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

抗　　体 | ELISA

免 疫 印 迹 | 原位杂交

免疫组化/荧光 | 细胞培养

细 胞 凋 亡 | 实验服务

BOSTER®

antibody and ELISA experts

实验技术手册

Experimental Technical Manual

32周年　专注试剂　始于源头

1800+
ELISA试剂

20000+
抗体指标

80000+
引用文献

抗体 ELISA 免疫印迹 免疫组化 原杂|凋亡 细胞培养 血清 实验服务

ABOUT US
关于我们

博士德生物（BOSTER）于1993年由生物组织学家夏一方博士成立，是一家集研发、生产、销售为一体的高科技生物公司。Bosterbio研发中心于2011年在美国加州成立，团队成员由国内外分子生物学、免疫学、细胞学等领域的专家组成引领。博士德实时了解生物领域研究的风向标，致力于为全球科研机构提供优质科研产品和技术服务。

经过32年的不断努力和发展，产品涵盖抗体、ELISA试剂盒、免疫检测试剂盒、分子生物学试剂盒、细胞产品、重组蛋白等，并提供各类产品专项定制服务。公司成立之初，就树立了“成就具有国际竞争力的中国科研试剂品牌”的企业愿景。在不断创造业界奇迹的同时，也吸引了众多国内外生物学领域有着深厚造诣和经验丰富的科研人才加盟，配备了全套高新技术实验设备，全程自主研发，迄今为止抗体已达20000+种，ELISA试剂盒达1800+种，产品在全球科研工作者使用并发表文献达80000+篇，广泛应用于国内外10000+家科研单位、院校、医院、工业药企等。

公司在全球设有总代理和经销商合作伙伴，包括美国、德国、英国、加拿大、法国、瑞士、日本、新西兰、澳大利亚、泰国、马来西亚等，在国内每个省和直辖市设有办事处或合作伙伴。博士德32年的奋勇开拓，已为100多个国家的科学家们提供了科研产品和服务，并赢得了全球研究人员的信任，已发展成为国内外生物科研行业诚信和技术领先的标杆企业。

2012年成功通过
ISO9001:2008质量体系认证

2015年获评 CiteAb
全球抗体增长最快奖项

2018年成功通过
国家级高新技术企业认证

2021年荣获
杰出抗体供应商奖项

2024年ELISA试剂盒
由中国人保承保

1 抗体

严格验证的高特异性抗体；
广泛适配WB/IHC/IF/流式多平台；
批次稳定性认证，实验可重复性强；
相比进口同标准抗体，性价比高。

2 ELISA试剂盒

高灵敏度检测，数据稳定可靠；
血清/血浆/细胞上清全兼容，实验更灵活；
CV值≤10%，确保结果一致性；
免费代测服务，免除后顾之忧。

3 细胞系

种类齐全，涵盖实验常用细胞种属；
严格验证，无支原体&无病毒污染；
STR图谱/种属污染验证；
代次低，状态良好，活性高。

4 WB检测试剂

品种齐全，进口原料保障高品质；
严格质控，产品质量更有保障；
批间批内差小，数据精准可重复；
高性价比，快速交付，节省时间成本。

5 IHC检测试剂

产品灵敏度高，背景优；
操作简便，稳定性优异；
批间批内差小，实验结果可重复；
性价比高，货期快。

6 胎牛血清

正规优质血源，三级100nm过滤；
低内毒素，无细菌、真菌、支原体污染；
批间差小，保证实验的稳定性与可重复性；
500余种培养验证，优良的生长效果。

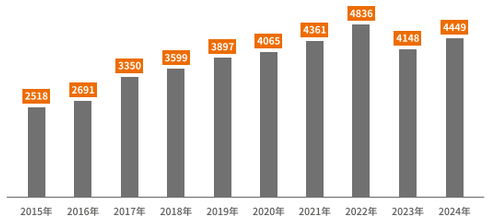
7 分子生物检测试剂

采用先进的探针设计，灵敏度高；
适用多种组织和细胞样本，支持多平台实验；
高特异性结合，无背景噪音，数据准确可靠；
高稳定性，批次一致性强。

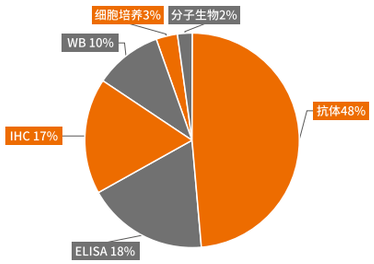
8 实验服务

专业定制服务，满足个性化需求；
全方位技术支持，覆盖多种实验领域；
提供病理/ELISA/分子/细胞类等实验服务；
高效代测服务，节省实验时间。

近十年SCI文献引用走势



产品文献引用占比



NO.1 一抗

引用占比最高
占比份额为

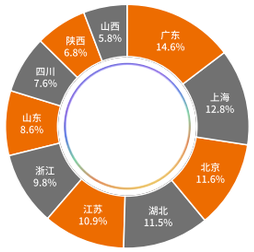
48%

NO.2 ELISA

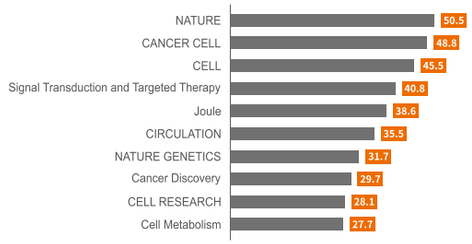
引用占比其次
占比份额为

18%

国内文献数量占比TOP 10



期刊影响因子TOP 10



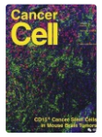
产品引用次数：82349 | SCI文献篇数：43491 | 总影响因子：173432 | 最高影响因子:66.85

CCT2 is an aggrephagy receptor for clearance of solid protein aggregates

IF=66.85

发表期刊： CELL
DOI： 10.1016/j.cell.2022.03.005
作者单位： 国家物学国家重点实验室
博士德引用产品：
Anti-TCP1 Antibody (M02389)

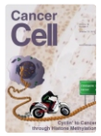
Distinct tumor architectures and microenvironments for the initiation of breast cancer metastasis in the brain



IF=48.8

发表期刊： CANCER CELL
DOI： 10.1016/j.ccell.2024.08.015
作者单位： 哈佛大学
博士德引用产品：
Anti-Macrosialin CD68 Antibody (PA1518)

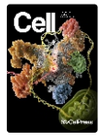
Distinct roles of TREM2 in central nervous system cancers and peripheral cancers



IF=48.8

发表期刊： CANCER CELL
DOI： 10.1016/j.ccell.2024.05.001
作者单位： 中山大学附属第一医院
博士德引用产品：
Anti-CD206 MRC1 Antibody (A02285-1)

IRE1α silences dsRNA to prevent taxane-induced pyroptosis in triple-negative breast cancer



IF=45.5

发表期刊： CELL
DOI： 10.1016/j.cell.2024.09.032
作者单位： 密苏里大学安德森癌症中心
博士德引用产品：
Anti-MEFV Antibody (A00764-1)

Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival

IF=64.8

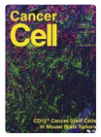
发表期刊： NATURE
DOI： 10.1038/s41586-023-06036-1
作者单位： 美国加利福尼亚大学
博士德引用产品：
Human Thrombospondin 1/THBS1 ELISA Kit(EK0899)

Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease

IF=49.962

发表期刊： NATURE
DOI： 10.1038/s41586-021-03734-6
作者单位： 麻省总医院
博士德引用产品：
Human IL3 ELISA Kit(EK0402)

Pericancerous cross-presentation to cytotoxic T lymphocytes impairs immunotherapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma



IF=48.8

发表期刊： CANCER CELL
DOI： 10.1016/j.ccell.2024.10.012
作者单位： 中山大学
博士德引用产品：
Human CXCL11 ELISA Kit(EK0737)

Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis

IF=43.07

发表期刊： NATURE
DOI： 10.1038/s41586-019-0948-2
作者单位： 麻省总医院
博士德引用产品：
Mouse M-CSF/CSF1 ELISA Kit (EK0445)

文献是最好的口碑！更多参考文献请查询博士德官网 **www.boster.com**

目录 Contents

第一章 抗体与抗原

一. 抗体与抗原的基础知识

1. 抗体与抗原的概念

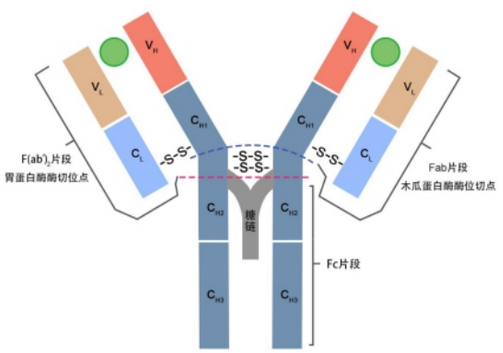
抗体：机体在抗原物质刺激下，由B细胞分化成的浆细胞所产生的、可与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白。免疫球蛋白是结构及化学的概念，而抗体是生物学及功能的概念。可以说，所有抗体都是免疫球蛋白，但并非所有免疫球蛋白都是抗体。

抗原：是指能够刺激机体产生（特异性）免疫应答，并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合，发生免疫效应（特异性反应）的物质。抗原的基本特性有两种，一是诱导免疫应答的能力，也就是免疫原性，二是与免疫应答的产物发生反应，也就是抗原性。

注：很多情况下，抗体与抗原是相对的概念，我们一般所说的抗原是指具有免疫原性和抗原性的物质。

2. 抗体的结构及特征

抗体是具有4条多肽链的对称结构，呈Y型，其中2条较长、相对分子量较大（约为50-75KD）的相同的重链(H链)；2条较短、相对分子量较小（约为25KD）的相同的轻链(L链)。链间由二硫键和非共价键联结形成一个由4条多肽链构成的单体分子。



重链有μ、δ、γ、ε和α五种，相对应的抗体就称为IgM、IgD、IgG、IgE、IgA。轻链有κ和λ两种。整个抗体分子可分为恒定区和可变区两部分。在给定的物种中，不同抗体分子的恒定区都具有相同的或几乎相同的氨基酸序列。可变区位于"Y"的两臂末端。在可变区内有一小部分氨基酸残基变化特别强烈，称为高变区。高变区氨基酸序列决定了该抗体结合抗原的特异性。一个抗体分子上的两个抗原结合部位是相同的，位于两臂末端称抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)。"Y"的柄部称结晶片段(crystalline fragment,FC)，在常规检测实验中是二抗结合的主要部位，也可以直接结合酶和荧光染料来标记抗体的片段。

现已知5 种免疫球蛋白中IgG、IgA 和IgD的H链各有一个可变区（VH）和三个恒定区（CH1、CH2 和CH3）共四个功能区。IgM和IgE 的H链各有一个可变区（VH）和四个恒定区（CHl、CH2、CH3和CH4）共五个功能区。VL和VH 是与抗原结合的部位，单体由一对L链和一对H链组成的基本结构，只有2 个与抗原结合的位点，如IgG、IgD、IgE、血清型IgA；双体由J链连接的两个单体，有4 个与抗原结合的位点，如分泌型IgA（sIgA），所以sIgA 结合抗原的亲合力要比血清型IgA 高。五聚体由J 链和二硫键连接五个单体，如IgM。五聚体IgM 理论上应为10 个与抗原结合的位点，但实际上由于立体构型的空间位阻，一般只有5 个结合点可结合。

免疫球蛋白特性					
	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
分子量	150kDa	900kDa	160kDa	200kDa	180kDa
重链类型	γ	μ	α	ε	δ
血清正常浓度	10-16mg/ml	0.5-2mg/ml	1-4mg/ml	0.00001-0.0004mg/ml	0-0.4mg/ml
占总IgG百分比	80	6	13	0.002	0.2
结构					

3. 抗原的分类

根据抗原是否具有免疫原性分为两类：完全抗原和不完全抗原。

完全抗原（complete antigen），是一类既有免疫原性，又有免疫反应性的物质，一般所说的抗原指的就是这类物质。如大多数蛋白质、细菌、病毒、细菌外毒素等都是完全抗原。

不完全抗原，即半抗原（hapten）是只具有免疫反应性，而无免疫原性的物质，故又称不完全抗原。半抗原要与蛋白质载体结合后，才能获得免疫原性。比如小分子量的多肽就属于一类半抗原，因其只是一个线性序列，没有空间构象，含有的表位少，免疫原性很差。

免疫原性好的抗原是制备好抗体的基础。商业化的抗体生产工艺中最常用的抗原（免疫原）有天然蛋白、重组蛋白、合成多肽。三种免疫原中天然蛋白免疫原性最好，重组蛋白次之，合成多肽最差。高纯度的天然蛋白很难获得，一般只在二抗生产中应用。合成多肽制备成本低，但其免疫原性差，识别天然蛋白的能力取决于多肽序列的设计是否合理，对设计人员的要求很高。相比之下重组蛋白（完全抗原）在免疫原性、制备成本、抗体制备成功率上综合优势最明显。博士德的抗体生产工艺经过了二十多年的摸索、积累与沉淀，现已形成一套完善成熟的设计、生产流程，立志为全球的科研工作者提供最高品质的产品。

4. 抗原抗体反应——免疫检测实验的基础

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反应。这种反应既可在机体内进行，也可以在机体外进行。抗原抗体反应的过程是经过一系列的化学和物理变化，包括抗原抗体特异性结合和非特异性促凝聚两个阶段，以及由亲水胶体转为疏水胶体的变化。

抗原抗体反应的特点：

特异性：特异性是抗原抗体反应的最主要特征，这种特异性是由抗原决定簇和抗体分子的超变区之间空间结构的互补性确定的。这种高度的特异性在传染病的诊断与防治方面得到有效的应用。随着免疫学技术的发展进步，还将在医学和生物学领域得到更加深入和广泛的应用，比如肿瘤的诊断和特异性治疗等。

比例性：比例性是指抗原与抗体发生可见反应需遵循一定的量比关系，只有当二者浓度比例适当时才出现可见反应，在抗原抗体比例相当或抗原稍过剩的情况下，反应最彻底，形成的免疫复合物沉淀最多、最大。而当抗原抗体比例超过此范围时，反应速度和沉淀物量都会迅速降低甚至不出现抗原抗体反应。

可逆性：可逆性是指抗原抗体结合形成复合物后，在一定条件下又可解离恢复为抗原与抗体的特性。由于抗原抗体反应是分子表面的非共价键结合，所形成的复合物并不牢固，可以随时解离，解离后的抗原抗体仍保持原来的理化特征和生物学活性。

二. 选择合适的实验应用

实验目的是什么？想要知道目的蛋白定位，或者想知道目的蛋白在样本中的表达量？依据实验目的，才能决定哪个实验应用最适合达成实验目的。

	IHC	ICC	WB	ELISA	FC
应用	亚细胞定位	亚细胞定位	相对蛋白含量	准确的蛋白含量	细胞表面标志物表达等
样本	固定过的细胞和组织	固定过的细胞	细胞和组织裂解液	血清、血浆和细胞上清等	固定过的或活细胞
结果	定性和半定量	定性和半定量	半定量	定性和定量	定量

三. 抗体的选择

选择了合适的实验应用，接着就需要考虑选择什么类型的一抗。抗体是免疫检测类实验的基础。市面上商品化的抗体产品数量是靶抗原的数十倍以上，也就是说对于某一特定抗原，市面上存在不止一种商品化的抗体，而且各种参数还不一样。如何从林林总总的产品中选择符合实验需求的抗体？通常需要注意以下几点：

1. 抗体的应用种属应包含样本种属

以博士德GFAP抗体为例，多抗有三种不同的货号，红框内表示抗体的应用种属，样本种属需在应用种属内。

产品货号	产品名称	产品描述	应用范围
PB9082	Anti-GFAP Antibody	human,mouse,rat	WB,IHC-P,IF
BM0055	Anti-GFAP Antibody	human,pig,rat	WB,IHC-P,IHC-F,IF
BA0056	Anti-GFAP Antibody	human,mouse,rat	WB,IHC-P,IF

选择抗体时首先考虑已验证过样本种属的抗体。博士德抗体的应用种属都是经过严格验证的，不含推测种属。但因亲缘关系较近的种属间同一蛋白往往有很多相同的氨基酸序列，抗体往往可以和多个物种的同源靶蛋白反应，所以当样本种属与抗体应用种属亲缘关系较近时，也可以选择该抗体进行尝试。

2. 抗体的应用范围要符合实验需求

产品货号	产品名称	产品描述	应用范围
PB9082	Anti-GFAP Antibody	human,mouse,rat	WB,IHC-P,IF
BM0055	Anti-GFAP Antibody	human,pig,rat	WB,IHC-P,IHC-F,IF
BA0056	Anti-GFAP Antibody	human,mouse,rat	WB,IHC-P,IF

抗体的应用实验范围一般包括IHC（IHC-P,IHC-F,ICC）、WB(western blot)、ELISA、FC、IF、IP等等。要选择应用范围包含自身需做实验类型的抗体。WB、IHC、FC是博士德每种抗体必做的验证实验，相关实验数据严格遵循实验结果。

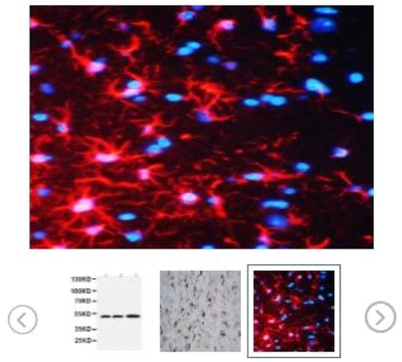
3. 厂家能提供检测结果图片

厂家能够提供抗体的检测结果，才能反映抗体质量的可靠性。

Anti-GFAP Antibody

Astrocyte antibody|FLJ42474 antibody|FLJ45472 antibody|GFAP antibody|antibody|Intermediate filament protein antibody

分类: 一抗 - 多克隆抗体 说明书: PDF



4. 注意一抗的种属来源

产生一抗的宿主应尽可能的与样本来源种属不同，以避免配套的二抗与样本中的内源性免疫球蛋白发生交叉反应，导致非特异染色。例如，当检测样本种属为鼠时，推荐使用兔源的一抗，二抗选择抗兔IgG。而对于WB的细胞裂解液样本，因其中不含内源性免疫球蛋白，则一抗来源种属的选择可以不用那么严格。另外，对于间接法免疫荧光双染实验，要求两种非标记一抗来源于不同种属，而两种二抗能特异性的识别其中一种一抗。

【单抗多抗如何选择】

现在市面上可选择的抗体主要分为多克隆抗体和单克隆抗体两种。两者的区别如下：

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高同源性的蛋白质，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。

5. 蛋白的名称及亚型

有些蛋白，如IKK、PKC、p38等有多个亚型，所以在选择抗体之前要确定好研究的蛋白亚型。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，这样的抗体一般会在抗体的名称中加入（pan）字样来标明，如Akt (pan)，就可以识别

Akt1、2、3等多个亚型，结果反映的也是所有Akt亚型的表达总水平。

6. 磷酸化修饰位点

由于抗体有很多磷酸化修饰位点，这样抗体在命名时会在蛋白名称后加上括号来标注，如Anti-Phospho-AKT1(T450) Antibody（BM4721），T450就是抗体识别的修饰位点。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，因此有些抗体可以同时识别不同亚型的相似修饰位点，这些能同时识别的位点都会标注在抗体名称后，实验结果反映的也是这些位点共有的表达水平。

7. 抗体的克隆号

抗体的克隆号反映的是抗体厂家在抗体克隆筛选过程中的原始克隆位置编号信息，这些信息一般对于抗体选择没有太大的影响。

四. 抗体的配制

好的染色效果就是阳性染色强度能和非特异性染色很好的区分和平衡。因此购买抗体后，都需要通过预实验来摸索最佳的抗体稀释度。

一抗稀释度	阳性染色强度	非特异性着色	一抗稀释度	阳性染色强度	非特异性着色
1:50	++++	++	1:400	+++	-
1:100	++++	++	1:500	++	-
1:300	+++	+	阴性对照	-	-

抗体的配制和稀释是免疫类实验的重要环节,抗体配制的精确度也关系着检测结果的可靠性和重复性。实验人员可以根据需要选择不同的抗体稀释液。如当天用完抗体可以使用PBS稀释即可,如长期保存使用，可以选用专用的抗体稀释液，因为抗体稀释液中含有明胶，BSA和NaN3，使得抗体储存时间更长久，抗体活性和效价更容易保持，通常通过抗体稀释液稀释的抗体，4℃储存三个月左右，-20℃可以保存至少一年。

五. 抗体的分装与保存

抗体保存得当与否，直接决定了抗体的活性和使用效果。如果抗体保存得当，大部分抗体活性都可以维持数月甚至数年。

1. 收到抗体后请在12000rpm离心30-300秒，将附着在管壁或盖内的抗体全部离心下来后再打开管盖进行分装和保存。

2. 对绝大多数抗体来说，保存在-20℃是完全足够的。没有任何证据显示保存在-80℃会有更多的好处。

3. 分装的量以一次实验用完为好，最少不要少于10ul每份。因为分装体积越小，抗体的浓度越可能会受到蒸发以及管壁吸附的影响。分装可以最大程度的降低反复冻融对抗体活性的损害，同时也降低了由于多次从同一管中吸取抗体造成的污染可能性。复融后的分装抗体如果一次用不完，将剩余母液保存在4度，避免再冻起来。

4. 大部分抗体收到后4度短暂保存1-2周对抗体活性是没有影响的，因蛋白在高浓度时更不容易降解。所以如果抗体很快(1-2周)会使用，推荐在4℃保存，这是为了避免反复冻融对抗体活性的损害。如果要长期保存则最好是在-20℃或-80℃。而对于抗体工作液来说最好当天配制当天用完。

5. 为了避免反复冻融，很多抗体公司会加50%的甘油到抗体中来避免反复冻融，甘油在-20℃会降低冰点，这对很多抗体可能是可行的。但加入甘油的溶液不建议在-80℃保存，因为这已经超过了甘油的冰点。

6. 因蛋白在高浓度时更不容易降解，因此部分抗体公司通过在抗体中加入BSA等蛋白质稳定剂来提高蛋白质浓度以达到保护抗体的目的。但是如果抗体要用来标记的话，则不能加入蛋白稳定剂，因为这些稳定剂会和抗体一起竞争结合标记物。

为了防止微生物污染，抗体溶液中一般会加入终浓度0.02%(w/v)的叠氮化钠。但在一些特殊情况下，如抗体用于处理活细胞和体内研究，以及要偶联带有氨基基团的抗体时，需要除去叠氮化钠。通常的去除方法有凝胶电泳和超滤法。

【特殊抗体的保存条件】

酶联抗体：保存在4℃，避免冻起来。否则会导致酶活性的下降或者丧失。

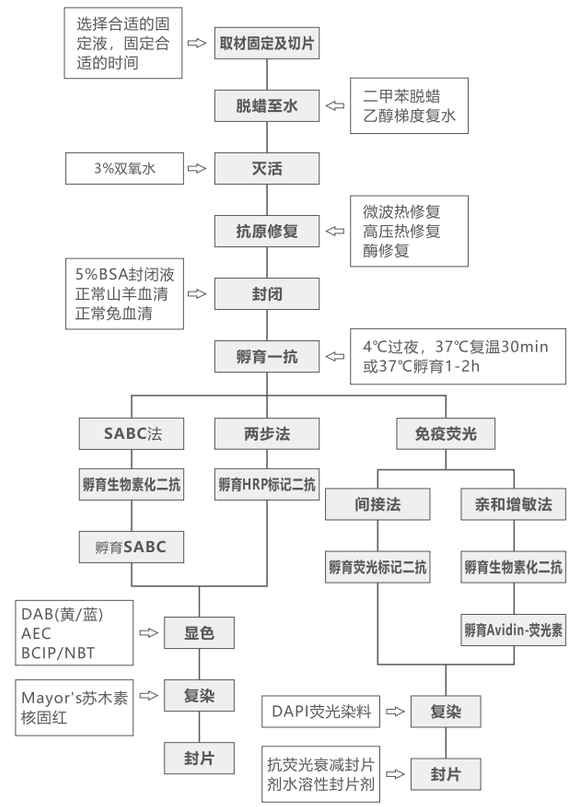
偶联抗体：所有偶联抗体都是在棕色管中或使用锡箔纸避光保存。尤其是荧光抗体，对光极为敏感，因此在所有的实验阶段也是要避光操作的。偶联后的抗体可以加入叠氮化钠保存，但是浓度只能是0.01%。对于需要偶联的抗体，thimerosal(merthiolate)可以替代叠氮化钠作为保护剂。

IgG3的同型对照：永远保存在4℃，避免冻起来。因为如果出现冻融过程，该抗体非常容易形成多聚体。

第二章 免疫组织细胞化学/荧光

免疫组织细胞化学/荧光是一门利用酶、荧光素、生物素、重金属离子等作为示踪剂，通过免疫亲和（抗原抗体特异性结合），在组织或细胞上原位显示追踪生物体内抗原物质动态变化规律，对相应抗原进行定性、定位或定量研究的技术。

以石蜡片为例，以下是组化的一般性实验步骤：



一. 样本制备

1. 取材

组织样本的取材

1) 刀剪锐利、洁净。

2) 快速、准确、尽量保持生活状态，力争1分钟之内放入固定液，最迟不能超过3分钟。要清楚取材的部位和内部，对病理组织还应做到以下几点：

① 取材部位必须是主要病变区。

② 必须取病灶与正常组织的交界区

③ 必要时取远离病灶的正常组织做对照。

3) 一刀切取，切取应在蜡版或滤纸上进行，避免拉锯、牵拉或挤压等动作。

4) 低温操作，防止自溶现象，通常以0℃-4℃的低温条件下操作为佳。

5) 定位准确，取材时必须注意样品的定向和定位，即头、尾、左、右以及上、下方向。切好的样品贴放在滤纸片上，标记好定向标志，防入预冷固定液内，或冰冻切片或短时间冷冻保存。

6) 样品大小适当，光镜样品一般在1.0cm以内，免疫组织化学样品大约在2cm×1.5cm×0.3cm[厚度控制在0.3cm]。电镜样品规格要求切成0.5-1.0cm^{3}小块。

细胞标本的取材

1) 印片法

应用：活检标本、手术切除的标本。

方法：新鲜标本以最大面剖开暴露病区，载玻片轻压病区，脱落细胞黏附于载玻片上，立即浸入固定液中5-10分钟，取出自然干燥，低温保存。

优点：简便省时，细胞抗原保存较好。

缺点：细胞分布不均重叠，影响标记效果。

2) 穿刺吸取涂片法

应用：实质器官的病变区。

方法：①穿刺液较少时直接涂片，力求均匀。②穿刺液较多时，穿刺液滴入1-2毫升Hanks液（RPMI -1640液）内，轻搅，500rpm离心5-10分钟弃上清，制成细胞悬液（1x10^{6}细胞ml）吸一滴于载玻片上，轻涂，干后固定。

3) 体液沉淀涂片法

① 细胞数多，取一滴直接涂片。

② 细胞数少，取毫升自然沉淀液以1500rpm离心10分钟，弃上清，将沉淀涂片，略干后固定备用。

4) 培养细胞

① 贴壁生长的细胞：将盖玻片插入培养液中。

② 生长的细胞：可用离心涂片法制成涂片。

5) 离心涂片机法

将待涂片的细胞样品或2×10$^{5-6}$/ml的细胞悬液，吸取50-100ul加入涂片机内，1000r/min离心2min后细胞就均匀的分布于玻片上。

注意事项：

① 防止脱片, 涂黏附剂。

② 为节省试剂及便于镜下观察和计数，将细胞集中到直径0.6-1.0cm圆圈内，细胞总数以 10^{5}为宜。

③ 粘液丰富的标本如胃液、痰液等未经特殊处理，不宜作免疫组化。

2. 固定

1) 固定的作用

从免疫组化技术的角度，固定的作用不仅是使细胞内蛋白质凝固，尽量减少或终止外源性酶和内源性酶的反应；防止细胞的自溶，以免使抗原扩散至组织间质；以保持组织的固有形态和结构，更重要的是保持组织或细胞的抗原性，不但要使抗原不导致失活，而且不使抗原发生弥散的现象，才能在免疫组化染色时，不产生过深的背景，影响对阳性物的判断。

2) 如何选择固定液?

