

实验技术&相关产品 百问百答



——博士德出品——

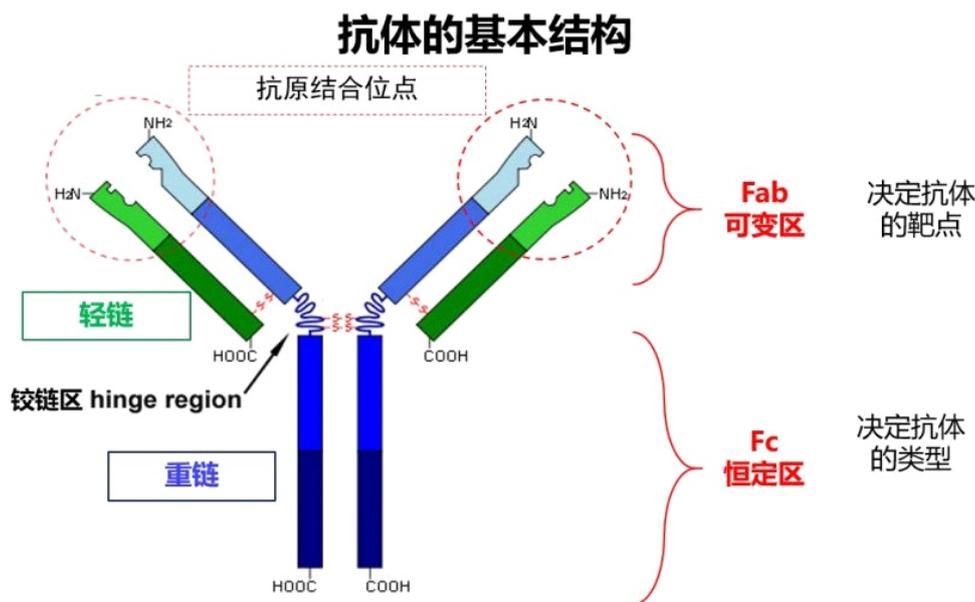
目录 Contents

抗体与抗原 Antibodies and antigens	01
免疫印迹 Western blotting	03
免疫组织细胞化学/荧光 Immunohistochemistry/fluorescence	11
酶联免疫吸附 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	16
细胞培养 Cell culture	21
细胞凋亡 Apoptosis	26
原位杂交技术 In situ hybridization (ISH)	28
流式细胞术 Flow cytometry (FCM)	30

第一章 抗体与抗原

1. 什么是抗体，简述其大致结构？

答：抗体是机体在抗原物质刺激下，由B细胞分化成的浆细胞所产生的、能与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白。抗体是由两条重链（分子量较大，也称H链）和2条轻链（分子量较小，也称L链）通过二硫键和非共价键联结组成的“Y”字型结构。其靠近N端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区（也是与抗原结合的部位），靠近C端氨基酸序列相对稳定的区域称为恒定区。



2. 什么是抗原抗体的反应？

答：抗原抗体反应是指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合的反应，其是免疫检测类实验（比如WB、IHC、ELISA等）的基础。该反应具有特异性、比例性和可逆性三种特点。

3. 怎么给客户挑选合适的一抗？

答：首先需要跟客户明确靶点名称、样本种属、实验类型三个基本信息，在这三个基本条件都满足的情况下，再根据客户的喜好（单或多抗）和实验类型，并且参考官网检测图片和文献数量灵活的推荐最合适的货号。

4. 在选择一抗的种属来源时需要注意什么？

答：一抗的宿主应尽可能的与样本种属不同，以避免配套二抗与样本中的内源性免疫球蛋白发生交叉和反应，导致非特异染色。比如样本为兔，那一抗尽量不要选择兔来源的多抗或单抗。不过对于WB的细胞裂解液样本，因其中并不含有内源性免疫球蛋白，则一抗的来源种属要求可以不用这么严格。

5. 二抗如何选择？

- ① 一抗的物种来源，如果一抗来自小鼠，那么二抗应该是抗小鼠的抗体。
- ② 一抗的类别和亚类：二抗需要与一抗的类别或亚类相匹配。例如，如果一抗是多克隆抗体，通常是IgG类免疫球蛋白，那么二抗应该是抗IgG抗体。对于单克隆抗体，如果一抗是小鼠IgM，那么二抗应该是抗小鼠IgM或抗小鼠IgG。
- ③ 实验类型：不同类型的实验可能需要不同类型的二抗。例如，ELISA或WB实验常用酶联二抗，而流式细胞术或免疫荧光实验则可能需要与荧光蛋白或染料偶联的二抗。

6. 单抗和多抗各有什么特点?

类别	多克隆抗体	单克隆抗体
识别表位	多个	单一
稳定性	好	易受外界因素影响
敏感性	强	较强
交叉反应	可能有	较少
制备难度	简单	较难
制备周期	短	长
价格	相对较低	较高

由上图可知多克隆抗体敏感性高,更容易识别出与免疫原同源性的蛋白质,价格相对低廉,但可能产生非特异性染色。而单抗的优势在于其只识别一个表位,特异性好,但同时又会限制其敏感性。所以当用单抗结果不理想的情况下可以换用多抗,可能会有不错的效果。单抗和多抗各有特点,要根据自己的实验需求选择合适的抗体类型。

7. 一抗的最佳稀释比例如何确定?

答:因个体差异、处理方式不同等因素的影响,导致使用相同的抗体做不同的样本会出现最佳稀释比例不一样的情况。针对不同类型的实验,厂家都会提供一个稀释比例的范围,建议先做一个预实验,挑选**2-3**个比较典型的样本做低、中、高**3**个浓度的梯度实验,根据最终的结果来选择最佳的稀释比例。

8. 一抗如何保存,是否需要分装?

- ①应严格按照厂家说明书的要求保存抗体。大部分厂家的一抗都是要求-20度保存(对绝大多数抗体来说,-20度的温度完全足够,没有任何证据显示-80度有更多的好处)。不过注意有些厂家的部分一抗是需要4度保存的。
- ②收到一抗之后,建议分装。每管分装的量不少于10 μ l。这样可以最大程度降低冻融对抗体活性的损害,以及吸取过程中的污染风险。

第二章 免疫印迹

1. 做组织样品的Western Blot的时候, 怎样处理样品?

答: 必须进行研磨、匀浆、超声处理, 蛋白质溶解度会更好, 离心要充分, 需要加入蛋白酶抑制剂, 研究磷酸化蛋白时还需同时加入磷酸酶抑制剂。

2. 贴壁细胞样本做WB实验, 在收集细胞时可以用胰酶消化吗?

答: 贴壁细胞做WB实验建议用细胞刮直接刮取, 不建议用胰酶消化, 特别是要检测的目的蛋白为膜蛋白。主要是因为胰酶会降解蛋白。

3. 博士德的几款RIPA裂解液(弱、中、强)如何区分?

产品编号	AR0102	AR0105	AR0108
产品名称	RIPA裂解液(强)	RIPA裂解液(中)	RIPA裂解液(弱)
有效裂解成分	1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS	1% NP-40, 0.25% deoxycholate
裂解强度	强	中	温和
对膜蛋白的提取	很好	较好	一般
对胞浆蛋白的提取	很好	很好	很好
对核蛋白的提取	很好	较好	较好
胞浆磷酸化蛋白提取	很好	很好	很好
细胞核转录因子提取	很好	很好	很好
含蛋白酶抑制剂	否	否	否
含磷酸酯酶抑制剂	否	否	否
主要用途	WB, IP	WB, IP	WB, IP, co-IP

4. 提取组织或细胞蛋白时, 裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物, 该如何处理?

答: 裂解产物中经常会出现一小团透明胶状物, 属正常现象。该透明胶状物为含有基因组DNA等的复合物。在不检测和基因组DNA结合特别紧密的蛋白的情况下, 可以直接离心取上清用于后续实验; 如果需要检测和基因组结合特别紧密的蛋白, 则可以通过超声处理打碎打散该透明胶状物, 随后离心取上清用于后续实验。如果检测一些常见的转录因子, 例如NFKB、p53等时, 通常不必进行超声处理, 就可以检测到这些转录因子。

5. 磷酸化抗体的检测样本制备时是否一定要加磷酸酶抑制剂?

答: 用磷酸化的抗体检测磷酸化蛋白时, 在样本制备时, 除了一定要在加入蛋白酶抑制剂外, 还需加入磷酸酶抑制剂, 防止磷酸酶将磷酸化蛋白去磷酸化。

6. 酶抑制剂是用单组分的好还是广谱型的好?

答: 广谱型更好, 抑制剂成分更多, 对酶的覆盖更广泛。

7. BCA蛋白定量的作用是什么? 是否一定要做?

答: 主要是测提取的总蛋白浓度, 通常都要做, 特别是做半定量, 判断趋势的时候。

8. WB常规变性上样缓冲液 (loading buffer) 中有哪些组分, 各组分的作用是什么?

- ① loading buffer 中的甘油可以增加样品的密度, 确保样品向下移动到点样孔中, 防止样品飘出点样孔。
- ② loading buffer 中的溴酚蓝在视觉上指示样品在凝胶中的位置 (示踪染料), 以便适时终止电泳。

③loading buffer 中的 Tris 可以将缓冲体系的 pH 保持在 6.8 左右,防止在低温保存的过程中蛋白质肽键断裂,保证了蛋白质的稳定性;同时,Tris 可以抑制酶促反应并防止蛋白酶降解蛋白质。

④loading buffer 中的 SDS 破坏保持蛋白质二级和三级结构的氢键,可以覆盖蛋白质本身的电荷,赋予蛋白质净负电荷,同时与硫醇试剂一起使蛋白质线性化,在电泳时蛋白质的分离只与蛋白质分子大小有关而与形状等无关。

⑤loading buffer 中的硫醇剂,如 β -巯基乙醇或二硫苏糖醇(DTT),用于破坏含硫氨基酸(如半胱氨酸)之间产生的二硫键。此外,由于硫醇剂具有抗氧化特性,因此能够防止半胱氨酸的氧化。因此,硫醇试剂与 SDS 协同作用,使蛋白质线性化。

9. 博士德上样缓冲液分为1X、2X和5X三种,为什么要这样分?如何选择?

答:主要是不同样本提取的总蛋白浓度不同,为了保证上样时总蛋白和上样体积一致,就需要用不同浓度的上样缓冲液来调平总蛋白的浓度(比如统一为3mg/ml,上样体积10 μ l)。样本总蛋白浓度低的就用5X上样缓冲液,总蛋白浓度高的就用1X的上样缓冲液。

10. 非还原 SDS-PAGE 和还原 SDS-PAGE 有什么区别?

答:SDS-PAGE 有非还原 SDS-PAGE 和还原 SDS-PAGE 之分,均是变性条件下的电泳。非还原与还原的区别是在样品处理时是否加入还原剂(如 DTT 等)。

还原 SDS-PAGE:即是我们常规的所做的 SDS-PAGE,在上样缓冲液中加入还原剂, β -巯基乙醇或 DTT 等,打开二硫键,SDS 打开非共价键,所以使蛋白还原变性为椭圆形单体,高温加热后变性成线性蛋白。

非还原 SDS-PAGE:是指在上样缓冲液中样品中只加入 SDS,而不加 DTT 等还原剂,此时二硫键不能断裂,所以蛋白没有完全去折叠。保持一定的4级结构。非还原 SDS 处理因为二硫键的连接,可能会有几条多肽链连在一起,所以最后的分子量要比预期的大,可能是2倍或3倍。

11. 使用凝胶试剂盒,配置的凝胶不凝或凝的很慢,该怎么办?

