水中取出切片并放入容器中，置于微波炉内。如果用家用微波炉，就将之开到最大功率至开始沸腾并煮沸 20 分钟。如果采用科研专用微波炉，就将温度设置在 98° C 维持 20 分钟以修复抗原（见注意事项 2）。
4. 20 分钟后，取出容器放置水中冷却 10 分钟。小心热溶液（见注意事项 3）。
5. 参照手册继续染色。

注意事项

1. 使用非密封的容器，要确保修复缓冲液足以浸没切片几厘米，防止在煮沸过程中切片变干。
2. 20 分钟只是抗原修复的建议时间。低于 20 分钟可能会使修复不彻底，导致染色较弱。而超过 20 分钟可能会使修复过度，导致非特异性的背景染色，同时会增加组织切片从玻片上解离的几率。因此需要做对照试验，同样的组织切片分别修复 5、10、15、20、25、30 分钟后开始染色，针对特异抗体选择最佳修复时间。
3. 确保玻片彻底冷却可以便于下一部操作，而且使抗原表位在经历高温后复原。

c) 蒸煮锅法

许多实验室使用蒸煮锅或电饭煲加热。此方法与微波法相似，都是将缓冲液温度维持在 100° C，不同之处在于沸腾时此方法没有微波法反应激烈。该方法也可用 100° C 水浴代替。



玻片要置于塑料或金属架子容器内，玻璃架和玻璃容器在加热时会破裂。

材料和试剂

- 蒸煮锅
- 玻片放置架及容器（容量大约 400-500ml，如果采用 Tissue – Tek 容器大约 250ml）
- 抗原修复缓冲液（如 Tris/EDTA pH 9.0, 枸橼酸钠溶液 pH 6.0, 等等）

方法

1. 按前面描述将切片脱蜡至水。
2. 依据用户手册设置蒸煮锅并预热。
3. 在烧瓶中加热适量修复缓冲液并煮沸（用微波炉加热会更方便）。
4. 将盛放玻片架的容器放置蒸煮锅中。
5. 将热修复缓冲液小心加到容器中，然后放入玻片架。也可以采用更简捷的操作，先向容器中加热修复缓冲液再放入蒸煮锅中。
6. 加盖。盛放缓冲液的容器也须配备盖子。刚开始时玻片架可能会使修复溶液温度降低，但几分钟内会回升到 95-100° C 之间。
7. 达到温度后维持 20 分钟。（见微波法注意事项 1）
8. 20 分钟后，取出容器放置水中冷却 10 分钟。热溶液使用注意事项（见微波法注意事项 2）。
9. 依据手册开始组织染色。

3. 酶解抗原修复法

依据抗体数据表中选择需要的酶。如果没有，那么胰蛋白酶适用于大多数福尔马林/PFA 固定后需要修复的抗原。

至少有两种将酶溶液加到组织上的方法：直接用吸管将酶溶液滴加到玻片的组织上或将组织玻片放入酶溶液中。第一种方法反应试剂需要量少，但是因为每个玻片需要分别处理，较不容易保证孵育时间的一致。鉴于此，在处理大批量玻片（如数量>5）时，采用第二种方法较容易。如果采用全自动染色系统（如 Ventana），要查阅酶解修复操作指南。

a) 滴管法

材料和试剂

- 37° C 孵育箱
- 加湿器（恒温箱自带或在容器内放入湿纸巾）
- 两个盛 TBS 的玻片架容器（TBS 配方详见缓冲液部分第 71 页）
- 酶解抗原修复溶液（胰蛋白酶如下所述，胃蛋白酶和蛋白酶 K 见缓冲液部分第 71 页）

下面介绍一下胰蛋白酶法。有市售已优化的 IHC 用胰蛋白酶产品 (Abcam, 货号 ID ab970)，也可以按照第 11 章 71 页缓冲液部分制备。

方法

1. 将胰蛋白酶预热至 37° C。小心的将组织切片周围的水吸干，然后吸取酶溶液滴加到切片上（一般 50-100μl 即可）。用吸管尖端将酶溶液铺盖住整个切片，注意不要弄坏组织。
2. 将玻片置于加湿器内，然后 37° C 孵育。避免直接将玻片放入恒温箱架子上，否则会因温度不均影响染色质量。盛放玻片的容器最好先预热再放入恒温箱内。
3. 10-20 分钟（需要优化）后，取出玻片，流水冲洗 3 分钟。
4. 参照手册继续染色。

b) 浸泡法

材料和试剂

- 37° C 水浴
- 玻片架及玻片架容器
- 酶解抗原修复溶液（胰蛋白酶见滴加作用液法，胃蛋白酶和蛋白酶 K 见缓冲液部分第 71 页）

方法

1. 将水浴温度设置为酶最适宜的温度。向盛放玻片架的两个容器中加入超纯水。容器放入水浴中加热。（见注意事项 2）
2. 按上述方法将切片脱蜡至水后放入水浴箱其中一个容器中加热。（见注意事项 3）
3. 用水浴箱中另一个容器中的热水制备酶解抗原修复缓冲液，然后将盛有缓冲液的容器放回水浴箱中重新加热。（见注意事项 4）
4. 将加热过的玻片放入酶溶液中 10-20 分钟（见注意事项 5）并间歇缓慢震荡。取出玻片在流水下冲洗 3 分钟，将酶漂洗干净。
5. 参照手册继续染色。

注意事项

1. 仔细阅读酶使用手册，因为有些酶需要特殊的缓冲溶液和活性辅助因子。
2. 水或缓冲液的体积要足够没过玻片。
3. 若将冷玻片直接放入酶溶液中会使溶液温度降低从而酶活性降低，导致抗原位点修复不彻底。
4. 尽可能快的准备出抗原修复缓冲液以避免妨碍酶活性的发挥。放入玻片之前使溶液达到需要的温度。
5. 10-20 分钟只是孵育的建议时间。低于 10 分钟可能会使修复不彻底，导致染色较弱。而超过 20 分钟可能会使修复过度，导致非特异性背景染色，增加切片从玻片上解离的几率，损坏组织形态。因此需要先做对照试验，同样的组织切片分别孵育 10、15、20、25、30 分钟后开始染色，针对特异抗体寻找最佳修复时间。

免疫组织化学染色和检测实验方案

1. 一般原则

下面的操作适用于没有全自动染色机或 capillary gap system 等的实验室（如Shandon Sequenza）。可用吸管人工加试剂，该手册也适用于全自动或半自动系统。

培养箱应配备有加湿器避免组织变干。变干发生在任何阶段最后都会导致非特异性染色及高背景染色。带密封盖的浅塑料盒，底部铺上湿纸巾就是一个加湿装置。玻片只要不贴聚纸巾且平放就不会变干，一个好的解决办法就是，将一根塑料输液管切割成若干适合恒温箱的小段，用胶两个两个的粘到恒温箱底部，每对管之间间隔 4cm，这样能给玻片一个平稳及升起的小平台，使玻片直接接触湿纸巾。

一抗和二抗的最佳稀释度可以从数据表中找到，或者通过试验获得。根据所获得的结果调节至最佳稀释度。要严格遵照说明书中的孵育时间。

酶解法中，辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP) 是最为常用的酶。这些酶有许多底物。

2. 操作步骤

缓冲液配方请参照 11 章第 71 页。若需要可在开始下面操作之前先进行抗原修复。

第一天

1. 如使用 HRP 标记二抗检测，则需要封闭掉内源性过氧化物酶，但我们建议在开始一抗孵育前不予理会。
2. 在含 0.025% Triton X-100 的 TBS 漂洗玻片 2 X 5 分钟，轻轻震荡。
3. 用含 10% 正常血清、1% BSA 的 TBS 室温封闭 2 小时。空干封闭液（不是漂洗），并用纸巾将玻片周围擦干。
4. 一抗用含 1% BSA 的 TBS 稀释后加到玻片上。
5. 4° C 孵育过夜。

第二天

1. 用含 0.025% Triton X-100 的 TBS 漂洗 2 X 5 分钟，并轻轻震荡。
 2. 如使用 HRP 标记二抗检测，则需将玻片在含 0.3% H2O2 的 TBS 中孵育 15 分钟以封闭内源性过氧化物酶。
 3. 酶法检测 (HRP 或 AP 标记二抗)：
- 参照厂家推荐的稀释度，用含 1% BSA 的 TBS 稀释酶标二抗，加到玻片上后室温孵育 1 小时。

荧光检测：

参照厂家推荐的稀释度，用含 1% BSA 的 TBS 稀释荧光标记的二抗，加到玻片上后室温孵育 1 小时。



此步应在暗处进行，防止荧光衰退。

4. 在 TBS 中漂洗 3 X 5 分钟。

如采用荧光检测，则结束此步后就可以用封固剂和盖玻片进行封固了。

如采用底物显色，则还需继续进行下述操作。

5. 室温下与底物作用 10 分钟。
6. 流水冲洗 5 分钟。
7. 复染（如果需要）。
8. 脱水，擦干并封固。

3. 对照

为了评价非特异性交叉反应和 Fc 受体结合的影响，与一抗同型但不相关的抗体（如 BrdU）将来用做对照。与不相关抗原结合的抗体称为同型对照。对于全血清抗体而言，对照抗体是来源于同种动物的未免疫正常血清。

如果没有同型对照，阴性对照也可，就是用抗体稀释液代替一抗。强力推荐阳性组织对照，确保抗体达到预期效果。根据实验需要，也可设阴性组织对照，在该组织中应没有目标蛋白存在的。



使用含 0.025% Triton X-100 的 TBS 有助于降低表面张力，从而使反应试剂能更易覆盖住整个组织切片。
同时也能融解 Fc 受体从而减少非特异结合。Abcam 推荐使用 TBS，它比 PBS 的背景染色更干净。

注意事项：

1. 二抗可能会与组织内的内源性免疫球蛋白发生交叉反应。以二抗同种动物来源的正常血清预处理组织，可减少这种作用。加一抗前先与正常血清孵育从而消除 Fc 受体与一抗和二抗结合。抗体稀释缓冲液中的 BSA 能降低疏水作用引起的非特异结合。

如果组织样品经醛类如甲醛、多聚甲醛、戊二醛等固定后用免疫荧光法 (IF) 检测，在加一抗之前要用含 0.3M 甘氨酸的封闭液封闭。因为甘氨酸能结合自由醛基，否则这些醛基会与一抗和二抗结合造成高背景染色。使用多聚甲醛或戊二醛固定时，由自由醛基导致的高背景很有可能发生。

2. 一抗应稀释到厂家推荐的最佳稀释度或者曾经筛选到的最佳稀释度。如果没有起始稀释倍数，我们建议按上述操作。大多数 IHC-P 用抗体的使用浓度在 0.5-10 μ g/ml 之间。要确保一抗和被染色的组织来自不同物种。例如，小鼠组织，一抗来自小鼠，抗鼠 IgG 二抗会与小鼠组织中的所有内源性 IgG 结合，导致高背景染色。将小鼠单克隆抗体用于小鼠组织将在我们小鼠-对-小鼠部分中讨论。

3. 过夜孵育可以使低亲和力的抗体有较长的时间结合到抗原上。然而，不管抗体亲和力的高低，一旦抗原抗体结合达到饱和或平衡，就不会再发生结合。因此，过夜孵育确保了结合达到平衡。

4. 过氧化氢 (H_2O_2) 能抑制内源性过氧化物酶活性从而降低背景染色。检测是否存在内源性过氧化物酶，在 DAB (3,3' 二氨基邻苯胺底物) 溶液中水解后孵育组织玻片。如果切片在显微镜下出现棕色区域，说明存在过氧化物酶，因此应该做封闭。一些表位被过氧化物修饰了，降低了抗原抗体的结合。初步孵育后再将切片与过氧化物孵育就能避免此问题。

用 TBS 或水稀释过氧化氢。有些实验室用甲醇稀释，甲醇更适合于血涂片或其它富含过氧化物酶的组织如肝脏。甲醇稀释过氧化氢可减少水溶液对组织的损坏。对于其它组织，我们建议使用 TBS 或水。甲醇/过氧化物孵育后会降低一些抗原抗体的结合，特别是对于细胞表面蛋白来说。

内源性过氧化物酶的封闭只用于过氧化物酶标记物如 HRP。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

5. 酶联底物产生有色沉着。最终产生什么样的有色沉着取决于用什么酶标签以及采用水溶性封片剂还是有机溶剂封片剂。下面所列的是一些常用底物：

酶	底物	颜色	优点	缺点	Abcam ID
辣根过氧化物酶 (HRP)	3,3' 二氨基邻苯胺 (DAB)	棕褐色	色泽鲜亮；持久	持久 组织中内源性过氧化物酶活性会造成假阳性；AEC 溶于醇类但不溶于有机介质	ab675
	3-氨基-9-乙基卡巴咤 (AEC)	红色	色泽鲜亮；蓝红对比鲜明的双染色		
碱性磷酸酶 (AP)	5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 酯；硝基四氮唑盐 (BCIP/NBT) 载体蓝	蓝色	色泽鲜亮；	组织中内源性碱性磷酸酶活性会造成假阳性	ab7413 ab7468
	硝基四氮唑盐(NBT)	蓝色	色泽较差但是双色 对比更鲜明		
葡萄糖氧化酶			无内源性酶活性	染色浅（需较高浓度的一抗和二抗浓度）	

6. 观察组织和细胞形态的复染剂通常是苏木精（蓝色）、核固红或甲基绿。采用荧光检测法时，复染用 DAPI（蓝色）或碘化毗/PI（红色）。

7. 切记 DAB 是一种致癌物，操作时要穿上防护服。与次氯酸钠在密封容器中过夜可弱化它的致癌作用（相互作用产生有害气体），再根据实验室操作规程处理。

如果使用 AP，取 0.24mg/ml 的左旋四咪唑加到染料溶液中，来抑制内源性磷酸酶的活性从而降低背景染色。

8. 如果使用 AEC、固红、INT 或其它水溶性染料，切记它们溶于醇类溶剂中。要选用合适的水溶性封片剂。切勿进行下述步骤 9 中的脱水擦干。

9. 通过再水化使切片脱水并擦干其上的 DAB、新品红、NBT、TVega 红、NBT 或其它有机染料。按照再水化操作步骤的反向操作。

1. 将玻片置于 50% 乙醇中 3 分钟。
2. 70% 乙醇 3 分钟。
3. 95% 乙醇 3 分钟。
4. 100% 乙醇 3 分钟。
5. 二甲苯与无水乙醇 1:1 混合液 3 分钟。
6. 二甲苯 2 X 3 分钟。

在适当的有机封固液中封固切片。在有机封固液中封固切片比在水溶性封固液中封固得到的折射率更好。在显微镜下看到的图像更清晰明显。

4. 信号放大

为得到一个较强的信号，有多种策略可以添加更多的酶或荧光染料。

a) 亲和素—生物素 (ABC)

该技术是由 Su-Ming Hsu 及其同事 (J Histochem Cytochem. 1981 Apr 29 (4):577-80) 共同建立的。亲和素是在鸡蛋白中发现的，亲和力高，有 4 个不可逆的生物素结合位点，并且这种结合是不可逆的。生物素是羧基化反应中酶的辅助因子。

简言之，先将一抗结合到靶蛋白上，再将生物素标记二抗结合到一抗上。另一反应系统中，将亲和素与生物素化的酶按一定比例混合形成亲和素—生物素—酶复合物，使亲和素上保留一定的未结合位点。切片与抗体孵育后再与此复合物共同孵育，使复合物亲和素上未结合位点与生物素化的二抗结合，相比较酶标二抗或一抗而言可以使更多的酶接触到底物。

亲和素—生物素复合物有市售的试剂盒，提供有两种试剂及结合最佳比例的操作说明。该复合物适用于 Abcam 的任何生物素化的抗体。如果组织中存在有内源性的生物素，如肾脏、肝脏、大脑、前列腺、结肠、肠、睾丸等会与亲和素—生物素复合物结合导致背景染色 (Wang and Pevsner, Cell Tissue Res. 1999 Jun;296(3):511-6.)。Abcam 提供有抑制这种结合的试剂盒，产品编号是 ab3387。

b) 标记的链霉生物素 (LSAB)

该方法同 ABC 法相似，它利用了链霉亲和素（亲和力与卵白素相似）和生物素之间的相互作用。一抗与生物素标记的抗 Ig 二抗结合后，再与结合在酶或荧光染料上的链霉亲和素结合。Abcam 提供有链霉亲和素—HRP 结合物，产品编号是 ab7403。

应用链霉亲和素代替生物素可以减少非特异性背景染色，因为链霉亲和素是非糖基化的，（卵白素不是），因此它不会与凝集素或其它糖结合蛋白反应。而且 LSAB 法比 ABC 法灵敏 4—8 倍（详见 Giorno R. Diagn Immunol. 1984;2(3):161-6）。

c) HRP 聚合物

将二抗与聚合物-酶复合物结合形成的新型聚合物-酶-抗体产物（如抗鼠和/或兔 IgG）优于卵白素—生物素 (ABC) 和标记的链霉生物素 (LSAB)。因为此种方法比上述两种方法减少一步，从而免除了内源性生物素的干扰。Abcam 提供有羊抗兔/鼠 IgG HRP 多聚物，产品编号是 ab2891。

d) 直接酪胺信号放大法 (TSE)

信号扩大最有效的方法之一是 TSE，受专利保护（又称 TSA 或 CSA，不同厂家的试剂盒标示不一样），特别适用于其它检测系统难以检测到的相对稀少的抗原，并且可以增强结合力弱的抗体的反应结果。

此方法是一抗和 HRP 标记二抗结合后利用过氧化物酶的催化作用，使酪胺蛋白中酪胺部分与抗体共价结合。即使在处理玻片清洗抗体时，共价结合的蛋白也不会被洗掉，因为酪胺键是共价的。将酶或荧光染料标记抗体直接结合到酪胺蛋白结合物的蛋白部分，就可以获得信号。市售的试剂盒中蛋白是生物素，应用的是链霉亲和素标记酶而不是抗体结合物。此方法的缺点是试剂盒昂贵，且步骤多时间长。

相关资料

IHC World (www.ihcworld.cn) 提供了一系列关于免疫组织化学中抗原修复、阳性对照及疑难问题解答等的信息。

Histonet (www.histosearch.cn/histonet.html) 将世界各地科学家关于组织的研究信息都粘贴在了该网页的服务器上。

北欧免疫组织化学质量控制 (www.nordiqc.org) 提供了大量关于靶蛋白的抗原修复操作步骤及适度的阳性对照的信息。

6.2 免疫组织化学 (IHC-Fr)-冷冻切片切割技术

冷冻切片：切片经 3-氨基-丙酯-三-乙氧基-硅烷 (APES) 包被玻片封固后，最好在 -80° C 下保存，需要时再取出。

1. 需要及时取出后室温恢复 5 分钟。
2. -20° C 预冷固定剂（丙酮、甲醇或乙醇）30 分钟。（Abcam 首推丙酮）
3. 冷固定剂室温固定 5-10 分钟。
4. PBS 漂洗 3×4 分钟。
5. 参照手册继续染色。

非醛类固定时不需进行抗原修复步骤。但是如果冷冻组织或细胞经福尔马林固定，就需要进行抗原修复。但易碎的样本，如大脑组织或会影响结果。下面的参考文献介绍了将切片放置在玻片上之前怎样用 3-氨基-丙酯-三-乙氧基-硅烷 (APES) 处理玻片。这种处理方法能提高粘附力，使抗原热修复对组织形态的损害降到最低：

Warembourg M, Leroy D.. Microwave pretreatment of sections to improve the immunocytochemical detection of progesterone receptors in the guinea pig hypothalamus. J Neurosci Methods. 2000 Dec 15;104(1):27-34.