4%中性甲醛：最常用的固定液，能满足常规HE及免疫组化、PCR等工作。一般无特殊要求的病理标本均适用。

乙醇：具有硬化、固定、脱水等效果，对组织渗透力较弱，因此很少单独使用，但其保存组织中的核酸强于中性甲醛，故常用于有核酸操作的实验或检查，如果用于证明尿酸结晶或保存糖原，可用100%乙醇固定组织，另外因乙醇能溶解脂质及类脂体，故在证明细胞内有脂肪存在时，不能用乙醇做固定剂和脱水剂。

丙酮：极易挥发，可使蛋白质沉淀，渗透力强，核的固定不好，易使组织收缩，常用于组织中各种酶的固定。其作用与乙醇基本相同，但对糖原无固定作用。

4%多聚甲醛：较适于免疫细胞化学研究，可长期保存标本，动物灌注固定及后固定，也常选该固定液固定，是常用的固定剂之一。

乙醇-甲醛（A-F液）：适用于皮下组织中肥大细胞的固定。该固定液有固定兼脱水作用，固定后的标本可直接入95%乙醇脱水，所以在时间紧迫的情况下该固定液是较好的选择。

Bouin液：穿透力强，固定均匀，对组织收缩小，染色效果好，对大多数组织固定良好，特别适用于睾丸活检组织的固定，是常用的固定剂之一。

B5（醋酸钠 - 甲醛）：多用于固定淋巴组织。染色前进行脱汞沉淀处理。

Carnoy液：穿透能力强，可很好的固定细胞质和细胞核，尤其适于染色体的固定，亦适用于糖原及尼氏小体的固定。外膜致密的组织用此固定液效果也很好。

Zenker液：经此液固定的标本，细胞核和细胞质染色颇为清晰，对免疫球蛋白染色最佳，但成本较昂贵且需特殊处理汞。

不同的抗原和标本需经过反复试验，选用最佳固定液。不少学者认为，迄今尚无一种标准固定液可用于各种不同的抗原固定。而且不同的固定液固定相同的组织，免疫组化染色标记结果也可能截然不同。

待测抗原	适用固定液
细胞表面抗原	100%丙酮，95%乙醇，10%福尔马林，4%多聚甲醛，Bouin液
免疫球蛋白	Zenker固定液，10%福尔马林，4%多聚甲醛，95%乙醇，100%丙酮
酶，蛋白类	10%福尔马林，4%多聚甲醛，Bouin液，95%乙醇，100%丙酮
肽类激素	Bouin液，10%福尔马林，4%多聚甲醛，FAA固定液
固醇类	10%福尔马林，4%多聚甲醛，Bouin液
补体	95%乙醇，100%丙酮，10%福尔马林，4%多聚甲醛，Bouin液
肿瘤胚胎抗原	10%福尔马林，4%多聚甲醛

注意事项：

① 组织取材要快速，不宜过大，一般1.0cmX1.0cmX0.2cm，避免人为损伤。组织要新鲜，取材后立即固定。

② 固定液的体积一般为组织体积的10-15倍。

③ 固定效果随温度升高而加强，4℃和室温最常用。

④ 组织块越大，固定时间越久。一般1mm对应1小时。

⑤ 另外固定时间不要过久。实验证明甲醛固定时间越久的组织越容易出现自发荧光及非特异性染色。

3) 固定的方法

原位固定法

原位固定法是在保持动物对其器官组织血液供应的条件下，边解剖边向所取样本的部位滴加预冷的固定液的一种方法。这种方法有益于组织细胞酶活性和结构的保存，不足之处是对动物刺激时间较长，因此应快速取样，断头处死动物。

浸透固定法

浸透固定法是将组织块浸泡在固定液内而固定的一种方法。在组织化学样品的处理上，对浸透的时间、温度有一定的要求，特别是免疫组织化学样品的要求更严一些。

灌流固定法

灌流固定法是通过血管的途径，将固定液灌注到所要固定的器官组织内，将生活的细胞在原位及时的固定后，再摘取样品的方法。这种方法的特点是：快速、固定充分，但是对固定液的温度、压力及取材时间有严格的要求。

培养细胞和外周血细胞固定法

培养细胞核外周血细胞的固定方法比较特殊，对培养细胞通常取盖片入37℃的Hanks液中，漂洗两次(每次3—5min)，洗除血清后，再置于甲醛缓冲固定液内10—30min。.如果进行电镜观察就以2%戊二醛固定或采取双重固定法。

3. 切片制备

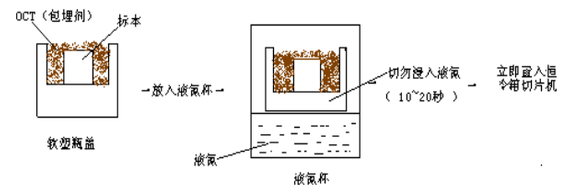
1) 冰冻片

冰冻片是免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法。其最突出的优点是能够较完好地保存多种抗原的免疫活性，尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜的组织及已固定的组织均可作冰冻切片。

冰冻时，组织中水分易形成冰晶，往往影响抗原定位。一般认为冰晶少而大时，影响较小，冰晶小而多时，对组织结构损害较大，在含水量较多的组织中上述现象更易发生。

冰冻片常采用液氮法制备，具体做法如下：

将组织置于20%-30%蔗糖溶液1～3天沉底，利用高渗吸收组织中水分，减少组织含水量。取出组织平放于软塑瓶盖或特制小盒内（比如用铝箔纸折成有口的方盒），加入适量OCT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汽化沸腾，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℃冰箱贮存备用，或置入恒冷箱切片机冰冻切片。



2) 石蜡片

其优点是组织结构保存良好，在病理和回顾性研究中有较大的实用价值，能切连续薄片，组织结构清晰，抗原定位准确。石蜡切片优点较多，但在制片过程中要经过酒精、二甲苯等有机溶剂处理，组织内抗原活性失去较多。

常规石蜡切片制作一般程序：

① 取材

② 固定

③ 脱水：升梯度酒精脱水

50%→70%→80%→90%→95%→100%

3～4h　　1.5h

④ 透明：用二甲苯、观察组织块至透明为止（0.5～1h，共两次）

⑤ 浸蜡：一般用两个蜡缸。石蜡Ⅰ(＜60℃＝1h；石蜡Ⅱ(60℃)2 h)

⑥ 包埋：铁板架包埋或其他容器，有时要求快速冷却

⑦ 切片和贴片：在切片机上切片，置水槽中展片、捞片和贴片

【实验是选择石蜡切片还是冰冻切片】

要求做冰冻切片的不一定能做石蜡切片，因为做石蜡切片时要高温烤片，可能会破坏组织的抗原性，如果组织的抗原较稳定，则可做石蜡切片；但是要求做石蜡切片的，一般可做冰冻切片。选择的时候最好同时看看所购抗体的说明书，看其适用于何种切片。若两种都适合，若染色的目的是为了看组织中有没有该抗原，可选用冰冻切片，若想了解具体的分布情况，可选择石蜡切片。

3) 细胞片

贴壁细胞的细胞爬片制作：

① 将处理好的盖玻片放入接种了细胞的培养瓶或六孔板内。

② 待细胞生长达到60%以上后取出玻片。

③ 用4%的多聚甲醛固定30min左右。可加甘油封存置于-20℃保存。

悬浮细胞的细胞爬片制作：

① 离心将细胞收集出来，用预冷的PBS洗2－3遍，最后用PBS将细胞重悬。

② 吸取30－50ul（可根据细胞量调整）滴至处理过的载玻片上，然后涂抹均匀。

③ 待稍微风干以后加4％多聚甲醛溶液覆盖细胞，固定2－4小时。在细胞上加一层甘油放-20℃保存。

二. 免疫组化实验操作

1.SABC三步法（以博士德货号为SA1022即用型SABC试剂盒为例）

免疫组化染色程序的选择

A 程序：石蜡切片热修复抗原程序。促进某些位于蛋白质内部的位点暴露。

B 程序：石蜡切片酶消化程序。促进某些被固定遮避的抗原位点暴露。

C 程序：石蜡切片不消化/不修复程序。适于稳定的抗原。

D 程序：细胞涂片，冰冻切片染色程序。

A程序：石蜡切片热修复抗原染色程序

1) 载玻片防脱片剂处理：(APES 或Poly-Lysine)，捞片后置烤箱(58-60℃)30-60min以使切片紧密粘附。或直接使用博士德多聚赖氨酸处理的防脱玻片(AR1065)。

2) 切片常规脱蜡至水。二甲苯分三缸，每缸各浸泡7min。95%、80%、60%乙醇依次各浸泡5min。水洗3次。

3) 3% H_2O_2室温孵育5-10min以灭活内源性酶。蒸馏水洗3次。

4) 热修复抗原:将切片浸入修复缓冲液（柠檬酸盐或EDTA修复液），电炉或微波炉加热至沸腾后断电，间隔5-10min后，反复1-2次。室温自然冷却后PBS（AR0030）洗涤1-2 次。

5) 滴加封闭液5%BSA，室温20分钟。甩去多余液体，不洗。

6) 滴加适当稀释的一抗，4℃过夜后37℃复温30min，也可37 ℃孵育1-2h。PBS（AR0030）洗2 min×3 次。

7) 滴加生物素化山羊抗兔IgG， 37℃ 30min。PBS(AR0030)洗2min×3 次。

8) 滴加试剂SABC，37℃ 30min。PBS（AR0030）洗5 min×4 次。

9) DAB (AR1022)显色：室温显色, 镜下控制反应时间，建议一般不超过10min。蒸馏水洗涤。

10) 苏木素（AR0005）轻度复染。脱水，透明，中性树胶封片(AR0038)。显微镜观察。

B程序：石蜡切片酶消化程序

以下面的步骤代替A 程序中的第4 步:滴加复合消化液（博士德有售）5-10min。蒸馏水洗3次。也可以使用0.1%的胰蛋白酶作消化液。

C程序：石蜡切片不消化/不修复程序

对于不需要微波修复或消化的抗原,省略A 程序中的第4 步即可。

D程序：血涂片，细胞和冰冻切片染色程序

1) 载玻片经防脱片剂处理（Poly-L-Lysine Ar0003）。抗凝血经分层离心后涂片；培养细胞也可涂片或贴片生长；冰冻切片室温风扇吹干。

2) 固定方案首选4%多聚甲醛或10%福尔马林固定30 min。

3) 3% H_2O_2室温浸泡30min，以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗1-2次。其余步骤和石蜡切片5-10步相同。如果冰冻切片直接染色结果

不理想时,可以参照石蜡切片对切片进行热修复，方法和石蜡切片4-10步相同。

注：以上的实验步骤采用的都是经典的ABC三步法法操作步骤。博士德推出两步法的检测试剂盒，主要特点是二抗换用聚合HRP标记的二抗，省去了孵育SABC的步骤，更为简单、快速；敏感性高，背景染色更低。

2. SV二步法（以博士德货号为SV0001的即用型SV超敏两步法试剂盒为例）

石蜡片染色步骤：

1) 石蜡切片(多聚赖氨酸处理的防脱玻片AR1065)，常规脱蜡至水。

2) 3% H_2O_2室温孵育5-10分钟，以消除内源性过氧化物酶活性。PBS(AR0030)洗涤，5 分钟×3 次。

3) 根据需要选择抗原修复方式及强度。可热修复、酶修复或不修复。热修复可选用枸橼酸盐缓冲液(AR0024)、EDTA 抗原修复液(AR0023)等作为抗原修复液。酶修复可选用复合修复液(AR0022)、抗原修复液Ⅰ(AR0026，与热修复配合使用)、胰蛋白酶(AR1007)、胃蛋白酶(AR1008)消化组织。

4) 封闭。滴加5%BSA 封闭液，37℃孵育30分钟，甩干，勿洗。

5) 滴加一抗，37℃孵育1-2小时或4℃过夜。PBS洗涤，5分钟×3 次。

6) 滴加聚合HRP 标记抗小鼠IgG，37℃孵育30分钟，PBS 洗涤，5分钟×3次。

7) 显色液显色，镜下控制反应时间。显色剂可选DAB(AR1022)或AEC(AR1020)。自来水充分洗涤。

8) 根据需要进行苏木素(AR0005)复染，染色时间为0.5-2 分钟。脱水，透明。

9) 选用中性树胶(AR0038)，水溶性封片剂(AR1018)或其他适当的封片剂封片。

注：对于免疫荧光实验，可以参照前面的步骤流程图，换用相应的荧光二抗或荧光标记SABC以及核染料DAPI。试剂孵育及清洗时间可以参照上面的步骤。对于双标或多标的免疫荧光实验需要根据一抗的来源对实验步骤做适当的调整。

三. 免疫荧光实验操作

1. 荧光SABC三步法（以博士德货号为SA1074的浓缩型SABC三步法试剂盒为例）

A程序：石蜡片热修复染色步骤

1) 石蜡切片(多聚赖氨酸处理的防脱玻片AR1065)，常规脱蜡至水。

2) 根据需要选择抗原修复方式及强度。可热修复、酶修复或不修复。

3) 热修复抗原：将切片浸入到EDTA 修复液中，微波炉加热到沸腾后断电，间隔5-10min 再修复1-2 次，冷却。

4) 滴加用稀释后的正常山羊血清封闭液(稀释比1:10)，室温20min，甩干，勿洗。

5) 滴加适当稀释的一抗，37℃孵育1-2 小时或4℃过夜。PBS 冲洗，5min×3 次。

6) 滴加稀释的生物素标记羊抗兔IgG(1:100)，37℃孵育30min。PBS 冲洗，5min×3 次。

7) 滴加稀释的SABC-CY3(1:100)，37℃孵育30min。PBS 冲洗，5min×4 次。

8) 抗荧光衰减封片剂(AR1109)或抗荧光淬灭PVP封片液(AR0036)封片。

9) 荧光显微镜观察。

B程序：石蜡片酶消化染色步骤

将A程序的第4步滴加酶消化液室温5-10min。酶修复可选用复合修复液(AR0022)、胰蛋白酶(AR1007)、胃蛋白酶(AR1008)消化组织。蒸馏水洗2min×3 次。

C程序：石蜡切片酶不消化/修复程序

对于不需要微波修复或消化的抗原,省略A程序中的第4步即可。

D程序：细胞片的染色步骤

1) 爬片。圆形盖破片经防脱片剂处理（Poly-L-Lysine AR0003），灭菌，备用。贴壁细胞消化后加入放有盖玻片的24 孔板中培养1-2 天，使细胞贴壁。悬浮细胞则处理后直接涂片，使细胞贴附。

2) 固定。4℃预冷4%多聚甲醛固定20min 或冷丙酮固定10min。蒸馏水洗2min×3 次。

3) 打孔。0.25% Triton X-100 处理细胞15min。（若采用丙酮固定则此步骤可省略）

4) 酶消化处理室温5-10min。酶消化可选用复合修复液(AR0022)、胰蛋白酶(AR1007)、胃蛋白酶(AR1008)。蒸馏水洗2min×3 次。

5) 滴加用稀释后的正常山羊血清封闭液(稀释比1:10)，室温20min，甩干，勿洗。

6) 滴加适当稀释的一抗，37℃孵育1-2 小时或4℃过夜。PBS(AR0030)冲洗，5min×3 次。

7) 滴加稀释的生物素标记羊抗兔IgG(1:100)，37℃孵育30min。PBS(AR0030)冲洗，5min×3 次。

8) 滴加稀释的SABC-CY3(1:100)，37℃孵育30min。PBS(AR0030)冲洗，5min×4 次。

9) 抗荧光衰减封片剂(AR1109)或抗荧光淬灭PVP封片液(AR0036)封片。

10) 荧光显微镜观察。

2. 荧光二步法（以博士德货号为BA1031的CY3-羊抗小鼠IgG为例）

A程序：石蜡片热修复染色步骤

1) 石蜡切片 (多聚赖氨酸处理的防脱玻片AR1065)，常规脱蜡至水。

2) 根据需要选择抗原修复方式及强度。可热修复、酶修复或不修复。

3) 热修复抗原：将切片浸入到EDTA 修复液中，微波炉加热到沸腾后断电，间隔5-10min 再修复1-2 次，冷却。

4) 滴加用稀释后的正常山羊血清封闭液(稀释比1:10)，室温20min，甩干，勿洗。

5) 滴加适当稀释的一抗，37℃孵育1-2 小时或4℃过夜。PBS 冲洗，5min×3 次。

6) 滴加稀释的CY3标记羊抗小鼠IgG(1:50-100)，37℃孵育30min。PBS 冲洗，5min×3 次。

7) 抗荧光衰减封片剂(AR1109)或抗荧光淬灭PVP封片液(AR0036)封片。

8) 荧光显微镜观察。

B程序：石蜡片酶消化染色步骤

将A程序的第4步滴加酶消化液室温5-10min。酶修复可选用复合修复液(AR0022)、胰蛋白酶(AR1007)、胃蛋白酶(AR1008)消化组织。蒸馏水洗2min×3 次。

C程序：石蜡切片酶不消化/修复程序

对于不需要微波修复或消化的抗原,省略A程序中的第4步即可。

D程序：细胞片的染色步骤

1) 爬片。圆形盖破片经防脱片剂处理（Poly-L-Lysine AR0003），灭菌，备用。贴壁细胞消化后加入放有盖玻片的24 孔板中培养1-2 天，使细胞贴壁。悬浮细胞则处理后直接涂片，使细胞贴附。

2) 固定。4℃预冷4%多聚甲醛固定20min 或冷丙酮固定10min。蒸馏水洗2min×3 次。

3) 打孔。0.25% Triton X-100 处理细胞15min。（若采用丙酮固定则此步骤可省略）

4) 酶消化处理室温5-10min。酶消化可选用复合修复液(AR0022)、胰蛋白酶(AR1007)、胃蛋白酶(AR1008)。蒸馏水洗2min×3 次。

5) 滴加用稀释后的正常山羊血清封闭液(稀释比1:10)，室温20min，甩干，勿洗。

6) 滴加适当稀释的一抗，37℃孵育1-2 小时或4℃过夜。PBS(AR0030)冲洗，5min×3 次。

7) 滴加稀释的CY3标记羊抗兔IgG(1:50-100)，37℃孵育30min。PBS(AR0030)冲洗，5min×3 次。

8) 荧光显微镜观察。

四. 常见问题

1. 3%H_2O_2溶液灭活内源性过氧化物酶是否有必要?

内源性过氧化物酶通常存在于组织的红细胞、坏死区域和急性炎症组织中的中性粒细胞，一般在血管瘤、肝、胎盘、阑尾炎等组织含量较高。

如果显色系统为过氧化物酶（HRP）系统，使用DAB显色，那么高含量的内源性过氧化物酶会干扰组化结果的判读。但如果显色系统不是过氧化物酶系统，例如碱性磷酸酶（AP）系统，或者为免疫荧光时，内源性的过氧化物酶基本不会对实验结果产生影响。

关于H_2O_2的使用，有的使用是单纯的H_2O_2稀释溶液，有的使用是H_2O_2甲醇混合物。根据实验，认为H_2O_2甲醇较适合于大多数的情况，因为除了H_2O_2外，甲醇对各种酶，都有钝化的作用，因此H_2O_2甲醇的双重作用效果较好。

需要注意的是灭活用的3%H_2O_2溶液需现配现用。

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。

2. 抗原修复方式如何选择?

抗原修复的方式主要有三种：酶修复、高压热修复、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。

1) 消化酶的选择

针对要显示的抗原成分不同要选用不同的酶。一般胃蛋白酶和菠萝蛋白酶主要用于细胞间质抗原的检测，例如纤连蛋白(fibronectin)、层黏连蛋白(lanninin,LN)和各类胶原的显示。其余消化酶酶均可用于细胞内抗原的检测。需格外注意的是各种消化酶的最佳工作PH值。

2) 修复液的选择

抗原热修复中所使用的修复液PH值会对染色结果产生相当大的影响。PH值对染色结果的影响大概可以分为以下四种情况：①稳定型，PH值对染色结果影响不大，如PCNA、AE1、EMA、CD20等；②V型，高PH值和低PH值染色较好，而PH值4-5染色结果较差，如ER、Ki-67等；③上升型，随着PH值的增加，染色结果逐渐增强，如HMB45等。④下降型，随着PH值的增加染色结果逐渐减弱，当然这种类型的抗体只是个别的现象，如MOC31。目前应用最多的修复液有枸橼酸盐修复原液和EDTA修复液。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。但是由于传统习惯，绝大多数医院和实验室都在使用PH6.0的枸橼酸缓冲液。

3) 修复强度的选择

大量的实验表明，固定时间越长的标本，它所形成的桥连就越紧密，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。

3. 封闭液如何选择?

封闭剂应封闭所有的未结合位点而不替换表面上的靶蛋白、不结合靶蛋白表位、也不与抗体或检测试剂有交叉反应。

5%BSA是最常用的封闭剂，成分单一适用于大多数情况。但因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，产生背景。

另外最常用的就是用血清封闭。其原理主要有两点，第一是待检样本会有些与蛋白非特异性结合的物质，从而导致背景过高，因此可以用BSA或血清封闭掉这部分非特异性的结合，从这点看，BSA和血清没有明显区别。第二是待检样本中可能会有Fc受体，可以和抗体恒定区结合，与抗体特异性无关，封闭血清中有抗体，因此用血清可以封闭掉一抗及二抗和样本Fc受体之间结合。BSA则无法封闭Fc受体。

封闭血清一般选择和二抗同一来源的，血清中动物自身的抗体，预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合，否则在后面的步骤中如果和二抗发生结合，会造成背景。但要注意封闭用血清中不能含有目标蛋白，且与一抗来源不同。

4. 抗体孵育条件如何？

一抗孵育条件有三种：4℃过夜、室温（温度恒定20℃）2-3h、37℃1-2h，其中4℃过夜效果最佳，但孵育时间较长，样本取出后需37℃复温30min。

二抗一般37℃或室温30min-1h，具体时间需要根据染色情况进行调整。

5. 二抗如何选择？

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。

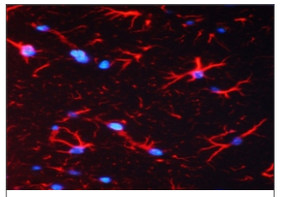
另外二抗因尽量少选取兔子或老鼠来源的，因为这两个在亲缘关系上和人类非常接近，所以产生交叉反应的机会就比较大，从而导致背景比较高。适合选用来源于驴，山羊，绵羊等的二抗，背景相对就很低。

博士德生物不仅提供两万余种优质一抗，还提供优质齐全的组化检测试剂：

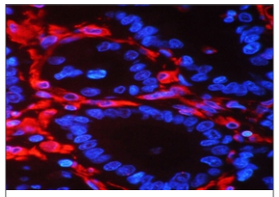
类别	产品名称	货号
固定	4%多聚甲醛(不含DEPC)	AR1068
	EDTA脱钙液	AR1071
切片	防脱片玻片(多聚赖氨酸处理)	AR1065
灭活	内源性过氧化物酶阻断液	AR1108
修复	柠檬酸钠抗原修复液	AR0024
	EDTA抗原修复液(10X)	AR0023
	PBS漂洗缓冲液	AR0030
	复合消化液	AR0022
封闭	5%BSA封闭液	AR0004
	即用型正常山羊血清	AR0009
二抗	FITC-羊抗兔IgG	BA1105
	FITC-羊抗小鼠IgG	BA1101

类别	产品名称	货号
二抗	DyLight®488-羊抗兔IgG	BA1127
	DyLight®488-羊抗小鼠IgG	BA1126
	CY3-羊抗兔IgG	BA1032
	CY3-羊抗小鼠IgG	BA1031
	TRITC-羊抗兔IgG	BA1090
	TRITC-羊抗小鼠IgG	BA1089
显色	DAB显色试剂盒(黄)×20	AR1022
	AEC显色试剂盒(红色)	AR1020
	BCIP/NBT显色试剂盒(蓝-紫)	AR1023
复染、封片	Mayor'苏木素	AR0005
	核固红	AR0008
	DAPI染色液	AR1176
	中性树胶	AR0038
	水溶性封片剂	AR1018
	抗荧光淬灭封片剂	AR1109
	抗荧光淬灭PVP封片液	AR0036
SABC三步法试剂盒	即用型SABC-POD(兔IgG)试剂盒	SA1022
	即用型SABC-POD(小鼠IgG)试剂盒	SA1021
	即用型SABC-AP(兔IgG)试剂盒	SA1052
	即用型SABC-AP(小鼠IgG)试剂盒	SA1051
SV超敏两步法试剂盒	多聚体抗兔IgG-HRP	SV0002
	多聚体抗小鼠IgG-HRP	SV0001
	多聚体抗兔/小鼠IgG-HRP	SV0004
SABC三步法试剂盒(荧光)	浓缩型DyLight 488-SABC(小鼠IgG)试剂盒	SA1092
	浓缩型DyLight 488-SABC(兔IgG)试剂盒	SA1094
	浓缩型SABC-CY3(POD)(兔IgG)试剂盒	SA1043
	浓缩型SABC-CY3(POD)(小鼠IgG)试剂盒	SA1041
	浓缩型SABC-FITC(兔IgG)试剂盒	SA1064
	浓缩型SABC-FITC(小鼠IgG)试剂盒	SA1062

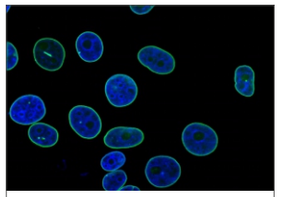
博士德生物组化相关试剂检测结果图片展示



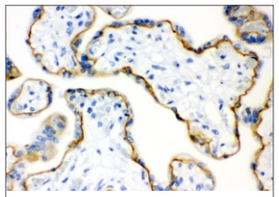
GFAP（PB0046）小鼠脑组织石蜡切片，稀释比1:200，二抗为Cy3-羊抗兔IgG（BA1032），稀释比1:100，DAPI（AR1176）染核。



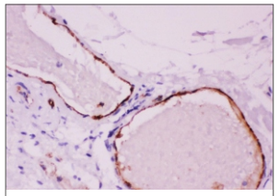
Vimentin（BM0135）人直肠癌石蜡切片，一抗稀释比1:200，二抗为Cy3-羊抗小鼠IgG（BA1031），稀释比1:100，DAPI（AR1176）染核。



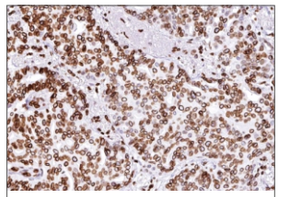
Lamin B1（PB0640）MCF-7细胞，稀释比1:100，二抗为DyLight®488-羊抗兔IgG（BA1127），稀释比1:200，DAPI（AR1176）染核。



E-cadherin(PB0583)人胎盘石蜡切片，SABC法（SA1022），DAB显色（AR1022）。



VWF(PB0086)人肺癌石蜡切片，SV两步法（SV0002），DAB显色（AR1022）。



Lamin-A/C(PB0307)人乳腺癌石蜡切片，SV两步法（SV0002），DAB显色（AR1022）。

五. 免疫组化结果判读与分析

1. 组化结果分析

给大家推荐三种可以量化的方法：

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。

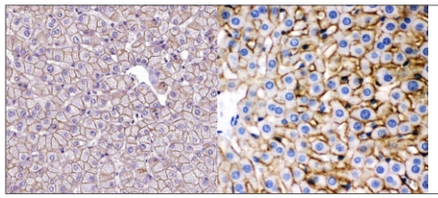
2) 灰密度分析法。通过在不同组别和不同动物组织切片上选择相同区域、相同条件下用Image J进行灰密度分析，然后进行统计分析即可。

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。

注：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。

2. 抗原在细胞中的定位

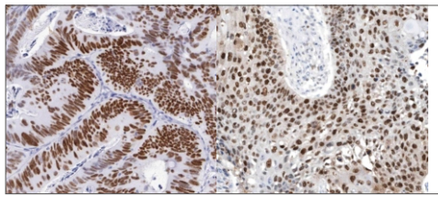
1) 胞膜型表达：阳性染色颗粒主要定位于细胞膜表面。常见的有淋巴细胞膜抗原(如LCA、CD20、CD4、CD8等)、间皮细胞抗原(如MCA、CR、CK5/6等)、细胞膜受体(insulinR、FAS、CD25等)、黏附分子(整合素、干扰素、钙黏蛋白等)、上皮细胞抗原(EMA、ECA、ESA等)等。



左图为
E-cadherin
在肝癌中胞膜阳性

右图为
NTCP在大鼠
肝脏中胞膜阳性

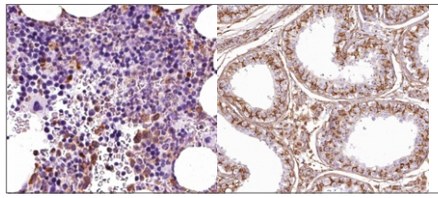
2) 胞核型表达:阳性颗粒定位于细胞核中。常见的有增殖细胞周期抗原(Ki-67、PCNA等)、性激素受体(ER、PR、AR等)、肿瘤相关基因(P53、P27、BRCA1等)、肌核抗原(Myf-3、MyoD1等)、淋巴细胞核抗原(OCT-2、MUM1等)、上皮细胞核抗原(P63、TTF-1等)等。



左图为
P53在结肠癌
中胞核阳性

右图为
PCNA在
肺癌中胞核阳性

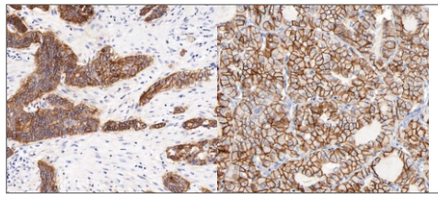
3) 胞质型表达：阳性颗粒定位于细胞质。常见的有细胞结构蛋白(中间丝蛋白、微丝蛋白等)、细胞内酶和功能蛋白(MPO、NSE、PLAP等)、神经内分泌物(GH、PLR等)等。



