

# 抗体应用技术手册

HANDBOOK OF ANTIBODY APPLICATION



## 关于我们

Bioss(博奥森)成立于2001年,是一家拥有自主品牌,集免疫学科研试剂研发、生产、销售为一体的国家高新技术企业。自成立之初,公司始终秉持“自主研发、原始创新,为全球生命科学研究提供优质服务”的经营理念。提供全面的科研抗体、试剂,诊断抗体原料,以及CRO服务。

Bioss Inc. 于2010年在美国波士顿设立了面向全球抗体市场的商务拓展及国际市场营销总部,不断扩展全球销售体系,主打Bioss国际品牌,向全球科研工作者提供高质量的科研抗体产品。迄今为止,Bioss产品已遍布全球多个国家和地区,并已成为数家国际知名抗体公司的深度合作伙伴。

近二十年的探索和拼搏,为Bioss品牌在免疫学试剂领域奠定了坚实的基础。我们在中国、美国、德国、日本分别建有现货库存,为生命科学研究提供及时优质的产品。

## 做值得信赖的抗体生产商

作为一家抗体及相关产品的专业生产和供应商,公司现拥有近两万种抗体产品,涵盖人蛋白靶点14000多个。特色产品有特异磷酸化抗体及专利授权AF荧光标记抗体等。此外,公司还提供完善的单/多克隆抗体制备、标记、重组蛋白、多肽合成及各项免疫学检测技术服务等。

Bioss公司自成立以来就非常重视抗体的验证,建立了严格的抗体生产、质检质控体系,并密切关注生物医学的最新研究进展。2016年Bioss启动了Knock Out(敲除)技术验证。不断开发和提供极具特异性及性价比较高的研究工具,以满足研究人员的需求。

## 您的成功是我们的使命

Bioss产品已出现在近万篇高质量SCI论文中,共引用Bioss产品数万次,其中IF 5以上SCI论文近2000篇。近年来,随着Bioss品牌影响力的增长,Bioss产品受到越来越多科研人员的信任和青睐,文献数量也在迅猛增加中。

## 关于本册

本手册涵盖了抗体生产、验证过程中常用的实验方案,以及实验中常见问题和疑难解析。Bioss与您分享长期积累的实战经验和技巧,希望对您的实验有所帮助。

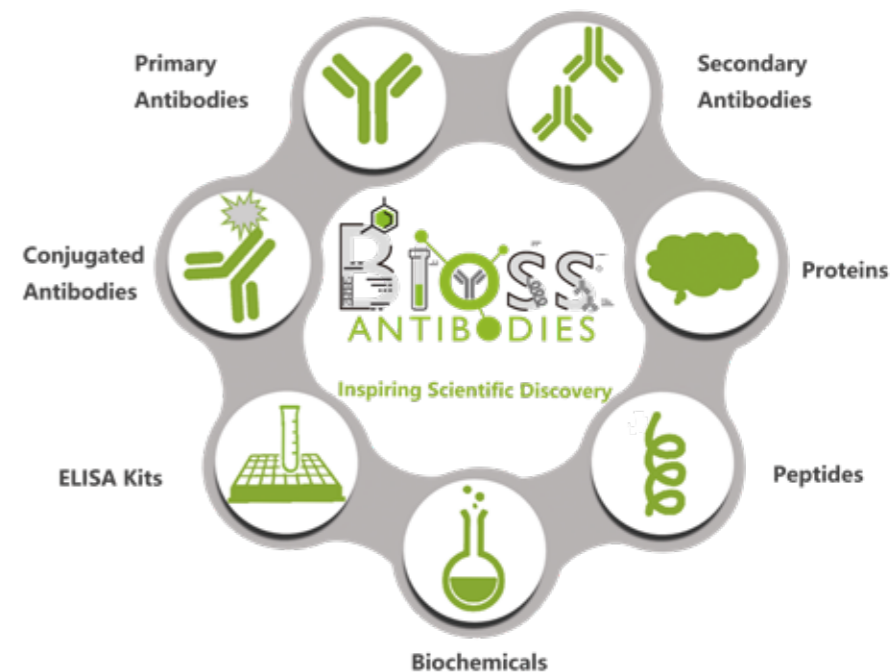


## Bioss被列为抗体市场中快速增长的抗体供应商

2019年11月15日,CiteAb公司官网发布了一项调查研究:基于对过去9年全球研究抗体市场的150多家供应商,近100万个特异性抗体的分析。Bioss保持了积极的发展轨迹,从2016年的第21位上升到现在的第19位。

—CiteAb 2019年

## Bioss产品线



## Bioss抗体引用文献荣登国际顶尖期刊



部分高分文献引用Bioss抗体列表

Name	SKU	IF	Pubmedid	Application	Name	SKU	IF	Pubmedid	Application
CD11b	bs-1014R	41.577	28117444	IF	EP3/PTGER3/AF647	bs-1876R-A647	23.394	28844837	FCM
Phospho-NFKB p65 (Ser276)	bs-3543R	40.73	24553141	IHC	PE2R1/A647	bs-6316R-A647	23.394	28844837	FCM
Phospho-TORC2 (Ser171)	bs-3415R	40.73	25383523	WB	FOXA2/PE	bs-2358R-PE	22.634	22704517	FCM
RIP1	bs-5805R	40.137	27049944	IHC	NOX2	bs-3889R	22.634	23333149	FCM
RIP3	bs-7596R	40.137	27049944	IHC	Nestin/PE	bs-0008R-PE	22.634	22704517	FCM
DR6	bs-7678R	40.137	27487218	IF	ASCL2	bs-12349R	22.387	26849305	IF
CXCL13/BCA1	bs-4509R	39.235	28319612	WB	CXCL10/IP10	bs-1502R	21.506	26595890	IHC
S100-A8 / MRP8	bs-2696R	38.49	23970558	FCM	Arc/AF647-AF488	bs-0385R-AF647-AF488	21.126	30778148	FCM
MCP-2	bs-1985R	38.49	23970558	FCM	Arc/AF647	bs-0385R-AF647	21.126	30778148	FCM
Met Enkephalin	bs-1759R	38.138	25533952	FCM	NeuN-AF488	bs-1613R-AF488	21.126	30778148	FCM
rabbit anti-mouse IgG	bs-0296R	38.138	25533952	FCM	DGAT2	bs-12998R	20.773	29604290	WB
SLC7A5	bs-10125R	37.205	27609895	WB	CD99	bs-2523R	20.565	28380379	IF
FGL2	bs-0315R	34.661	25791085	FCM	FAPA/AF647	bs-5758R-A647	20.565	28889950	IF
Galectin 9	bs-1699R	32.621	28394331	IF	CD31/AF488	bs-0468R-A488	20.565	28889950	IF
p-MARK2(Thr596)/AF647	bs-5742R-AF647	30.357	26569381	IF	KIF15	bs-7804R	20.06	27240320	IF
FLK1/AF555	bs-10412R-AF555	28.467	30742039	FCM	CXCR2	bs-1629R	20.011	26701088	IHC
CD62p	bs-0561R	25.809	31222856	WB	CXCL5	bs-2549R	20.011	26701088	IHC
Tissue factor/CD142	bs-4690R	23.394	28506465	FCM	IL-10	bs-0698R	20.011	26715643	IF

## 目录

第一章 抗体相关基本知识.....	(1)
一、抗体的基本结构.....	(1)
二、抗体的制备流程.....	(2)
第二章 抗体的选择.....	(5)
一、一抗的选择.....	(5)
二、二抗的选择.....	(6)
第三章 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 技术指南.....	(7)
一、蛋白免疫印迹 (Western Blot) 技术概览.....	(7)
二、实验所需仪器、材料及试剂.....	(7)
三、实验标准操作流程和技术要点.....	(9)
四、常见问题和解决方案.....	(12)
附表 1: Bioss 精品内参抗体	
附表 2: Bioss 常见蛋白免疫印迹 (Western Blot) 配套试剂	
第四章 免疫组织化学 (IHC) 技术指南.....	(15)
一、免疫组织化学 (IHC) 技术概览.....	(15)
二、实验需要提前准备的溶液和试剂.....	(15)
三、实验需要提前准备的对照切片.....	(16)
四、石蜡切片的制备过程.....	(16)
五、实验标准操作流程.....	(18)
六、操作技术要点.....	(20)
七、结果判读的一般标准.....	(21)
八、结果半定量分析.....	(21)
九、实验常见问题和解决方案.....	(22)
十、Bioss 常见 IHC/IF/ICC 配套试剂.....	(23)
第五章 免疫荧光 (IF) 技术指南.....	(24)
一、免疫荧光 (IF) 技术概览.....	(24)
二、实验前准备的溶液和试剂.....	(25)
三、实验标准操作流程.....	(25)
四、实验注意事项.....	(28)
五、冰冻切片制备常见问题及解决方法.....	(29)
六、免疫荧光 (IF) 实验常见问题及解决方法.....	(29)
附表 1: 常见荧光素分类及选择	
附表 2: 常见亚细胞结构标志物	
第六章 流式细胞分析 (FCM) 技术指南.....	(34)
一、流式细胞分析 (FCM) 技术概览.....	(34)
二、实验标准操作流程.....	(35)
三、注意事项.....	(39)
四、流式抗体的选择.....	(39)
五、常见问题及解决方案.....	(41)

## 第一章 抗体相关基本知识

抗体 (antibody) 是生物体在抗原物质刺激下, 由 B 细胞分化成的浆细胞所产生的、可与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白 (Ig)。按抗体的来源, 可将其分为天然抗体和人工制备的抗体, 是通过对特定生物体免疫接种特定抗原物质后而获得。人工免疫动物制备的抗体应用甚为广泛, 既可以用于科学研究, 也可以用于疾病的预防、诊断和治疗。

### 一、抗体的基本结构

经 x 线晶体衍射结构分析发现, 抗体 Ig 由四条多肽链组成, 各肽链之间由数量不等的链间二硫键连接。Ig 可形成 “Y” 字型结构, 称为 Ig 单体, 是构成抗体的基本单位。

#### 重链和轻链

天然 Ig 分子含有四条异源性多肽链, 其中, 分子量较大的两条链称为重链 (heavy chain, H), 而分子量较小的两条链称为轻链 (Light chain, L)。同一 Ig 分子中的两条 H 链和两条 L 链的氨基酸组成完全相同。

1. 重链分子量为 50 000 ~ 75 000, 由 450 ~ 550 个氨基酸残基组成。重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 其抗原性也不同。据此, 可将抗体 Ig 分为 5 类 (class), 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为  $\mu$  链、 $\delta$  链、 $\gamma$  链、 $\alpha$  链和  $\epsilon$  链, 商品化的抗体绝大部分都是 IgG。不同类的 Ig 具有不同的特征, 如链内和链间二硫键的数量和位置、结构域的数量及铰链区的长度等均不完全相同。即使是同一类的 Ig, 其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数量、位置也不同, 据此又可将同类 Ig 分为不同的亚类 (subclass)。

2. 轻链分子量约为 25 000, 由 214 个氨基酸残基构成。轻链可分为两种, 分别为 kappa( $\kappa$ ) 链和 lambda( $\lambda$ ) 链。据此, 可将 Ig 分为两型 (type), 即  $\kappa$  型和  $\lambda$  型, 一个 Ig 分子上两条轻链的型别总是相同的。生物体内可同时存在  $\kappa$  型和  $\lambda$  型的 Ig 分子, 不同种属生物体内两型轻链的比例不同。正常人血清 Ig 的  $\kappa$ : $\lambda$  约为 2:1, 而在小鼠则为 20:1。根据  $\lambda$  链恒定区个别氨基酸的差异, 又可将  $\lambda$  链分为  $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$  和  $\lambda 4$  四个亚型 (subtype)。

### IgG 的亚类



利用不同种属动物制备的 IgG 存在不同的亚类, 常见的不同种属 IgG 亚类如下:

- 兔: IgG (无亚类)
- 小鼠: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3
- 大鼠: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c
- 山羊: IgG1, IgG2

在进行某些抗体相关实验 (如 IF 和 FCM) 的时候, 我们常常需要仔细看一下所订购商品化抗体的 IgG 亚类, 以方便我们选择同型对照 (isotype control) IgG (即与目的蛋白抗体相同来源种属的相同类型正常 IgG) 作为抗体的阴性对照进行平行实验, 以排除可能的非特异性染色结果。

### 可变区和恒定区

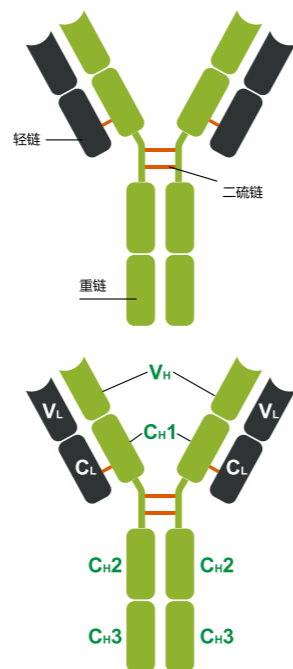
通过分析不同 Ig 重链和轻链的氨基酸序列发现，重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸序列变化很大，其他部分氨基酸序列相对恒定。因此，将 Ig 轻链和重链中靠近 N 端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区 (variable region, V 区)，占重链 1/4，占轻链 1/2；将靠近 C 端的氨基酸序列相对稳定的区域，称为恒定区 (constant region, C 区)，占重链 3/4，占轻链 1/2。

1. 可变区 重链和轻链的 V 区分别称为 VH 和 VL。VH 和 VL 中各含有 3 个氨基酸组成和排列顺序高度可变的区域，称为高变区 (hypervariable region, HVR) 或互补决定区 (complementarity determining region, CDR)，包括 HVR1(CDR1)、HVR2(CDR2) 和 HVR3(CDR3)，其中，HVR3(CDR3) 变化程度更高。VH 的 3 个高变区分别位于 29 ~ 31、49 ~ 58 和 95 ~ 102 位氨基酸，而 VL 的 3 个高变区分别位于 28 ~ 35、49 ~ 56 和 91 ~ 98 位氨基酸。VH 和 VL 的 3 个 CDR 共同组成 Ig 的抗原结合部位 (antigen binding site)，决定抗体的特异性，是抗体识别及结合抗原的部位。

2. 恒定区 重链和轻链的 C 区分别称为 CH 和 CL。不同型 (κ 或 λ) Ig 的 CL 长度基本一致，但是不同类 Ig 的 CH 长度不同，例如 IgG、IgA 和 IgD 包括 CH1、CH2 和 CH3，而 IgM 和 IgE 则包括 CH1、CH2、CH3 和 CH4。

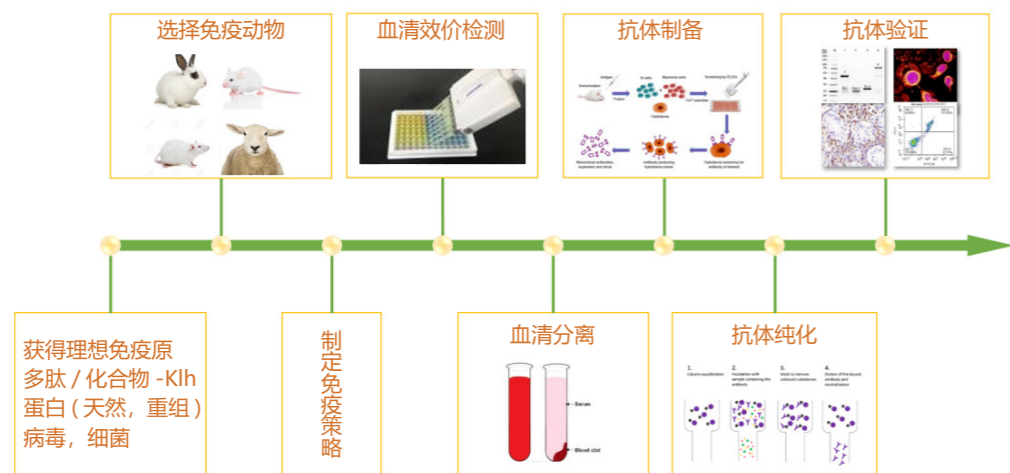
### 铰链区

铰链区 (hinge region) 位于 CH1 与 CH2 之间，富含脯氨酸，易伸展弯曲，从而改变抗原结合部位之间的距离，有利于抗体结合位于不同位置的抗原表位。铰链区易被木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等水解，产生不同的水解片段。



## 二、抗体的制备流程

利用生物体对抗原物质产生免疫应答并产生抗体的机制，选用特定抗原物质对机体持续刺激使其产生大量特异性抗体，之后收集纯化得到针对特定抗原的特异性抗体，这一过程就是抗体制备。抗体制备主要步骤包括：获得理想免疫原、免疫动物、分离血清和纯化抗体，这样得到的抗体即称为多克隆抗体；而单克隆抗体是通过经典的杂交瘤细胞技术，在小鼠免疫后，将分泌抗体的 B 淋巴浆细胞与骨髓瘤细胞融合，使得 B 淋巴浆细胞获得永生性。再通过有限稀释法将融合细胞单克隆化，利用包被相应抗原的 96 孔板对细胞上清进行筛选，上清中有相应抗体，则呈现阳性结果。将阳性孔所对应的杂交瘤细胞株挑出，即为所获得的单克隆细胞株。单克隆细胞株可通过体外细胞培养或小鼠腹水的方式扩大生产单克隆抗体。单 / 多克隆抗体在纯化后，需要经过不同应用检测验证。我们在此主要介绍获得理想免疫原、抗体的克隆性和抗体纯化的一些细节。