关于冷冻组织切片抗原修复更加深入的讨论见下面的参考文献。

Yamashita S, Okada Y. Application of heat-induced antigen retrieval to aldehyde fixed fresh frozen sections. J Histochem Cytochem. 2005 Nov;53(11):1421-32.



如果组织样品是醛类固定剂如福尔马林、多聚甲醛、戊二醛等固定的或用免疫荧光法检测的，在加一抗之前用含 0.3M 甘氨酸的封闭液封闭。因为甘氨酸能结合自由醛基，而这些醛基会与一抗和二抗结合造成高背景染色。使用多聚甲醛或戊二醛固定时，由自由醛基导致的高背景很有可能发生。

IHC-石蜡操作指南中 (IHC-P) 有关于显色和荧光检测石蜡技术的详细介绍。

6.3 免疫细胞化学 (ICC) 指南

一般步骤

1. 加盖玻片，聚氮丙啶或多聚左旋赖氨酸室温作用 1 小时。
2. 灭菌水漂洗盖玻片 3×5 分钟。
3. 盖玻片彻底干燥后，紫外灯灭菌至少 4 小时。
4. 玻璃盖玻片上种上细胞，或制作细胞样本或涂片标本。
5. 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗。

固定

1. 冷甲醇、丙酮固定样品 1-10 分钟，或含 3-4% 多聚甲醛 pH 7.4 的 PBS 室温固定 15 分钟。
2. 冷 PBS 冲洗样品 2 次。

通透

如果靶蛋白是细胞内表达的，那么使细胞膜变通透就很重要了。注：丙酮固定的样品不需要通透。

3. 将样品在含 0.25% Triton X-100 (或 100μM 洋地黄皂昔或 0.5% 韧角昔) 的 PBS 中孵育 10 分钟。Triton X-100 是最常用的去污剂，能增强抗体的穿透力。因为它对细胞膜有损坏作用，因此不适用于与细胞膜结合的抗原。
4. PBS 冲洗细胞 3×5 分钟。

封闭及孵育

5. 细胞在含 1% BSA 的 PBST (封闭液也可以选择含 1% 明胶或 10% 与二抗同种动物来源的血清) 中孵育 30 分钟，以阻断抗体的非特异性结合。



如果组织样品是醛类固定剂如福尔马林、多聚甲醛、戊二醛等固定的或用免疫荧光法检测的，在加一抗之前用含 0.3M 甘氨酸的封闭液封闭。因为甘氨酸能结合自由醛基，而这些醛基会与一抗和二抗结合造成高背景染色。使用多聚甲醛或戊二醛固定时，由自由醛基导致的高背景很有可能发生。

IHC-石蜡操作指南中 (IHC-P) 有关于显色和荧光检测石蜡技术的详细介绍。

6. 细胞与抗体（含 1% BSA 的 PBST 稀释）在湿盒中共同孵育，室温 1 小时，或 4°C 过夜。
7. 弃去液体，用 PBS 冲洗细胞 3×5 分钟。
8. 细胞与二抗在 1% BSA 中孵育，室温 1 小时，避光。
9. 弃去二抗溶液，并用 PBS 冲洗细胞 3×5 分钟，避光。

复染

10. 在 0.1-1μg/ml Hoechst 或 DAPI (DNA 染色剂) 中孵育细胞 1 分钟。
11. PBS 冲洗。

封固

12. 向盖玻片上滴加一滴封固液封固。
13. 用指甲油密封盖玻片防止变干并移至显微镜下观察。
14. -20°C 或 +4°C 避光保存。

6.4 IHC/ICC 中的固定和通透技术

固定：

固定就是保持抗原细胞和亚细胞结构固定不动，同时又能使抗体进入到细胞和亚细胞的所有部位。固定和通透方法的选择取决于抗原表位和抗体本身的灵敏性，有时需要优化。

固定时可使用一些交联试剂，如多聚甲醛，有利于保护细胞结构，但是可能会降低一些细胞成分的抗原性，因为交联阻碍了抗体结合。鉴于此，可采用抗原修复技术，尤其是固定孵育时间较长时或使用高百分比的交联度固定剂时。另外一种选择就是使用有机溶剂，但是它们会吸去脂类使细胞脱水，同时会使蛋白沉淀在细胞架上。

1. 4% 多聚甲醛

向玻片滴加 4% 多聚甲醛，维持 10 分钟。

用 PBS 或含 1%BSA 的 PBS 冲洗细胞。



注意：在多聚甲醛中固定时间超过 10-15 分钟会造成蛋白交联，或许需要通过抗原修复技术来修复此交联位点，以确保抗体能自由结合并检测到该蛋白。

2. 乙醇

向玻片滴加 100-200 μ l 预冷的 95% 乙醇，5% 冰醋酸，维持 5-10 分钟。

用 PBS 或含 1%BSA 的 PBS 冲洗细胞。

3. 甲醇

向玻片滴加 100-200 μ l 的冷甲醇。-20° C 维持 10 分钟。

用 PBS 或含 1%BSA 的 PBS 冲洗细胞。



注意：甲醇有通透作用。一些抗原表位对甲醇非常敏感，能破坏抗原表位结构。因此，如果需要通透，可用丙酮代替甲醇。

4. 丙酮

向玻片滴加 100-200 μ l 的冷丙酮。-20° C 维持 5-10 分钟。

用 PBS 或含 1%BSA 的 PBS 冲洗细胞。



注意：丙酮也有通透作用，因此，不需要进一步通透。

通透：

通透技术仅用于抗体需进入细胞内检测蛋白时，包括细胞内蛋白和抗原表位位于胞内区的跨膜蛋白检测。

溶剂：

1. 丙酮固定也有通透作用。

2. 甲醇固定也可通透，但不是总适用。

这些反应试剂都可用来固定和通透，也可在交联剂如多聚甲醛固定后再使用。

去污剂：

1. Triton 或 NP-40

含 0.1-0.2% Triton 或 NP-40 的 PBS 洗涤 10 分钟。

这些去污剂同样也能溶解部分核膜，因此非常适合于核抗原染色。



注意：因为这些都是强去污剂，因此当使用浓度较高或作用时间较长时会破坏蛋白，影响染色效果。

2. 吐温-20, 皂角昔, 洋地黄皂昔和 Leucoperm。

用0.2-0.5% 洗涤 10-30 分钟。

这些是较温和的细胞膜溶剂。它们会使细胞膜产生足够大的孔, 促使抗体进入细胞内而不用溶解胞膜。适合于胞浆内抗原质膜的胞浆表面抗原和可溶的核抗原。

特别建议:

用丙酮、乙醇或甲醛 (高浓度) 固定细胞骨架、病毒和一些酶抗原, 可获得理想的结果。

位于细胞器和胞浆颗粒上的抗原, 其固定和通透方法的选择取决于抗原本身, 需尽量保留表位。

6.5 灌注固定法

出于多种考虑, 将小组织片段简单浸泡在固定液中便能得到合适的固定, 对大多数组织来说可能是唯一的固定模式。然而更快、更均一的固定方法是将固定液通过管道系统如心主动脉或腹部主动脉灌注到组织中。下面介绍一下用 4% 多聚甲醛固定大鼠大多数器官的操作步骤。

材料

- 麻醉剂
- 手术用剪刀、镊子、止血钳
- 锯齿小镊子
- 手术刀
- 放置样品的带塞子的小瓶 (5-10ml)
- 0.9% 生理盐水
- 500ml 烧杯
- 4% 多聚甲醛、固定液
- 手套、防护眼镜
- 蠕动泵 (或将烧瓶固定在距手术台上方 150cm 处, 口向下)
- 心主动脉灌注用输液针, 长 50mm, 外径 1.3-1.5mm
- 带有静脉输血用的滴注腔的灌注装置

心脏灌注固定法

1. 设置蠕动泵, 安装灌注装置和输液针。首先, 取 100ml 水冲洗管道除去管内残留物, 然后烧杯盛满 4% 冷多聚甲醛 (冰盒预冷), 将灌注管末端置入烧杯中。溶液体积应该与动物大小成比例, 通常对于一只动物来说 100-200ml 足够。打开阀门, 调节到一个缓慢而稳定的速度 (20ml/min), 然后关闭阀门。

2. 在操作台上将剪刀、镊子和止血钳放在适宜操作的位置。给动物注射合适剂量的麻醉剂。动物一旦处于麻醉状态后, 将其背部向下放在操作台上。可以使用带子固定确保动物不动。

3. 用捏反应法检测麻醉程度。在开始下述操作之前确保动物是无反应的。

4. 在腹部用手术刀沿着膈肌切一个口, 用锋利的剪刀剪开膈肌底部连着的组织, 确保能进入胸腔。

5. 取大号剪刀, 钝端向下, 切穿左胸肋廓。

6. 横向切穿肋骨一到两厘米, 打开胸腔。用止血钳打开, 使心脏暴露出来。准备排血和输液装置。

7. 用镊子固定住心脏 (心脏应该还在跳动), 在左心室跳动部位直接插入针头, 垂直外露 5mm。注意针头不要插入太多, 以防刺破心室壁 影响溶液循环! 用止血钳将针头固定在输入口。打开阀门使 0.9% 的生理盐水以缓慢、稳定的流速大约 20ml/min 输入动物体内。

8. 用剪刀在心房处剪一个口, 保证溶液自由流动。如果溶液不能自由流出或溶液从动物的鼻孔或口腔流出, 则要让针头复位。

9. 当血液快排干时, 换上 4% 多聚甲醛溶液 (200-300ml) 。



换液时注意不要引入气泡。灌注过程中最好带上防护眼镜, 因为有时连接的管道会崩开使固定液喷射到眼睛里。

当肝脏自发跳动 (福尔马林 “跳舞”) 及颜色变浅时表明灌注完成。 (注: 一般地, 一只成年大鼠的灌注时间大约是 30-60 分钟, 但是根据动物大小和技术的不同也有所差别) 。

10. 终止灌注, 切除靶组织, 放置盛有同种固定液的小瓶中, 冰上或 4° C 固定 2 小时, 再脱水包埋。4° C 浸泡过夜固定, 效果更好。

腹主动脉灌注法

1. 按上述方法准备材料和动物（步骤 1-3）。
2. 在腹部正中横向剪开一个长切口，打开腹腔，将肠道轻轻推至腹腔左侧。
3. 小心地将肾主动脉始端下方的主动脉露出。轻轻地将腹主动脉与覆盖其上的脂肪组织及其它粘联组织剥离开。
4. 用小镊子将主动脉壁牢牢地固定在距远端 0.5-1.0cm 分叉处。然后将折针紧贴镊子插入主动脉腔的近心端。
5. 快速连续操作以下步骤：
 - a) 用小剪刀在下腔静脉剪开一个口。
 - b) 灌注。
 - c) 夹住膈肌下方肾主动脉始端上方的主动脉。



操作时，精确度和速度是非常重要的。因此，固定步骤最好两个人操作。

灌注开始后迅速夹住主动脉至关重要，最简单的方法就是用手指（带手套）抵住腹腔的后壁压住主动脉，然后换上止血钳。最后切除受压上游的主动脉。

6. 肾脏表面呈现颜色均一、变浅发白时表明灌注完成。灌注一只成年大鼠来说流速至少要控制在 60-100ml/min。灌注 3 分钟。终止灌注，切除并清理靶组织，并将之放置到盛有同种固定液的小瓶中（见后面的固定步骤），冰上或 4° C 固定 2 小时。4° C 浸泡过夜固定，效果更好。

7. 脱水包埋组织。

6.6 鼠对鼠染色注意事项

用鼠抗体对鼠组织染色是个复杂的过程，因为容易导致背景染色高，而且很难消除。形成这种背景主要是由于组织染色时二抗与内源性的鼠 IgG，或 B 细胞、浆细胞及巨噬细胞上的 Fc 受体结合造成的。

Abcam 不能保证鼠单克隆抗体与鼠组织（除非说明书有显示）。然而，必需鼠对鼠染色时，应用一些窍门可能会有助于减少这些背景染色。

封闭内源性 IgG

1. 按常规制备组织切片。
2. 在封闭步骤，用血清（与二抗同种动物来源）室温封闭 30 分钟。
3. PBS-吐温-20 冲洗 3 X 2 分钟。
4. 组织切片与未结合的抗鼠 IgG 的 AffiniPure Fab 片段 (H+L) 室温孵育 1 小时或 4° C 过夜。
建议封闭抗体浓度用 0.1 mg/ml，但是是否是最佳浓度仍需终端用户来评估。
5. 抗体染色。

封闭内源性Fc受体

以单克隆二抗 F (ab) 段封闭内源性 Fc 受体，有市售试剂盒。

有助于降低背景染色的其它窍门

1. 切片在含 1% Triton 的 PBS 中室温孵育 30 分钟，“洗净”组织。
2. TBS – 吐温-20 作为冲洗缓冲液比 PBS-吐温-20 更能减少背景染色。