答:通常10-30分钟内胶会凝固,具体的凝固时间和温度及光照有关,说明书中10%过硫酸铵和 TEMED 的推荐用量是室温为25 $^{\circ}$ C时的推荐用量。当室温低于 25 $^{\circ}$ C或胶不凝固时,可以适当同时加大10%过硫酸铵和 TEMED 的用量。

12. 博士德的预制胶必须用其自带的电泳液吗,是否可以用常规电泳液代替?

答:必须使用自带电泳液,常规的电泳液代替不了。

13. 博士德预制胶自带的电泳液只有4L(4包,1L/包),而且不能单卖,那不够怎么处理?

答:一般可以重复使用1-3次。

14. 针对不同的蛋白,电泳时的电压和电流如何选择?如何判断电泳终止时间?

答:一般都是选择80v和120v跑,没有严格的区分,溴酚蓝到底部了基本就可以停止点用了。

15. 如何选择分离胶的浓度?

SDS-PAGE分离胶浓度	最佳分离范围
6%	50-150KD
8%	30-90KD
10%	20-80KD
12%	12-60KD
15%	10-40KD

16. 针对不同的蛋白, 转膜的电压和电流如何选择?如何设置转膜时间?

答:我们的转膜条件是**150mA**恒流, 针对**1mm**厚的胶。

SDS-PAGE分离胶浓度	转膜时间 (min)
6%	80-90
8%	70-80
10%	60-70
12%	40-50
15%	30-40

17. 转膜是用NC膜还是PVDF膜?孔径如何选择?

答:两者都可以使用, 20kd以下使用0.22 μ m的, 20kd以上使用0.45 μ m的。

18. 转膜后的脱脂奶粉封闭液是5%的TBST脱脂奶粉, 其中TBST最后那个T是Tween吗, 浓度多大?

答:TBST缓冲液, 即TBS with Tween-20, 向TBS缓冲液中加入终浓度为0.05%的Tween-20即可得到TBST。Tween-20是一种非离子型去污剂, 可复性抗原, 也可增加缓冲液的洗脱能力。

19. 针对分子量很小和很大的蛋白, 电泳和转膜这两个步骤有什么建议?

答:分子量很大的蛋白使用Tris-Acetate凝胶, 分子量很小的蛋白使用Tricine胶, 转膜主要是调整转膜时间, 分子量越大, 转膜时间越长, 反之亦然。

20. 封闭液有哪几种, 如何选择?

答:封闭液分为脱脂奶粉(优点:价格便宜, 但由于成分相对复杂, 适用范围狭窄), BSA(优点:成分单一, 适用于大多数情况。封闭效果比较理想, 价格比较贵), 和无蛋白封闭液(不含动物蛋白, 不存在封闭液与蛋白样品之间的相互作用, 特别适合磷酸化蛋白检测, 提供比传统封闭缓冲液更好的特定信号和更少的背景噪声)。

21. 博士德无蛋白封闭液有什么优点?

- ①快速高效:5~15min快速完成封闭, 只结合封闭转印膜而不结合蛋白, 因此不会屏蔽样品蛋白的抗体识别位点, 与传统的脱脂奶粉和BSA封闭相比信噪比更高;
- ②方便快捷:无需稀释, 即取即用;
- ③性能可靠:无蛋白配方, 与抗体无交叉反应;
- ④应用范围广:无磷酸化蛋白, 无生物素, 尤其适合磷酸化特异抗体及生物素检测系统;
- ⑤节省抗体:使用本封闭剂后, 所需的最适抗体浓度低于常规使用浓度, 可大大节省抗体使用量。

22. 蛋白转移不到膜上, 但胶上有, 同时 Marker转上去了, 为什么?

- ①样品浓度过低, 因此需要提高样品上样量。
- ②转膜时间太短, 需增加转膜时间。

23. 要验证某个细胞上有无该蛋白的存在, 需要做免疫组化和 western blot 试验吗?做这两个试验时的一抗和二抗可以共用吗?

- ①免疫组化和WB都可以用来定性分析, 判断细胞上是否有无该蛋白;但免疫组化主要还是用来进行定位, 看目的蛋白处于哪个位置, 但是不能精确定量, 而且有时会有假阳性, 不易与背景区分;Western blot可以特异性检测某个蛋白质分子, 进行半定量(通过计算条带灰度值来做平行比较), 但是不能定位。
- ②两种实验的一抗很多时候是可以通用的, 但也有时候不能通用, 具体情况需看抗体的产品说明书, 一般都会介绍这个抗体具体适用于做什么实验。二种实验的二抗一般不可以(不建议)通用, 而是用各自专用二抗,

效果才会更好。

24. 做 Western Blot时, 提取蛋白后冻存(未加蛋白酶抑制剂), 用的博士德的一抗, 开始还有点痕迹, 现在越来越差, 上样量已加到120 μ g, 换了个一抗仍不行。是什么原因? 蛋白酶抑制剂单加PMSF行吗?

①样品不能反复冻融。

②样品未加蛋白酶抑制剂。

建议检查 Western Blot 过程, 提高一抗浓度。对于加蛋白酶抑制剂来说, 一般加PMSF就可以了, 同时采用新鲜制备的样品最好。

25. 我的样品的蛋白含量很低, 每微升不到1 μ g, 但是在转膜时经常会发现只有一部分蛋白转到了膜上, 就是在转膜后染胶发现有的孔所有的蛋白条带都在, 只是颜色变淡了, 有什么办法可以解决?

答: 可以浓缩蛋白后加大上样量, 转膜时可以用减少转膜电流延长转膜时间, 加 20% 甲醇。

26. 不能很好地将大分子量蛋白转移到膜上, 转移效率低怎么样解决?

答: 转移缓冲液中加入10%甲醇(是指终浓度), 可增加蛋白质和NC膜的结合能力, 甲醇可以防止凝胶变形, 可延长转移时间; 转移缓冲液加入终浓度0.1% SDS, 也是为了增加转移效率; 用优质的转移膜, 使用低浓度胶, 如低至6%。提高转移电压/电流, 增加转移时间。

27. 如果上样量超载, 要用什么方法来增加上样量?

答: 可以浓缩样品, 也可以根据你的目标分子量透析掉一部分小分子蛋白。一般地, 超载 30% 是不会有问题的。如果已经超了不少了, 而且小分子量的也要, 可以考虑加大胶的厚度, 可以试试1.5mm 的。用5倍的上样缓冲液来稀释变性。

28. 在做 Western Blot 时, PVDF 膜用甲醇浸泡的目的?

答: PVDF膜用甲醇泡的目的是为了活化 PVDF 膜上面的正电基团, 使它更容易跟带负电的蛋白质结合。

29. 转膜的方法该如何选择(半干还是湿转)

答: 半干转操作步骤与湿转基本类似, 区别在于转移电压和时间也有所不同。半干转移系统中, 滤纸和膜切成与凝胶相同大小很重要, 这样电流必须通过凝胶。否则, 在凝胶边缘处滤纸重叠将导致电流短路。两种转移系统中都必须注意防止在滤纸、凝胶和膜之间的任何地方存在气泡, 气泡阻碍转移并在印迹膜上产生“秃斑”(即非转移区)。小分子量的蛋白半干转效果比较好, 大分子量(100KD 以上) 建议湿转。

30. 转膜后经丽春红染色的条带, 为什么大蛋白质的一端的转膜好象不是很好, 为什么?

答: 这是正常的, 大分子的蛋白转移的慢, 如延长转膜时间, 大分子一端就会好的多, 但是小分子的就有可能转过来了, 会变淡。

31. 如果是 6 \times 8cm 印迹膜, 要加多少一抗?

答: 一抗的稀释度可以参考说明书, 6 \times 8cm 印迹膜需要抗体工作液的体积一般为8-10ml。

32. 蛋白质的分子量跨度很大, 如要分离小21KD, 中至 66KD, 大至 150KD, 可以一次做好吗?

答: 这么广的分布不好转移, 一般建议: 21kd 和 66kd 可以一起转, 10% SDS-PAGE, 湿转 150mA, 50-60min; ; 150kd 用 8% SDS-PAGE, 150mA 90min; 根据实验室转膜结果适当调整。

33. 是否Western Blot 实验半定量一定要加内参?

答: 进行内参的检测, 可以校正蛋白质定量、上样过程中存在的误差, 保证实验结果的准确性; 此外, 使用内参可以作为空白对照, 检测蛋白转膜情况是否完全、整个 Western Blotting 显色发光体系是否正常。目前, 在国内外发表的文章中, Western Blotting 实验结果必须进行内参校正已成为一种惯例。

34. 做半定量Western Blot, 内参 β -actin, GAPDH 哪个好?

答:选择内参抗体时,应该考虑目的蛋白分子量的大小。通常应该保证目的蛋白与内参蛋白分子量相差 5KD 以上。比如检测目的蛋白分子量为 45KD,此时不适宜选择 β -actin(42KD)作为内参,可以考虑选择 GAPDH(36KD)作为内参。也可以参考文献。

35. Wb实验中内参抗体有哪些作用?

- ①内参抗体在各组织和细胞中的表达相对恒定,在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。
- ②检测整个 WB 流程是否正常。
- ③检测基因表达产物是否正确。
- ④比较表达产物微量的相对变化。
- ⑤评价各个上样孔内蛋白的总量是否基本一致。

36. Wb实验中,如何选择内参?

- ①样本种属来源:首先考虑实验样本来源于何物种。
- ②目的蛋白分子量:选择内参抗体时,应该考虑目的蛋白分子量的大小。通常应该保证目的蛋白与内参蛋白分子量相差 5 kDa 以上但勿差距太大。
- ③目的蛋白表达部位:针对一般蛋白质检测,GAPDH、 β -actin或 β -tubulin可以满足要求,而如果需要检测亚细胞器蛋白时,适宜选择对应亚细胞器内参更能体现内部参照的准确性。比如常用的核内参抗体有 Lamin A、Lamin B、TBP、YY1、Histone H3。而对于膜蛋白检测,常用的内参抗体为 ATP1A1。对于线粒体蛋白的检测,常用VDAC1和COX IV作为内参抗体。
- ④实验环境的影响:以上原则仅针对通常情况,需要特别注意的是内参的选择还须考虑实际实验环境状况,比如某些细胞或组织由于缺氧、糖尿病等因素会导致 GAPDH 的表达量增高,此种状况下 GAPDH 不适合做内参;在涉及细胞增殖相关实验中,c-Jun 由于自身表达变化就不适合做内参;在凋亡实验中,TBP、Lamin B 等不适合作为核内参。因此在设计实验方案时应考虑这些因素的影响并查询相关文献,如果在实验过程中出现内参表达出现异常状况应及时分析原因并调整内参选择。

样品定位	内参	内参分子量(kDa)
全细胞或胞浆蛋白	β -肌动蛋白(β -actin)	43
	α -攄肌动蛋白(α -actin)	43
	GAPDH	35
	β -微管蛋白(β -tubulin)	55
	α -微管蛋白(α -tubulin)	55
线粒体	COX IV	17
	VDAC1/Porin	31
	HSP60	60
细胞核蛋白	核纤层蛋白B1(lamin B1)	66
	PCNA	29
	Histone H3	17
	TBP	38-45
细胞膜蛋白	alpha 1 Sodium Potassium ATPase antibody	100-112
	Cadherin	130-150
血清	转铁蛋白	77

37. 怎样才能把胶跑的非常漂亮,泳道都能很直,上样的量和灌胶是否很重要,电压有什么要求?