左图为
MPO在小鼠
骨髓中胞质阳性

右图为
VIM在睾丸癌
中胞质阳性

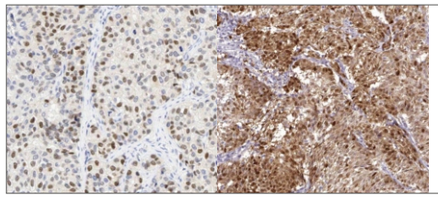
4) 胞膜-质型表达：阳性颗粒分布于细胞质和细胞膜。常见的有肿瘤相关抗原(如CA家族抗原)、间皮标志物(MCA、CR等)等。



左图为
EGFR在尿路上皮
癌中胞膜-质阳性

右图为
EPCAM在甲状腺
癌中胞膜-质阳性

5) 胞核-质型表达：阳性颗粒分布于细胞核和细胞质。常见的有S-100、HMB45、Melan A、HSP27、MLH1等。



左图为
CCND1在乳腺癌
中胞核-质阳性

右图为
S100B在黑色素瘤
中胞核-质阳性

3. 组化实验中如何设置对照？

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。阴性对照主要用非相关抗体，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。

六. 免疫组化常见问题及解决办法

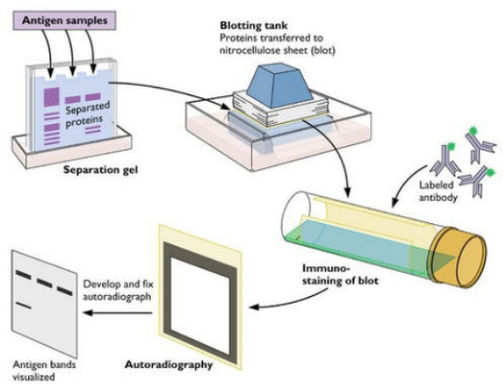
问题	可能原因	验证或解决办法
无染色	一抗和二抗不匹配	使用针对一抗的二抗（如一抗来自兔，二抗为抗兔抗体）
	没有足够的一抗与目标蛋白结合	提高一抗用量。延长4℃孵育时间（如过夜）
	由于不当储存、稀释或反复冻融造成一抗/二抗试剂盒失效	做阳性对照确认一抗/二抗试剂盒的有效性
	样本中没有目标蛋白	建议做阳性对照
	目标蛋白含量太少	应用信号放大操作

问题	可能原因	验证或解决办法
无染色	脱蜡不彻底	延长脱蜡时间，更换二甲苯
	固定液封闭了抗体识别表位	缩短固定时间，加强抗原修复
	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
	PBS缓冲液被细菌污染后破坏了靶蛋白的磷酸根	在抗体PBS储存液中加入适量防腐剂，或使用新鲜无菌的PBS。
高背景	封闭不充分	选择合适的封闭液，延长封闭时间
	一抗浓度过高	针对一抗做浓度梯度实验，选择合适浓度
	孵育温度过高，时间过长	选择4℃过夜或缩短孵育时间
	二抗质量不佳	不加一抗，做二抗对照，选择合格二抗
	组织冲洗不彻底	加强洗涤
	内源性过氧化物酶含量过高	延长3%H_2O_2灭活时间或用0.5%高碘酸溶液室温孵育10min
	固定过度	改变抗原修复方法或减小抗原修复强度。
	信号过度放大	缩短抗体孵育时间
	通透作用破坏膜并除去了膜蛋白	去除缓冲液中的通透剂
	显色底物过量或显色时间太长	缩短底物孵育时间
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时间
	存在内源性过氧化物酶活性	延长3%H_2O_2灭活时间或用0.5%高碘酸溶液室温孵育10min
	一抗与被染组织同源(如用鼠一抗检测鼠组织)，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。

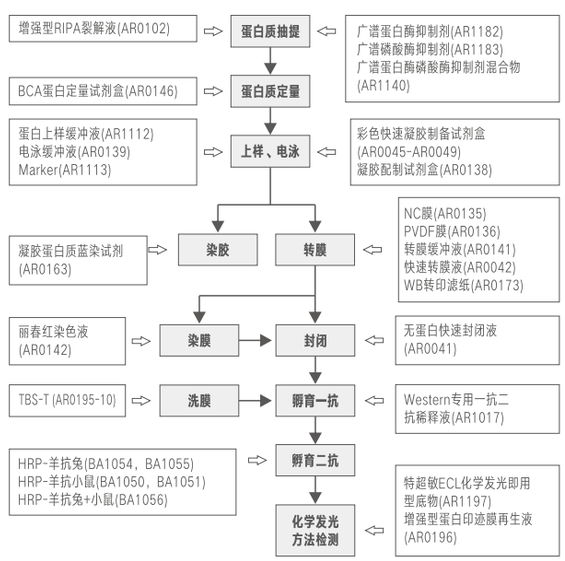
第三章 免疫印迹

免疫印迹又称蛋白质印迹（Western blotting），是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法。其基本流程是先将待检测样品溶解于含有去污剂和还原剂的溶液中，经过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离各组分，然后通过印迹技术把分离样品几乎原位、定量转移到印迹膜上。

用特异抗体与印迹膜上的靶抗原反应，结合上的抗体可用与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶偶联的抗免疫球蛋白进行反应，最后通过与酶的底物发生显色反应来做检测。由于免疫印迹具有SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性，现已成为蛋白分析的一种常规技术。免疫印迹常用于鉴定某种蛋白，并能对蛋白进行定性和半定量分析。结合化学发光检测，可以同时比较多个样品同种蛋白的表达量差异。



免疫印迹实验流程步骤：



一. 蛋白样品的制备（蛋白抽提）

1. 裂解液的选择

裂解液一般包含以下几个组分：

1) 缓冲液：Tris-HCl（pH7.5), 主要作用是提供pH环境，使蛋白保持稳定，增加溶解性。

2) 表面活性剂：分为离子型（如SDS、脱氧胆酸盐等）和非离子型（如NP-40、Triton-100、tween系列等）。主要作用是溶解膜与脂膜，溶解稳定蛋白质（特别是膜蛋白）。

试剂名称	作用推荐
Triton-X100	非离子表面活性剂(或称去污剂),能溶解脂质，以增加抗体对细胞膜的通透性。
NP-40	TERGITOL(TM)NP-40表面活性剂, 可以破坏细胞膜，但是保留核膜。
SDS	阴离子去污剂,表面活性剂,作为变性剂和助溶试剂, 破坏蛋白分子高级结构。
脱氧胆酸钠	生物活性分子，破膜。

3) 蛋白酶抑制剂：作用是抑制蛋白酶的活性，防止蛋白被水解，使用前临时加入。

抑制剂	靶蛋白酶	有效浓度	储藏溶液	注解
Antipain	木瓜酶和胰酶	50μg/ml	1mg/ml水溶液	对胰凝蛋白酶，胃液素，纤溶酶无影响
APMSF	胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶	10-40μg/ml或10-20μM	100mmol/L水溶液	毒性比PMSF低，不能抑制胰凝蛋白酶或乙酰胆碱酯酶
抑肽酶	丝氨酸蛋白酶	0.06-2μg/ml	10mg/mlPBS溶液	避免反复动冻融
抑氨肽酶B	氨基肽酶	40μg/ml	溶于甲醇	不能抑制羧肽酶
Calpain抑制剂Ⅰ、Ⅱ	Calpain (钙依赖性半胱氨酸蛋白酶)	Ⅰ:17μg/ml Ⅱ:7μg/ml	溶于乙醇	可渗透薄膜
抑糜朊酶素	胰凝乳蛋白酶	6-60μg/ml	溶于DMSO	
B.M.综合酶片	丝氨酸，半胱氨酸和金属蛋白酶	每10-50ml细胞提取液内加一片		不含EDTA
EDTA	金属蛋白酶	0.2-0.5mg/ml或0.5-1.3μmol/L	500mmol/L水溶液pH=8.0	
抑蛋白酶醛肽	丝氨酸蛋白酶，巯基蛋白酶	0.5-2μg/ml	10mg/ml水溶液	
a2-巨球蛋白	广谱	1U/ml	100U/ml PBS溶液	避免接触还原剂
Pefabloc SC (boe- hringer Mannheim)	丝氨酸蛋白酶	0.1-1.0mg/ml或0.4-4mmol/L	100mM水溶液	无毒，在中性pH下较PMSF 稳定
胃蛋白酶抑制剂	酸性蛋白酶	0.7μg/ml	1mg/ml甲醇溶液	
PMSF	丝氨酸蛋白酶	17-170μg/ml	10mg/ml异丙醇溶液	每一操作步骤时新鲜加入
TLCK	胰蛋白酶	37-50μg/ml	1mg/m溶于50mMmol/L醋酸盐溶液，pH=5.0	对胰凝蛋白酶无影响
TPCK	胰凝乳蛋白酶	70-100μg/ml	3mg/ml乙醇溶液	对胰蛋白酶无影响

1-A 培养细胞蛋白样品的制备

1) 细胞培养至密度80%左右时，用0.05%胰蛋白酶(AR1007)消化或细胞刮处理，处理后的细胞经预冷的PBS(PYG0021)漂洗两次，3000g离心2-3分钟。去除上清，向沉淀中加入5-7倍沉淀体积的博士德培养细胞总蛋白提取试剂(AR0103)/ 增强型RIPA裂解液(AR0102)[需提前加入广谱蛋白酶抑制剂混合物(AR1182),磷酸化蛋白需同时加入广谱磷酸酶抑制剂混合物(AR1183)]，反复吹打混匀。

2) 若有粘稠物存在可用超声细胞破碎仪超声处理，超声时间2秒，间歇2秒，功率100-120瓦，至溶液无粘稠物为止。处理完后置冰上裂解0.5小时。

3) 再次超声处理至无粘稠，10000g离心10分钟。去除上层脂类和下层细胞碎片，取中层溶液至一新的离心管即为所提取蛋白溶液；取少量蛋白溶液定量后，剩余蛋白溶液加入等体积博士德蛋白上样缓冲液(2X)(AR0131)，或1/4体积博士德蛋白上样缓冲液(5x)(AR1112),强力混匀，样品置100℃水浴箱中沸水浴变性5分钟。至此样品制备完成(样品可立即使用，也可以分装冻存。-20℃存放的样品可稳定维持数月，4℃可保存1-2周)。

1-B 组织蛋白样品的制备

1) 手术切除的组织块迅速置于预冷的生理盐水中，洗去表面的血迹，将组织称量后切成较小的组织块(0.2-1.0g)，放入组织匀浆器中，按组织净重(g)：哺乳动物组织总蛋白提取试剂体积(ml)=1:10的比例加入相应体积的哺乳动物组织总蛋白提取试剂(AR0101)/增强型RIPA裂解液(AR0102)[需提前加入广谱蛋白酶抑制剂混合物(AR1182),磷酸化蛋白需同时加入广谱磷酸酶抑制剂混合物(AR1183)]进行匀浆，至组织研磨完全。

2) 超声处理(同细胞蛋白样品的制备)，处理完后置冰上裂解0.5小时。

3) 10000g离心10min，取上清至一新的离心管即为所提取蛋白溶液；取少量蛋白溶液定量后，剩余蛋白溶液加入等体积的博士德蛋白上样缓冲液(2×)，或1/4体积博士德蛋白上样缓冲液(5×)(AR1112)，置100℃水浴箱中沸水浴变性5分钟。至此样品制备完成（样品可立即使用，也可以分装冻存。-20℃存放的样品可稳定维持数月，4℃可保存1-2周)。

注意事项：

① 如果研究蛋白为膜蛋白，建议使用细胞刮处理细胞，因为胰蛋白酶会破坏膜蛋白。

② 当目标蛋白的含量很低时，需要选取目标蛋白含量较高的组织或细胞器(如细胞浆、核、膜、线粒体等)，或者通过免疫沉淀等方式进行富集。

③ 尽量选取新鲜的组织或细胞；如需保存，可置-80℃存放。

④ 在分离蛋白时，组织或细胞裂解液中充满来自溶酶体的酶，并且原来无活性的蛋白酶原被充分激活,开始消化其周围的蛋白质。为避免此现象，必须在缓冲液内加入蛋白酶抑制剂以阻止蛋白酶对细胞组织的消化作用。通常加入PMSF、蛋白酶抑制剂等，研究磷酸化蛋白还需加入磷酸酶抑制剂。

2. 蛋白定量

样品电泳前需测定蛋白浓度，以便保证上样量一致，有利于后续定量或半定量分析。常用蛋白定量试剂盒有博士德BCA蛋白质定量试剂盒(AR0146)，微量BCA 蛋白质定量试剂盒(AR1110)，Bradford蛋白浓度测定试剂盒(AR0145)。

Bradford蛋白定量法操作简便迅速，消耗样品量少，但不同蛋白质之间差异大，且标准曲线线性差。高浓度的Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵和去污剂可改变测定液的pH 值，从而影响显色和干扰蛋白质定量。

BCA蛋白定量，试剂及其形成的颜色复合物稳定性更好，几乎没有干扰物质的影响，灵敏度高（微量BCA检测可达到0.5μg/ml)，应用更

加灵活。与Bradford蛋白定量法相比，BCA 法的显著优点是不受去垢剂的影响。

BCA蛋白浓度测定方法如下：

试管法（以博士德BCA蛋白测定试剂盒AR0146为例）

1) 配制工作液: 根据标准品和样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）配制适量BCA工作液，充分混匀。（**注**：工作液需临用前配置）

2) 稀释标准品：将标准品储存液稀释至25～2000ug/ml。稀释液可用生理盐水或PBS。

管号	稀释液体积(ul)	标准品体积(ul)	终浓度（ug/ml)
A	0	100	2000
B	25	75	1500
C	50	50	1000
D	125	75	750
E	150	50	500
F	350	50	250
G	375	25	125
H	395	5	25
I	400	0	0(空白)

3) 将0.1ml的标准品和合适浓度范围的样本分别加入试管中。

4) 各管加入2ml BCA工作液，37℃放置30分钟（增加孵育时间和温度能够增加562nm的吸光度值和检测最低浓度，降低测量范围）。

5) 冷却到室温，（BCA不会达到真正的反应终止点，当冷却到室温时颜色依然会产生。但是在室温下颜色产生的效率非常低，在冷却后10分钟内测量完则无影响）用分光光度计测定562nm的吸光值，根据标准曲线计算出蛋白浓度。

微孔板法

配制工作液（同上）。（注：工作液需临用前配置）

稀释标准品：将标准品储存液稀释至25～2000ug/ml。稀释液可用生理盐水或PBS。

（同上表）

1) 将25ul的标准品和合适浓度范围的样本分别加入96孔板的微孔中。

2) 各孔加入200ul BCA工作液，充分混匀。

3) 盖上96孔板盖，37℃孵育30分钟（增加孵育时间和温度能够增加562nm的吸光度值和检测最低浓度，降低测量范围）。

4) 冷却到室温，（BCA不会达到真正的反应终止点，当冷却到室温时颜色依然会产生。但是在室温下颜色产生的效率非常低，在冷却后10分钟内测量完则无影响）用酶标仪测定562nm的吸光值，根据标准曲线计算出蛋白浓度。

注意事项：

① 长期保存出现沉淀时，可搅拌或37℃温育或微波几十秒使溶解, 如发现细菌污染，则应丢弃。

② BCA法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中的化学物质的影响，可以兼容样品中高达5% 的SDS，5%的Triton X-100，5%的Tween 20、60、80。但本试剂盒受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响，需确保EDTA低于10mM，无EGTA，二硫苏糖醇(DTT)低于1mM，β-巯基乙醇 (β -Mercaptoethanol)低 于 0.01%。 不 适 用 BCA法 时 请 试 用Bradford蛋白浓度测定试剂盒（博士德货号为AR0145）。高浓度的去垢剂也影响实验结果，可用TCA沉淀去除干扰物质。

③ 要得到更为精确的蛋白浓度结果，每个蛋白梯度和样品均需做复孔且标准品与样品处理要尽量一样（如采用同样的溶液溶解样品和标准品），每次均应做标准曲线。

④ 当试剂A和B混合时可能会有浑浊，但混匀后就会消失。

⑤ 需准备37℃水浴或温箱、酶标仪或普通分光光度计，测定波长为540-595nm之间，562nm最佳。酶标仪需与96孔酶标板配套使用。使用分光光度计测定蛋白浓度时，试剂盒测定的样品数量会因此而减少。使用温箱孵育时，应注意防止因水分蒸发影响检测结果。

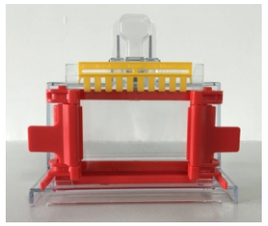
二. 凝胶的制备

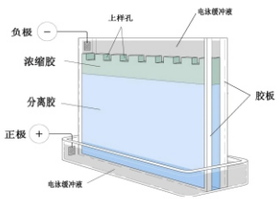
1. 以博士德凝胶制备试剂盒(AR0138) 为例

蛋白分子量(KD)	>100	30～100	10～30	<10
分离胶浓度(%)	8%	10%	12%	15%

1) 根据待检测目的蛋白质分子量按比例配制分离胶，轻缓摇动混匀(不要过于剧烈以免混入过多氧气)，待凝胶溶液混合均匀，将凝胶溶液平缓注入两层玻璃板中，再在液面上小心注入一层水，以阻止氧气接触凝胶溶液影响凝胶的聚合，保持水平，室温静置约1小时(室温较低可延长时间)，直至凝胶溶液完全聚合凝固。

2) 按比例配制浓缩胶，轻缓摇动混匀，滤纸吸去已凝固分离胶上的水，平缓注入浓缩胶溶液，然后小心插入梳子，并注意齿尖不要有气泡。在室温静置约1小时(室温较低可延长时间)，直至凝胶溶液完全聚合凝固，小心拔出梳子，准备上样。





注意事项：

① 装好玻璃板后灌胶前可以先灌水检查是否漏液。

② 制胶关键是聚合时间，可通过控制AP和TEMED量来控制。AP，TEMED的量过高，局部胶凝的太快，会使凝胶不均匀，电泳蛋白条带会弯曲。环境温度较高时，应减少AP，TEMED的量。空气中氧气会影响胶的聚合，所以在分离胶上面应加一层水或正丁醇以隔绝氧气。

③ 浓缩胶浓度较低，凝固后体积会收缩减小，从而导致上样体积减少，所以一般在凝固前补胶至刚刚冒顶。

④ 根据目标蛋白的分子量选择合适浓度的凝胶，以达到最优的分离效果和分辨率。

⑤ 分离胶不宜灌注过满，需要有一定的浓缩胶空间，否则起不到浓缩效果。

⑥ 各泳道上样体积最好大体一致且适中，体积偏差过大会相互挤压导致条带走形，为避免边缘效应，可在未加样的泳道加入等量的样品缓冲液。

⑦ 电泳时应保持电压和电流稳定，且不宜过高，否则会造成不规则的蛋白质迁移带。

⑧ 如有特殊需要，可以使用梯度胶，高浓度丙烯酰胺可以使低分子量蛋白质形成清晰的条带，还能在一块胶内同时分离分子量范围更大的蛋白质。

2. 特别推荐——SDS-PAGE彩色快速凝胶制备试剂盒

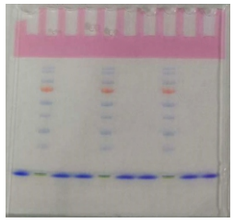
1) 制胶方便，凝胶迅速——改良型促凝剂，相比普通APS凝胶更迅速，最少仅需15 min可完成制胶；

2) 避免异味，更加安全——无需使用TEMED，避免恶臭气味；

3) 彩色上层胶，易于上样——可制备彩色的上层胶，颜色分层更利于操作者点样；

4) 分离效果好，条带清晰——不同浓度的分离胶，蛋白质条带比在传统凝胶中更清晰；

产品货号	产品名称	产品规格
AR0045	彩色快速凝胶制备试剂盒6%	可制50-125块凝胶
AR0046	彩色快速凝胶制备试剂盒8%	可制50-125块凝胶
AR0047	彩色快速凝胶制备试剂盒10%	可制50-125块凝胶
AR0048	彩色快速凝胶制备试剂盒12.5%	可制50-125块凝胶
AR0049	彩色快速凝胶制备试剂盒15%	可制50-125块凝胶



3. 小技巧：胶为什么总是漏?

1) 每次电泳完后，洗净玻璃、胶条和其它附件，下次用之前，用75%酒精擦拭玻璃和胶条，能有效防漏，且利于剥胶。

2) 避免玻璃边缘（与胶条接触处）破损很重要，尤其是下面和胶条接触的地方。

3) 胶条一定要干，跑完电泳后，胶条放实验台上晾干。

4) 下面的胶条注意不要老化，如果有裂纹可以用保鲜膜垫在胶条上，也可以有效防止漏胶；或者反过来用。

5) 玻璃在使用过程中容易造成小的缺口，从而导致封条无法完全密封，装好架子后，在玻璃底边上抹上一层薄薄的凡士林，两边适当多点（容易从两边漏）这样就可以避免漏胶；胶凝固转移到电泳槽的时，把玻璃底边上的凡士林擦干即可（注意，一定要擦干净，尤其是少量进入了两隔玻璃之间空腔的）。

6) 因为两块玻板没有放的完全对齐，底部不在同一个平面，所以封条封不严。以后每次只要在水平的桌面上仔细对齐两块玻板，再夹紧。用手感觉一下确定在同一平面上后，放到灌胶架并压在封条上，卡紧。注意两边均匀用力，一般不会再漏。

三. 上样

1. 上样缓冲液

1) 还原（变性）蛋白上样缓冲液

一般的抗体只能识别抗原蛋白中的线性序列结构表位（一级结构），因此，为使抗体能够达到结合该表位而需要将蛋白样本进行变性，使之打开折叠的空间结构。缓冲液中含有的SDS可断裂蛋白分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质分子的二级和三级结构，同时SDS也与蛋白疏水区结合，由于SDS带大量的负电荷，因而消除或掩盖了不同种类蛋白质间原有电荷的差异，使其均带有相同密度的负电荷。缓冲液中的强还原剂DTT则能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂，分子被解聚成组成它们的多肽链。缓冲液中还含有甘油，确保上样后蛋白样本沉积在点样孔中。溴缓冲液中的酚蓝染料呈蓝色，且分子量比绝大部分蛋白质小，电泳中比其他蛋白质移动速度快，可监控电泳进程。加入还原（变性）蛋白上样缓冲液的蛋白样品最后需100℃水浴5分钟变性。

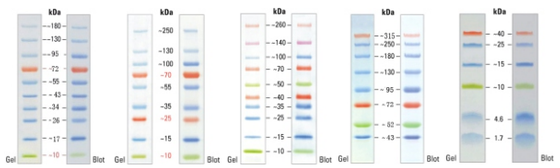
2) 非还原（非变性）蛋白上样缓冲液

某些抗体识别的表位是非连续氨基酸构成的蛋白三维结构，此种情况则需要使用非变性蛋白样品进行电泳，抗体的说明书一般会标注。非还原（非变性）蛋白上样缓冲液不加SDS和DTT，蛋白样本也不需变性。

2. 具体操作

向电泳槽中加入博士德电泳缓冲液(常用AR0139)，使两块玻璃内侧电泳液高于上样孔，外侧电泳槽内电泳液浸没凝胶底部。玻璃板内侧液面高于外侧。然后开始上样(已处理好的样品，博士德组织和细胞阳性对照蛋白样本或者阳性对照重组蛋白以及分子量范围合适的彩色蛋白预染Marker(AR1113)，保证每孔总蛋白量在20-50ug,总上样体积在10ul左右，注意上样时间尽量短，避免样品扩散。

博士德彩色预染蛋白Marker



AR1113　AR1114　AR1115　AR1116　AR1117

彩色预染蛋白Marker的作用：

1) 用于监控蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

2) 验证Western时蛋白转移至印迹膜的效率。

3) 鉴定目的蛋白质分子量大小等。

四. 电泳

上样完毕后，选择适当的电压进行电泳。通常在不连续的系统中，上层浓缩胶的电泳电压(50-70V)要低于分离胶电泳电压(70-90V)，以达到更好的浓缩效果，使样品进入分离胶时处于同一水平线上。溴酚蓝染料跑至凝胶最下端处停止电泳，电泳时间2-3小时。

注意事项：

① 条带出现“微笑”现象（中间凹两边翘起）：主要是凝胶中间部分凝固不均所致，应待凝胶充分凝固后电泳，或者催化剂加入后没充分混匀。

② 条带出现“皱眉”现象（中间鼓坡两边向下）：两玻璃板之间底部气泡所致，应排除底部气泡。

③ 带出现拖尾现象：主要是样本溶解效果不佳；分离胶浓度过大，电泳缓冲液放置时间过长。建议：加样前离心，选择适当的样本缓冲液，加适量的样品促溶剂；使用新配置的电泳缓冲液，降低凝胶浓度或使用梯度凝胶。

④ 蛋白条带出现纹理现象：样品不溶性颗粒引起的：加样前离心，加入适量的促溶剂。

电泳槽

五. 染胶

电泳完毕可通过使用博士德凝胶蛋白质蓝染试剂(AR0163)，检测电泳是否成功。胶检测后的凝胶不能进行后续转膜等操作。

六. 转膜

1. 印迹膜的选择

1) 选择哪种类型的膜

印迹膜	PVDF膜	Nc膜	尼龙膜
背景	较低	低	较高
蛋白结合能力	100-200ug/cm2	80-100 ug/cm2	>400 ug/cm2
机械强度	强	干的膜很脆	软而结实
溶剂抗性	强	差	差
使用前处理	甲醇润湿	缓冲液润湿	缓冲液润湿
价格	高	较低	低

尼龙膜虽然蛋白结合能力很强，但一般背景较重，现在已很少使用。PVDF膜稳定、耐腐蚀，而且膜灵敏度、分辨率和蛋白亲和力比常规的膜都要高，因此是蛋白测序的理想用品，并且非常适合低分子量蛋白的检测。缺点是价格较高，而NC膜在这方面有明显优势而且应用很广泛。所以要根据膜的特点以及实验目的去选择。

2) 印迹膜孔径的选择

随着膜孔径的不断减小，膜对低分子量蛋白的结合就越牢固。但膜孔径如果小于0.1μm，蛋白的转移就很难进行。所以我们通常用0.45μm和0.2μm两种规格的膜。大于30KD的蛋白用0.45μm的膜，小于30KD的就用0.2μm的膜。

3) 膜在使用过程中需要注意

PVDF膜在使用之前必需用纯甲醇浸泡15秒钟，以活化膜上的正电基团。NC膜纯度越高，韧性越差，容易损坏，尽量减少操作并且动作轻柔。

2. 转膜的方式

转膜分为湿转和半干转。两种方式都可以达到理想的效果。湿转应用最广泛只是耗时较长；半干转耗时短，但不易控制，容易转过或烧膜。

1) 湿转：效果比较稳定，三明治排列为：海绵/滤纸/胶/膜/滤纸/海绵，胶位于负极侧，膜位于正极侧。

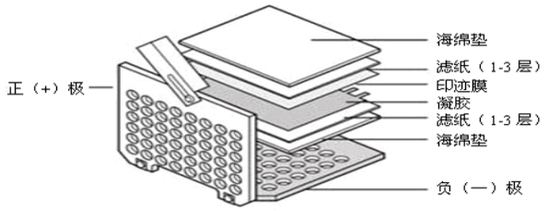
2) 半干转：三明治排列为：滤纸/胶/膜/滤纸。用于检测30-100KD分子量蛋白质时通常采用电流60mA，90min，。转移小分子量或三层胶时，电流提高到100mA，120min。

3. 湿式电转膜

1) 电泳结束后取出凝胶，在博士德转膜缓冲液(AR0141或AR0042)中浸泡15-30分钟。

2) 制作转膜“三明治”：打开电转印夹，每侧垫上一块专用的用转膜液浸泡透的海绵垫，再各放一块转膜液浸透的博士德WB转印滤纸(AR0172/AR0173)，将凝胶平放在阴极侧滤纸上，最后将博士德硝酸纤维素NC膜(AR0135-02/AR0135-04)或PVDF膜(AR0136-02/AR0136-04)平放在凝胶上，去除气泡，夹好电转印夹，注意NC膜与胶，印迹膜膜与转移垫，转移垫与胶之间不能有气泡。

转膜“三明治”



3) 转印槽加满转膜缓冲液，插入电转印夹，将转印槽放入冰箱内(-20℃)，连接好电极，接通电流，转印夹内的印迹膜应对转印槽的正极。

4) 转膜选择恒流，建议电流为150-200mA,时间依据胶的浓度及目的蛋白分子量适当调整.