6.7 IHC/ICC 疑难解答提示

无染色

一抗和二抗不匹配

使用针对一抗的二抗（如一抗来自兔，二抗为抗兔抗体）

没有足够的一抗与目标蛋白结合

使用低稀释度抗体。延长 4°C 孵育时间（如过夜）。

抗体的天然结构（3D 形态）受损不适用于 IHC

用天然（非变性的）WB 法检测抗体，确保抗体没被损坏。

由于不当储存、稀释或反复冻融造成一抗/二抗试剂盒失效

做阳性对照确认一抗/二抗试剂盒的有效性。

靶组织中没有目标蛋白

参照抗体供应商的建议做阳性对照。

组织中没有足够的目标蛋白

应用信号放大操作。

没有避光保存二抗

避免将二抗处于光照下。

脱蜡不彻底

延长脱蜡时间，更换二甲苯。

固定步骤（使用福尔马林和多聚甲醛固定剂）修饰了抗体识别表位

抗原修复法暴露出抗原表位，缩短固定时间。

蛋白位于细胞核内（核蛋白），抗体不能穿透核膜

在封闭液和抗体稀释液中加入通透剂。

PBS 缓冲液被细菌污染后破坏了靶蛋白的磷酸根

在抗体 PBS 储存液中加入 0.01% 叠氮化合物，或使用新鲜无菌的 PBS。

高背景

没有封闭非特异性结合或封闭不充分

延长封闭时间，并考虑改换封闭剂。Abcam 建议用 10% 正常血清封闭切片 1 小时或 1-5% BSA 封闭培养细胞 30 分钟。

一抗浓度过高

滴定法寻找到最佳抗体浓度，或在浓度较低抗体中延长孵育时间（最好是缓慢而准确地结合）。

孵育温度过高

4°C 孵育切片或细胞

二抗发生了非特异性结合（被损坏）

不加一抗，做二抗对照。

组织冲洗不彻底，有固定剂残留

所有步骤都要用 PBS 充分洗涤。

存在内源性过氧化物酶活性

用酶抑制剂如抑制碱性磷酸酶的盐酸左旋咪唑 (2mM)，或抑制过氧化物酶的 H₂O₂ (0.3% v/v)。（详见 IHC 操作手册）。

固定过度（固定剂用福尔马林和多聚甲醛）导致抗体识别抗原位点被修饰

改变抗原修复方法，缩短与抗原修复液的孵育时间。

信号过度放大（信号放大技术）

缩短信号放大孵育时间，稀释信号放大试剂盒。

底物过量（酶检测法）

缩短底物孵育时间

染料与 PBS 在细胞/组织中相互作用（酶检测法）

用 Tris 缓冲液冲洗切片后，再与底物孵育。孵育后，Tris 缓冲液再次冲洗细胞/切片。

通透作用破坏膜并除去了膜蛋白

去除缓冲液中的通透剂

非特异性染色

一抗/二抗浓度过高

降低抗体浓度和或缩短孵育周期。对比不表达目标蛋白细胞的信号强度。

存在内源性过氧化物酶活性

用酶抑制剂如抑制碱性磷酸酶的盐酸左旋咪唑 (2mM)，或抑制过氧化物酶的 H₂O₂ (0.3% v/v)。（详见 IHC 操作手册）。

一抗与被染组织同源(如用鼠一抗测鼠组织)，加二抗后，二抗会与同源的所有组织结合

应用与组织非同源的一抗

切片/细胞变干

保持切片/细胞湿度，切勿变干。

关于免疫组织化学/免疫细胞化学操作指南的更多详细信息

关于免疫组织化学/免疫细胞化学操作指南的更多详细信息见手册网页，URL 地址：

Double immunofluorescence: sequential protocol

www.abcam.cn/immunosequential

Double immunofluorescence: simultaneous protocol

www.abcam.cn/immunosimultaneous

Preparing cells and sections for BrdU immunostaining

www.abcam.cn/brduimmunostaining

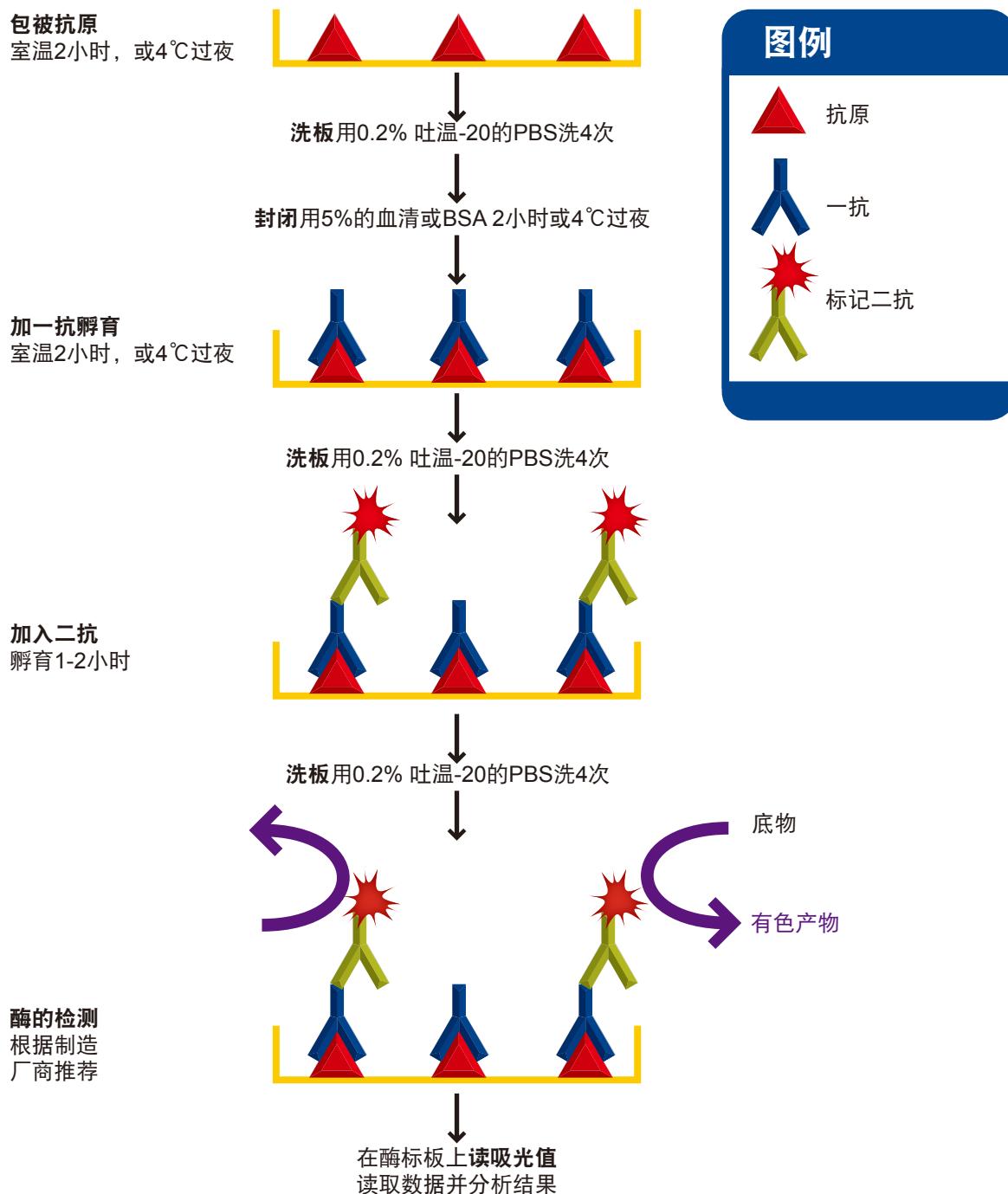
Whole mount staining protocols

www.abcam.cn/wholemountstaining

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第七章：ELISA

7.1 间接 ELISA



缓冲液和试剂

通常将未知浓度样品与阳性对照标准曲线相比较，可精确定量。每块板都要带标准（做平行或者三份）和空白对照以保证精确性。

常规程序

包被抗原

1. 用 PBS 或碳酸盐缓冲液稀释抗原至终浓度 20 μ g/ml。用吸管吸取 50 μ l 稀释抗原到 PVC 微孔板上的第一排孔，按要求往后进行系列稀释。



样品纯度较高时通常在酶标板上稀释到不低于 2 μ g/ml。

**不一定用纯化的溶液，不过，一般在试验样品中目的蛋白（抗原）含量需大于 3%。
抗原的蛋白浓度在酶标板上应该不高于 20 μ g/ml，此时已经足够中和酶标板上的位点了。**

确保抗原的浓度在抗体可以检测到的范围内。

2. 在酶标板上覆盖封口膜，室温孵育 2 小时，或者 4° C 过夜。包被的孵育时间需要优化。

3. 倒掉孵育溶液，用 PBS 每孔 200 μ l 洗板 3 次。在水池上轻甩倒掉洗液，在纸巾上轻拍酶标板除去残留液体。

封闭

4. 用 200 μ l 含 5% 脱脂奶粉或含 5% 血清的 PBS 缓冲液封闭酶标板上剩余的蛋白结合位点。或者用其他封闭剂如 BlockACE、BSA（牛血清蛋白）代替。

5. 用封口膜覆盖酶标板室温至少孵育 2 小时，或者 4° C 过夜。

6. 用 PBS 洗板 2 次。

加一抗和二抗进行孵育

7. 每孔加入 100 μ l 稀释好的一抗。

8. 用封口膜覆盖酶标板室温孵育 2 小时，该孵育时间需要进行优化。尽管 2 小时的孵育通常可以获得足够强的信号，但如果获得的信号较弱时，通过 4° C 孵育过夜通常可以获得较强信号。

9. 用 PBS 洗板 4 次。

10. 加 100 μ l 标记二抗，稀释到最佳浓度（参照说明书），使用前用封闭液现配。

11. 用封口膜覆盖酶标板室温孵育 1-2 小时。

12. 用 PBS 洗板 4 次。

检测

虽然许多种类的酶都可以用来检测，但辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP) 在 ELISA 实验中是被广泛应用的两种酶。我们必须要考虑到一些生物原料本身具有很高水平的酶活性（例如肺泡细胞中高含量的 AP，红血球中高含量的过氧化物酶），这可能导致不精确的结果。如果有必要的话，用左旋咪唑（针对 AP）或含 0.3% 双氧水溶液的甲醇（针对过氧化物酶）进行一个附加的封闭处理。

AP 底物

pNPP（对硝基苯基磷酸盐）是最广泛使用的底物。室温下孵育 15-30 分钟后，硝基酚的黄颜色可以在 405nm 下被检测出（这一反应可以通过加入适当量的 0.75M 氢氧化钠溶液来终止）。

HRP 显色剂

HRP 的底物是过氧化氢，反应中，过氧化氢分裂使氢供体氧化产生颜色变化。

TMB (3,3' ,5,5' -四甲基对二氨基联苯)

加 TMB 溶液至每孔，孵育 15-30 分钟，加相同分量终止液 (2M 硫酸)，在 450nm 下读取吸光度值。

OPD (邻苯二胺盐酸盐)

终产物在 492nm 下检测。需要注意的是这种底物对光敏感，因此需要避光保存。

ABTS (2,2' -连氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)磷酸氢二铵盐)

终产物是绿色的，在 416nm 测定吸光度值。



注意：一些酶底物是有害的（致癌物），因此必须小心操作并佩戴手套。

13. 用多通道吸液器向每孔加入 100 μ l（或 50 μ l）底物。

14. 显示出足够深的颜色之后，再向每孔加终止液 100 μ l（如果必须）。

15. 用酶标仪读每个孔的吸光度值（光密度）。

数据分析

根据连续稀释的数据制作一条标准曲线，x轴为浓度（对数转换），y轴为吸光度值（线性）。将样品吸光度值代入标准曲线求出浓度。

7.2 直接ELISA操作步骤

常规程序

包被抗原

1. 用 PBS 或碳酸盐缓冲液稀释抗原至终浓度 20 μ g/ml。用吸管吸取 50 μ l 稀释抗原到 PVC 微孔板上，按要求往后进行系列稀释。



样品纯度较高时通常在酶标板上稀释到不少于 2 μ g/ml。

不一定用纯化的溶液，不过，一般在试验样品中目的蛋白（抗原）含量需大于 3%。

抗原的蛋白浓度在酶标板上应该不高于 20 μ g/ml，此时已经足够中和酶标板上的位点了。

确保抗原的浓度在抗体可以检测到的范围内。

2. 在酶标板上覆盖封口膜，室温孵育 2 小时，或者 4° C 过夜。包被的孵育时间需要优化。

3. 倒掉孵育溶液，用 PBS 每孔 200 μ l 洗板 2 次。在水池上轻甩倒掉洗液，在纸巾上轻拍酶标板除去残留液体。

封闭

4. 用 200 μ l 含 5% 脱脂奶粉或含 5% 血清的 PBS 缓冲液封闭酶标板上剩余的蛋白结合位点。或者用其他封闭剂如 BlockACE、BSA（牛血清蛋白）代替。

5. 用封口膜覆盖酶标板室温至少孵育 2 小时，或者 4° C 过夜。

6. 用 PBS 洗板 2 次。

加抗体孵育

7. 加入 100 μ l 抗体，稀释到最佳浓度（参照说明书），使用前用封闭液现配。

8. 用封口膜覆盖酶标板室温孵育 2 小时，该孵育时间需要进行优化。尽管 2 小时的孵育通常可以获得足够强的信号，但如果获得的信号较弱时，通过 4° C 孵育过夜通常可以获得较强信号。

9. 用 PBS 洗板 4 次。

检测

10. 用多通道吸液器向每孔加入 100 μ l（或 50 μ l）底物。

11. 显示出足够深的颜色之后，再向每孔加终止液 100 μ l（如果必须）。

12. 用酶标仪读每个孔的吸光度值（光密度）。



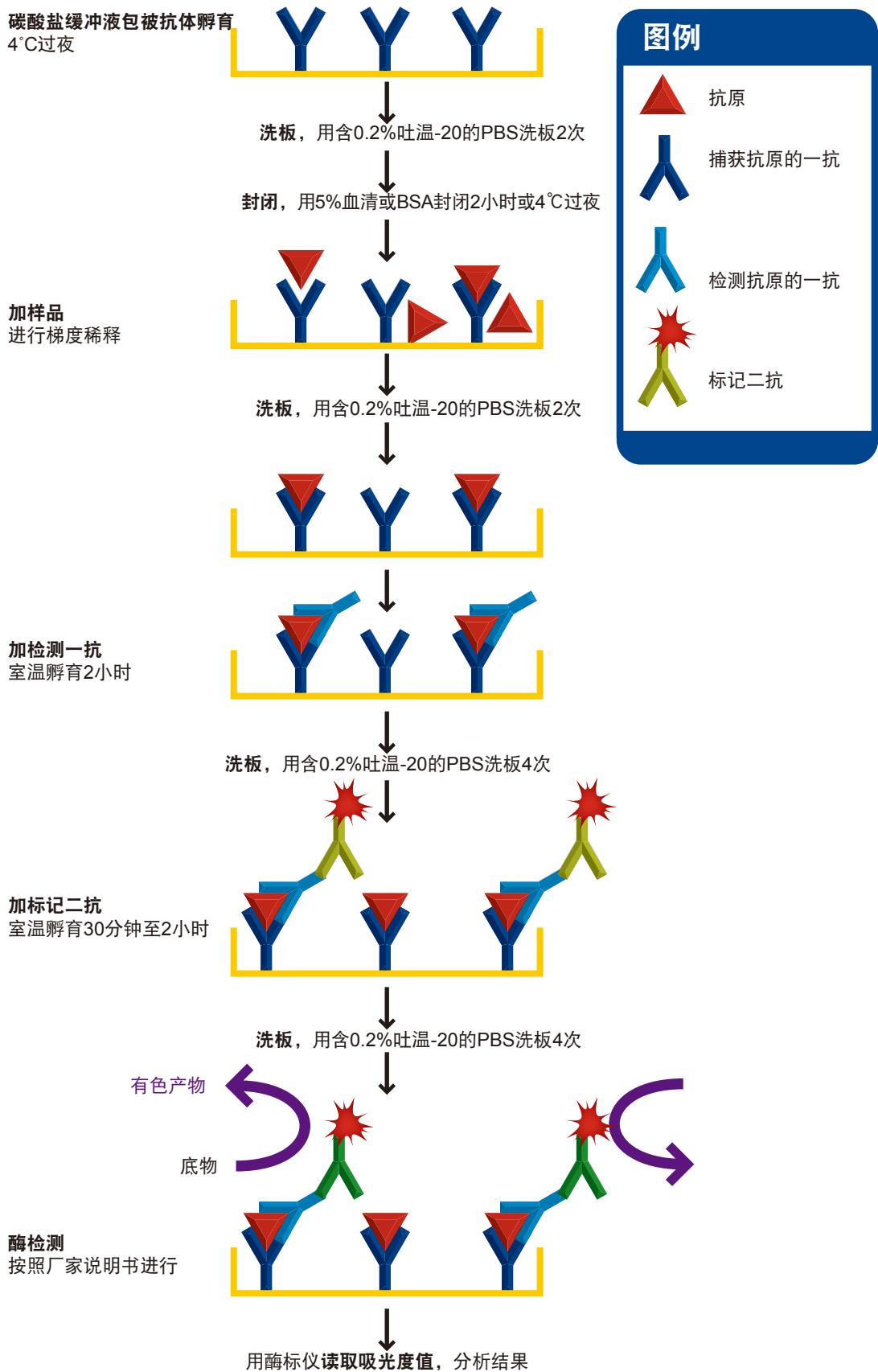
注意：一些酶作用物是有害的(致癌物)，因此必须小心操作并佩戴手套。

数据分析

根据连续稀释的数据制作一条标准曲线，x 轴为浓度（对数转换），y 轴为吸光度值（线性）。将样品吸光度值代入标准曲线求出浓度。

7.3 夹心 ELISA

第七章



夹心 ELISA 用两种抗体协同测定抗原的含量（例如：捕获抗体和检测抗体）。抗原必须包含至少 2 个能被抗体识别的抗原位点才能被检测，因为至少有 2 个抗体参与到这个试验中。

在夹心 ELISA 中，单克隆抗体和多克隆抗体都可以被用作捕获和检测抗体。单抗识别单一的抗原表位，可以区别抗原的微小差别使抗原得到更精确地检测和定量。多克隆抗体通常被用作捕获抗体，以捕获尽可能多的抗原。

夹心 ELISA 的优势是样品在分析前不需要纯化，检测灵敏度高（灵敏度是直接法或间接法的 2-5 倍）。

注意事项：

夹心 ELISA 的步骤很难优化，试验中应使用测试过的配对抗体。这样可以确保在不干扰其他抗体结合的情况下，检测目标蛋白上相应不同的抗原表位。因此对于没有做过特定测试试验的抗体，我们不能确保我们的抗体可以用于夹心 ELISA。请参阅抗体说明书有关抗体测定应用的信息。

常规步骤：

包被捕获抗体

1. 用碳酸盐/重碳酸盐缓冲液 (pH7.4) 稀释捕获抗体至浓度 1-10 μ g/ml，包被酶标板。



如果使用了没有纯化的抗体（例如：腹水或抗血清），可能需要通过提高样品蛋白浓度（试一下 10 μ g/ml），来补偿特定抗体数量较低的问题。

2. 用封口膜覆盖酶标板，于 4° C 孵育过夜。

3. 倒掉包被液，用 PBS 每孔 200 μ l 洗板 2 次。在水池上轻甩倒掉洗液，在纸巾上轻拍酶标板除去残留液体。

封闭和加样品

4. 封闭包被后孔内残留的蛋白结合位点，每孔加 200 μ l，含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液。

5. 用封口膜覆盖酶标板，室温孵育至少 1-2 小时或者如果方便的话，4° C 孵育过夜。

6. 每孔加 100 μ l 适当稀释的样品。在精确定量测定时，通常将未知浓度样品与阳性对照标准曲线相比较，每块板都要带标准（做平行或者三份）和空白对照以保证精确性。37° C 孵育 90 分钟。



对于定量检测，标准品的使用浓度应覆盖抗体结合的大部分动态检测范围。您可能需要优化标准品的浓度使用范围，以确保得到一个合适的标准曲线。为了精确定量，样品和标准通常做 2 份或 3 份。

7. 倒掉样品，每孔用 200 μ l PBS 洗板 2 次。

用检测抗体和二抗先后进行孵育

8. 每孔加入 100 μ l 稀释好的检测抗体。



确保检测抗体与包被抗体识别目标蛋白上不同的抗原表位，这防止了抗体结合的冲突，保证第二个抗体结合位点可以用来结合，尽可能的使用测试过相匹配的配对抗体。

9. 用封口膜覆盖酶标板，室温孵育 2 小时。

10. 用 PBS 洗板 4 次。

11. 加入 100 μ l 标记二抗，使用前用封闭液快速稀释至最佳浓度（根据说明书）。

12. 用封口膜覆盖酶标板，室温孵育 1-2 小时。

13. 用 PBS 洗板 4 次。

检测

虽然许多种类的酶都可以用来检测，但辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP) 在 ELISA 实验中是被广泛应用的两种酶。我们必须要考虑到一些生物原料本身具有很高水平的酶活性（例如肺泡细胞中高含量的AP, 红血球中高含量的过氧化物酶），这可能导致不精确的结果。如果有必要的话，用左旋咪唑（针对 AP）或含 0.3% 双氧水溶液的甲醇（针对过氧化物酶）进行一个附加的封闭处理。

AP 底物

pNPP（对硝基苯基磷酸盐）是最广泛使用的底物。室温下孵育 15-30 分钟后，硝基酚的黄颜色可以在 405nm 下被检测出（这一反应可以通过加入适当量的 0.75M 氢氧化钠溶液来终止）。

HRP 显色剂

HRP 的底物是过氧化氢，反应中，过氧化氢分解使氢供体氧化产生颜色变化。

TMB (3,3' ,5,5' -四甲基对二氨基联苯)

加 TMB 溶液至每孔，孵育 15-30 分钟，加适量终止液（2M 硫酸），在 450nm 下读取吸光度值。

OPD (邻苯二胺盐酸盐)

终产物在492nm下检测。需要注意的是这种底物对光敏感，因此需要避光保存。

ABTS (2,2' -连氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)磷酸氢二铵盐)