### 获得理想免疫原

制备抗体首先要获得理想免疫原，通常免疫原可以是多种形式，不过理想的免疫原则需要进一步的准备以获得良好的免疫效果。

1. 蛋白类抗原：对于天然易获取的蛋白可以纯化后直接作为免疫原；对于天然含量较少或难以提取的蛋白，可以通过基因工程重组表达的方式获取。同时也可以利用多肽合成的方式选择蛋白的特定序列作为抗原。较短的多肽是半抗原，通常免疫原性较弱，需要进一步偶联载体蛋白 (可选 KLH、BSA、OVA) 才能作为免疫原。

2. 小分子化合物：化合物抗原同样是半抗原，也需要进一步偶联载体蛋白才能作为免疫原。为了便于偶联载体蛋白，特定的化合物还需要进行分子改造以便能成功偶联。

3. 病原体：灭活的病毒或细菌可以直接作为免疫原。



### 免疫应答过程

1. 抗原进入机体
2. 抗原刺激 B 淋巴细胞，使之分化增殖成为抗体分泌浆细胞和记忆细胞 (初次免疫应答)
3. 抗体主要由浆细胞分泌
4. 记忆细胞再次受到特异性抗原刺激后会被激活而成为分泌抗体的浆细胞 (再次免疫应答)
5. 记忆 B 细胞是长命细胞，可以存活数月甚至机体终生

### 抗原

是一类在适合条件下能激发机体免疫系统发生免疫应答，并能与免疫应答产生的效应物质 (抗体和效应细胞) 在体内或体外发生特异性结合反应的物质。

抗原具有两种性能：

● 免疫原性 (immunogenicity)：指抗原分子具有诱导机体产生免疫应答的特性。

● 反应原性 (reactogenicity)：指抗原分子与抗体或效应 T 细胞等免疫应答产物发生特异性反应的特性。

### 抗原决定簇 (antigenic determinant)

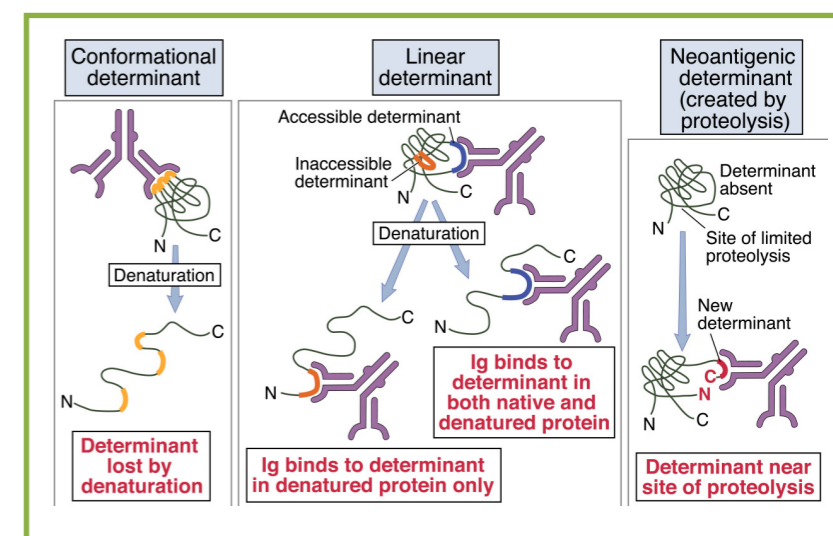
指抗原上那部分可以引起机体产生抗体的具有特殊立体构型和免疫活性的分子结构和化学基团，叫做抗原决定簇。由于抗原决定簇通常位于抗原分子表面，因而又被称为表位 (epitope)。

抗原决定簇决定着抗原的特异性，即决定着抗原与抗体发生特异结合的能力。抗原决定簇多位于蛋白质的表面，一个蛋白质大分子常有許多抗原决定簇。抗原决定簇依赖于氨基酸序列和空间构象两种因素，又分为线性决定簇 (linear determinants)、构象决定簇 (conformational determinants) 和

● 线性决定簇 (linear determinants)：又称为顺序决定簇 (sequential determinants) 或连续决定簇 (continuous determinants)，是抗原中直接由分子基团的一级结构序列构成的决定簇。

● 构象决定簇 (conformational determinants)：又称为不连续决定簇 (discontinuous determinants)，是抗原中由分子基团间特定的空间构象构成的决定簇，一般是由分子中不连续的若干肽链盘绕折叠而构成。

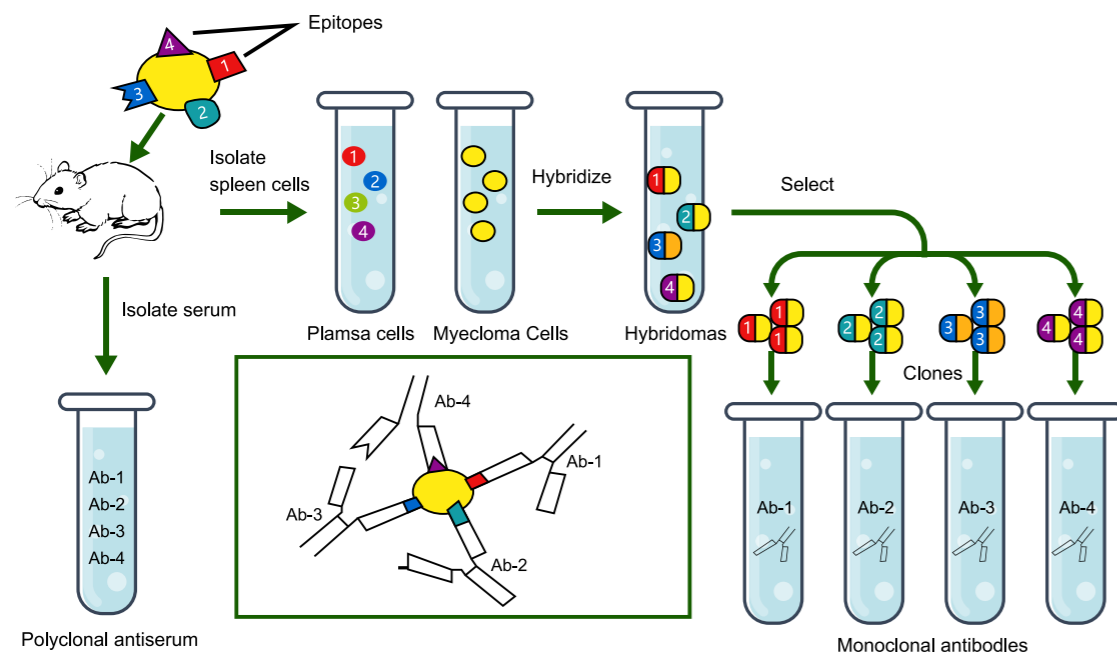
● 新生抗原决定簇 (neoantigenic determinants)：通常是由于蛋白酶的切割活化以后才会出现的抗原决定簇，尤其是与一些蛋白和酶 (如 Caspase、insulin 等) 的加工和活化形式对应。



## 抗体的克隆性 (Clonity)

一个抗原上可以有好几个不同的抗原决定簇，因而使机体产生好几种不同的抗体，最终产生出抗体是浆细胞。只针对一个抗原决定簇起作用的 B 细胞群或浆细胞群就是一个纯系，纯系的英文为 Clone，音译就是克隆。由一种 B 细胞群或浆细胞克隆产生的特异性抗体叫做单克隆抗体。单克隆抗体能目标明确地与单一的特异抗原决定簇结合，就象导弹精确地命中目标一样。另一方面，即使是同一种抗原刺激机体，也存在多种抗原决定簇，相应地就产生各种各样的单克隆抗体，这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体。

单克隆抗体和多克隆抗体产生区别示意图



## 抗体的纯化

我们知道，一般免疫血清中含有特异性抗体和非特异性抗体，血清蛋白以及其他各种杂蛋白等，在制备特异性抗体过程中当抗体的效价达到实验预期之后，需要对免疫血清进行纯化提取得到效价更高，特异性更强，稳定性更好的抗体。

目前，大多数商品化抗体使用 protein A 或 protein G 进行纯化。由于 protein A 或 protein G 可以和抗体 IgG 分子的 Fc 段特异性结合。protein A 或 protein G 作为配基可以被偶联到琼脂糖凝胶上，当抗血清从中流过时，特异性的 IgG 就与配基结合，其他杂蛋白则穿流而过。因两种蛋白纯化抗体时对不同宿主的抗体的结合能力不同，我们需要具体情况，分别选择 protein A 或 protein G，或者是 protein A/protein G 组合。一般兔抗（包括单克隆蛋白与多克隆抗体）、小鼠单抗 IgG2a、IgG2b、IgG3，选择用 protein A 纯化；而小鼠、大鼠和山羊的多克隆抗体、小鼠单抗 IgG1、大鼠单抗，则选择用 protein G 纯化。

## 第二章 抗体的选择

随着生命科学的发展，围绕蛋白进行的研究越来越多，抗体试剂在实验中的重要性越来越举足轻重。面临着纷繁复杂的抗体试剂市场，如何选择到适合自己实验的抗体就变得尤为重要。

当我们要检测目的蛋白在组织中表达情况的时候，如何选择适合我们实验需要的抗体，并恰当保存使用，是每个科研人员需要细心考虑的。抗体种类繁多，品牌众多，技术参数不一，价格和质量更是相差甚大，如何购买到高质量价格合适的抗体，并准确地做出我们想要的结果，其中有很多细节需要注意。

### 一、一抗的选择

#### 目的蛋白的信息

确定检测的目的蛋白是否与抗体识别蛋白信息吻合，注意中英文名称、别名等信息。

某些蛋白具有多种不同的亚型，这需要在选择抗体之前确定要研究的蛋白亚型。还有些抗体由于其抗原选择的是不同蛋白亚型共有的肽段区域，是可以同时识别多个亚型的。有的蛋白通过剪切加工才能转变为成熟的活性形式，如 Caspase、Insulin 等，这就需要根据研究需要，选择针对前体或成熟形式的特异性抗体。

#### 抗体制备所用抗原的信息

抗体是由各种不同抗原免疫宿主制备而来，抗原类型包括：全长蛋白、蛋白片段、多肽、全有机体（如：细菌）或细胞，抗体说明书一般都有制备抗体所用抗原的描述。在有些情况下，需要查阅抗体制备相关抗原信息来选择抗体。比如，针对重组表达蛋白选择抗体，如果是表达部分蛋白片段，则需要注意抗体的抗原区域是否在该片段区域内。如果打算用 FACS 流式检测活细胞的表面蛋白，则需选择含该表面蛋白的胞外域来免疫制备的抗体。某些特殊蛋白（如病原体蛋白）未经过内部验证种属的目的蛋白，需要求助生产商进行蛋白同源性序列比对，并结合制备抗体所用的抗原序列，查看交叉反应的情况。

某些抗体要求样本经过某些特殊处理，例如：许多抗体只识别还原和变性的、表位已暴露不受二级四级结构阻碍的蛋白样本，另一方面，某些抗体仅识别天然折叠状态的蛋白。当选择免疫组化的抗体时，应注意某些抗体只识别未固定的冷冻的组织，而另一些抗体则适用于无需抗原修复解交联步骤的甲醛固定石蜡包埋的组织，这些都会在抗体说明书上应用部分标示出来。

了解样本抗原蛋白的结构性质有助于选择最合适的抗体，待测样本蛋白的结构域和样本在提取和处理过程中是否会变性，蛋白空间构象的改变，会影响抗体的免疫亲和反应。

#### 修饰位点的信息

在选择合适的抗体用于特定修饰位点研究时，需要特别注意，不同位点的修饰可能有不同的机制存在，不宜一概而论。有关不同修饰位点的功能，可以通过查阅文献确定。另外，由于有的蛋白存在不同亚型且序列高度同源，而不同亚型的某些磷酸化修饰位点周围的序列完全相同，因此针对这些保守的修饰位点的抗体往往会同时识别不同亚型的相似修饰位点。

#### 实验样本的种属信息

抗体一般会在出厂前对常见的不同种属目标样本进行内部验证，以确定可以满足的不同种属类型，可以在产品说明书的 Species-Reactivity 一栏中看到（如人、小鼠、大鼠等）。通过验证，达到质检要求的种属会明确标记，以备参考。一些没有标明的种属，也有可能是可以应用的，建议通过联系抗体公司技术支持来获得相关抗原序列比对的信息，根据蛋白同源性的情况以确定是否可以用于该种属的样本。为了避免实验风险，尽量不要使用说明书中没有提及的标本的种属的抗体。

## 第三章 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 技术指南

### 抗体应用的实验类型

抗体一般会在出厂前对常见的抗体应用 (WB、IP、ChIP、IHC、IF、FCM) 进行内部验证, 以确定是否可以满足不同应用要求。通过验证, 达到质检要求的抗体会明确标记, 以备参考。一些没有标明的应用, 往往是因为经过验证没有达到质检标准, 因而不推荐根据经验或常识去推测某个抗体的应用。比如, 有的客户会认为, 既然某个抗体可以用于 IHC, 根据经验推断应该可以用于 IF, 但毕竟这是两个不同的应用, 这样做可能会浪费很多时间和试剂而不能获得结果。抗体厂家不推荐您使用没有标明的应用, 可以挑选其他的货号, 可能有适用于这个应用的更好的其它产品。如果抗体说明书没有提及的应用类型, 并不意味着该抗体一定不适用于此种应用类型, 而仅是说明尚未通过此种应用的内部验证。为了避免实验风险, 当计划使用说明书中没有提及的应用方法时, 可向生产商申请试用装, 进行初步预实验后, 再决定是否购买。

### 标记物的信息

有一些实验, 如多重免疫荧光、多指标流式测定可能会使用到直接标记的一抗 (简称直标一抗)。在进行直标一抗选择时, 需要了解到自己将要使用的仪器能检测到的荧光范围, 针对不同的参数要求选择合适的标记物。在设计多重实验时, 应考虑每种荧光基团的独特性质, 如最大吸收波长和最大发射波长, 消光系数和斯托克斯位移等因素。有关标记物选择的细节, 我们将在后面的免疫荧光与流式技术部分详加介绍。

### 文献引用情况

有的时候, 针对某一个蛋白可能有不同货号的产品, 很多人喜欢通过查阅文献来确定自己将要选择的抗体货号是否有过较好的表现。一般抗体公司都会收集引用自己产品的文献, 这些产品都是经过 SCI 验证过的, 所以大可放心地使用。不过, 也不排除抗体公司近期生产出更好的抗体, 可以向公司咨询。

## 二、二抗的选择

### 一抗的来源种属

主要根据一抗来源种属而决定二抗, 如一抗是小鼠来源, 那二抗就选择抗小鼠的即可。

### 二抗应用的实验类型

针对不同的实验应用, 需要考虑二抗所偶联的标记物, 如 HRP、Biotin、荧光素等。WB 与 IHC 所用的二抗, 所带的标记物主要选择 HRP 和 Biotin, 而免疫荧光和流式应用可根据实验设计的需要, 选择不同荧光素标记的二抗, 如 FITC、Cy3、PE 等。

## 一、蛋白免疫印迹 (Western Blot) 技术概览

蛋白免疫印迹 (Western Blot, 以下简称 WB) 是利用特定抗体能够专一结合其抗原“蛋白质”的原理来对样品进行着色, 通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达或修饰水平的免疫检测技术。

一般我们使用 WB 都是为了半定量检测某种目的蛋白的相对表达量, 通常要以表达相对稳定的蛋白作为内部对照 (内参), 然后采用“灰度分析软件”检测目的蛋白及内参条带的表达强度, 每组目的蛋白分别以内参作为对照进行比对和相对定量, 以使实验结果更加准确。同时, 同一批样品至少进行技术重复三次, 然后方可进行统计学分析。WB 灵敏度可达 ng 级, 用 ECL 显色法理论上可达 pg 级。

## 二、实验所需仪器、材料及试剂

### 主要实验仪器

制冰机、超声破碎仪、低温冷冻离心机、蛋白电泳 / 转膜仪、多功能酶标仪、LI-COR Odyssey 成像系统。

### 主要实验试剂与材料

- 15ml 离心管、玻璃组织研磨器、EP 管、冰浴
- 蛋白抽提试剂 (改进型 RIPA 配方, Bioss 产品货号 C05-01001)
- 蛋白酶抑制剂混合物 (protease inhibitor cocktail)
- BCA 蛋白定量试剂盒 (Bioss 产品货号 C05-02001)
- 30% 丙烯酰胺 -N, N- 亚甲基双丙烯酰胺混合液 (29:1)(Bioss 产品货号 C05-03004)
- 10% 过硫酸铵 (APS)(Bioss 产品货号 C05-03009)
- 四甲基乙二胺 (TEMED)(Bioss 产品货号 C05-03008)
- 4× 蛋白上样缓冲液 (Bioss 产品货号 C05-03015)
- 蛋白 Marker(Bioss 产品货号 C05-090006)
- 电泳缓冲液 (Bioss 产品货号 C05-03010)
- 转膜缓冲液 (Bioss 产品货号 C05-05003)
- 考马斯亮蓝染色液 (Bioss 产品货号 C05-04001)
- TBST 缓冲液 (pH7.4)(Bioss 产品货号 C5049)
- PVDF 膜 (Bioss 产品货号 C55008) 或 NC 膜 (0.22μm)(Bioss 产品货号 C05-05002)
- 丽春红染色液 (Bioss 产品货号 C05-04002)
- 脱脂奶粉 (Bioss 产品货号 C5059)
- 牛血清白蛋白 (BSA)
- 目的蛋白一抗
- WB 一抗稀释液 (Bioss 产品货号 C05-07001)
- HRP 标记二抗 (bs-0295G-HRP 或 bs-0296G-HRP) 或荧光标记二抗 (Bioss 内部操作流程选用荧光二抗, Bioss 产品货号 bs-40295G-IRDye8 或 bs-40296G-IRDye8)
- WB 二抗稀释液 (Bioss 产品货号 C05-07002)
- ECL 发光液 (Bioss 产品货号 C05-07004)
- 膜再生液 (Bioss 产品货号 C05-03041)

