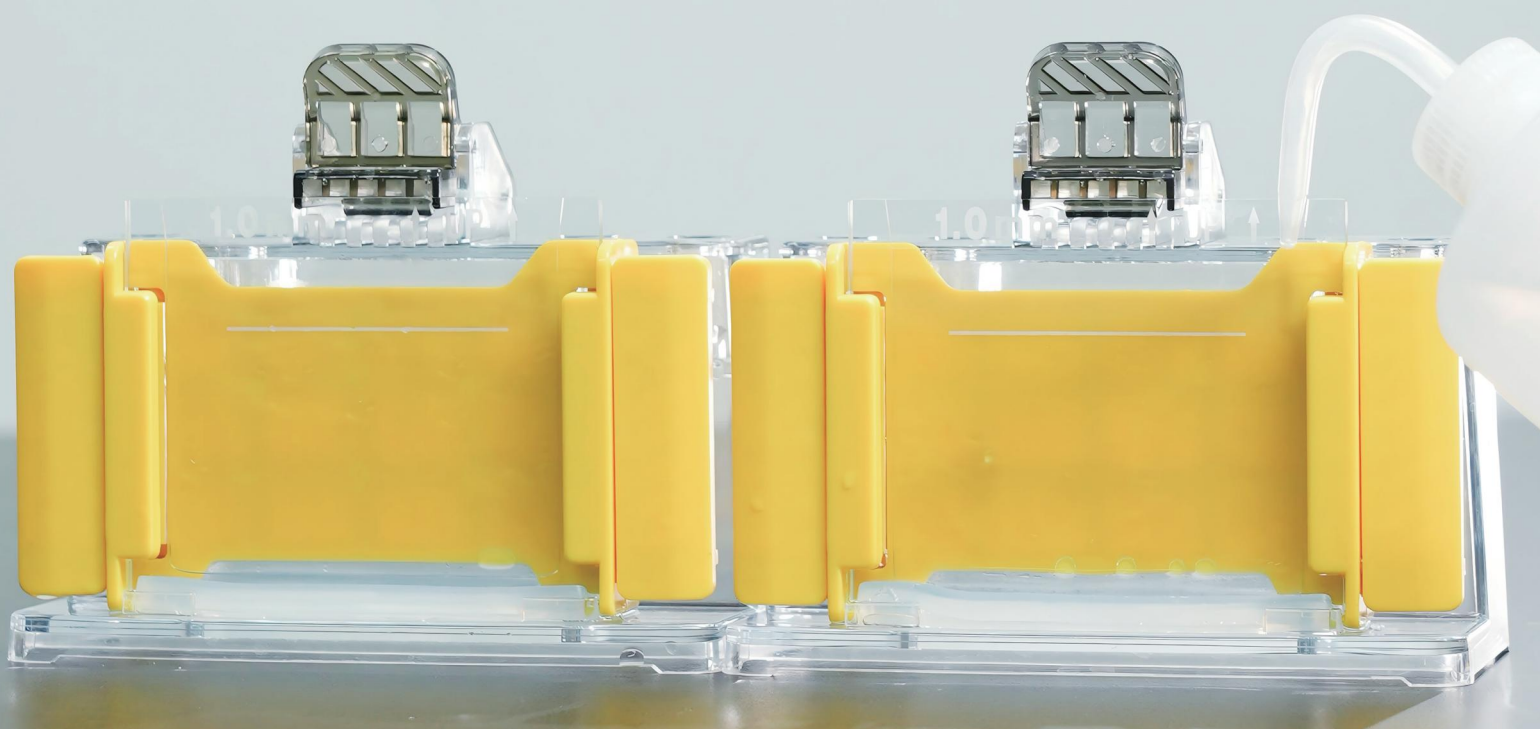




WB实验技术指南

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

关于爱博泰克

武汉爱博泰克生物科技有限公司（ABclonal）成立于2011年，总部位于中国武汉，现有波士顿研发中心、上海诊断与科研分子酶研发中心以及武汉光谷诊断与免疫研发和生产中心。作为生命科学解决方案的提供商，旨在为全球生命科学工作者提供更好的产品与服务。公司主营业务包括抗体和分子酶试剂、生命科学仪器、药物发现CRO服务等，服务用户涵盖生命科学基础研究、转化研究、生物医药、精准医疗、体外诊断等多个领域，覆盖全球40多个国家与地区。

ABclonal与国内外顶尖科研机构及科研专家保持深度合作，确保产品经过严格验证，为客户的科研创新提供强有力的支持。

一站式生命科学研究解决方案



免疫学分析产品

涵盖SMab®重组兔单克隆抗体、体内应用重组抗体、ELISA试剂盒、ABplex多因子试剂盒以及重组蛋白。



分子生物学产品

依托ProGenLab®-AI辅助酶定向进化技术平台，开发出涵盖科研、高通量测序及诊断领域的分子试剂。



CRO服务

超10,000个兔单抗项目成功研发经验，SMab®平台助力抗体快速发现。

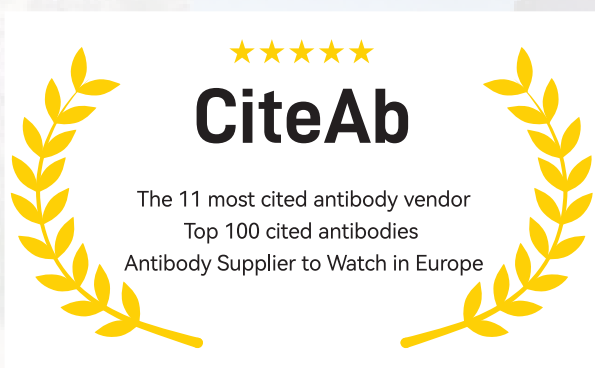


仪器设备

涵盖桌面仪器，如高效组织细胞样品处理系统，及高端精密仪器如多指标流式联合分析系统，ABCyte®流式细胞仪等。

50,000+ 次文献引用，影响因子分数累计 **360,000+**，

连续两年列入CiteAb文献引用次数榜单！



目录 CONTENTS

第一章 实验原理及流程	01
1. 实验原理	01
2. 实验流程	01
第二章 操作流程及注意事项	02
1. 样本选取及制备	02
2. 凝胶上样、电泳	06
3. 转膜	07
4. 膜封闭与抗体孵育	09
5. 曝光	09
第三章 WB常见问题及解决方案	14
1. 无阳性条带或条带弱	14
2. 非特异性条带或多条带	15
3. 表观分子量与理论不符	18
4. 高背景	19
5. 条带变形	20
第四章 代表性靶点检测案例详解	22
1. 蛋白磷酸化检测注意事项	22
2. 存在剪切和加工的蛋白检测注意事项	23
3. 分泌蛋白检测注意事项	26
第五章 WB配套试剂	27
附录：抗体的选择	29
ABclonal文献奖励活动方案	30
ABclonal微信商城	31
第六章 SCI文献引用精选	32

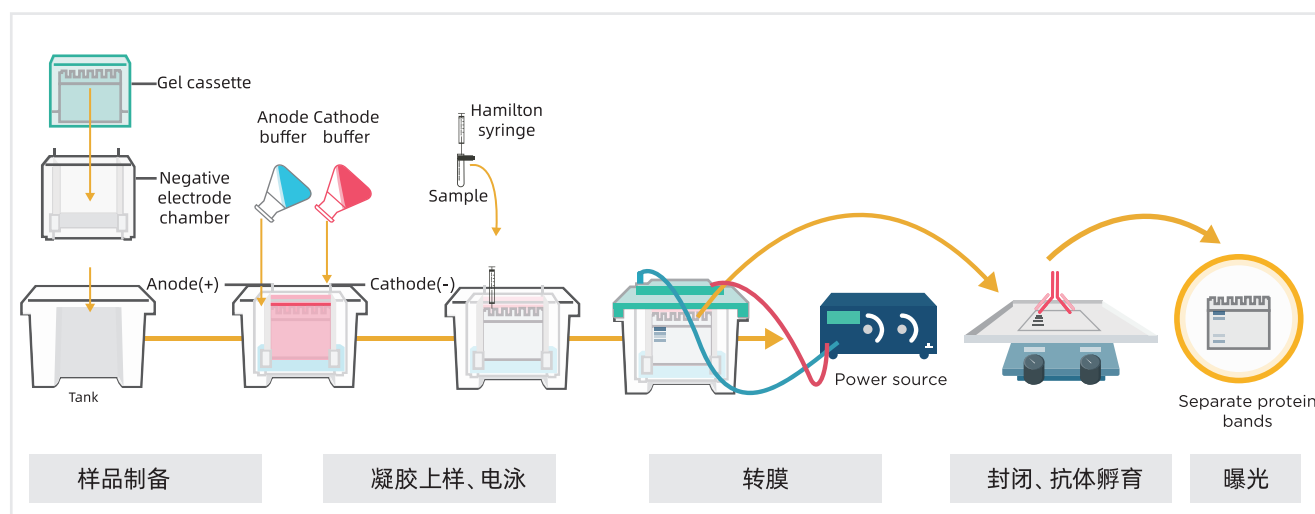
第一章 实验原理及流程

1. 实验原理

Western Blot即蛋白免疫印迹, 是利用电泳对处理过的细胞或生物组织蛋白样品在凝胶中按照分子量进行分离, 再通过电场转印到膜介质上, 然后通过特异性抗体对膜上的目的蛋白或特定位点修饰进行结合和识别, 经过抗体偶联的显色或显影系统获得条带结果, 通过分析条带位置和深度来分析目的蛋白或特定位点修饰的水平。

2. 实验流程

蛋白印迹一般由样品制备、凝胶电泳、转膜、封闭及抗体孵育和曝光五个步骤组成, 其简要流程如下:



扫描二维码, 获取Western Blot (WB)技术资源!

为方便您更快速的了解WB实验流程, 可扫描侧方二维码, 观看WB实验操作教学视频、WB实验技巧及关键环节注意事项等相关视频。



第二章 操作流程及注意事项

1. 样本选取及制备

// 1.1. 蛋白背景

实验开始前, 有必要对所研究的目的蛋白在待测样本中的表达水平、蛋白大小、翻译后修饰等背景信息进行深入的了解; 同时设置严格的阴性、阳性对照样本是必不可少的, 这将有助于在实验出现异常结果时进行排查分析。通常会参考文献或数据库进行样本的选择, 下面列举几个常见数据库。

Uniprot数据库

Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)是信息最丰富、资源最全面的蛋白质数据库, 它整合了Swiss-Prot、TrEMBL和PIR-PSD三大数据库的数据, 包含了大量来自文献蛋白质的生物功能信息。在Uniprot数据库可以查询的常见蛋白相关信息包括:

● 表达量查询

Expressionⁱ

Tissue specificityⁱ

Expressed in prostate cancer and levels increase from the normal to the malignant state (at protein level). Expressed in all human cell types so far analyzed. The Tyr-176 phosphorylated form shows a significant increase in expression in breast cancers during the progressive stages i.e. normal to hyperplasia (ADH), ductal carcinoma in situ (DCIS), invasive ductal carcinoma (IDC) and lymph node metastatic (LNMM) stages. [3 Publications](#)

● 翻译后修饰查询

PTM/Processingⁱ

Features

Showing features for chain¹, modified residue¹, modified residue (large scale data)¹, disulfide bond¹, glycosylation¹, cross-link¹.

[Download](#)

TYPE	ID	POSITION(S)	SOURCE	DESCRIPTION
Modified residue		126	UniProt	Phosphoserine; alternate Combined Sources
Glycosylation		126	UniProt	O-linked (GlcNAc) serine; alternate 1 Publication
Modified residue (large scale data)		126	PRIDE	Phosphoserine Combined Sources
Modified residue		129	UniProt	Phosphoserine; alternate Combined Sources
Glycosylation		129	UniProt	O-linked (GlcNAc) serine; alternate 1 Publication
Modified residue (large scale data)		129	PRIDE	Phosphoserine Combined Sources
Modified residue (large scale data)		140	PTMeXchange	Ubiquitinated lysine Silver Combined Sources
Modified residue (large scale data)		154	PTMeXchange	Ubiquitinated lysine Gold Combined Sources
Modified residue (large scale data)		158	PTMeXchange	Ubiquitinated lysine Silver Combined Sources

[Expand Table](#)

Post-translational modificationⁱ

O-GlcNAcylation at Thr-305 and Thr-312 inhibits activating phosphorylation at Thr-308 via disrupting the interaction between AKT1 and PDPK1. O-GlcNAcylation at Ser-473 also probably interferes with phosphorylation at this site. [14 Publications](#)

PTM/Processing中详细描述靶蛋白的翻译后修饰; 一般来说, 部分大量修饰会导致电泳迁移率的极大变慢, 对应电泳条件也需随之变化。

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

异构体查询

Sequence & Isoform¹

Align isoforms (2) Add isoforms

Sequence status¹ Complete

This entry describes 2 isoforms¹ produced by Alternative splicing.