终产物是绿色的，在 416nm 测定吸光度值。



注意：一些酶作用物是有害的(致癌物)，因此必须小心操作并佩戴手套。

14. 使用多通道移液器每孔加入底物溶液 100 μ l (或 50 μ l) 。

数据分析：根据连续稀释的数据制作一条标准曲线，x 轴为浓度(对数转换)，y 轴为吸光度值(线性)。将样品吸光度值代入标准曲线求出浓度。

7.4 ELISA 疑难解答提示

阴性对照出现阳性结果

试剂/样品污染

试剂和样品可能被污染，或者由于孔之间的溅洒交叉污染。使用新鲜试剂，小心操作移液器。

夹心ELISA - 检测抗体与包被抗体反应

确定使用的是正确的包被抗体和检测抗体，他们之间不会互相反应。

酶标板洗板不彻底

用洗液充满板孔确保每孔被充分洗涤，洗板前确保所有的剩余抗体溶液被倒净。

抗体量过多导致非特异结合

根据推荐用量使用抗体。尽量使用较少的抗体。

酶标板整体背景高

结合反应太强或时间过长

检查底物的稀释，使用建议的稀释度。当酶标板显色足够进行吸光度读取时立即用终止液终止反应。

底物溶液或终止液不是新配制

使用新配制的底物溶液。终止液应该是清亮的（如果它变黄，这是被污染的标志，需要重新配制）。

没有终止反应

如果底物反应没有被终止，颜色会继续变化。

酶标板在酶标仪读板前放置时间过长

颜色会继续变化（尽管加了终止液，依然会以很慢的速度变化）。

试验器皿污染

确保试剂是新配的并且使用的是清洁的玻璃器具。

底物孵育过程没有避光

底物孵育应该在避光条件下进行。

孵育温度过高

抗体在适宜的温度下有最佳的结合活性。确保孵育在正确的温度下进行，孵育箱要设定好适宜的温度并正常工作。孵育温度可能需要一些优化。

抗体非特异性结合

确保进行了封闭并使用的是恰当的封闭液。我们建议使用 5-10% 的与二抗同种动物来源的血清或牛血清。

确保板孔经过预处理以防止非特异结合。使用亲和力强、纯度高的抗体，最好经过了预吸收。

请检查针对“阴性对照出现阳性结果”的建议

吸光度数值低**使用的样品中没有显示出靶蛋白或者靶蛋白显示的水平低**

检查靶蛋白表达系统，确保它在您的样品中被表达出来。如果靶蛋白的表达水平低，需要增加样品使用量，或者您可能需要选择一个更灵敏的测定方法。确保您使用的是没有超出测定方法检测范围的阳性对照。

抗体不足

确定使用的是建议的抗体量，为了使结果更好可能需要增加抗体的浓度。

底物溶液不是新鲜配制或成分有误

使用前新鲜配制底物溶液。确保储备液在有效期内并且被正确储存，使用的浓度也是正确的。确保试剂按正确的浓度使用。

试剂不是新鲜配制或pH值有误

确保试剂配制正确并在有效期内。

孵育时间不够长

如果建议了孵育时间，确保按推荐的时间长度孵育抗体。为了使结果更理想，孵育时间可能需要增加。

孵育温度太低

抗体在适宜的温度下有最佳的结合活性，确保孵育是在正确的温度下进行，孵育箱要设定好适宜的温度并正常工作。孵育温度可能需要一些优化。确保所有的试剂在使用前是室温。

未加终止液

加入终止液可以增加显色反应的强度，也能固定反应最终的颜色。

吸光度数值高**样品和/或阳性对照吸光度数值高。吸光度没有按样品在板子上的稀释度递减。**

样品或阳性对照的浓度过高，超出了试验方法检测的范围。重新设置试验方法或者在加样前通过稀释降低样品和对照的浓度，在处理结果计算浓度时考虑到所作的稀释。

酶标板上吸光度不规律**孵育时酶标板叠在一起**

酶标板叠在一起使板子每个孔的温度不能平衡一致，请避免堆叠。

吸液不一致

确保移液器使用正确并经过校准、确保枪头插得足够紧密。板子稀释时要特别仔细，注意确保每个枪头都吸上和排出正确量的液体，这对平行样品结果的一致性有很大影响。

抗体稀释液/试剂未混匀

为保证板子所有孔的浓度一致，确保所有的试剂和样品在加到板子上以前都被混合均匀。

板孔变干涸

确保所有孵育期间酶标板始终被盖好。放置一个潮湿的水盘(保持清洁，无菌水)在孵育箱的底部。

洗板不充分

这将导致一些孔没有其他孔清洗的好，残留不同量的未结合的抗体，使后面的结果产生不一致。

酶标板底部不净影响吸光度读取

读板前小心清洁酶标板底部。

颜色变化过慢

酶标板未处于恰当的温度中

确保酶标板处于室温，试剂在使用前也处于室温。

结合能力太弱

使用前新鲜配制底物溶液。确保储备液在有效期内并且被正确储存，使用的浓度也是正确的。确保试剂按正确的浓度使用。

溶液污染

例如象叠氮化钠和过氧化物酶这类污染物的存在，将会影响底物的反应，避免使用含有这些防腐剂的试剂。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第八章：流式细胞术

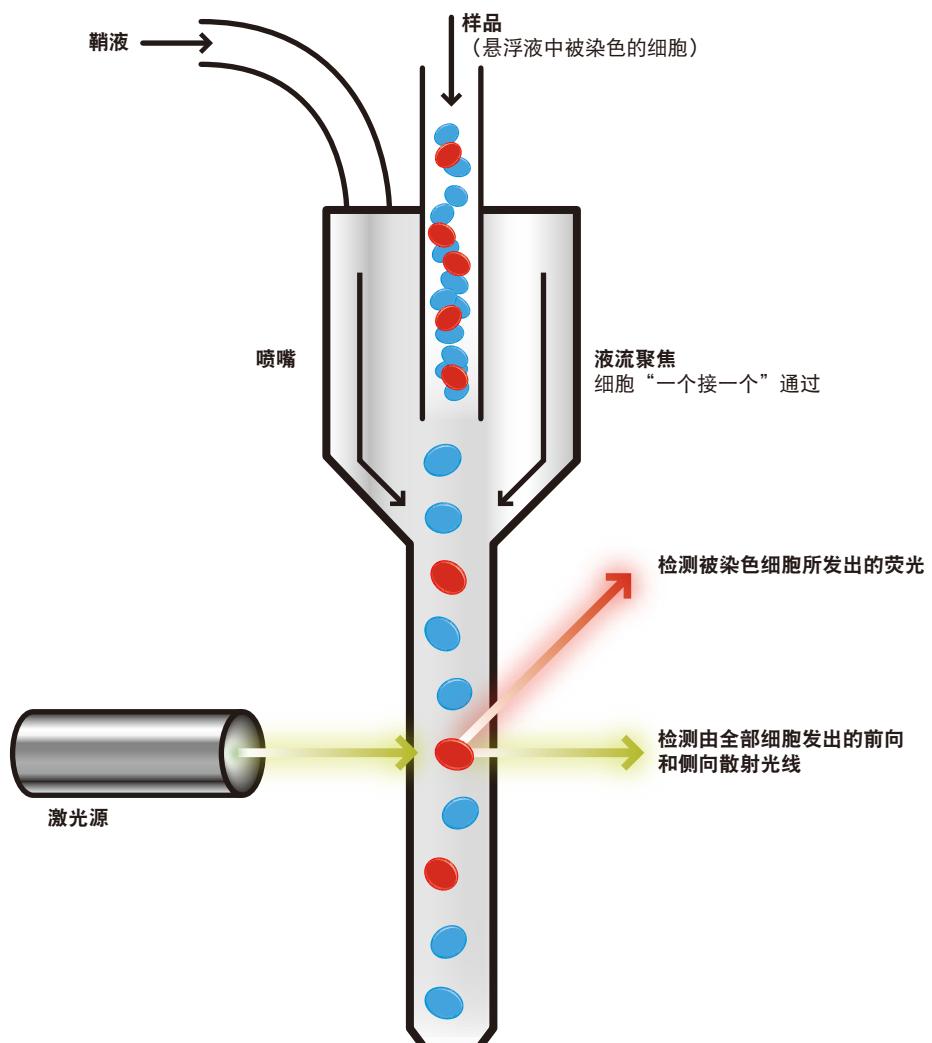
流式细胞术现在是被广泛应用于分析细胞表面和细胞内分子表达水平，从多样性的细胞群中分辨及界定不同的细胞种类，测定分离出的细胞亚群纯度，以及分析细胞的大小和总量。它可以同时分析单个细胞的多个参数。流式细胞术主要用于检测样本中所发出的荧光强度。这些荧光是由带有荧光标记用以检测蛋白的抗体，或与特定的细胞分子结合的配体所产生，如与DNA结合的溴化丙啶(PI)等。

染色步骤包括：将培养的细胞或组织样品制成单细胞悬液。然后将细胞放入管子或酶标板中与荧光标记或未标记的抗体孵育。最后将细胞放入流式细胞仪中进行分析。

目录

1. 流式细胞仪：射流系统。
2. 流式细胞仪：检测前向和侧向散射光。
3. 流式细胞仪：检测散射光和荧光。
4. 抗体染色。
5. 选择荧光结合染料。

8.1 流式细胞仪：射流系统



悬浮缓冲液中被染色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。这种微小的“流液束”使细胞一个接一个地通过激光。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。其中光柱前有一个检测器，称为前向散射(Forward Scatter, 或简称FS)，而光柱的旁边则有几个检测器，称为侧向散射(Side Scatter, 或简称SS)。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。

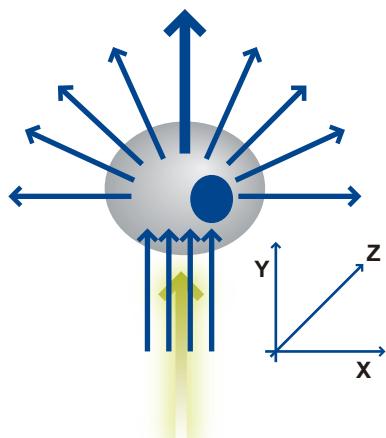
8.2 流式细胞仪：前向和侧向散射光的检测

颗粒/细胞通过光束时使光线散射，并通过前向散射 (FS) 和侧向散射 (SS) 而被检测到。散射光和荧光会被检测并一并分析。其中前向散射与细胞大小有关，而侧向散射则取决于颗粒/细胞的密度（即胞浆颗粒数量、细胞膜尺寸）。因此，透过这种方式，根据细胞大小和密度通常可把不同细胞群区分开。

细胞散射的光线方向与以下有关：

- 细胞大小（前向散射；FS）
- 粒度（侧向散射；SS）

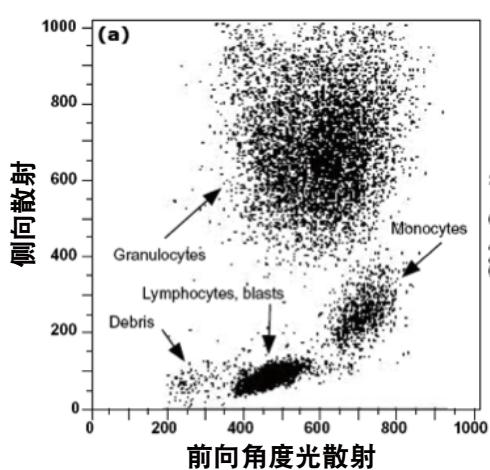
下图显示绿色激光照射细胞时的光散射模式：



此技术的一个有用的例子是使用流式细胞仪分析血液样本。

- 侧向散射和前向散射数值都很高的庞大细胞群属较大和较高粒度的粒细胞。
- 单核细胞属形状较大的细胞，但粒度较低，因此其细胞群的前向散射数值高而侧向散射数值低。
- 前向散射较低的独立细胞群属较小的淋巴细胞和淋巴母细胞。它们不是粒状细胞，因此侧向散射也较低。

因此，这些细胞可以根据其前向散射和侧向散射分成不同的细胞群。



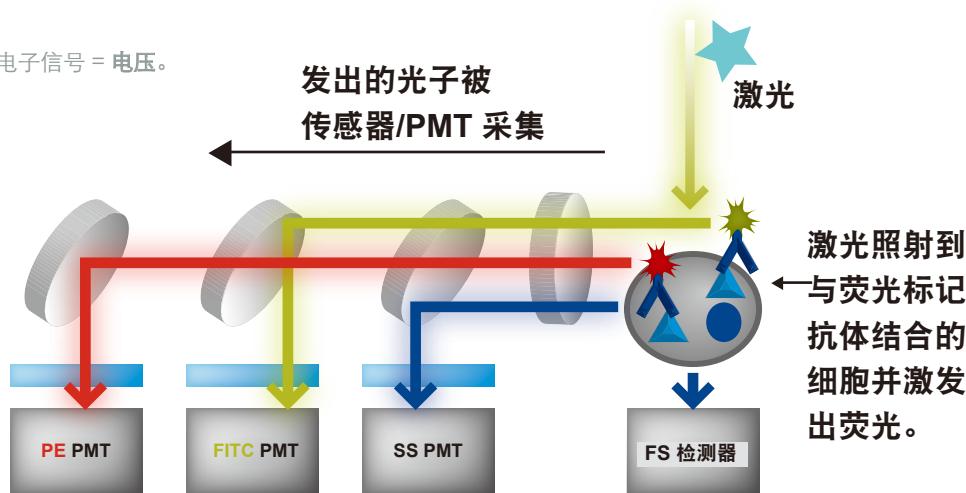
数据：Roger S. Riley 等人。

8.3 流式细胞仪：散射光和荧光的检测

用于对靶蛋白进行检测/染色的荧光染料被相应激发波长的激光激发时将发出光线。那些被荧光标记了的颗粒或细胞，可以个别检测和分析。

自染色细胞发出的前向和侧向散射光及荧光被流式细胞仪内一套滤光片和反光镜分成各个特定的波长并导向。荧光在流式细胞仪内被过滤，使每个传感器检测的荧光只属某特定波长。这些传感器称为光电倍增管 (PMT)。

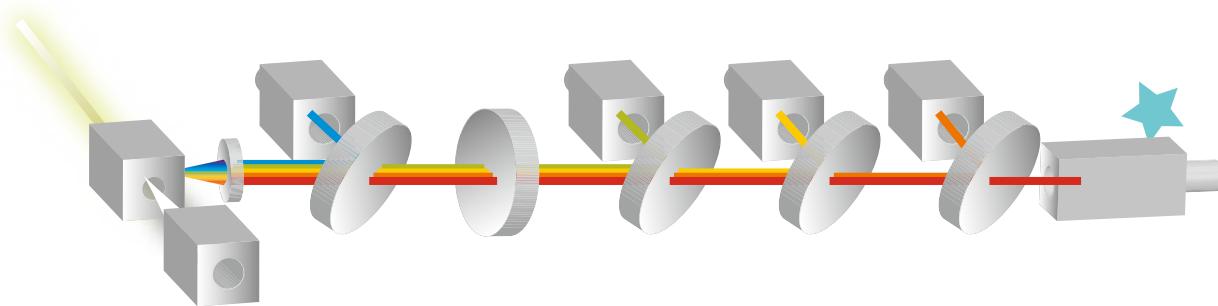
PMT 将光子的能量转换成电子信号 = 电压。



例如：

FITC 频道 PMT 检测 FITC 发射大约 519nm 波长的光。（它也检测任何其他荧光色素所发射出相近波长的荧光。）PE 通道 PMT 检测 PE 发射 575nm 波长的光。（每个 PMT 会检测任何其他荧光色素所发射出相近波长的荧光。）

下图展示了流式细胞仪光学器件的一个例子。



BP = 带通滤光片；DL= 双色长通滤光片/反光镜；

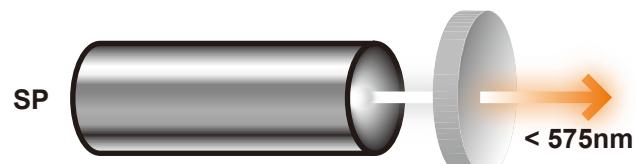
在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

流式细胞仪采用了不同的滤光片来引导正确波长的光子通过每个 PMT:

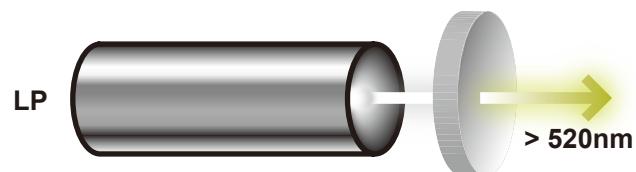
带通 (BP) 滤光片允许透射窄范围内波长的光子。



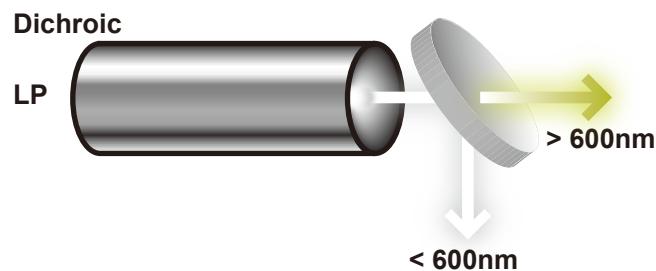
短通 (SP) 滤光片允许透射特定波长以下的光子。



长通 (LP) 滤光片允许透射特定波长以上的光子。



双色滤光片/反光镜（例如双色 LP 长通反光镜）安放在与光束形成 45° 角的位置。在长通双色滤光片中，特定波长以上的光子直接透过，与此同时特定波长以下的光子会以 90° 角反射。

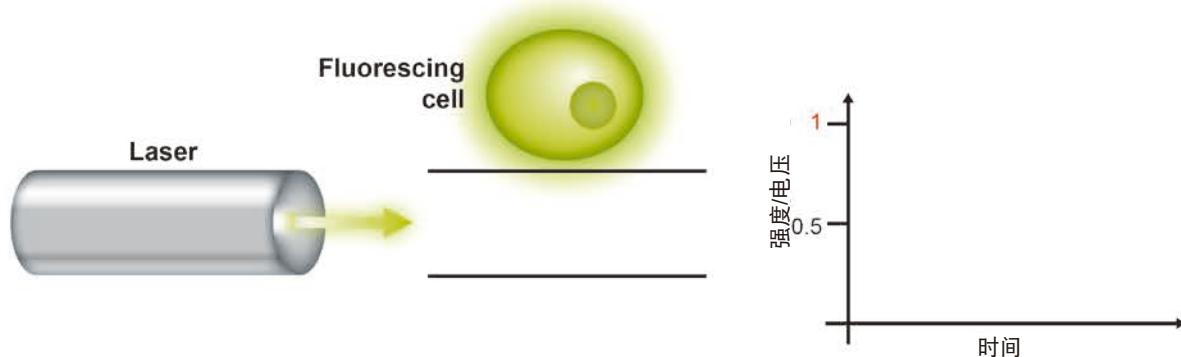


信号检测：

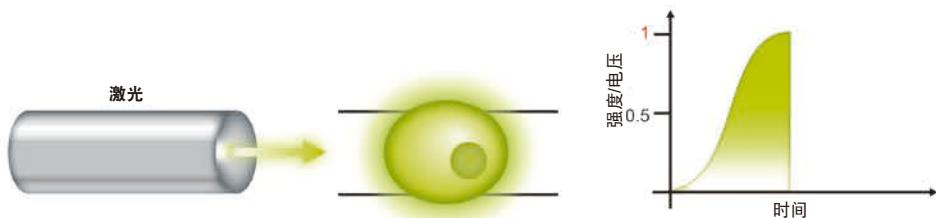
PMT 检测荧光细胞每次发射的光子所产生的电压脉冲面积。

当荧光细胞通过激光束时，按一段时间内的光子数量所产生的峰或脉冲。它们被 PMT 检测到并转化为电压脉冲。每个细胞的每个脉冲称为一次事件。测得的电压脉冲面积与该事件的荧光强度直接相关。