## Western Blot操作流程及Bioss相关配套试剂



## 三、实验标准操作流程和技术要点

### 蛋白提取

#### ● 组织样品蛋白提取方法

1. 用灭菌(预冷)的工具分离新鲜目的组织 50mg-100mg,并用预冷的生理盐水或 PBS 洗涤干净,用洁净的剪刀将组织剪碎至合适大小。
2. 将剪碎的组织转移到电动匀浆器或玻璃研磨器中,加入适量的含有蛋白酶抑制剂(必要时还需要加入磷酸酶抑制剂)的 RIPA(按照每 20mg 组织加入 150-250μl 裂解液的比例加入裂解液),置于冰上研磨 2-5min,直到看不到明显的大的细胞团块,然后在冰浴裂解 30min,让组织细胞充分裂解;可取少量裂解后组织液滴于载玻片,盖上盖玻片进行光镜下观察确认是否裂解充分。
3. 注: RIPA 裂解液有(中)和(强)裂解强度两种,可以根据组织类型进行调整,以提高裂解效率。
4. 超声处理 10-15s,以完成细胞裂解并剪切 DNA,以降低样品粘度和提升蛋白溶解度。  
注意:为确保组织细胞充分裂解,建议进行超声破碎。调节超声仪至适宜频率与功率(超声功率不宜过大,并设置超声间歇,以防止超声探头过度产热),将超声探头置于样本裂解液中部,但不触碰管壁或管底,进行冰浴超声。  
超声循环设置如下:  
超声 3s,暂停 10s,重复 3-5 次。
5. 超声处理后将样品继续置于冰上孵育 30min。
6. 将上述裂解后样品,于 4°C, 12 000rpm,离心 15-20min,取上清到一个新的 EP 管,置于冰上备用。

#### ● 细胞样品蛋白提取方法

1. 对于贴壁细胞:从培养物中吸出培养基,用预冷的 1× PBS 洗涤细胞后,加入含有蛋白酶抑制剂(必要时还要加入磷酸酶抑制剂)的 RIPA 裂解液(6 孔板每孔 100 μl 或 10 cm 直径的平板 500 μl)来裂解细胞,然后立即从板上刮下细胞并将提取物转移至 EP 管,置于冰上。
2. 对于悬浮细胞:将悬浮细胞连同培养基转移到 15ml 离心管,室温 1000rpm 离心 5min,收集细胞沉淀,然后加入含有蛋白酶抑制剂(必要时还要加入磷酸酶抑制剂)的 RIPA 裂解液(6 孔板每孔 100 μl 或 10 cm 直径的平板 500 μl),用加样器吸打几次后转入一个新的 EP 管,置于冰上来裂解细胞。
3. 超声处理 10-15s,以完成细胞裂解并剪切 DNA,以降低样品粘度和提升蛋白溶解度。  
注意:为确保组织细胞充分裂解,建议进行超声破碎。调节超声仪至适宜频率与功率(超声功率不宜过大,并设置超声间歇,以防止超声探头过度产热),将超声探头置于样本裂解液中部,但不触碰管壁或管底,进行冰浴超声。  
超声循环设置如下:  
超声 3s,暂停 10s,重复 3-5 次。
4. 超声处理后将样品继续置于冰上孵育 30min。
5. 将上述裂解后样品,于 4°C, 12 000rpm,离心 15-20min,取上清到一个新的 EP 管,置于冰上备用。

### 蛋白定量

1. 配制工作液:根据标准品和样品数量,按体积比 A : B (50 : 1) 配制适量 BCA 工作液,充分混匀。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。
2. 稀释标准品:取 10 微升标准品用 PBS 稀释至 100ul(标准品一般可用 PBS 稀释),使浓度为 0.5mg/ml。将标准品按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20ul 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中,加 PBS 补足到 20ul。
3. 将稀释后(一般稀释 5 倍)的适当体积样品加入 96 孔板的样品孔中,补加 PBS 到 20ul。
4. 各孔加入 200ul BCA 工作液,37°C 放置 30 分钟。
5. 将 96 孔板冷却到室温,用酶标仪 562nm 测定 OD 值,根据标准曲线计算出蛋白浓度,理想的蛋白浓度应为 1-5 μg/μl。  
注意:对于过高的样品浓度,我们建议将样品用 RIPA 裂解液进行合理稀释并充分混匀后,再进行一次浓度测定为宜。

### 电泳上样样品的制备

1. 在上样前, 建议用提取样品用的 RIPA 裂解液将制备的组织、细胞蛋白样品的浓度统一调整为相同浓度并充分混匀, 最好都在 3-5 $\mu$ g/ $\mu$ l。
2. 上样量为 20-40 $\mu$ g(如果是纯蛋白, 上样量为 100ng), 根据上样量计算好体积, 每管样品分别与 4 $\times$  蛋白上样缓冲液按体积比 3:1 混匀。
3. 煮沸 5-10min, 使样品还原变性, 然后立即放于冰上备用。
4. 对于剩余的样品, 可以统一加入 4 $\times$  蛋白上样缓冲液后, 将样品在 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 保存。

### 电泳

#### 1. SDS-PAGE 凝胶的制备

根据要检测的目的蛋白分子量范围, 参考下表选择合适的分离胶浓度灌制分离胶, 加入保护层(可小心加入 0.5ml 去离子水封胶面)。待分离胶凝固后, 倒出保护层的水, 再灌注浓缩胶。根据样品数量和体积, 选择合适的梳子插入浓缩胶。待浓缩胶完全凝固后, 小心拔出梳子, 将凝胶放入电泳槽内。

分离胶浓度	最佳分离范围 -1	最佳分离范围 -2
6%	$\geq 200$ kD	$\geq 100$ kD
8%	50-200kD	70-100kD
10%	30-75kD	35-70kD
12%	25-60kD	35-70kD
15%	0-30kD	0-35kD

#### 2. 蛋白上样与电泳

将上述变性处理后的样品低速短暂离心后, 按照实验设计的上样顺序, 分别加入样品孔中。最后, 加入合适的预染蛋白 Marker。浓缩胶恒压 80V, 分离胶 150V 电压条件下电泳, 直至指示剂溴酚兰迁移至凝胶底部。

电泳合格标准: 目的蛋白条带位于分离胶的中部, 并且条带充分分离。

### 考马斯亮蓝染色 (预实验步骤)

在进行正式实验前, 对于刚刚制备的蛋白样品, 可取少量上样电泳后, 把整张胶用考马斯亮蓝染色进行初步鉴定, 以确定样品的质量。然后, 再进入正式实验。

### 蛋白转膜 (湿转法)

原理: 蛋白因结合 SDS 而带负电荷, 在电场中从胶转移至膜上。

1. 将 PVDF 膜在无水甲醇中浸泡 1-3min, 再孵育于冰冷的电转缓冲液中 5min。胶也可以在转膜液中平衡 3-5min, 防止转膜时条带变形, NC 膜不需要甲醇浸泡, 需提前转膜液浸泡即可。

#### 2. 制作转膜“三明治”

湿式转膜三明治排列顺序: 负极 / 海绵 / 吸水纸 / 胶 / 膜 / 吸水纸 / 海绵 / 正极, 全部紧密排列, 特别是胶与膜之间不能留有气泡。

三明治安装的方向: 负极与胶同侧, 向正极方(膜)迁移。

膜的面积: 5.2 \* 8.4 cm。

滤纸的面积: 4 条边均略长于膜的 4 条边。

3. 200-300mA 恒流转膜, 转膜时间可参考下表。

分离胶浓度	6%	8%	10%	12%	15%	15-20%
理论分子量 (kD)	> 100	70-100	35-70	35-70	15-35	< 15
转膜时间	1.5h	1h	1h	1h	45min	20min
建议膜的孔径	0.45 $\mu$ m			0.2 $\mu$ m		
恒流	200-300mA					

### 转膜后蛋白染色 (备选步骤)

将膜置于丽春红工作液中, 在室温下摇动 1-5min, 待蛋白带显示, 后用 TBST 或超纯水洗膜, 直至洗净膜上丽春红。

### 膜的封闭

封闭的作用: 为避免作为检测试剂的特异性一抗与膜发生非特异性结合而造成背景提高, 需要对膜上的潜在非特异性结合位点进行封闭处理。

封闭条件: 用 TBST 溶解的 5% 的脱脂奶粉或 5% 的 BSA(建议提前配制, 使奶粉或 BSA 充分溶解), 室温封闭 1h。

另外, 需注意膜封闭的一些特殊情况:

- 脱脂奶粉成本低, 但不能用于磷酸化蛋白检测。因为脱脂奶粉含有酪蛋白, 该蛋白本身就是一种磷酸化蛋白, 使用脱脂奶粉时, 磷酸化抗体可能也会与奶粉中的磷酸化蛋白结合, 从而产生高背景。
- 如果是生物素标记的二抗就不宜用牛奶, 因为牛奶中含有生物素, 用 BSA 效果更好。
- 某些抗体用 BSA 封闭时因不明原因也可能产生比脱脂奶粉更强的信号, 建议参照抗体说明书进行实验。

### 一抗的孵育

1. 用 WB 专用一抗稀释液(对整张膜建议使用 5-10ml), 按一定比例(一般为 1:1000-1:2000)稀释一抗。
  2. 倒掉封闭液, 将膜置于适量一抗孵育液中, 4 $^{\circ}$ C, 水平摇床孵育过夜。
- 用 TBST 洗膜, 3 次, 每次 5min。

### 二抗的孵育和洗膜

1. 用 WB 二抗稀释液按一定比例(HRP 标记二抗稀释 1:5000-1:10 000; 荧光二抗 1:10000-1:20000)稀释二抗。
2. 将膜置于二抗孵育液中, 水平摇床室温孵育 1h。
3. 用 TBST 洗膜, 3 次, 每次 5min。



### 目的蛋白质显影

#### ● 化学发光法 (使用 HRP 偶联的二抗)

1. 制备 ECL 工作液: A 液和 B 液等体积的混合, 例如 0.5ml A 液和 0.5ml B 液混合, 混匀后即可使用。
2. 用量以充分覆盖印迹膜为准, 每 10cm<sup>2</sup> 膜需要大约 1 ml 工作液。
3. 将印迹膜有蛋白的一面朝上平整的铺在一张平板上, 加上配好的发光底物工作液。
4. 将工作液均匀滴加在印迹膜上, 孵育 1-5 min。可将一洁净的保鲜膜或透明的玻璃纸平整的铺在孵育有工作液的印迹膜上, 轻轻赶出其间的气泡。
5. 用合适的照相器材直接记录蛋白膜的化学发光图或使用 X 射线胶片曝光 (曝光 5 秒至 1 分钟, 通过调整 X 片的曝光时间获得最佳结果)。

#### ● 荧光底物法 (使用荧光二抗)

1. 将膜上多余的 TBST 沥干, 可使其干燥。
2. 使用合适的荧光扫描仪 (如 LI-COR Odyssey 荧光成像系统), 根据制造商的建议扫描膜上条带。

## 四、常见问题和解决方案

实验结果	可能原因及解析	问题解析
无目的条带	转膜失败	丽春红染色
	蛋白处理不当	做考染或参考内参抗体结果
	发光液或显色剂过期或失效	换发光试剂或其他抗体检测结果对比
	存在抑制 HRP 显色的试剂	HRP 显色中, 避免叠氮钠存在
	抗体出现问题: 特异性不高	咨询抗体技术支持
背景颜色深	封闭时间短	延长封闭液对膜封闭时间
	一抗浓度高, 发生非特异性结合	适当提高一抗稀释比例
	二抗浓度高, 发生非特异性结合	适当提高二抗稀释比例
	洗膜不充分	对封闭盒清洗干净, 清洗时间及次数
	底物显色过强	减少二抗稀释度
	曝光时间过长	缩短曝光时间
	膜被污染	全程带手套, 接触膜器皿应清洗干净
背景中有斑点	封闭液选择不当	可用 BSA 代替脱脂奶粉来观察效果
	脱脂奶粉未充分溶解或有杂质	孵育盒应清洗干净, 奶粉应充分溶解
背景中条带未成条形	蛋白降解	样品处理不当, 注意蛋白降解
	抗体特异性不好	咨询抗体公司
杂带较多	上样量太大	减少上样量
	抗体浓度太高	减少一抗、二抗浓度
	抗体孵育时间过长	缩短抗体孵育时间
	曝光时间长	缩短曝光时间
	多克隆抗体出现杂带	多抗中杂带不影响主带且条带浅才可接受, 必要时可更换为单抗
带型不规则	条带出现笑脸状	电压或电流过大, 应适当减小
	条带拖尾, 泳道模糊	样品制备中有杂质, 需离心后上样
	纵向条纹	样品中含有不溶性物质, 需离心后上样
	条带偏斜	加样位置偏斜, 凝胶不均匀
	条带向两边扩散	样品中无机盐浓度高

附表 1: Bioss 精品内参抗体

适用范围	名称	货号	分子量	抗体类型	交叉反应	应用
胞质内参抗体 (胞浆或全细胞) Cytoplasmic Loading Control	beta I Tubulin	bsm-33041M	50kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC
	beta Tubulin	bsm-33034M	50kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC
		bs-4511R	50kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
	beta Actin	bsm-33036M	42kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
		bs-0061R	42kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt,Rb,Dg,Pg,Co,Sh,Chk	WB,IHC-P,IHC-F,FC,IF,ICC
	GAPDH	bs-10900R	36kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,ICC,IF
		bs-2188R	36kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt,Sh	WB
		bsm-0978M	36kDa	鼠单抗	Ms,Rt,Sh,Rb	WB,IHC-P,IHC-F,FC,IF
		bsm-33033M	36kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB
	alpha Tubulin	bs-20496R	50kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,ICC,IF
		bs-0159R	50kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,FC
	Vinculin	bsm-54148R	117kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,ICC,IF
	Cyclophilin B	bsm-33228M	20kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB
bsm-52473R		20kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB	
核蛋白内参抗体 Nuclear Loading Control	Histone H3	bs-0349R	15-17kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt,Pg	WB,IHC-P,IHC-F,FC,ICC,IF
		bsm-33042M	15-17kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
	Lamin B	bs-23709R	66-72kDa	兔多抗	Hu, Ms, Rt, Chk, Dg, Pg, Co, Hor, Shp	WB
		bsm-33040M	66-72kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB
	PCNA	bs-0754R	36kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt,Pg,Chk	WB,IHC-P,IHC-F,FC,IF
		bsm-52347R	36kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC
		bsm-33035M	36kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
	TATA binding protein TBP/TBP	bsm-33227M	38kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
	YY1	bsm-52349R	46kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC,IP
	HDAC1	bs-1414R	65kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,FC
bsm-52080R		65kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC	
膜蛋白内参 Membrane protein Loading Control	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> beta 2 (ATPB2)	bs-1152R	33kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F
		bs-23414R	33kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB
质膜内参 Plasma Membrane Loading Control	ATP1A1 (Sodium Potassium ATPase)	bs-4255R	97-110kDa	兔多抗	Hu, Ms, Rt, Chk, Pg, Rab, GP	WB
		bsm-52485R	97-110kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF,ICC
线粒体内参 Mitochondrial Loading Control	COX4	bsm-33037M	17kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F,IF
	VDAC1	bs-1461R	32kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F
		bsm-52251R	32kDa	兔单抗	Hu,Ms,Rt	WB,IHC-P,IHC-F
全血/血浆/血清内参 Serum Loading Control	Transferrin	bsm-33243M	77kDa	鼠单抗	Hu,Rt	WB,IHC-P,IHC-F
		bs-2052R	77kDa	兔多抗	Hu	WB
	Albumin	bsm-0945M	66kDa	鼠单抗	Hu,Ms,Rt,Pg	WB,IHC
		bs-0945R	66kDa	兔多抗	Hu,Ms,Rt, Dg, Gt	WB
细胞增殖标志物 cell proliferation Loading Control	BrdU	bsm-0917M	化合物	鼠单抗	-	IHC-P,IF
		bs-0489R	化合物	兔多抗	-	IHC-P,IF
植物内参 Plant Loading Control	Plant actin	bsm-33128M	42kDa	鼠单抗	Plant	WB