答:影响跑胶跑的质量,有以下几个因素:

- ①电压,小的电压会使胶的分子筛效应得到充分发挥。电压越小,条带越漂亮,浓缩胶 80v,分离胶 100v 就能跑得很好。
- ②胶的均匀度,胶越均匀,条带越窄,分离越均匀。倒胶之前,一定要充分混匀,玻璃板一定要干净,双蒸水隔离时,一定要比较轻地加上去,避免稀释上层的分离胶。

38. 我用胶片在显影液中显影1分钟和5分钟后,底片漆黑一片,是什么原因呢?

- ①可能是胶片被曝光了,可以在完全黑暗的情况下操作.看是否有改善。
- ②显影时间过长。

39. 显色方法是采用 DAB 好还是 ECL 好?

答: DAB有毒,但是比较直观,直接在膜上就可以看到结果,但灵敏度较低;ECL结果容易控制,灵敏度高,可以检测pg级抗原,建议用 ECL。

40. 为什么我的细胞提取液中没有目标蛋白?

- ①细胞中不表达这种蛋白质,换一种细胞。
- ②细胞中的蛋白质被降解掉了,你必需加入蛋白酶抑制剂(如PMSF),抑制蛋白酶活性。
- ③抗体不能识别目标蛋白,多看看说明,看是否有问题。

41. 检测出的分子量与理论分子量有差异是什么原因造成的,怎么解决?

- ①翻译后修饰,比如磷酸化,糖基化等,这些变化会增加蛋白的大小。
- ②蛋白变性后复性引起的二聚体,三聚体,四聚体等形式,分子量可能是单体形式的二倍,三倍,四倍等。
- ③蛋白活化后剪切,比如很多蛋白在合成的时候是作为前体蛋白合成的,然后剪切形成活性蛋白片段形式,实际分子量变小。
- ④蛋白的电泳表观分子量与理论分子量有差别,例如p53蛋白,其表观分子量是53kDa(这也是该蛋白名字的由来),但是根据氨基酸序列计算得到的分子量却是43kDa。
- ⑤许多蛋白质有多个亚型,分子量都不同。
- ⑥可能是胶变形引起的,比对Marker出现偏差。
- ⑦蛋白质的降解。

42. Western blot结果中背景较高,是什么原因造成的,怎么解决?

- ①膜封闭不够:延长封闭的时间;选择更加适合的封闭液。
- ②一抗稀释度不适宜:对抗体进行梯度测试,选择最适宜的抗体稀释度,降低抗体浓度。
- ③一抗孵育的温度偏高:建议4℃结合过夜。
- ④检测时曝光时间过长:减少曝光时间。
- ⑤洗膜不充分:操作中将洗膜时间延长或多洗几次。

43. Western blot结果中杂带较多,是什么原因造成的,怎么解决?

- ①目的蛋白有多个修饰位点(磷酸化位点、糖基化位点、乙酰化位点等),本身可以呈现多条带:查阅文献或进行生物信息学分析,获得蛋白序列的修饰位点信息,通过去修饰确定蛋白实际大小。

- ②目的蛋白有其它剪切体:查阅文献或生物信息学分析可能性。
- ③样本处理过程中目的蛋白发生降解:加入蛋白酶抑制剂;样本处理时在冰上操作。
- ④上样量过高,太敏感:适当减少上样量。
- ⑤一抗或者二抗浓度偏高:降低抗体浓度。

44. Western blot结果中无信号或显示信号弱,是什么原因造成的,怎么解决?

- ①检测样本不表达目的蛋白。

答:选择表达量高的细胞作为阳性对照,用于确定检测样本是否为阴性。可通过<https://www.proteinatlas.org/>,查询该细胞或组织中是否有目的蛋白表达,如果没有,建议更换指标。

- ②检测样本低表达目的蛋白。

答:提高上样量,裂解液中注意加入蛋白酶抑制剂。浓缩使信号最大化,测核蛋白要用核裂解物,检测膜蛋白用膜裂解液。诱导增加靶标蛋白表达。很多靶标蛋白需要药物诱导或其它特殊处理,其含量才能达到WB检测范围。

- ③靶标蛋白是分泌型蛋白,检测时分泌到细胞外,若检测的样本为全细胞裂解液,会出现无信号或信号弱现象。

答:使用 Brefeldin A (BFA) 抑制蛋白分泌,提取全细胞裂解液。如果全细胞裂解液中依然检测不到靶蛋白,建议提取细胞培养上清中的蛋白。

- ④裂解不充分,导致无信号或信号弱现象。

答:建议使用超声破碎。超声破碎有利于蛋白释放,建议所有样本制备时,加入裂解液后都使用超声破碎裂解样本,特别是核蛋白。

- ⑤转移不完全或过转移。

答:可以用丽春红染膜并结合染胶(考马斯亮蓝)后确定条带是否转至膜上或转移过头;适当调整转膜的时间和电流。另外还需要注意以下2点:

- a. PVDF 膜使用前,需预先浸在甲醇中,然后浸到转移缓冲液中。
- b. 小蛋白和大蛋白需注意PVDF膜孔径、转膜试剂和转膜时间等是否合适封闭

- ⑥封闭剂与一抗或二抗有交叉反应,导致无信号或信号弱现象。

答: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、血清等)。

- ⑦抗体不能识别测试该种属的相关蛋白。

答:购买抗体前应当认真阅读抗体说明书,确定其是否能够交叉识别测试种属的对应蛋白。

- ⑧没有足够的一抗或二抗结合目标蛋白,导致无信号或信号弱现象。

答:使用高浓度抗体,延长 4℃ 孵育时间(如过夜)。

- ⑨二抗与一抗不匹配。

答:选择针对一抗来源的种属的抗体。

- ⑩二抗受叠氮钠抑制,导致无信号或信号弱现象。

答:避免叠氮钠和 HRP 标记抗体一起使用

- ⑪洗膜过度,导致无信号或信号弱现象。

答:勿过度洗膜。

⑫检测试剂盒过期和底物失活,导致无信号或信号弱现象。

答:使用新鲜的底物。

45. Wb实验中的蛋白质条带强度不一致是什么原因造成的,怎么解决?

答:蛋白质条带强度不一致可能是由于抗体和蛋白质结合效率不一致、蛋白质浓度不一致等原因造成的。要解决这个问题,可以调整抗体的浓度和反应的时间,优化蛋白质的提取和浓度测定方法。

46. Wb条带出现歪斜或漂移是什么原因造成的,怎么解决?

答:如果可以排除电泳时条带已经歪斜,可能的原因是:

- ①“三明治”结构因为电转移装置长期使用,海绵垫变薄或操作时没有压紧,在胶和膜之间可能存在潜在的间隙,导致电转移时蛋白从胶和膜之间的空隙中流走,或者在电转移过程中膜或凝胶歪斜。
- ②电转移时转移液没有完全浸没凝胶和膜。

47. Western Blot 中抗体的可以重复应用吗?

答:如抗体稀释液中加入有保护剂(AR1017),可反复使用至少3次,4度保存,避免反复冻融。

第三章 免疫组织细胞化学/荧光

1. 免疫组化和免疫荧光实验样本固定推荐哪种固定液？

答：固定液有很多种，其中4%多聚甲醛和福尔马林（10%甲醛，医院较多）通用性最好，绝大部分组织或细胞用这两种固定液都可以得到比较好的结果。另外用的比较多的还有Bouin液和Carnoy液。其中Bouin液穿透力强，组织收缩小，适合外膜致密的样本，比如睾丸。Carnoy液穿透力也比较强，尤其适于染色体的固定，也适用于糖原及尼氏小体的固定。

2. 固定液的用量和最佳的固定时间？

①为了样本能充分固定，固定液的用量是组织体积的20倍左右，可多但不建议少。如若受容器的容积限制，可以先用10倍左右体积固定液浸泡5-6小时后换液一次。

②组织固定的最佳时间是24-72小时，如若时间难以安排建议也不要超过一周，固定时间太久可能会导致非特异着色，而且是固定时间越久这种风险越高。固定时间超过2个月的样本建议不要使用。如若是分批收集样本，每次取样间隔时间较长，建议在最佳固定时间就做包埋或者将样本用PBS清洗后转移到70%乙醇保存（乙醇也是一种固定液，而且有脱水效果，可较长时间保存已经固定了的样本）。对于细胞样本，使用4度预冷的4%多聚甲醛固定15-20分钟即可。

3. 石蜡片和冰冻片的优缺点，如何选择？

①石蜡片组织结构优于冰冻片，可长期保存且保存条件简单（避光，常温或4度可保存3年以上），方便随时重复或增加实验。缺点是包埋时间较长，且包埋过程组织会经历高温和化学试剂的浸泡，会导致有些不稳定的蛋白被破坏，出现阴性结果。

②冰冻片优点是可以快速包埋切片，适合快检，而且组织没有经历高温和化学试剂的浸泡，且一直处于低温状态，蛋白保存完善度优于石蜡片。缺点是组织结构较差，不能长期保存（不建议超过3个月）且必须低温保存。

③对于大部分蛋白来说，石蜡片的制作对其影响不大，出于采图效果（组织结构好，图片效果也会更好）和实验的可重复性考虑，可以优先选择石蜡片。对于组织内含量很少或者结构不稳定的蛋白可以优先选择冰冻片。建议是先做石蜡片的预实验，如果结果不好再考虑冰冻片。

4. 免疫荧光冰冻片的效果要比石蜡片好吗？

答：并不是这样，对于大部分蛋白，石蜡片和冰冻片并没有太大差异，出于样本的长期保存和图片效果考虑，反倒石蜡片更有优势。

5. 组化或免疫荧光实验对载玻片有要求吗？

答：有要求，必须使用做过防脱处理的专业玻片，比如多聚赖氨酸或者APES浸泡处理过的防脱玻片，可以有效降低组织脱片的风险。另外玻片的厚度（1mm左右）和透明度（超白玻璃）也需要达到实验要求。

6. 石蜡片实验前脱蜡至水的目的是什么？

答：石蜡片的组织上有一层石蜡，石蜡是疏水的，会阻碍后面实验的水试剂与组织接触。为了实验的顺利进行，需要先用二甲苯或者环保型脱蜡剂洗去石蜡，然后用乙醇（可以与脱蜡剂和水任意比例互溶）洗掉残留的脱蜡剂，之后经过水洗掉乙醇，给后期的实验提供水化环境方便试剂孵育。

7. 3%H₂O₂溶液灭活内源性过氧化物酶是否有必要？

答：对于过氧化物酶（HRP）体系的组化实验（比如DAB显色的组化实验）以及基于TSA信号放大原理的多色荧光实验（mIHC），这个步骤很有必要，可以很明显的减少非特异着色。而对于其他显色系统，比如碱性磷酸

酶系统(AP),以及传统的免疫荧光实验,这个步骤是没有必要做的。

小技巧:如何判断组织片中内源性过氧化物酶含量过高?

在使用 3% H_2O_2 溶液灭活时,如果组织片中出现细小且密集的气泡,通常预示组织片中过氧化物酶含量过高,这时用3% H_2O_2 溶液难以完全阻断,我们推荐用0.5%高碘酸溶液室温条件孵育10min,效果不错。

8. 抗原修复的方式如何选择?