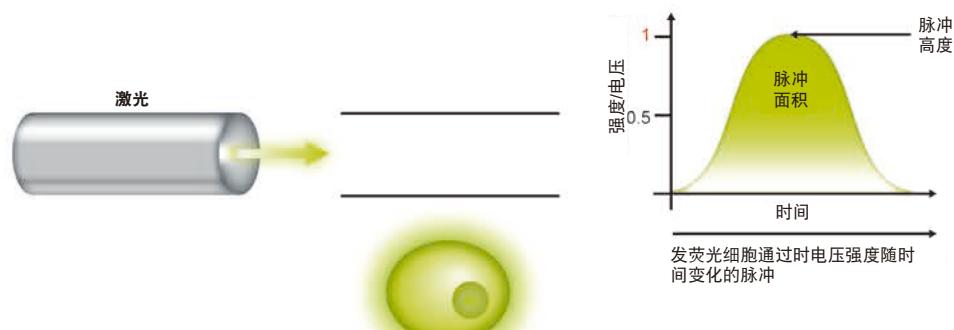
1. 当没有荧光细胞通过光学仪器时，没有光子发射，所以检测不到信号。



2. 随着荧光标记细胞通过光学仪器并被激光照射，发射的光子数量增加，检测到的电压强度也相应增加。



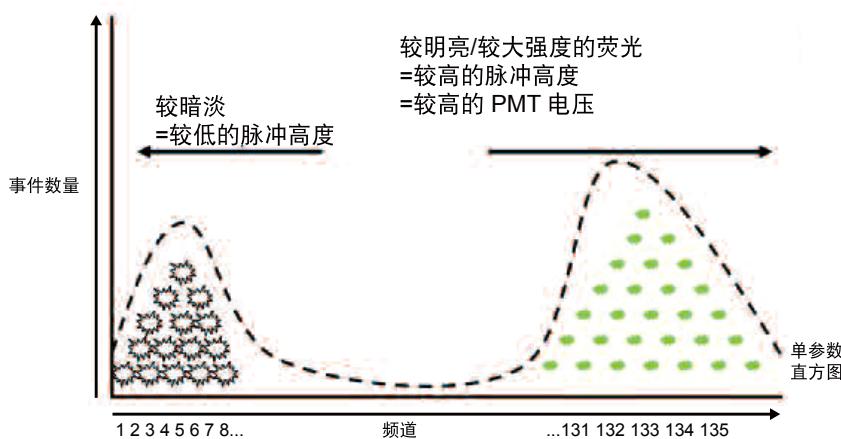
3. 当每个荧光细胞完成通过激光束的路程，随着时间变化会形成一个电压脉冲。总脉冲高度和面积会被流式细胞仪检测。该脉冲称为一次事件。每次的事件将会具有特定的强度，具体取决于所得脉冲面积。



脉冲面积由每个脉冲时间片（取决于 ADC 的速度）的高度值加起来而确定，其中脉冲时间片为 10 兆赫，即每秒 1000 万个脉冲或每微秒 10 个脉冲。面积更好地代表了荧光总量。

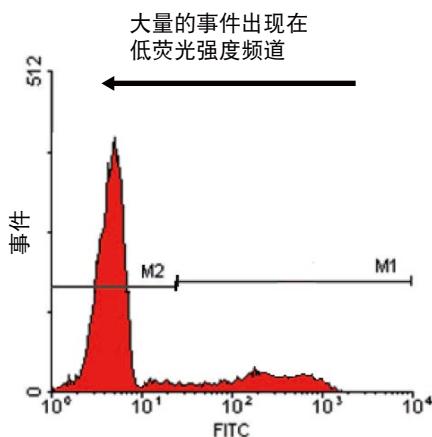
这些事件根据脉冲强度（脉冲面积）而分配通道。

这些信号可以藉调高流过 PMT 的电压而被放大。

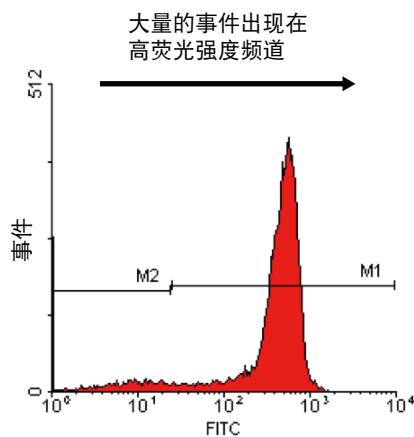


根据其测量强度，每个事件赋予一个频道编号。总共有 1024 个通道。荧光越强，事件分配的频道编号越大。频道编号与事件数量的曲线图是单参数直方图。通常，这些频道都以对数标度显示在 x 轴上。

无染色的阴性结果

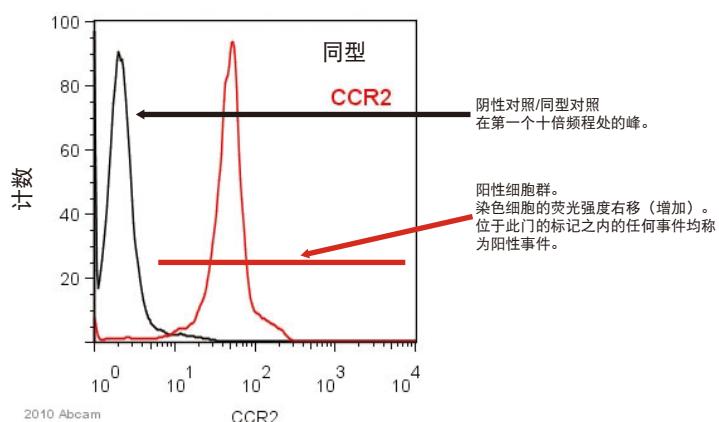


阳性结果



如观察到阴性对照与阳性对照之间信号发生移位，此为阳性结果。例如：ab21667 CCR2 抗人外周血单核细胞 (PBMC) 抗体染色，设门于单核细胞。

数据：匿名 Abreview



更多有关流式细胞仪的使用和数据分析的信息，请查看我们的流式细胞术实验方案。

8.4 抗体染色

直接染色

直接免疫荧光染色时，细胞与直接偶联有荧光染料（如 FITC 标记）的抗体孵育。这种方法的优点在于只需要一步抗体孵育，从而排除了二抗非特异性结合的可能性。这对细胞内染色特别有用，因为包含二抗的大抗体荧光复合物有可能被困住，造成非特异性结合甚或无法进入细胞，而使一抗检测不到。

间接染色

间接染色时，一抗是没有标记荧光色素，而是通过带有荧光色素标记的二抗进行检测。这种二抗是对一抗具有特异性的抗体。另外可选择使用亲和素-生物素系统，即使用偶联了生物素的抗体，通过带有荧光标记的亲和素进行检测。随着目前有更多种类的偶联二抗可以选择，这种方法意味着结合使用一种带有荧光标记的二抗，可配合针对不同目标蛋白而没有连接偶联物的一抗，来进行流式细胞术的分析。这拓宽了研究者对目标蛋白的选择。

细胞内染色

使用流式细胞技术进行的细胞内源抗原的染色检测成功与否，取决于各种不同的固定和通透方法，以使抗体接近细胞内部蛋白。任何情况下，要获得成功的染色都必须对实验条件进行优化，包括测定抗体效价，采用合适的对照来正确设定流式细胞仪，并且优化固定和通透步骤。

检测分泌蛋白

检测分泌蛋白是相对困难，是由于蛋白在检测前就从细胞中向外分泌或者迅速降解。进行此类实验需要使用高尔基体阻断剂 (Golgi-Block)，例如布雷非德菌素 A (Brefaldin A)。细胞与 Brefaldin A 孵育，可以阻止蛋白从高尔基体中释放。任何已表达而停留在高尔基体内的蛋白，都可以在细胞内被检测，使用细胞内染色方法，便可检测此类目标蛋白。

8.5 选择合适的荧光色素偶联物

对一个给定的抗体，能否从阴性信号中分辨出阳性信号，往往取决于所用的荧光色素偶联物。

各种荧光色素相对强度的一般准则是，从最亮到最暗：PE、PE-Cy7、PE-Cy5、APC > APC-Cy7、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700 > FITC、Pacific Blue、Alexa Fluor 488。这是一般模式。在个别抗体中，这相对强度的模式会有差异。

一个有高表达水平的抗原，几乎使用任何一种荧光色素都能检测出其抗原和从阴性信号中分辨出来。水平较低的抗原或需要配合使用较亮的 PE 或 APC 这类偶联物来获取高信背比，以便从未染色细胞中充分地分离出阳性细胞。

荧光色素的相对强度取决于仪器。这是由于不同的仪器上的激光和滤光片的组合存在差异。切记使用合适的流式细胞仪。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第九章：免疫沉淀 (IP)

免疫沉淀步骤

免疫沉淀是一种纯化蛋白质的方法。将我们感兴趣的一种蛋白质的抗体与细胞提取液孵育，以使抗体和蛋白质在溶液中结合。然后用蛋白A/G耦合的琼脂糖凝胶，从样品中将抗体/抗原复合物提取出来。这种物理方法可将所需蛋白质从样品中分离出来。然后样品可以通过SDS-PAGE分离出来进行Western blot分析。

9.1a 裂解缓冲液

理想的裂解液将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质，以满足接下来的分析。非离子型去污剂比如NP - 40 和Triton X-100 比离子型去污剂如SDS 和脱氧胆酸钠要温和一些。其它可以影响到IP 成功的因素包括盐浓度、二价阳离子浓度和pH 值。因此，要按如下范围优化这些变量（摘自Harlow and Lane, 231 页，见参考部分67 页）：

- 0-1 M 盐
- 0.1-2% 去污剂，非离子型
- 0.01-0.5% 去污剂，离子型
- 0-10 mM 二价阳离子
- 0-5 mM EDTA
- pH 值：6-9

各种裂解液配方可以参考缓冲液部分：第11 章，第71 页。

变性裂解液

用于去污剂可溶性抗原，并且抗体可识别其天然构象。

1. RIPA (放射免疫沉淀法) 缓冲液

比裂解液NP - 40 或Triton X-100 更能使蛋白质变性，RIPA 缓冲液含有离子型去污剂SDS 和脱氧胆酸钠作为活性成分，对裂解核膜进行核内提取特别有用。RIPA 缓冲液可以降低背景，但同时可使某些蛋白变性，包括蛋白激酶。

2. 不含去污剂的可溶性蛋白裂解液

使用含EDTA 和叠氮钠的PBS。有些可溶性蛋白不需要使用去污剂。对细胞使用此缓冲液并加上机械破损，例如反复通过注射器或用Dounce 匀浆器匀浆。

3. 变性裂解液或用于不溶性抗原缓冲液的去污剂

天然蛋白质的抗原表位总是不容易靠近只识别变性蛋白质的抗体。当收集和裂解细胞时，用变性裂解液加热细胞。这个方法也可用于非离子型去污剂不能从细胞中提取的抗原。用DNase1 将有助于从染色质中提取蛋白质。

9.1b 其他试剂

蛋白酶抑制剂

一旦裂解发生，水解、去磷酸化和变性就开始了。如果样本在冰上或始终在4°C 存放以及一开始就在裂解液中加入适当抑制剂的话，这些反应将可以大大减缓。混合（“鸡尾酒”）的蛋白酶和磷酸酶抑制剂已经商品化了。如果不使用混合的蛋白酶抑制剂，IP 实验中最常用的两种蛋白酶抑制剂是PMSF (50μg/ml) 和抑肽酶 (1μg/ml)。磷酸酶和蛋白酶抑制剂的详细资料，请参阅我们的蛋白质免疫印迹实验指南。所需的其他试剂：

- 无菌PBS pH 7.4
- 无菌PBS-牛血清白蛋白1% W/V (过滤)
- TBST 缓冲液
- 蛋白免疫印迹实验的加样/样品缓冲液
- 100 mM EDTA 贮备液：1.86g EDTA 溶解到40ml 水中。加氢氧化钠调整pH 至7.4。最后定容到50ml。

9.2 裂解物制备

培养细胞的裂解

非变性：

1. 将细胞培养皿放置冰上并用冰冷的PBS洗涤细胞。
 2. 吸干PBS 后，再加入冰冷的裂解液（每107 细胞/ 100mm² 培养皿/150cm² 培养瓶加1ml，每5x106 细胞/ 60mm² 培养皿/ 75cm² 培养瓶加0.5ml）。
 3. 用预冷的塑料细胞刮刀将贴壁细胞从培养皿上刮下，然后轻轻将细胞悬液转移到预冷的EP 管中。
 4. 4°C 持续振荡30 分钟。
 5. 放入微型离心机4°C 离心。
- 您可能要根据细胞的类型更改离心力和时间。一个准则就是12,000rpm 20 分钟，但是这必须由最终用户决定（如白细胞需要轻度离心）。
6. 从离心机中轻轻地取出离心管放置在冰上。将上清液吸出转移到预冷的新管（放在冰上）中，弃沉淀。

变性：

- 加100μl 变性裂解液至0.5-2 × 10⁷个细胞中。
- 用涡旋混合器最大速度剧烈震荡2-3秒。将细胞悬液转入EP管。



由于DNA的释放，这步的溶液是粘性的。

- 样品加热95°C 5分钟变性。
- 用0.9 ml 非变性裂解液稀释悬液，轻轻混合。（非变性裂解液中过量1% Triton X - 100 可以淬灭原来变性缓冲液中的SDS）。
- 将裂解的悬液通过1ml 注射器针头5-10次，把DNA打成片段。



重复机械断裂直到把粘度降低到可操作的程度。如果DNA没有完全消化成片段，就会影响离心后分离上清和沉淀。

- 冰上孵育5分钟。
- 进行免疫沉淀反应。

组织裂解

- 用干净器械解剖所要的组织，最好在冰上，并快速操作以防止蛋白酶降解。
- 将组织放入圆底离心管中，浸入液氮中“速冻”。样本在-80°C 储存备以后使用或放在冰上立即匀浆。
- 对于约5mg 组织，向管中迅速加入约300μl 裂解液并用电动匀浆器均浆。
- 裂解液冲洗刀片两次，每次300μl，然后4°C 持续振荡2小时（将回旋振荡器放入冰箱）。

裂解液的体积根据组织总量来决定。蛋白提取物不宜过于稀释，以避免蛋白质损失，并尽量减少样品体积以便凝胶上样。最小浓度为0.1mg/ml；最佳浓度为1-5mg/ml。



注：如果样品需要变性，使用变性裂解液，然后参考上文变性程序执行步骤2-5。

- 微型离心机4°C 12000rpm 离心20分钟。从离心机中轻轻地取出离心管放置在冰上。吸出上清液放入预冷的新管（放在冰上）中，弃沉淀。

9.3 裂解物的预清除程序

裂解物预清除可以帮助减少蛋白质非特异性结合到agarose (琼脂糖)或Sepharose beads (凝胶琼脂糖珠)。用无关抗体或血清预清除，可去除蛋白质与免疫球蛋白的非特异结合。最终实验结果背景降低并且信噪比提高。但是，如果最后蛋白质是由免疫印迹实验检测，预清除未必必要，除非是污染蛋白质对目的蛋白质产生明显干扰。

- 加入50μl 同种动物来源和型的无关抗体或正常血清作为免疫沉淀抗体（一些研究人员首选兔，参考Harlow and Lane, 243页）到1ml 裂解物中，在冰上孵育1小时。
- 加入100μl 珠浆。
- 4°C 孵育10-30分钟并轻轻搅拌。
- 微型离心机14000g 4°C 离心10分钟。
- 丢弃珠子并保留上清进行免疫沉淀。

为了提高收率，珠子可用裂解液洗涤1或2次以上，并将上清收集在一起。

重要的是要确保尽可能多的去除正常血清，这是因为它会与特异抗体竞争靶抗原。为了检查这一点，可以做一个测试：用裂解缓冲液代替样品，如上进行所有预清除步骤。考马斯蓝染色的凝胶将显示上清液中血清IgG是否被有效去除。如果血清没有得到充分去除，泳带将出现在50和25 kDa处，这是重链和轻链，它的存在可能导致一个弱的免疫沉淀反应。在预清除步骤，考虑降低血清量或增加与您的样品孵育的珠子数量。

9.4 免疫沉淀

1. 在冰上预冷离心管中加入 10-50 μ g 含推荐量抗体的细胞裂解物。具体数量将根据蛋白质的丰度和抗体与蛋白质的亲和力来选择。通常在预实验中，通过增加抗体的量沉淀固定数量的蛋白质。

您可以查看抗体数据表获得建议抗体的浓度。以下供参考使用：

- 1-5 μ l 多克隆抗体血清
- 1 μ g 亲和纯化的多克隆抗体
- 0.2-1 μ l 腹水（单克隆抗体）
- 20-100 μ l 培养液上清（单克隆抗体）

2. 样品和抗体孵育的固定时间 4° C 1-12 小时（过夜），最好轻轻振荡或旋转。孵育时间的长短取决于蛋白质的量和抗体的亲和特性。

3. 同时准备琼脂糖珠子。如果使用单克隆抗体，选择蛋白 G 偶联琼脂糖珠子。如果使用多克隆抗体，蛋白 A 偶联琼脂糖珠通常是适合的（请参阅“选择蛋白珠”表9.5 下文）。如果买来的珠子是粉末，100mg 的珠子与 1ml 0.1M PBS 孵育，洗 1 小时后珠子膨胀起来，然后离心，去除上清。加入 1ml 含 0.1% BSA (牛血清白蛋白) PBS，混合 1 小时，PBS 洗涤 2 次。去除上清并加入 400 μ l 含蛋白酶抑制剂的缓冲液（可与裂解液相同）就可以使用了。它可以在 4° C 储存几天；在含 0.02% 叠氮钠的 PBS 里会保存更长时间（使用当天用新鲜裂解液充分洗涤珠子）。您也可以购买事先膨胀好的珠子直接使用。



最好是用尖端切掉的移液吸头，以防破坏珠子。

IgM 抗体：不要使用蛋白 A 或蛋白 G 结合珠子。使用山羊抗小鼠 IgM (或多价 Ig 或抗重链) 的珠子。

4. 浆料混合好，向每个样本中加入 70-100 μ l。始终保持样品在冰上。珠子将倾向于粘着吸头，所以尽量减少珠子在吸管中运动并使用从尖端切断 5mm 的吸头。

5. 裂解珠子混合液 4° C 孵育 4 小时并旋转振荡（最佳孵育时间可由预实验确定）。

6. 当孵育结束后，管子离心，去除上清液并用细胞裂解液洗涤珠子 3 次（每次 4° C 离心去除上清）。

7. 最后，去除最后一次上清并加入 25-50 μ l 2× 上样缓冲液。95-100° C 煮沸 5 分钟，以变性蛋白质并将其与蛋白- A / G 珠子分离，随后离心并保持上清含有蛋白质。然后，您可以冻存样品或进行 SDS - PAGE 电泳。



使用上样缓冲液是最苛刻的洗脱方法，也将洗脱任何非共价结合的抗体和抗体片段，这将显示在免疫印迹胶中。

抗原可用温和的甘氨酸梯度洗脱（高达 1M），以减少抗体洗脱量。请同时参阅抗体交联琼脂糖凝胶分离程序。

9.5 选择合适的微珠，汇总表

各种来源免疫球蛋白类型	蛋白A	蛋白G
人IgG1	+++	+++
人IgG2	+++	+++
人IgG3	-	+++
人IgG4	+++	+++
人IgM	用抗人IgM	
人IgE	-	+
人IgA	-	+
小鼠IgG ₁	+	+++
小鼠IgG2 _a	+++	+++
小鼠IgG2 _b	++	++
小鼠IgG ₃	+	+
小鼠IgM	用抗小鼠IgM	
大鼠IgG	-	+
大鼠IgG _{2a}	-	+++
大鼠IgG _{2b}	-	++
大鼠IgG _{2c}	+	++
鸡全部亚型	-	++
奶牛全部亚型	++	+++
山羊所有亚型	-	++
豚鼠所有亚型	+++	++
仓鼠所有亚型	+	++
马所有亚型	++	+++
猪所有亚型	+	++
兔所有亚型	+++	++
绵羊所有亚	-	++

Key: +++ = Strong binding, ++ = Medium binding, + = Weak binding, - = No binding

参考资料

Harlow, Ed, and David Lane. Using Antibodies. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
Bonifacino, Juan S. et al. Current Protocols in Immunology 8.3.1-8.3.28, New York: John Wiley, 2001.