附表 2: Bioss 常见蛋白免疫印迹 (Western Blot) 配套试剂

编号	产品名称	规格
WB001	WB 检测试剂盒 (适用于兔一抗)	36 次
WB002	WB 检测试剂盒 (适用于小鼠一抗)	36 次
C05-01001	RIPA 组织及细胞蛋白裂解液	30ml/50ml/100ml
C05-01002	PMSF(100mM)	1ml/10ml/100ml
PIC003	蛋白酶抑制剂混合物 (100×)*	2ml
C51003	磷酸酶抑制剂混合物 (100×)	2ml
C05-02001	BCA 蛋白定量试剂盒	30ml/50ml/100ml
C05-03001	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5×(还原)	5ml/10ml
C05-03002	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5×(非还原)	5ml
C05-03003	预染广谱蛋白 Marker(11-245kD)*	250ul/50 次
C05-03004	30% 丙烯酰胺 /N,N- 亚甲基双丙烯酰胺溶液 (29:1)	100ml/500ml
C5005	SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液 (4×)	100ml/500ml
C05-03026	4-20% 预制胶 (Hepes), 10 孔 *	10 片装
C05-03005	1.5M Tris-HCl, pH 8.8	100ml
C53042	1M Tris-HCl PH 8.0	100ml
C05-03006	1M Tris-HCl, pH 6.8	100ml
C05-03007	10% SDS 溶液	100ml
C05-03008	TEMED	1ml
C05-03009	10% 过硫酸铵 (AP)	1ml
C05-03010	Western Blot 电泳缓冲液 1×	粉剂 (1000ml)
C05-03011	Western Blot 电泳缓冲液 10×	粉剂 (1000ml)
C05-05003	Western Blot 转膜缓冲液 1×	粉剂 (1000ml)
C05-05004	Western Blot 转膜缓冲液 10×	粉剂 (1000ml)
C05-04001	考马斯亮蓝快速染色液	250ml
C05-04002	丽春红染色液 10×	10ml
C05-05001	NC 膜 (0.45μm, 13×20cm)	1 张, 5 张
C05-05002	NC 膜 (0.22μm, 13×20cm)	1 张, 5 张
C55005	PVDF 膜 (0.45μm, 6.6×8.5cm)	20 张, 100 张
C55008	PVDF 膜 (0.22μm, 6.6×8.5cm)	20 张, 100 张
C05-06001	Western Blot 封闭液 - 脱脂奶粉	60ml
C05-06002	Western Blot 封闭液 - BSA	60ml
C05-07001	Western Blot 一抗稀释液	60ml
C05-07002	Western Blot 二抗稀释液	60ml
C05-07003	WB 洗涤液 10X	60ml
C05-07004	超敏 ECL 化学发光试剂盒 *	25ml

\* 更多产品选择, 请访问 Bioss 官方网站 <http://www.bioss.com.cn/>

## 第四章 免疫组织化学 (IHC) 技术指南

### 一、免疫组织化学 (IHC) 技术概览

免疫组织化学 (immunohistochemistry, 以下简称 IHC) 是利用组织切片, 通过特异性抗体对抗原进行结合, 再通过偶联在抗体上的标记物 (通常是辣根过氧化物酶, 即 HRP) 介导化学反应催化显色剂显色, 对组织细胞内抗原进行定位、定性及相对定量的研究技术。IHC 技术流程主要包括取材与切片制备、切片处理与抗原修复、抗体孵育与显色、结果采集与判读几个大的部分, 操作步骤较多。因此, 影响 IHC 结果的因素也较多。

IHC 技术不但在科学研究中广泛使用, 也是临床病理诊断的重要技术, 其临床应用主要包括以下几方面:

- 恶性肿瘤的诊断与鉴别诊断;
- 确定转移性恶性肿瘤的原发部位;
- 对某类肿瘤进行进一步的病理分型;
- 软组织肿瘤的治疗一般需根据正确的组织学分类, 因其种类多、组织形态相像, 有时难以区分其组织来源, 应用多种标志进行 IHC 研究对软组织肿瘤的诊断是不可缺少的;
- 发现微小转移灶, 有助于临床治疗方案的确立, 包括手术范围的确立;
- 为临床提供治疗方案的选择。

### 二、免疫组织化学 (IHC) 实验需要提前准备的溶液和试剂

#### 所用仪器与耗材:

通风橱、解剖刀、离心管、玻璃缸、组织包埋机、组织包埋盒、蜡托、镊子、载玻片、石蜡切片机、展片机、恒温箱、金属玻片架、玻片清洗盒、水平摇床、烧杯、吸水纸、湿盒、4℃冰箱、移液枪、震荡混匀器、免疫组化笔、显微镜、滴管、盖玻片。

#### 所用试剂:

组织 / 细胞固定液 (Bioss 产品货号 C01-06002)、多聚赖氨酸溶液 (防脱片粘片剂) (Bioss 产品货号 C02-01001)、去离子水

- 二甲苯
- 不同浓度 (100%、95%、90%、80%、70%) 乙醇 (组织级)
- 洗涤缓冲液: 1× 磷酸盐缓冲液 (PBS) (Bioss 产品货号 C01-01001)、0.01MPBST(pH7.2-7.4) (Bioss 产品货号 C01-01004)
- 一抗稀释液 (Bioss 产品货号 C01-04001)
- 抗原修复液需根据目的蛋白进行预实验后选择: 1× 柠檬酸钠修复液 (Bioss 产品货号 C02-02001) 或 1× EDTA 修复液 (Bioss 产品货号 C02-02003)
- 3% 过氧化氢 (在显色系统中包含)
- 10% 封闭山羊血清 (Bioss 产品货号 C01-03001)、抗体稀释液 (普通型) (Bioss 产品货号 C01-04001)
- 显色系统需根据目的蛋白抗体来源种属选择: Polink-2plus® PolymerHRPDetection System (Rabbit) (Bioss 产品货号 PV-0023) 或 Polink-2plus® PolymerHRPDetection System (Mouse) (Bioss 产品货号 PV-0024); 广谱 SP 免疫组化检测试剂盒 (Bioss 产品货号 SP-0022)、SP 免疫组化检测试剂盒 (兔) (Bioss 产品货号 SP-0023) 或 SP 免疫组化检测试剂盒 (小鼠) (Bioss 产品货号 SP-0024)
- 显色底物: DABKit (Bioss 产品货号 C-0010)
- 苏木素染色液 (Bioss 产品货号 S0145)
- 中性树胶封片剂 (Bioss 产品货号 C02-05001)

### 三、免疫组织化学 (IHC) 实验需要提前准备的对照切片

IHC 染色中的对照片的设置非常重要，它是判断您的染色是否成功的关键依据，而且也是检测每一个抗体的质量标准，常设的对照如下：自身对照、阴性对照（空白对照、替代对照、抑制对照、吸收实验对照）、阳性对照。

**A、自身对照：**用同一组织切片上与待检抗原无关的其它结构做对照。如肿瘤组织切片中，Vimentin 应主要出现在间质细胞，不应该出现在其他类型细胞。如果应为阳性的组织是阳性，则技术操作正确，如为阴性，则表明技术或试剂质量有问题。但在进行科研工作中，单纯用这种对照是不科学的，必须增加空白对照、替代对照等，才能使染色结果得到承认。

**B、空白对照：**是最常用的对照，用不加一抗的缓冲液，如 PBS 替代一抗，染色结果应为阴性，说明染色方法可靠，可排除组织的内源性过氧化物酶、碱性磷酸酶、自发荧光等物质引起的非特异性显色。

**C、替代对照：**用与一抗来源同种动物正常血清来替代一抗，以相同的稀释倍数进行对照染色。这可证明待检切片中阳性结果不是抗体以外混杂的血清成分所致，而是所用特异性抗体与组织细胞内待检抗原的特异性反应的结果。

**D、吸收试验对照：**用过量的与一抗对应的已知纯化抗原与一抗反应，抗体结合位点全部被已知抗原结合，这种被抗原吸收的抗体不能与组织内的抗原反应，故再做 IHC 染色时，结果应为阴性。

**E、阳性对照：**用已证实含用待测抗原的组织，与待检标本做同样处理后，进行免疫组化染色，结果应为阳性，称为阳性对照。每次实验都应做阳性对照，通过阳性对照可证明靶抗原有一定活性，染色过程中各个步骤以及所用的试剂都合乎标准，染色方法可靠。特别是当待检的标本为阴性结果时，阳性对照呈阳性反应，可排除待检标本假阳性的可能。所以若预期染色结果是阴性时，就必须设阳性对照。

### 四、石蜡切片的制备过程

光镜下观察切片标本多数是石蜡切片法制备的。活的细胞或组织多为无色透明，各种组织间和细胞内、各种结构之间均缺乏反差，在一般光镜下不易清楚区别出；组织离开机体后很快就会死亡和产生组织腐败，失去原有正常结构。因此，组织要经固定、石蜡包埋、切片及染色等步骤以免细胞组织死亡，而能清晰辨认其形态结构。

石蜡切片法包括取材、固定、洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与贴片、脱蜡、染色、脱水、透明、封片、结果采集与判读等步骤。一般的组织从取材固定到封片制成玻片标本需要数日，但标本可以长期保存使用，为永久性显微玻片标本。

#### 取材

应根据要求选取材料来源及部位。材料必须新鲜，搁置时间过久则产生蛋白质分解变性，导致细胞自溶及细菌的滋生，而不能反映组织活体时的形态结构。

#### 固定

用适当的化学药液——固定液浸渍切成小块的新鲜材料，迅速凝固或沉淀细胞和组织中的物质成分、终止细胞的一切代谢过程、防止细胞自溶或组织变化，尽可能保持其活体时的结构。固定能使组织硬化，有利于切片的进行，而且也有媒浸作用，有利于组织着色。

固定液的种类很多，其对组织的硬化收缩程度以及组织内蛋白质、脂肪、糖类物质的作用各不相同。例如纯酒精可固定肝糖而能溶解脂肪，甲醛能固定一般组织，但溶解肝糖和色素。固定液可分为单一固定液及混合固定液。前者有甲醛（乙醛、福尔马林）、酒精、醋酸或冰醋酸、升汞、锇酸（四氧化钨）、重铬酸钾及苦味酸等，单一固定液不能固定细胞中的所有成分；混合固定液可以互补不足，常用的混合固定液有 Bouin 氏液、Zenker 氏液、FAA 液、Carnoy 氏液、SuSa 液等（配方见有关技术书籍）。因此，应根据所要显示的内容来选择适宜的固定液。

10% 福尔马林（4% 甲醛）或 4% 多聚甲醛是病理切片常规使用的固定液，不仅适用于常规 HE 染色，还可以用于组织学有关的其他技术的切片染色。固定液的用量通常为材料块的 20 倍左右，固定时间则根据材料块的大小及松密程度以及固定液的穿透速度而定，可以从 1 小时至数天，通常为 24 小时。

#### 洗涤与脱水

固定后的组织材料需除去留在组织内的固定液及其结晶沉淀，否则会影响后期的染色效果，该步骤称作洗涤，多数用流水冲洗；使用含有苦味酸的固定液固定的则需用酒精多次浸洗；使用酒精或酒精混合液固定的组织，则不必洗涤，可直接进行脱水。

固定后或洗涤后的组织内充满水分，若不除去水分则无法进行以后的透明、浸蜡与包埋处理，原因在于透明剂多数是苯类，苯类和石蜡均不能与水相溶合，水分不能脱尽，苯类无法浸入。酒精为常用脱水剂，它既能与水相混合，又能与透明剂相混。

为了减少组织材料的急剧收缩，应使用从低浓度到高浓度递增的顺序进行，通常从 30% 或 50% 酒精开始，经 70%、85%、95% 直至纯酒精（无水乙醇），每次时间为 1 ~ 数小时，如不能及时进行各级脱水，材料可以放在 70% 酒精中保存，因高浓度酒精易使组织收缩硬化，不宜处理过久。

#### 透明

纯酒精不能与石蜡相溶，还需用能与酒精和石蜡相溶的媒浸液，替换出组织内的酒精。材料块在这类媒浸液中浸渍，出现透明状态，此液即称透明剂，透明剂浸渍过程称透明。常用的透明剂有二甲苯、苯、氯仿、正丁醇等，各种透明剂均是石蜡的溶剂。

通常组织先经纯酒精和透明剂各半的混合液浸渍 1 ~ 2 小时，再转入纯透明剂中浸渍。透明剂的浸渍时间则要根据组织材料块大小及属于囊腔抑或实质器官而定。如果透明时间过短，则透明不彻底，石蜡难于浸入组织；透明时间过长，则组织硬化变脆，就不易切出完整切片，最长为数小时。

#### 浸蜡与包埋

用石蜡取代透明剂，使石蜡浸入组织而起支持作用。通常先把组织材料块放在熔化的石蜡和二甲苯的等量混合液浸渍 1 ~ 2 小时，再先后移入 2 个熔化的石蜡液中浸渍 3 小时左右，浸蜡应在高于石蜡熔点（通常石蜡采用熔点为 56 ~ 58°C 或 60 ~ 62°C 两种，可根据季节及操作环境温度来选用）3°C 左右的温箱中进行，以利石蜡浸入组织内。

浸蜡后的组织材料块放在装有蜡液的容器中（摆好在蜡中的位置），待蜡液表层凝固即迅速放入冷水中冷却，即做成含有组织块的蜡块。容器可用光亮且厚的纸折叠成纸盒或金属包埋框盒。如果包埋的组织块数量多，应进行编号，以免差错。石蜡熔化后应在蜡箱内过滤后使用，以免因含杂质而影响切片质量，且可能损伤切片刀。

#### 切片

包埋好的蜡块用刀片修成规整的四棱台，以少许热蜡液将其底部迅速贴附于小木块上，夹在轮转式切片机的蜡块钳内，使蜡块切面与切片刀刃平行，旋紧。切片刀的锐利与否、蜡块硬度是否适当都直接影响切片质量，可用热水或冷水等方法适当改变蜡块硬度。

通常切片厚度为 4 ~ 7 微米，切出一片接一片的蜡带，用毛笔轻托轻放在纸上。

#### 贴片与烤片

展平的蜡片需要用粘附剂牢附于载玻片上，以免在以后的脱蜡、水化及染色等步骤中二者滑脱开，粘附剂是多聚赖氨酸。首先在洁净的载玻片上涂抹薄层多聚赖氨酸，再将一定长度蜡带（连续切片）或用刀片断开成单个蜡片于温水（45°C 左右）中展平后，捞至玻片上铺正，或直接滴两滴蒸馏水于载玻片上，再把蜡片放于水滴上，略加温使蜡片铺展，最后用滤纸吸除多余水分，将载玻片放入 45°C 温箱中干燥。

## 五、免疫组织化学 (IHC) 实验标准操作流程

### 脱蜡水化

1. 脱蜡: 组织切片在三个不同容器的二甲苯中连续脱蜡三次, 每次 15min;
2. 水化: 组织切片依次置于不同浓度 (100%、95%、90%、80%、70%) 乙醇, 各 5min, 最后在去离子水中静置 5min。

### 抗原修复

- 方法 1: 沸水浴修复, 将盛有修复液和玻片的烧杯置于沸水浴环境, 保持外部沸腾状态 15min, 自然冷却至室温。
- 方法 2: 微波修复, 将盛有修复液和玻片的烧杯置于微波炉中, 高火 5min, 停火 3min, 中火 5min, 自然冷却至室温。
- 方法 3: 高压修复, 将盛有修复液和玻片的烧杯置于高压锅, 上汽后修复 2-5min, 然后将高压锅置入凉水中, 减压至正常后取出玻片。

#### 注意事项:

1. 每一种蛋白的抗原修复液都需要通过预实验来确定, 大家可以咨询 Bioss 技术部门获得每一种抗体内部验证所使用的抗原修复条件。
2. 脱蜡水化的切片, 应避免因切片干燥, 而至非特异性染色。
3. 热修复操作时务必谨慎, 当心烫伤。
4. 热修复时间过长易导致脱片, 请注意控制时间。

### 抗体孵育

- PBS 洗涤 5min, 重复 3 次;
- 用吸水纸吸去玻片上多余液体, 滴加 3% 过氧化氢到组织切片上, 孵育 15min;
- PBS 洗涤 5min, 重复 3 次;
- 用吸水纸吸去玻片上多余液体, 滴加 10% 封闭山羊血清到组织切片上, 室温封闭 30min;
- 用吸水纸吸去玻片上多余液体, 滴加适量用一抗稀释液稀释后的抗体工作液, 置于湿盒 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 1h-2h;
- PBS 洗涤 5min, 重复 3 次。

### 显色

- 滴加聚合物辅助剂 (试剂 1), 在湿盒中室温或 37 °C 孵育 20min;
- PBS 洗涤 5min, 重复 3 次;
- 滴加辣根过氧化物酶标记 IgG 聚合物 (试剂 2), 在湿盒中室温或 37 °C 孵育 20min;
- PBS 洗涤 5min, 重复 3 次;
- 用吸水纸吸去玻片上多余液体, 每张切片滴加新鲜配制的 DAB 工作液孵育 3-5min, 光学显微镜下观察染色结果, 达到合适的显色强度后, 用去离子水洗涤切片, 适时终止显色;
- 滴加苏木素染液到切片上复染 5min, 用去离子水洗涤切片 5min, 盐酸酒精分化液分化 30s, 再用去离子水洗涤切片 5min 蓝化。