P31749-1

This isoform has been chosen as the canonical sequence. All positional information in this entry refers to it. This is also the sequence that appears in the downloadable versions of the entry.

Name 1

See also sequence in UniParc or sequence clusters in UniRef

Tools Download Add Highlight Copy sequence

Length 400
Mass (Da) 55,686

Last updated 2005-02-01 v2
MD5 Checksum¹ 1620296E269940819BAFA78CA71E003A

MSDVAIVEKGLMLHKRGEYIKTNRPRYFLKNDGTFIGYKERPQDVQREAPLNNF5VAQCQLNKTERTPRNTFIIRCLQNTTVIERTFHWETPEEREENTTAIQTVDGLKKQEEEEPDFRSGSPSDNSGAEEHEVSL
PKHRVTNMEFEYLKLLGKGTFGKVLVKEKATGRYAMKILKKEVIVAKDEVHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVHEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKMYVYRDLKLE
MLDKDGHGIIKIDTDFGLCKEGIKDGMTHKTFCTGPEYLAPEVEDNDYGRAVDMMGLGVVHYEMMKGRLPFYNQDHEKLFELILMEETRFPRTLGPEAKSLLSGLLKDKPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQHVE
LSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQHITITPPDQDSMECVDSERRPHFPQFSYASAGTA

P31749-2

Name 2

Differences from canonical 1-62: Missing 1 Publication

See also sequence in UniParc or sequence clusters in UniRef

Show sequence

Computationally mapped potential isoform sequences¹

There are 6 potential isoforms mapped to this entry

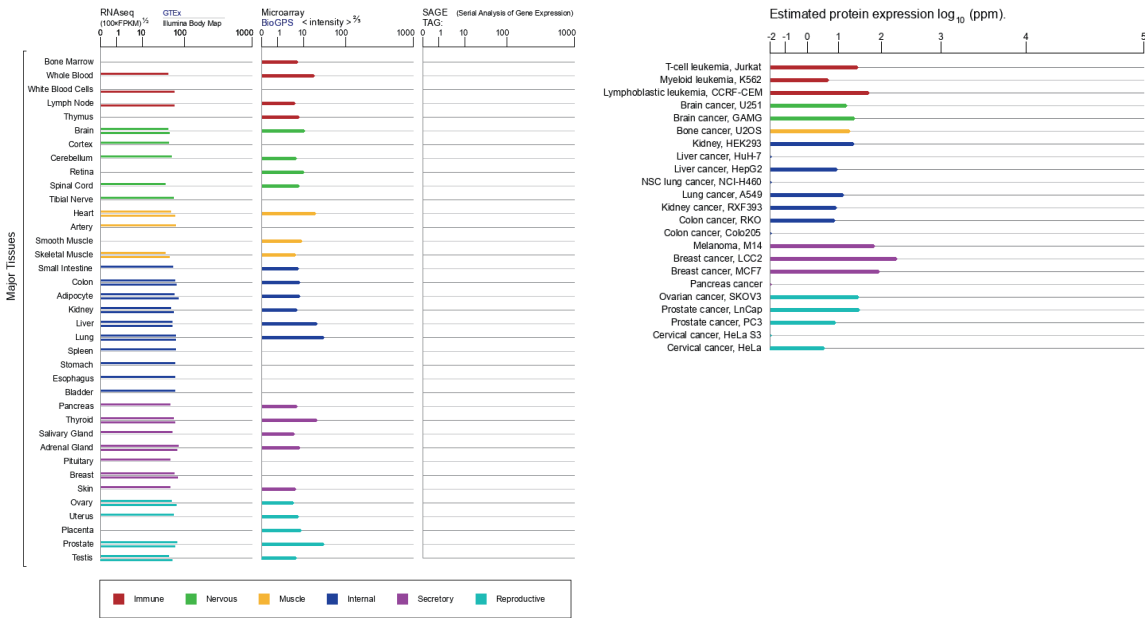
Align Add View all

Entry	Entry name	Gene name	Length
☐ A0AAQ3BHJ3	A0AAQ3BHJ3_HUMAN	AKT1	529
☐ A0AAQ3BHK3	A0AAQ3BHK3_HUMAN	AKT1	438
☐ G3V3X1	G3V3X1_HUMAN	AKT1	467
☐ G3V2I6	G3V2I6_HUMAN	AKT1	447
☐ A0AB04HJM6	A0AB04HJM6_HUMAN	AKT1	505

Sequences中会描述靶蛋白理论大小, 是否存在异构体, 异构体间序列差异。

GeneCards数据库

GeneCards数据库 (<https://www.genecards.org/>), 包含了人类基因表达调控和功能研究的各类信息, 在Expression中也会描述目的蛋白在不同组织和细胞的表达水平。



RNA EXPRESSION OVERVIEW

Organ Origin Category Expression Alphabetical

Cell lines ordered by descending RNA expression order.

Cell Line	Organ	Origin	Category	Expression (nTPM)
ASC2xelo	Brain			23
Sfha	Brain			20
K-562	Liver & Gallbladder			19
A-549	Gastrointestinal tract			18
HaCat	Male reproductive system			17
HTERT-RE1	Kidney & Urinary bladder			16
Rh30	Skin			15
hep-G2	Eye			14
A272	Proximal digestive tract			13
OE19	Lung			12
JURKAT	Female reproductive system			11
HOLM-2	Endothelial			10
PC-3	Mesenchymal			9
REL	Lymphoid			8
CAO-2	Myeloid			7
HTCEP	Renal, urinary, male reproductive system			6
NBA	Brain			5
B/J Human fibroblast	Brain			4
PDON TERT26	Brain			3
HBA293	Brain			2
A-431	Brain			1
GMG	Brain			1
MCF-1	Brain			1
U-251MG	Brain			1
HTERT-HNE1	Brain			1
SUSa	Brain			1
HeLa	Brain			1
REL	Brain			1
RPTCE TERT1	Brain			1
HTEC-15TER 24.8	Brain			1
HBB TERT88	Brain			1
U2OS	Brain			1
EFO21	Brain			1
Thp-1	Brain			1
HDFTERT166	Brain			1
SK-MEL-30	Brain			1
HAP1	Brain			1
SK-SY5Y	Brain			1
HBCRC-MT	Brain			1
PDON SW TERT153	Brain			1
HUVEC TERT2	Brain			1
IF-4	Brain			1
LYCN-MO2	Brain			1

MG数据库 (<http://www.informatics.jax.org/>)，深得广大科学家们好评的实验室小鼠数据库。该数据库整合了小鼠的遗传学组、基因组和其他生物学数据，旨在促进人类健康和疾病的研究。

BioGPS数据库 (<http://biogps.org>) 检索基因表达谱信息非常简单,可以快速查询不同物种不同组织中目的蛋白表达量。

citexs-赛特新思生物医学科研助手 (<https://www.citexs.com/>), 该平台是一款完全免费并且开放的生物医药科研服务平台, 可以通过搜索文献当中目的蛋白的检测图片对目的蛋白预期表达及定位特征进行比对, 为科研人员提供最新的数据库聚合平台。



// 1.2.样本制备

// 裂解液的选择

组织和细胞破碎过程中常用的裂解液为RIPA裂解液，其中根据蛋白质性质的不同，我们选择的裂解液也不同（见下图）。

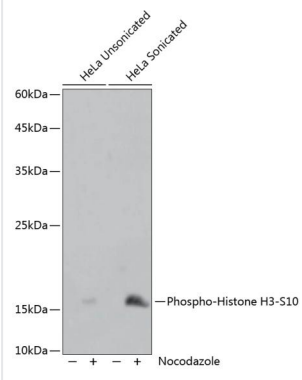
产品名称	Western及IP细胞裂解液	RIPA裂解液(强)	RIPA裂解液(中)	RIPA裂解液(弱)	NP-40裂解液	SDS裂解液
有效裂解成分	1% Triton X-100	1% Triton X-100. 1% deoxycholate. 0.1% SDS	1% NP-40. 0.5% deoxycholate. 0.1% SDS	1% NP-40. 0.25% deoxycholate	1% NP-40	1% SDS
裂解强度	温和	强	中	温和	温和	强
对膜蛋白的提取	一般	很好	较好	一般	一般	很好
对胞浆蛋白的提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好
对核蛋白的提取	较好	很好	较好	较好	较好	很好
胞浆磷酸化蛋白提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好
细胞核转录因子提取	很好	很好	很好	很好	很好	很好

// 超声破碎

样本制备环节，一般使用化学和物理方法破碎细胞及组织，确保细胞和组织样本充分裂解，释放蛋白。超声破碎是有效的切割染色质的方法，同时可以有效提升样品中蛋白质的可溶性，特别是完整的核蛋白和染色质相关蛋白的有效裂解都需要样品的超声处理。使用超声方法制备新鲜样本用于WB检测，有利于降低背景及提高目的蛋白检出率。然而，长时间的超声过程产生的热量会导致样品变性或者降解。为防止样本过热，超声过程中需要将样品管放在冰浴中，每次超声处理一段时间后需要在冰上暂停一段时间，以减少热量的产生，每次超声的时间也可以优化。

ABclonal推荐条件

超声破碎的功率是39W，每次超声3-5s左右，中间置于冰上间隔3-5s。超声3到5次即可，主要根据样本的体积以及加裂解液的裂解程度而定，一般样本均一旦不粘稠即可。不同的超声仪性能不同，可根据生产商的建议进行个性化优化。



靶点: Phospho-Histone H3-S10

分子量: 15KD

样本:

对照组 HeLa, HeLa+ Nocodazole (未超声处理)

实验组 HeLa, HeLa +Nocodazole (超声处理)

结果描述: WB检测对照组及实验组中组蛋白 H3 第10位丝氨酸磷酸化水平，结果显示超声后样本比未超声处理样本，可以获得更强的目的信号。

2. 凝胶上样、电泳

// 2.1. 浓缩胶、分离胶浓度的选择

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 凝胶由两种不同的凝胶层组成, 上层为浓缩胶, 下层为分离胶。浓缩胶为大孔胶, 缓冲液pH6.7, 胶浓度通常为5%; 分离胶为小孔胶, 缓冲液pH8.9, 分离胶浓度需要根据蛋白分子量大小, 选择不同浓度的分离胶用于实验 (见下表)。

分子量 (kDa)	分离胶浓度
$X \leq 10$	15%
$10 < X \leq 15$	13.5%
$15 < X \leq 25$	12%
$25 < X \leq 35$	11%
$35 < X \leq 40$	10%
$40 < X \leq 55$	9%
$55 < X \leq 70$	8%
$70 < X \leq 100$	7%
$100 < X$	6%
备注: X 为目的蛋白大小	

// 2.2. 凝胶上样注意事项

制备凝胶过程中, 吹打混匀制胶组分时, 速度不能过快, 吸液时不能吸空, 防止气泡产生。胶液灌制过程中防止产生气泡, 吸取胶液时不能吸空, 否则枪头中会有气泡; 若胶溶液中有气泡, 不要将气泡吸入枪头; 若枪头中吸入气泡, 待其上升到液体表面后开始灌胶且不要将其打入胶室, 让其留在枪头中; 灌胶时要连贯流畅, 切勿快速注入胶室中, 容易产生大量气泡, 造成胶面不平。凝胶时间要充分, 否则时间过短会造成胶体不结实。

上样前建议先加热煮沸, 然后离心, 吸取样本上样时, 枪头刚进入液面即可, 避免将枪头伸入管底, 否则枪头会沾上大量的样本, 点样时会扩散到缓冲液中造成窜样, 也浪费样本。点样时, 将枪头置于两块玻璃板之间上样泳道所在的位置, 轻轻插入其中 (不能用力插入, 挤压玻璃板), 缓慢打出样本, 待样本全部打出时, 停顿2秒再拔出枪头, 保证样本完全加入上样泳道。

3.转膜

SDS-PAGE凝胶中的蛋白因结合SDS而带负电荷, 在电场的作用下, 带负电的蛋白会转移到膜上。转膜方法一般有半干转法和湿转法。两者原理完全相同, 只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同(见下图)。半干转所需缓冲液少, 转膜时间短, 但不如湿转稳定(小分子蛋白半干转效果较好); 湿转需要大量缓冲液, 时间相对较长, 但更稳定。