①抗原修复的方式主要有两种:热修复和酶修复、其中热修复又分为高压热修复和微波热修复。不同的抗原都有各自最适宜的修复方式。

根据经验,对于大多数的抗原来说微波热修复都能得到很好的效果。它有双重作用,微波辐射可以使各物质分子作极性运动,促进形成的醛键断裂开。分子间运动所产生的瞬间热,当达到有效的温度后,就可导致甲醛固定后的蛋白的变性。该法的特点是:产热迅速,容易操作,也容易引起抗原修复液的沸腾。

②对于不适合做热修复的样本,比如细胞片,可以采用酶修复。比如使用胃蛋白酶室温孵育。

③修复液的选择:目前应用最多的修复液有枸橼酸盐修复液(PH6.0)和EDTA修复液(PH8.0和9.0)。经验证,绝大多数的抗体使用EDTA(PH8.0或9.0)修复液效果都要优于PH6.0的枸橼酸,尤其是核阳性的抗体。

④修复强度的选择:固定时间越长的标本,抗原表位越难打开,所需要的修复强度也就越强所以老旧标本与新鲜标本的修复条件一定是有所区别的,同等条件下一定要加长修复的时间或提高修复所使用的温度,才可能得到比较满意的结果。

9. 在实验中,特别是在修复后切片容易脱片,切片脱片的原因是什么?

①不是使用的防脱玻片或所用玻片防脱效果不好

②切片后没有及时烤片(冰冻片不需要烤片),导致贴片不牢

③修复强度多大,温度过高或时间过长

④有些组织贴片不牢,容易脱片,如骨头、皮肤组织等,应使用酶修复或烫片的方式修复。

10. 常用的封闭液有哪些,如何选择?

答:常用的封闭液有BSA和血清两种。BSA是一种惰性蛋白,便宜易得,是最常用的封闭液,大部分情况都可以得到较为满意的效果,不过BSA中可能有少量的抗体残留,会导致抗原/抗体之间的交叉反应,产生一些背景。而用与二抗同源的血清做封闭,除了可以封闭掉待检样本中与蛋白发生非特异性结合的物质(这一点与BSA功能相同),还可以封闭掉样本中可以与二抗结合的Fc受体,效果可能更好。免疫荧光实验推荐使用血清封闭。

11. 我的组织是肝组织,含有很多内源性的生物素,由于亲和素会与生物体内的内源性生物素反应,从而有非特异性着色,如何解决?

答:可以用内源性生物素封闭剂消除内源性的生物素的影响,或者不使用三步法组化试剂盒(SABC法或SP法),改用两步法(SV)检测系统。

12. 在什么情况下使用 TritonX-100?

答:在免疫组织化学(切片厚度 $>10\mu m$)和免疫细胞化学中一般用Triton X-100作为细胞通透剂,在膜上打孔。抗体及大分子结构的物质进入胞浆和胞核内,故在细胞免疫组化时尤为推荐使用,这样抗体就能顺利进入胞内与相应抗原结合。

13. 推荐的抗体孵育条件

- ①一抗:有4°C过夜、37°C1-2h这两种条件,其中4°C过夜效果最佳。
- ②二抗:一般37°C 30min或室温30min-1h,可以根据染色情况进行调整。

14. 如何确定合适的一抗稀释比例?

答:因同一个靶点的一抗会因样本情况以及厂家的不同而有很大的差异,建议先用2-3个典型样本做一个预实验,按照一抗说明书推荐的一抗稀释比例范围,设置高中低三个浓度梯度,最后根据实验结果挑选最佳稀释比例。

15. 二抗如何选择?

答:二抗需与一抗的种属、类别或亚类相匹配。多克隆抗体主要是兔来源IgG类免疫球蛋白,因此相应的二抗就是抗兔IgG抗体。如果你的一抗是小鼠IgG1,那么你可以选择抗小鼠IgG1的二抗,如果你不知道一抗是哪一类别或亚类,那么抗小鼠IgG是一个不错的选择,因为此种抗体可以识别大多数类型的IgG免疫球蛋白。另外二抗应尽量少选取兔子或老鼠来源的,因为这两个在亲缘关系上和人类非常接近,产生交叉反应的几率比较大。推荐选用来源于驴,山羊,绵羊等的二抗。

16. 博士德有哪些酶标记的二抗,他们的使用注意事项有哪些?

- ①博士德有过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP)两种酶标记的二抗
- ②防腐剂叠氮钠(NAN3)会严重影响二抗上的过氧化物酶活性,所以HRP二抗的防腐剂避免使用叠氮钠。
- ③碱性磷酸酶实验中避免使用磷酸盐缓冲液(比如PBS),以及EDTA等碱性磷酸酶抑制剂。

17. 免疫荧光二抗如何选择?

- ①根据一抗的来源选择二抗类型,比如一抗为小鼠单抗,那二抗应选抗小鼠,比如羊抗小鼠
- ②不同荧光素的激发光波长不一样,了解客户仪器的配置后,根据客户仪器情况选择合适的荧光素
- ③根据客户的需求选择相应颜色的荧光素,比如FITC与Dylight 488标记的为绿色荧光,Cy3、Dylight 594、TRITC红色。

18. 免疫组化实验的显色如何操作?

- ①显色液现配现用,配制超过30min的显色液应弃之不用。
- ②建议镜下控制显色时间,在阳性和背景之间选取一个平衡点(阳性清晰,背景较浅或没有)终止显色。
- ③终止显色后应充分水洗以去除残留的显色液。

19. DAB显色后必须要进行苏木素复染吗?

答:建议还是做复染。苏木素主要是染细胞核,起一个衬托定位的作用,让组织结构更清晰明了。

20. 组化结果分析有哪几种方法?

- ①阳性着色细胞计数法:在40*光镜下,随机选择不重叠的10个视野,人工或机器计数阳性着色细胞,每组3~6张不同动物组织切片,然后进行组间比较即可。
- ②灰密度分析法:通过在不同组别和不同动物组织切片上选择相同区域、相同条件下用Image J进行灰密度分析,然后进行统计分析即可。
- ③评分法:通过在光学显微镜下对组织切片分别按染色程度(0~3分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)、阳性范围进行评分(1~4分为0~25%、26~50%、51~75%、76~100%),最终可以分数相加,再进行比较。

对于以上这几种方法,各有利弊,请细心选择。要想得到正确结果的前提是你要做出着色均匀、背景很浅的高

质量切片。

21. 组化实验中如何设置对照?

答:原则上讲,所有实验都应该设置阳性对照,阴性对照,空白对照。阳性对照主要是确保实验流程没有问题,各试剂质量过关,多用已有明确蛋白表达的组织。阴性对照是已知不表达检测蛋白的细胞系或组织切片,确认染色结果的特异性。空白对照一般多用一抗来源的动物血清,用以排除非特异背景染色。不过,由于样本选取的复杂性,国内多数实验室以及国外多数小实验室,都无法做到规范的阴性对照,所以普遍以空白对照代替阴性对照,而这种方法也在国内外得到承认。

22. 为什么实验结果无阳性或阳性弱?

- ①一抗和二抗不匹配,使用针对一抗的二抗(如一抗来自兔,二抗为抗兔抗体)。确保一抗和二抗的同种型匹配(例如,IgY和IgG)。
- ②没有足够的一抗与目标蛋白结合,提高一抗用量,建议4°C过夜孵育,延长孵育时间,增强抗原抗体结合,背景更低。
- ③由于不当储存、稀释或反复冻融造成一抗/二抗试剂盒失效,由于储存和使用不当,导致抗体效价降低或失活,提高抗体浓度仍无阳性可做阳性对照确认一抗/二抗试剂盒的有效性。
- ④样本中没有目标蛋白,通过查阅资料确认样本中是否存在某蛋白表达,若无可参考资料建议做阳性对照。
- ⑤样本中目标蛋白含量太少,应用信号放大操作,例如,使用生物素偶联二抗和偶联酶的链霉亲和素(SABC试剂盒)。
- ⑥脱蜡不彻底,延长切片脱蜡时间,使用新配制的二甲苯。
- ⑦固定液封闭了抗体识别表位,固定时间过长会导致蛋白质空间结构发生折叠而遮盖抗原决定簇,可缩短样本固定时间,加强抗原修复。
- ⑧蛋白位于细胞核内(核蛋白),抗体不能穿透核膜,对样本进行破膜通透处理。
- ⑨PBS缓冲液被细菌污染后破坏了靶蛋白的磷酸根,在抗体PBS储存液中加入适量防腐剂,或使用新鲜无菌的PBS。

23. 为什么我的片子背景很强而且非特异性着色很严重?

- ①未封闭或封闭不充分,延长封闭孵育时间,考虑更换封闭剂。推荐使用二抗种属来源的10%正常血清封闭1小时,或使用5% BSA封闭30分钟。另一种选择是用针对样品种属的Ig进行预吸附处理的二抗。
- ②一抗浓度过高,针对一抗做浓度梯度实验,选择合适浓度,缩短抗体和底物孵育时间。
- ③孵育温度过高,时间过长,选择4°C过夜或缩短孵育时间。
- ④二抗质量不佳,使用不加一抗的二抗对照。如果观察到二抗对照有染色,则更换二抗或使用针对样品种属Ig进行预吸附处理的二抗。
- ⑤内源性过氧化物酶含量过高,延长3% H₂O₂灭活时间或用0.5%高碘酸溶液室温孵育10min。
- ⑥固定过度,福尔马林/PFA通常会在绿光光谱内产生自发荧光,因此试着使用红光范围内的荧光素。
- ⑦注意实验操作细节,在所有步骤(除封闭)之间加强PBS充分洗涤,孵育时候切勿干片。
- ⑧通透作用破坏膜并去除了膜蛋白,使用较温和的去垢剂(例如,用Tween 20代替Triton X)。或去除缓冲液中的透化剂。
- ⑨一抗与被染组织同源(如用鼠一抗检测鼠组织),二抗会与同源的所有组织结合,使用种属来源不同于样本

种属的一抗,或检测系统使用生物素直标一抗和酶偶联的链霉亲和素。

24. 为什么我的标本着色部位不对?

情况一:本是胞浆抗原,但实验显示结果却在胞核有着色。

- ①修复时间过长,修复条件十分严苛,这时应降低反应强度,减少修复时间。
- ②标本处理不当,如组织在二甲苯中静置时间过长,这时应更换标本。

情况二:本是胞核抗原但显示结果却在胞浆。

- ①核抗原不易暴露,需用热修复或延长修复时间来充分暴露。
- ②蛋白质是在胞浆翻译的,再转运至其他部位,所以出现浆着色也属正常。

情况三:本是胞膜抗原但显示结果却是在胞浆和胞膜都有着色。

蛋白质是在胞浆翻译的,再转运至其他部位,处于转运过程中的膜蛋白有可能显示在胞浆。

25. 如何判断结果是否准确?有什么数据库可以参考?

- ①组化实验的主要作用是定位,可以参考数据库的理论亚细胞定位,同时兼顾文献的介绍来综合判定实验结果是否准确。
- ②推荐Uniprot数据库,在其Subcellular Location这一栏可以查到该蛋白的理论表达位置,以及支持该数据的文献。不过该数据只有理论,无实际染色图片参考。数据库地址:<https://www.uniprot.org>。
- ③HUMAN PROTEIN ATLAS数据库。该数据的优点是可以提供人的各种正常、肿瘤以及细胞系的染色结果图供参考。不过只有人的,无其他物种的验证信息,另外该数据库的实验结果仅供参考,准确性需要根据Uniprot数据库的理论数据来评判。数据库地址:<https://www.proteinatlas.org>。

第四章 酶联免疫吸附 (ELISA)

1. 血清和血浆有什么区别?