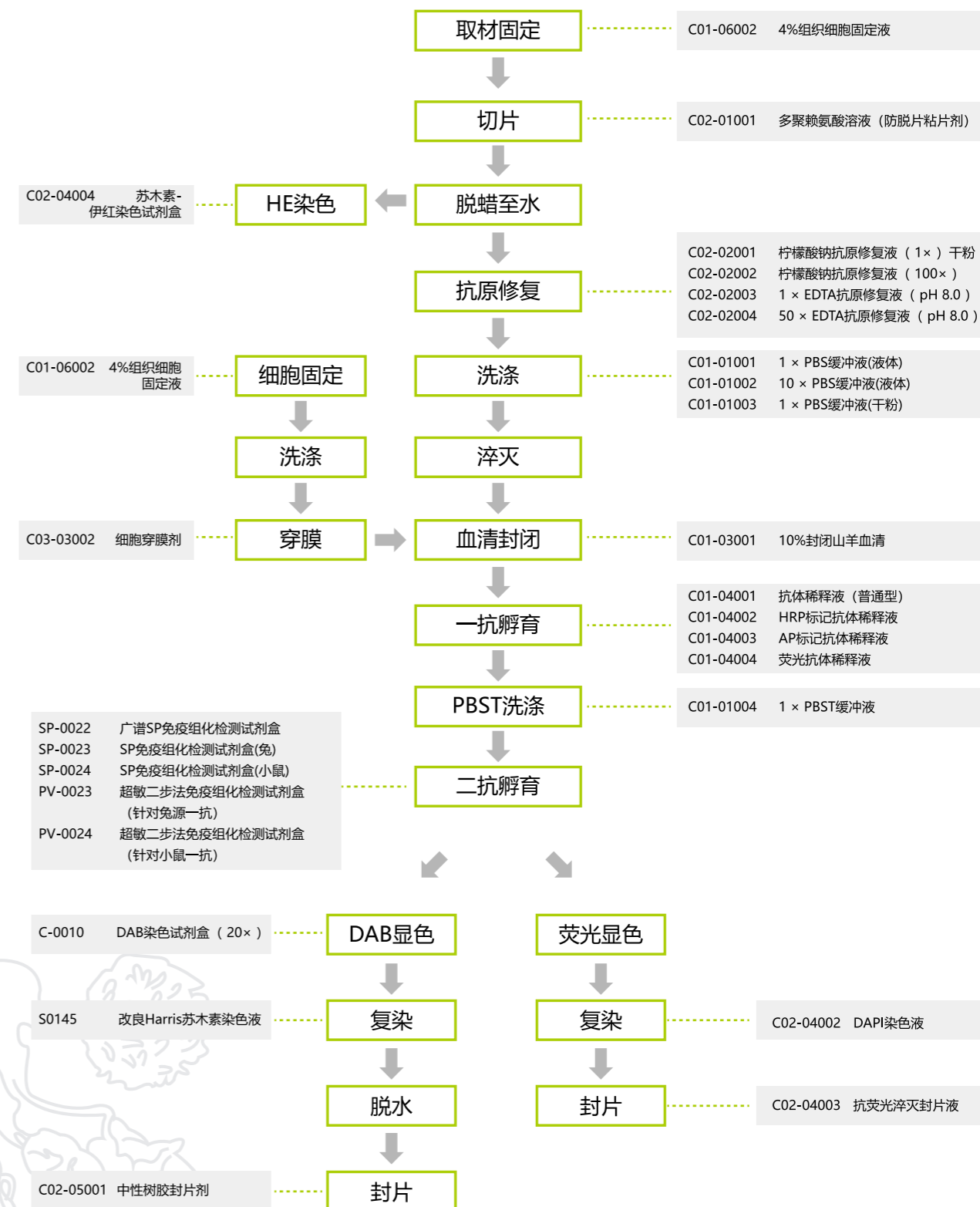
### 脱水

- 组织切片依次置于不同浓度 (70%、80%、90%、95%、100%) 乙醇各一次, 每次放置 5min;
- 在三个不同容器的二甲苯中连续各放置 1 次, 每次 15min。

### 封片及观察

取出切片, 沥干二甲苯, 用中性树胶封片后在显微镜下观察。

## IHC/IF 操作流程及 Bioss 相关配套试剂

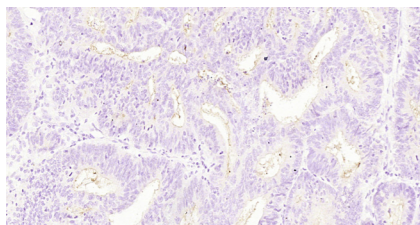


## 六、免疫组织化学 (IHC) 操作技术要点

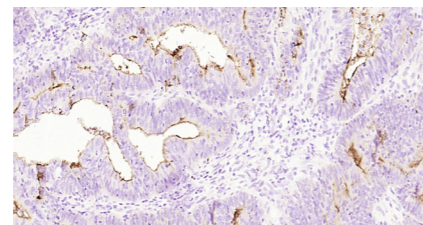
### 务必使切片在制作过程中保持湿润状态

### 抗原修复技术要点

- 抗原修复方法包括蛋白酶消化和抗原热修复。
- 抗原热修复效果取决于所用修复缓冲液的种类、浓度、PH 值、修复温度和时间。比如，我们利用 BH0027 CEA 抗体对结肠癌标本进行不同条件的抗原修复后染色结果显示 (如下图)，用 EDTA PH 8.0 在沸水浴处理 15min 要比枸橼酸 PH6.0 处理 15min 效果好。



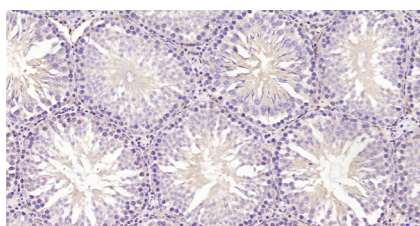
枸橼酸PH6.0沸水浴处理15min



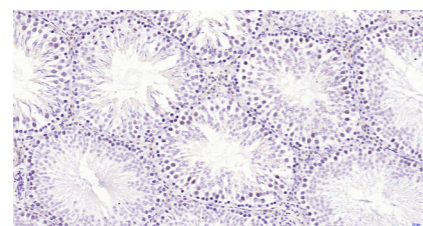
EDTA PH 8.0沸水浴处理15min

- 每一种蛋白的抗原修复液都需要通过预实验来确定，大家可以咨询 Bioss 技术部门获得内部验证所使用的抗原修复条件。
- 玻片架放进沸腾的修复液时动作要轻缓，防止脱片。

### 血清封闭的技术要点



封闭前，非特异性染色

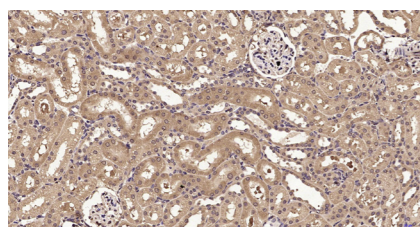


封闭后，干净，无着色

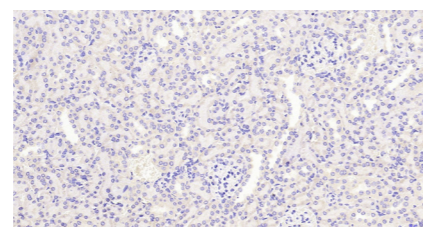
- 封闭血清一般是和二抗同一来源的。
- 必要时可加入 2%~5% BSA，可进一步减少非特异性染色。

### 抗体孵育的技术要点

- 一抗的稀释比例和孵育时间需要通过滴定法来预先确定。
- 一抗孵育需要置于 4°C 湿盒内，如孵育过夜，加二抗前检查一抗液滴是否仍覆盖样品区域，并恢复至室温至少 0.5 h 后再进入二抗孵育步骤。



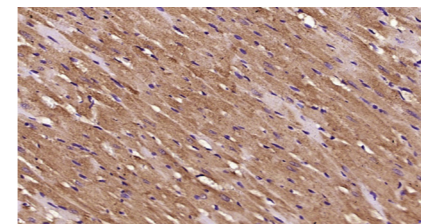
一抗浓度过高导致目的蛋白染色过度



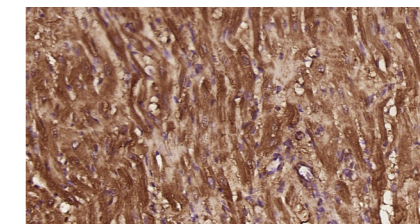
一抗浓度过低导致目的蛋白染色不足

### DAB 显色的技术要点

- 显色时间控制在 5min 以内，不要太长。
- DAB 显色要在显微镜下观察，一旦显色达到适当强度立即用去离子水洗掉终止显色。



显色适当



显色过深

### 脱水与封片的技术要点

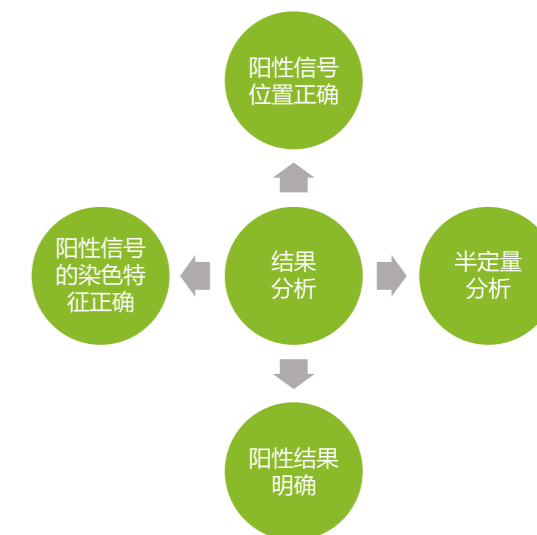
- 手工封片要避免气泡。
- 注意封片胶的用量，切勿使用太多。

## 七、免疫组织化学 (IHC) 结果判读的一般标准

- 阳性信号着色形态和组织细胞分布特征是否与报道一致。比如，一些蛋白根据报道应该在特定组织或细胞表达，需要在染色后参照相关报道或判读标准对结果进行比对。
- 阳性信号位置需要符合预期的细胞学特征 (亚细胞定位)。如 LCA 应定位在细胞膜上; CK 应定位在细胞浆内; PCNA 及 p53 蛋白应定位在细胞核内; EMA 应定位在细胞膜上, Collagen 应定位在细胞外等等。与文献报道公认的阳性着色亚细胞定位不符的结果，不能视为阳性，需要查找相关可能的问题。
- 阳性信号明确，阳性染色为黄色、棕黄色到褐黄色。
- 应该避免对出血、坏死、切片刀痕、界面边缘等区域进行结果判读，这些区域的着色很有可能是内源因素或认为因素造成的假阳性。

## 八、免疫组织化学 (IHC) 结果半定量分析

1. 人工计数方法。在 40× 倍光镜下，随机选择 5-10 个不同视野，人工计数阳性着色细胞。
2. 评分法。综合染色强度和阳性细胞占比进行评分。染色强度评分标准：不着色 0 分；淡黄色 1 分；棕黄色 2 分；棕褐色 3 分。阳性细胞占比评分标准：< 5%，0 分；5%-25%，1 分；26%-50%，2 分；51%-75%，3 分；> 75%，4 分。两种评分相加后 0 分为 (-)，2-3 分为 (±)，4-5 分为 (+)，6-7 分为 (++)，其中 (+) 和 (++) 判为阳性。
3. 灰度值检测法。图片经分析软件进行灰度值检测，常用分析软件为 ImageAnalyser、Imagej、ImageProPlus(IPP)。
4. 数字病理图像分析平台。在全切片成像 (WSI) 的基础上，可对全切片数字扫描病理图像中的 ROI 区域进行高通量分析。比如 3DHitech 开发的 QuantCenter 模块能够智能识别组织切片中的阳性细胞和染色程度等，并能自动生成 H-score。

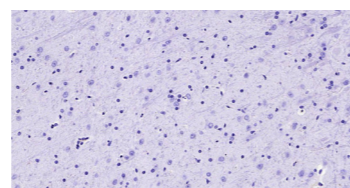


## 九、免疫组织化学 (IHC) 实验常见问题和解决方案

### 阴性染色

需查找的可能问题

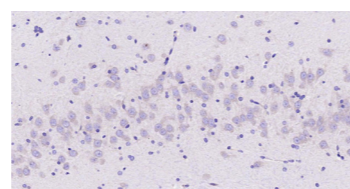
- 组织本身是否含有目的蛋白, 设置合理的阳性对照
- 是否进行抗原修复以及修复方式是否恰当
- 所加试剂和染色步骤是否有误
- 抗体是否有效, 浓度是否过低
- 检测系统是否匹配



### 弱阳性染色

需查找的可能问题

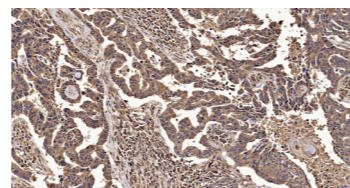
- 标本的固定方式及固定时间
- 抗原修复液的选择是否正确
- 抗原修复方式是否适当
- 抗体浓度是否过低
- 抗体是否在孵育过程中流失
- 显色时间是否太短



### 非特异性染色

需查找的可能问题

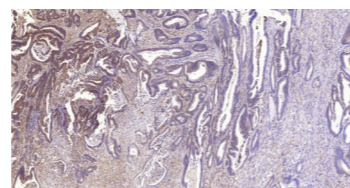
- 封闭是否不完全
- 抗体浓度是否过高
- 抗体孵育时间是否过长
- 抗体孵育温度是否较高
- 一抗是否特异性差
- 一抗是否未充分清洗
- 组织是否在染色过程中变干
- DAB 显色时间是否太久
- 切片是否在缓冲液或修复液中浸泡时间太长 (大于 24 小时)



### 不均匀染色

需查找的可能问题

- 脱蜡是否不充分
- 切片是否水化过程不全
- 抗体是否没混匀, 或有气泡
- 抗体是否在孵育过程中流失
- 组织是否在染色过程中变干
- 切片是否清洗不充分
- 切片制备时厚度是否不均匀



## 十、BioSS 常见 IHC/IF/ICC 配套试剂

产品编号	产品名称	产品规格
C02-01001	多聚赖氨酸溶液 (防脱片粘片剂)	5ml/10ml/100ml
C01-01001	1×PBS 缓冲液	500ml
C01-01002	10×PBS 缓冲液 (液体)	50ml/500ml
C01-01003	1×PBS 缓冲液 (干粉)	1L (粉剂)
C01-01004	1×PBST 缓冲液	500ml
C01-03001	10% 封闭山羊血清 *	30ml/100ml
C01-04001	抗体稀释液 (普通型)	30ml/100ml
C01-04002	HRP 标记抗体稀释液	30ml/100ml
C01-04003	AP 标记抗体稀释液	30ml/100ml
C01-04004	荧光抗体稀释液	30ml/100ml
C01-06002	组织 / 细胞固定液	100ml/500ml
C03-03002	细胞穿膜剂	100ml
C02-02001	柠檬酸钠抗原修复液 (1×)	1L (粉剂)
C02-02002	柠檬酸钠抗原修复液 (100×)	50ml/100ml
C02-02003	1×EDTA 抗原修复液 (pH 8.0)	100ml
C02-02004	50×EDTA 抗原修复液 (pH 8.0)	100ml
PV-0023	超敏二步法免疫组化检测试剂盒 (兔源一抗)	3ml/6ml/18ml
PV-0024	超敏二步法免疫组化检测试剂盒 (针对小鼠一抗)	3ml/6ml/18ml
SP-0022	广谱 SP 免疫组化检测试剂盒	3ml/6ml/18ml
SP-0023	SP 免疫组化检测试剂盒 (兔)	3ml/6ml/18ml
SP-0024	SP 免疫组化检测试剂盒 (小鼠)	3ml/6ml/18ml
C-0010	二氨基联苯胺 / DAB 染色试剂盒 (20×)	0.5ml/1ml
C02-04002	DAPI 染色液	10ml/50ml
C02-04003	免疫荧光抗淬灭封片剂	5ml
C02-04004	苏木素 - 伊红染色试剂盒	10ml/100ml
C02-05001	中性树胶封片剂	10ml/100ml

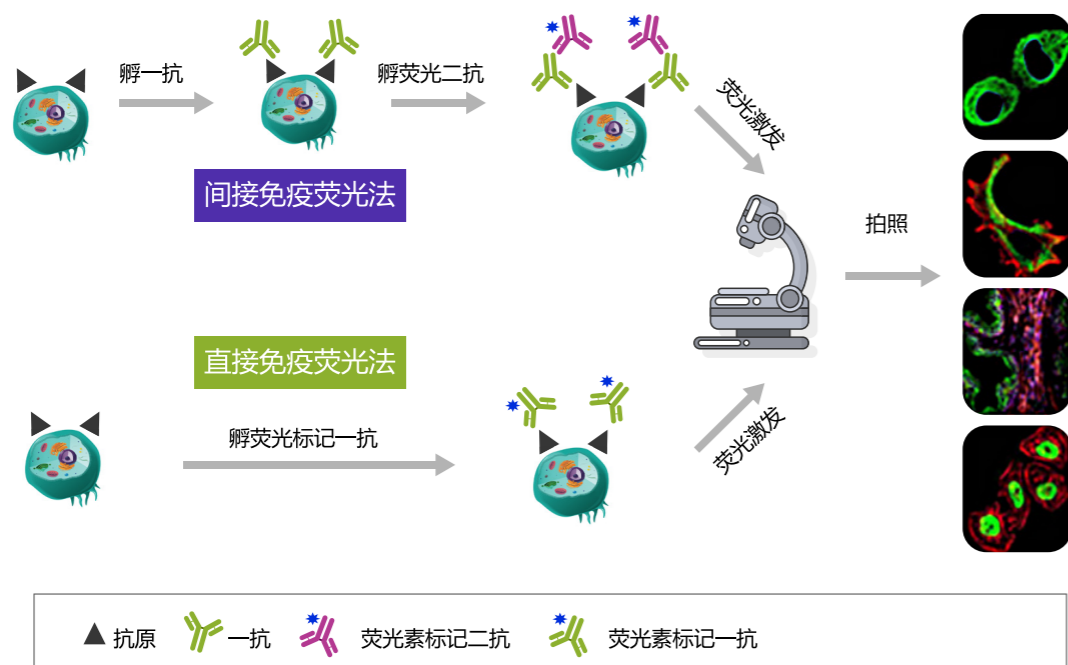
\* 更多产品选择, 请访问 BioSS 官方网站 <http://www.bioss.com.cn/>