9.6 使抗体与微珠交联的步骤：

降低洗脱蛋白质溶液中污染的抗体数量：

为了使洗脱蛋白较少污染抗体，也为了更纯净蛋白质的制备和干净的免疫印迹实验，推荐将抗体与珠子交联。下面是一个实验程序举例（几个网站有关于这个程序有很多信息）。目标蛋白应该用温和的洗脱液洗脱，如甘氨酸缓冲液。更详细的缓冲液配方可在缓冲液章节找到，第71页。

试剂：

交联试剂：

邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)

储液浓度13mg/ml

洗脱试剂：

1M 甘氨酸（加浓盐酸调整pH 值至3）

稀释缓冲液：

PBS+ 1mg BSA 每1ml PBS

洗涤缓冲液：

含0.2M 三乙醇胺的PBS（每100ml 缓冲液中含3.04ml 三乙醇胺）

淬灭缓冲液：

含50mM 乙醇胺的PBS（311.7 μ l/100ml）

准备工作：

1. 珠子用PBS 洗2 次。最终浓度为50% 珠浆。

2. PBS 混合均匀并4° C 旋转过夜。

交联：

1. 微量离心机（14000rpm 1分钟）离心沉淀以洗涤珠颗粒。吸出PBS 上清液。

2. 1:1 比例加入稀释缓冲液，轻轻混合并4° C 旋转10 分钟。微型离心机离心并如上吸出/摒弃上清。

3. 按需要的浓度用抗体稀释缓冲液准备抗体溶液（参见抗体说明书的建议浓度）。1:1 比例将抗体加入，轻轻混合并4° C 旋转1 小时。

4. 离心并吸出/摒弃上清。

5. 1:1 的比例将稀释缓冲液加入，4° C 旋转5 分钟。离心并吸出/摒弃上清液。

6. 1:1 的比例将PBS 加入，离心并吸出/摒弃上清液。

7. 交联：

用1ml 洗涤缓冲液，溶解1ml 准备好的13mg/ml DMP 储液。迅速漩涡震荡混合。1:1 的比例将DMP 溶液加入，室温（RT）旋转30 分钟。



DMP 在水溶液中不稳定。使用前快速配制。



注意：您需要确认DMP 在加入珠子前后的pH 值均在8-9 之间（在此pH 值范围以外，交联效率将大大降低）。

用洗涤缓冲液洗涤珠子（室温旋转5 分钟，离心并吸出/摒弃上清液）。

1:1 比例第二次加入DMP，室温旋转30 分钟，按之前方法洗涤。

1:1 比例第三次加入DMP，室温旋转30 分钟，按之前方法洗涤。

7. 淬灭和洗涤。

1:1比例加入淬灭缓冲液，室温旋转5 分钟，离心并吸出/摒弃上清液；重复该步骤。

用PBS 洗。

8. 去除多余的（未交联）抗体：

用1M 甘氨酸（pH3）洗涤。室温旋转10 分钟，离心并吸出/摒弃上清液；重复该步骤。

9. 存储洗涤。

用免疫沉淀缓冲液洗涤（通常是PBS+吐温）。室温旋转5 分钟。

洗三次，最后一次旋转后保存。珠子可以在4° C 储存几天。可以加入0.02 - 0.05% 叠氮钠W/V 防止细菌生长。

免疫沉淀：

结合抗体的珠子现在可以进行如上常规IP 实验流程。

为了防止抗体与目标蛋白质一起洗脱，用温和的甘氨酸梯度洗脱（可到1M）。

9.7 用IgM 抗体进行免疫沉淀

由于IgM 抗体的五聚体结构，所以很难用于免疫沉淀实验。IgM 抗体还不能很好地结合蛋白A 或蛋白G。有两种方法可供选择：

9.8a 蛋白L 珠子

蛋白L是一个36 kDa 的免疫球蛋白结合蛋白，可从大消化链球菌纯化。蛋白L 可以结合抗体的轻链（而蛋白A 和G 结合抗体重链的Fc 段）。

蛋白L 比蛋白A 或G 结合抗体类型范围更广泛，因为重链的任何一部分都不参与结合相互作用。它能够结合所有抗体类型，包括 IgG、IgM、IgA、IgE 及IgD。单链可变区段 (ScFv) 和Fab 片段也能结合蛋白L。

蛋白L 仅限于结合那些含有kappa(κ) 轻链（即VL 功能区）的免疫球蛋白。在人类和小鼠中，以kappa (κ) 轻链为主。其余的免疫球蛋白有lambda(λ) 轻链，它不结合蛋白L。此外，蛋白L 仅能有效结合kappa 轻链的某些亚型。例如，它结合人类V_kI、V_kIII 和V_kIV 亚型，但不结合V_kII 亚型。对于小鼠，仅限于结合那些具有V_kI 轻链的免疫球蛋白。

利用蛋白L有几个优势：

1. 蛋白L 不能结合牛、绵羊或山羊的抗体，因此非常适合从含牛血清的细胞培养液中纯化小鼠IgM。
2. 蛋白L 可以结合多种动物来源抗体的kappa 轻链而不干扰抗原结合位点，因此非常适用于用IgM 抗体的免疫沉淀。
3. 它能结合所有类别的免疫球蛋白 (IgG、IgM、IgA、IgE 及IgD)，因此对IgM 纯化特别有用，因为IgM 不能用蛋白A 或G 纯化。

9.8b 使用结合了抗IgM 的IgG 的蛋白A 或G 珠子

此方法涉及抗IgM 抗体的IgG 鞣联蛋白A 或G 珠子（方法见下文）。这些珠子就可以在常规免疫共沉淀程序中使用IgM 抗体。通过结合抗-IgM 抗体，IgM 可以间接结合珠子。

下面的过程介绍了用DMP 如何把抗IgM 抗体与蛋白A 或G 涂层的珠子耦合：

试剂：

- 200mM 硼酸盐缓冲液+ 3M 氯化钠pH 值9.0
- 含20mM (DMP) 的200mM 硼酸缓冲液+ 3M 氯化钠，pH 值9.0
- 200mM 乙醇胺pH 值8.0 (乙醇胺储液1:80 稀释)
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- PBS+ 0.1% 叠氮化钠
- 200mM 甘氨酸pH 值2.5
- 蛋白A 或G 珠子 (Sephadex)

方法：

我们建议每ml 湿珠子使用每2mg 抗体（使用适当的抗体/蛋白A 或G 结合物）。

1. 使用前1 小时将250mg 蛋白A 或G Sephadex (珠子) 加入2ml PBS+0.1% 叠氮钠。这使得珠子膨胀。
2. 将珠子与适当浓度的抗体室温混合2 小时（旋转或滚动）。
3. 2500rpm 离心5 分钟。
4. 10 倍体积200mM 硼酸缓冲液+ 3M 氯化钠洗珠子两次。
5. 20mM DMP 重悬珠子。
6. 室温旋转/振荡珠子30 分钟。
7. 将珠子2500rpm 离心5 分钟。
8. 200mM 硼酸盐缓冲液+ 3M 氯化钠洗珠子2 次。
9. 20mM 乙醇胺洗珠子1 次。这步终止耦合反应。
10. 20mM 乙醇胺重悬珠子并室温旋转2 小时。
11. 将珠子2500rpm 离心5 分钟。
12. PBS 洗珠子2 次。
13. 200mM 甘氨酸洗珠子2 次。
14. PBS 洗珠子2 次。
15. 珠子可以4° C 储存在PBS + 0.1% 叠氮钠溶液里 (PBS : 珠=1:1)。
16. 这些珠子可用于IgM 抗体的免疫沉淀实验。从这里就可以按照我们前面描述的免疫沉淀实验方法继续进行免疫沉淀程序了，见60 页。

9.9 免疫沉淀疑难解答提示

高背景

去污剂不溶性蛋白有残留

离心后立即去除上清。沉淀中留有不溶性蛋白质，如果再次有悬浮发生，再次离心。

洗涤不充分

盖上管盖离心前反复颠倒几次。

非特异性蛋白质与珠子结合。

珠子用BSA预封闭不充分。确保牛血清白蛋白（组分V）新鲜，新鲜珠子与含1%牛血清白蛋白的PBS孵育1小时，使用前PBS洗3-4次。

使用的抗体特异性不够。

使用亲和纯化的抗体，最好预先吸收。

使用太多抗体导致非特异性结合

检查推荐抗体用量。尝试使用更少的抗体。

细胞裂解液中含有太多的细胞或太多蛋白质，导致洗脱液中有很多额外的（假阳性）蛋白质。

减少细胞数量/裂解液使用。我们推荐使用10-500 μ g细胞裂解液。

蛋白与抗体非特异性结合

如果有很多非特异结合的蛋白质，可以尝试减少上样珠子的样本数量。您还可以在开始免疫沉淀实验之前预先孵育珠子和准备好的裂解液（请参阅实验方案）来预清除裂解液。这应该清除裂解液内任何与珠子非特异结合的蛋白质。一些研究人员也使用同种来源和相同免疫球蛋白亚类的无关抗体来预清除裂解液。

免疫沉淀实验时抗原降解

确保样品裂解时加入新鲜的蛋白酶抑制剂。

大量抗体被洗脱

太多抗体与目标蛋白质洗脱

尝试减少抗体用量。免疫沉淀前将抗体与珠子交联，并使用温和的甘氨酸缓冲液梯度洗脱将大大减少抗体洗脱量。

没有检测到目的蛋白洗脱

所用样品中不表达或低水平表达目标蛋白质

检查目标蛋白质的表达谱，以确保它会在您样品的细胞表达。如果有目标蛋白低水平表达，增加裂解液的使用量。但是，这可能导致增加非特异性结合，所以开始免疫沉淀程序之前最好预先清除裂解液。

没有足够的抗体捕获目标蛋白

检查抗体的建议使用量。抗体浓度可能需要增加。

目标蛋白没有从珠子上洗脱

确保您使用的洗脱缓冲液是正确的，并且是洗脱蛋白质所需的正确强度和pH值。

抗体没有结合免疫吸附磁珠

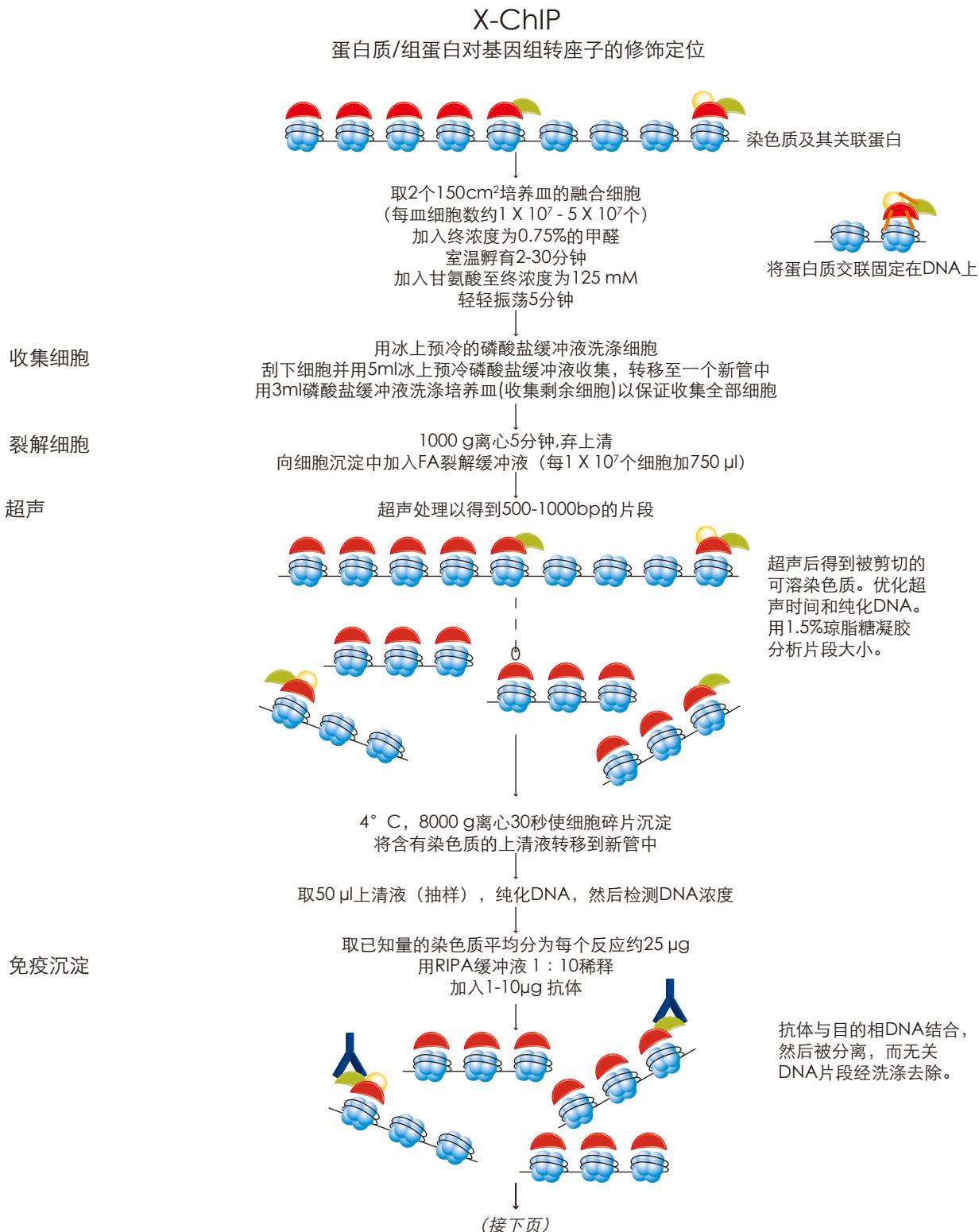
确保您使用的珠子与抗体亚型匹配。

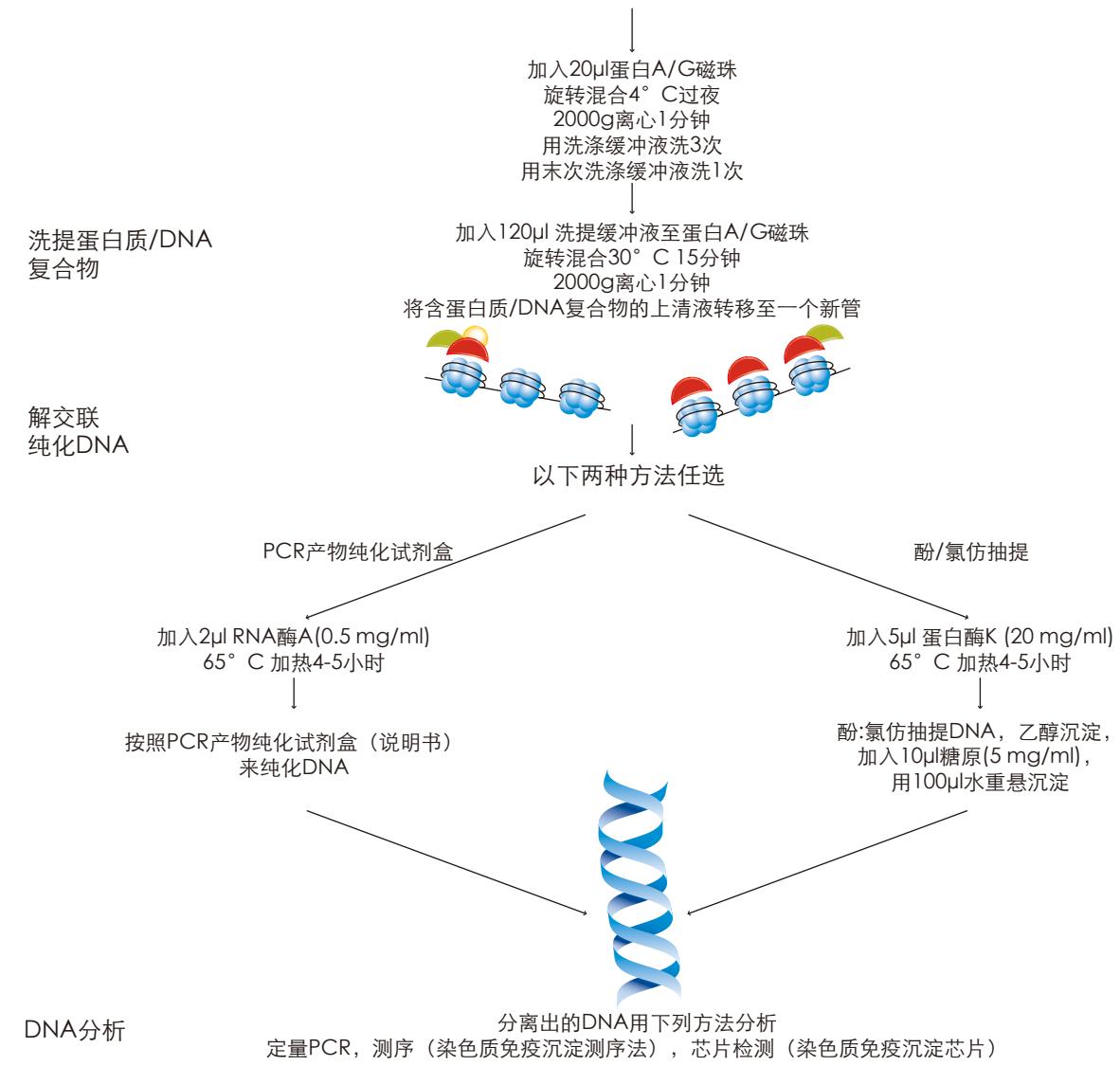
使用的裂解液不正确。

检查说明书，看看抗体是否能检测变性蛋白质或天然蛋白质，并确保使用正确的裂解液。

第十章: 染色质免疫沉淀

10.1 交联染色质免疫沉淀(X-ChIP) 操作步骤





染色质免疫共沉淀是一种强力的手段，来联系蛋白质或其修饰位点与基因组的关系。染色质分离并用特异性抗体判断是否与特异性DNA序列相结合。染色质免疫沉淀法亦可用来检测目的位点在基因组中的时空分布（用芯片或DNA测序）。本操作规程详细阐述了交联染色质免疫沉淀(X-ChIP)实验的具体步骤。