5) 转膜结束后，可用博士德立春红染色液(AR0142-100)检验转膜是否成功：将印迹膜置于博士德印迹膜丽春红染色液(AR0142-100)中，室温5-10min即可看见红色蛋白条带，用洗涤缓冲液洗数次即可洗掉红色蛋白条带进行后续实验。

注意事项：

① 要使蛋白质组分能有效的从凝胶转移到固相印迹膜上，缓冲液的PH值很重要。有些分子量不是很大的蛋白质区带，即使延长电转印时间也不能从凝胶转移到膜上。这是由于蛋白质在转移缓冲液中恰好处于等电点状态造成的，因此应适当改变转移缓冲液的PH以利于转膜。另外对于分子量较小的蛋白质，可再缓冲液中加入适量甲醇(20%)，因为甲醇能促进它们固定在固相膜上。但是对于大分子量的蛋白质，尤其是碱性蛋白质缓冲液中是不宜加入甲醇的，因为甲醇使凝胶孔径变小，不利于分子量较大的蛋白的转移，甲醇能将结合在碱性蛋白质上的SDS解离出来而使其带正电或呈电中性，蛋白质就更难从凝胶中转移出来。

② 电转印迹膜的选择：有NC膜，PVDF膜等。其中NC膜和PVDF膜使用的最为普遍，它们的蛋白质容量大，可用各种染色方法进行检测。PVDF膜在使用前须用纯甲醇浸泡活化，NC膜勿用甲醇浸泡。此外膜的孔径大小也是考虑的重要因素。目的蛋白30KD以下用0.22um孔径的印迹膜，30KD以上用0.45um孔径的印迹膜。

③ 湿转选择恒流，恒流150-200mA,10KD以下转30-40分钟，10-30KD转印40-50分钟，30-100KD转印60-70分钟，100KD以上转印90-120分钟，以实际的转膜效果适当调整。

七. 封闭

转膜完成后，印迹膜上其他没有结合蛋白质的空白位置需要用封闭液加以封闭，以避免一抗或二抗非特异性结合。

1. 漂洗印迹膜：使用博士德TBS-T(含有0.05％Tween-20)漂洗缓冲液(常用AR0195-10)室温漂洗10分钟×3次。

2. 取漂洗过的印迹膜，放入博士德封闭蛋白TBS缓冲系统封闭液(常用AR0179)中，摇床摇动，室温封闭1.5-2 小时;或无蛋白快速封闭液(AR0041)，摇床摇动，室温封闭5-10分钟。

注意事项：

① 由于WB的灵敏度很大程度上取决于封闭的好坏，封闭时间过长(过度封闭)导致抗原表位的遮蔽，从而降低检测灵敏度；封闭时间过短(不完全封闭)又会导致最终背景增高或信噪比太低，因此封闭液的选择和条件的优化很重要。

② 脱脂奶粉是最常用的，脱脂奶粉不能与生物素化的抗体一起使用，因为脱脂奶粉含有糖蛋白和生物素；建议使用BSA。

③ 分析磷酸化蛋白建议用BSA。脱脂奶粉含磷酸酶，用磷酸化特异性抗体分析磷酸化蛋白受到影响，因为磷酸酶与膜上的磷酸化蛋白接触可使之去磷酸化。

④ 无蛋白快速封闭液不含动物和植物蛋白，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。

⑤ 如果用辣根过氧化物酶(HRP)检测系统，封闭液不应加叠氮钠(NaN3)，因为叠氮钠对辣根过氧化物酶（HRP）有灭活作用。

⑥ 如果用二抗抗体是碱性磷酸酶(AP)标记的检测系统，可使用酪蛋白封闭，同时须选择TBS缓冲溶液，不可使用PBS缓冲溶液，因为PBS缓冲溶液干扰碱性磷酸酶。

八. 孵育一抗

检测目标蛋白质的特异性一抗抗体和封闭后的膜进行孵育，膜上的目标蛋白质和一抗抗体发生特异性的结合。

1. 向封闭后的印迹膜加入博士德Western专用一抗二抗稀释液(AR1017)稀释后的一抗，4℃孵育过夜。

2. 洗涤缓冲液洗膜5分钟×3次。

注意事项：

① 一抗抗体取决于被检测的抗原蛋白质。免疫印迹一抗抗体包含单克隆抗体(MAbs)和多克隆抗体(PAbs)。单克隆抗体(MAbs)识别单个抗原表位,具有更高的特异性,可有效降低背景;但如果所识别的抗原表位被破坏，则会影响实验结果。多克隆抗体可识别多个抗原表位，通常具有更高的亲和力，即使有少数几个抗原表位被破坏，仍然不会影响实验结果。

② 一般而言，一抗建议4℃孵育过夜，也可以尝试室温孵育1-2小时。

③ 一抗稀释比例及反应条件(温度、时间)视抗体效价而定，并需根据实验结果进行优化；二抗一般可固定一个反应条件。

④ 博士德Western专用一抗二抗稀释液(AR1017)稀释后的一抗,孵育后可回收重复使用至少5次，也可稳定在4度保存3-6个月。

九. 孵育二抗

特异性酶标记的针对一抗抗体的二抗抗体和孵育一抗后的膜进行孵育，膜上已和目标蛋白质特异性的结合的一抗抗体和二抗抗体发生特异性的结合。

1. 向封闭后的印迹膜加入博士德Western专用一抗二抗稀释液(AR1017)稀释后的二抗，4℃孵育2小时。

2. 洗涤缓冲液洗膜3-5次，每次5分钟。

注意事项：

① 大多数一抗抗体的来源是小鼠或兔, 因此抗鼠免疫球蛋白和抗兔免疫球蛋白是最常见的二抗抗体。山羊是最常见的用于生产多克隆抗小鼠和抗兔抗体的动物, 所以山羊抗鼠免疫球蛋白和抗兔免疫球蛋白是最常见的二抗抗体。选择二抗抗体取决于一抗抗体的动物来源。例如, 如果一抗抗体是小鼠来源单克隆抗体, 二抗抗体必须是抗小鼠的抗体; 如果一抗抗体是兔来源多克隆抗体, 二抗抗体必须是抗兔的抗体。

② 清洗步骤对移除未结合试剂、降低背景、增加信噪比至关重要，清

洗不够会造成较高背景，清洗过度会导致灵敏度降低，清洗液的成分可适当调整(加入Tween20，浓度0.05%)。

十. 检测

根据二抗的标记物不同，其杂交结果的检测方法也不同，常用检测系统有ECL化学发光和DAB化学显色检测系统。

1. ECL化学发光检测法

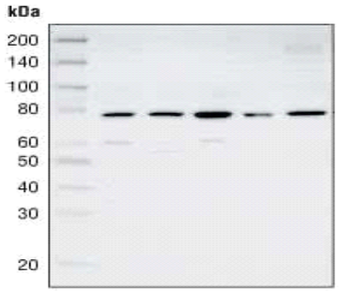
ECL化学发光检测法利用HRP催化化学发光物质，在暗室内形成明显的肉眼可见的化学发光带，电子成像或利用胶片感光原理，将结果记录下来。

1) ECL显色试剂配制：按1ml水加入博士德超敏化学发光底物(浓缩型AR1111)A.B各50ul混匀；或者将博士德即用型超敏/特超敏/极超敏ECL化学发光即用型底物中的A，B液等体积混匀。以混合好的显色底物覆盖印迹膜10秒-5分钟，直至出现目的蛋白条带。

2) 实验结果可通过放射自显影胶片或者化学发光CCD成像系统来显示。

3) 放射自显影胶片：曝光几秒到数分钟，以显影效果确定所测抗原的正确曝光时间。曝光完的胶片先在博士德显影液中冲洗至出现条带为止，再放入定影液中漂洗（显影定影试剂盒AR0132）。

化学发光-CCD成像法



特别推荐：

1) X光片背景去除液：如胶片背景较高或有阴影杂点，推荐用博士德X光片背景去除液试剂(AR0154)去除胶片的高背景和阴影杂点，可得到理想效果的胶片。

2) Western Blot蛋白印迹膜再生液: 印迹膜上蛋白如需重复利用，推荐用博士德Western Blot蛋白印迹膜再生液(AR0196)去除膜上一抗二抗，重新进行抗体杂交。

2. DAB化学显色法

以博士德DAB化学显色检测法为例：

博士德DAB显色液的配制；按照1ml水加显色剂A.B.C各一滴混匀(可视蛋白条带强度增加滴数)。

显色：将适量的DAB显色液平铺在杂交后的印迹膜上，室温放置观察，可出现明显的棕黄色蛋白显色条带。

注意事项：

1) 对照设计

成功进行Western Blot 检测，设置合适正确的对照是必不可少的，只要正确设置了这些对照，即可快速和准确的找到Western Blot 的问题所在，并保证实验结果的准确性和特异性。

① 阳性对照：明确表达检测蛋白的组织或细胞，用于检测抗体的工作效率。

② 阴性对照：明确不表达检测蛋白组织或细胞，用于检测抗体的特异性。

③ 二抗对照：不加一抗，用于检测二抗的特异性。

④ 内参对照：检测标本的质量和二抗系统。

⑤ 空白对照：不加一抗和二抗；用于检测膜的性质和封闭的效果。

2) 内参

内参即是内部参照，对于哺乳动物细胞表达来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白，它们在各组织和细胞中的表达相对恒定，在检测蛋白的表达水平变化时常用它来做参照物。在Western Blotting 中使用内参其实就是在免疫印迹过程中另外用内参对应的抗体检测内参，这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正蛋白质定量、上样过程中存在的实验误差，保证实验结果的准确性。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 显色或者发光体系是否正常。

选择内参与要检测的目的蛋白的分子量最好相差5KD以上。当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量大小相差比较明显，可同时进行检测；当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量相差不大时，可以先进行目的蛋白的抗体检测，然后使用印迹膜再生液洗掉膜上的抗体，重新进行内参蛋白的抗体检测。

常用内参抗体：

内参名称	分子量大小	适用范围
Beta-actin	43KDa	胞浆和全细胞
GAPDH	36KDa	胞浆和全细胞
Tubulin	55KDa	胞浆和全细胞
VDAC1(porin)	31KDa	线粒体
COXIV	16KDa	线粒体
Lamin B1	67KDa	细胞核（不适于去除核膜的样本）
TBP	38KDa	细胞核（不适于去除DNA的样本）

十一. Western Blotting实验疑难解答指南

1. 高背景

原因	解决办法
抗体浓度太高	优化/降低一抗和二抗的浓度
二抗聚集	0.2um过滤或更换新二抗
抗体孵育温度过高	4℃孵育
二抗非特异性结合或与封闭剂交叉反应	设置二抗对照(不加一抗)，降低二抗浓度
一抗或二抗与封闭剂有交叉反应	在孵育和洗涤液中加入Tween-20减少交叉反应.
封闭液不适合	比较尝试不同的封闭液
封闭不完全	封闭液的选择与优化；增加封闭液中蛋白质浓度； 优化封闭时间和温度（常温至少2小时；4℃过夜）； 封闭液中加入 Tween20，浓度0.05%； 抗体稀释液中加入 Tween20，浓度0.05%；
封闭不充分	延长封闭时间，更换合适的封闭剂（脱脂奶粉，BSA，酪蛋白等）
抗体与其它蛋白质交叉反应	更换不同的封闭液；勿在含生物素体系中使用脱脂奶粉封闭； 降低二抗浓度；检测二抗与膜的交叉反应性
漂洗不完全	增加漂洗时间和缓冲液体积；漂洗液中加入浓度0.05%Tween20
曝光时间太长	缩短曝光时间
膜的问题	使用干净镊子；戴手套操作；换一张新膜； 用足够的液体，膜始终保持湿润；孵育时使用脱色摇床； 避免膜重叠，互相覆盖；小心操作，勿毁损膜；
洗膜不充分	增加洗涤次数
膜不合适	NC膜比PVDF膜背景低
膜干燥	保证充分的反应液，避免出现干膜现象
缓冲液污染	使用新缓冲液；过滤缓冲液
仪器污染	保证所有仪器，用具干净；确保膜上无残留胶

2. 信号弱或者无信号

原因	解决办法
转膜不完全	1.转膜后，染胶以决定转膜效率；2.使用丽春红染膜以决定转膜效率；3.保证转膜时胶与膜充分结合；4.滤纸 - 膜 - 胶，电极方向正确装配；5.根据说明书，对膜进行处理如湿润；6.电转时防止过热；7.使用阳性对照或预染Marker；8.优化转移时间和电流；9.使用博士德转膜缓冲液；10.保证样品处理时，样品不被破坏(抗原决定簇)
蛋白质与膜结合不充分	20%甲醇于转膜缓冲液；低分子蛋白质透过膜；使用小孔径膜
抗体	增加抗体浓度；抗体与抗原结合差；抗体丧失活性
抗原不足	增加上样量
抗原被封闭液遮蔽	试用不同的封闭液；优化封闭液中蛋白质浓度；缩短封闭时间
缓冲液里有叠氮钠	去掉叠氮钠
曝光时间太短	延长曝光时间
底物孵育时间太短	5分钟
膜上蛋白质被消化	封闭物质可能有蛋白质降解活性
蛋白质样品在储存过程中降解	重新制备样品
一抗、二抗等不匹配	订购试剂时认真选取一抗与组织种属，一抗与二抗或/和底物与酶系统之间相匹配的抗体及底物。可通过设置内参可以验证二级检测系统的有效性。
一抗或/和二抗浓度低	增加抗体浓度，延长孵育时间
封闭剂与一抗或二抗有交叉反应	封闭时使用温和的去污剂，如Tween20，或更换封闭剂
一抗不识别目的物种的靶蛋白	检查说明书，设阳性对照
样本中无靶蛋白或靶蛋白含量过低(抗原无效)	设置阳性对照，如果阳性对照有结果，但标本没有则可能是标本中不含靶蛋白或靶蛋白含量太低。后者可增加标本上样量至少每孔20-30ug蛋白，样本制备时使用蛋白酶抑制剂，或分级提取目的蛋白。
转膜不充分,或洗膜过度	使用丽春红检测转膜效果，PVDF膜需浸透，需正确的转膜操作，勿过度洗膜
过度封闭	使用含0.5%脱脂奶或无脱脂奶的抗体稀释液，或更换封闭剂，减少封闭时间
一抗失效	使用有效期内抗体，分装保存，避免反复冻融取用，工作液现配现用
二抗受叠氮钠抑制	所用溶液和容器中避免含有叠氮钠(HRP的抑制剂)
酶和底物失效	直接将酶和底物进行混合，如果不显色则说明酶失活了。选择在有效期内、有活性的酶联物,使用新鲜的底物.
膜没有完全均匀湿透	使用100%甲醇浸透膜
靶蛋白分子量小于10,000	选择小孔径的膜，缩短转移时间
靶蛋白等电点等于或接近转移缓冲液pH值	可尝试使用其他缓冲液如CAPS缓冲液(pH 10.5)或使用低pH值缓冲液如乙酸缓冲液
甲醇浓度过高	过高甲醇浓度会导致蛋白质与SDS分离，从而沉淀在凝胶中，同时会使凝胶收缩或变硬，从而抑制高分子量蛋白的转移。降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替过高甲醇浓度会导致蛋白质与SDS分离，从而沉淀在凝胶中，同时会使凝胶收缩或变硬，从而抑制高分子量蛋白的转移。降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替

3. 非特异性条带

原因	解决办法
SDS 非特异性结合到胶上的蛋白质	转膜后充分清洗；不用 SDS
细胞传代次数过多，使其蛋白表达模式的分化	使用原始或传代少的细胞株，或平行实验
蛋白样本降解	使用新鲜制备的标本，并使用蛋白酶抑制剂
新蛋白或同族蛋白的分享同种表位的不同剪接方式	查其它文献报导，或BLAST搜寻，使用说明书报导的细胞株或组织
抗体未纯化	使用单克隆或亲和纯化的抗体，减少非特异条带
蛋白存在二聚体或多聚体	SDS-PAGE电泳上样前，煮沸10 分钟，以增强蛋白质解聚变性
许多蛋白质有多个亚型，分子量都不同	查阅文献或进行生物信息学分析，抗体针对几个亚型，就会有几个条带
蛋白本身有多个修饰位点	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，确定分子量
一抗浓度过高	在满足一定的敏感性的情况下，降低一抗浓度
二抗引起的非特异条带	免疫球蛋白是一个超家族，而标本中含有大量的类似球蛋白的抗原，容易和二抗引起反应，尤其是在变性的情况下，在满足敏感性要求的前提下，荧光标记一抗，酶标兔抗荧光就可以解决这个问题
蛋白的降解	同前
上样量过高	适当减少上样量
洗涤不完全	可适当延长洗涤时间
封闭不好	延长封闭的时间；选择更加适合的封闭液

4. 弥散型条带

原因	解决办法
抗体浓度太高	降低抗体浓度
蛋白质上样量太多	降低蛋白质上样量
迁移过快、电泳温度过高	降低电泳速度，调低电泳电压，预冷电泳液

检测出的分子量与理论分子量有差异：

1) 目的蛋白的糖基化修饰，磷酸化修饰等。

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。

3) 目的蛋白有其它剪切本。

4) 蛋白的电泳表观分子量与理论分子量有差别。

5) 蛋白质的降解。

6) 有的marker标记后，可能分子量不准确，有时marker的图谱不完整。

7) 可能是胶变形引起的。

8) 许多蛋白质有多个亚型，分子量都不同。

9) 蛋白本身有多个修饰位点。

十二. 博士德免疫印迹相关产品推荐

产品货号	产品名称	包装规格
AR0102	增强型RIPA裂解液	10ml/30ml/100ml
AR1182	广谱蛋白酶抑制剂混合物(含EDTA,100×)	1ml*2
AR1183	广谱磷酸酶抑制剂混合物(100×)	1ml
AR1178	蛋白酶抑制剂PMSF(液体)(100×)	1ml
AR1118	红细胞裂解液	100ml
AR0146	BCA蛋白浓度测定试剂盒	500次/kit
AR1112	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(变性)(5×)	1ml×3
AR1112-10	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(变性)(5×)	1ml×10
AR1201	Western溶液套装(封闭液,洗涤液,一抗二抗稀释液)	kit
AR1113	彩色预染中分子量蛋白质标准(10-180KDa)	200μl
AR0139	Tris-glycine-SDS电泳缓冲液(1×粉剂)	1L
AR0139-10	Tris-glycine-SDS电泳缓冲液(10X粉剂)	10L
AR1146-10	Tris-glycine-SDS电泳缓冲液(10×液体)	500ml
AR0195-10	TBS-T(含有0.05%Tween-20)漂洗缓冲液(10×)	500ml
AR0144	TBS漂洗缓冲液(干粉)	500ml
AR0141	Tris-glycine转膜缓冲液(1×干粉)	1000ml
AR0141-10	Tris-glycine转膜缓冲液(10×干粉)	10000ml
AR0042	快速转膜液	1L/包
AR0173	WB转印滤纸(9cm×7.5cm,100张/包)	100张
AR0199	加厚型转印滤纸(9cm×7.5cm×1mm)	40张
AR0135-02	硝酸纤维素薄膜(NC膜),0.22um,9cm×10cm	20片
AR0135-04	硝酸纤维素薄膜(NC膜)0.45um 9cm×10cm	20片
AR0104	蛋白干粉	10g
AR0041	无蛋白快速封闭液	500ml
AR1017	Western专用一抗二抗稀释液	100ml
AR0196	增强型蛋白印迹膜再生液	100ml
AR1196	特超敏ECL化学发光即用型底物	25ml×2
AR1197	特超敏ECL化学发光即用型底物	50ml×2
AR1191	极超敏ECL化学发光即用型底物	50ml×2

第四章 酶联免疫吸附（ELISA）

ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay酶联免疫吸附测定法）是免疫学种的经典实验。ELISA的基础是抗原的固相化及抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原仍保持其免疫学活性，酶标记的抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在检测时，受检标本（测定其中的抗原）与固相载体表面的抗体反应。洗涤后加入酶标记的抗体，通过反应结合在固相载体上。再次洗涤加入酶反应的底物，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

一. ELISA样本的处理

ELISA检测的目的是为实验提供准确可靠的定量分析实验依据。为了保证实验数据的可靠性，在实验过程中必须坚持全面质量控制和全过程质量控制。在收集标本前都必须有一个完整的计划。

注意事项：

① 每个标本量收集体积＝100ul × 检测种类，如要做复孔，标本量收集体积＝100ul × 检测种类×2 。

② 对于做某一个具体指标来说，最好先用一系列稀释度作一批标本测定，得出对实验有意义的一个稀释度（即测定剂量反应曲线），然后用一个最适稀释度测定即可。

③ 收集标本前必须清楚要检测的成份是否足够稳定。对收集后当天进行检测的标本，储存在4 ℃ 备用，如有特殊原因需要周期收集标本，将标本及时分装后放在-20 ℃ 或-70 ℃ 条件下保存。避免反复冻融。标本2 -8 ℃ 可保存48 小时，-20 ℃ 可保存1 个月。-70 度可保存6 个月。部分激素类标本需添加抑肽酶。

④ 血清标本采集时，应注意避免溶血，红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质，以HRP为标记的ELISA测定中，溶血标本可能会增加非特异性显色。

⑤ 为了保证尿液检测结果的准确性，必须正确收集尿液标本和保存。盛尿容器要清洁干燥。最好使用一次性的容器（如塑料尿杯），避免因用药并清洗不干净而造成的污染，影响检测结果。尿液标本必须新鲜，留取后，应及时检测或保存，以免细菌繁殖。因在室温中久置后（尤其是夏季）尿中磷酸盐等可析出结晶而干扰检测。

⑥ 标本宜在新鲜时检测。如有细菌污染，菌体中可能含有内源性HRP，也会产生假阳性反应。保存过久可发生聚合在ELISA中可使本底加深。

⑦ 冻结标本融解后，蛋白质会因为局部浓缩，出现分布不均的情况。应充分混匀，混匀过程宜轻缓，避免气泡，可上下颠倒混和，不要在混匀器上强烈振荡。

⑧ 混浊或有沉淀的标本应先离心或过滤，澄清后再检测。

⑨ 反复冻融会使蛋白效价降低，所以待测标本如需保存作多次检测，宜少量分装冻存。

二. 标本类型

1. ELISA常见标本

1) 液体类标本：包括血清、血浆、尿液、胸腹水、脑脊液、细胞培养上清等。

2) 培养细胞

3) 组织标本

注：这些标本收集的时间、方法和保存都有一定的要求。

2. 标本的保存

1) 一般说来，在5天内测定的标本可放置于4℃，超过一周测定的需低温冻存。

2) 对收集后当天进行检测的标本，储存在4 ℃ 备用，如有特殊原因需要周期收集标本，将标本及时分装后放在-20 ℃ 或-70 ℃ 条件下保存。避免反复冻融。

3) 标本2 -8 ℃ 可保存48 小时，-20 ℃ 可保存1 个月。-70 度可保存6 个月。部分标本也可加入适当防腐剂，激素类标本需添加抑肽酶。

3. 标本的处理

可用作ELISA测定的标本十分广泛，体液（如血清）、分泌物（唾液）和排泄物（如尿液）、细胞培养上清、细胞、组织等均可作标本以测定其中某种成份。有些标本可直接进行测定，有些则需经预处理。

1) 血清

室温血液自然凝固10-20 分钟后，离心20 分钟左右（2000-3000 转/ 分）。收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

2) 血浆

应根据试剂盒的要求选择EDTA 、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，加入10 %（v/v）抗凝剂（0.1M 柠檬酸钠或1% heparin 或2.0%EDTA.Na2) 混合10-20 分钟后，离心20 分钟左右（2000-3000 转/ 分）。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

3) 尿液、胸腹水、脑脊液

用无菌管收集。离心20 分钟左右（2000-3000 转/ 分）。仔细收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。

4) 细胞培养上清

检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心20 分钟左右（2000-3000 转/ 分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用PBS（PH7.2-7.4）稀释细胞悬液，细胞浓度达到100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心20 分钟左右（2000-3000 转/ 分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

5) 细胞

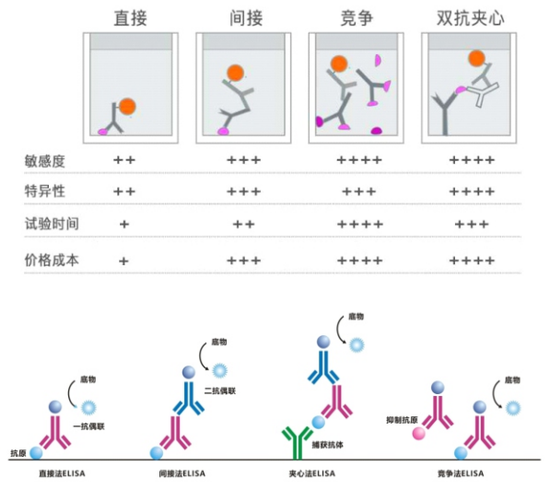
检测细胞的成份时，对于贴壁细胞，去除培养液，用PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液。用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触细胞10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍.加入适量裂解液, 用枪吹打把细胞吹散。用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，必需分装然后再裂解。充分裂解后，10000-14000g离心3-5 分钟，取上清，即可进行后续操作。

6) 组织标本

切割标本后，称取重量。加入一定量的PBS或组织蛋白萃取试剂，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 度或-70 度保存，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。

三. ELISA的检测方法

ELISA的检测方法有直接法、间接法、竞争法及双抗夹心法。其中直接法和竞争法应用较少，应用最多的是双抗夹心法，其在敏感性及特异性上有明显的优势。



ELISA原理图

1. 直接法（direct ELISA）

将抗原直接固定在固相载体上，加入酶标记的一级抗体，即可测定抗原总量，此一级抗体的特异性非常重要。

优点：操作手续简短，因无须使用二抗可避免交互反应。

缺点：试验中的一抗都得用酶标记，但不是每种抗体都适合做标记，费用相对提高。

2. 间接法（indirect ELISA）

此测定方法与直接法类似，差别在于一级抗体没有酶标记，改用酶标记的二级抗体去辨识一级抗体来测定抗原量。

优点：二抗可以加强信号，而且有多种选择能做不同的测定分析。不加酶标记的一级抗体则能保留它最多的免疫反应性。

缺点：交互反应发生的机率较高。

3. 竞争法（competitive ELISA）

小分子抗原或半抗原因缺乏可作夹心法的两个以上的位点，因此不能

用双抗体夹心法进行测定，可以采用竞争法模式。其原理是标本中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合。标本中抗原量含量愈多，结合在固相上的酶标抗原愈少，最后的显色也愈浅。

优点：适用于小分子抗原，数据再现性很高。

缺点：整体的敏感性和特异性都较差。

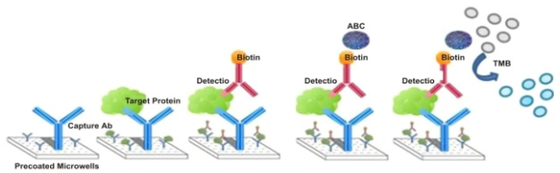
4. 双抗体夹心法（sandwich ELISA）

被检测的抗原包被在两个抗体之间，其中一个抗体将抗原固定于固相载体上，即捕捉抗体。另一个则是检测抗体，此抗体可用酶标记后直接测定抗原的量；或不标记，再透过酶标记的二级抗体来测定抗原的量。这两种抗体必须小心选取，才可避免交互反应或竞争相同的抗原结合部位。

优点：高灵敏、高特异性，抗原无须事先纯化。

缺点：抗原一定得拥有两个以上的抗体结合部位。

四. 博士德ELISA试剂盒（双抗夹心法）操作步骤



准备博士德ELISA Kits预包被抗体96孔板，试剂和标准品等	每孔添加100ul样品和标准品，37°C反应90分钟，不洗	每孔添加100ul生物素标记抗体，37°C反应60分钟，TBS洗涤3次	每孔添加100ul ABC复合物，37°C反应30分钟，TBS洗涤5次	加TMB显色液37°C避光反应30分钟以内，加入TMB终止液，读数

1. ELISA实验的几点建议

1) 加样：加样速度尽量要快，避免酶标板干燥。加样时，移液器垂直向下，加在包被孔的底部，同时避免碰壁触底。

2) 孵育：孵育温度严格控制在37℃，不可过高或过低。孵育时，将酶标板封闭完好，避免将酶标板放在环境温度变化大的地方。避免酶标板堆叠。

3) 洗涤：洗液需要现配现用，配制洗液应用新鲜的和高质量的超纯水或双蒸水。洗板机洗板时，保证洗液注满各孔，洗板针畅通。手动洗板时，加洗液要快速，没有多道移液器可以使用洗瓶，浸泡后甩板倒液要迅速干脆，倒液后在吸水纸上拍板。需要用力拍板，使孔内没有可见液体挂壁，但也不能太重，不能让样品干太久。洗板时，每孔至少加300ul洗液。