答:全血根据收集的条件,分成不抗凝和抗凝两种。不抗凝分离出的上层黄色的液体我们称之为血清;抗凝分离出的上层黄色的液体我们称之为血浆。血清不含有纤维蛋白原。

2. ELISA实验不同实验样本如何采集?

- ①血清:全血样品于室温放置1小时或2-8℃过夜后于2-8℃,1000×g离心20分钟,取上清即可检测。
- ②血浆:真空采血针采集新鲜血液,加入无菌试管中。抗凝剂推荐使用EDTA-Na₂(也可以使用绿色或紫色管盖的真空采血管),样品采集后30分钟内于2-8℃,1000×g离心15分钟,取上清即可检测。
- ③细胞上清液:收集液体后于2-8℃,1000×g离心20分钟,除去杂质及细胞碎片。取上清检测。
- ④组织裂解液:切割标本后,称取重量。加入一定量的PBS或组织蛋白提取试剂(推荐使用NP-40蛋白提取试剂),缓冲液中可加入蛋白酶抑制剂。用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心20分钟左右(2000-3000 转/分)。仔细收集上清置于20℃或-80℃保存,如有必要,可以将样品浓缩干燥。分装后一份待检测,其余冷冻备用。
- ⑤细胞裂解液:对于贴壁细胞,去除培养液,用PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液(推荐使用NP-40蛋白提取试剂)。用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触细胞10秒后,细胞就会被裂解。对于悬浮细胞,离心收集细胞,用PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍,加入适量裂解液(推荐使用NP-40蛋白提取试剂),用枪吹打把细胞吹散。用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多,建议分装然后再裂解。充分裂解后,10000-14000g 离心 3-5 分钟,取上清,即可进行后续操作。
- ⑥唾液:提前1小时禁食并漱口保持口腔干净,采样前半小时不喝水不刷牙。在2-8℃下,4000×g离心10分钟以去除杂质,取上清即可检测。建议使用新鲜的唾液样本检测。
- ⑦尿液:采集尿液样本,一般为早晨的中段晨尿,加入无菌试管中;将采集样本于2-8℃,1000×g 离心 15-20分钟,除去杂质及细胞碎片。取上清检测。
- ⑧骨髓液:建议用抗凝管抗凝并静置30min,于2-8℃,1000×g离心15分钟,取上清液检测。骨髓液建议抽取后直接处理并检测,不能即刻检测需将离心后的上清液冻存。骨髓是重要的造血组织,未处理的样本直接冻融后会有溶血现象,不适用ELISA检测。
- ⑨其他不常见的样本类型:例如肺泡灌洗液、脑脊液、胸腹水、前列腺液、乳汁、精液、阴道分泌物等,请查找相关文献或通过实验验证是否适用。

3. 样本如果发生溶血是什么原因造成的,有什么影响?该如何避免?

- ①溶血可由多种理化因素和毒素引起。在体外,如机械性强力振荡、低温冷冻等均可引起溶血。
- ②样本溶血后,内源性HRP酶以及血红蛋白的类HRP性能会导致ELISA出现不可控的非特异性着色,从而影响检测结果的准确性。如果样本轻微溶血,建议完成标准品孵育步骤后将板条洗涤1-3次再进行后续的操作,以尽可能减少影响。如果溶血严重建议重新收集样本。
- ③为避免溶血对检测结果的感染影响,请:静脉采血时,回抽压力不宜过大;一次性采血量不宜过少;采集的全血不宜激烈振荡;离心转速不宜过大;收集的全血需尽快处理成血清/血浆,全血不能冻融;若需要麻醉采血,需使用没有溶血作用的麻醉剂。

4. 收集样本时有哪些注意事项?

- ①血液样本采集时应尽可能避免溶血现象。
- ②收集抗凝全血后一定要轻轻颠倒,充分抗凝,防止部分血液未接触到抗凝剂而导致凝固。
- ③组织与细胞提取液样本收集时不建议使用商品化的裂解试剂,如提取困难需要用到裂解液,也建议使用比较温和的裂解液(比如NP-40)。因为裂解液中的表面活性剂可能会影响待检物质的天然构象,出现测值明显降低或者假阴性。此外,由于是新引入的溶剂,不确定基质干扰的情况,可能会造成本底升高,从而影响测值准确性。
- ④避免使用高脂样本,高脂样本含有脂肪,不是均质溶液,若直接上样会影响抗原抗体的结合,从而影响测值准确性。
- ⑤样品收集后若在1周内进行检测可保存于2-8°C,若不能及时检测,请按一次使用量分装,冻存于-20°C或-80°C,避免反复冻融。

5. 贵公司的ELISA试剂盒可以检测哪些类型的标本?

答:我们的大多数ELISA试剂盒均适用于血清,血浆,细胞培养上清液和其它体液的检验。在产品说明书和网站上您会看到具体的适用范围。

6. 我的样本是组织和细胞匀浆样本,能做ELISA吗?

答:一般可以做组织和细胞裂解液。我们不写的原因是:ELISA这个实验方法是专为液体样本研发的一种定量的方法,组织和细胞样本需要做提蛋白和定量的工作,实验的本底也会比液体样本高,一定要做好阴性对照。

阴性对照:就是样本在做加生物素标记抗体那一步时,只加抗体稀释液,其他步骤相同,得到的是样本的本底值,计算时样本数据需要减去这个本底值。

7. 如何确定实验所需样本量?

答:首先,在进行正式实验前需要做预实验。预实验中分别从各组别选取几个代表样本做一系列的梯度稀释,对照标准曲线选取适合样本的最佳稀释比,样本稀释后的OD值在标准曲线线性区间内最佳。正式实验中,为提高精确度可以做复孔。切记每次检测都需要做标准曲线。而且样本含量应根据同次实验标准品曲线方程进行计算。一次实验中,每个样本量最小所需体积=100ul/稀释比例×检测种类,如要做复孔,样本量收集量加倍。实际配制时应多配制50-100ul。所有样本配置好后加入孔内,避免在孔内稀释。

8. 如何确定最佳稀释比?

答:检测之前可以根据文献资料或者自己的经验对所检测的目标蛋白含量进行预估。选择合适的稀释比例进行检测。如果没有确切的资料,我们可选择几个样本进行高中低的几个稀释比例,来确定最后的稀释比。一般,我们可选择10倍,100倍,1000倍等的稀释比例,进行预实验。如果样本进行10倍稀释时,样本OD值在标曲最低两个浓度的OD值附近甚至更低时,说明稀释过量,可按情况选择2倍或者四倍稀释。如果样本浓度稀释100倍甚至1000倍时,样本OD值仍高于标曲最高OD值,说明稀释比例仍然不够,此时需要继续稀释,可选则一万倍和十万倍再次做预实验,直到样本OD值落在标曲以内。如果选择的稀释比,样本OD值正好在标曲中间附近,说明稀释比合适,可直接进行实验。

注意:不正确的稀释导致结果出现偏差。过度稀释将导致样品值低于标准曲线范围;而当样本浓度过高,稀释度不够时,有可能超出了检测上限,计算时造成偏差或者出现hook效应。

9. 如果试剂的体积很小,该怎么办?

答:如果试剂的体积很小,请在使用前将试剂瓶离心,以确保试剂集中于瓶底。

10. 收到试剂盒之后该如何保存?

答:按说明书要求保存,避免反复冻融。六个月以内使用可以4℃保存,大于六个月可以-20℃保存。

11. 可以将不同批号内的同一试剂混用吗?

答:不建议混用,博士德试剂盒是整盒优化后组装的,尤其是ABC,不同批次试剂盒差异可能会有差异。如果混用,会对试剂盒敏感性造成影响。具体情况,可根据批次号咨询客服。

12. 实验必须做复孔吗?为什么?

答:建议做复孔。

- ①计算平均值,确保结果更准确。
- ②减少实验操作误差的影响。
- ③计算CV值。对实验操作和试剂盒的精密度进行评估。

13. ELISA实验必须在无菌操作台中进行吗?

答:ELISA整个实验只需要避免污染即可,无需严格在无菌操作台中操作。

14. 背景色过高是什么原因?

- ①不正确的洗涤:洗涤不充分或省略洗涤步骤中的任何一步均会导致背景色过高,保证洗涤缓冲液的体积足量,至少300ul,浸泡1分钟左右,并确保完成所有的洗涤步骤。
- ②底物曝光:底物曝光会使底物变成蓝色,因此在加入板内之前要保存在暗处(即试剂瓶内),用多少取多少。
- ③显色时间过长:应控制显色时间,因用户实验室条件差异,最佳显色时间会有所不同,此时肉眼可见,即标准品的前3-4孔有明显的梯度蓝色,后3-4孔差别不明显。
- ④实验过程中酶标板孔底干涸:整个实验操作过程要连续,试剂都提前准备好,避免加液不及时,引起板孔干燥过久。

15. 测试内 CV(变异系数)过高是什么原因?

- ①在洗涤或吸取移液时,刮擦到板孔内部引起包被的抗体脱落,注意在洗涤包被板或吸移标准品和样品时不要刮擦到板孔内表面。
- ②封板膜重复使用:每一步都要换新的封板膜。
- ③样品不均一:确保所测试样品是均一的,在加入包被板前要混匀。
- ④边缘效应:确保实验中孵育温度稳定。
- ⑤移液器没有正确校准:在实验时,要确保移液器经过校准并且正确使用。
- ⑥洗涤不充分:机器洗板时,检查出水口是否堵塞;手工洗板时,检查每次液体是否拍干。
- ⑦样本被污染:因唾液或皮肤可能含有分析物,因此在实验过程中,建议带上口罩和手套。
- ⑧加样本及试剂量不准:检查吸液管(枪)的功能,必要时进行校准,重复测定标本,操作条件、人员等应尽可能与上次保持一致,以排除这些因素造成的不一致。

16. 不显色是什么原因?

- ①测试前未将试剂恢复至室温,在实验开始前要将所有试剂恢复至室温。
- ②某些试剂的不正确保存,所有试剂的保存方法在说明书中均有详述,要严格依其操作。

- ③操作时, 试剂配错配反, 可重复实验, 再做一次。
- ④省略孵育步骤, 说明书中任何一步孵育步骤均不可省略。
- ⑤样品不适合此检测, 在说明书中会列出每种产品的适用标本范围, 超出范围的标本可能不适于此试剂盒或者检测条件需要摸索(如调节稀释度等)。

17. 样品或标准品的数据值降低是什么原因造成的, 如何解决?

- ①不恰当的数据处理方法: 按照试剂盒内的推荐, 使用数据处理方法。其他处理方法可能会降低标准曲线的精确度。
- ②标准曲线未经分析: 如果没有计算机软件, 使用对数纸绘制标准曲线并对对数变化进行回归分析。标准曲线必须与每次分析相符合。试剂盒内所提供的标准曲线仅供参考, 并不能用于计算结果。
- ③样本稀释倍数不对: 做好预实验, 选择好合适的稀释比例, 尽量使样本浓度处在最佳的检测范围。
- ④Hook效应: 样本浓度如果远高于试剂盒的检测范围, 而样本没有稀释到合理的范围, 会导致hook效应, 致使结果呈现假阴性。
- ⑤冻干标准品溶解不充分: 按照说明书要求, 充分溶解标准品, 并颠倒混匀数次, 必要时, 可用漩涡混匀器加强混匀
- ⑥溶解时间过短: 确保足够的时间, 以完全溶解冻干标准品。
- ⑦已经稀释的标准品, 应在12小时内使用。-20°C冷冻保存条件下, 2天内可以使用, 但不得反复冻融。
- ⑧检测波长不正确: 要保证酶标仪的检测波长是正确的, TMB的检测波长是450nm。
- ⑨显色时间过短: 延长显色时间。

18. 样品或标准品值过高是什么原因?

- ①试剂稀释不准确, 仔细查看标签和说明书要求, 重新稀释试剂。
- ②移液误差, 校准移液器, 上紧枪头, 按规范使用移液器。
- ③样品不适合此检测, 在说明书中会列出每种产品的适用标本范围, 超出范围的标本可能不适于此试剂盒或者检测条件需要摸索(如调节稀释度等)。
- ④孵育时间/温度不正确, 孵育时间过长或者温度过高, 都会增加非特异性反应, 造成OD值过高。
- ⑤显色时间过长, 可缩短显色时间。
- ⑥洗板不充分, 导致的非特异性显色。

19. 博士德ELISA试剂盒的标曲都是线性的吗?