// 3.1.膜类型的选择

分类	NC 膜	PVDF 膜
结合能力	80-110 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	125-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
背景	低	高
特点	脆、易破	韧性强、疏水性强
操作	缓冲液湿润	先 100% 甲醇活化
成本	价格便宜	价格偏贵

// 3.2.转膜条件的选择

分子量 (kDa)	转膜条件
$X \leq 10$	恒流 200mA, 30min
$10 < X \leq 15$	恒流 200mA, 40min
$15 < X \leq 20$	恒流 200mA, 50min
$20 < X \leq 50$	恒流 200mA, 1kDa/min+20min
$50 < X \leq 100$	恒流 200mA, 1kDa/min+30min
$100 < X \leq 150$	恒流 250mA, 1kDa/min+20min
$150 < X \leq 180$	恒流 270mA, 1kDa/min(时间控制在 3h 内)
$180 < X$	恒流 270mA, 1kDa/min(时间控制在 4h 内)

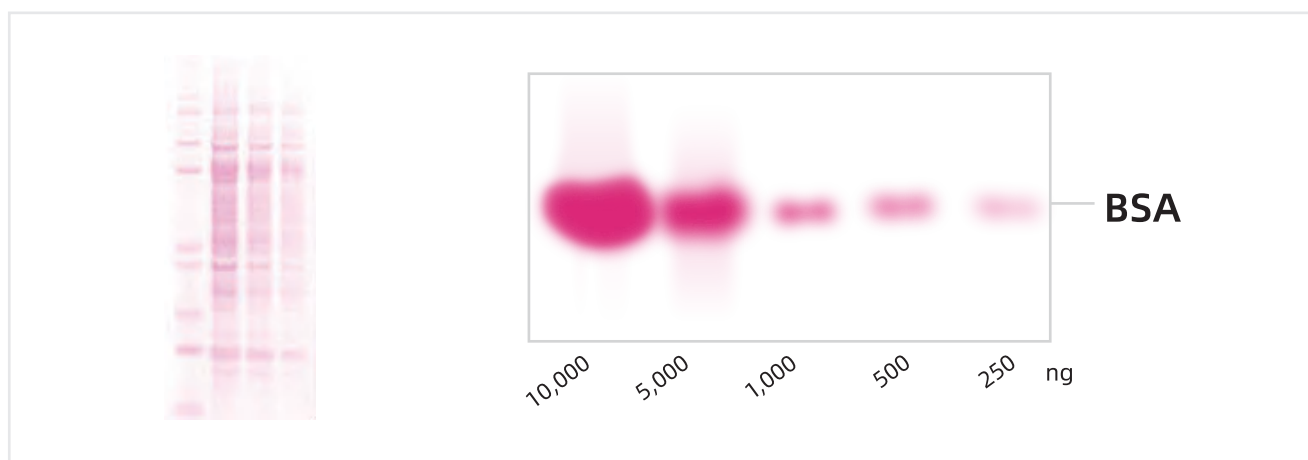
备注: X为目的蛋白大小

// 3.3.转膜要点及注意事项

- **大分子量蛋白:** 转膜缓冲液里加入0.1%的SDS; 甲醇浓度降到10%甚至更少, 用4°C湿转过夜代替半干法转膜; 增加转膜时间、电流/电压
- **小分子量蛋白:** 去净缓冲液里的SDS; 保持甲醇浓度在20%; 用小孔径的膜; 降低转膜时间、电流/电压
- **膜的方向确定:** 转移后剪角做标记, 分清正反面; 用铅笔做记号或电泳时Marker上成非对称的
- **转膜后背景高:** 选择NC膜
- **转膜时污染:** 避免手指触碰膜, 可以用镊子来取膜, 油脂和蛋白质会弄脏膜
- **滤纸的大小:** 确保滤纸和膜的大小与胶一致, 当使用半干法转膜时, 过多的部分会阻碍电流穿过膜

// 3.4.转膜后丽春红染色（可选步骤）

带负电荷的丽春红染料能够与膜上带正电的氨基酸发生可逆结合, 以判断转膜效率。染色后可用TBST缓冲液洗膜数次, 以去除染色, 再进行后续膜封闭及抗体孵育。



4.膜封闭与抗体孵育

// 4.1.膜封闭

蛋白转膜后,膜上尚有未结合蛋白的部位,可以采用TBST配制的3%或5%脱脂牛奶或BSA进行封闭,以减少非特异性结合。一般来说,脱脂牛奶的封闭效果更强,只有当进行磷酸化相关WB检测时,在信号不佳时考虑更换为TBST配制的3%或5% BSA来进行封闭。

// 4.2.抗体孵育

一抗识别膜上蛋白或修饰性抗原表位,二抗识别一抗恒定区从而与一抗结合,最终通过二抗携带的荧光或酶显色信号,达到对样本中目的蛋白进行检测的目的。一抗孵育环节我们推荐4℃过夜,可以提高抗体结合效率,并有助于降低背景;二抗一般为室温孵育。

5.曝光

WB检测中,二抗偶联的最常见的酶是HRP(辣根过氧化物酶),以ECL为底物进行发光检测。

WB详细实验步骤

1.样品制备

(1) 组织样品蛋白提取方法

- 用灭菌(预冷)的工具分离新鲜目的组织200mg,并用生理盐水或PBS洗涤干净,用洁净的剪刀将组织剪碎至合适大小。
- 将剪碎的组织转移到玻璃研磨器中,加入适量的含有蛋白酶抑制剂(必要时还需要加入磷酸酶抑制剂)的RIPA(按照每20mg组织加入100μL裂解液的比例加入裂解液),置于冰上每3min研磨一次,重复5次,使组织尽量碾碎,直到看不到明显的大细胞团块,然后在冰浴裂解30min,让组织细胞充分裂解;可取少量裂解后组织液滴于载玻片,盖上盖玻片进行光镜下观察确认是否裂解充分。
- 超声处理使细胞裂解并剪切DNA,以降低样品粘度和提升蛋白溶解度。超声破碎的功率39W,每次超声3-5s左右,中间置于冰上间隔3-5s。超声3到5次即可,主要根据样本的体积以及加裂解液的裂解程度而定,一般样本均一旦不粘稠即可。
注意:为确保组织细胞充分裂解,建议进行超声破碎。调节超声仪至适宜频率与功率(超声功率不宜过大,并设置超声间歇,以防止超声探头过度产热),将超声探头置于样本裂解液中部,但不触碰管壁或管底,进行冰浴超声。
- 超声处理后将样品继续置于冰上孵育30min。
- 将上述裂解后样品,于4℃,12 000rpm,离心15-20min,取上清到一个新的EP管,置于冰上备用。

(2) 细胞样品蛋白提取方法

- 对于贴壁细胞:从培养物中吸出培养基,用1X PBS洗涤细胞后,加入含有蛋白酶抑制剂(必要时还要加入磷酸酶抑制剂)的RIPA裂解液(6孔板每孔100μL或10cm直径的平板500μL)来裂解细胞,然后立即从板上刮下细胞并将提取物转移至EP管,置于冰上。

- b. 对于悬浮细胞: 将悬浮细胞连同培养基转移到15mL离心管, 室温1000rpm离心5min, 收集细胞沉淀, 然后加入含有蛋白酶抑制剂 (必要时还要加入磷酸酶抑制剂) 的RIPA裂解液 (6孔板每孔100 μ L 或 10 cm 直径的平板 500 μ L), 用加样器吸打几次后转入一个新的EP管, 置于冰上来裂解细胞。
- c. 超声处理使细胞裂解并剪切DNA, 以降低样品粘度和提升蛋白溶解度。超声功率50W左右, 每次超声3-5s, 中间置于冰上间隔3-5s, 循环超声3到5次, 超声后样品不粘稠即可。
- d. 超声处理后将样品继续置于冰上孵育30min。
- e. 将上述裂解后样品, 于4°C, 12 000rpm, 离心15-20min, 取上清到一个新的EP管, 置于冰上备用。

(3) 蛋白浓度测定 (BCA法)

- a. BCA工作液的配制根据样品数量, 按50体积BCA试剂A加入1体积BCA试剂B (50:1) 配置适量BCA工作液, 充分混匀。BCA工作液室温24h内稳定。
- b. 标准品设置与蛋白浓度测定
取10 μ L蛋白标准品 (5mg/mL BSA) 稀释至50 μ L, 使终浓度为1mg/mL。稀释后的蛋白标准品可以-20°C长期保存。此标准品溶液的稀释液可使用去离子水或1*PBS。将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 μ L加入到96孔板中, 加稀释液补足到20 μ L。加适当体积样品到96孔板的样品孔中, 如果样本不足20 μ L, 需加稀释液补足到20 μ L。请注意记录样品体积。各孔加入200 μ L BCA工作液, 37°C放置20-30min。用酶标仪测定A562, 或540-595nm之间的其他波长吸光度。根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

(4) 蛋白变性

按照测定获得的每组蛋白浓度, 按照每组30-50 μ g蛋白进行分装, 按照体积比向分装后的蛋白提取物中加入1/4上清体积的5 $\times$ Loading Buffer (最终工作液为1X)并混匀, 95°C加热变性10min, 并迅速置于冰上冷却, 待液体完全冷却后置于-20°C保存。

2.凝胶上样、电泳

(1) 制胶器安装

根据使用说明书安装。

(2) 分离胶制备

根据不同蛋白大小, 选择不同浓度的分离胶 (见下表)。将制备好的胶溶液注入预先安装好的制胶器中, 加入异丙醇封胶。室温水平放置30min左右。注意防止胶溶液产生气泡并注入制胶器中; 注胶前再加入TEMED, 防止注胶前凝固; 注入异丙醇时需沿玻板一边缓慢拖动加入。

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

分离胶配方	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13.5%	15%
去离子水 (mL)	5.3	4.9	4.6	4.3	4.0	3.65	3.3	2.8	2.3
30% 丙烯酰胺 (mL)	2	2.4	2.7	3.0	3.3	3.65	4.0	4.5	5.0
1.5M Tris-HCL(pH8.8) (mL)					2.5				
10%SDS (mL)					0.1				
10%AP (mL)					0.1				
TEMED (mL)					0.01				
总体积 (mL)					10				

(3) 浓缩胶制备

分离胶凝固后, 沿玻板一边倒出异丙醇, 并用滤纸吸干。再根据需要的体积制备浓缩胶 (见下表)。将制备好的胶溶液注入制胶器中, 并把准备好的样品梳沿玻板一端缓慢插入胶溶液中, 室温水平放置20-30min。注意样品梳与胶溶液之间避免气泡产生。

浓缩胶配方	5% 浓缩胶	5% 浓缩胶	5% 浓缩胶	5% 浓缩胶	5% 浓缩胶
去离子水 (mL)	1.1	2.1	2.7	3.4	4.1
30% 丙烯酰胺 (mL)	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0
1.0M Tris-HCL(pH6.8) (mL)	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
10%SDS (mL)	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
10%AP (mL)	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
TEMED (mL)	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006
总体积 (mL)	2	3	4	5	6

(4) 上样

待浓缩胶凝固好后, 双手垂直拔出样品梳, 并用Tris-Glycine SDS Running Buffer注入到内外槽中, 形成闭合回路。用移液器吸取样品垂直梳孔上样, 蛋白含量25μg/孔。注意内槽Tris-Glycine SDS Running Buffer需注满, 外槽Tris-Glycine SDS Running Buffer没过底部3~5cm即可。

(5) 电泳

上样完以后, 连通电泳仪电源, 注意正负极需连接正确, 设定适宜的电泳参数, 浓缩胶电泳参数为恒压80V, 待样本进入分离胶时, 可将电泳调至120V。当溴酚蓝电泳到凝胶底部时, 停止电泳, 关闭电泳仪电源。

3.转膜

(1) 准备工作

- 转膜缓冲液至少提前2h（即开始电泳后）放入-20℃冰箱预冷。
- 根据胶体大小选择,将Filter Paper及Nitrocellulose membrane剪裁至合适尺寸。
- 目的蛋白>20KD选择0.45μm NC膜; 目的蛋白<20KD选择0.2μm的NC膜或0.22μm的PVDF膜, 选择完毕后将NC膜放在Western Transfer Buffer中浸泡备用, 注意如使用的是PVDF膜需先放入甲醇中浸泡1 min左右至均匀浸透, 没有白点即可放入Western Transfer Buffer中浸泡备用。