4) 显色：肉眼可见标准品前3-4孔有明显的梯度蓝色时，就可终止反应。加终止液时避免出现气泡。

5) 数据处理：可以在武汉博士德生物科技有限公司官网免费下载专业ELISA绘图软件。

2. 如何选购ELISA 试剂盒？

1) 特异性：ELISA 试剂盒的特异性与试剂盒的关键组分——抗体对的特异性有关。若抗体对中之一为多抗，另一个必须为单抗，若是双单抗特异性性会更好。

2) 灵敏度：灵敏度反映的是试剂盒检出被检物质的最低量的能力，用户可根据自己样本中待检指标的量选择合适的试剂盒，如果待检指标量很低，一般的试剂盒不能满足要求，可选择高敏的ELISA 试剂盒。

3) 重复性：科学实验讲求重复性，一般ELISA 试剂盒，其板内和板间变异系数应该控制在15% 以内。

4) 经济性：目前很多客户因为对品牌的信任度问题，主要还是选择国外原装进口,但价格昂贵，国产ELISA试剂盒在性价比上优势明显。

5) 美誉度：这个反映的不仅是产品质量的问题，对供应商的售前售后服务也是一个非常严格的检验。

3. 博士德ELISA试剂盒的特点

1) 抗体特异性好：精心挑选抗体对，在很大程度上消除干扰和交叉反应。

2) 精密度高：酶标板内和酶标板间变异系数均小于**10**%。

3) 稳定性好：经过了严格交叉反应、干扰测试及稳定性试验。

4) 低背景：自主研究出亲和素-酶复合物，消除了酶标二抗和包被抗体结合造成的背景高。

5) 高敏感性：进口原材料加上自配的特殊配方稀释剂保证高品质产品性能。

批内差/批间差

	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
Sample	1	2	3	1	2	3
n	16	16	16	24	24	24
Mean(pg/ml)	79.2	310	1682	103.4	427	1853
Standard deviation	3.56	17.36	114.38	5.07	28.61	137.12
CV(%)	4.5	5.6	6.8	4.9	6.7	7.4

4. 如何鉴别假冒伪劣ELISA试剂盒？

造假一：在国外注册公司，国内生产，隐瞒生产产地，明明是国产试剂却宣称国外进口虚报高价，欺骗广大用户。

鉴别方法：将“厂家名”、“ELISA”和“假货”关键词在google上搜索，各类论坛的用户会将该ELISA试剂盒的质量和效果，是否伪劣一一有所讨论。

造假二：仿冒进口ELISA试剂盒，使得进口分装ELISA质量参差不齐，鱼龙混杂，很多都是经小作坊粗劣加工而成，这样的试剂盒偶尔可以侥幸做出结果，如果做不出来，所购买的公司又没有完善的售后服务，往往对客户的问题推三阻四，推脱责任，最后还是消费者吃亏。

鉴别方法：直接打电话给生产厂商，询问他们试剂盒抗原和抗体的来源，索要试剂盒说明书，然后利用网络确认这些信息，正规的ELISA生产商，这些信息都是非常齐全，如果信息不全，则该ELISA的制造水平和质量都会很差。

造假三：某些奸商为了夸大其生产ELISA涵盖的指标的范围，用一种指标来冒充其它指标，造成各种种属、各种指标都可以做的假象。比如用TGFβ这样的指标代替大多数试剂盒的其他指标作为检测抗体，同样可以获得“良好”的样本数据。因为TGFβ在大多数哺乳类动物中（人、大鼠、小鼠、猪、牛……）都有广泛表达，种属间抗原的氨基酸序列同源性达100%，TGFβ随着其他因子的影响，其表达水平也会发生相应的变化，一般客户很难察觉，因此这样的恶性造假行为使得消费者被动造假，后果极其严重，因此善意提醒客户警惕此类作假试剂盒。

鉴别方法：

利用干扰实验即可辨别ELISA试剂盒是否检测目的抗原，方法如下：

1) 将针对试剂盒特异性的重组蛋白抗原和试剂盒中的检测抗体配置成antibody: antigen≈1:2的混合孵育液。

2) 37℃孵育15分钟后，代替原试剂盒中的检测抗体。

3) 后续操作按照试剂盒说明书进行，加检测抗体、酶复合物和底物。

4) 实验完毕后，检测其标准曲线，如果标准曲线良好则说明加入的目的抗原和试剂盒抗体不匹配，试剂盒检测抗体针对的是非目的抗原，该试剂盒为伪劣假造ELISA试剂盒。

5) 如果标准曲线无线性，则说明试剂盒检测抗体已被目的抗原中和或干扰，影响了其实际试剂盒抗体的检测作用，则该试剂盒检测抗体针对的是目的抗原。

如果购买了两盒同一公司的ELISA试剂盒A和B，利用交叉实验即可辨别ELISA试剂盒是否造假，方法如下：

1) 取出购买的试剂盒A的包被板两条。

2) 一条包被板加试剂盒A的标准品做标准曲线。

3) 另一条包被板加试剂盒B的标准品做标准曲线。

4) 后续操作按照试剂盒说明书进行，加检测抗体、酶复合物和底物。

5) 实验完毕后，检测两条标准曲线，如果两条标准曲线一致则说明两个ELISA试剂盒检测的同一个指标而非A和B，即该试剂盒为伪劣假造ELISA试剂盒。

6) 如果加B标准品的标曲无线性则说明两个ELISA试剂盒检测的不同指标，试剂盒A只能检测A，不能检测B，即该试剂盒为正常的ELISA试剂盒。

5. ELISA常见问题及注意事项

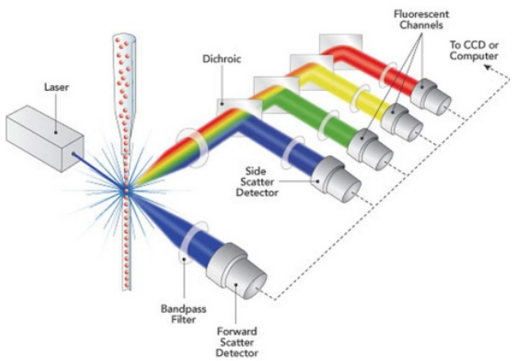
问题	可能原因	解决方法
信号较弱	标准品配制不正确	标准品加稀释液后充分溶解，并在指定时间内使用
	加入孔内的试剂量不足	检查移液枪的功能，必要时进行校准。确保枪头和枪紧密结合
	抗原抗体反应不够充分	延长反应时间，确保在最适温度下进行
	试剂过期	检查试剂盒有效期，不使用过期试剂
	酶标仪滤光片不匹配	检查酶标仪设置及滤光片
	试剂盒平衡不充分	确保试剂盒在使用前平衡至室温
	显示时间不够	增加底物显色时间
边缘效应	孵育温度不均衡	避免在环境温度变化大的地方孵育
	蒸发	确保孵育时封闭完好
	酶标板叠放	避免酶标板叠放
背景高	显色时间过长没及时终止	控制显色时间，及时终止反应
	反应温度过高导致的非特异性吸附	严格控制反应在最适温度下进行
	洗板不充分	增加洗涤次数 延长洗液浸泡时间 确保洗涤前弃去所有残留溶液
无信号	检测抗体、ABC、显色液漏加或加试剂顺序出错	检测试验操作流程，复核试剂添加顺序，重复试验
	抗体用量不足	检查抗体稀释倍数是否正确
	酶被叠氮钠污染	使用新配制的试剂
	同时操作两盒及以上试剂盒时，试剂盒中试剂或酶标板混淆	试验过程中，做好记录，避免试剂或酶标板混淆
梯度稀释时出现跳孔现象	酶标板叠放	避免酶标板叠放
	梯度稀释时不准确	确定移液枪精准，梯度稀释操作正确
	蒸发	孵育时用封板膜封闭或加盖板
	洗板不均匀	确定洗板机正常工作
	酶标板底有杂物或水珠	读数时清理干净酶标板底部
标曲佳但样本孔无信号	样本含量低或样本中无检测物	设置阳性对照，重复实验
	样本基质遮盖检测	选择合适稀释倍数，重新稀释样本再测
标曲佳但样本信号偏高	样本中待测物超过标曲范围	选择合适稀释倍数，重新稀释样本再测

第五章 流式细胞术

一. 基础知识

概念：流式细胞术（Flow Cytometry, 简称FCM）是以激光为光源，对处在快速直线稳定流动状态的颗粒（通常是细胞）进行多参数、快速定量分析和分选的技术。

基本原理：简而言之就是一定波长的激光束直接照射到高压驱动的液流，产生的光信号被多个接收器接收，一个是在激光束直线方向上接收的前向角散射光信号，其他的是在激光束垂直方向上接收的光信号，包括侧向角散射光信号和荧光信号，这些光信号被相应的接收器接收后，根据接收到信号的强弱就能反映出细胞的物理和化学特征。



检测对象：包括有细胞、细菌、染色体、细胞因子、生物颗粒如外泌体、囊泡等、物理性颗粒微球等。

检测内容：细胞大小和内部颗粒度、细胞活性、DNA/RNA/蛋白质等含量检测、表面抗原及细胞因子表达等物理化学生物性质。

二. 流式细胞术的三大要素

1. 流式细胞仪

流式细胞仪的基本结构包括液流系统、光路系统、检测分析系统和分选系统。分析型流式细胞仪主要由前面的3个系统组成，分选型的流式细胞仪多一个分选系统。

2. 样品细胞

流式细胞术的检测对象是单细胞悬液，脏器或组织必须先用各种方法制备成单细胞悬液才能用于流式检测。

3. 荧光染料或荧光素偶联抗体

样本细胞只有标记荧光素或荧光素偶联抗体进而被激光照射才能发射荧光信号，从而得到样品细胞表达某抗原分子强弱情况等化学特征，否则只能通过分析散射光信号得到样品细胞体积、大小和颗粒度等物理特征。

三. 流式检测的一般步骤

1. 了解仪器的配置，验证仪器运行状态；

2. 了解实验原理与目的，设置检测方案；

3. 合理选择荧光染料，做好染色样本（阴性对照，同型对照，补偿管，待测样本）；

4. 阴性对照管调节电压，确定目的细胞群体及阴性与阳性的分界；

5. 固定电压条件，分别用每个单染补偿管调荧光补偿，消除不同荧光间的干扰；

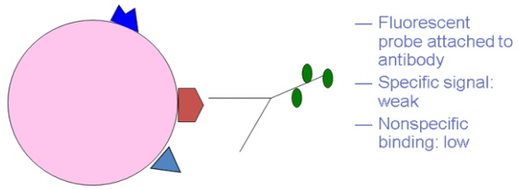
6. 多色同时标记样本进行检测，确认阴性阳性分界及补偿条件的合理性，进行设门、数据分析。

注：流式细胞术关注的是细胞的群体信息，如有多少比例的细胞表达某重要的抗原分子或合成某细胞因子等，而较少关注其中某一个细胞的特性，所以，流式细胞术得到的数据经常是一个比例值或平均荧光强度等群体信息。

四. 流式染色方式

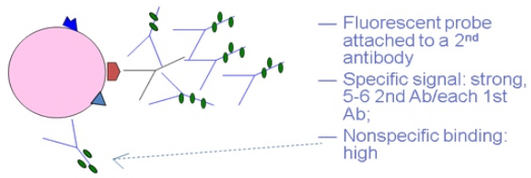
1. 直接染色

直接免疫荧光染色时，细胞与直接结合有荧光染料（如FITC 标记）的抗体孵育。它的优点在于只需要抗体孵育这一个步骤，从而消除了来自二抗的非特异性结合的可能性。这对细胞内染色特别有用，由于大的抗体荧光分子复合物包括二抗被困在细胞内造成背景，或甚至无法进入细胞，阻止了一抗的检测。



2. 间接染色

间接染色时，一抗不是荧光染料直接标记的，而是通过荧光染料标记的二抗检测。另外可选择使用亲和-生物素系统，即抗体与生物素结合并且通过荧光染料标记的亲和素来检测。随着标记二抗越来越多的应用，可针对不同的目标蛋白制出未标记的一抗，然后用标记二抗进行流式细胞仪分析，这拓宽了研究者对目标蛋白的选择范围。



3. 细胞内染色

应用流式细胞术的细胞内源性抗原在染色时，需要对样本进行固定和通透，以使抗体能接近胞内蛋白。

流式常用的固定方式有两种：

1) 沉淀法：如70%乙醇，做细胞周期时常用到，还兼带破膜的作用；

2) 交联法：如4%多聚甲醛。

注：根据检测的表面Marker不同，固定对结果的影响也会有差别，除了固定剂对抗原本身的影响，还可能导致荧光素淬灭。所以不管是流式染色前还是染色后，为了结果更加准确，最好都不要多聚甲醛固定样本。一定要固定的话，也一定要先验证待测分子固定前后染色水平无明显的变化。

膜通透试剂的选择：

1) 甲醇：中等，可能导致部分蛋白变性

2) 皂素：温和，对细胞形态影响小

3) Triton-X100：强烈，对细胞形态影响大

4) 商品化试剂：含有上述多种成分，不同组合用途不同

荧光染色的方式：

1) 膜抗原检测：染色后裂红

2) 膜和胞内单一抗原检测：固定-破膜-染色

3) 膜和胞内多抗原检测：表面染色-固定-破膜-胞内染色

注：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，采用合适的对照设定流式细胞仪，并且（如有必要）优化样品的固定和通透方法。

五. 荧光素的选择

1. 常见的荧光素

主要荧光素包括：PI、FITC、PE、PC5、PerCP、Cy5、Cy7、APC等。在单色或双色分析时，最常用的荧光素为FITC和PE。

Reagent	Filter	Stain Index
PE	585/40	356.3
Alexa Fluor® 647	660/20	313.1
APC[1]	660/20	279.2
PE-Cy™7	780/60	278.5
PE-Cy5[2]	695/40	222.1
PerCP-Cy5.5[2]	695/40	92.7
PE-Alexa Fluor® 610	610/30	80.4
Alexa Fluor® 488[3]	530/30	75.4
FITC[1]	530/30	68.9
PerCP[2]	695/40	64.4
APC-Cy7	780/60	42.2
Alexa Fluor® 700	720/45	39.9
Pacific Blue™	440/40	22.5
AmCyan	525/50	20.2

图/常见荧光素的染色指数

2. 荧光素的选择原则

1) 依据抗原密度不同选择不同荧光素

——低密度抗原选择强的染料

——高密度抗原选择较弱亮的染料

2) 多色试剂的关键

——比较容易补偿

——检测表达弱的,或稀有的细胞

——染料的干扰

➡ 非特异性结合

➡ 构象的阻碍

➡ 光漂白

➡ 荧光共振

6-color	8-color	10-color
FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488
PE	PE	PE
-	-	PE-Texas Red® or PE-Alexa Fluor® 610
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647
-	-	Alexa Fluor® 680 or 700
APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7
-	AmCyan	AmCyan
-	Pacific Blue™	Pacific Blue™

图/常见的6、8、10色荧光染料组合

六. 多色实验抗体组合原则

1. 弱表达抗原选择强荧光染料，强表达抗原选择弱荧光染料（"老法则"）。

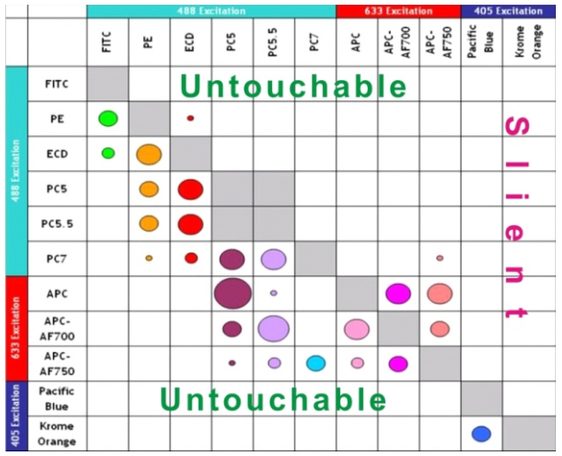
2. 弱表达抗原放在“untouched”通道，强表达抗原放在“silent”通道。

3. 互相排斥的抗原允许spillover。

4. 共表达抗原避免spillover。

5. 允许子代对亲代对spillover, 反之不行。

6. 使分析的复杂程度降到最低。



Untouchable=其他染料不会干扰
Silent=不会干扰其他通道

七. 流式细胞术的样本制备及保存

流式常用的样本包括组织样本、培养细胞、血液及其他体液等。样本制备的目的是获得单细胞悬液。

1. 组织单细胞悬液制备

常用方法：机械法、酶解法、化学试剂处理法

操作流程：新鲜组织——组织分散——过滤、离心、洗涤——细胞悬液——细胞计数及活性检测——细胞固定或抗体标记

保存：深低温保存法（一年）；乙醇或甲醇保存法（2周）；甲醛或多聚甲醛保存法（2月）

比较：

1) 机械法常造成严重的细胞损伤，单细胞产量低，因为碎片过多会影响检测结果，所以应尽量去除碎片；

2) 化学处理法的处理组织导致细胞存活率低，细胞产量较低，细胞碎片和细胞聚集量不稳定，此方法可单独使用，也可与其他方法结合使用；

3) 酶学法、化学法对实体组织的分散解聚较理想，但对所检测的化学成分有不良影响。

注意事项：

① 新鲜组织标本应及时进行处理保存，以免在室温下放置时间过长，产生组织坏死及细胞自溶，影响检测结果；

② 根据实验目的选择最佳的固定方法，避免固定剂的原因，造成检测结果的不稳定；

③ 酶解法要注意条件的选择和影响因素，注意酶的溶剂、消化时间、pH值、浓度等方面对此方法的影响。

2. 培养细胞的单细胞悬液制备

1) 悬浮细胞：反复吹打，分散聚团的细胞即可；

2) 贴壁细胞：可采用机械刮脱法、钙螯合法、酶消化

	机械刮脱法	钙螯合法	酶消化
优点	操作简单，细胞表面抗原保存完好	细胞表面抗原保存完好	高效、简便，细胞回收率和存活率均高
缺点	可能导致大量细胞机械损伤	耗时，细胞回收率低，降低细胞存活率	可能显著改变细胞表面抗原表达

3. 血液样本

在生理状态下，血液中细胞成分呈分散的游离状态，因此血细胞是FCM最合适的样品。血细胞成分包括红细胞、白细胞和血小板等有形成分，白细胞包括淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。流式细胞术主要是对某一类细胞群为对象，因此常常把某一群细胞单独分离出来做分析。其中白细胞的制备主要有三种方法：1) 密度梯度离心；2) 溶血分离法；3) 磁珠分选法。

密度梯度离心	溶血分离法	磁珠分选法
细胞亚群纯化，去除死细胞(PBMC制备常用)，耗时，细胞回收率低	染色后溶血>>溶血后染色，经济，操作简便，细胞回收率高	快速简便，选择性强，价格昂贵

保存原则：尽量缩短保存时间；选择合适的抗凝剂；选择适宜的保存温度（一般为4℃或常温）

八. 流式主要实验对照及作用

空白对照（未染色的细胞）：用以区分细胞的自发荧光和特异性荧光，避免假阳性的结果。

同型对照（电压）：是指使用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，用于消除抗体非特异性结合到细胞上而产生的背景荧光。

单染管对照（补偿）

FMO：称为减一阴性对照或荧光扣除对照，用于多色实验，圈定阳性群，低表达情况下，将阴阳性分开，便于设门。

阳性对照：在诊断抗原表达确失性疾病时，需确定抗原表达正常时的抗原表达强度和百分含量

阴性对照：评估非特异反应水平，界定阴性范围

标准微球：界定目标细胞或微颗粒大小

其他：胞内细胞因子的检测需做系列对照（刺激剂活性实验、阻断剂实验）

使用同型对照的注意事项：

① 如果抗原表达为双峰分布（即阴性峰和阳性峰明显分开），那么就不需要同型对照。例如外周血T细胞的CD4、CD8的表达。

② 如果你检测的是培养后的细胞，那么同型对照可以给你一些反映细胞粘附能力的信息，但无法反映其它非特异性荧光。

③ 如果你的实验中同时用到多种荧光素，分析时荧光渗漏对结果影响较明显，而背景荧光不明显，那么最好用FMO（荧光扣除对照，指的是除掉检测通道的荧光素，其它荧光都加上）。

④同型对照是参考，但不能直接、单纯凭此确定阳性阴性分界点或以此设门，因为同型对照只能反映非特异性结合的背景荧光，而背景荧光如第2点的链接所述，还有其它因素引起的。

⑤ 需要进行目标抗体的滴定，以降低非特异性结合的背景荧光。因为抗体量过多，会造成阴性峰的偏移和基底增宽。

⑥ 如果你使用同型对照时发现非特异性结合水平很高，那么就要注意进行Fc阻断了，目前有商业化的Fc阻断剂，也可以用免疫球蛋白或血清阻断。

⑦ 对于细胞信号转导和细胞因子检测，除了FMO对照，还需要设置生物学阴性对照，例如未刺激细胞或用磷酸化抑制剂处理的细胞。

⑧ 记得在多色方案中加入细胞活性染料，以去除死细胞。死细胞的非特异性染色很强。

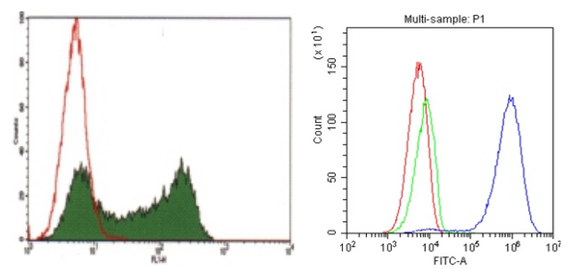
九. 流式细胞术结果分析

1. 流式细胞术结果数据的显示方式及意义

流式细胞术数据的显示通常有一维直方图、二维点图、等高线图、密度图等几种。

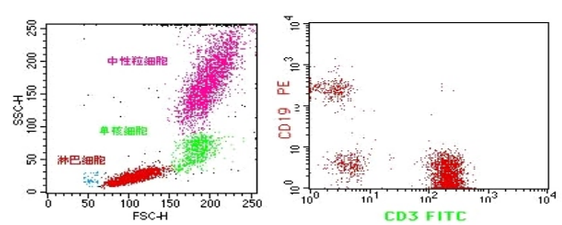
1) 单参数直方图

每一个细胞单参数的测量数据可以整理成统计分布，以直方图的方式来显示。在图中，横坐标表示荧光信号或散射光信号相对强度的值，其单位是道数（channel），可以是线形（line）或者对数（log）。纵坐标一般是相对细胞/粒子数（count）！



2) 二维图

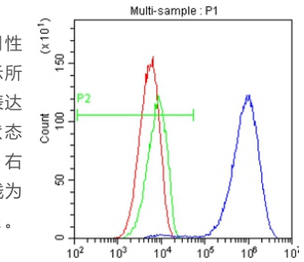
在二维图中，横坐标/纵坐标都表示荧光信号或散射光信号相对强度的值，可以是线形（line）或者对数（log）。双参数图可以将样品细胞群分开，从而方便对感兴趣的细胞进行分析。



注：流式图中的颜色为区分不同细胞群而人为指定，与荧光颜色无关。

2. 流式图中的阴/阳如何划分？

阴性区域的划分完全是根据阴性(同型)对照来的！同型对照显示所检测的物质在阴性组中的基础表达量，可以理解为背景、静息状态下、基础水平、未受刺激时等。右图中红色线为空白对照，绿色线为同型对照，蓝色线为实验组。P2区域即为阴性区域。



3. 数据分析中几种常见图形及分析原则

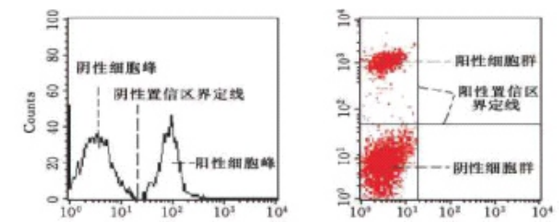
1) 阴性细胞群（峰）和阳性细胞群（峰）分群明显

分析原则：

① 根据阴性对照界定阴性置信区；

② 允许阴性对照非特异荧光信号（假阳性）一般小于1%-5%；

③ 可以记录阳性细胞百分率和平均荧光强度。



2) 样本管与阴性对照管峰形重叠，但样本管峰形左侧右移，右侧有肩峰

分析原则：

① 根据阴性对照界定阴性置信区，阴性置信区应设在两曲线分离处；

② 可以记录阳性细胞百分率（近似值）或平均荧光强度，或弱阳性；

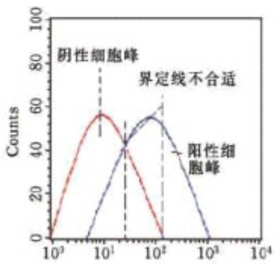
③ 允许阴性非特异荧光信号（假阳性）高些，但阳性细胞百分率（近似值）要减去假阳性率。

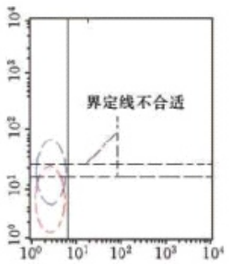
3) 样本管与阴性对照管峰形重叠，但样本管峰形整体右移

分析原则：

① 不能根据阴性对照界定阴性置信区；

② 可以记录平均荧光强度，不可记录阳性细胞百分率（近似值）。

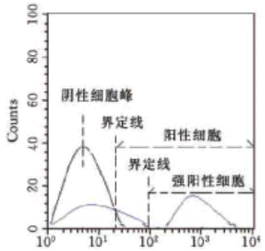




4) 同时出现弱阳性峰与强阳性峰的组合图形

分析原则：

① 根据阴性对照界定阴性置信区，阴性置信区应设在两曲线分离处。阳性细胞要包含弱阳性细胞和强阳性细胞，但阳性细胞百分率要减去假阳性百分率；



② 界定线可设在弱阳性返回基线处，阳性细胞仅表示强阳性细胞；

③ 可记录阳性细胞百分率或平均荧光强度。

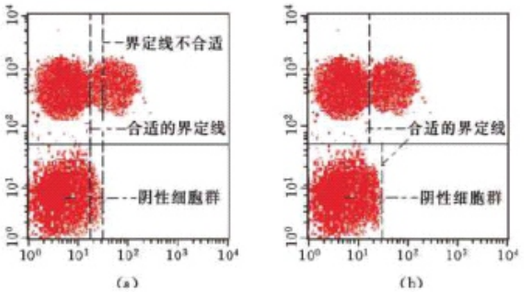
5) 阴性细胞和阳性细胞分群处于阴性置信区界定线不在一条直线上

分析原则：

① 根据阴性对照界定阴性置信区不合适；

② 根据细胞分群趋势，可以将界定线设在阴性细胞与阳性细胞分群处；

③ 可以记录阳性细胞百分率或平均荧光强度，阳性细胞百分率要减去假阳性率；



这种情况是由阴性细胞和阳性细胞的自身荧光阈值不同导致的

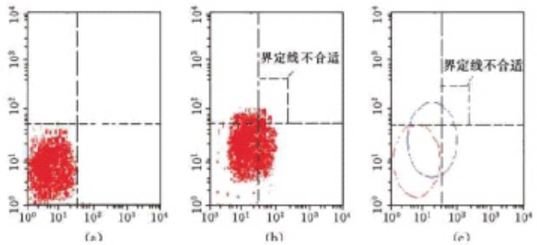
6) 与阴性对照管相比，样本管细胞群整体呈45°角平移

分析原则：

① 根据阴性对照界定阴性置信区不合适；

② 这类图形多由非特异性染色引起；

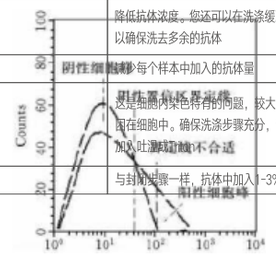
③ 执行严格的阴性对照（同型对照）排除非特异性染色，且待测的两个分子在细胞上都是低表达，方可记录平均荧光强度，一般不记录阳性细胞百分率。



多出现在双色或多色实验中

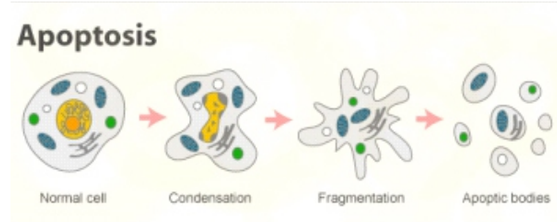
十. 流式常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决方法
无信号/荧光强度弱	一抗和二抗不匹配	二抗应该是和一抗来源物种相同
	抗体量不足	增加抗体的量/浓度
	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
	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
	仪器故障	可能需要考虑联系厂家
	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
	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
	补偿过高或增益过低	使用阳性对照再次设置设置补偿或在合理的范围内提高增益以增强信号
	荧光分子的荧光逐渐消退	抗体可能放置时间太长或没有避光。
背景高或阳性细胞百分比高	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，用补偿减少颗粒背景并减少增益以降低信号
	抗体过量	降低抗体浓度。您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
荧光强度过高	抗体浓度过高	减少每个样本中加入的抗体量
	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其他去污剂
	封闭不足	与封闭步骤一样，抗体中加入1-3%封闭试剂