答: 不一定。ELISA实验是利用抗原抗体的结合遵循一定的量比关系的原理来定量分析样本中目的抗原的浓度。而且抗原抗体结合的量比关系只有在两者分子比例合适时才出现最强的抗原-抗体反应, 此时这种量比关系成正比且相当复杂, 并不是只有简单的线性关系。因此, 我们在根据标准品浓度与吸光度制作标曲时, 选择的曲线模型最好不要用简单的线性图, 我们一般推荐使用 4-PL或 5-PL (参数逻辑) 拟合标准曲线。相较于其他模型, 4-PL或 5-PL拟合曲线适用于大部分ELISA校正标准曲线且更接近于真实曲线。缺乏相关绘图软件的同学, 可登录网站(<http://boster.com/index/index/show/id/92.html>), 下载我们博士德公司推荐使用的“Curve Exert1.4”软件, 网站上也有具体操作步骤。

20. ELISA实验结果如何分析?

答: 可登录博士德公司官网, 在“技术资源-常用工具”下载ELISA绘图软件, 以标准品浓度作为横坐标, 吸光值

作为纵坐标,选出拟合度高(r 值 >0.99)且平滑上升的曲线,四参数或五参数拟合法往往曲线拟合效果较好,然后根据得到的函数关系计算样本的目的蛋白浓度值,具体操作可参考我们官网上的软件软件使用方法详解。

21. 什么是跳孔,原因以及如何避免?

答:浓度低的样本OD值高或者浓度高的样本OD值低,也就是说样本浓度和OD值没有线性关系,我们一般称为跳孔。

- ①各孔加入试剂的量不一致:使用较好的加样器和吸头,吸头安放牢固。
- ②洗板不均一:确定移液枪精准,进行正确移液操作。
- ③洗板后未将各孔拍干:做到洗板一致,每孔注入同样多的蒸馏水(约300ul),可增强浸泡时间30s。
- ④拍板时不同样本间发生交叉污染:推荐使用机器洗板。
- ⑤酶标板底有杂物或水珠:读数时清理干净酶标板底部。

22. 我做出标准曲线挺好,但样本孔无信号是什么原因,怎么解决?

- ①样本中目的抗原的含量本来就很低:设置阳性对照,再重复一遍实验,如果的确样本含量低于检测线就没办法。
- ②被样本基质遮盖:选择合适的稀释倍数,重新稀释样本后再测一次。
- ③样本降解:重新取新鲜样本,并避免反复冻融。

23. 我做出标准曲线很好,但样本孔信号很高可能是什么原因造成的,怎么解决?

- ①可能样本中待测物含量超过标曲范围,建议重新稀释样本后再进行实验。
- ②样本溶血或者被污染,建议重新取样本。

24. 博士德官网推荐两款ELISA数据处理绘图软件,有什么区别?

答:两款ELISA数据处理绘图软件,其中Curve Expert1.4提供的供选择曲线方程的种类较多,易找到更适合且“ r ”更接近于1的方程,用于处理较复杂的数据。而ELISA Calc软件与Curve Expert相比较,能选取的拟合模型种类较少,但优点是操作简单,可以结合excel表格处理数据,方便复制粘贴,计算大批量数据时有明显优势。

25. 什么是钩状效应(Hook效应),如何判断,如何解决?

答:当样本中抗原含量很高时,过量抗原分别和包被抗体及检测抗体结合,而不再形成夹心复合物,如果按常规方法测读,所得结果将低于实际的含量,这种现象被称为钩状效应。钩状效应严重时,甚至会出现假阴性的结果。在实际应用中,如果发现高浓度的样本,越稀释OD值不降反升,就要注意钩状效应的存在。此时,我们需要继续加大稀释倍数,使得OD值和稀释倍数之间,呈正比的关系,就认为达到了正常的稀释倍数,消除了钩状效应的影响。

第五章 细胞培养

1. 细胞培养过程中常用的基础培养基有哪些？

答：常用的基础培养基有MEM、DMEM、F12K、DMEM/F12、 α -MEM、PRMI1640、L-15、McCoy's 5A、F12、F10等。不同的细胞适用的培养基不同，客户需根据自己所培养细胞的要求来选择最适培养基。

2. 如何选用细胞系培养基？

答：优先根据细胞来源公司提供的培养条件，其次参考ATCC/DSMZ推荐细胞对应培养基。一般建议不要随意更换培养基种类。细胞株均有其特定使用且已适应的细胞培养基，若骤然使用和原先提供的培养条件不同的培养基，可能造成细胞形态发生变化或者无法存活以及细胞的表型或功能丢失。

3. 储存在冰箱中的培养基，在放置几天后颜色变紫是什么原因？

答：变紫的培养基是可以继续使用的，培养细胞时会在培养箱自动恢复颜色。

培养基保存在4℃条件下，培养基内的CO₂会逐渐溢出，造成培养基越来越偏碱性，而培养基中酸碱指示剂（通常为酚红）的颜色也会随着碱性增加而偏紫。培养基偏碱性将会造成细胞生长停滞或死亡，可以在使用前旋松瓶盖（用于培养箱与培养基瓶中气体交换），在CO₂培养箱中孵育培养基10-15分钟，来校正溶液PH值，过一段时间就会变回正常。

4. 培养基PH值变化迅速是什么原因？怎么解决？

- ①培养箱CO₂分压设置错误或者CO₂浓度不准，核实并检测培养箱的CO₂浓度；
- ②细胞培养瓶不透气瓶盖过紧，将瓶盖旋松一圈。
- ③碳酸氢钠缓冲系统缓冲能力不足，加入HEPES缓冲液，使其终浓度10-25mM。
- ④细菌、酵母或者真菌污染也会导致培养基PH值变化，若确定污染将细胞和培养基灭菌处理后丢弃。

5. 如果细胞培养中发现黑点，如何处理？

- ①如果判定黑点是污染，请及时将细胞处理后丢弃。
- ②若是判定黑点为细胞碎片，可参照以下进行：

如果是悬浮细胞，收集细胞上清慢速离心(500-600 rpm/min, 5-6min) 并更换新的培养瓶；如果是贴壁细胞，将细胞用PBS洗2-3遍，洗的时候，轻轻拍打培养瓶，让贴壁不牢的碎片和颗粒脱落，再弃去PBS，消化时先加低浓度的胰酶如0.05%胰酶消化1 min左右，让细胞间隙中的颗粒和碎片脱落下来，去掉低浓度胰酶，然后正常消化细胞，将收集的细胞悬液慢速离心(500-600 rpm/min, 5-6min)，并更换新的培养瓶。掌握细胞传代的最佳时机，不要细胞长老了再传代；掌握好消化时间，防止消化过度产生细胞碎片。

- ③黑点也可能是是血清里的磷酸钙等沉淀，尽量减少血清冻融次数。

6. 细胞内有空泡，是否是正常现象？

答：部分细胞本身存在一定的空泡(如Caco-2、NCI-N87和HCC1937等)，这个是正常现象。如果只有少数细胞内出现极少空泡，则很可能是细胞状态不佳，可以通过调整血清浓度，控制消化，控制传代比例及时间等方法来调整细胞状态；如果大部分细胞出现空泡，且单个细胞内空泡数目偏多，则可能细胞代次较高，细胞老化所致，需更换代次较早的细胞。

7. 细胞培养液变黄，变浑，怎么处理？

答：细胞培养液变黄多半是细胞密度过大，细胞增殖速度过快，产生大量酸性代谢废物，细胞营养不足，应立

即进行消化传代处理;而培养液变浑多半是发生了细菌污染。

8. 可否使用与原先培养条件不同的培养基?

答:不能。每一细胞株均有其特定使用且已适应的细胞培养基,若骤然使用和原先提供的培养条件不同的培养基,细胞大都无法立即适应,造成细胞无法存活,细胞形态变化及增殖速度变慢。

9. 血清中出现的沉淀是什么?对细胞培养有影响吗?怎么去除?

①纤维蛋白,它是经常出现的较大的沉淀物,可以达到1-2mm,可以用肉眼观察到。

②胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质,它们也是血清中出现沉淀物的常见原因。

③磷酸钙,它也是常见的一种沉淀物,通常会使得血清出现浑浊,并且在37°C培养的时候会增加。这种沉淀物在倒置显微镜下观察像小黑点,这些小黑点由于布朗运动看上去可以活动,因此经常被误认为是微生物污染。

这些沉淀对细胞的生长是没有影响的,如果想去除尽量采用离心的方法弃掉沉淀,不建议用过滤的方法去除沉淀,因为会堵塞滤膜而且会有污染的风险。

10. 如何避免血清沉淀物的产生?

①解冻血清时,请按照所建议的逐步解冻法(-20°C至4°C至室温),

②解冻血清时,请随时将之摇晃均匀,使温度及成分均一,减少沉淀的发生。

③请勿将血清置于37°C太久。若在37°C放置太久,血清会变得混浊,同时血清中许多较不稳定的成分也会因此受到损害,而影响血清的质量。

血清的热灭活非常容易造成沉淀物的增多,若非必要,可以无须做此步骤。

11. 什么是热灭活,有必要作热灭活吗?

答:热灭活是指以56°C,30分钟水浴处理已经解冻的血清,使血清中的补体灭活。以往公认的操作中,培养的血清通常是经过热灭活的,但是并没有确凿的证据说明这样做是有益的,虽然灭活有可能降低支原体的滴度,但灭活能够消除支原体的论点还不能算是成立。另外,经过灭活的血清,颗粒状沉淀物会显著增加。建议:若非必须,不要对血清进行热灭活。不仅可以节约时间,而且确保血清的质量。

12. 细胞生长缓慢是什么原因,怎么解决?

①生长培养基使用不当;按照生产商的建议,使用与细胞相对应的培养基;

②生长培养基中血清质量差;建议更换其他品牌或者其他批次的血清;

③传代操作不当;按照生产商的建议消化时间及传代比例进行操作;

④换液过于频繁;降低换液频率,参考生产商推荐的换液频率;

⑤细胞生长超过汇合状态;哺乳动物细胞传代应在细胞处于对数期、未达到汇合状态时进行,建议密度80%传代;

⑥细胞状态不佳,传代次数过多;使用传代次数较少的健康细胞;

⑦支原体污染;弃掉原有细胞及培养基,重新复苏代数比较低无支原体污染的细胞。

13. 细胞复苏后存活率低是什么原因?

①细胞冻存不当:首先要确保冻存细胞前细胞的状态良好,严格按照生产商推荐的操作程序冻存细胞,保存过程中液氮罐中液氮充足,不在冰箱里面长期存放细胞。

②复苏方法不当:严格按照生产商推荐的操作程序复苏细胞,确保冷冻细胞解冻迅速。

- ③处理细胞时动作不够轻柔:冻存和复苏过程对大多数细胞会造成不利影响,应进行低速离心。
- ④冻存液中保护剂存储不当:DMSO没有避光保存会转变为对细胞有毒性的物质,应及时更换并避光保存。

14. 微生物污染有那些独有的特点?