(2) 转膜

取出玻板中的凝胶, 在夹板上依次放一块多孔垫、三张滤纸、凝胶、NC膜、三张滤纸、一块多孔垫（“三明治”结构）, 将转好的膜放在转膜槽, 按一定的条件进行转膜。

4.封闭

将膜从“三明治”结构中取出, 放入合适的抗体孵育槽中, 加入Western Blocking Buffer室温孵育1h, 一张6.3×8.3cm大小的膜加入6~7mL即可。

5.一抗孵育

- 将一抗用Western Antibody Dilution Buffer按照合适比例进行稀释。
- 封闭结束后, 将稀释好的一抗工作液倒入孵育槽中, 室温2h或4℃过夜。

6.洗涤

一抗孵育结束后, 加入TBST Buffer洗涤4次, 5min/次。

7.二抗孵育

- 一抗洗涤结束前10min, 将二抗用Western Antibody Dilution Buffer按照合适比例进行稀释。
- 洗涤结束后, 将稀释好的二抗工作液加入孵育槽中, 室温1h。

8.洗涤

二抗孵育结束后, 加入TBST Buffer洗涤4次, 5min/次。

9. 曝光

- a. 根据膜的大小, 按每 10cm² 膜使用 1-2mL 工作液, 按比例吸取等体积的 Solution I 和 Solution II 混匀, 配制成发光检测工作液。
- b. 用平头镊子将膜取出, 膜的下缘轻轻接触吸水纸, 去除膜上多余的液体。用移液器将工作液加到转印膜上, 使其均有覆盖, 室温孵育 1-2min, 此步骤可在洁净保鲜膜上或塑料盒中完成。
- c. 压片检测: 将膜固定于片夹内。暗室内压片 1 分钟, 立即显影定影, 根据结果再调整压片时间。或直接分别压片 30 秒、1、3、5 分钟, 然后一起显影定影观察结果。
- d. 荧光成像仪检测: 将膜放置到荧光成像仪内, 参考仪器说明书进行检测。

WB 实验操作 Tips

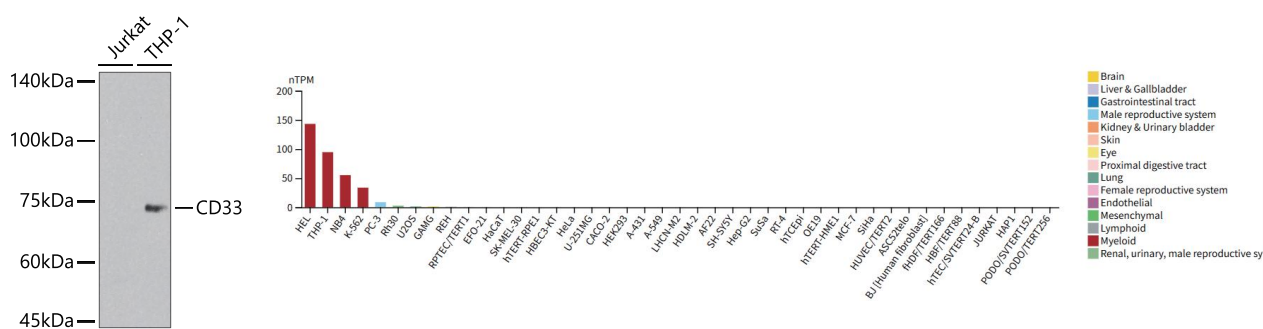
- **样本选择:**
参考文献及数据库了解靶蛋白表达情况, 选择合适的样本及处理条件。
- **样本制备:**
选择合适的裂解液及超声条件。
- **凝胶上样及电泳:**
根据靶蛋白大小选择适宜的分离胶浓度; 凝胶制备均匀充分。
- **转膜:**
根据靶蛋白大小选择对应孔径的膜及转膜条件, 丽春红染色确认转膜效率。
- **封闭:**
选择合适的封闭液及条件进行充分封闭。
- **抗体孵育:**
优选高质量抗体并梯度稀释确定最佳稀释比, 选择合适条件进行孵育。
- **曝光:**
梯度曝光, 获得最佳信噪比实验结果图。

第三章 WB常见问题及解决方案

1. 无阳性条带或条带弱

可能原因	解决方法
一抗或二抗失效	更换抗体，选择现配现用工作液
一抗 / 二抗不匹配	更改为与一抗物种相匹配的二抗
发光液失效	更换新的发光液
样本中不含目的蛋白或目的蛋白含量太低	设置阳性对照，确定样本中是否表达靶蛋白；增加样本上样量解决靶蛋白含量低
抗体染色不充分	增加抗体浓度；延长孵育时间
溶液中有辣根过氧化物酶抑制剂	所有溶液和器皿中避免含有叠氮化钠
抗体活性降低	选择在有效期内的抗体；工作液现配现用，避免长时间放置
洗膜过度	缩短洗涤时间
曝光时间过短	延长曝光时间
封闭过度	减少封闭剂的量或缩短时间；换用不同封闭剂类型
蛋白转移不充分	优化转膜条件；调整转膜时间；严格按照配方配制转膜液；如为 PVDF 膜，需提前用 100% 甲醇浸泡 5-10min 进行活化

>> 案例 1.1 样本不表达目的蛋白



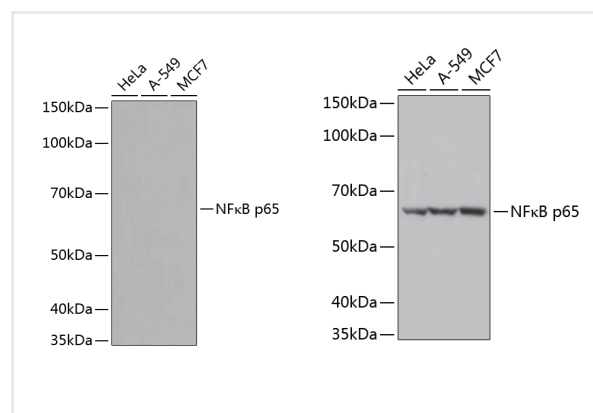
靶点: CD33

分子量: 70-80KD

表达情况: 已有文献报道Jurkat细胞中CD33阴性 (PMID:30519686), HPA数据库显示THP-1细胞表达CD33。

结果描述: WB同时检测Jurkat (CD33阴性) 及THP-1细胞, 前者未检测到条带, 后者可检测到信号。

>> 案例 1.2 抗体浓度低



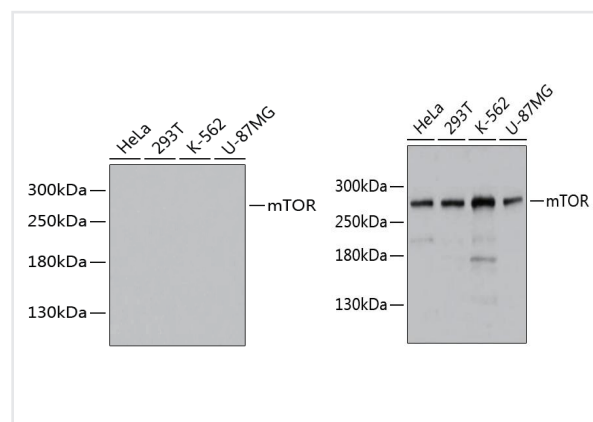
靶点: NFκB p65

分子量: 65KD

抗体稀释比: 1:1000及1:500

结果描述: 抗体1:1000稀释, WB检测HeLa, A549, MCF-7样本, 强曝光3min, 无带(左图); 更改抗体稀释比为1:500, 提高抗体浓度, 普通曝光3s可见明显目的带(右图)。

>> 案例 1.3 转膜不充分



靶点: mTOR

分子量: 289KD

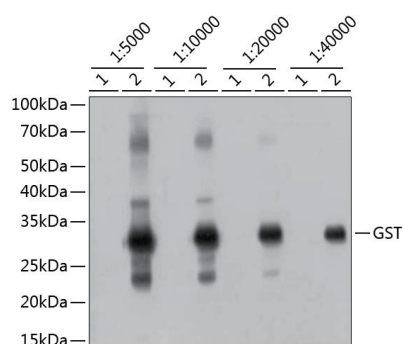
转膜条件: 恒流270mA, 转膜时间1.5h及恒流270mA, 转膜时间3.5h

结果描述: 恒流270mA, 转膜时间1.5h, WB检测HeLa, 293T, K562, U-87MG样本, 无带(左图); 优化转膜条件为恒流270mA, 转膜时间3.5h, 可见明显目的带(右图)。

2. 非特异性条带或多条带

可能原因	解决方法
抗体浓度过高	降低抗体(一抗、二抗)浓度
一抗的特异性不够	使用单克隆或者亲和纯化的抗体, 保证抗体的特异性
二抗的非特异性结合	不加一抗, 其他操作过程不变, 即可验证背景是否由二抗系统来源; 重新选择二抗
蛋白上样量过大	降低上样量
蛋白降解	避免反复冻融; 使用新鲜制备的样本, 并使用蛋白酶抑制剂
剪切体、异构体存在	分析不同剪切体、异构体的大小并核对
细胞传代过多, 导致蛋白变异	使用原代或传代少的细胞作对照

>> 案例 2.1 抗体浓度高引起的非特异性条带



靶点: GST蛋白

分子量: 27KD

样本: 数字“1”: 代表空载对照组, 不携带GST标签的载体转化大肠杆菌, 诱导后不表达GST蛋白

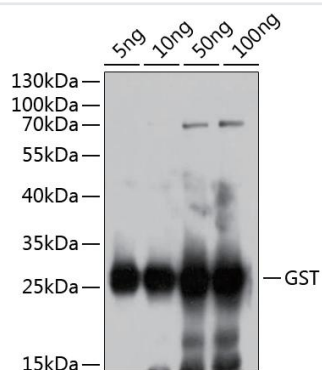
数字“2”: 代表实验组, 携带GST标签的载体转化大肠杆菌, 表达纯化后的GST蛋白

抗体稀释比: 梯度稀释1:5000至1:4万

上样量: 每个泳道均为10ng

结果描述: WB检测四组相同样本, 随着抗体浓度的降低, 非特异性条带逐渐减少。

>> 案例 2.2 样本上样量大引起的非特异性条带



靶点: GST蛋白

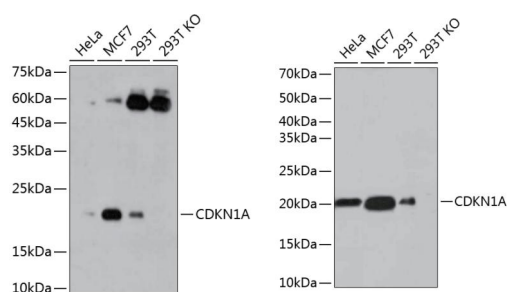
分子量: 27KD

样本: 携带GST标签的载体转化大肠杆菌, 表达纯化的GST蛋白

抗体稀释比: 1:3000

结果描述: WB检测纯化后的GST蛋白 (梯度上样5ng, 10ng, 50ng, 100ng), 随着样本上样量增大, 非特异性条带逐渐增强。

>> 案例 2.3 抗体特异性不好引起的非特异性条带



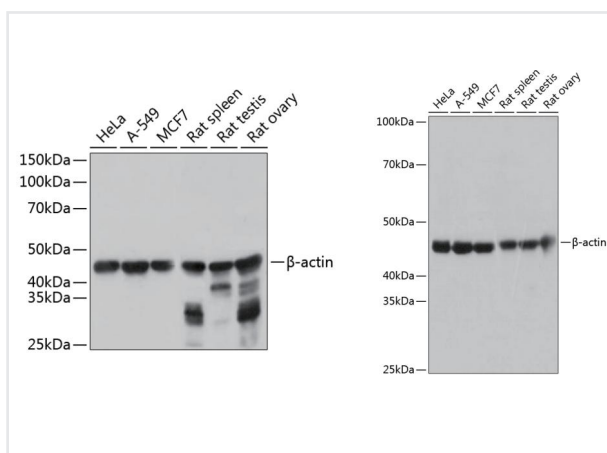
靶点: CDKN1A

分子量: 21KD

抗体稀释比: 1:1000

结果描述: WB检测HeLa, MCF-7, 293T及293T敲除样本, 左图抗体检测显示在60KD左右出现非特异性条带, 更换另外一支针对CDKN1A特异性好的抗体进行检测, 无非特异性条带出现。

>> 案例 2.4 样本降解引起非特异性条带



靶点: β -actin

分子量: 42KD

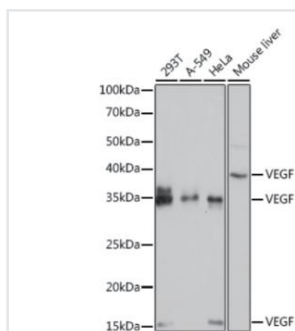
样本: 人细胞系HeLa,A-549,MCF7;