## 第五章 免疫荧光 (IF) 技术指南

### 一、免疫荧光 (IF) 技术概览

免疫荧光 (Immunofluorescence, IF) 是利用抗原抗体能进行特异性结合的免疫化学特性, 以荧光素标记已知的抗体 (或抗原) 作为试剂, 在特定条件下检测未知的抗原 (或抗体), 借助于荧光显微镜观察抗原抗体结合物的荧光分布, 从而可对抗原抗体物质进行定性、定位观察。此技术已被广泛应用于医学和生物学等多种领域之中, 荧光检测常用于需要同时检测多种物质的情况。荧光染料可以与一抗或二抗直接偶联, 也可与链霉素亲和素偶联。

免疫荧光技术可分为直接法和间接法两种, 具体流程如下图所示。直接法的优点在于检测步骤较少, 实验周期短, 且背景染色低; 缺点在于其检测的敏感性偏低, 对于表达丰度低的抗原检测较难, 且每一种抗体均需分别标记, 价格较昂贵。间接法的优点在于敏感性高, 缺点在于其会造成较高背景。



### 二、实验前准备的溶液和试剂

- O.C.T. Compound (Bioss 产品货号 C2076)
- 去离子水
- 4% 多聚甲醛
- 洗涤缓冲液: 1× 磷酸盐缓冲液 (PBS)(Bioss 产品货号 C01-01001)、0.01M PBST (pH7.2-7.4) (Bioss 产品货号 C01-01004)
- 封闭缓冲液: 用 PBS 配制的 5%~10% 二抗来源相同种属正常血清
- Bioss 标准抗体稀释液 (Bioss 产品货号 C01-04001)
- 荧光抗体稀释液 (Bioss 产品货号 C01-04004)
- 抗体: 荧光直标一抗或无标记一抗及对应荧光标记二抗
- DAPI 染色液 (Bioss 产品货号 C02-04002)
- PI 染色液 (Bioss 产品货号 D-9103)
- 抗荧光淬灭封片液 (Bioss 产品货号 C02-04003)

### 三、实验标准操作流程



#### 样品处理

- 细胞爬片
  1. 弃去细胞培养液, PBS 洗 3 次, 5 min/ 次。
  2. 固定: 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 也可 4°C 固定过夜。
  3. PBS 洗 3 次, 5 min/ 次。
  4. 透膜: 用含有 0.3% Triton X -100 的 PBS 室温孵育 20 min( 如检测细胞膜外侧蛋白, 可省略此步 )。
  5. PBS 洗 3 次, 5 min/ 次。
- 冷冻组织切片
  1. 制备好的冰冻切片放置于室温复温。
  2. PBS 洗 3 次, 5 min/ 次。
- 石蜡包埋组织切片
  1. 制备好的石蜡切片按以下顺序进行脱蜡水化:

- 二甲苯 I：20min，二甲苯 II：20min，二甲苯 III：20min；  
无水乙醇：15min，95% 乙醇：15min，70% 乙醇：15min，50% 乙醇：15min；  
蒸馏水 I：5min，蒸馏水 II：10min；  
2. PBS 洗 3 次，5 min/ 次。  
3. 抗原修复：依据所要检测蛋白参照抗体说明书选择合适的抗原修复液与修复方式，沸水浴热修复 15min。  
4. PBS 洗 3 次，5 min/ 次。

### 冷冻样本制备

免疫荧光技术主要依靠观察标本上荧光抗体的染色结果对抗原进行鉴定，因此标本制作的好坏直接影响检测的结果。样本制备过程应力求保持抗原的完整性和充分暴露，以便于后续的抗体结合和染色结果观察。免疫荧光实验样本又分为组织样本和细胞样本，我们分别介绍。

#### ● 组织样本冰冻切片的制备

由于石蜡包埋的组织切片会在免疫荧光实验过程中带来自发荧光的干扰，免疫荧光实验所用组织样本优先考虑制备冰冻切片。冰冻切片可以较好的保留酶功能和抗原的完整性，尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。由于其常采用丙酮进行固定，此类固定剂通常不会掩蔽抗原表位，所以不需要像甲醛固定的石蜡切片必须进行抗原修复，从而减去了冗长的实验步骤，也减少了实验失败的几率。

冰冻切片的质量与实验成败息息相关，高质量的切片可以避免实验中组织脱片，减少组织细胞形态的损坏，大大提高了实验结果的可信度。我们要从实验取材开始就做正确的处理方式，尽量减少人为因素对实验结果造成的不确定性。

#### 组织样本冰冻切片的制备过程包括以下步骤：

##### 选取组织

准备做冰冻切片的组织取材，不能太大太厚，厚者冰冻费时，大者难以切完整，最好为 20 mm×20 mm×5mm 以内。

##### 切片前的组织预处理和包埋

新鲜的组织及已固定的组织均可作冰冻切片。对于新鲜的组织常常采用液氮速冻法，对于固定的组织采用蔗糖脱水法。

**液氮速冻法：**将组织块平放于软塑瓶盖或特制小盒内（直径约 2cm），如组织块小可适量添加 O.C.T.(optimal cutting temperature) 包埋剂浸没组织，然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内，当盒底部接触液氮时即开始气化沸腾，此时小盒保持原位切勿浸入液氮中，大约 10-20s 组织即迅速冰结成块。取出组织冰块立即置入 -80°C 冰箱贮存备用，或置入恒冷箱切片冰冻切片。

**蔗糖脱水法：**将组织置于 4% 多聚甲醛固定液中，4°C 摇床过夜。将固定后的标本用 1× PBS 漂洗三次，每次 15 分钟。将组织置于 30% 蔗糖溶液中，4°C 摇床过夜。第二天观察是否脱水完全（判断的标准是：当管竖直时，组织是否沉到蔗糖溶液的底部，若组织已完全沉降到蔗糖溶液的底部，平放或震荡后仍能沉降，则可判断组织已脱水完全）。之后将组织置于包埋盒中，用滤纸吸干组织周围多余的蔗糖溶液，滴加 O.C.T. 包埋剂到包埋盒中，用移液枪头将组织与 O.C.T. 混匀，将组织按切片需要方向摆放于包埋盒的底部，迅速置于 -80°C 冰箱待切。

### 切片

切片前先将切片机的箱体温度及刀头温度均设为 -20°C，把包埋盒从 -80°C 冰箱取出置于切片机中平衡半小时左右。之后将包埋块用 O.C.T. 固定在样品托上，然后将样品托固定在样品头上，调整合适的位置，以使样品与刀头处于平行位置。使用冷冻切片机，将组织块切成 6-10μm 的切片，用细毛笔将切片粘贴于处理过的载玻片上。

不同组织标本的适宜切片温度必要时可进行调整：甲状腺 -20 ~ -18°C；含脂肪的乳腺 -30 ~ -22°C；脂肪组织 -30°C 以下；脑 -18 ~ -16°C；肝、脾、肾、淋巴结 -18°C；皮肤、肌肉 -24 ~ -22°C；卵巢、胆囊、胃壁 -22 ~ -20°C。

### 固定及保存

制备好的冰冻切片室温放置 30min，待切片晾干后在 -20°C 丙酮中固定 10min，取出后晾干，然后置于 -80°C 冰箱。

冷冻切片可以在 -80°C 保存 1-3 个月，建议尽快使用。

#### 冰冻切片制备的注意事项：

● 防卷板及切片刀和持刀架上的板块应保持干净，需经常用毛笔挑除切片残余和用柔软的纸张擦。有时需要每切完一张切片后就用纸擦一次。因为这个地方是切片通过和附贴的地方，如果有残余的包埋剂粘于刀或板上，将会破坏甚至撕裂切片，使切片不能完全切出。

● 多例多块组织同时需做冰冻切片时，可各自放于不同的支承器上，于冷冻台上冻起来，然后依据不同的编号，依序切片，这样做既不费时也不会乱。

● 放置组织冰冻前，应视组织的形状及走势来放置，所谓“砍柴看柴势”，切片也是如此，如果胡乱放置，就不能收到很好的效果。

● 切片时一定要保持匀速，切片要平整不能皱缩。

● 如果发现冰冻过度时，可将冰冻的组织连同支承器取出来，在室温停留片刻，再行切片。或者，调高冰冻点再继续切片。

● 用于附贴切片的载玻片，不能存放于冷冻处，于室温存放即可。因为当附贴切片时，从室温中取出的载玻片与冷冻箱中的切片有一种温度差，当温度较高的载玻片附贴上温度较低的切片时，由于两种物质间温度的差别，当它们碰撞在一起时，分子彼此间发生转移而产生了一种吸附力，使切片与载玻片牢固地附贴在一起。如果使用冷藏的载玻片来附贴切片，由于温度相同，没有发生上述的现象。

● 粘片时应平行的将涂有粘片剂的载玻片贴近组织切片，不要从一侧慢慢地将组织切片吸附到载玻片上，这样会影响组织细胞形态。

● 细胞样品的准备

用于免疫荧光实验的细胞可以是直接生长在盖玻片或专用腔室载玻片上的贴壁细胞，也可以是经过离心后涂片的悬浮细胞或者是将取自体内的组织细胞悬液离心后涂片。贴壁良好的细胞一般在培养时直接放入盖玻片或专用腔室载玻片上让细胞生长在其上即可，尽量避免使用贴壁性能不好的细胞进行免疫荧光实验，以免后续的漂洗操作引起细胞脱落。少数实验需要使用悬浮细胞进行免疫荧光观察，取对数生长细胞，用 PBS 离心洗涤 (1000rpm, 5min) 2 次，用细胞离心甩片机制备细胞片或直接制备细胞涂片。

### 封闭

#### 1. 封闭：

● 直接法免疫荧光

使用与直标一抗宿主物种来源相同的血清进行封闭，室温封闭 20 min。

● 间接法免疫荧光

使用与二抗宿主物种来源相同的血清进行封闭，室温封闭 20 min。

注意：当使用来自不同物种的荧光抗体（一抗或二抗）进行多重染色时，需要使用这些物种的血清共同封闭。

2. PBST 洗 3 次，3 min/ 次。



## 抗体孵育

### ● 直接法免疫荧光

1. 用 Bioss 荧光抗体稀释液按合适比例稀释一抗，37°C下孵育 2h 或 4°C过夜（孵育抗体的浓度、孵育时间通过预实验确定）。

注意：如果进行双重指标共染色，可将标记有两种不同荧光素的抗体（荧光素需要根据抗原丰度确定）以适当比例（稀释比例需提前优化确定）混合后进行孵育。

2. PBST 洗 3 次，10 min/ 次。

### ● 间接法免疫荧光

1. 用 Bioss 标准抗体稀释液按合适比例稀释一抗，37°C下孵育 2 h 或 4°C过夜（孵育抗体的浓度、孵育时间通过预实验确定）。

2. PBST 洗 3 次，10 min/ 次。

3. 用 Bioss 荧光抗体稀释液按合适比例稀释二抗，37°C下孵育 1h（孵育抗体的浓度、孵育时间通过预实验确定）。

4. PBST 洗 3 次，10 min/ 次。

注意：如果进行双重指标共染色，可用未标记的两种特异性一抗以适当比例（稀释比例需提前优化确定）混合后孵育组织或细胞，洗去多余的一抗后，再用两种不同的荧光素（荧光素需要根据抗原丰度确定）分别标记的二抗进行孵育，洗去多余的二抗，后在荧光显微镜下分别选择两种相应的激发滤片观察，从而对两种抗原进行定位和定量。使用此法应注意两种特异性一抗必须来源于不同种属，且荧光标记二抗的种属必须与第一抗体的种属相匹配。

## 细胞核复染及封片观察

1. 复染细胞核。

2. PBS 洗 3 次，5 min/ 次。

3. 用防荧光淬灭封片剂封片，镜下观察。

## 四、实验注意事项

### ● 自发荧光的减少和封闭

自发荧光可由组织中存在的荧光化合物引起，例如黄素和卟啉。这些化合物会被用于固定、脱水切片的溶剂从组织中溶解，然而其仍会存留在使用水性试剂处理的冰冻切片中。固定步骤也可能诱导自发荧光，在使用醛类固定剂时通常会发生这类情况，醛类固定剂会与胺类反应生成荧光产物。因此，可采取以下措施，减少自发荧光的产生：

a. 使用冰冻切片，降低固定过程中诱导自发荧光的可能性。

b. 使用非醛类的固定剂。

c. 用硼氢化钠或甘氨酸 / 赖氨酸处理组织，以此封闭固定过程中带来的醛基。

d. 利用淬灭染料处理组织，例如滂胺天蓝 / 苏丹黑 / 台盼蓝或 FITC 封闭剂。

● 正确的对照可以帮助获得更准确真实的实验数据。例如间接法免疫荧光可以设置如下对照：

a. 仅 PBS——排除自发荧光的可能性。

b. 仅二抗——排除二抗非特异性结合内源细胞蛋白质的可能性。

● 染色期间务必要避免细胞干燥，因为这可能引起假阳性。

● 对于每个抗体，最优通透化步骤不尽相同，因此可尝试不同的通透方法，例如尝试采用不同百分比的 Triton X-100

(0.1-0.25%) 或预冷的 100% 甲醇。

● 可以通过以下方式降低非特异性染色：

a. 对于直接法免疫荧光，使用与直标一抗宿主物种来源相同的血清进行封闭。

b. 对于间接法免疫荧光，使用与二抗宿主物种来源相同的血清进行封闭。

c. 使用专门的荧光增强剂在抗体孵育前处理细胞表面。

## 五、冰冻切片制备常见问题及解决方法

问题	原因	解决方法
切片软化	样本冷冻不足	选择较低的温度
	防卷板冷冻不足，使切片升温	等待切片刀和 / 或防卷板达到冷冻箱温度
切片碎裂	样品冷冻过度	选择较高的温度
	样品冷冻不足	选择较低的温度
切片不平整	样品面积过大	粗修样品的切面，提高切片厚度
	防卷板位置及角度不正确	调整防卷板
	切片刀变钝	使用切片刀的其他部位或更换切片刀
	防卷板边缘损坏	更换防卷板
	防卷板及切片刀上有污垢	用干布或刷子清扫
防卷板上的切片打卷	防卷板超出刀刃不够	重新正确调整
切片有皱褶	切片刀损坏	使用切片刀的其他部位或更换切片刀
	防卷板边缘损坏	更换防卷板
组织粘在防卷板上	防卷板温度过高或位置不当	冷却防卷板或者重新正确放置
	防卷板边角有油脂	清除防卷板上的油脂
	防卷板未正确固定	正确固定
	切片刀生锈	除锈

## 六、免疫荧光 (IF) 实验常见问题及解决方法

问题	原因	解决方法
无表达或表达浅	与目标蛋白质结合的一抗不足	提高抗体浓度，4°C下孵育过夜
	抗体可能无法识别天然形式的蛋白质，因此不适用于 IF 实验	查看说明书，了解该抗体的免疫原，若适用于 ICC 或 IP 也能说明该抗体可识别天然形式的蛋白质
	组织中目的蛋白丰度低	使用放大步骤来最大限度地增强信号
	操作不当	洗液残留过量，影响抗体稀释度
背景色偏高	抗体无法渗入蛋白质所在位置	向封闭缓冲液和抗体稀释液中添加强效通透剂如 Triton X-100
	封闭不当	适当延长封闭时间，推荐使用 10% 的二抗来源血清，孵育 1h，或使用免疫球蛋白处理过的预吸附二抗
	抗体浓度过高或孵育时间过长	摸索最适抗体浓度，并在 4°C下孵育
非特异性染色	洗涤不充分	增加洗涤次数和时间
	一抗 / 二抗浓度可能过高	尝试降低抗体浓度并缩短孵育时间，使用阴性组织做对照
	一抗与被染色组织是同一物种（如小鼠组织上测试小鼠一抗）	使用产生物种与该组织物质不同的一抗
组织细胞形态不清晰	切片 / 细胞爬片干燥	保持样本较高的湿度，勿使其干透
	固定不足 / 组织自溶	延长固定时间，增大固定剂与组织的比例，将组织修整成合适大小 / 尝试使用交联固定剂
	组织从载玻片上脱落	更换粘片剂，使用新制备的切片
	组织切片过厚	将组织切片切得更薄，减少冰晶对切片形态的破坏

附表 1: 常见荧光素分类及选择

荧光素	激发光波长 (nm)	发射光波长 (nm)
Alexa Fluor 350	346	442
DAPI	359	461
Alexa Fluor 488	495	519
FITC	495	519
Cy3	548	561
Alexa Fluor 555	555	565
PE	496, 566	576
Alexa Fluor 594	590	617
PI	305, 540	620
APC	650	660
Alexa Fluor 647	650	665
Cy5	647	665
PE-Cy5	565	666
PE-Cy5.5	565	693
Cy5.5	675	694
Alexa Fluor 750	749	775
Cy7	753	775
PE-Cy7	566	778

附表 2: 常见亚细胞结构标志物

Protein	Full Name	Uniprot No.
<b>Golgi apparatus</b>		
GM130	Golgin subfamily A member 2	Q08379
TGN38	trans-Golgi network integral membrane protein 2	O43493
RCAS1	receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells	O00559
MAN2A1	alpha-Mannosidase 2	Q16706
STX6	syntaxin 6	O43752
FTCD	formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O95954
b4Gal	beta1,4-galactosyltransferase 6	Q9UBX8
<b>Mitochondria</b>		
AIF	apoptosis-inducing factor	O95831
COX4	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	P13073
VDAC1	outer mitochondrial membrane protein porin 1	P21796
CPS1	carbamoyl-phosphate synthase	P31327
PHB	prohibitin	P35232
HK1	hexokinase-1	P19367
<b>Chromatin</b>		
HIST1H3F	histone H3.1	P68431
TERF1	telomeric repeat-binding factor	P54274
HIST3H2A	histone H2A	Q7L7L0
HIST1H4A	histone H4	P62805
TERF2IP	telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	Q9N9Y0
HIST1H2BB	histone H2B	P33778
CBX5	heterochromatin protein 1alpha	P45973
CBX1	heterochromatin protein 1beta	P83916
CBX3	heterochromatin protein 1gamma	Q13185
CENPA	centromere protein A	P49450
CENPC	centromere protein A	Q03188