- ①PH突然改变,细菌污染的大多数情况是PH降低,酵母污染时PH很少改变,只有在污染严重时PH才会改变。真菌污染有时会出现PH上升。
- ②培养基出现云雾状或浑浊,有时表面出现丝状和树枝状的菌团等白色和黄色点状物。
- ③细菌污染时,在低倍镜下(约100倍)可见细胞之间的空隙处有细沙状的颗粒物。酵母污染则显示有分散的圆形或卵形的颗粒,并可能出芽长出更小的颗粒,真菌污染会产生细的纤维状菌丝体或有时产生密集的孢子,随着毒性加重,细胞坏死越来越明显。
- ④在高倍镜下(约400倍),有可能分辨出细菌个体,并可区分出杆菌或球菌。

15. 如果细胞发生微生物污染时,应如何处理?

答:无论是何种污染均应直接丢弃或者更换细胞,将未受污染的细胞转移至其它培养箱,用实验室消毒剂消毒培养器皿和超净台以及二氧化碳培养箱。如果发生真菌霉菌污染,需要将房间紫外照射以消除可能产生的孢子。发生污染后同时排除使用试剂的污染,包括培养基和血清,可以空培试验。

16. 细胞支原体污染怎么处理?

答:支原体污染是比较难去除的,特别容易复发,一般建议直接更换新的细胞,如果特别精贵或者重要的细胞可以尝试使用四环素、大环内酯类抗生素(泰乐霉素)、喹诺酮类抗生素。

17. 细胞何时换液最佳?

- ①细胞消化传代后建议隔天或者隔两天换一次液。
- ②细胞传代后发现碎片多、死细胞特别多在细胞形态已经出来的前提下可以第二天换液。
- ③对于生长速度较慢、形态出来慢的细胞可以多放点培养基,减少换液次数,让细胞静养。
- ④细胞传代后细胞分布不均,细胞堆叠,细胞间隙大,局部密度大,这时不换液,可以采取消化重铺的方式。

18. 如何控制胰酶消化时间?

答:胰酶消化的程度是细胞培养中的一个关键步骤:消化过度细胞碎片增多,黑渣子增多,细胞会成片脱落,严重影响细胞活性,导致部分细胞漂浮;消化不足则细胞难于从瓶壁脱落,反复吹打同样也会损伤细胞活性。不同细胞对消化液的敏感性不同,胰酶消化的时间也会有差异。像贴壁不牢的293T和Lncap大约1-2分钟,HeLa和A549大约2-3分钟,HEPG2和CACO-2大约5分钟,5637和A431大约10分钟左右。胰酶消化时间与胰酶的活性及浓度,是否含EDTA,消化加入的胰酶体积,消化温度及细胞的密度有关。对于新购买的细胞,建议客户先用胰酶仔细去摸索一下消化时间,可每隔30s镜下观察细胞是否变圆,记录最佳消化时间,下一次操作参考之前的记录来控制时间即可。

19. 对细胞形态有疑问?

- ①确定细胞所使用的培养基种类是否为说明书建议的。改变了培养基种类细胞形态可能会有变化。
- ②以引用公司官网细胞照片为准,其次可以参考ATCC或DSMZ网站的图片。
- ③如果上皮型细胞很明显成为成纤维细胞或者成纤维细胞很明显成为上皮型细胞,那需要查看细胞是否提供了STR鉴定报告,身份是否正确。

④细胞的代次是否过高导致分化变异、细胞是否经过加药诱导、细胞是否经过转染等都会引起细胞形态出现变化。

⑤细胞低密度和高密度形态是不一样的,还有一些细胞呈现形态比较慢,细胞要1-2天才能伸展开。所以细胞的正常形态要等细胞密度起来后才能确定。

20. 怎么进行细胞身份检测, 判定细胞为正确细胞?

①STR分型:基于多重PCR、同时扩增基因组中多态STR 位点的技术鉴定人类和小鼠细胞系(只有部分小鼠细胞可以鉴定到具体细胞系);

②种属污染鉴定:对非人源和小鼠细胞可以进行种属污染鉴定。

21. 冻存细胞发货的, 收到以后怎么处理细胞?

①收到冻存细胞后,核对冻存细胞信息,及时拍照记录(冻存管放在干冰上拍照核对即可)。

②若收到细胞当天不复苏,请及时将细胞转移至液氮罐中(注意转移过程动作要迅速,温度变化对冻存细胞的影响较大)。

③若无液氮罐,请及时将细胞转移到-80℃冰箱中保存(注意放在靠里面的位置,储存温度稳定性对细胞复苏活率的影响较大)。

④请提前做好适合该细胞生长的培养基,若从冰箱拿出,请将培养基水浴后使用。

⑤复苏的细胞不建议当天或者第二天换液,部分细胞贴壁时间长(48h左右),

⑥建议先复苏其中一管细胞,复苏有异常,请及时跟厂家联系,待技术分析复苏失败原因后再复苏第二管冻存细胞。

22. 复苏细胞发货的, 收到以后怎么处理细胞?

①收到细胞后,及时拍照记录培养瓶有无漏液,瓶身有无破损现象。

②用75%酒精擦拭细胞培养瓶表面,显微镜下观察细胞状态。先不要打开培养瓶盖,将细胞置于二氧化碳培养箱内静置复温2-4小时,以便稳定细胞状态。

③仔细阅读细胞说明书,了解细胞相关信息,如贴壁特性(贴壁/悬浮)、细胞形态、所用基础培养基、血清比例、所需细胞因子、传代比例、换液频率等。

④静置完成后,取出细胞培养瓶,镜检、拍照,记录细胞状态;建议细胞传代培养后,定期拍照、记录细胞生长状态。

⑤若细胞生长汇合度超过80%,可正常传代,首次传代推荐1:2~1:3(按实际收货细胞密度决定,若不确定可联系技术支持);若未超过80%,移除细胞培养瓶内培养基,预留6mL左右原瓶培养基继续培养,直至细胞密度达80%左右再进行传代操作(注意发货的是密封培养瓶盖的话,处理细胞完后放入培养箱记得将瓶盖拧松一圈)。

⑥若观察到异常或者对细胞有疑问,请及时跟代理商或我们联系;对于细胞培养操作及培养注意事项有疑问的,可跟我们的技术支持交流沟通。

注:部分贴壁细胞由于贴壁不牢,或者由于气温和运输原因导致收货后贴壁细胞有成片漂浮,属于不可避免因素,可按如下操作进行处理:

①将细胞培养瓶内漂浮部分连带培养基转入离心管,离心收集细胞(1000rpm 3min),旧培养瓶内细胞贴壁部分补液可正常培养。

- ②用PBS重悬收集的细胞,并再次离心(1000rpm/3min)。
- ③去除PBS后加入1ml左右0.25%胰酶重悬细胞,放入二氧化碳培养箱消化细胞2-3分钟左右(消化时间视细胞特性决定)。
- ④消化好后可按正常消化传代步骤进行终止消化并吹打成单个细胞悬液,提高血清浓度后按比例转到培养瓶中并提高血清浓度进行培养。

第六章 细胞凋亡

1. 什么是细胞凋亡?

答:细胞凋亡(apoptosis)是正常机体细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发的死亡过程,它在多细胞生物的组织分化、器官发育、机体自身稳定的维持中有着重要的意义。机体在产生新生细胞的同时,衰老和突变的细胞通过凋亡机制而被清除,使器官和组织得以正常地发育和代谢。

2. 博士德公司有哪些细胞凋亡检测的方法?

答:博士德主要有两种细胞凋亡检测的方法:1、TUNEL法(末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法);2、Annexin V/PI法。

3. TUNEL法检测原理是什么?

答:细胞凋亡的特征是DNA分解,此时染色体DNA双链或单链断裂而产生大量的粘性3'-OH末端,这两种缺口在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TDT)的作用下,将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或地高辛等形成的衍生物标记到DNA的3'-末端,从而可进行凋亡细胞的检测,这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal - deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)

4. AnnexinV/PI法的原理是什么?

答:正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)位于细胞膜的内侧,但在早期凋亡细胞中,PS会从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。Annexin-V(膜联蛋白-V)是一种分子量为35-36KD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,能与PS高亲和力结合。用荧光素(FITC、Alexa Fluor488等)标记的Annexin-V作为探针,利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生;碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死细胞,PI能够透过细胞膜而将细胞核染红。因此将Annexin-V与PI结合使用,就可以检测出细胞群体中的早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞。

5. 为什么我的TUNEL细胞凋亡实验会出现非特异性着色?

- ①标本原因,肝肾内源性生物素含量高,直接与SABC结合导致非特异性着色,皮肤肺组织胶原含量高,由于胶原带负电荷,易吸附试剂导致非特异性着色。
- ②固定时间过长会导致胞浆着色。
- ③洗涤不充分。
- ④显色剂氧化,显色时间长。

6. 为什么我的TUNEL细胞凋亡实验没有阳性结果?

- ①TDT酶保存一定要恰当,在常温下容易失活,应在-20℃保存。
- ②蛋白酶K消化时间不够,根据标本情况适当延长消化时间。
- ③实验中漏加试剂,实验操作不规范。

7. 为什么我的TUNEL细胞凋亡实验的阳性很弱?

- ①标记液量过低,建议根据组织大小提高标记液用量;
- ②孵育时间过短,建议延长孵育时间;

- ③液体流失,建议补加试剂;
- ④显色时间过短,建议在显微镜下控制反应时间;
- ⑤蛋白酶K消化时间不够,建议延长消化时间。

8. 为什么我的TUNEL细胞凋亡着色背景很高?

- ①福尔马林固定导致某些含黑色素前体的细胞染成黄色。
- ②内源过氧化物酶未被灭活。
- ③标记反应试剂的浓度过高。
- ④孵育时间过长。

9. TUNEL 法测凋亡细胞会出现假阳性或假阴性的情况吗?

答:会出现假阳性或假阴性的情况。在坏死晚期和高增殖的细胞中也可产生大量的DNA片段,这就有可能会
出现假阳性;在某些形式的凋亡细胞中DNA链断裂可能缺失或不完整,这就有可能出现假阴性。

10. TUNEL法检测组织里面的凋亡细胞,组织样本需要固定吗?

答:需要固定,并且需要及时固定。因为TUNEL法检测的是细胞中断裂的DNA片段,如果不及时固定DNA片
段是会降解的。

第七章 原位杂交技术 (ISH)

1. 什么是原位杂交实验?

原位杂交(in situ hybridization, ISH)就是应用已知碱基顺序并带有标记物的核酸探针与组织细胞内待测的核酸(DNA或RNA),按碱基互补配对原则(A-T,C-G)进行特异性结合,形成杂交体,然后用与标记物相应的检测系统在核酸原有位置进行细胞内定位、定性和定量研究。

2. 博士德的原位杂交产品和服务有哪些?

我们公司有1600种以上的现货成套试剂盒(包含探针和显色系统),以及配套的辅助试剂,并且可以根据客户需求提供探针定制服务,显色系统有HRP(过氧化物酶)、AP(碱性磷酸酶)、荧光(红色,绿色)三种可供选择。

3. 博士德定制的mRNA探针有什么特点?

- ①三相寡核苷酸探针
- ②地高辛标记

4. 消化时间对原位杂交实验有什么影响?

答:标本的消化对原位杂交比较重要,适当的消化使靶基因充分暴露,增强探针的接触性。但过度的消化将使标本明显减薄乃至消失,不同的标本对消化的敏感性不同。

5. 洗涤时间对原位杂交有什么影响?

答:杂交后的洗涤跟信号及背景强度有密切关系。洗涤时间越短,信号越强,背景也越高;洗涤时间过长,信号越低,适当的洗涤时间会获得理想的信号强度和可以忽略的背景。

6. 原位杂交和免疫组化的固定液是一样吗?