大鼠组织Spleen,Testis,Ovary

抗体稀释比: 1:1万

结果描述: WB同时检测人和大鼠样本, 人的样本条带单一, 大鼠样本出现多条非特异性条带, 分析为样本降解导致; 重新制备新鲜大鼠样本, 并与人样本同步检测, 均得到单一目的带。

>> 案例 2.5 异构体引起检测结果多条带

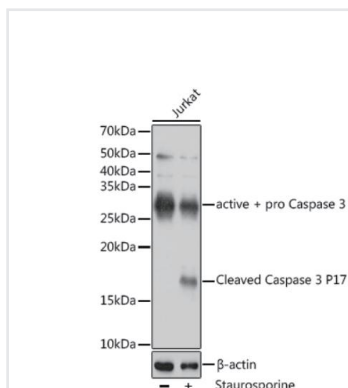


靶点: VEGF

分子量: 15, 20, 25, 36, 40KD等多个异构体 (PMID: 8167412)

结果描述: WB检测人293T,A-549,HeLa细胞系及小鼠肝组织中VEGF表达水平, 可检测到VEGF多个大小的异构体条带。

>> 案例 2.6 剪切体引起的检测结果多条带



靶点: caspase3

分子量: 前体32KD, 17KD剪切体 (凋亡发生时)

样本:

对照组 Jurkat细胞

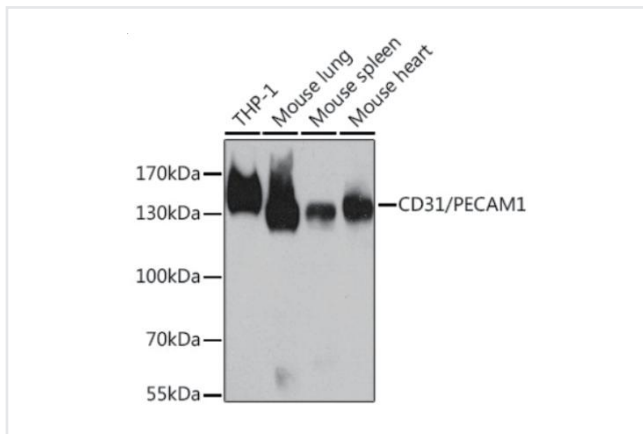
实验组 staurosporine处理的Jurkat细胞 (诱导凋亡)

结果描述: WB检测staurosporine处理前后的Jurkat细胞, 对照组仅检测到前体32KD, 实验组既检测到前体, 又检测到凋亡发生的17KD剪切体。

3.表观分子量与理论不符

原因	类型
存在翻译后修饰	如糖基化，乙酰化，泛素化等
存在聚体形式	如二聚体或多聚体
蛋白所带电荷类型	蛋白所带正电还是负电，影响蛋白迁移率

>> 案例 3.1 糖基化引起表观分子量增大

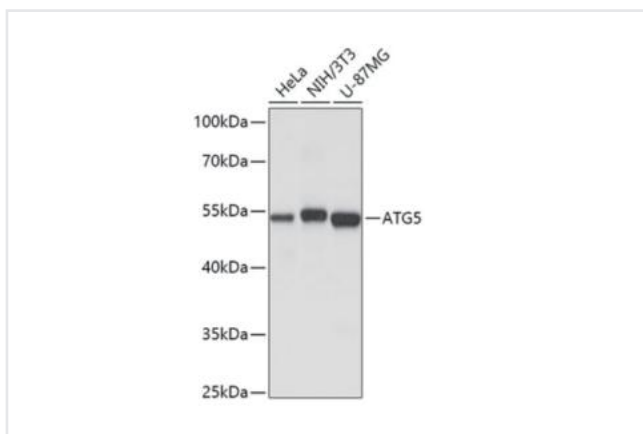


靶点: CD31

分子量: 理论分子量82KD, 表观分子量130KD (PMID: 25971970)

分子量增大原因: 糖基化修饰

>> 案例 3.2 异源二聚体引起表观分子量增大

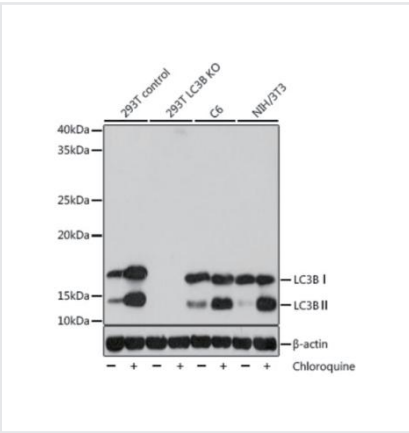


靶点: ATG5

分子量: 理论32KD, 表观分子量55KD(PMID: 28928221)

分子量增大原因: ATG5与ATG12共价结合,以异源二聚体形式存在, 表观分子量为异源二聚体的大小。

>> 案例 3.3 蛋白所带电荷引起分子量变化



靶点: LC3B-II

分子量: 14KD

结果描述: LC3B-I的分子量约16KD, 因LC3B-II接合了PE基团, 理论上, LC3B-II的分子量比LC3B-I大。但是, 由于带负电的PE改变了LC3B-II的性质, 使其疏水性更强, 在电泳中迁移率更高。所以, LC3-II在电泳后, 停留在更小分子量 (约14 KD) 处。

4. 高背景

可能原因	解决方法
封闭不充分	增加封闭液孵育时间, 或者提高温度; 选择合适的封闭试剂
洗膜不充分	增加洗液体积和洗涤次数; 洗涤液中加入Tween-20
二抗浓度过高	降低二抗浓度
二抗的非特异性背景	不加一抗, 其他操作过程不变, 即可验证背景是否由二抗系统来源; 重新选择二抗
抗体与封闭蛋白有交叉反应	更换封闭剂; 洗涤液中加入Tween-20可减少交叉反应
曝光过度	缩短曝光时间
检测过程中膜干燥	保证充分的反应液, 避免出现干膜现象

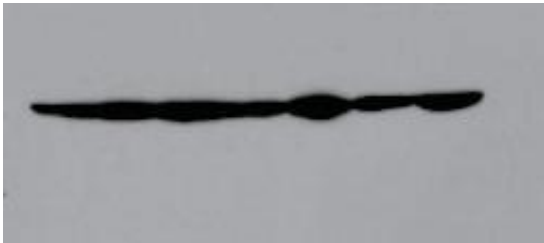
>> 案例 4.1 封闭、洗膜不充分导致高背景



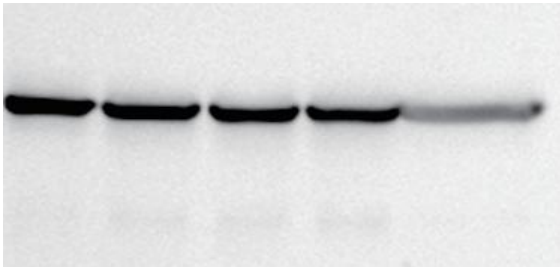
5. 条带变形

常见问题	可能原因	解决方法
条带连成一条线	上样量大，一抗浓度高	降低上样量及一抗浓度
条带呈笑脸状	凝胶不均匀冷却，电泳时中间比两端更热；凝胶浓度不适宜；电压过大	调整胶浓度；降低电泳时的电压
条带呈皱眉状	凝胶和玻璃挡板底部有气泡；两边聚合不完全	电泳槽中加电泳液时排空玻璃挡板下方的气泡；配胶时充分混匀
拖尾	样本中蛋白溶解不好	上样前对样本煮沸5min，离心1min
出现纹理（纵向条纹）	样本中含有不溶性颗粒	上样前对样本煮沸5min，离心1min
条带偏斜	电极不平衡或者加样位置偏斜；凝胶不均匀凝固	在未加样孔中加入等量样品缓冲液，配胶时充分混匀
条带弥散	上样时样品被电泳缓冲液稀释；浓缩胶配制出错或梳齿底部过短	上样时自底部往上缓缓加样；使用新配制 AP，按照配方配浓缩胶；梳齿底部至分离胶顶约1.0 ~ 1.5cm
条带宽窄不均	蛋白浓度不同，上样时体积差异过大	浓度高的样本中补充1*上样缓冲液至各样本体积大致相同
背景有不均匀白色斑点	转膜过程中有气泡存在	仔细检查，避免存在气泡
	抗体分布不均匀	孵育抗体时使用摇床

>> 案例 5.1 上样量大条带连成一条线

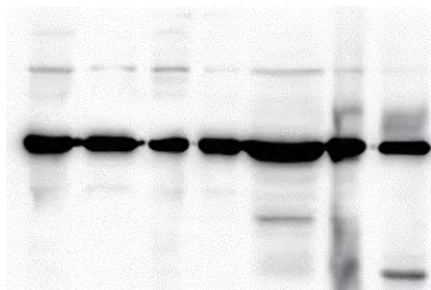


>> 案例 5.2 泳道扩散

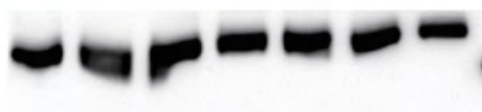


右侧空置泳道，未用等体积1×loading buffer上样，导致泳道扩散

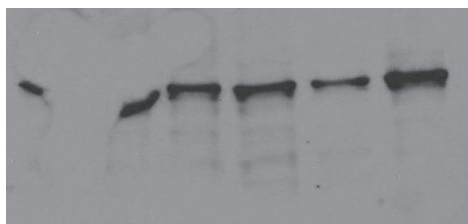
>> 案例 5.3 胶齿弯曲导致条带变形



>> 案例 5.4 制胶不均匀、凝胶不充分



>> 案例 5.5 转膜有气泡导致条带变形

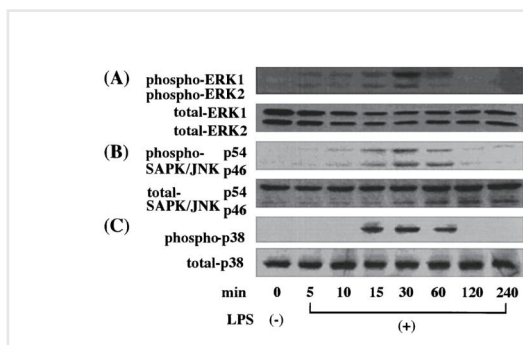


第四章 代表性靶点检测案例详解

1. 蛋白磷酸化检测注意事项

规律1：蛋白质磷酸化往来的快去得也快

正常情况下，细胞内的磷酸化与去磷酸过程一般来说是一个非常迅速的过程，通常在几分钟至几十分钟内就完成了。所以，如果利用小分子化合物在体外对细胞进行处理建立细胞模型进行后续相关研究，建议一定要查阅文献并根据参考文献针对自己使用的细胞系进行药物处理浓度和处理时间点的摸索。一般来说，很多蛋白的磷酸化修饰都会在小分子化合物处理后的较短时间内（几分钟、数十分钟、1-2小时不等）迅速发生并随着时间推移逐渐升高。但随着小分子化合物处理的时间延长，一些蛋白的磷酸化水平反而会逐渐降低，大部分的原因是，蛋白磷酸化水平前期升高后会受到磷酸酶（phosphatase）的负调节而逐渐去掉这些磷酸化修饰，防止某些蛋白（如激酶）因磷酸化水平一直保持较高水平而使这些蛋白处于长期激活的状态（如下图所示）



图：用LPS(1mg/mL)刺激J774.1细胞诱导多种MAPK磷酸化的时间过程。ERK、SAPK/JNK和p38的活性由Western Blot测定。

所以，要比较对照组和处理组之间某一个蛋白磷酸化水平是否存在差异以及是否符合预期规律，在什么时间点取样是大有学问的。强烈建议大家首先要用合适的药物浓度（依据文献或前期摸索）做Time course（即处理不同的时长并分别取样），确定最佳检测时间点后，才可以只取一个固定时间点的处理组样品进行相关磷酸化检测，并与对照组相比以评估其是否存在变化。这个建议无论是对于体外培养的细胞模型，还是动物模型都适用。

规律2：细胞正常培养时某些蛋白存在本底的磷酸化水平

很多细胞在正常培养条件下都会添加血清，血清当中很多营养成分（如氨基酸、脂类、生长因子等）是维持细胞生长的重要因素。但是由于这些成分的存在，会导致包括AKT、MAPK在内的一些激酶磷酸化在不添加任何小分子化合物处理时就已经发生磷酸化修饰，即我们通常所说的蛋白本底的磷酸化水平。因此，如果涉及增殖研究的的一些激酶磷酸化研究，往往需要在正式实验前采用血清剥夺（即利用不含血清的培养基进行培养）的方式对细胞进行预处理。