Nuclear envelope		
LMNA	prelamin-A/C	P02545
LMNB	lamin B1	P20700
NUP98	nuclear pore complex protein Nup98	P52948
EMD	emerin	P50402
Nucleolus		
FBL	fibrillarin	P22087
CD3EAP	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA34	O15446
NOP2	ribosomal RNA methyltransferase NOP2	P46087
FUS	RNA-binding protein FUS	P35637
Endosomes		
EEA1	early endosome antigen 1	Q15075
CLTC	clathrin heavy chain 1	Q00610
Rab5	Ras-related protein Rab5	P20339
Rab11	Ras-related protein Rab-11A	P62491
Rab9	Ras-related protein Rab-9a	P51151
Rab7	Ras-related protein Rab-7a	P51149
CLTB	clathrin light chain B	P09497
AP2S1	AP-2 complex subunit sigma	P53680
Exosomes		
HSPA8	heat shock protein family A member 8	Q96IS6
CD81	CD81 antigen	P60033
CD9	CD9 antigen	P21926
Endoplasmic reticulum		
CANX	calnexin	P27824
CALR	calreticulin	P27797
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	P11021
PDI	Protein disulfide-isomerase (PDI)	P07237
Microtubules		
TUBA1A	alpha-tubulin	Q71U36
TUBB3	beta tubulin III	Q13509
Centrosome		
TUBG1	gamma-tubulin	P23258
PCNT	pericentrin	O95613
NINL	ninein	Q9Y2I6

Actin filaments		
ACTA2	actin alpha (smooth muscle)	P62736
Autophagosomes and lysosomes		
LAMP1	lysosome-associated membrane protein 1	P11279
LAMP2	lysosome-associated membrane protein 2	P13473
LC3	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Q9H492
GLB1	beta-galactosidase	P16278
ATG12	autophagy-related protein 12	C1IDX9
ATG5	autophagy protein 5	Q9H1Y0
Melanosomes		
OA1	melanoma antigen recognized by T-cells 1	Q16655
PMEL	melanocyte protein PMEL	P40967
TYRP1	tyrosinase-related protein 1	Q6LES1
TYRP2	tyrosinase-related protein 2	P40126
Peroxisomes		
CAT	catalase	P04040
ACOT8	acyl-coenzyme A thioesterase 8	O14734
PEX3	peroxin factor 3	P56589
Ribosomes		
RPS6	ribosomal protein s6	P62753
RPL7A	60S ribosomal protein L7a	P62424
RPL26	60S ribosomal protein L26	P61254
Proteasomes		
PSMA1	20S proteasome alpha-subunit	P25786
PSMB5	proteasome subunit beta type-5	P28074
PSMC1	26S protease regulatory subunit 4	P62191
PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q99460
PSMD7	26S protease regulatory subunit 7	P51665
Mitosis		
HIST1H3F	phosphohistone H3	P68431
Cytokinesis		
Aurora B	Aurora B kinase	Q96GD4

## 第六章 流式细胞分析 (FCM) 技术指南

### 一、流式细胞分析 (FCM) 技术概览

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

常见应用包括:

细胞结构与功能分析: 细胞大小、细胞粒度、细胞表面积、核浆比例、细胞活力、酶活性等;

抗原及受体分析: 细胞表面分子及受体分析、细胞内蛋白及细胞因子分析、激素结合位点分析等;

细胞周期与凋亡: 细胞周期分析、细胞凋亡分析、凋亡相关蛋白分析等;

细胞分型及疾病诊断: 淋巴细胞亚群鉴定、干细胞亚群鉴定、血小板分析、网织红细胞分析、HLA-B27 分析、PNH 诊断、AIDS 诊断与治疗 and 疗效评价、血液病与血液肿瘤诊断等。

#### 流式细胞仪的结构

流式细胞仪 (Flow cytometer) 是对细胞进行自动分析和分选的装置, 其主要由液流系统、光学系统、电子系统和细胞分选系统构成。

##### 液流系统

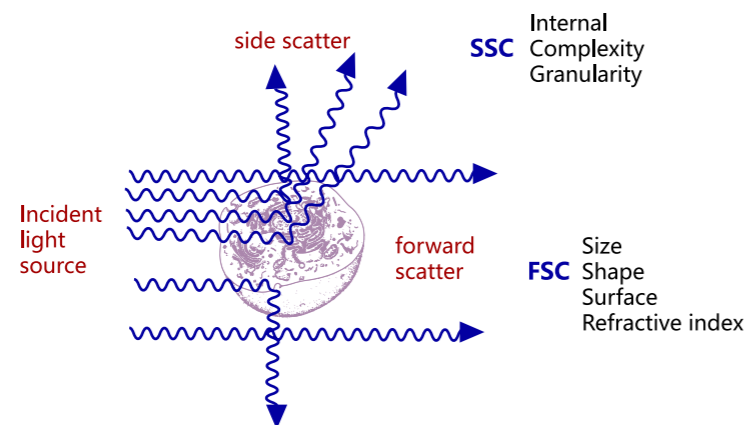
流式细胞仪的液流系统是由鞘液流和样品流这两套紧密联系而又相互独立的液流组成。悬浮缓冲液细胞样品通过流式细胞仪时, 由于鞘液的作用, 细胞被限制在液流的轴线上, 从而能通过一个非常小的喷嘴。细胞 / 颗粒通过通道时所散射的光线将被多个检测器检测到。荧光检测器是用作检测由阳性染色的细胞 / 颗粒散发的荧光。

##### 光路系统

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

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

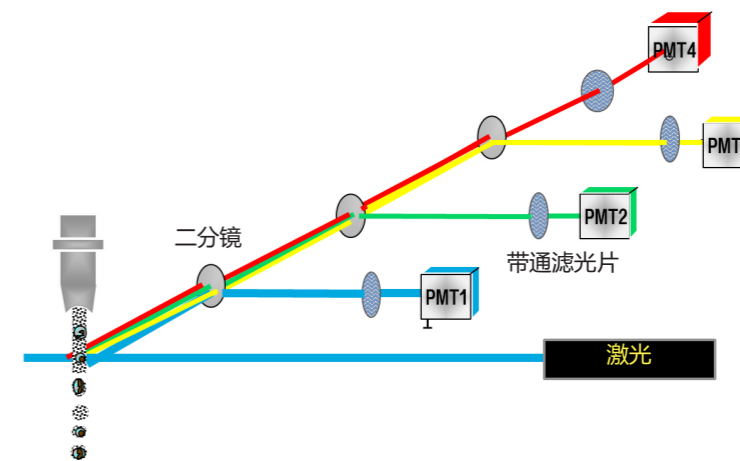
另外, 流式细胞仪的光路系统由一系列透镜、滤光片和小孔组成, 根据不同的波长将光信号进行分离。其中滤光片最为重要, 按照功能滤光片可以分为长通滤光片、短通滤光片和带通滤光片三种。



##### 监测分析系统

流式细胞仪的检测分析系统需要将细胞的各个通道的光信号分析汇总, 然后得出样品中细胞的物理化学特征。光电倍增管能将光信号转变为电子信号, 同时将信号进行一定的比例放大。通道这个概念是和光电倍增管紧密联系在一起, 可以说流式细胞仪有多少个光电倍增管就有多少个通道, 一个光电倍增管实际上就是一个通道。

检测分析系统的另一个重要组成部分是计算机分析系统, 计算机分析系统通过特定的软件实时反映收集到的信息, 并且控制流式细胞仪的工作, 用户则通过相应软件操控流式细胞仪进而分析仪器采集到的信息。



### 二、实验标准操作流程

#### 常见样本处理方法

##### 外周血样本 - 白细胞悬液制备

1. 将用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-2K) 抗凝的外周血标本上下颠倒直到充分混匀。
2. 向一支新的 15ml 离心管中加入混匀的抗凝血 50 $\mu$ L 至试管管底。
3. 加入红细胞裂解液 2ml, 混匀, 室温避光放置 5 ~ 10min。
4. 重复第 3 步的操作, 待红细胞完全裂解后, 1000 ~ 1200rpm 离心 5min, 弃上清液。
5. 悬浮细胞, 加入 1 $\times$ PBS 2ml, 混匀, 800 ~ 1000rpm 离心 5min, 弃上清液。
6. PBS 悬浮细胞沉淀物, 即为单细胞悬液, 供下一步实验使用。

##### 培养细胞样本 - 贴壁细胞单细胞悬液制备

1. 去除培养瓶或培养皿中的培养液, 用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞 2 次。
2. 加入 0.25% 胰蛋白酶 (含有 0.04% EDTA-2Na 溶液) 2 ~ 3ml, 消化 1 ~ 2min。
3. 加入含有 10% 血清的培养基 4 ~ 5ml, 用吸管将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来, 并将其转移到新的 15ml 离心管中。室温 1200rpm 离心 5min, 去上清液。
4. 加入预冷的含 0.1% 牛血清白蛋白的 PBS 重悬细胞沉淀物, 1200rpm 离心 5min, 去上清液, 重复洗涤 2 次。
5. PBS 重悬细胞沉淀物, 即为单细胞悬液, 供下一步实验使用。

##### 实体组织样本 - 酶化学法制备实体组织单细胞悬液

1. 将组织切为薄片放入小三角烧瓶中。
2. 加入 EDTA-Hanks 液 10ml, 室温放置 30min, 间断震荡 3 ~ 5 次。
3. 用 300 目细胞滤网过滤, 收集滤过液至一个 15ml 离心管中, 室温 1000rpm 离心 5min, 去上清液, 重复洗涤 2 次。
4. PBS 重悬细胞沉淀物, 即为实体组织单细胞悬液, 供下一步实验使用。

### 流式细胞分析样本标记方案

#### 1. 所需溶液和试剂

- 1× 磷酸盐缓冲液 (PBS)(C01-01001)。
- 固定液: 4% 多聚甲醛溶液 (无甲醇)(Bioss 产品货号 C01-06002); 1% 多聚甲醛溶液 (无甲醇)(Bioss 产品货号 C01-06001)。
- 细胞穿膜剂: 含 0.1% tritonX-100 的 PBS(Bioss 产品货号 C03-03003)。
- 封闭缓冲液: Bioss 产品货号 C01-03001。
- 孵育缓冲液: Bioss 产品货号 C03-04001。
- 抗体稀释液: Bioss 产品货号 C01-04001。

#### 2. 固定

1) 将约  $1 \times 10^6$  个细胞重悬在 1ml PBS 中。加入等体积 4% 多聚甲醛固定液, 室温固定 10 分钟 (或者用 70% 的冰乙醇 5-10 ml, 4°C 固定 16 小时)。

2) 用足够的 1× PBS 离心洗涤。将上清液丢弃在合适的废液缸中。做细胞外染色不需要细胞膜穿膜时, 继续免疫染色或将细胞保存在 4° C 含有 0.1% 叠氮钠的 PBS 中备用。

#### 3. 细胞穿膜 (检测胞内蛋白时备选)

- 1) 用 1 ml 含 0.1% tritonX-100 的 PBS 重悬细胞, 穿膜 5 分钟 (若细胞核内的抗体标记, 用 90% 的冰甲醇穿膜 30 分钟)。
- 2) 通过离心分离以及足够的 1× PBS 来洗涤细胞, 以去除穿膜剂。将上清液丢弃在合适的废液缸中, 然后用 0.5-1ml PBS 重悬细胞。

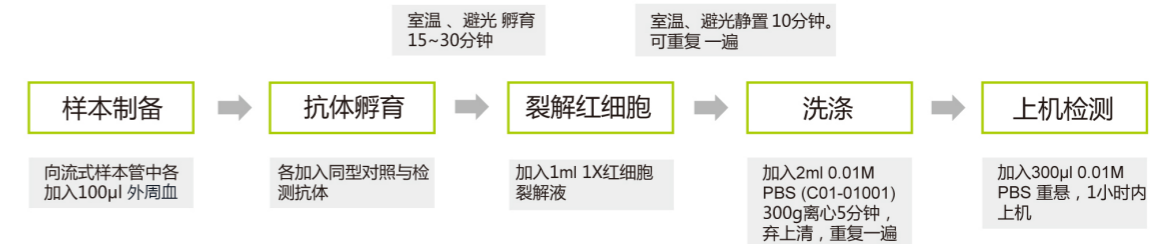
#### 4. 免疫染色

注意: 使用抗体进行免疫染色应设立相应同型对照 (见本书第一章 抗体的亚类)。

- 1) 用血球计数法或是其他方法对细胞计数, 并将  $1 \times 10^6$  个细胞分到各检测管中 (依照细胞悬液体积)。
- 2) 各管加入 2-3 ml 孵育缓冲液 (C03-04001) 漂洗, 1000rpm 离心 5min 离心后去除上清。重复一次。
- 3) 将每个样品管中的细胞重悬在 100μl 孵育缓冲液 (C03-04001) 中, 再加入抗体封闭液 (C01-03001), 室温, 封闭 30 分钟。
- 4) 1000rpm 离心 5min, 离心后去除上清, 用 100ul 孵育缓冲液重悬。
- 5) 重复步骤 4) 操作 1 次。
- 6) 按合适的稀释比例在检测管中加入一抗或同型对照 IgG (具体的用量参考抗体说明书), 室温孵育 30 分钟。
- 7) 同步步骤 4), 用孵育缓冲液清洗、离心回收细胞。
- 8) 如果是荧光素标记的一抗, 则将细胞重悬在 0.5 ml PBS 中, 然后用流式细胞仪检测。如果是未标记或者生物素标记的一抗, 则继续步骤 9)。
- 9) 用抗体稀释液 (C01-04001) 按推荐比例稀释荧光素标记的二抗或抗生物素蛋白, 将细胞重悬在该稀释液中, 室温孵育 40 分钟。离心去除稀释液。
- 10) 同步步骤 4), 用孵育缓冲液清洗、离心回收细胞。
- 11) 将细胞重悬在 0.5 ml PBS 中, 然后用流式细胞仪检测。

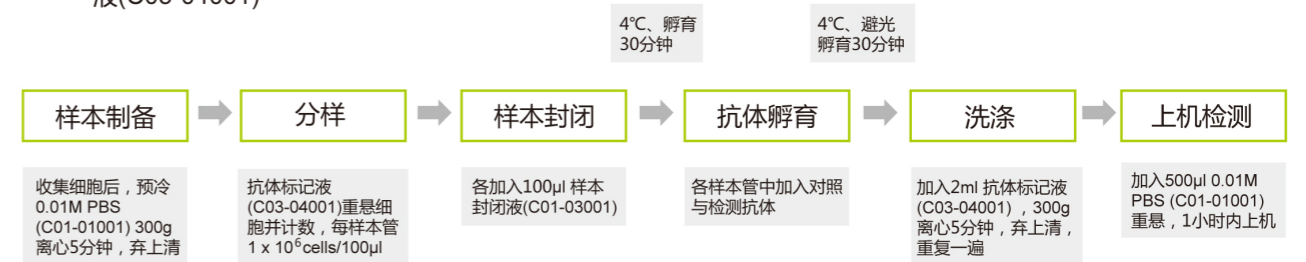
### 全血快速标记流程

※ 所需试剂: 荧光抗体、同型对照抗体、红细胞裂解液 10X (C03-05002)、0.01M PBS (C01-01001)



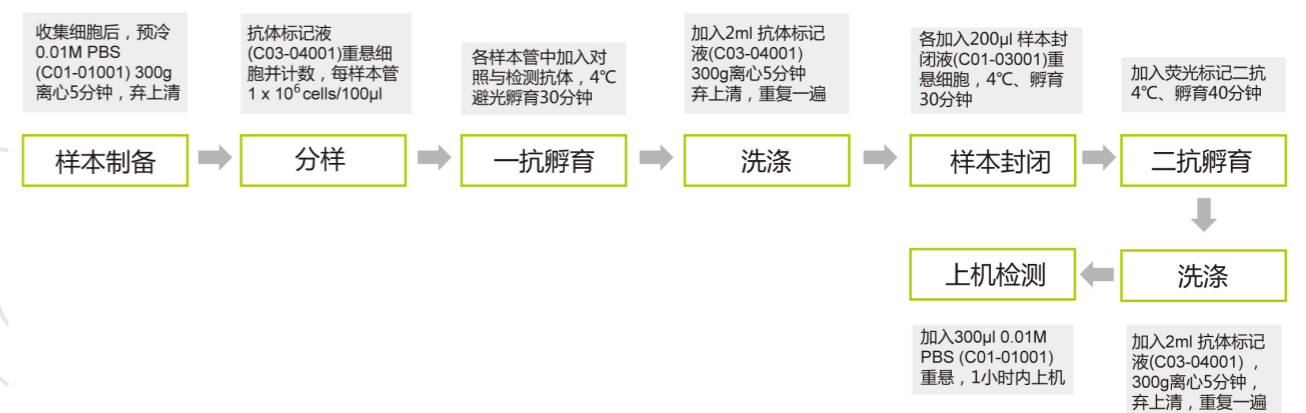
### 细胞膜表面标记流程——直接标记

※ 所需试剂: 荧光抗体、同型对照抗体、0.01M PBS (C01-01001)、封闭液(C01-03001)、抗体标记液(C03-04001)