第六章 细胞凋亡

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。



图/细胞凋亡的过程

一. 细胞凋亡在形态学上的变化

第一阶段：胞体缩小，与周围细胞失去联系，细胞器变致密，核体积缩小，核仁消失，细胞质浓集于核膜内表面下，形成新月形致密小斑块。

第二阶段：染色体断裂，核膜与细胞膜均内陷，包裹胞内成分（胞质、细胞器、碎裂的染色质及核膜），形成“泡”样结构，此为“凋亡小体”。最后整个细胞均裂解成多个凋亡小体。

第三阶段：凋亡小体被邻近的巨噬细胞、上皮细胞等识别，吞噬，消化。

注：上述三个阶段维持时间很短，通常在几分钟至十几分钟内即可完成。

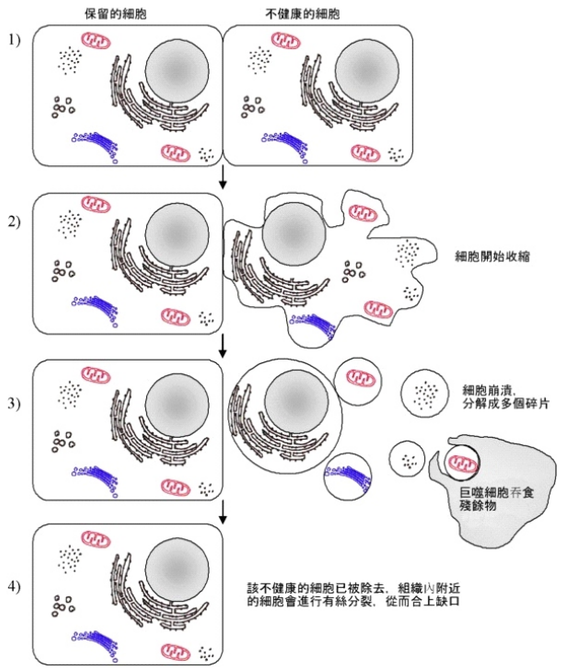
二. 细胞凋亡过程中细胞的形态学观察

形态学观察细胞凋亡的变化是多阶段的，细胞凋亡往往涉及单个细胞，即便是一小部分细胞也是非同步发生的。

细胞器：首先出现的是细胞体积缩小，连接消失，与周围的细胞脱离，然后是细胞质密度增加，线粒体膜电位消失，通透性改变，释放细胞色素C到胞浆；

细胞膜：胞膜有小泡状形成，膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，胞膜结构仍然完整。

细胞核：核质浓缩，核膜核仁破碎，DNA降解成为约180bp-200bp片段



图/细胞凋亡形态学的变化

三. 细胞凋亡与程序性死亡

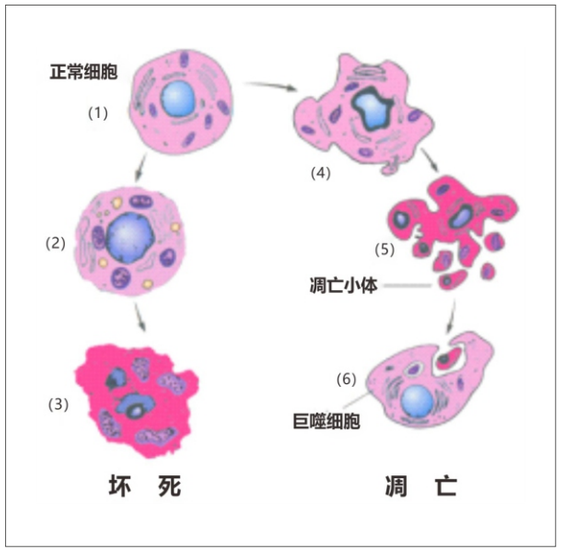
细胞程序性死亡（PCD）与细胞凋亡是有很大区别的。PCD是个功能性概念，描述在一个多细胞生物体中某些细胞死亡是个体发育中的一个预定的，并受到严格程序控制的正常组成部分。这些细胞逐个地从正常组织中死亡和消失，机体无炎症反应，而且对整个机体的发育是有利和必须的。因此认为动物发育过程中存在的细胞程序性死亡是一个发育学概念，而细胞凋亡则是一个形态学的概念，描述一件有着一整套形态学特征的与坏死完全不同的细胞死亡形式。但是一般认为凋亡和程序性死亡两个概念可以交互使用，具有同等意义。

四. 凋亡与坏死的区别

虽然凋亡与坏死的最终结果极为相似，但它们的过程与表现却有很大差别。

坏死（necrosis）是细胞受到强烈理化或生物因素作用引起细胞无序变化的死亡过程。表现为细胞胀大，胞膜破裂，细胞内容物外溢，核变化较慢，DNA降解不充分，引起局部严重的炎症反应。

凋亡（Apoptosis）是细胞对环境的生理性病理性刺激信号，环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程。其细胞及组织的变化与坏死有明显的不同。



图/细胞凋亡与坏死

区别点	细胞凋亡	细胞坏死
起因	生理或病理性	病理性变化或剧烈损伤
范围	单个散在细胞	大片组织或成群细胞
细胞膜	基本保持完整，一直到形成凋亡小体	破损
染色质	凝聚在核膜下呈半月状	呈絮状
细胞器	无明显变化	肿胀，内质网崩解
细胞体积	固缩变小	肿胀变大
凋亡小体	有，被邻近细胞或巨噬细胞吞噬	无，细胞自溶，残余碎片被巨噬细胞吞噬
DNA	有控降解	随机降解
蛋白质合成	有	无
调节过程	受基因调控	被动进行
炎症反应	无，不释放细胞内容物	有，释放内容物

五. 细胞凋亡的检测方法

早期检测

1) 线粒体膜电位变化的检测（线粒体）

2) 细胞色素C的定位检测（线粒体）

3) PS（磷脂酰丝氨酸）在细胞外膜上的检测（细胞膜）

4) 细胞内氧化还原状态改变的检测

晚期检测

1) TUNEL（即末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法）（细胞核）

2) LM-PCR Ladder （连接介导的PCR检测）（细胞核）

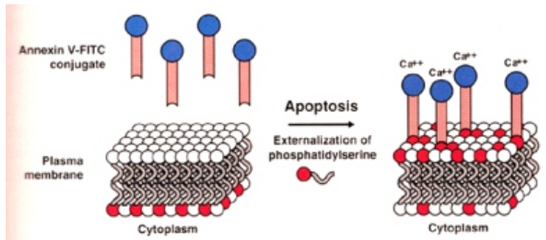
3) Telemerase Detection （端粒酶检测）（细胞核）

目前应用较多的为磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V法，早期凋亡)和TUNEL法（晚期凋亡）

1. 磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V法)

磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧，但在细胞凋亡的早期，PS可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(图3)。Annexin-V是一种分子量为35~36KD的Ca2+依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力特异性结合。将Annexin-V进行荧光素(FITC、PE)或biotin标记，以标记了的Annexin-V作为荧光探针，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(propidine 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能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将Annexin-V与PI匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。



操作步骤（以博士德Annexin V-FITC /PI凋亡试剂盒MK1028为例）：

1) 悬浮细胞离心（2000rpm离心5min）收集；贴壁细胞用不含EDTA的胰酶消化收集（注：胰酶消化时间不易过长，否则容易引起假阳性）；

2) 用PBS洗涤细胞二次（2000rpm离心5min）收集1~5×10^5细胞；

3) 加入500μL的Binding Buffer悬浮细胞；

4) 加入5μL Annexin V-FITC混匀后，加入5 μL Propidium Iodide，混匀；

5) 室温、避光、反应5～15min；

6) 请在1 hour内，进行下述荧光显微镜或流式细胞仪的观察和检测。

A. 荧光显微镜观察

1) 滴一滴上述染色后的细胞悬液于载玻片上，并用盖玻片盖上细胞；

2) 对于贴壁细胞来说，也可直接用盖玻片来培养细胞并诱导细胞凋亡；

① 将细胞于盖玻片上生长，用适当的凋亡诱导剂诱导细胞凋亡，并设立阴性对照组；

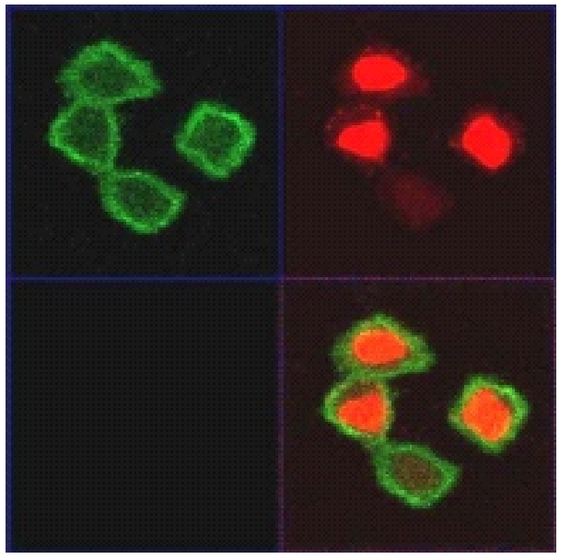
② 用PBS洗涤细胞两次；

③ 在500μL的Binding Buffer中加入2μL Annexin V-FITC，5μL Pi，混匀；

④ 将上述溶液滴加于盖玻片表面，使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖；

⑤ 避光、室温反应5 min。

3) 将盖玻片倒置于载玻片上，荧光显微镜下观察。



图/Annexin V-FITC荧光信号呈绿色，PI荧光信号呈红色

B. 流式细胞仪分析

用流式细胞仪检测，激发波长Ex=488 nm; 发射波长Em=530 nm。

Annexin V-FITC的绿色荧光通过FITC通道检测；PI红色荧光通过PI通道。

荧光补偿调节：使用未经凋亡诱导处理的正常细胞，作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1) 悬浮细胞，2000rpm 离心5min 收集细胞；对于贴壁细胞，要用不含EDTA 的胰酶消化细胞，胰酶消化时间不宜过长或过短（过长细胞膜破碎，造成假阳性，过短，细胞黏连影响检测）最好是在轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时，吸除胰酶消化液，加入细胞培养液终止消化，2000rpm 离心5min 收集细胞。

2) 4℃ 预冷PBS，洗涤细胞2次（2000rpmx5min）收集细胞2～5×10^5。

3) 离心弃上清，加入500μL 结合缓冲液，轻轻吹打重悬细胞。

4) 加入5μL Annexin V-FITC，轻轻吹打混匀，加入5μL PI 轻轻吹打混匀，室温避光孵育5-15min。(PI 染色时间过长有可能造成检测的凋亡率偏高，时间允许，可以在检测前5 分钟加入PI。)

5) 流式细胞仪检测或荧光显微镜观察。最好在1h 内检测。

注意事项：

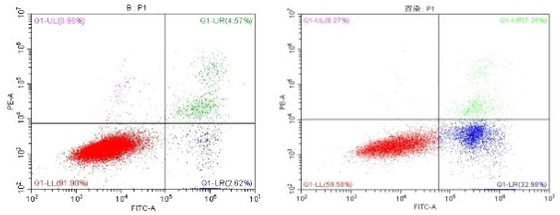
① Annexin V-FITC 与PI 量微，请在使用前离心集液。

② Annexin V-FITC 与PI 需低温避光储存。

③ PI 有毒，能透过皮肤进入体内，使用时注意必要防护。

④ 检测细胞不能固定。

实验参考：凋亡诱导剂处理JK细胞，37℃，5% Co_2培养4h，参照说明书操作，经流式细胞仪检测结果如下：



处理前：正常细胞占比较高，早期凋亡

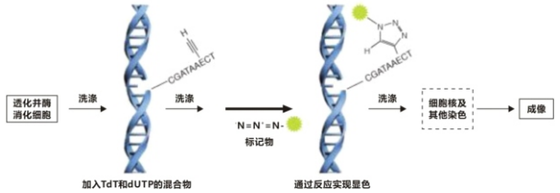
处理后：正常细胞明显减少，早期凋亡细胞明显增加。细胞与晚期凋亡细胞较少。

注：红色部分为正常细胞，蓝色为早期凋亡细胞，绿色为晚期凋亡细胞，品红为坏死细胞。

2. TUNEL法

细胞凋亡中，染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的粘性3'-OH末端，可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、碱性磷酸酶或生物素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)。

由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有DNA的断裂，因而没有3'-OH形成，很少能够被染色。TUNEL实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法，对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征，可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的细胞形态测定，并可检测出极少量的凋亡细胞，因而在细胞凋亡的研究中被广泛采用。



操作步骤（以博士德货号为MK1020的TUNEL细胞凋亡检测试剂盒为例）：

1) 样品处理

① 玻片预先用多聚赖氨酸或APES 进行处理。

② 细胞涂片和冰冻切片：最重要的是及时固定。用4%多聚甲醛

/0.01M PBS(pH7.0-7.6)室温下固定30—60 分钟。0.01M PBS 洗2分钟×2 次。蒸馏水洗涤2 分钟×2 次。

③ 组织：有条件时应及时固定。常规4%多聚甲醛/0.01M PBS(pH7.0-7.6)或10%中性缓冲福尔马林固定4 小时以上，石蜡包埋。切片常规脱蜡入水(脱蜡务必干净)。

2) 新鲜配制3%双氧水，室温处理10 分钟。蒸馏水洗涤2 分钟×3次。

3) 标本片加0.01M TBS 1:200 新鲜稀释Proteinase K 37℃消化1-15分钟，0.01M TBS 洗2 分钟×3次。(细胞涂片和冰冻切片一般不消化或消化10—60 秒钟。新鲜石蜡切片消化5-10 分钟。陈旧石蜡切片消化10-15 分钟)。

4) 标本片加标记缓冲液(Labeling Buffer) 20μl/片,以保持切片湿润。按每张切片取TdT和DIG-d-UTP 各1μl，加入18μl标记缓冲液中，混匀。甩去切片上多余液体后加标记液，20μl/片。置样品于湿盒中，37℃标记2 小时。

5) 0.01M TBS 洗2 分钟×3 次。

6) 加封闭液50μl/片，室温30 分钟，甩掉封闭液，不洗。

7) 用抗体稀释液1：100稀释生物素化抗地高辛抗体：取1ml 抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体10μl，混匀后50μl/片加至标本片上。置样品于湿盒中，37℃反应30 分钟。0.01M TBS洗2 分钟×3 次。

8) 用抗体稀释液1：100稀释SABC：取1ml 抗体稀释液加SABC 10μl，混匀后50μl/片加至切片。37℃反应30 分钟。0.01M TBS 洗5 分钟×4 次。

9) DAB 显色：取1ml 蒸馏水，分别加入DAB 试剂盒中A，B，C 试剂各一滴，混匀后加至标本片上，显色10-30 分钟左右。水洗。

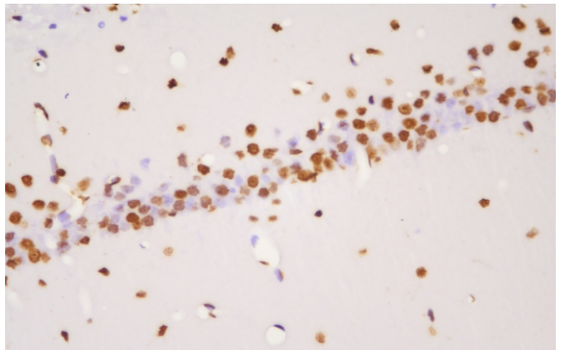
10) 苏木素轻度复染。0.01M TBS 洗，蒸馏水洗。脱水，透明，封片。显微镜观察。

注意事项：

① 试剂盒严格-20℃存放。

② 初用时如试管底部无可见的试剂，在离心机离心5 分钟，使试剂沉至管底。

③ 检测过程中切勿使样品干涸。



图/TUNEL法POD系统DAB显色

博士德提供不同标记方式的TUNEL凋亡检测试剂盒：

货号	产品名称
MK1011	TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-POD
MK1012	TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-CY3
MK1013	TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-FITC
MK1014	TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-AP
MK1015	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-POD
MK1016	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-CY3
MK1017	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-AP
MK1018	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-FITC
MK1019	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-FITC+POD

TUNEL法常见问题及解决方法：

1) 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 内源性过氧化物酶未被封闭，要严格规范实验操作

2) 无阳性

① TDT酶保存一定要恰当，在常温下就失活，应在-**20**℃以下保存

② 标本制作过程中烤片时间固定时间过长，标本制作不规范均可导致无阳性。

③ 实验中漏加试剂，实验操作不规范。

3) 阳性弱

① DIG-dUTP和TDT酶浓度过低，解决方法：根据组织大小严格按照说明书的比例配制

② 孵育时间过短，解决方法：加强孵育时间

③ 液体流失，解决方法：补加试剂

④ 显色时间过短，解决方法：在显微镜下控制反应时间

4) 染色背景较高

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封闭，

③ 标记反应试剂的浓度过高

④ 孵育时间过长

第七章 原位杂交技术

原位杂交技术（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、细胞中待测的核酸按碱基配对的原则进行特异性结合而形成杂交体，然后再应用标记物相应的检测系统，通过组织化学或免疫组织化学方法，放大信号后在被检测的核酸原位形成带一定颜色的杂交信号，在显微镜下进行细胞内定位。原位杂交技术应用于染色体、细胞和组织切片等样品中进行核酸特异性检测，与免疫组化技术的结合应用，能将DNA、mRNA和蛋白水平上的基因活性与样品的显微拓扑信息结合起来。

原位杂交技术已用于基础研究，如基因作图、转基因检测、基因表达定位等，临床研究应用在细胞遗传学、产前诊断、肿瘤和传染病的诊断、生物学剂量测定和病毒学的病原学诊断等。随着核酸探针的制备、标记方法和基本操作方法的不断改进，新的技术不断涌现，原位杂交技术将会更广泛的应用于各个学科。

一. 原位杂交技术的基本原理

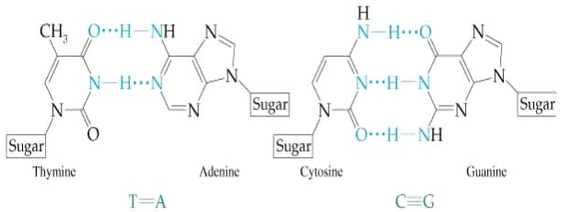
利用核酸分子单链之间有互补的碱基顺序，通过碱基对之间非共价键的形成，出现稳定的双链区，形成杂交的双链。

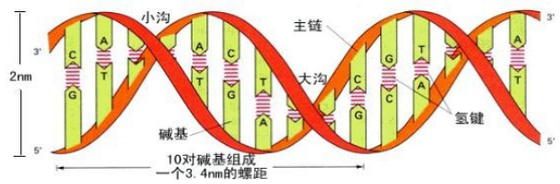
1) 两条核苷酸单链片段，在适宜的条件下，通过氢键结合，形成DNA-DNA、DNA-RNA或RNA-RNA 双键分子

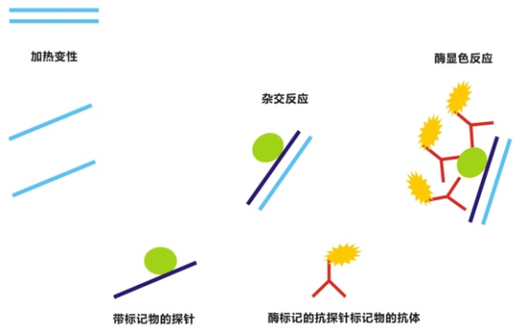
2) 应用带有标记的（有放射性同位素，如3H、35S、32P，荧光素、生物素、地高辛等非放射性物质)DNA或RNA片段作为核酸探针,与组织切片或细胞内待测核酸(RNA或DNA）片段进行杂交

3) 用放射自显影等方法予以显示，在光镜或电镜下观察目的mRNA或DNA 的存在与定位

二. 碱基互补配对原理







三. 核酸探针的分类

根据探针的核酸性质不同可分为DNA**探针**、RNA**探针**、cDNA**探针**、cRNA**探针和寡核苷酸探针等。其中**DNA**探针还有单链**DNA（Single stranded，ssDNA）**和双链**DNA（Double stranded，dsDNA）**之分。**

比较：

1) RNA探针：用途广，容易获得，但其不稳定性限制其用途。

2) cDNA探针：特异性强，被广泛使用；但制备过程较复杂，有相应条件的实验室才能做到。

3) 寡核苷酸探针：可大量合成，且快速简便，渗透性好，特异性好；敏感性稍低。博士德采用三相寡核苷酸探针技术生产的探针渗透性和特异性好，并且解决了敏感性低的问题。

探针标记的方法：

cDNA探针一般采用随机引物标记法，偶尔也用缺口平移标记法。标记出来的探针长度有200bp-500bp其长度并不依赖cDNA的长度，所以长达数千碱基的cDNA才能用于原位杂交。

寡核苷酸探针的标记方法有5’-末段标记；3’-末段标记；3’-尾段标记。前两种均不适用于原位杂交，3’-尾段标记可将多个标记物结合到寡核苷酸探针，敏感性可提高10倍左右，非常适用于原位杂交。博士德公司采用的标记方法就是3’-尾段标记。

四. 原位杂交组织化学技术的基本方法

如前所述，由于核酸探针的种类和标记物的不同，在具体应用的技术方法上也各有差异，但其基本方法和应用原则大致相同。大致可分为：①杂交前准备，包括固定、取材、玻片和组织的处理，如何增强核酸探针的穿透性、减低背景染色等；②杂交；③杂交后处理；④显示（visual－ization）：包括放射性自显影和非放射性标记的显色。

1. 固定

对于染色体涂片，1：:1的乙醇/醚处理的载玻片已能符合要求。对于组织切片的原位杂交，为了在实验过程中不丢失组织样品，可使用多聚赖氨酸或铬矾明胶包被的载玻片。

样品的固定步骤是为了保持样品的原有形态学。样品固定是原位杂交中必不可少的步骤，从化学反应角度来看，固定剂的使用和选择对后续杂交的影响不会太大，因为核酸杂交的功能分子基团被安全地包裹

在DNA双螺旋结构中，而交联剂的使用对RNA基本没有影响。对于染色体涂片，常使用甲醇/醋酸溶液固定；石蜡包埋的组织切片用福尔马林固定。冷冻切片可通过在4%的甲醛溶液中固定30min，或使用Bouin固定剂。

注：最重要的是及时固定，并在固定液中加入0.1%的DEPC处理，以抑制RNA酶对mRNA的分解作用。

2. 样品预处理

在待测样品中，DNA或RNA通常都是被蛋白包裹缠绕，根据不同的细胞和组织样品的应用，可选择合适的预处理方法将靶核酸暴露。

1) 内源性酶灭活

如果探针的检测是通过酶促法进行的，则样品内相应的内源性酶必须被灭活。如内源性的POD可通过3% H2O2溶液处理10min。如果检测酶为AP，可在底物溶液中加入左旋咪唑，AP检测的内源性背景一般来说比POD检测的低得多，因为在杂交过程中，样品中内源性AP酶的活性基本都丧失了。

2) Rnase处理

在DNA-DNA杂交实验中，RNase的处理可去除内源性RNA，增加实验的信噪比。在进行mRNA为靶标的检测时，RNase处理的样品也可作为质控对照。通常的处理方式是将DNase-free的RNase溶解于2×SSC (100μg/ml)，样品在溶液中37℃处理60min。

3) Hcl处理

对样本进行20-30min的200mM Hcl处理，可将蛋白抽提，并将核酸序列进行一定程度的水解，增加杂交检测的信噪比。

4) 去垢剂处理

如果对样品的固定、脱水、包埋等预处理过程不足以将脂膜成分破坏暴露核酸，可对样品进行额外的蛋白去垢剂处理(如Triton X-100和SDS)。

5) 蛋白酶处理

样品中待杂交的核酸序列常与蛋白缠绕交联在一起，样品的固定步骤更是加剧了蛋白的交联程度，因此预渗透是核酸杂交前的常规步骤，通常通过蛋白酶K的消化作用来完成。

注：对于结缔组织，肝组织等样品，还可进行Collagenase和Dispase的组织消化处理，以降低背景。

3. 杂交

ISH整个实验周期是比较长的，实验程序也比较繁杂，杂交前的一切准备工作如增加组织通透性都是为了在杂交这一步骤中核酸探针能进入细胞或组织与其内的靶核苷酸相结合。因此，杂交是ISH中关键的而且是最重要的一个环节。

杂交是将杂交液滴于切片组织上，加原位杂交专用盖玻片。加盖片的目的是防止孵育过程中的高温导致杂交液的蒸发。盖玻片自身有一定重量能与有限的杂交液吸附达到覆盖和防止蒸发的作用。在孵育时间较长时，为保证杂交所需的湿润环境，可将复有硅化盖玻片进行杂交的载片放在盛有少量溶液的硬塑料盒（要能防止高温破坏）中进行孵育。杂交液的成分和预杂交液基本相同，所不同的是加入了标记的核酸探针和硫酸葡聚糖。

1) 探针的浓度

探针浓度依其种类和实验需要略有不同，在原位杂交细胞化学中，探针浓度为0.5～5.0μg/ml（即0.5～5.0ng/μl）。放射性标记的dsDNA或cRNA探针，其浓度在2～5ng/μl。生物素标记探针，其最佳浓度在0.5～5ng/μl。而在非放射性标记（生物素或地高辛）cRNA探针浓度为2.5ng/μl，放射性标记DNA探针浓度为1.0ng/μl。

2) 探针的长度

一般应用于ISH探针的最佳长度应在50～100个碱基之间。探针短易进入细胞，杂交率高，杂交时间短。据报告，长500个碱基的探针，其杂交时间约需20h左右。200～500个碱基的探针仍可应用，如超过500个碱基的探针则在杂交前最好用碱或水解酶进行水解，使其变成短的片段，达到实验所需求的碱基数。

3) 杂交的温度和时间

根据探针的种类不同，杂交温度略有差异，RNA和cRNA探针一般在37～42℃左右，而DNA探针或细胞内靶核苷酸为DNA的，则必须在80～95℃加热使其变性，时间5～15min，，然后在冰上搁置1min，使之迅速冷却，以防复性，再置入盛有2×SSC的温盒内，在37～42℃孵育杂交过夜。

杂交的时间一般定为16～20h，或为简便起见杂交孵育过夜，另外若核酸探针长度过长或组织通透性差，应适当延长杂交时间。

4. 杂交后洗涤

杂交后进行非特异结合探针的洗脱，同时也可进行单链核酸链的酶消化。洗脱的严谨性可通过调节洗脱液中的甲酰胺浓度、盐浓度和洗脱温度。常规洗涤条件为含50%甲酰胺的2×SSC。但在实际的实验中发现，对于提高杂交检测的特异性，严谨的杂交条件比严谨洗涤更为有效。

5. 免疫细胞化学反应显示结果

如果使用间接检测的方法，通常需引入免疫细胞化学反应进行酶免反应和底物检测。

酶反应显色包括使用POD和底物DAB/咪唑构成的显色系统、AP和底物BCIP/NBT构成的显色系统。酶免反应的检测灵敏度提高，成色后色原性物质的稳定性和定位功能更好。POD和AP的底物显色反应后使用普通的显微镜镜检，且显色可永久保留。该检测手段能满足大部分研究的灵敏度需求。对于样品厚度较高或密度较大的情况，可使用相差显微镜进行镜检。

如使用荧光标记的探针，则在杂交和洗涤步骤后直接用荧光显微镜观察。荧光探针配合荧光显微镜的检测是进行多重探针检测的良好手段，检测时建议使用抗荧光衰减封片剂，以减缓荧光淬灭。DNA复染用的PI或DAPI可直接溶于封片液进行染色。

五. 对照实验的设置

包括标本对照、探针对照、杂交体对照、检测系统对照

阴性对照：排除非特异性杂交等因素造成的假阳性

阳性对照：证明杂交步骤及试剂可靠性

空白实验：无探针的杂交液进行杂交

标本对照：选用已知为阳性或阴性的组织

注：对照实验设置越多，实验结果的可靠性就越大。每次实验都应有阳性对照和阴性对照。

mRNA原杂操作步骤（以博士德加强型原位杂交检测试剂盒(POD)-MK1030为例）：

石蜡切片

1) 取材、固定、脱水、浸蜡、包埋。切片厚度6-8μm。

2) 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或APES。

3) 石蜡切片经常规脱蜡至水。3%H_2O_2室温处理10min以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤2次。

4) 暴露mRNA核酸片段：切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1ml 3% 柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37℃或室温消化3–30min（视标本厚薄、新旧自行调整）。0.5M PBS洗3次×5min。蒸馏水洗1次。

5) 预杂交：湿盒的准备——干的杂交盒底部加20%甘油20ml以保持湿度。按每张切片20μl加预杂交液。恒温箱37-42℃孵育2-4h。吸取多余液体，不洗。

6) 杂交：按每张切片加20μl杂交液。恒温箱37-42℃杂交过夜。

7) 杂交后洗涤：30-37℃左右水温的2×SSC洗涤5min×2次；0.5×SSC洗涤15min×1次；0.2×SSC洗涤15min×1次。必要时可重复0.2×SSC洗涤1次。