1. 交联和细胞收集



用甲醛来使蛋白质和DNA相交联。交联的时间很关键，因此需优化。建议样本交联的时间为2-30分钟。

过度的交联可降低抗原的可结合性和超声的效率。抗原的表位也会被遮盖。甘氨酸可抑制甲醛的作用并终止交联反应。

- 1.1 取2个150cm²培养皿的融合细胞(每皿细胞数约1×10⁷-5×10⁷个)。向培养基中滴加甲醛以使蛋白和DNA相交联，甲醛的终浓度为0.75% (体积百分比)，室温下轻轻摇动10分钟。
- 1.2 加入甘氨酸至终浓度为125mM，轻轻振荡孵育5分钟。
- 1.3 用10ml冷PBS洗涤细胞2次。
- 1.4 刮下细胞并用5ml冷PBS收集，转移至一个50ml离心管中。
- 1.5 用3ml PBS洗涤培养皿，收集剩余细胞至50ml离心管中。

1.6 1000g 离心5分钟

1.7 小心吸弃上清液，用FA 裂解缓冲液重悬沉淀(每 1×10^7 个细胞加750μl)



用细胞悬液实验时，起始细胞量为 1×10^7 - 5×10^7 个细胞，并按照第一部分的步骤加入体积百分比0.75% 的甲醛和甘氨酸。

离心沉淀细胞 (5分钟, 1000g)。用冷PBS 洗涤3次，用FA 裂解液重悬沉淀 (每 1×10^7 个细胞加750μl)。然后转到步骤2.1。

2. 超声



当使用组织来进行实验时（见步骤6.2），要得到单细胞悬液，应从此步超声处理开始。

2.1 将裂解液超声处理以使DNA 断裂成约500-1000bp 的片段。不同的细胞系需要不同的超声时间，因此需分别进行优化。



交联后的裂解液应进行超声处理，并优化得到最佳条件。取部分样本按照步骤3 进行DNA 分离。

片段大小应按照图1 所示，用质量百分比1.5% 的琼脂糖凝胶分析。

2.2 超声处理后，4° C，8000g 离心30 秒使细胞碎片沉淀。将上清液转移到新管中。此染色质溶液将用于步骤4的免疫沉淀 (IP)。

2.3 每个超声后的样本均取50μl，此样本为抽样样本，用于定量DNA 浓度（见步骤3），并作为PCR 的对照样本。



超声后的染色质可在液氮中速冻，在-80°C 中可保存2 个月。应避免反复冻融。

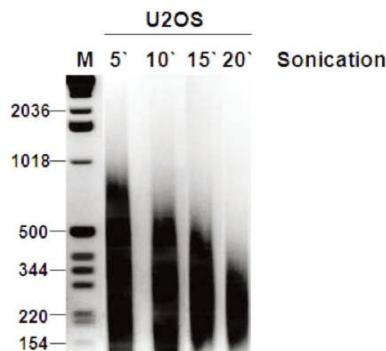


图1. U2OS 细胞分别超声5、10、15 和20 分钟。随着时间的延长，所得片段大小逐渐减少。超声15 分钟后可得到最适片段大小。

注意：超声时间过长会使核小体与DNA 的交联断裂，因此条带大小不应低于200bp。

3. DNA浓度测定

3.1 抽样样本用来测定DNA浓度，为后续IP反应提供数据。用PCR产物纯化试剂盒（加70 μ l洗提缓冲液，转至步骤3.2a）或酚：氯仿（加350 μ l洗提缓冲液，转至步骤3.2b）来纯化DNA。

3.2a 加入2 μ l RNA酶A (0.5 mg/ml)。置于65° C恒温振荡4-5小时（或过夜）以解交联。按照PCR产物纯化试剂盒说明书来纯化DNA。



用DNA纯化试剂盒来纯化DNA时，RNA浓度过高会干扰DNA的纯化过程，因此样本中应加入RNA酶A处理。否则纯化柱吸附饱和时产物会大大减少。

3.2b 加入5 μ l蛋白酶K (20mg/ml)。65° C恒温振荡4-5小时（或过夜）以解交联。酚：氯仿抽提DNA，乙醇沉淀中加入10 μ l糖原(5 mg/ml)。

用100 μ l水重悬沉淀。样本可冻存于-20° C冰箱中。



样本用蛋白酶K处理，可使脂肪与芳香族氨基酸的羧基邻近的肽键断裂。破坏蛋白质和DNA的交联可帮助DNA的纯化。

3.3 DNA浓度测定：取5 μ l纯化DNA，加入装有995 μ l TE的离心管中，200倍稀释，测定OD₂₆₀。根据公式DNA浓度 (μ g/ml) = OD₂₆₀ × 10,000，计算每毫升染色质溶液中DNA的浓度。

4. 免疫沉淀

4.1 使用步骤2.2中得到的染色质溶液继续此操作。建议每个免疫沉淀反应DNA含量约为25 μ g。每个样本用RIPA缓冲液1:10稀释。应设一个抗体对照和一个仅加磁珠的对照。

4.2 除对照外，其余样本中均加入一抗。事先应通过预实验得到最佳的抗体加入量。一般来说，每25 μ g DNA加入1-10 μ g抗体。

4.3 所有样本均加入20 μ l的蛋白A/G磁珠（预吸附了鲑鱼精DNA和牛血清白蛋白，见步骤4.3a），进行免疫沉淀反应，4° C旋转过夜。

4.3a 蛋白A/G磁珠与鲑鱼精DNA混合液的制备：如果使用蛋白A和蛋白G两种磁珠，应将其等体积混合，并用RIPA缓冲液洗涤3次。

吸弃RIPA缓冲液，加入鲑鱼精DNA至终浓度75ng/ μ l，同时加入牛血清白蛋白至终浓度0.1 μ g/ μ l。加入等体积RIPA缓冲液，常温旋转孵育30分钟。用RIPA缓冲液洗涤一次，然后加入等体积RIPA缓冲液。



应使用蛋白A磁珠、蛋白G磁珠或两种混合物。61页第9.5部分的表中列出了两种磁珠对不同种属免疫球蛋白的不同亲和性。

4.4 将蛋白A/G磁珠离心，2000g 1分钟，弃上清。

4.5 用1ml洗涤缓冲液洗涤磁珠3次。2000g离心1分钟。

4.6 用末次洗涤缓冲液洗1次。2000g离心1分钟。



如果背景过高，则应增加洗涤次数。或者，在步骤4.2之前将超声处理后的染色质与蛋白A/G磁珠共孵育1小时，以去除背景。此步将消除与磁珠的非特异结合。将上清液（超声处理的染色质）转移至一个新管中，然后按照前述步骤4.2将抗体与磁珠孵育。

5. 洗涤和解交联

5.1 洗涤DNA：向蛋白A/G磁珠中加入120 μ l洗涤缓冲液，30° C旋转15分钟。

5.2 2000g离心1分钟。将上清液转移至新管中。样本可于-20° C保存。

5.3 纯化DNA可用PCR纯化试剂盒（见步骤3.2a）或酚：氯仿（加280 μ l洗提缓冲液，然后参照步骤3.2b）法进行。

5.4 DNA可用实时PCR进行定量检测。可用实时PCR仪自带的软件进行引物和探针设计。或者，也可以使用在线设计工具进行设计。

6. 组织免疫沉淀中染色质的制备

此步骤描述了从组织中制备染色质，以用于后续的染色质免疫沉淀反应。每个免疫沉淀/抗体反应推荐使用组织30mg，但组织使用量可根据实际进行调整。每种组织的用量依据组织蛋白丰度、抗体亲和力和交联效率而定。每个免疫沉淀反应最适染色质的量为5-15 μ g。每次交联免疫沉淀反应之前，需根据不同组织类型确定具体的染色质需要量。应先按照下述方法制备染色质溶液，再进行交联免疫沉淀反应。所有溶液中均应添加蛋白酶抑制剂（10 μ l/ml 的PMSF，1 μ l/ml 的抑肽酶和1 μ l/ml 的亮肽素，溶于PBS中）。

本部分摘自Henriette O' Geen, Luis G. Acevedo 和Peggy J. Farnham 提供的操作规程。

6.1 交联



冰冻组织应置于冰上融化（根据组织用量的不同，此过程可能需要几个小时不等）。注意，冰冻组织融化时温度不能过高，以免蛋白酶活化使组织降解。操作过程中样本要一直置于冰上，所有操作均应迅速完成，以使其处于融化状态的时间最短。

组织切块时要在培养皿中进行，其下要放置一块干冰。

6.1.1 用刀片将冰冻或新鲜组织切成小块（1-3mm³）

6.1.2 取一个空的15ml 锥形离心管，称重，放入组织后再次称重，计算组织重量。

6.1.3 在通风橱中配制交联所用溶液。每克组织加10ml 磷酸盐缓冲液。加入终浓度1.5% (v/v) 的甲醛，室温旋转15分钟。

6.1.4 加入甘氨酸至终浓度0.125M，以终止交联反应。继续室温旋转5分钟。

6.1.5 组织样本离心，4° C 720 rpm，离心5分钟。

6.1.6 吸弃培养基，用10ml 冰上预冷的PBS 洗涤。4° C 720 rpm，离心5分钟，弃掉洗涤缓冲液。



此步所得组织可以用液氮速冻，然后保存于-80°C。应避免反复冻融。

如果随后使用，可以用冷PBS 重悬组织，每克组织加10ml，冰上放置。

6.2 组织降解

应用Becton Dickinson 生产的Medimachine（中型研磨器）处理得到单细胞悬液。每克组织使用2个中号锥形研磨管(50 μ m)。

6.2.1 将1ml 枪头的末端剪掉，使吸头口增大。

6.2.2 50-100mg (3-4 块) 的组织用1ml PBS 重悬。

6.2.3 将溶液加入锥形研磨管中，研磨2分钟。

6.2.4 将18号钝圆的针头连接到1ml 注射器上，将其插入锥形研磨管中收集细胞。将细胞加入一个锥形管中，冰上放置。

6.2.5 重复步骤2.2 直到所有组织均处理完。

6.2.6 镜下观察细胞悬液，以确定得到的是单细胞悬液。如果需要进一步研磨，可在组织中加入更多的PBS，重复步骤2.2 到2.5 直至所有组织均研磨成均一的悬液。

6.2.7 将细胞离心，1000rpm，4° C，离心10分钟。估算细胞沉淀的体积以备下一步操作。

6.2.8 小心吸弃上清液，用FA裂解缓冲液重悬沉淀（每1x10⁷ 个细胞加入750 μ l）。

6.2.9 从第2阶段（超声处理）开始，继续进行交联染色质免疫沉淀反应。

10.2 ChIP 疑难解答提示

无特异性抗体对照时出现背景过高

与蛋白A或G非特异性结合

应采用预清除处理，即在加入抗体前，将裂解的样本与磁珠混合1小时然后分离使用。

染色质免疫沉淀所用缓冲液被污染

裂解液和洗涤缓冲液要新鲜配制。

某些蛋白A或G磁珠本身会产生很高的背景

某些蛋白A或G磁珠会有很高的背景。要找到一个合适的供应商，所提供的产品应在非特异性对照样本中得到背景最低最干净的结果。

结合区域过大使得背景过高分辨率过低

片段过大

针对不同的细胞系，应优化DNA片段的大小。超声时间和酶孵育时间均应调整。建议DNA片段不要超过1.5kbp。如果用酶消化染色质，会得到175bp大小的单核苷酸酶。

信号过低

染色质片段过小

要得到小于500bp的染色质片段时，不需进行超声处理。太小的片段会使核小体被误认为核小体间的DNA而被消化掉。如果进行末端染色质免疫沉淀，通常酶消化法即能得到所需大小的染色质片段。

交联染色质免疫沉淀时交联时间过长

用甲醛交联10-15分钟，然后用磷酸盐缓冲液洗净，接着需要加入甘氨酸以终止甲醛的作用。过度交联可能会降低表位的可结合度从而减少抗体的结合。

原材料不足

建议每个免疫沉淀反应用25 μ g染色质

免疫沉淀中抗体不足

建议开始时加入抗体量为3-5 μ g。如果未检测到信号，可增加抗体量至10 μ g。

特异性抗体结合受阻碍

在洗涤缓冲液里氯化钠浓度不要高于500mM，否则浓度过高将阻碍特异性抗体结合

细胞裂解不充分

建议用RIPA缓冲液来裂解细胞

目标区域无足够的抗体

目标区域无表位。应有阳性对照抗体，以确认操作过程无误，如H3K4me3用于活化的启动子，或者H3K9me3抗体用于异染色质位点。

有些单抗不适合做交联染色质免疫沉淀

单抗识别的表位可能会在交联过程中被掩盖，而阻碍位点识别。建议用多克隆抗体，可识别多个表位，这样就增加了免疫沉淀目标蛋白的几率。

用错了抗体亲和性磁珠

蛋白A和G是细菌来源蛋白质，其对不同种的免疫球蛋白的亲和性不同。请使用特异性的亲和基质。建议使用混合好的蛋白A和蛋白G琼脂糖。

免疫沉淀DNA时PCR扩增的问题

反应后包括无模板的阴性对照在内的所有样本都出现很高的信号

实时PCR所用试剂被污染。建议使用储备液来新鲜配制溶液。

样本中无DNA扩增

使用标准对照/抽样DNA以确定样本中引物均有效。

在线查看我们
所有的实验方案：
www.abcam.cn/protocols

第十一章：缓冲液和储备溶液

11.1 PBS，三乙醇胺缓冲液(TBS) 和三乙醇胺-吐温(TBS Tween) 缓冲液的配制

PBS (10x)

- 8.0g 氯化钠
- 2.0g 氯化钾
- 14.4g 磷酸氢二钠
- 2.4g 磷酸二氢钾
- 加入800ml 超纯水，混匀，用纯盐酸调节pH 值至7.4，然后加入超纯水至1L。

10倍三乙醇胺缓冲液

- 24.23g 氨基丁三醇氯化氢
- 80.06g 氯化钠
- 加入800ml 超纯水，混匀，用纯盐酸调节pH 值至7.6，然后加入超纯水至1L。

三乙醇胺-吐温缓冲液（含0.1% 的吐温20）

配制1L 溶液：取100ml 10 倍三乙醇胺缓冲液加890ml 超纯水，再加入10ml 吐温20 (10%)

吐温20 很粘稠会粘在量取的枪头上，要确定加入三乙醇胺缓冲液的变性剂体积足够。建议使用10% 的溶液进行配制，这样会比用未稀释的吐温20 溶液容易配制。

11.2 蛋白质印迹

裂解液

这些缓冲液可保存于4° C 几周，分装后冻存于-20° C 可以保存一年。

乙基苯基聚乙二醇 (NP-40) 缓冲液

- 150mM 氯化钠
- 1.0% 乙基苯基聚乙二醇（也可用0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100) 代替）
- 50mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢(Tris-HCl)，pH 值8.0
- 蛋白酶抑制剂

RIPA缓冲液（放射免疫沉淀测定缓冲液）

- 150mM 氯化钠
- 1.0% 乙基苯基聚乙二醇或0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚
- 0.5% 去氧胆酸钠
- 0.1% SDS (十二烷基硫酸钠)
- 50mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢，pH 值8.0
- 蛋白酶抑制剂

RIPA 缓冲液的变性能力要强于乙基苯基聚乙二醇或聚乙二醇辛基苯基醚，因其活性成分包含了离子型去垢剂SDS 和去氧胆酸钠，在核膜降解和细胞核提取时非常有用。RIPA 缓冲液产生的背景很低，但其也可使蛋白酶变性。



10% 的去氧胆酸钠储存液 (5 克溶于50ml) 必须避光保存。

三羟甲基氨基甲烷-氯化氢缓冲液

- 20mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢，pH 值7.5
- 蛋白酶抑制剂

三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇辛基苯基醚缓冲液（用于细胞骨架蛋白）

- 10mM 三羟甲基氨基甲烷，pH 值7.4
- 100mM 氯化钠
- 1mM 乙二胺四乙酸
- 1mM 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸
- 1% 聚乙二醇辛基苯基醚
- 10% 甘油
- 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 0.5% 去氧胆酸钠
- 蛋白酶抑制剂



10% 的去氧胆酸钠储存液 (5 克溶于50ml) 必须避光保存。

非变性裂解缓冲液

- 20mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢, pH 值8.0
- 137mM 氯化钠
- 10% 甘油
- 1% 乙基苯基聚乙二醇/聚乙二醇辛基苯基醚
- 2mM 乙二胺四乙酸
- 蛋白酶抑制剂

用于可溶于变性剂的抗原, 其天然型被相应抗体识别。聚乙二醇辛基苯基醚可替代乙基苯基聚乙二醇

无去垢剂型可溶蛋白裂解液

- 5mM 乙二胺四乙酸
- 0.02% 叠氮化钠
- 磷酸盐缓冲液
- 蛋白酶抑制剂

一些可溶性蛋白不需要使用去垢剂。此缓冲液可用于机械裂解细胞, 如用注射器反复抽压或用Dounce 匀浆机匀浆。

变性裂解液/用于不容于去垢剂的抗原的裂解液

- 1% 十二烷基硫酸钠
- 5mM 乙二胺四乙酸

使用前加入:

- 10mM 的二硫苏糖醇或β-巯基乙醇
- 蛋白酶抑制剂
- 15U/ml DNA 酶I

仅识别变性蛋白的抗体不会与天然型蛋白结合。在收集和裂解细胞时, 要将重悬细胞的变性裂解缓冲液加热。此方法也可用于非离子型去垢剂无法提取的抗原。使用DNA 酶I 有助于从染色质中抽提蛋白。

电泳和印迹缓冲液**Laemmli 2 倍缓冲液/上样缓冲液**

- 4% 十二烷基硫酸钠
- 10% 2-巯基乙醇
- 20% 甘油
- 0.004% 溴酚蓝
- 0.125M 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢

测定pH 值, 调整pH 值至6.8

电泳缓冲液

- 25mM 三羟甲基氨基甲烷碱
 - 190mM 甘氨酸
 - 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 测定pH值, 如有必要的话, 调整pH 值至8.3

转移缓冲液 (湿式)

- 25mM 三羟甲基氨基甲烷碱
- 190mM 甘氨酸
- 20% 甲醇

如有必要的话, pH 值应调节至8.3

大于80 kDa 的蛋白, 建议十二烷基硫酸钠终浓度为0.1%。

转移缓冲液 (半干式)

- 48mM 三羟甲基氨基甲烷
- 39mM 甘氨酸
- 20% 甲醇
- 0.04% 十二烷基硫酸钠

封闭缓冲液

5% 牛奶或BSA (牛血清白蛋白)

加入三乙醇胺-吐温缓冲液。充分混合后过滤。如不过滤会聚集成斑点, 这种小暗点会在显色时影响印迹的效果。

11.3 免疫组化/免疫细胞组化 (IHC)

固定缓冲液

福尔马林 (10%，中性缓冲液)

- 3.7-4% 甲醛 (37-40%)
- 33mM 磷酸二氢钠
- 46mM 磷酸氢二钠 (无水)

多聚甲醛 (4%，中性缓冲液)

8% 的多聚甲醛

0.2M 磷酸盐缓冲液(PBS)，pH值7.4

- 53mM 磷酸二氢钠
- 154mM 磷酸氢二钠

8% 多聚甲醛溶液配制时应60° C 加热搅拌 (温度不要超过60° C)。溶液达到60° C 时多聚甲醛溶解，加入500ml 0.2mM 磷酸盐缓冲液，使0.1mM 磷酸盐缓冲液中含4% 多聚甲醛。小心滴加1 当量的氢氧化钠溶液直至溶液澄清 (每500ml 滴加1 至2 滴；如果仍未澄清，可继续滴加。或者，可在1 至2L 溶液中加入2 粒固体氢氧化钠)。溶液变冷后过滤。

溶液的pH 值应为7.4。不要用酸或碱来调节pH 值！如需要调节，可另配制0.2 M 溶液来调节，溶液可使用单碱或双碱的磷酸钠配制（视实际情况而定）。



多聚甲醛应新鲜配制。如4°C 过夜保存，第二天使用固定效果不如当天配制的好。可以将多聚甲醛溶液-20°C 冻存，但为了结果的一致性，组织样本要么都用新鲜配制的多聚甲醛固定，要么都用新鲜融解的多聚甲醛固定。

Bouin 溶液 (特别用于保存质地软、结构精细的组织，如脑组织)

- 75ml 苦味酸 (饱和的)
- 25ml 甲醛(37-40%)
- 5ml 冰乙酸
- 充分混合

抗原修复液

柠檬酸钠缓冲液，pH 值6.0

- 10mM 柠檬酸钠 (二水枸橼酸三钠)
- 0.05% 吐温20
- 混合溶解枸橼酸钠，用1N 盐酸调节pH 值至6.0。

加入吐温20 并充分混合。

室温可保存3 个月，置于4° C 可保存更长时间。

三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液，pH 值9.0

- 10mM 三羟甲基氨基甲烷碱
- 1mM 乙二胺四乙酸
- 0.05% 吐温20

混合溶解，调节pH 值至9.0。加入吐温20 并充分混合。

室温可保存3 个月，置于4° C 可保存更长时间。

含酶的抗原修改缓冲液：

胰蛋白酶储存液

0.5% 胰蛋白酶

蒸馏水融解后-20° C 冻存。

氯化钙储存液(1%)

1% 氯化钙

蒸馏水融解后4° C 保存。

胰蛋白酶工作液

- 0.05% 胰蛋白酶 (用0.5% 胰蛋白酶储存液配制)
- 0.1% 氯化钙 (用1% 氯化钙储存液配制)
- 8ml 蒸馏水

蒸馏水融解，用1M 氢氧化钠调节pH 值至7.8

4° C 可保存3 个月，置于-20° C 可保存更长时间

11.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)

碳酸氢盐/碳酸盐包被缓冲液(100mM) pH9.6

抗原或抗体应用包被缓冲液稀释，以使其固定在孔内：

- 29mM 碳酸钠
- 71mM 碳酸氢钠

封闭液：

常用的封闭试剂为1% 牛血清白蛋白、血清、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶，用PBS 溶解。

洗涤液：

常用PBS 或含去垢剂（如体积百分数0.05% 吐温20）的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(pH 7.4) (TBST)

抗体稀释缓冲液：

一抗和二抗应用1 倍的封闭液稀释，以减少非特异结合。

11.5 流式细胞术

荧光激活细胞分类检测 (FACS) 缓冲液/抗体稀释缓冲液

- 10% 胎牛血清
- 1% 叠氮化钠
- 溶解于PBS 中

细胞穿透液

0.1-1% 聚乙二醇辛基苯基醚/乙基苯基聚乙二醇

溶解于PBS 中，也可用吐温20，皂甙，洋地黄皂甙和Leucoperm 等温和的细胞膜溶解物。使用浓度0.5%，溶解于PBS 中

固定液

0.01%-0.1% 多聚甲醛，溶解于PBS 中

11.6 免疫沉淀(IP)

缓冲液配制方法见免疫印迹 (western blot) 部分

RIPA (放射性免疫测定) 缓冲液

缓冲液配制方法见免疫印迹部分

11.7 染色质免疫沉淀(ChIP)

FA裂解缓冲液

- 50mM 羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钾，pH 值7.5
- 140mM 氯化钠
- 1mM 乙二胺四乙酸，pH 值8.0
- 1% 的聚乙二醇辛基苯基醚
- 0.1% 的去氧胆酸钠
- 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 蛋白酶抑制剂

RIPA (放射性免疫测定) 缓冲液

- 50mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢，pH 值8.0
- 150mM 氯化钠
- 2mM 乙二胺四乙酸，pH 值8.0
- 1% 乙基苯基聚乙二醇
- 0.5% 去氧胆酸钠
- 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 蛋白酶抑制剂

洗涤缓冲液

- 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 1% 聚乙二醇辛基苯基醚
- 2mM 乙二胺四乙酸，pH 值8.0
- 150mM 的氯化钠
- 20mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢，pH 值8.0

末次洗涤缓冲液

- 0.1% 十二烷基硫酸钠
- 1% 聚乙二醇辛基苯基醚
- 2mM 乙二胺四乙酸，pH 值8.0
- 500mM 氯化钠
- 20mM 三羟甲基氨基甲烷-氯化氢，pH 值8.0

洗提缓冲液

- 1% 十二烷基硫酸钠
- 100mM 碳酸氢钠

蛋白酶K

用蒸馏水溶解，浓度为20mg/ml, -20° C 冻存。

第十二章：抗体保存指南

不同类型抗体储存时注意要避免污染或损失



请每次均查看抗体说明书是否有特殊的保存要求。Abcam 公司对于非正确保存的抗体不保证其有效。

对于保存适当的抗体，大多数的活性保持时间为数个月甚至数年。

保存温度和条件

很多抗体的最佳保存条件是分装成小包装冻存于 -20° C 或 -80° C。分装能使冻融引起的损失减到最小，同时可避免多次在一个管内取样而由枪头引入的污染。分装冻存的抗体，融解一次后剩余抗体应保存于 4° C。收到抗体后，应 10,000 × g 离心 20 秒，使管口螺纹内的抗体溶液全部离心至管底，用低蛋白吸附性的微量离心管分装。分装量的多少取决于每次试验的使用量。分装量不能少于 10µl；分装量越少，由于蒸发和吸附于管内壁而引起的损失会越大。

除了腹水液含蛋白酶应立即冻存外，大多数抗体接收后可在 4° C 保存一至两周，随后可冻存以长期保存。同样，应按照说明书推荐的条件进行保存。

免责声明和其他特殊情况

酶联抗体，不应冻存，4° C 可保证稳定。冻融会降低酶的活性，同时影响抗体的吸附能力。

偶联标记的抗体，无论是标记的荧光染料、酶还是生物素，都应保存于深色的管内并包裹上铝箔。如果暴露在光线下可能会减弱偶联标记物的活性。荧光标记物尤其容易受到光漂白作用，整个实验过程中均应避光。

免疫球蛋白 G3 同种型抗体冻融后易形成聚合物，因此应一直保存于 4° C。

用叠氮化钠防止污染

为防止微生物污染，在抗体溶液中应加入叠氮化钠，终浓度为 0.02%（质量百分比）。很多 Abcam 的抗体已经包含了 0.02-0.05% 的叠氮化纳，在说明书的“保存缓冲液”部分会有描述。

什么时候不能用叠氮化纳

如果用抗体标记活细胞，或用于体内实验，确保所用制剂中不含叠氮化钠。这种抗生素对大多数有机体都有毒性：会阻断细胞色素电子传递系统的信号。

叠氮化钠会干扰胺基的偶联标记，应在进行标记之前将其除去。标记后抗体可保存于叠氮化纳，也可用不含胺基的硫柳汞替代。

叠氮化钠可用透析或凝胶过滤法从抗体溶液中除去。免疫球蛋白 G 的分子量是 150,000 kDa（免疫球蛋白 M 的分子量是 600,000 kDa），叠氮化钠的分子量是 65 道尔顿。使用 14,000 kDa 的微量透析装置，随着叠氮化钠的扩散，抗体将保留。将带有烧杯的磁力搅拌器置于 4° C 搅拌透析装置 6 小时，每毫升抗体溶液要用至少 1 升的磷酸盐缓冲液。更换 2 次磷酸盐缓冲液，每次均搅拌至少 6 小时。如果可以的话，所有材料均要求无菌，所有溶液都应无菌配制。

冻存/复苏的损失

反复冻融可使抗体变性，使其形成聚合物而降低了抗体结合能力。

大多数抗体在 -20° C 保存就足够了，没有必要置于 -80° C 保存。千万不要使用无霜的冰箱。反复冻融能减少霜的形成，但这正是应该避免的。同理，抗体应该放置于冰箱中温度变化最小的部位，如应放置于冰箱格里，而不应放置于冰箱门上。

一些研究者为防止反复冻融的损失，在抗体中加入终浓度为 50% 的甘油作为抗冻剂。甘油可以将冰点降低至 -20° C 以下。很多抗体都可以这样做，本公司提供的抗体只有一小部分测试了这种保存条件下的稳定性，我们只保证那些按照说明书推荐条件储存的抗体有活性。由于 -80° C 低于甘油的冰点，所以加了甘油的溶液不应保存于 -80° C。注意，甘油可能会被细菌污染。如果要加入甘油或其他防冻剂，应注意无菌处理。

稀释至工作浓度的抗体最好不要在 4° C 保存超过一天时间。通常蛋白质在较高浓度保存时不易发生降解，理想浓度为 1mg/ml 或更高，因为抗体溶液中包含了如牛血清白蛋白等蛋白质稳定剂。加入的蛋白可吸附于管壁从而使抗体的损失减到最小。对用于聚合的抗体，不应加入蛋白稳定剂，因为其可能会与抗体竞争而降低抗体的聚合活性。

技术帮助 — 在线资源



在线查找产品和信息

搜索产品

搜索我们产品目录上的抗体、试剂、裂解物、试剂盒等等。

- 在我们的主页产品搜索框内输入目标名称。
- 也可以按照研究领域或产品类型来搜索。
- 过滤器可用于进一步缩小搜索范围，如已测试应用和反应等等。

This screenshot shows a detailed product page for the Anti-GFP antibody - ChIP Grade (ab290). The top navigation bar includes "产品" (Products), "试剂盒" (Reagents), "技术支持" (Technical Support), "蛋白印迹" (Western blot), and "酶联免疫法" (ELISA). The main content area displays the antibody's name, product code ab290, price (50 μl RMB4,476.00), and a "立即购买" (Buy Now) button. To the right, there's a "客户评价" (Customer reviews) section with a 5-star rating and a "ABPROMISE" guarantee stamp. The left sidebar contains sections for "具体参考文献" (Specific References), "应用" (Applications), "相关产品" (Related products), and "客户评价" (Customer reviews).

具体参考文献

使用本产品的出版物和作为背景阅读和参考的其他文件。

Abreviews®

在Abreviews®中阅读其他客户对我们产品的意见，查看他们的观点和结果。发布产品反馈意见，兑换奖品！

技术支持

查看我们的专业技术支持团队对之前客户询问的答复。

实验方案

所查看产品的专门实验方案。链接到已测试实验方法。这些实验方案由我们的技术支持团队维护，可帮助您最有效地利用我们的产品。

技术支持 — 在线实验方案和海报库

This screenshot shows the 'Protocols and troubleshooting tips' section of the Abcam website. It features a sidebar with a search bar and navigation links for '产品' (Products), '应用' (Applications), '研究领域' (Research Areas), and '更多' (More). The main content area is titled 'Protocols and troubleshooting tips' and includes a brief introduction. Below this are two main sections: 'Protocols - by application' and 'Protocols - by research area'. The 'Protocols - by application' section lists various protocols such as 'Antibody conjugation and labeling', 'Cell culture', 'Flow cytometry / FACS', 'Immunoprecipitation', 'Western blotting', etc. The 'Protocols - by research area' section includes 'Cardiovascular', 'Molecular biology', 'Neuroscience', 'Virology', and 'Protocol guides and diagrams'.

关于如何最有效地利用我们抗体和蛋白的实验方案 和疑难解答提示

有 100 多种实验方案供选择，只需点击一下即可！

获得应用和研究领域相关的实验方案，以及 FAQs 和疑难解答提示。

www.abcam.cn/protocols

This screenshot shows the 'Scientific pathway poster library' section of the Abcam website. It includes a sidebar with a search bar and navigation links. The main content area is titled 'Download one of our pathway posters for your lab, or request a hard-copy today.' It features a large image of a scientific pathway poster and a link to 'Request a hard-copy for yourself?'. Below this, there are two sections: 'Popular pathways' and 'By research area'. The 'Popular pathways' section lists 'Antigenic and kinase signaling pathways', 'Cancer metabolism', 'Cancer pathways', 'Glycosylation and metabolism', and 'Protein modification'. The 'By research area' section lists 'Cancer', 'Cell biology', 'Epigenetics and Nuclear signaling', 'Neuroscience', and 'Virology'.

海报库

为您的实验室下载一份我们的通路图、海报或通用产品指南，或索取邮件副本！

我们竭尽全力绘制出与我们产品系列完美搭配的作品。

www.abcam.cn/posters

This screenshot shows the 'Welcome to the Abcam blog' page. It features a sidebar with a search bar and navigation links. The main content area includes a post titled 'Why the small vials?' which discusses the benefits of using smaller vials for storage. It includes a small image of a vial and a link to 'View environmental solutions'. Below this, there is a section for 'Meet our meeting reporter competition winner' featuring a photo of a person and some text about the competition.

Abcam 博客

保持了解 Abcam 的最新消息！观看我们最近发布的各种科研课题的网络研讨会，从中获得实验灵感和技巧。

www.abcam.cn/blog

探索我们多种激动剂、拮抗剂、活化剂和抑制剂新产品

- 受体激动剂和拮抗剂
- 离子通道调节剂
- 酶抑制剂
- 信号传导工具



酶

抑制剂、激活剂和基板，适用于广泛的酶。范围包括传统使用的抑制剂，如p38 MAP激酶抑制剂SB203580和PDE4抑制剂咯利普兰，以及尖端的独家工具，例如，dyngo-4A™，一个新的高度有效的发动蛋白GTP酶抑制剂。

- | | | |
|------------------|----------------|-----------|
| • Akt | • MAPK | • Caspase |
| • Cyclooxygenase | • ATP/GTPase | • Kinases |
| • Oxidases | • Phosphatases | |

信号传导

一氧化氮、脂质信号、刺猬的药理调制器和工具来调节内吞作用，细胞凋亡和更多。我们的新型细胞渗透网格抑制剂Pitstop 2™ – 是Abcam生化试剂的独家产品。

- | | | |
|-------------------|------------------------------|-------------------|
| • Apoptosis | • Cell cycle | • Endo/Exocytosis |
| • Amyloidogenesis | • Ca ²⁺ signaling | • NO signaling |
| • cAMP signaling | | |

受体和转运体

激动剂、拮抗剂和适用于广泛受体的调制器，包括G蛋白偶联受体、配体门控离子通道、核受体和转运体。

- | | | |
|---------------------|---------------------|----------------|
| • Adrenoceptors | • Cannabinoid | • Dopamine |
| • GABA | • Glutamate | • Glycine |
| • Histamine | • Nuclear receptors | • Opioids |
| • Peptide receptors | • Serotonin | • Transporters |

离子通道

范围包括必不可少的工具，如河豚毒素柠檬酸， ω -芋螺毒素GVIA和 ω -Agatoxin IVA。

- | |
|-------------|
| • Calcium |
| • Potassium |
| • Sodium |
| • Chloride |

RabMAb[®] 怎样帮助您 得到预期的实验结果？

兔单克隆抗体 (RabMAbs[®])
有众多优点，为您提供最
优质的抗体。



#4	高亲和力
#5	高特异性
#6	识别多种表位
#7	应用广泛

● RabMAbs[®] 的高特异性是检测翻译后修饰,如磷酸化,必需的条件:

WB on NIH/3T3 using anti-Akt 1 Phospho (pT450) RabMAb[®] (ab108266). (A) untreated or (B) treated with Lambda Phosphatase. Akt1 (ab32510) as a pan control

Akt1 RabMAb[®] (ab32510)

查找合适 RabMAb[®] 和更多信息, 请登陆 abcam.cn/rabmabs-advantages

艾博抗（上海）贸易有限公司

地址：上海市浦东新区伽利略路338号5幢4层5401室

邮政编码：201203

联系电话：021-20700500 4009210189

市场咨询：cn.marketing@abcam.com

订购咨询：cn.orders@abcam.com

技术咨询：cn.technical@abcam.com

中文官网：www.abcam.cn



验正品 询技术 学实验
查物流 抢促销 扫一扫