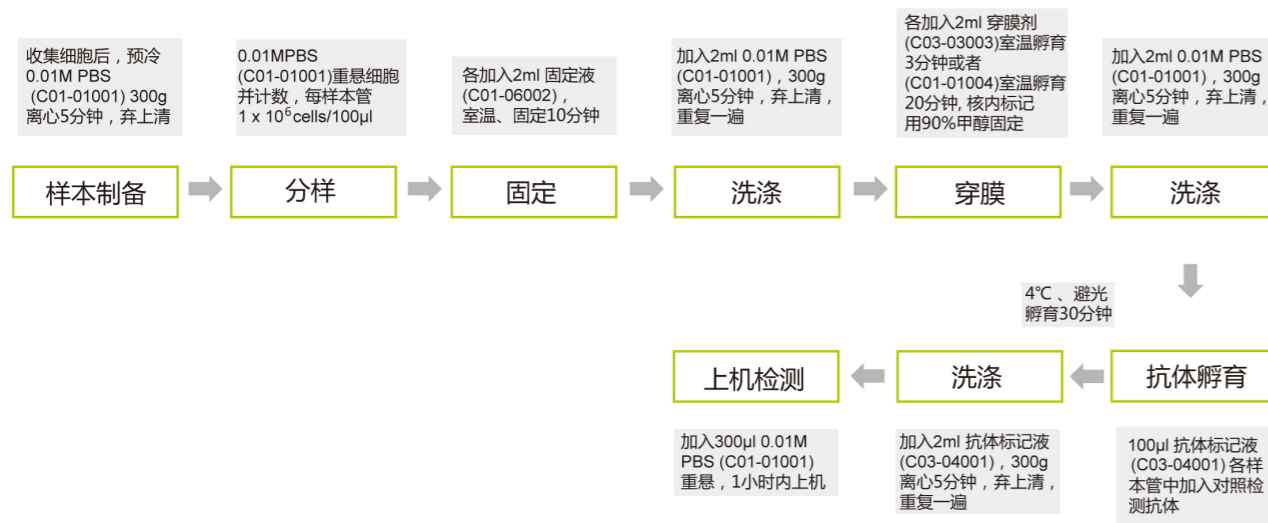
### 细胞膜表面标记流程——间接标记

※ 所需试剂: 无荧光一抗、荧光二抗、同型对照抗体、0.01M PBS (C01-01001)、封闭液(C01-03001)、抗体标记液(C03-04001)



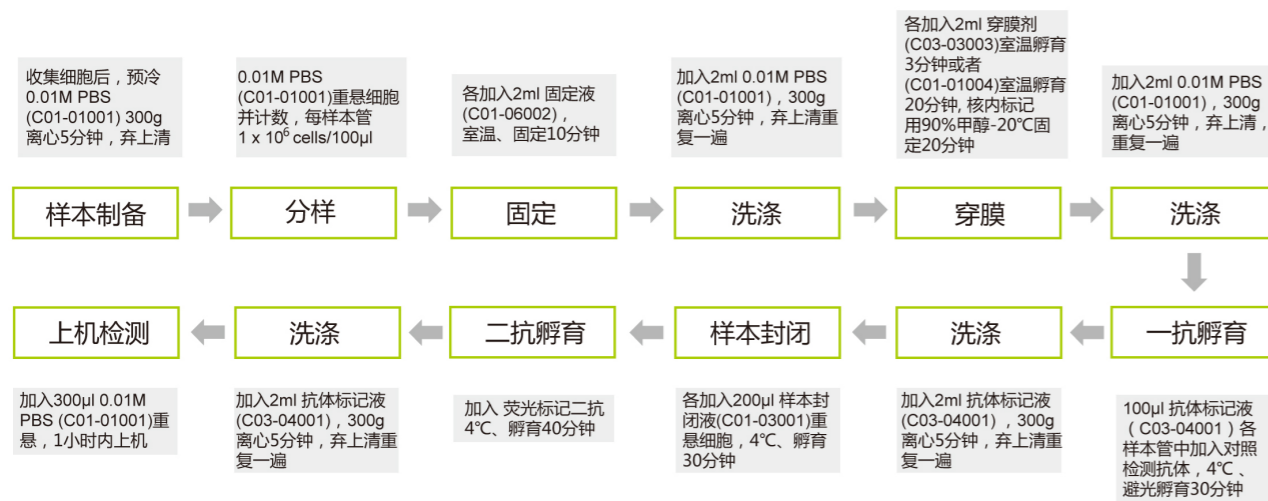
## 细胞膜内标记流程——直接标记

※ 所需试剂：荧光抗体、同型对照抗体、0.01M PBS (C01-01001)、抗体标记液(C03-04001)  
固定液(C01-06002)、穿膜剂(C03-03003) / (C01-01004)



## 细胞膜内标记流程——间接标记

※ 所需试剂：无荧光一抗、荧光二抗、同型对照抗体、0.01M PBS (C01-01001)、抗体标记液(C03-04001)  
固定液(C01-06002)、穿膜剂(C03-03003) / (C01-01004)



## 三、注意事项

### 固定剂的选择

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

### 排除死细胞

死细胞的自发荧光水平很高，且容易摄取抗体导致非特异性结合，最终影响实验结果；还可能会释放 DNA，DNA 非常粘稠，会导致细胞成团，容易堵塞管路。

#### 区分死细胞的方法：

- 当流式检测只分析细胞表面抗原分子，且不对样本固定时，7-AAD 和 PI 等 DNA 结合染料是比较理想和经典的方法。DNA 染料只会进入细胞膜受损的死细胞并染色，而活细胞不会被染色。
- 蛋白结合染料：通过与细胞上蛋白质的氨基结合来实现。因活细胞可排除染料，所以仅细胞膜被着色；而死细胞的细胞膜及胞质均被着色，继而根据荧光信号的强弱来区分死 / 活细胞。可以用在固定标本中的，区分样本固定细胞状态。

### 封闭 Fc 受体

Fc 受体是指细胞表面能够与免疫球蛋白 (IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD) 结合的分子，存在于 NK 细胞、肥大细胞、巨噬细胞、中性粒细胞表面。Fc 受体能够与抗体的 Fc 段结合，在检测时产生假阳性。

对 Fc 受体进行封闭可以使用商品化的 Fc 封闭剂或细胞来源相应物种的血清。

### 优化抗体使用浓度

抗体滴定方法：用同种细胞，相同细胞数量与反应体积，加入不同量的抗体计算阳性峰荧光强度及信噪比，理想的信噪比应该大于 3。

1. 滴定的浓度范围尽量大。
2. 滴定实验条件要和实际实验条件一致，如反应温度、pH 等。
3. 弱表达或不分群的抗原不适合做滴定。

## 四、流式抗体的选择

### 满足抗体选择的基本条件

1. 确定目的细胞的特异性表面标记或者胞内标记。
2. 抗体应用种属。
3. 经过内部验证确定可用于流式细胞分析。
4. 抗体克隆一般选择参考文献上提到的克隆；同一抗体多个克隆号的情况下，可以选择荧光标记种类最多的那个克隆。

### 确定流式细胞仪的参数配置

在设计流式方案前，先确定需要使用流式细胞仪检测的型号，对该仪器的参数配置要了解，首先是激光器，其次是滤光片，最后是确认仪器的具体型号：有助于再次确定检测通道。

## 荧光标记物的选择

### 1. 根据机器配置选择荧光素

不同激发器对应的检测通道：设计流式实验时一定要了解仪器，才能搭配合适的荧光染料配色，包括如何设置补偿，在此我们建议从以下两个方面来了解：仪器有几个激发器（激光管）及每个激发器对应那些检测通道。以最简单的 BD Calibur 流式仪为例，其配置有两色激光，能够做 4 个通道的荧光素（如下图），需根据对应的激光激发波长和检测通道选择合适荧光标记物。

激发器	通道	激发光波长 (nm)	发射光波长 (nm)	常用染料
488	FL1	BP 530/30	515-545	FITC, Alexa Fluor 488
	FL2	BP 585/42	564-606	PE
	FL3	670 LP	>670	PE-Cy5, PerCP, PE-Cy7
635	FL4	BP 661/16	653-669	APC, Alexa Fluor 488

BP: 带通滤片，只允许一定波长范围内的光束通过；  
LP: 长通滤片，只允许特定波长以上的光束通过；

多色标记荧光素搭配原则：每个通道只能选择一种荧光素；各个通道之间的荧光素可以随意搭配。FACS Calibur 常用的四色搭配：FITC, PE, PerCP, APC。

其他的仪器会有更多的激光器和通道，大家可以根据这一原则参考下图去选择合适荧光素。

激发器	可激发荧光染料
UV 激光 (355nm)	Hoechst, DAPI
紫激光 (405nm)	Pacific Blue, BG Violet450
蓝激光 (488nm)	FITC, PE, ECD, PE-Cy5, PerCP, PE-Cy5.5, PE-Cy7, AF488,SSC,FSC
绿激光 (532nm)	PE, AF647, PE-Cy5.5
黄激光 (561nm)	APC, APC-Cy7, AF647, PE-Cy5
红激光 (633nm)	APC, APC-Cy7, AF647, Cy5,Cy5.5

另外，大家需要注意荧光对等染料的问题。荧光对等染料是指荧光染料的发射波长相同或者相近，在流式细胞仪上是同一个检测通道，因此对等染料不能同时使用。比如下图中 FITC 和 Alexa Fluor 488 就是荧光对等染料。

激发器	可激发荧光染料				
530/30	FITC	Alexa Fluor 488	eFluor488	BB515	CFSE
575/30	PE				
620/20	PI	ECD			
710/50	PerCP	PerCP-Cy5.5	PE-Cy5	PE-Cy7	7-AAD
780/60	PE-Cy7	APC-H7			
660/20	APC	Cy3	Cy5	Alexa Fluor 647	
710/50	Cy5.5	Alexa Fluor 700			
780/60	APC-Cy7	APC-H7			
450/50	BV421	BG Violet450	eVolve450	V450	
510/50	BV510	eVolve506	V500		
610/20	BV 605	eVolve605			

### 2. 根据抗原表达强弱合理分配荧光素

明确检测指标的表达情况，可将其分为三个层次：

第一层次抗原：这一类抗原通常表达稳定且大多呈高表达状态。如果该类抗原为高表达的话，可以将其与荧光强度较低的荧光素抗体相结合，如 Alexa Fluor 700, Brilliant Violet 570TM, Brilliant Violet 785 TM 或 APC-Cy7。

第二层次抗原：这类抗原对于进一步表型鉴定至关重要，但是在平行实验中表达量也会有所变化。该类抗原表达水平多变，通常适合与中度荧光强度的荧光素抗体结合，如 Brilliant Violet 510TM, Brilliant Violet 650TM, FITC 或 PerCP-Cy5.5。

第三层次抗原：这类抗原有可能在不同样本中表达差异很大甚至表达量未知。通常针对这类抗原市面上只有纯化抗体，且其搭配的荧光素类型也较少。对于这类抗原的检测要尽量选择荧光素强度最强的荧光素抗体，如 Brilliant Violet 421TM, PE, APC 或 PE-Cy7。

### 3. 选择光谱重叠小的荧光素

由于荧光素的宽发射谱的特点，荧光通道间有光谱重叠现象，因此选择试剂组合时要将光谱叠加可能性减到最低。多色流式实验的时候需要通过补偿调节消除光谱重叠的影响。比如 FITC 和 PE, FITC 的发射谱是 530/30, PE 的发射谱是 585/42, 部分发生重叠。如在进行四色分析，经常会将 PE-Cy5 标记的抗体与 APC 标记的抗体搭配使用，此搭配需较大幅度地调节两者的颜色补偿。可选用 PE-Cy5.5 来替代 PE-Cy5, 颜色补偿只需 1% 左右。因为 Cy5 的激发波长与 APC 的激发波长相近，所以 PE-Cy5 荧光素中的 Cy5, 也会被激发 APC 的第二个激光器（氦氖激光器）所激发，导致 PE-Cy5 与 APC 的颜色补偿很难调。相反，PE-Cy5.5 中的 Cy5.5 激发波长为 675nm, 不能被激发 APC 的第二个激光器所激发，也就不存在 Cy5.5 对 APC 的干扰，颜色补偿也就很小。因此，可能需要牺牲个别的荧光的亮度来避免荧光渗漏以及敏感度丧失。所以尽量选择光谱重叠小的荧光素，如 FITC/PE-Cy7; 选择不同激光激发的荧光素，如 FITC/APC, PE/APC。

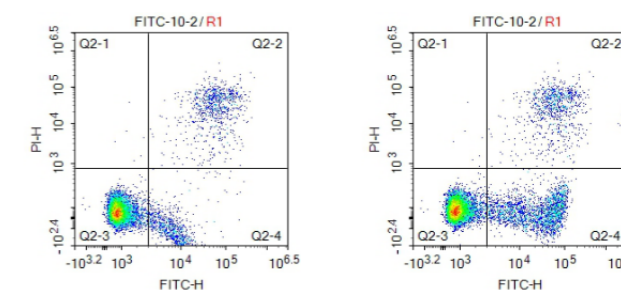
### 4. 尽量避免偶联染料使用带来的假阳性

偶联荧光染料是指两种荧光素联接在一起进行荧光共振能量转移。供方荧光素如 PE, APC 或 Brilliant Violet 421TM 被激光激发，然后通过共振将能量转移给受体荧光素，如 PE-Cy7 中的 Cy7。若使用偶联的荧光素，务必要在短时间内尽快完成实验，曝光时间越长，荧光素就越不稳定。

## 五、常见问题及解决方案

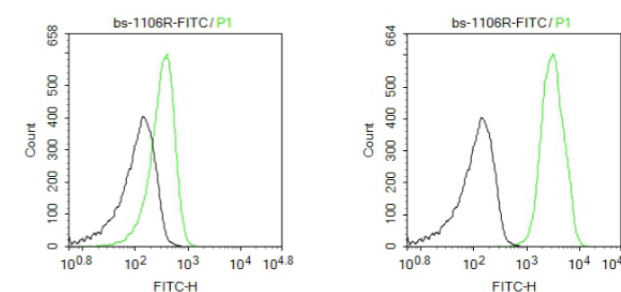
### 无荧光信号 / 荧光强度弱：

1、信号补偿不正确，调节通道和补偿设置至采集图形内部。



补偿过度

正确补偿

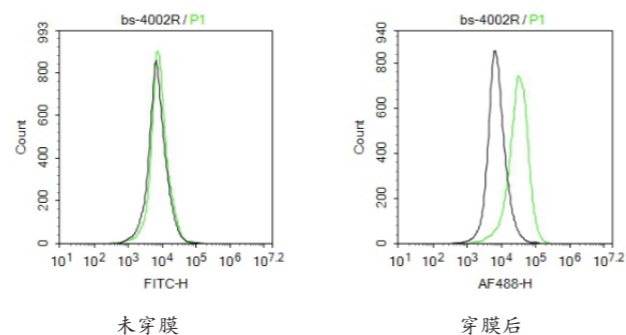


荧光淬灭

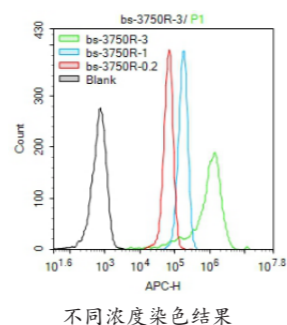
重新标记

2、荧光分子淬灭，更换新抗体或重新标记。

3、未到达目标抗原反应位置，确定目标蛋白是否在细胞内（需固定与穿膜处理）。



4、一抗或二抗浓度过低，调整一抗二抗浓度。



### 其他常见问题

出现的问题	可能的原因	解决办法
荧光强度高	洗涤不充分，大分子荧光素困在细胞内	确保充分洗涤，在洗涤缓冲液中加入 BSA 或者吐温 20
	封闭不足	提高抗体封闭液浓度
	抗体浓度过高	减少样本中抗体加入量
背景高 / 阳性细胞百分比高	增益设置过高或补偿过低	使用阳性对照再次设置流式细胞仪，用补偿减少小颗粒背景并减少增益以降低信号
	同型对照与细胞中某些蛋白存在交叉反应	使用空细胞做阴性对照或更换同型对照
	抗体过量	降低抗体浓度
观察到一个细胞以上细胞群	不止一类细胞表达目的蛋白	确认样品中目的蛋白在所有细胞类型的预期表达水平
	出现双峰，细胞状态改变	染色及上机前确保为单细胞悬液，吸管吹打或者 200 目筛网过滤

### 联系我们

公司名称：北京博奥森生物技术有限公司

英文名称：BEIJING BIOSYNTHESIS BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

客服热线：400-901-9800 | +86 (10) 56495219 | +86 (10) 56495221 | +86 (10) 50842818

传真号码：010-58129612

产品订购：sales@bioss.com.cn 400-901-9800-8106

技术支持：support@bioss.com.cn 400-901-9800-8206

售后服务：400-901-9800-8108

服务时间：早上 8:00-11:45 下午 13:00-17:00

综合邮箱：bioss@bioss.com.cn 商务合作 OEM 定制服务 区域代理销售 人才诚聘

邮政编码：101102

联系地址：北京市通州区马驹桥镇景盛南四街联东 U 谷西区 2 号院 67 号楼



Inspiring Scientific Discovery