但是，我们也要注意这种预处理不是适用于任何研究的细胞模型，所谓的蛋白本底的磷酸化水平并不是发生在所有的蛋白上。血清剥夺可以迅速启动多种应激反应，处理时间过长反而可能对某些研究靶点（比如自噬相关靶点）的检测带来影响。因此，为了更好的确定磷酸化水平是否发生变化，需要根据所检测靶点来确定是否需要进行血清剥夺的预处理。

规律3：蛋白的磷酸化很敏感，取样时要快速和小心

我们要对蛋白磷酸化进行检测，就往往需要在非正常细胞培养条件下（比如把细胞培养皿拿出培养箱）把蛋白从细胞当中提取出来。在这些操作中，如果操作不当（比如让细胞长期处于低温、培养条件改变（如PH值改变）、细胞暴露于空气、重金属及各种材料的表面等），也会造成细胞发生应激反应进而导致某些蛋白的磷酸化在这段时间发生了变化。因此，我们需要在尽可能短的时间内完成从撤除培养基、到加入细胞裂解液（含足量蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂）并迅速置于冰上低温裂解的过程，以减少这些外部因素对于细胞内磷酸化水平的扰动。

规律4：蛋白的磷酸化不稳定，新鲜样品是关键

蛋白提取后，由于蛋白提取用的细胞裂解液都会含有足量蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂，来防止蛋白降解和磷酸化的丢失，但是不是这样就万事大吉了呢？

很多时候，大家都会遇到这样的困扰，就是当利用新鲜样品做第一次磷酸化检测的时候，结果都符合预期，但是当蛋白在冰箱（无论是-20℃还是-80℃冰箱）储存一段时间后，发现用同一批提取的样品再去做磷酸化检测，实验无法重复。这是因为蛋白的磷酸化在体外并不稳定，特别是当蛋白提取用的细胞裂解液相对不足（就是细胞太多，而裂解液加的体积不够）时，这类问题就更加严重。所以，我们建议：

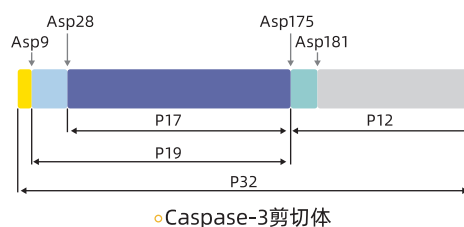
- ① 蛋白提取用的细胞裂解液体积一定要适当，不能过少；
- ② 要使用质量好的蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂，这是不同的两种抑制剂cocktail，希望尽量都加上；
- ③ 尽量使用新鲜提取的样品来做磷酸化相关检测，退而求其次才能使用冻融过的蛋白样品；而且审稿人需要的三次实验重复，本身就要求从细胞培养、药物处理、到样品制备和检测全部流程重复至少三次，而不是做一次样品，进行三次检测（这是不符合严谨的科学精神的）
- ④ 如果真的是需要进行技术重复（提取一次样品，进行多次检测），也建议蛋白浓度测定后把蛋白分装到不同管子，加入上样buffer煮沸后再低温保存，上样buffer当中的较高浓度的SDS也会尽量减少样品中的磷酸酶对磷酸化的影响。样品从低温冰箱取出后尽快置于冰上并在冰上融化为宜，尽量减少融解过程对磷酸化的影响。

2.存在剪切和加工的蛋白检测注意事项

// 2.1.Caspase-3

Caspase-3属于半胱天冬酶家族，在凋亡信号传导的许多途径中发挥重要功能，正常情况下以无活性的酶原形式（Pro-caspase-3,32KD）存在于胞浆中，在凋亡的早期阶段被激活，活化的Caspase-3由大小亚基组成，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导致细胞凋亡。

Caspase-3全长277个氨基酸，酶原上有四个酶切位点Asp9、Asp28（Ser29）、Asp175（Ser176）和Asp181，其中在Asp175和Asp181处切割产生p20（1-175氨基酸）和p11（181-277氨基酸）大小亚基，大亚基进一步在Asp28处切割去掉N末端前肽产生p17，而Asp9处切割产生p19大亚基，其与Caspase-3酶原自身活化有关。



WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

凋亡过程中的关键事件之一是caspase-3的活化, 因此, 通过WB方法检测cleaved caspase-3成为研究凋亡常用手段, 但常会遇到cleaved caspase-3检测不到的情况。那么该从哪些方面入手进行分析呢?

确认Caspase-3在所检样本中表达水平

Caspase-3 在肺、脾、肝等组织中高表达, 在脑、骨骼肌中, 中等水平表达, 低表达在睾丸组织; 并在多种细胞系中表达, 尤其在免疫细胞中高表达。在做caspase-3检测前, 有必要提前查阅文献或数据库, 了解其在本检测样本中本底表达水平。

Expression¹

Tissue specificity¹

Highly expressed in lung, spleen, heart, liver and kidney. Moderate levels in brain and skeletal muscle, and low in testis. Also found in many cell lines, highest expression in cells of the immune system.

选择合适的诱导处理条件

Cleaved caspase-3 仅存在于正在发生凋亡的细胞中, 未发生凋亡或坏死的细胞中检测不到 cleaved caspase-3。因此, 样本处理的有效性是决定cleaved caspase-3能否检测到的关键因素之一。建议, 在能检测到caspase-3前体的情况下, 根据样本, 如不同细胞系, 选择合适的诱导剂, 在诱导剂浓度、诱导时间上做梯度摸索, 确定最佳处理浓度及收样时间。同时设置合适的阳性对照做对比检测。

关于贴壁细胞系

贴壁细胞在发生凋亡后可能会比较难贴壁, 建议通过离心收集所有悬浮细胞, 与刮下来的贴壁细胞混合在一起裂解用于后续的检测。

足够的上样量

组织样本可能只有小比例细胞发生凋亡, 建议每孔蛋白上样量100μg; 诱导的细胞建议每孔蛋白上样20~30μg。

膜的孔径

Cleaved caspase-3属于小分子量蛋白, 0.2 μm 孔径的膜能最大程度的减少转膜过程中小分子量蛋白的丢失。另外, 文献报导使用戊二醛固定NC膜30 min, 能促进caspase-3 与 NC 膜的稳定结合, 提高caspase-3检测成功率。

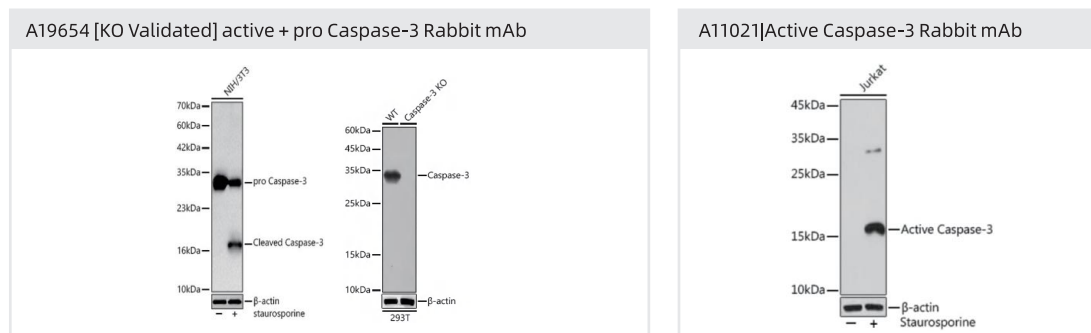
分离胶浓度

可采用15%浓度的分离胶 (SDS-PAGE) 进行cleaved caspase-3的检测。

高质量可识别cleaved caspase-3抗体

选择抗体时, 除了关注所验证的物种、应用是否符合要求, 同时, 务必确认抗体是否可识别cleaved caspase-3。

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE



// 2.2. LC3

微管相关蛋白1A/1B-轻链3 (MAP1LC3) 通常缩写为 LC3, 哺乳动物LC3蛋白有四个亚型, 分别是MAP1LC3A(简LC3A), MAP1LC3B(简LC3B), MAP1LC3B2(简LC3B2), MAP1LC3C(简LC3C), 其中LC3A和LC3B研究最多。

LC3普遍存在于哺乳动物组织和培养的细胞中, 是自噬的关键分子。其与酵母蛋白ATG8具有较高相似性, 在其羧基端被ATG4迅速剪切, 产生胞浆定位的LC3-I (分子量16kD)。在自噬过程中, LC3-I通过需要ATG7和ATG3参与的泛素样反应, 结合到PE上, 产生脂质化的LC3-II (电泳表现分子量为14kD), 并定位到自噬体膜上。

LC3-II是自噬体的重要标志物, 随自噬体膜的增多而增加。因此, LC3的WB检测, 也成为自噬研究中常见检测手段, 但LC3经常出现检测不到LC3-II的情况, 该如何分析?

确认LC3在所检测样本中的表达水平

LC3的四个亚型, 在不同组织或细胞样本中表达水平有差异, 需根据所研究样本中蛋白表达水平进行选择。

LC3B广泛表达在心脏、脑、骨骼肌及睾丸组织中, 肝组织中很少表达。

Expressionⁱ

Tissue specificityⁱ

Most abundant in heart, brain, skeletal muscle and testis. Little expression observed in liver. [1 Publication](#)

LC3A广泛表达在心脏、脑、肝、骨骼肌及睾丸组织中, 但胸腺及外周血白细胞中不表达。

Expressionⁱ

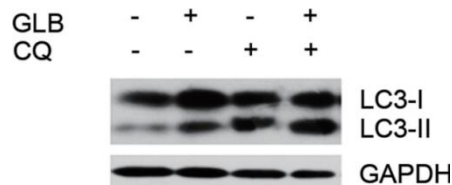
Tissue specificityⁱ

Most abundant in heart, brain, liver, skeletal muscle and testis but absent in thymus and peripheral blood leukocytes. [1 Publication](#)

可见, 研究肝组织, 检测LC3A更合适。通常, 也可以考虑采用LC3A/B抗体, 同时检测LC3A和LC3B, 提高实验成功率。

选择合适的样本处理条件

自噬小体存在生成、融合、降解的过程, 即“自噬流”。LC3-I和II的存在是一个生成-降解的动态过程。因此, 未经自噬诱导, 仅选择单时间点检测的样本, 很可能恰逢自噬流降解, 而难以检出LC3-II; 且LC3-II的表达改变并不能体现自噬的改变, 需要使用一些阻断溶酶体降解的药物 (如氯喹、巴佛洛霉素A1等), 通过在“堵漏”的前提下, 根据一段时间内LC3-II的积聚程度, 判断细胞的自噬程度的改变。



WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

样本超声处理

作为脂化和膜相关蛋白, 在细胞裂解后, 对其进行冰上短暂超声, 可以促进蛋白的溶解, 将LC3从膜上解离。

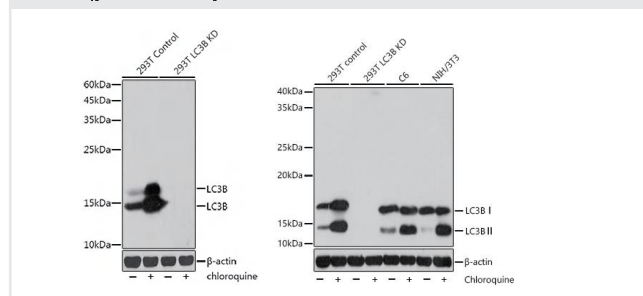
分离胶和膜的选择

LC3属于小分子量蛋白, LC3-I (16KD) 与LC3-II(14KD) 仅2KD差异, 建议使用高浓度分离胶如15%(SDS-PAGE)进行分离, 同时使用小孔径0.2 μ m膜进行转印, 并设置合适的转膜条件。