答:固定液是不同的,做 ISH 的固定液里面需要加 DEPC 来防止mRNA的降解的(4%多聚甲醛-含 DEPC, AR1069),而做免疫组化的固定液里面可以不用加 DEPC(AR1068)。

7. 做ISH实验前所有器皿必须经过灭菌和消毒处理吗?

答:有条件的可以灭菌和消毒,有些器皿也最好用DEPC处理,如果没有那个条件的也可以不处理,但要保持器皿干净。

8. 我现在在做贵公司的原位杂交的产品,但是我没有原位杂交专用PBS,我可不可以用普通的PBS代替呢?

答:原位杂交使用的PBS必须采用原位杂交专用 PBS (AR0033),因为专用PBS是高盐的PBS,浓度越低的PBS就越容易洗掉杂交的结果。

9. 需要原位杂交专用盖玻片吗?如果没有该如何操作?

答:需要,原位杂交专用盖玻片可以防止液体蒸发,避免样本处于干燥状态,影响实验。如果没有专用盖玻片,可以适当增加试剂的量,放入湿盒中孵育,并把湿盒密封好。

10. 我的标本是在手术室得到的,及时固定很不方便。如果先把标本置于液氮中,再转至-70 冰箱。等到标本收集到一定数量以后再进行上述固定步骤,不知可否?

答:及时固定是非常重要的,这样才可以最大程度的保持样本mRNA的完整性,mRNA 容易被环境中的RNA酶降解,所以及时固定是很重要的一步。如果确实无法及时固定,可以放入液氮中保存,后期可以做冰冻片检测。

11. 为什么我的原位杂交结果有非特异性着色?

① 探针浓度过高、或者杂交时间过长、温度过高;

解决办法:适当稀释探针,降低杂交时间和温度;

② 标本原因,肝肾内源性生物素含量高,与SABC 结合导致非特异性着色,皮肤肺组织胶原含量高,由于胶原带负电荷,易吸附试剂导致非特异性着色;

解决办法:如果是内源性生物素干扰,可以选用内源性生物素封闭剂进行封闭或者选用非生物素-亲和素的检测系统;如果是标本吸附试剂导致的,可以加强血清封闭;

③ 切片干涸导致的边缘效应;

解决办法:在实验中应保持切片始终处于水平状态避免试剂流失,应将试剂覆盖面积大于组织面积;

④ 洗涤不充分;

解决办法:洗涤要充分,在背景十分深时,可用37°C预温的缓冲液浸泡;

⑤ 显色剂氧化,显色时间长,产生很强的背景。

解决办法:显色剂的配制要防止氧化,尤其是显色剂的配制时使用的容器,最好是灭菌过的。显色时间应在显微镜下严格控制。

12. 着色部位不对,为什么本来mRNA在细胞胞浆显色,但实验显示结果却在胞核有着色?(如果显示少数的核着色属于正常)。

① 消化时间过长。客户初次做时应多摸索几个时间,如5、10、15分钟(视标本新旧、厚薄自行调整);

② 组织固定时间过长,应严格控制固定时间;

③ 探针浓度太高,可适当的稀释探针。

13. 为什么我的原位杂交实验没有阳性?

① 固定时间方式是否按说明书进行,标本是否陈旧。在标本固定中应该严格操作,做到及时固定。固定液为4%多聚甲醛(0.1Mpbs, PH7.0-7.6)含0.1%DEPC;

② 标本制作过程中温度过高时间过长,标本制作不规范。浸蜡时温度不要太高,时间不要过长。一般2小时×2次。烤片温度一般在60°C左右30分钟;

③ 实验操作不规范,实验中漏加试剂;

④ 杂交时间过短、温度不够,可适当的提高杂交时间和杂交温度;

⑤ 消化不够,需延长消化时间。

14. 为什么我的原位杂交实验阳性弱?

① 杂交时间过短温度不够,解决方法:可适当的提高杂交时间和杂交温度;

② 试剂流失,解决方法:将试剂覆盖面积大于切片组织面积;

③ 显色时间过短,解决方法:在显微镜下控制反应时间;

④ 消化时间不够,解决方法:需延长消化时间。

第八章 流式细胞术(FCM)

一. 流式细胞

1. 样品处理需要注意哪些?

答:未固定的样本应立即实验,根据实验目的选择最佳固定方法,避免因固定剂造成检测结果不稳定。新鲜组织标本应及时处理保存,以免在室温下放置时间过长,导致组织坏死及细胞自溶,从而影响检测结果。

2. 什么是空白对照?

答:空白对照就是不进行任何标记的细胞,主要目的是用于测定基础荧光信号表达值。设置空白对照管(未染色的细胞)来区分细胞的自发荧光和特异性荧光,避免假阳性的结果。

3. 什么是同型对照?

答:同型对照就是与实验抗体相同种属来源、相同剂量及同种免疫球蛋白的相同亚型的抗体作为对照。设置同型对照管,消除抗体非特异性结合到细胞上从而产生的背景荧光。

4. 如何确定样品是否需要破膜?

答:可通过蛋白信息数据库或其他文献查询蛋白在细胞/正常组织/癌变组织中的表达情况,以确定后续实验中该选取什么样品(细胞)来进行实验,以及是否使用破膜剂/破核膜剂来处理样品(细胞)。

5. 流式染色时间和温度如何选择?

答:流式染色是抗原抗体的结合反应,该过程结合非常快,而且非常牢固,但染色过程要尽量让所有抗原都能结合抗体分子,所以加入抗体时一定要混匀,我们一般选择室温染色15 min或者4°C染色30 min,染色中途混匀一次,建议轻弹管子(枪头吹打可能会对细胞受损,死细胞增多,导致非特异性结合增加)。

6. 如何减少补偿的干扰?

答:因为不同激光器激发的荧光染料之间几乎没有补偿的干扰,所以对于多激光器的仪器我们可通过选择不同激光器激发的染料来避免补偿的干扰,选择同一激光器激发的染料时,尽量选择染料之间发射光谱不重叠的染料。

7. FCM检测过程中如何调节补偿?

答:在FCM检测过程中,如果存在多色,则必须进行荧光补偿调节。调节补偿首先要知道双阴性细胞的情况,其次,必须要用单阳和双阴性细胞。只有在有阴性细胞作为参照的情况下,才能既不会过多又不会过少地调节补偿。

8. 细胞内染色选用什么样的荧光素?

答:对于胞内染色,应选用分子量较小的荧光素。

9. 补偿过高或增益过低导致无信号/荧光弱怎么办?

答:使用阳性对照再次设置补偿或在合理的范围内提高增益以增强信号。

10. 过量抗体被困导致荧光强度高怎么办?

答:这是细胞内染色特有的问题,较大的荧光分子使抗体被困在细胞中。确保洗涤步骤充分,包括在洗涤缓冲液中加入吐温或Triton。

11. 流式实验无信号或荧光信号强度弱是什么原因造成的,以及如何解决?

- ①一抗和二抗不匹配:使用的二抗应与一抗来源种属不同(例如,一抗为兔源,则应该使用抗兔源二抗)。
- ②抗体量不足:增加抗体的量浓度。
- ③目标蛋白为胞内蛋白,但未作通透处理:采用合适的破膜剂对样本进行通透。
- ④细胞内染色结合荧光分子太大:对于胞内染色,应选用分子量较小的荧光素。
- ⑤仪器故障:可能需要考虑联系厂家。
- ⑥目标蛋白不存在或处于低水平表达:确保组织或细胞类型表达的目标蛋白处于一个足够检测的量。
- ⑦可溶性或分泌型目标蛋白:通过高尔基体封闭的步骤,比如加入Brefeldin A,可提高细胞内染色信号。
- ⑧补偿过高或增益过低:使用阳性对照再次设置补偿或在合理的范围内提高增益以增强信号。
- ⑨荧光分子的荧光逐渐消失:抗体可能放置时间太长或没有避光。

12. 流式实验荧光信号强度过高是什么原因造成的, 以及如何解决?

- ①抗体浓度过高:减少每个样本中加入的抗体量。
- ②过量抗体被困:这是细胞内染色特有的问题,较大的荧光分子使抗体被困在组胞中。确保洗涤步骤充分,包括在洗涤缓冲液中加入吐温或Triton。
- ③封闭不足:与封闭步骤一样,抗体中加入1-3%封闭试剂。

13. 实验背景值高或阳性细胞百分比高是什么原因造成的, 以及如何解决?

- ①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,用补偿减少颗粒背景并减少增益以降低信号。
- ②抗体过量:降低抗体浓度,还可以在洗涤缓冲液中添加去污剂,以确保洗去多余的抗体。

二. 流式凋亡

1. 凋亡率低怎么办?

答:凋亡刺激不够,可以增加诱导凋亡试剂浓度和反应时间;做单染管对比检查荧光试剂效用;荧光易碎灭,反应完毕应尽快检测,最好在1h内。

2. 凋亡率高怎么办?

答:轻柔处理细胞,保证活细胞的状态良好;细胞收集后及时染色;降低Annexin V-FITC染色浓度。

3. 细胞过密产生假阳性的处理?

答:细胞密度不要超过 1×10^6 ,避免细胞培养过程中自身引起的凋亡,而非外界处理因素。

4. 消化过度产生假阳性的处理?

答:消化过度可能造成PS外翻,得到假阳性结果。因此消化时最好用低浓度胰酶消化,轻柔吹打贴壁细胞2-3次,尽量把胰酶造成损伤控制在5%以内。

5. 操作剧烈产生假阳性的处理?

答:处理贴壁细胞时要小心操作,力度过大可能造成细胞膜损伤,导致PS暴露,导致假阳性。

6. 液氮保存的组织块,能不能再做流式细胞分析?

答:不能,因为流式细胞分析要求细胞分散、单个,活性好,组织在冻存、复温的过程中会有大量的细胞死亡,

同时经过这一过程的组织在分离成单个细胞的时候会形成许多细胞碎片,不宜上流式检测,所以用于流式检测的标本最好是新鲜标本,即取材后立即检测,效果最好。液氮保存的组织块,可以将组织标本进行切片,然后做原位染色,观察组织细胞的凋亡。

7. Annexin V能否用在植物和细菌中检测凋亡?

答:可以。

8. 血液样品可以做凋亡吗?

答:可以,但必须去除血液中的血小板,因为血小板含有PS,能与Annexin V结合,干扰实验结果。

9. 如何统计凋亡细胞数?

答:Annexin V凋亡实验在做凋亡统计时一般统计细胞早期凋亡率,也有文献统计总的凋亡比例(早期凋亡和晚期凋亡或坏死细胞之和)。

10. 检测凋亡用的细胞能否固定?

答:甲醛固定液会造成结果假阳性,因此用于Annexin V凋亡检测的细胞不能进行固定。

11. 是否可以用PBS替代凋亡试剂盒里面的Binding Buffer?

答:不行,Annexin V与PS的结合依赖Ca²⁺, Binding Buffer含有Ca²⁺,主要是促进Annexin V与PS的结合。不加Binding Buffer,会导致Annexin V的结合能力降低,造成阳性信号大幅下降甚至无阳性信号, Binding Buffer是必须要加的。



博士德公众号



实验技术手册



抗体应用手册



ELISA应用手册



精选文献目录



WB实验视频



IHC实验视频



ELISA实验视频



细胞实验视频



FCM实验视频

博士德·中国

武汉博士德生物工程有限公司

地址：武汉市东湖高新区光谷生物医药加速器C21栋3-5层

电话：027-67845390/1/2

邮箱：boster@boster.com

网址：www.boster.com

博士德·美国

BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY Co.,Ltd.

Add: 3942 B Valley Ave, Pleasanton, CA, 94566

Tel: (888) 466-3604

E-mail: boster@bosterbio.com

Website: www.bosterbio.com