8) 滴加封闭液：37℃ 30分钟。甩去多余液体，不洗。

9) 滴加生物素化鼠抗地高辛：37℃60min或室温120min。0.5M PBS洗5min×4次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。

10) 滴加SABC：37℃20min或室温30min。0.5M PBS洗5分钟×3次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。

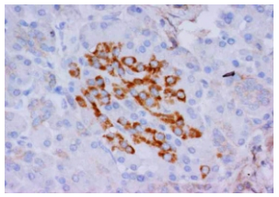
11) 滴加生物素化过氧化物酶：37℃孵育20min或室温30min。0.5M PBS洗5min×4次。

12) DAB显色，充分水洗。

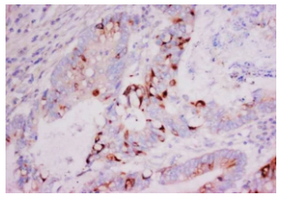
13) 必要时苏木素复染，充分水洗。

14) 酒精脱水，二甲苯透明，封片。

结果观察：阳性细胞的胞浆着色呈棕黄色。



图/大鼠肾脏IntegrinαL-1 mRNA阳性



图/人肠癌HIF-1α mRNA阳性

六. 原位杂交常见问题及对策

作为初次使用本公司的试剂盒做原位杂交的客户可能遇到许多问题，归纳起来主要有非特异性着色、着色部位不对、无阳性、阳性弱四大类以及其他一些小问题。现在就以上几点分别说明。

1. 非特异性着色

主要原因：

1) 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。

2) 切片干涸导致的边缘效应。

3) 洗涤不充分。

4) 显色剂氧化，显色时间长，产生很强的背景。

解决方法：

1) 适当的稀释探针

2) 稳定实验条件，严格按操作说明进行

3) 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切片面积

4) 减少杂交时间和降低杂交温度

5) 洗涤要充分，在背景十分深时，可用37℃预温的缓冲液浸泡

6) 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。

2. 着色部位不对

理论上，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）

原因及解决办法：

1) 消化时间过长，消化条件十分严苛，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，应严格按说明书的步骤来操作；

3) 可适当的稀释探针。

3. 无阳性

主要原因：

1) 固定时间方式是否按说明书进行，标本是否陈旧。

2) 标本制作过程中浸蜡和烤片温度过高时间过长，标本制作不规范。

3) 实验中漏加试剂，实验操作不规范。

解决方法：

1) 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，因为mRNA类基因容易降解。

2) 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℃左右30分钟。

3) 消化时间要做对比摸索。

4) 提高杂交温度和杂交时间。

4. 阳性弱

原因及解决方法：

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面积

3) 显色时间过短，解决方法：在显微镜下控制反应时间

5. 其他问题及注意事项

1) 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。

2) 杂交后的洗涤对信号/背景/强度有密切关系，洗涤时间越短，信号越强，背景也越高；洗涤时间超长，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。

博士德公司现有上千种原位杂交产品及相关检测试剂盒，并提供杂交试剂盒（探针）定制。

产品货号	产品名称	包装规格
MK1030	敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅰ(POD)	Kit
MK1031	通用型原位杂交检测试剂盒Ⅲ(AP)	Kit
MK1032	敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅱ(AP)	Kit
MK1003	地高辛标记探针检测试剂盒Ⅰ(POD)	Kit
MK1005	地高辛标记探针检测试剂盒Ⅱ(AP)	Kit
MK1010	地高辛随引物标记和检测试剂盒Ⅱ(AP)	Kit
MK1034	敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅴ(FITC)	Kit
MK1033	敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅳ(CY3)	Kit
AR1069	组织固定液/4%多聚甲醛(含DEPC)	500ml
AR0058	原位杂交2×SSC缓冲液	1000ml
AR0033	原位杂交专用PBS缓冲液	1000ml
AR0044	DEPC	5ml

第八章 细胞培养

一. 细胞培养基本概念

1. 细胞培养（cell culture）是指在体外模拟体内环境（无菌、适宜温度、酸碱度和一定营养条件等），使之生存、生长、繁殖并维持主要结构和功能的一种方法。细胞培养也叫细胞克隆技术。

2. 细胞系（cell line）指原代细胞培养物经首次传代成功后所繁殖的细胞群体。也指可长期连续传代的培养细胞。

3. 细胞株（Cell Strain）指通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得具有特殊性质或标志物的培养物。

4. 将细胞从一个培养瓶转移到另一个培养瓶即称为传代培养。

5. 原代培养的细胞在生长、繁殖一定时间后，由于空间不足或细胞密度过大导致营养枯竭，会影响细胞的生长，因此需要进行扩大培养，即传代或称为传代培养。

二. 细胞培养生长条件

1. 细胞培养基

1) 培养基成分主要包括碳水化合物、无机盐、氨基酸、维生素和微量元素。

2) 平衡盐溶液主要由无机盐和葡萄糖配制而成，作用为维持渗透压、缓冲和调节酸碱度 。常用的缓冲液：生理盐水，PBS ，Hanks液（常用于配制胰酶溶液）。

2. pH调节液

1) 碳酸氢钠液：一般细胞培养液的pH在7.0-7.4之间。由于碳酸盐pH缓冲系统是一种生理pH缓冲系统（它是人体血液中最重要的pH缓冲系统），大多数培养液用它来保持稳定的pH。用粉末配制培养液时，常常需要加入一定量的碳酸氢钠。

2) Hepes缓冲液：是一种可以保持细胞培养过程中pH值较长时间稳定的氢离子缓冲剂，通常使用浓度为10～25mM。

3. 消化液

1) 胰蛋白酶溶液

主要作用是使细胞间的蛋白质水解，从而使贴壁细胞从瓶壁上脱落并使细胞游离分散开来，常用浓度为0.25%或0.05%胰蛋白酶。

2) EDTA溶液

作用机制是螯合钙镁离子，破坏细胞间的连接。对于一些贴壁不太牢的细胞可以单独用EDTA即可消化，对于贴壁特别牢固的细胞，可用EDTA和胰酶的混合液。EDTA溶液的使用浓度为0.02%，配制时应加碱助溶 。

3) 胶原酶溶液

胶原酶在上皮类细胞原代培养时经常使用，胶原酶作用的对象是胶原组织，因此不容易对细胞产生损伤。

4. 抗生素溶液

通常是青霉素和链霉素联合使用，俗称“双抗溶液”。青霉素主要是对革兰阳性菌有效，链霉素主要对革兰阴性菌有效。加入这两种抗生素可预防绝大多数细菌污染。 培养基内青霉素、链霉素最终使用浓度为每毫升100单位。

5. 血清

细胞培养中血清的浓度为5%-20%，绝大多数细胞培养为10%FBS。

1) 提供对维持细胞指数生长的激素，基础培养基中没有或量很少的营养物，以及主要的低分子营养物；

2) 提供结合蛋白，能识别维生素、脂类、金属和其他激素等，能结合或调节它们所结合的物质活力；

3) 有些情况下结合蛋白质能与有毒金属和热原质结合，起到解毒作用；

4) 是细胞贴壁、铺展在塑料培养基质上所需因子来源；

5) 起酸碱度缓冲液作用；

6) 提供蛋白酶抑制剂，使在细胞传代时使剩余胰蛋白酶失活，保护细胞不受伤害；

7) 参与细胞冻存。

三. 细胞种类介绍

1. 细胞按贴壁方式可以分为贴壁细胞、半贴壁半悬浮细胞以及悬浮细胞三类，其中贴壁细胞按形态分为以下4种：

1) 成纤维细胞型

形态：胞体梭形或不规则三角形，胞质向外伸出2—3个长短不等的突起，中有卵圆形核。

生长特点：排列成放射状，漩涡状细胞与细胞接触易断开而单独行动，游离的单独的成纤维样细胞，常有几个伸长的细胞突起。

2) 上皮型细胞

形态：类似体内的上皮细胞扁平，不规则多角形，中有圆形核 。

生长特点：易相连成片，相靠一紧密相连一成薄层一铺石状，生长时呈膜状移动，很少脱离细胞群而单个活动。

3) 游走细胞型

本型细胞在支持物上散在生长，一般不连接成片形成群落。细胞质经常伸出伪足或突起，在培养器皿壁上生长位置不固定，呈活跃的游走或变形运动，速度快而且方向不规则。

4) 多形细胞型

多形细胞型是一些形态上不规则的细胞，多形型细胞不常见，只有像某些神经组织的细胞等难以确定其稳定形态。

2. 悬浮细胞介绍

1) 概念：培养时不贴附于底物而呈悬浮状态生长。

2) 来源：血液，脾或骨髓，尤以血中白细胞癌肿细胞。

3) 特点：在悬浮中生长良好细胞圆形，单个或小细胞团。

4) 优点：生存空间大，提供数量大，传代方便(不需消化)，易于收获，可获得稳定状态。

缺点：细胞比较脆弱，操作需轻柔。

3. 半贴壁半悬浮细胞介绍

半贴壁半悬浮细胞是贴壁部分和悬浮部分同时存在，均为活细胞；悬浮部分为单个圆形或成团，处理时悬浮部分需收集离心。

四. 培养基介绍

经典的培养基有很多种，其中 DMEM、 RPMI 1640、 MEM 、F12K 都是应用最广泛的培养基。其他如M199 、IMDM 、L-15、McCoy5A、 DMEM/F12培养基等也用于某些细胞的培养。

1. DMEM培养基

DMEM起初是为小鼠成纤维细胞设计的。DMEM的氨基酸浓度是MEM的两倍，维生素浓度是MEM的4倍，采用双倍的HCO3-和CO2浓度起到更好的缓冲作用。如HELA、NRK、U251都是用DMEM来培养的。

2. 1640培养基

1640主要用于悬浮细胞培养，如哺乳动物、特殊造血细胞、正常或恶性增生的白细胞，杂交瘤细胞的培养，其它像U93T、HL-60、Jurkat、等成淋巴细胞、T细胞淋巴瘤细胞。

3. MEM培养基

又称低限量Eagle培养基（Minimal Essential Medium），删去赖氨酸、生物素，氨基酸浓度增加，适合多种细胞单层生长，是一种最基本、使用范围最广的培养基。如U-87MG、Siha、MCF-7适用于MEM培养。

4. IMDM培养基

IMDM培养基含有硒、额外的氨基酸和维生素、丙酮酸钠和HEPES。并用硝酸钾取代了硝酸铁。IMDM还能够促进小鼠B淋巴细胞，骨髓造血细胞，T细胞和淋巴瘤细胞的生长。如A431、K562、HK-2适用于IMDM。

5. L-15培养基

L-15培养液适用于快速增殖瘤细胞的培养，用于在CO2缺乏的情况下培养肿瘤细胞株。此培养液采用磷酸盐缓冲体系，氨基酸组成进一步改良，并由半乳糖替代了葡萄糖。如mda-mb-231、UACC-812、sw620适用于L-15培养。

6. McCoy5A培养基

1959年MCCoy为肉瘤细胞设计，可支持多种（如骨髓、皮肤、肺和脾脏等）的原代移植物的生长.如sk-ov-3、u-2os、HT-29适用于5A培养。

7. F12K培养基

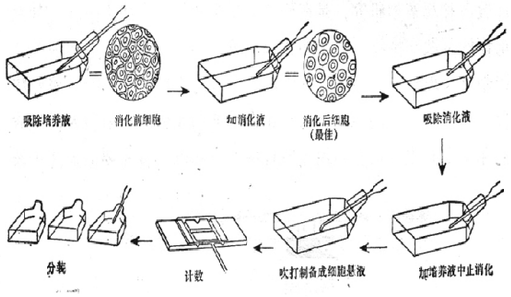
F12K 为 Ham's F12 的 Kaighn's改进型，区别在于提高了氨基酸和丙酮酸的含量，主要用来培养分化的大鼠和鸡细胞以及原代人肝细胞的生长。如AGS、PC-12、DU145适用于F12K培养基。

五. 细胞传代方法

1. 根据细胞生长的特点，传代方法有3种：

1) 贴壁生长细胞传代

采用酶消化法传代，常用的消化液有0.25%的胰蛋白酶液。



传代步骤：

① 从培养容器中吸出培养基；

② 用不含钙、镁的平衡盐溶液洗细胞（每10cm²培养表面积约2ml溶液）；冲洗步骤可去除可能抑制解离剂作用的少量血清、钙和镁；

③ 从培养容器中吸出冲洗液，加入预热的胰酶；试剂量足以覆盖细胞层（每10cm²大约0.5ml）；

④ 轻轻摇晃容器，使胰酶充分覆盖细胞层；将培养容器放入至37℃培养箱中孵育3min左右（注意实际孵育时间根据所用细胞系不同而有所差异）；

⑤ 在显微镜下观察细胞解离状况；如果解离程度未达到90%，可将孵育时间延长几分钟，每隔30秒检查一次解离情况；

⑥ 细胞解离程度大于等于90%时，加入所用解离剂体积5倍的完全培养基终止消化；吹打细胞层表面数次，使细胞分散成单个细胞；

⑦ 将单细胞悬液离心（1000转/分），细胞沉淀按照推荐比例稀释，并将适量体积的细胞悬液转移到新的培养容器中，摇晃培养容器使细胞均匀分布在底部，把细胞放回培养箱培养。

2) 悬浮生长细胞传代

采用离心法传代，离心（1000转/分）去上清，沉淀物加新培养液后再混匀传代。

方法一

① 使用无菌吸管从培养瓶中取出少量细胞样品，采用血球计数器或细胞计数仪测定总细胞数；计算将细胞稀释到推荐接种密度时需要加入的培养基体积；

② 在无菌状态下将细胞分装到各个培养瓶中，将适量的完全培养基加入到培养瓶中。

方法二

① 将细胞悬液转移至离心管中，以1000转/分离心3-5分钟（离心速度与时间依细胞种类不同而有所差异）；

② 用1ML预热完全培养基重悬细胞沉淀，根据细胞沉淀量将细胞稀释，然后分装到各个培养瓶中，补充适量新鲜培养基继续培养。

3) 半贴壁半悬浮生长细胞传代

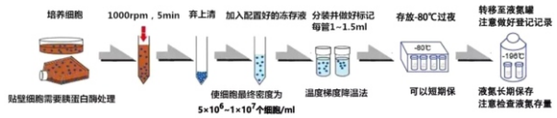
此类细胞部分呈现贴壁生长现象，但贴壁不牢，可用直接吹打法使细胞从瓶壁脱落进行传代。或将贴壁部分消化，悬浮部分离心收集，合在一起进行传代。

六. 细胞冻存与复苏

1. 冻存与复苏原理

在不加保护条件下直接冻存细胞时，细胞内和外环境中的水会形成冰晶，能导致细胞内发生一系列的变化，如机械损伤、电解质浓度升高、渗透压改变、脱水、pH值改变、蛋白质变性等，能引起细胞死亡。但如向培养基中加入保护剂（甘油或DMSO）,可使冰点降低，在缓慢的冻存条件下，能使细胞内水分在冻结前透出细胞外。复苏溶解细胞时，速度要快，使之迅速通过细胞最易受损的 - 5～0度后，细胞仍能生长，活力不受任何损害。当前使用的保护剂为DMSO和甘油，它们对细胞无毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。

2. 细胞冻存步骤



1) 冻存贴壁细胞时，利用传代时所用的方法轻柔的使细胞从组织培养容器上脱离下来，用该细胞对应的完全培养基重悬细胞，用枪头将细胞吹打成单个细胞悬浮液；冻存悬浮细胞时，将其用移液管轻轻吹打均匀（若悬浮细胞有少量聚团生长的要吹打为单个细胞）；

2) 以大约1000r/min离心3-5分钟，在无菌条件下小心倒掉上清液，倾斜离心管，吸尽里面残留的培养基（过程中不要搅动底部的细胞沉淀）；

3) 用预冷的（2-8℃）低温冻存液（血清：DMSO=9:1）按细胞密度结合细胞沉淀量计算冻存细胞管数并加入相应体积冻存液重悬细胞沉淀；

4) 将细胞悬液分装到若干冻存管中并在冻存管上标明细胞的名称，冻存时间及操作者；分装时，应注意轻轻混合细胞，使其保持均匀的细胞悬液状态；

5) 冻存管封口，做好标记，按照以下程序冻存：

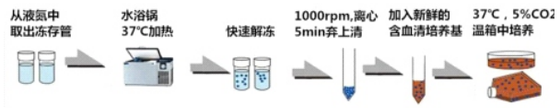
① 标准的冻存程序为降温速率-1~-2℃/min；当温度达到-25℃以下时，可增至-5℃~-10℃/min；到-150℃时，则可迅速浸入液氮中；

② 放入4°冰箱10-20min； - 20°冰箱0.5-1h； - 80°冰箱16-18h或者过夜，最后转入液氮罐长期保存；

③ 如果有程序降温盒可以将冻存管放入程序降温盒中放入-80°冰箱冻存4h以上再转入液氮罐长期保存。

④ 如果使用无血清冻存液则直接将冻存管放入-80℃冰箱，24h后转入液氮。

3. 细胞复苏步骤



1) 将装有冻存细胞的冻存管从液氮中取出，立即放入37℃水浴中；

2) 轻轻转动或者搅拌冻存管，使其迅速解冻（1分钟内）；

3) 解冻后，将冻存管内细胞悬液吸到离心管中离心1000r/min 3-5分钟；

4) 将离心管转移至超净工作台内加入1ML对应细胞完全培养基重悬细胞；

5) 将重悬的细胞移至培养瓶中，补加适量的完全培养基，轻轻晃动细胞瓶使细胞分布均匀；

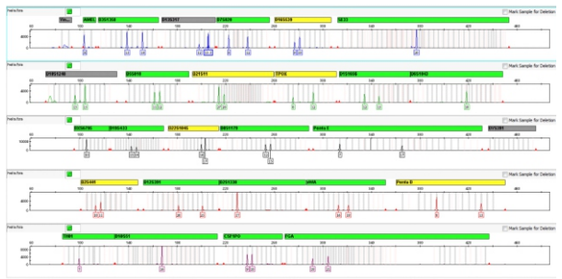
6) 将培养瓶的瓶盖拧松一圈，以便进行充分的气体交换（或者使用通气式培养瓶、透气性瓶盖），放入37℃二氧化碳培养箱中静置培养；

7) 第二天观察细胞贴壁情况，换新鲜的培养基以除去DMSO和死细胞,放入37℃二氧化碳培养箱中静置培养。

七. 细胞STR鉴定

STR（Short Tandem Repeat，短串联重复序列）基因位点由长度为3～7个碱基对的短串连重复序列组成，这些重复序列广泛存在于人类基因组中，可作为高度多态性标记，被称为细胞的DNA指纹。

STR基因座位上的等位基因可通过PCR（聚合酶链式反应）扩增区域内重复序列的拷贝数的不同来区分，在毛细管电泳分离之后可通过荧光检测来识别，随后通过一定的计算方法，即可根据所得的STR分型结果与专业的细胞STR数据库比对从而推算出样品所属的细胞系或可能的交叉污染的细胞系名称。



图：HeLa细胞STR鉴定图谱

通过DSMZ 数据库/ATCC数据库比对结果如下：

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
	Query (Your Cell)		11,12	12,13.3	8,12	9,10	16,18	7,7	X,X	8,12	9,10
1.00(36/36)	57	HELA	11,12	12,13.3	8,12	9,10	16,18	7,7	X,X	8,12	9,10

结果表明 HELA 符合细胞库信息。

注：参考 ANSI/ATCC,Authenticationof Human Cell Line Standardization of STR Profiling .2011,ASN-0002-2011.标准，STR 检测匹配度超过 80%时可认为是同一种来源的细胞。

图：HeLa细胞STR位点比对结果

八. 细胞培养常见问题

1. 可否使用与原先培养条件不同的培养基?

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。

2. 细胞培养液变黄、变浑，怎么处理?

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。

3. 细胞支原体污染怎么处理?

支原体污染几乎可影响所有细胞之生长参数，代谢及研究之任一数据。故进行实验前，必须确认细胞为支原体阴性，实验结果的数据方有意义。支原体污染是比较难去除的，特别容易复发，一般建议重新复苏或购买新的细胞，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。

4. 怎么进行细胞身份检测，判定细胞为正确细胞?

1) STR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部分小鼠细胞系；

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。

5. 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℃至4℃至室温)，若血清解冻时改变的温度太大(如-20℃至37℃)，非常容易产生沉淀物；

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℃太久。若在37℃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；

4) 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。

6. 细胞内有空泡，是否是正常现象?

部分细胞本身存在一定的空泡（如HepG2，Ishikawa及一些耐药株等），这个是正常现象。如果只有少数细胞有内出现极少空泡，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. 如何控制胰酶消化时间?

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，并有部分细胞漂浮，随弃去的胰酶流失；消化不足则细胞难于从瓶壁上吹下，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。胰酶消化时间与胰酶的浓度，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。消化对于新购买的细胞，建议客户先用低浓度的胰酶仔细去摸索一下消化时间，可每隔1分钟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。

8. 黑点已经产生了，如何处理?

如果判定黑点是污染，请及时将细胞处理后丢弃。若是细胞碎片，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，5-6 min）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，5-6 min）并更换新的培养瓶，并可以尝试适当增加血清浓度进行培养。

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；减少血清等试剂的冻融次数；将培养液的PH调到最佳；严格控制水质和器皿的清洁。

细胞系精选产品目录

产品货号	产品名称	使用培养基	STR鉴定证书
CX0001	293T(人胚肾细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0002	A549(人肺癌细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0003	HELA(人宫颈癌细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0004	Hep G2(人肝癌细胞)	MEM	有(STR)
CX0005	Jurkat(人T淋巴细胞白血病细胞)	RPMI1640	有(STR)
CX0006	SK-OV-3(人卵巢癌细胞)	McCoy's 5A	有(STR)
CX0009	MCF-7(人乳腺癌细胞)	MEM	有(STR)
CX0010	C6(大鼠胶质瘤细胞)	F12K	有(种属鉴定)
CX0015	RH-35(大鼠肝癌细胞)	DMEM(高糖)	有(种属鉴定)
CX0016	A431(人表皮癌细胞)	IMDM	有(STR)
CX0019	Hepa 1-6(小鼠肝癌细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0022	RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0025	A-375[A375](人恶性黑色素瘤细胞)	DMEM(高糖)	有(STR)
CX0027	Hacat(人永生化角质形成细胞)	MEM	有(STR)
CX0030	U-2 OS [U2OS](人骨肉瘤细胞)	McCoy's 5A	有(STR)
CX0031	SiHa(人子宫颈鳞癌细胞)	MEM	有(STR)

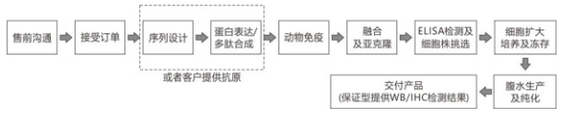
细胞培养辅助试剂精选产品目录

货号	产品名称	产品描述
PYG0001	标准胎牛血清 FBS(未经灭活)	血清
PYG0003	DMEM高糖液体培养基	不含丙酮酸钠
PYG0004	DMEM/F12 1:1 液体培养基	含hepes
PYG0006	RPMI 1640 液体培养基	常规
PYG0010	IMDM液体培养基	常规
PYG0015	0.25%胰酶溶液(含EDTA)	细胞消化液
PYG0016	青霉素-链酶素溶液(100X)	抗生素
PYG0021	无菌PBS溶液	平衡盐缓冲液
PYG0024	细胞低温冻存液	细胞冻存液
PYG0026	McCoy's 5A 液体培养基	含hepes
PYG0029	MEM液体培养基	常规
PYG0036	F12K液体培养基	常规
PYG0038	L-15液体培养基	常规
PYG0040	DMSO	细胞冻存液
PYG0067	0.25%胰酶溶液(含EDTA 含酚红)	细胞消化液
PYG0128	无血清细胞冻存液	细胞消化液
PYG0073	DMEM高糖液体培养基	常规

第九章 专项定制

一. 小鼠单克隆抗体定制

1. 服务流程



2. 服务特色

1) 最全面服务套餐：免费的抗原设计，多样化的免疫原，包括重组蛋白，多肽，小分子，能全方位的满足客户要求，抗体制备、纯化、抗体检测一体化服务；可提供多样的纯化方法，辛酸硫酸铵、Protein A/G 、抗原亲和层析等；

2) 多样化定制服务：可提供小鼠单克隆抗体服务平台、采用液体-半固体模式结合快速制备单克隆抗体服务平台，大大缩短单克隆抗体制备时间；

3) 抗原及免疫种类多样性：专业的抗原设计及表达平台，保证了高质量的免疫原，从而为得到更优质的单抗提供了保证；

4) 高通量检测服务：提供最丰富的抗体应用检测服务，满足客户的各种应用验证需求。

3. 服务内容

项目	实验流程		周期	交付结果
普通型小鼠单克隆抗体定制服务	抗原制备	重组蛋白表达	18-24周	测序报告和SDS-PAGE图
		裸肽，小分子及偶联		UV鉴定报告
	动物免疫	免疫5只Balb/c小鼠		抗原包被量0.1-1ug/孔，血清效价>1:10000(判断标准 OD阳/OD阴 > 2.0:1)
	融合及亚克隆筛选	PEG融合，并进行2-3次亚克隆，全阳后定株		杂交瘤的构建(融合率、阳性率)、杂交瘤的克隆化ELISA检测结果
	细胞株扩大培养	扩大培养定株的杂交瘤细胞株		细胞上清效价检测>1:1000(判断标准OD阳/OD阴 > 2.0:1)
	腹水制备及纯化	将ELISA阳性杂交瘤细胞株制备腹水及效价检测，纯化单抗(每株细胞提供至少2mg纯化单抗)		腹水效价ELISA检测结果
WB保证型多克隆抗体制备	抗原制备	重组蛋白表达	22-28周	测序报告和SDS-PAGE图
	动物免疫	免疫5只Balb/c小鼠		抗原包被量0.1-1ug/孔，血清效价>1:10000(判断标准OD阳/OD阴 > 2.0:1)
	融合及亚克隆筛选	PEG融合，并进行2-3次亚克隆，全阳后定株		杂交瘤的构建(融合率、阳性率)、杂交瘤的克隆化ELISA检测结果
	细胞株扩大培养	扩大培养定株的杂交瘤细胞株		细胞上清效价检测>1:1000(判断标准OD阳/OD阴 > 2.0:1)
	WB验证	将所有阳性克隆上清全部进行WB检测，针对免疫原		至少一株WB阳性单抗的Western检测图谱
	腹水制备及纯化	将WB阳性(针对免疫原)杂交瘤细胞株制备腹水及效价检测，纯化单抗(每株细胞提供至少2mg纯化单抗)		腹水效价ELISA检测结果，SDS-PAGE电泳结果

4. 服务流程

种类	要求
重组(天然)蛋白	3-5mg,要求蛋白纯度大于90%,蛋白要求分子量大于15kDa,可溶性蛋白,浓度大于0.8mg/mL(也可以由博士德制备抗原，客户只需提供名称，网址链接(以NCBI为主)及蛋白序列信息，包括AA序列和基因序列)
多肽	裸肽至少6mg，多肽纯度大于90%，不少于10个AA，由博士德来偶联，载体蛋白一般为KLH/BSA/OVA，也可根据客户要求更换其它种类(也可由客户自己提供偶联好的免疫原和包被原)
小分子	小分子名称，CAS号，分子量，分子式，结构，溶解性。客户提供至少5mg的小分子，由博士德来偶联，载体蛋白一般为KLH/BSA/OVA，也可根据客户要求更换其它种类(也可由客户自己提供偶联好的免疫原和包被原)

注：客户提供的抗原中不应含有叠氮钠、咪唑、尿素或其它有毒有害刺激性大的物质，甘油含量应低于20%。

5. 服务特色

1） 1-3株杂交瘤细胞株和每株细胞株提供2mg腹水纯化抗体和100μL腹水原液，100-500μg；

2）ELISA包被抗原（博士德提供抗原的情况）以及鉴定报告，包括小鼠血清效价，杂交瘤的构建（融合率、阳性率）、杂交瘤的克隆化、杂交瘤培养上清液的抗体效价，以及杂交瘤诱生腹水的ELISA效价检测；