高质量一抗

选择抗体时, 务必根据所验证的物种、应用选择合适的抗体。

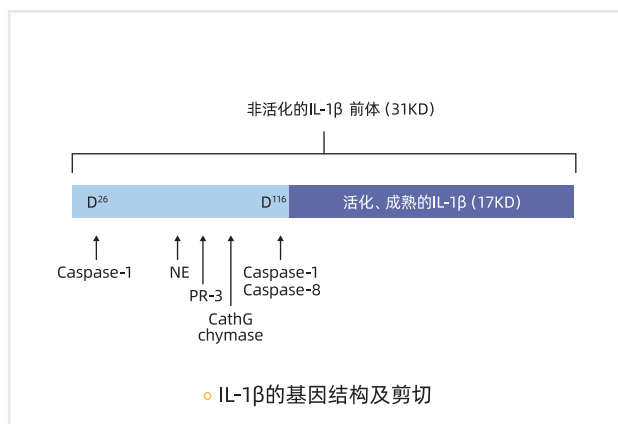
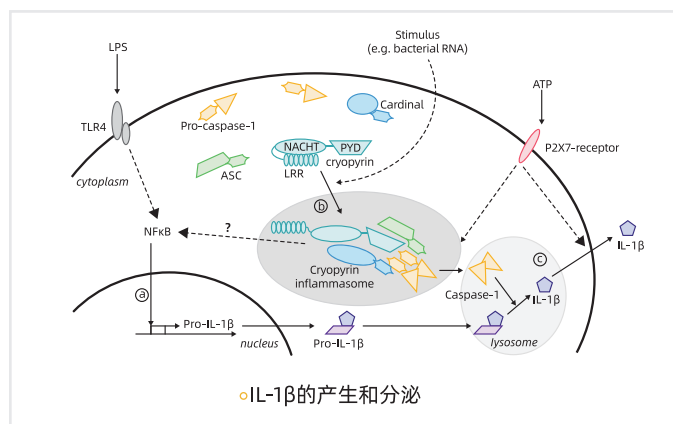
A19665[KO Validated] LC3B Rabbit mAb



3.分泌蛋白检测注意事项

分泌蛋白是指在细胞内合成后, 分泌到细胞外起作用的一类蛋白。研究中常会涉及到培养的细胞样本分泌蛋白的检测, 在样本制备过程中需要做一定调整, 通常会检测富含这些蛋白的细胞培养上清, 下面以IL-1 β 为例进行介绍。

白细胞介素1 β (IL-1 β) 是IL1家族成员之一, 属于促炎细胞因子, 参与多种自身免疫性炎症反应和多种细胞活动, 包括细胞增殖、分化和凋亡等, 是典型的多功能细胞因子。很多细胞, 包括免疫细胞 (如单核细胞和巨噬细胞) 都可以产生并分泌IL-1 β 。IL-1 β 的产生和释放大致分为3个步骤, 首先是无活性前体的产生, 其次是前体的成熟活化, 最后是活化蛋白向胞外的分泌。



WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

WB是IL-1 β 活化体检测的有效手段,但在实际检测中,会出现检测不到信号的情况,该如何分析呢?

选择合适的样本处理条件

IL-1 β 的成功释放需要两步的信号刺激: 第一步是mRNA 的表达和后续的翻译需要来自病原的刺激PAMPs (病原相关分子模式, 如 LPS等); 第二步是前体快速有效加工和释放需要更进一步的刺激 DAMPs (损伤相关分子模式, 如 ATP) 或 PAMPs。研究表明, 若无第二步刺激, 细胞只会非常慢地产生极少量的活化IL-1 β 。因此, 选择和摸索合适的样本处理条件至关重要。

细胞培养上清样本的制备

由于活化的IL-1 β 是分泌到细胞外, 但不是借助经典的蛋白分泌途径 (ER-Golgi途径) 进行分泌, 因此使用传统抑制剂来处理细胞抑制该途径, 无法达到富集胞内IL-1 β 的目的。所以, 可以通过检测细胞培养上清样本检测IL-1 β 活化体。如下样本制备方法(丙酮沉淀蛋白)可参考:

- 培养基和冷丙酮 (体积比1: 4) 混合, -80℃过夜
- 10,000 g 离心 10 分钟
- 去除上清, 不要取到蛋白沉淀。注意不要使沉淀干燥过度, 否则后续不易溶解
- 室温敞开管子放置30分钟以让丙酮挥发完全
- 1X SDS上样缓冲液溶解沉淀, 进行WB检测

分离胶及膜的选择

活化的IL-1 β 分子量为17KD, 属于小分子量蛋白, 建议选用15%分离胶 (SDS-PAGE)进行分离,同时使用小孔径0.2 μ m膜进行转印, 并设置合适的转膜条件。

第五章 WB配套试剂

产品类别	货号	产品名称
彩色预染蛋白 marker	RM02949	ColorMixed Protein Marker 250 (10-250 kDa) { 蛋白 marker }
	RM19001	ColorMixed Protein Marker 180 (10-180 kDa) { 蛋白 marker }
	RM02943	ColorMixed Protein Marker 310 (10-310 kDa) { 蛋白 marker }
样品制备试剂相关 (酶抑制剂、裂解液等)	RM00022	Cell lysis buffer for IP (without inhibitors)
	RM00001	SDS-PAGE Sample Loading Buffer (5*)
	RM02916	蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, 100X DMSO 储液)
	RM02997	磷酸酶抑制剂 Phosphatase Inhibitor Cocktail (2 Tubes, 100X)
	RM70000	PMSF { 苯甲基磺酰氟 } (100mM)
预制胶、快速制胶试剂盒、 或者散装配胶等	RM02998	RIPA Lysis Buffer (Strong)
	BRK0001	一步法彩色快速凝胶试剂盒 6%
	BRK0002	一步法彩色快速凝胶试剂盒 8%

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

产品类别	货号	产品名称
预制胶、快速制胶试剂盒、或者散装配胶等	BRK0003	一步法彩色快速凝胶试剂盒 10%
	BRK0004	一步法彩色快速凝胶试剂盒 12%
	BRK0005	一步法彩色快速凝胶试剂盒 15%
	BRK1010T	预制 Tris-Gly (10%) 10 孔超快蛋白电泳试剂盒
	BRK1210T	预制 Tris-Gly (12%) 10 孔超快蛋白电泳试剂盒
	BRK0021P	预制 Tris-Gly (4-20%) 10 孔超快蛋白电泳试剂盒
	BRK1010B	预制 Bis-Tris (10%) 10 孔蛋白电泳试剂盒
	BRK1210B	预制 Bis-Tris (12%) 10 孔蛋白电泳试剂盒
	BRK0031	预制 Bis-Tris (4-20%) 10 孔蛋白电泳试剂盒
	BRK0020	预制 Tris-Gly (4-20%) 蛋白电泳试剂盒
	BRK0020P	预制 Tris-Gly (4-20%) 超快蛋白电泳试剂盒
	BRK0030	预制 Bis-Tris (4-20%) 蛋白电泳试剂盒
	BR00013	Cassette Opener (预制胶开胶器)
电泳、转膜、剥离液等试剂及耗材	RM00010	1X Tris-Glycine SDS Running Buffer
	BR00007	超快电泳缓冲液 (Tris- 甘氨酸 SDS 粉末)
	BR00009	Ice-Bath Free Ultra-Fast Transfer Buffer Powder { 免冰浴超快转膜缓冲液粉末 }
	BR00016	WB Stripping buffer 抗体洗脱液 (再生液、剥离液)
	BR00017	ecolorization-free Ultra Fast Staining Buffer 考马斯亮蓝快速染色液 (免脱色)
	RM00017	Nitrocellulose membrane (6.3×8.3cm)(0.45μm) {NC 膜 (0.45μm)}
	RM02801	Nitrocellulose membrane (6.3×8.3cm)(0.2μm) {NC 膜 (0.2μm)}
	RM00018	Polyvinylidene fluoride (6.3×8.3cm)(0.2μm) {PVDF 膜 }
洗膜、封闭、一抗二抗孵育及曝光	RM02954	Western Blot Primary Antibody Dilution Buffer { WB 一抗稀释液 }
	RM02955	Universal Antibody Dilution Buffer { 通用型抗体稀释液 }
	RM02956	Rapid Blocking Buffer { 快速封闭液 (5*) }
	RM00020P	ECL Basic Plus Kit {ECL 化学发光底物 Plus(普通型)}
	RM00021P	ECL Enhanced Plus Kit {ECL 化学发光底物 Plus(增强型)}
	RM02867	ECL Super Kit {ECL 化学发光底物 (超敏型)}
常见内参抗体	AC012	α-Tubulin Mouse mAb
	AC026	β-Actin Rabbit mAb (High Dilution)
	AC021	β-Tubulin Mouse mAb
	AC038	β-Actin Rabbit mAb
	A12289	β-Tubulin Rabbit mAb
	AC009	Actin (plant specific) Mouse mAb
	AC002	GAPDH Mouse mAb
	A19056	GAPDH Rabbit mAb(High Dilution)
	AC033	GAPDH Mouse mAb (High Dilution)
	AC028	HRP-conjugated β-Actin Rabbit mAb

附录：抗体的选择

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

1. 一抗选择

// 1.1. 目的蛋白的信息

确定想检测的目的蛋白是否与抗体识别蛋白信息吻合，注意中英文名字、别名等信息。

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

// 1.2. 抗体制备所用抗原的信息

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

// 1.3. 修饰位点信息

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

// 1.4. 实验样本的种属信息

抗体一般会在出厂前对常见的不同种属目标样本进行内部验证，以确定可以满足的不同种属类型，可以在产品说明书的“反应物种”一栏中看到（如人、小鼠、大鼠等）。通过验证，达到质检要求的种属会明确标记，以备参考。

// 1.5. 抗体应用的实验类型

抗体一般会在出厂前对常见的抗体应用（WB、IP、ChIP、IHC、IF、FCM等）进行内部验证，以确定是否可以满足不同应用要求。通过验证，达到质检要求的抗体会明确标记，以备参考。

// 1.6.标记物的信息

一些实验,如多重免疫荧光、多指标流式测定可能会使用到直接标记的一抗(简称直标一抗)。在进行直标一抗选择时,需要了解到自己将要使用的仪器能检测到的荧光范围,针对不同的参数要求选择合适的标记物。

// 1.7.文献引用情况

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

2.二抗选择

2.1.一抗的种属来源

主要根据一抗种属来源而决定二抗的选择,如一抗是小鼠来源,那二抗就买抗小鼠的即可。

2.2.二抗应用的实验类型

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

3.内参抗体选择

内参即内部参照 (Internal Control),对于哺乳动物细胞来说一般是指由管家基因编码表达的蛋白 (Housekeeping Proteins),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。以下列举几个常见内参及注意事项:

Loading 对照	样品类型	分子量 (kDa)	注意
Beta Actin	全细胞 / 细胞质	43	不适用于骨骼肌的样品。细胞生长条件的改变以及与胞外基质组分的相互作用都可能会导致 actin 蛋白合成的变化
GAPDH	全细胞 / 细胞质	30-40	在某些生理条件下,如缺氧及糖尿病时,会导致在一些特定细胞类型中 GAPDH 的表达增加
Tubulin	全细胞 / 细胞质	55	对抗微生物和抗有丝分裂药物耐受性的不同而会导致 Tubulin 的表达发生变化
VDAC1/Porin	线粒体	31	
COXIV	线粒体	16	
Lamin B1	核内	66	不适用于移除核被膜的样品
TATA结合蛋白TBP	核内	38	不适用于移除 DNA 的样品

ABclonal文献奖励活动方案

活动细则

- 在SCI期刊中引用标注“ABclonal”或“ABclonal Technology (WuHan, China)”等字样。
- ABclonal品牌所有产品，CRO服务均可申请奖励。试用装，生化试剂（例如：转染试剂、蛋白Marker、PBS等），耗材，标签、内参和二抗等工具抗体不在奖励范围之内。
- 所发表期刊必须是SCI引用期刊，如非SCI引用期刊，视研究成果的重要性进行单独考量。
- 投稿人需为论文第一作者或通讯作者，其他情况请文章发表团队内部商议。
- 最终解释权归ABclonal所有。



扫描二维码，
参加文献奖励活动！

ABclonal微信商城

- 注册商城，绑定手机号并完善个人信息可获得相应积分，积分可在ABclonal官方微信商城--积分商城中兑换所需礼品；
- 在ABclonal官方微信商城购买产品可获得对应积分，相应的积分比例以产品详情页说明为准；
- ABclonal会在商城开设不定期活动，可赢取高额积分，活动形式以ABclonal官方微信商城宣传为准，具体情况可联系当地ABclonal销售人员。