3) WB保证型单抗定制还提供WB抗体验证图谱结果。

二. 兔多克隆抗体定制

1. 服务流程

2. 服务内容

项目	实验流程	周期	备注
普通型多克隆抗体制备	1. 蛋白免疫原设计合成与表达 2. 免疫两只新西兰兔 3. 采血ELISA检测 4. 抗体亲和纯化	16周	客户提供完整的项目信息表，包括目的基因的物种、序列等信息
普通型多克隆抗体制备(客户提供抗原)	1. 客户蛋白核查(浓度纯度鉴定) 2. 免疫两只新西兰兔 3. 采血ELISA检测 4. 抗体亲和纯化	14周	1. 客户提供重组蛋白4mg以上，蛋白纯度大于85%，蛋白分子量大于10kDa，可溶性蛋白浓度在1-5mg/mL之间。若要求抗原亲和纯化，需额外提供2-3mg左右重组蛋白。 2. 客户提供多肽：裸肽5mg以上，多肽纯度大于80%，不少于10个aa，偶联KLH/BSA/OVA或其他载体蛋白(也可由博士德提供该服务)。若要求抗原亲和纯化，需额外提供2-3mg以上裸肽。
WB保证型多克隆抗体制备	1. 蛋白免疫原设计合成与表达(提供2-3条蛋白免疫原) 2. 免疫2-3只新西兰兔 3. 采血ELISA检测 4. 抗体亲和纯化 5. Western blot检测 6. 免疫组化检测(可提供)	16-20周	

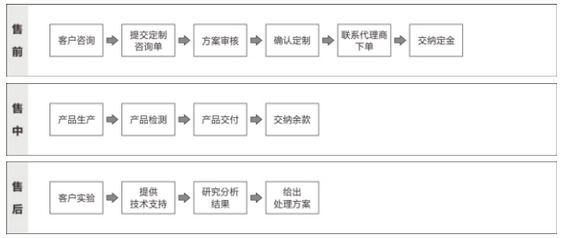
3. 解决方案

多抗制备选用两只新西兰大耳兔，采用完全弗氏佐剂（CFA）和不完全弗氏佐剂（IFA）皮下多点注射。

流程	时间	描述
阴性血清采集	Day 0	免疫前血清采集 (0.5mL/只)
一兔	Day 1	0.4mg免疫原（CFA），皮下多点注射（10点）
二兔	Day 14	0.2mg免疫原（IFA），皮下多点注射（4点）
三兔	Day 35	0.2mg免疫原（IFA），皮下多点注射（4点）
四兔	Day 49	0.3mg免疫原（IFA），皮下多点注射（4点）
抗血清采集	Day 60	10ML/只（提供试用装100ug）
ELISA检测	Day 64	根据ELISA检测结果，决定是正常牺牲兔子还是调整免疫周期
最终采血/加免	Day 70	牺牲兔子或加免，0.15mg免疫原（IFA），皮下多点注射（4点）
纯化/检测	2-3周	

三 . 原位杂交定制

1. 服务流程



2. 服务内容

定制周期： 一般3-4周

定制价格：常规哺乳动物价格为3000元/盒，非哺乳类价格为3800元/盒。

产品内容：可满足100T实验的3’尾端地高辛高效标记的寡核苷酸探针，以及配套检测试剂盒（POD/AP/FITC/CY3系统）

四 . 培养基定制

1. 服务流程

2. 服务内容

1）根据客户的需求在基础培养基DMEM、RPMI-1640、MEM、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、DMEM/F12、Ham's F-12K、IMDM配方表上计算好各成分的含量，包括成分的缺失和增减，以及添加的特殊组分，标注PH值和其它特殊需求。

2) 根据形成的定制培养基配方表使用分析天平准确称量各个组分，称量结束进行复核校对。

3) 将各个组分进行依次溶解完全并按客户要求调好PH值。

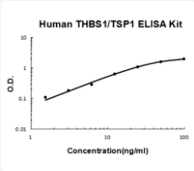
4）将培养基进行依次在无菌环境进行0.45um滤膜过滤→0.22um滤膜过滤→0.1um滤膜过滤的三级过滤。

5）灌装的培养基送质量部进行QC检测，例如无菌性，颜色，PH值，渗透压，内毒素，细胞生长测试等各项指标的验证，合格方可放行出库。

6) 所有定制培养基自接单后一周内配制完成发货。

精选文献 | ELISA

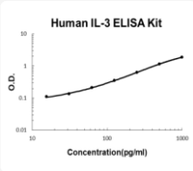
Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival



影响因子： 64.8
发表期刊： NATURE
作者单位： 美国加州大学旧金山分校

产品名称： Thrombospondin 1/THBS1
产品货号： EK0899
样本种属： human

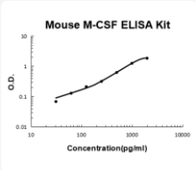
Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease



影响因子： 49.962
发表期刊： NATURE
作者单位： 麻省总医院和哈佛医学院

产品名称： IL3
产品货号： EK0402
样本种属： human

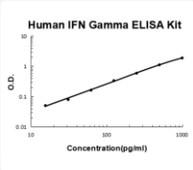
Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis



影响因子： 43.07
发表期刊： NATURE
作者单位： 麻省总医院和哈佛医学院

产品名称： M-CSF/CSF1
产品货号： EK0445
样本种属： mouse

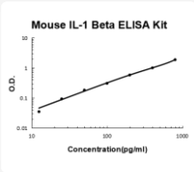
Non-invasive activation of intratumoural gene editing for improved adoptive T-cell therapy in solid tumours



影响因子： 38.3
发表期刊： Nature Nanotechnology
作者单位： 浙江大学

产品名称： IFN Gamma/IFNG
产品货号： EK0373
样本种属： human

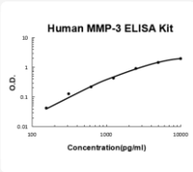
MARCH3 negatively regulates IL-3-triggered inflammatory response by mediating K48-linked polyubiquitination and degradation of IL-3Rα



影响因子： 38.104
发表期刊： Signal Transduction and Targeted Therapy
作者单位： 武汉大学中南医院

产品名称： IL-1 beta/IL1B
产品货号： EK0394
样本种属： human

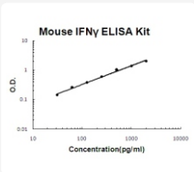
Neutrophil membrane-coated nanoparticles inhibit synovial inflammation and alleviate joint damage in inflammatory arthritis



影响因子： 37.49
发表期刊： Nature Nanotechnology
作者单位： 美国加州大学圣地亚哥分校

产品名称： MMP3
产品货号： EK0461
样本种属： human

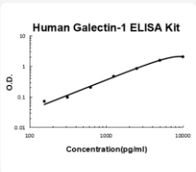
Manipulating Offense and Defense Signaling to Fight Cold Tumors with Carrier-Free Nanoassembly of Fluorinated Prodrug and siRNA



影响因子： 32.086
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 南京鼓楼医院

产品名称： IFN Gamma/IFNG
产品货号： EK0375
样本种属： mouse

A "Bridge-Building" Glycan Scaffold Mimicking Microbial Invasion for In Situ Endothelialization

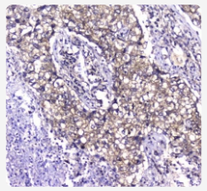


影响因子： 30.849
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 澳门大学

产品名称： Galectin-1/LGALS1
产品货号： EK0762
样本种属： human

精选文献 | 一抗

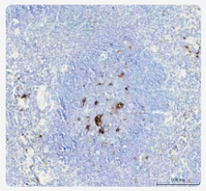
CCT2 is an aggrephagy receptor for clearance of solid protein aggregates



影响因子： 66.85
发表期刊： CELL
作者单位： 北京膜生物学国家重点实验室

产品名称： TCP1
产品货号： M02389
样本种属： human
应用范围： WB,IHC,ICC/IF,FCM

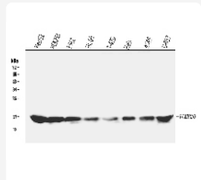
SARS-CoV-2 Z-RNA activates the ZBP1-RIPK3 pathway to promote virus-induced inflammatory responses



影响因子： 44.1
发表期刊： CELL RESEARCH
作者单位： 中国科学院武汉病毒研究所

产品名称： CD68
产品货号： BA3638
样本种属： mouse,rat
应用范围： WB,IHC,IF,FCM

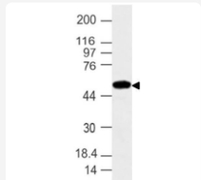
Targeting ATAD3A-PINK1-mitophagy axis overcomes chemoimmunotherapy resistance by redirecting PD-L1 to mitochondria



影响因子： 44.1
发表期刊： CELL RESEARCH
作者单位： 陆军军医大学第一附属医院

产品名称： TOM20/TOMM20
产品货号： BM4366
样本种属： human,mouse,rat
应用范围： WB,IHC,ICC/IF,FCM

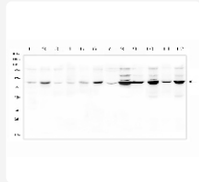
DNA methyltransferase 3 alpha and TET methylcytosine dioxygenase 2 restrain mitochondrial DNA-mediated interferon signaling in macrophages



影响因子： 43.474
发表期刊： IMMUNITY
作者单位： 美国加州大学

产品名称： IFIT2
产品货号： A04428
样本种属： human
应用范围： WB

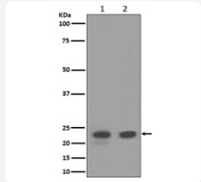
SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides



影响因子： 43.07
发表期刊： NATURE
作者单位： 美国加州大学伯克利分校

产品名称： SLC19A1
产品货号： PB0534
样本种属： human,monkey,mouse,rat
应用范围： WB

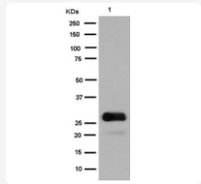
The bone marrow microenvironment at single-cell resolution



影响因子： 43.07
发表期刊： NATURE
作者单位： 美国纽约大学医学院

产品名称： CD9
产品货号： BM4212
样本种属： human,mouse,rat
应用范围： WB,IHC,ICC/IF,IP,FCM

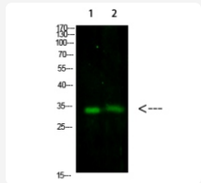
Phase separation drives RNA virus-induced activation of the NLRP6 inflammasome



影响因子： 41.584
发表期刊： CELL
作者单位： 哈佛医学院

产品名称： GFP
产品货号： BM3883
样本种属： human,mouse,rat
应用范围： WB,IHC,ICC/IF

TIPE3 is a candidate prognostic biomarker promoting tumor progression via elevating RAC1 in pancreatic cancer



影响因子： 41.444
发表期刊： Molecular Cancer
作者单位： 青岛大学附属医院

产品名称： TNFAIP8L3
产品货号： A14951
样本种属： human,mouse,rat
应用范围： WB

精选文献 | 二抗

A Soft and Absorbable Temporary Epicardial Pacing Wire

影响因子： 30.849
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 南方科技大学

产品名称： 未标记羊抗小鼠IgG
产品货号： BA1038

Targeted Dual Small Interfering Ribonucleic Acid Delivery via Non-Viral Polymeric Vectors for Pulmonary Fibrosis Therapy

影响因子： 30.849
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 江苏淮安第一人民医院

产品名称： HRP-羊抗兔IgG+HRP-羊抗小鼠IgG
产品货号： BA1056

Pancreatic acinar cells-derived sphingosine-1-phosphate contributes to fibrosis of chronic pancreatitis via inducing autophagy and activation of pancreatic stellate cells

影响因子： 29.4
发表期刊： GASTROENTEROLOGY
作者单位： 华中科技大学同济医学院

产品名称： CY3-羊抗兔IgG
产品货号： BA1032

Printed Divisional Optical Biochip for Multiplex Visualizable Exosome Analysis at Point-Of-Care

影响因子： 29.4
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 中国科学院化学研究所

产品名称： CY3-兔抗羊IgG
产品货号： BA1034

Adipose Mesenchymal Stem Cell–Derived Exosomes Promote Keratinocytes And Fibroblasts Embedded in Collagen/Platelet-Rich Plasma Scaffold And Accelerate Wound Healing

影响因子： 29.4
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 空军军医大学第一附属医院

产品名称： HRP-羊抗兔IgG
产品货号： BA1054

ADAM9: A regulator between HCMV infection and function of smooth muscle cells

影响因子： 20.693
发表期刊： JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY
作者单位： 中南大学

产品名称： HRP-羊抗小鼠IgG
产品货号： BA1050

Double Cross-Linked Biomimetic Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with Thermo-Stimulated Self-Contraction and Tissue Adhesiveness for Accelerating Post-Wound Closure and Wound Healing

影响因子： 19
发表期刊： ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS
作者单位： 青岛大学附属医院

产品名称： 生物素标记羊抗兔IgG
产品货号： BA1003

High-Resolution Patterned Functionalization of Slippery "Liquid-Like" Brush Surfaces via Microdroplet-Confined Growth of Multifunctional Polydopamine Arrays

影响因子： 18.808
发表期刊： ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS
作者单位： 中山大学

产品名称： FITC-兔抗山羊IgG
产品货号： BA1110

精选文献 | 免疫印迹

Targeting polarized phenotype of microglia via IL6/JAK2/STAT3 signaling to reduce NSCLC brain metastasis

影响因子： 38.104
发表期刊： Signal Transduction and Targeted Therapy
作者单位： 华中科技大学同济医学院附属同济医院

产品名称： BCA蛋白浓度测定试剂盒
产品货号： AR0146

A positive mechanobiological feedback loop controls bistable switching of cardiac fibroblast phenotype

影响因子： 38.079
发表期刊： Cell Discovery
作者单位： 西安交通大学

产品名称： WB专用DAB显色试剂盒(蓝色)
产品货号： AR1024

Defects in a liver-bone axis contribute to hepatic osteodystrophy disease progression

影响因子： 31.373
发表期刊： Cell Metabolism
作者单位： 南京鼓楼医院

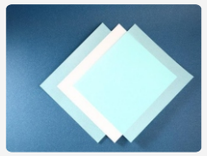
产品名称： SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(变性,5×)
产品货号： AR1112

Injectable Supramolecular Hydrogels for in Situ Programming of Car-T Cells Towards Solid Tumor Immunotherapy

影响因子： 29.4
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 厦门大学

产品名称： 红细胞裂解液
产品货号： AR1118

ADAM9: A regulator between HCMV infection and function of smooth muscle cells



影响因子： 20.693
发表期刊： JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY
作者单位： 中南大学

产品名称： PVDF膜(进口分装,0.45um,13.5cm×10cm)
产品货号： AR0136-04

Coupling BCP Ceramics with Micro-Vibration Stimulation Field for Cascade Amplification from Immune Activation to Bone Regeneration

影响因子： 19
发表期刊： ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS
作者单位： 四川大学国家生物材料工程研究中心

产品名称： 增强型RIPA裂解液
产品货号： AR0102

Cardiac patches made of brown adipose-derived stem cell sheets and conductive electrospun nanofibers restore infarcted heart for ischemic myocardial infarction

影响因子： 18.9
发表期刊： Bioactive Materials
作者单位： 北京航空航天大学

产品名称： SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(30-50gels)
产品货号： AR0138

Metabolism-Based Molecular Subtyping Endows Effective Ketogenic Therapy in p53-Mutant Colon Cancer

影响因子： 17.521
发表期刊： Advanced Science
作者单位： 武汉大学中南医院

产品名称： Western溶液套装
产品货号： AR1201

精选文献 | 免疫组化

Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer

影响因子： 66.85
发表期刊： CELL
作者单位： 中国科学院西湖生命科学与生物医学实验室

产品名称： DAB(棕黄色)
产品货号： AR1000

The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice

影响因子： 42.779
发表期刊： NATURE
作者单位： 中国医学科学院实验动物科学研究所

产品名称： 复合消化液
产品货号： AR0022

Epigenetic regulation of TP53 is involved in prostate cancer radioresistance and DNA damage response signaling

影响因子： 39.3
发表期刊： Signal Transduction and Targeted Therapy
作者单位： 葡萄牙波尔图肿瘤研究所

产品名称： DAPI染色液
产品货号： AR1176

Metabolic reprogramming of proinflammatory macrophages by target delivered roburic acid effectively ameliorates rheumatoid arthritis symptoms

影响因子： 39.3
发表期刊： Signal Transduction and Targeted Therapy
作者单位： 四川大学华西第四医院

产品名称： 即用型SABC-POD(大鼠IgG)试剂盒
产品货号： SA1025

A positive mechanobiological feedback loop controls bistable switching of cardiac fibroblast phenotype

影响因子： 38.079
发表期刊： Cell Discovery
作者单位： 西安交通大学

产品名称： Mayer`S苏木素
产品货号： AR0005

A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice

影响因子： 35.209
发表期刊： NATURE GENETICS
作者单位： 华南农业大学

产品名称： 即用型SABC-POD(小鼠IgG)试剂盒
产品货号： SA1021

Surface Wettability of Nanoparticle Modulated Sonothrombolysis

影响因子： 30.849
发表期刊： ADVANCED MATERIALS
作者单位： 北京化工大学

产品名称： **HE**染色试剂盒
产品货号： **AR1180**

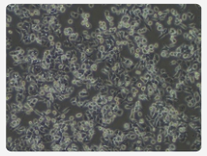
Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota

影响因子： 24.897
发表期刊： International Journal of Oral Science
作者单位： 南京市口腔医院

产品名称： 组织固定液(不含**DEPC**)
产品货号： **AR1068**

精选文献 | 细胞系

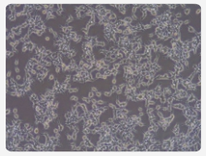
Universal immunotherapeutic strategy for hepatocellular carcinoma with exosome vaccines that engage adaptive and innate immune responses



影响因子： 23.168
发表期刊： Journal of Hematology & Oncology
作者单位： 天津医科大学

产品名称： Hepa 1-6 (小鼠肝癌细胞)
产品货号： CX0019

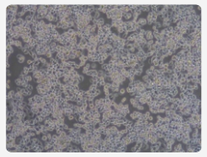
A cell membrane-anchored nanoassembly with self-reporting property for enhanced second near-infrared photothermal therapy



影响因子： 20.722
发表期刊： Nano Today
作者单位： 中国地质大学

产品名称： 293T(人胚肾细胞)
产品货号： CX0001

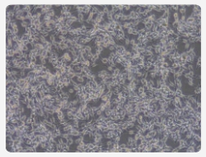
NAT10/ac4C/FOXP1 Promotes Malignant Progression and Facilitates Immunosuppression by Reprogramming Glycolytic Metabolism in Cervical Cancer



影响因子： 15.1
发表期刊： Advanced Science
作者单位： 南方医科大学深圳医院

产品名称： **U14** (小鼠子宫颈癌细胞)
产品货号： **CX0104**

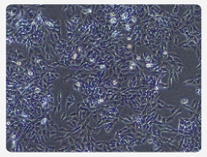
Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages



影响因子： 13.942
发表期刊： ACS Nano
作者单位： 华中科技大学

产品名称： **B16-F10** (小鼠皮肤黑色素瘤细胞)
产品货号： **CX0109**

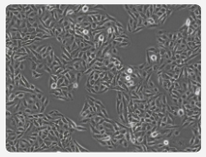
Differential Diagnosis and Precision Therapy of Two Typical Malignant Cutaneous Tumors Leveraging Their Tumor Microenvironment: A Photomedicine Strategy



影响因子： 13.903
发表期刊： ACS Nano
作者单位： 上海市皮肤病医院

产品名称： A-375[A375](人恶性黑色素瘤细胞)
产品货号： CX0025

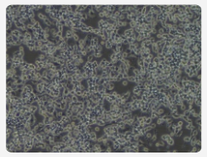
Multi-color live-cell super-resolution volume imaging with multi-angle interference microscopy



影响因子： 12.353
发表期刊： Nature Communications
作者单位： 浙江大学

产品名称： U-2 OS [U2OS](人骨肉瘤细胞)
产品货号： CX0030

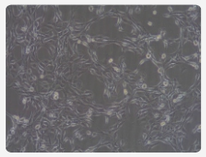
Forsythoside A Mitigates Alzheimer's-like Pathology by Inhibiting Ferroptosis-mediated Neuroinflammation via Nrf2/GPX4 Axis Activation



影响因子： 10.75
发表期刊： International Journal of Biological Sciences
作者单位： 吉林大学

产品名称： Neuro-2a[N2a]（小鼠脑神经瘤细胞）
产品货号： CX0020

A general strategy for developing cell-permeable photo-modulatable organic fluorescent probes for live-cell super-resolution imaging



影响因子： 10.742
发表期刊： Nature Communications
作者单位： 华中科技大学

产品名称： **NIH/3T3**(小鼠胚胎成纤维细胞)
产品货号： **CX0021**

精选文献 | 细胞培养

Hypoxia-induced circWSB1 promotes breast cancer progression through destabilizing p53 by interacting with USP10

影响因子： 41.444
发表期刊： Molecular Cancer
作者单位： 重庆医科大学

产品名称： Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)
产品货号： AR1160

Quantitatively Lighting up the Spatial Organization of Cd47/SIRPα Immune Checkpoints on the Cellular Membrane with Single-Molecule Localization Microscopy

影响因子： 17.1
发表期刊： ACS Nano
作者单位： 武汉大学人民医院

产品名称： F12K液体培养基(常规)
产品货号： PYG0036

Doxorubicin-Fe(III)-Gossypol Infinite Coordination Polymer@PDA:CuO2 Con Nanoparticles for Cost-Effective Programmed Photothermal-Chemodynamic Coordinated Dual Drug Chemotherapy Trimodal Synergistic Tumor Therapy

影响因子： 17.1
发表期刊： ACS Nano
作者单位： 西安交通大学

产品名称： DMEM高糖液体培养基(常规)
产品货号： PYG0073

Lipotoxicity-induced STING1 activation stimulates MTORC1 and restricts hepatic lipophagy

影响因子： 16.016
发表期刊： Autophagy
作者单位： 中山大学附属第三医院

产品名称： 无菌PBS溶液
产品货号： PYG0021

Meniscal transplantation and regeneration using functionalized polyurethane bionic scaffold and digital light processing 3D printing

影响因子： 13.273
发表期刊： CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL
作者单位： 北京大学第三医院

产品名称： **DPBS**(不含钙镁)液体
产品货号： **PYG0123**

Covalently construction of poly(hexamethylene biguanide) as high-efficiency antibacterial coating for silicone rubber

影响因子： 13.273
发表期刊： CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL
作者单位： 南京师范大学

产品名称： **DMEM**低糖液体培养基(常规不含酚红)
产品货号： **PYG0106**

STAT3/miR-130b-3p/MBNL1 feedback loop regulated by mTORC1 signaling promotes angiogenesis and tumor growth

影响因子： 12.658
发表期刊： J EXP CLIN CANC RES
作者单位： 安徽医科大学第一附属医院

产品名称： **RPMI-1640**液体培养基(常规)
产品货号： **PYG0006**

Ai-lncRNA EGOT enhancing autophagy sensitizes paclitaxel cytotoxicity via upregulation of ITPR1 expression by RNA-RNA and RNA-protein interactions in human cancer

影响因子： 10.679
发表期刊： Molecular Cancer
作者单位： 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院

产品名称： **L-15**液体培养基(常规)
产品货号： **PYG0038**

精选文献 | 原位杂交

Circular RNA circPVT1 promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis via the β-TrCP/c-Myc/SRSF1 positive feedback loop

影响因子： 41.444
发表期刊： Molecular Cancer
作者单位： 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院

产品名称： 地高辛标记探针检测试剂盒Ⅰ(POD)
产品货号： MK1003

Senktide blocks aberrant RTN3 interactome to retard memory decline and tau pathology in social isolated Alzheimer's disease mice

影响因子： 21.1
发表期刊： Protein & Cell
作者单位： 华中科技大学

产品名称： 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅳ(CY3)
产品货号： MK1033

Molecularly defined and functionally distinct cholinergic subnetworks

影响因子： 18.688
发表期刊： NEURON
作者单位： 华中科技大学

产品名称： 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅰ(POD)
产品货号： **MK1030**

N6-methyladenosine reader IMP2 stabilizes the ZFAS1/OLA1 axis and activates the Warburg effect: implication in colorectal cancer

影响因子： 17.388
发表期刊： Journal of Hematology & Oncology
作者单位： 中国医科大学

产品名称： 通用型原位杂交检测试剂盒Ⅲ(**AP**)
产品货号： **MK1031**

Tumor-Associated Macrophage-Derived Exosomal LINC01232 Induces the Immune Escape in Glioma by Decreasing Surface MHC-I Expression

影响因子： 15.1
发表期刊： Advanced Science
作者单位： 华中科技大学同济医学院

产品名称： 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅴ(FITC)
产品货号： MK1034

Tau pathology epigenetically remodels the neuron-glial cross-talk in Alzheimer's disease

影响因子： 13.6
发表期刊： Science Advances
作者单位： 华中科技大学

产品名称： 地高辛标记探针检测试剂盒Ⅱ(**AP**)
产品货号： **MK1005**

Ginsenoside Rg1 ameliorates blood–brain barrier disruption and traumatic brain injury via attenuating macrophages derived exosomes miR-21 release

影响因子： 11.614
发表期刊： Acta Pharmaceutica Sinica B
作者单位： 安徽宿州学院

产品名称： 地高辛随引物标记和检测试剂盒Ⅰ(POD)
产品货号： **MK1008**

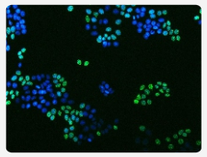
Extracellular vesicle-packaged circBIRC6 from cancer-associated fibroblasts induce platinum resistance via SUMOylation modulation in pancreatic cancer

影响因子： 11.3
发表期刊： J EXP CLIN CANC RES
作者单位： 广东省人民医院

产品名称： 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅱ(**AP**)
产品货号： **MK1032**

精选文献 | 细胞凋亡

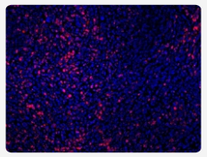
Gut stem cell necroptosis by genome instability triggers bowel inflammation



影响因子： 42.779
发表期刊： NATURE
作者单位： 厦门大学

产品名称： 地TUNEL细胞凋亡检测试剂盒III-FITC
产品货号： MK1018

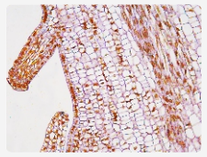
METTL3-mediated m6A RNA methylation regulates dorsal lingual epithelium homeostasis



影响因子： 24.897
发表期刊： International Journal of Oral Science
作者单位： 四川大学华西口腔医院

产品名称： TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-CY3
产品货号： MK1012-100

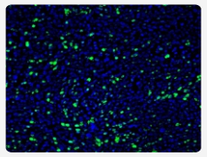
Nanobooster-encapsulated hybrid RNA as anti-tumor viral mimicry



影响因子： 20.722
发表期刊： Nano Today
作者单位： 上海交通大学

产品名称： TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-POD
产品货号： MK1025

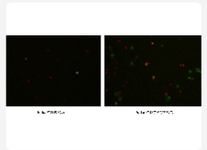
Extracellular vesicles derived from human dermal fibroblast effectively ameliorate skin photoaging via miRNA-22-5p-GDF11 axis



影响因子： 16.744
发表期刊： CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL
作者单位： 哈尔滨医科大学附属第二医院

产品名称： TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-FITC
产品货号： MK1027

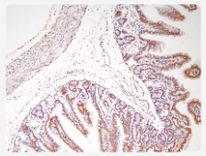
Reversing breast cancer bone metastasis by metal organic framework-capped nanotherapeutics via suppressing osteoclastogenesis



影响因子： 15.304
发表期刊： BIOMATERIALS
作者单位： 暨南大学附属第一医院

产品名称： Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒
产品货号： MK1028

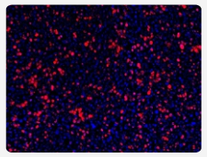
Alcoholic fatty liver disease inhibited the co-expression of Fmo5 and PPARα to activate the NF-κB signaling pathway, thereby reducing liver injury via inducing gut microbiota disturbance



影响因子： 11.161
发表期刊： J EXP CLIN CANC RES
作者单位： 郑州大学第一附属医院

产品名称： TUNEL细胞凋亡两步法检测试剂盒-POD
产品货号： **MK1011**

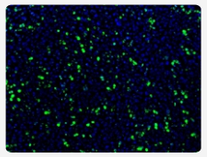
Construction of homologous cancer cell membrane camouflage in a nano-drug delivery system for the treatment of lymphoma



影响因子： 10.435
发表期刊： JOURNAL OF NANOBIOTECHNOLOGY
作者单位： 中南大学湘雅三医院

产品名称： **TUNEL**细胞凋亡检测试剂盒-**CY3**
产品货号： **MK1016**

Novel idiopathic DCM-related SCN5A variants localised in DI-S4 predispose electrical disorders by reducing peak sodium current density



影响因子： 5.451
发表期刊： JOURNAL OF MEDICAL GENETICS
作者单位： 复旦大学附属中山医院

产品名称： TUNEL细胞凋亡检测试剂盒-FITC+POD
产品货号： **MK1019**

博士德生物

32年，只研发了20000多种抗体

32年，却收获了80000多篇引用文章

32年，只研发了1800多种精品ELISA

32年，却服务了10000多所全球院校和医院

32年，销售了两百多万支抗体

32年，却没有一份假货投诉或曝光

拒绝假货，追求探索的快乐

拒绝应付，追求卓越的科研

原谅我们

从不随大流

博士德期待

与坚持探索的你

共同创造科研的崇高价值