扫描二维码直达微信商城

1. 进入ABclonal微信公众号，点击【微信商城】



2. 点击【我的】，绑定手机号



3. 点击【绑定手机号】，填写相关信息，点击立即绑定



4. 点击【完善个人资料】填写相关信息后，点击确认修改，即可注册成功



第六章 SCI文献引用精选

PMID	标题	期刊名称	影响因子	产品类型	引用货号/物种
25083871	MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation	Cell	41.582	抗体	A4967
28753426	Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity	Cell	41.582	抗体	A3194
28965759	Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m6A Methylation	Cell	41.582	抗体	A8530
29290468	Stabilization of Reversed Replication Forks by Telomerase Drives Telomere Catastrophe	Cell	41.582	抗体	A9555
30146159	Microbial Siderophore Enterobactin Promotes Mitochondrial Iron Uptake and Development of the Host via Interaction with ATP Synthase.	Cell	41.582	抗体	A5769
31031002	Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity.	Cell	41.582	抗体	AP0342
31251911	Pervasive Chromatin-RNA Binding Protein Interactions Enable RNA-Based Regulation of Transcription.	Cell	41.582	抗体	A5016
31585088	Integrated Proteogenomic Characterization of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma	Cell	41.582	抗体	A11932
32169215	Initiation of Parental Genome Reprogramming in Fertilized Oocyte by Splicing Kinase SRPK1-Catalyzed Protamine Phosphorylation	Cell	41.582	抗体	A5854
32259487	Distinct Processing of lncRNAs Contributes to Non-conserved Functions in Stem Cells	Cell	41.582	抗体	A5964
32810437	Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response	Cell	41.582	抗体	A20262
32931733	Targeting Mitochondria-Located circRNA SCAR Alleviates NASH via Reducing mROS Output	Cell	41.582	抗体	A9840
33991488	Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression	Cell	41.58	抗体	A5891, A6709
28297716	RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response.	Nature	49.962	抗体	A1848, AP0099
30111841	Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture	Nature	49.962	抗体	A16279
30814741	Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma.	Nature	49.962	抗体	A2091
31485071	Structural basis of nucleosome recognition and modification by MLL methyltransferases.	Nature	49.962	抗体	A2355, A2357
32376953	Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation	Nature	49.962	抗体	A2348
32238924	U1 snRNP regulates chromatin retention of noncoding RNAs	Nature	49.962	抗体	A5761, AP0844
32581380	Reversing a Model of Parkinson's Disease With in Situ Converted Nigral Neurons	Nature	49.962	抗体	A14150, A6107
33268895	Galactosaminogalactan activates the inflammasome to provide host protection	Nature	49.962	抗体	A15094, A6724
33361816	Molecular basis of nucleosomal H3K36 methylation by NSD methyltransferases	Nature	49.962	抗体	A2364
32029600	Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice.	Science	47.728	抗体	A16279

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

PMID	标题	期刊名称	影响因子	产品类型	引用货号/物种
33243860	Identification of Integrator-PP2A complex (INTAC), an RNA polymerase II phosphatase	Science	47.728	抗体	A2355, A7253
33795473	Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters	Science	47.728	抗体	A2192, A5928
34709882	NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules	Science	47.72	抗体	A20191
30348677	Spatiotemporal loss of NF1 in Schwann cell lineage leads to different types of cutaneous neurofibroma susceptible to modification by the Hippo pathway.	Cancer discovery	39.397	抗体	A8202
33653692	Macropinocytosis in Cancer-Associated Fibroblasts is Dependent on CaMKK2/ARHGEF2 Signaling and Functions to Support Tumor and Stromal Cell Fitness	Cancer Discov	39.39	抗体	A16678
33558758	Comprehensive characterization of protein-protein interactions perturbed by disease mutations	Nat Genet	38.33	抗体	A2877
28263319	Asymmetric subgenome selection and cis-regulatory divergence during cotton domestication	Nature genetics	38.33	抗体	A2363
30193849	The Zinc-Finger Protein ZCCHC3 Binds RNA and Facilitates Viral RNA Sensing and Activation of the RIG-I-like Receptors.	Immunity	31.745	抗体	A12938
30650373	Fever Promotes T Lymphocyte Trafficking via a Thermal Sensory Pathway Involving Heat Shock Protein 90 and α 4 Integrins.	Immunity	31.745	抗体	A0284, A0969
30770248	Specific Decrease in B-Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhances Post-Chemotherapeutic CD8+ T Cell Responses.	Immunity	31.745	抗体	A10389, A1934
29033244	iASPP Is an Antioxidative Factor and Drives Cancer Growth and Drug Resistance by Competing with Nrf2 for Keap1 Binding	Cancer Cell	31.743	抗体	A0207, A0208
32049046	Direct Phosphorylation and Stabilization of MYC by Aurora B Kinase Promote T-cell Leukemogenesis	Cancer Cell	31.743	抗体	A11021, A5904
33186520	Elevated CXorf67 Expression in PFA Ependymomas Suppresses DNA Repair and Sensitizes to PARP Inhibitors	Cancer Cell	31.743	抗体	A2189
32442403	SETD5-Coordinated Chromatin Reprogramming Regulates Adaptive Resistance to Targeted Pancreatic Cancer Therapy	Cancer Cell	31.743	抗体	A7254, A7257
33740421	Cancer cells escape autophagy inhibition via NRF2-induced macropinocytosis	Cancer Cell	31.74	抗体	A11159
31915373	Single-cell reconstruction of the adult human heart during heart failure and recovery reveals the cellular landscape underlying cardiac function	Nature Cell Biology	28.824	抗体	A2179
32029896	BCAT2-mediated BCAA catabolism is critical for development of pancreatic ductal adenocarcinoma	Nature Cell Biology	28.824	抗体	A1957
29510730	The lncRNA MACC1-AS1 promotes gastric cancer cell metabolic plasticity via AMPK/Lin28 mediated mRNA stability of MACC1	Molecular Cancer	27.401	抗体	A0207, A2156
29803224	The long non-coding RNA PTTG3P promotes cell growth and metastasis via up-regulating PTTG1 and activating PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma	Molecular Cancer	27.401	抗体	A0266
30458784	Invasion-related circular RNA circFND3B inhibits bladder cancer progression through the miR-1178-3p/G3BP2/SRC/FAK axis.	Molecular cancer	27.401	抗体	AP0185, AP0302
30541550	TRIB2 functions as novel oncogene in colorectal cancer by blocking cellular senescence through AP4/p21 signaling.	Molecular cancer	27.401	抗体	A11661
30922314	RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3.	Molecular cancer	27.401	抗体	A0208, A2156
30940151	Circular RNA circTADA2A promotes osteosarcoma progression and metastasis by sponging miR-203a-3p and regulating CREB3 expression.	Molecular cancer	27.401	抗体	A0289
31122259	miR-301a promotes lung tumorigenesis by suppressing Runx3.	Molecular cancer	27.401	抗体	A0433, A6247
31718709	Circ-HuR suppresses HuR expression and gastric cancer progression by inhibiting CNBP transactivation	Molecular Cancer	27.401	抗体	A0958

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

PMID	标题	期刊名称	影响因子	产品类型	引用货号/物种
29275960	Inactivation of the Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor Improves Outcomes following Experimental Myocardial Infarction	Cell Metabolism	27.287	抗体	A9816
30527742	The Circadian Protein Period2 Suppresses mTORC1 Activity via Recruiting Tsc1 to mTORC1 Complex.	Cell Metabolism	27.287	抗体	A2190, A3217
31230984	OLFR734 Mediates Glucose Metabolism as a Receptor of Asprosin.	Cell Metabolism	27.287	抗体	A2036
31668872	Adipocyte Hypoxia-Inducible Factor 2 α Suppresses Atherosclerosis by Promoting Adipose Ceramide Catabolism	Cell Metabolism	27.287	抗体	A10613
31761563	Fructose-1,6-Bisphosphatase 2 Inhibits Sarcoma Progression by Restraining Mitochondrial Biogenesis	Cell Metabolism	27.287	抗体	A13552, A6774
32375062	Low-Dose Sorafenib Acts as a Mitochondrial Uncoupler and Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis	Cell Metabolism	27.287	抗体	A11435, AP0115
33186558	Elevation of JAML Promotes Diabetic Kidney Disease by Modulating Podocyte Lipid Metabolism	Cell Metabolism	27.287	抗体	A13049
30174306	Short-Term Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Modulates Histone Lysine Methylation at the Early Phase of Somatic Cell Reprogramming	Cell Metabolism	27.287	抗体	A1156, A2359
30455424	VCAM-1+ macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche.	Nature	49.962	抗体定制	斑马鱼
30944466	TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook.	Nature	49.962	抗体定制	拟南芥
31942069	Host-mediated ubiquitination of a mycobacterial protein suppresses immunity	Nature	49.962	抗体定制	结核杆菌
30487604	Stella safeguards the oocyte methylome by preventing de novo methylation mediated by DNMT1.	Nature	49.962	抗体定制	小鼠
30356214	Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis.	Nature	49.962	抗体定制	人
31243371	UDP-glucose accelerates SNAIL mRNA decay and impairs lung cancer metastasis.	Nature	49.962	抗体定制	人
32841601	A Defense Pathway Linking Plasma Membrane and Chloroplasts and Co-opted by Pathogens	Cell	41.582	抗体定制	拟南芥
28552346	Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis	Cell	41.582	抗体定制	小鼠
31835033	A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis	Cell	41.582	抗体定制	小鼠
30612740	METTL13 Methylation of eEF1A Increases Translational Output to Promote Tumorigenesis.	Cell	41.582	抗体定制	人
31859049	Immune Sensing of Cell Death through Recognition of Histone Sequences by C-Type Lectin-Receptor-2d Causes Inflammation and Tissue Injury	Immunity	31.745	抗体定制	小鼠
31085179	Inhibition of Nuclear PTEN Tyrosine Phosphorylation Enhances Glioma Radiation Sensitivity through Attenuated DNA Repair	Cancer Cell	31.743	抗体定制	人和小鼠
27002220	A positive role for polycomb in transcriptional regulation via H4K20me1.	Cell research	25.617	抗体定制	果蝇
30778176	An H3K27me3 demethylase-HSFA2 regulatory loop orchestrates transgenerational thermomemory in Arabidopsis.	Cell research	25.617	抗体定制	拟南芥
25753158	ERK kinase phosphorylates and destabilizes the tumor suppressor FBW7 in pancreatic cancer.	Cell research	25.617	抗体定制	人
26928339	The kinase CK1 ϵ controls the antiviral immune response by phosphorylating the signaling adaptor TRAF3.	Nature immunology	25.606	抗体定制	小鼠
32461121	Peptide SMIM30 promotes HCC development by inducing SRC/YES1 membrane anchoring and MAPK pathway activation	J Hepatol	25.083	抗体定制	小鼠

WESTERN BLOT APPLICATION GUIDE

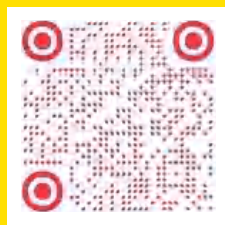
PMID	标题	期刊名称	影响因子	产品类型	引用货号/物种
32735848	A Bacterial Effector Protein Hijacks Plant Metabolism to Support Pathogen Nutrition	Cell Host Microbe	21.023	抗体定制	烟草
32994405	The cross-talk between methylation and phosphorylation in lymphoid-specific helicase drives cancer stem-like properties	Signal Transduct Target Ther	18.187	抗体定制	人
32296027	CDK4/6 inhibition blocks cancer metastasis through a USP51-ZEB1-dependent deubiquitination mechanism	Signal Transduction and Targeted Therapy	18.187	抗体定制	人
31422874	Naa10p Inhibits Beige Adipocyte-Mediated Thermogenesis through N- α -acetylation of Pgc1 α .	Molecular cell	17.97	抗体定制	小鼠
31110366	Oxidization of TGF β -activated kinase by MPT53 is required for immunity to Mycobacterium tuberculosis.	Nature microbiology	17.745	抗体定制	小鼠
33619562	The human tRNA taurine modification enzyme GTPBP3 is an active GTPase linked to mitochondrial diseases.	Nucleic Acids Res	16.971	抗体定制	人
33176558	A VAST-domain protein regulates autophagy, membrane tension, and sterol homeostasis in rice blast fungus	Autophagy	16.016	抗体定制	稻瘟病菌
25814387	Suppressor of Deltex mediates Pez degradation and modulates Drosophila midgut homeostasis.	Nat Commun	14.919	抗体定制	果蝇
30833710	In rose, transcription factor PTM balances growth and drought survival via PIP2;1 aquaporin	Nature plant	13.256	抗体定制	月季
31075443	Translational Regulation of Plant Response to High Temperature by a Dual-Function tRNA His Guanylyltransferase in Rice	Molecular Plant	13.164	抗体定制	水稻
30914468	OsSHI1 Regulates Plant Architecture Through Modulating the Transcriptional Activity of IPA1 in Rice	Plant cell	11.277	抗体定制	水稻
30923230	Rice qGL3/OsPPKL1 Functions with the GSK3/SHAGGY-Like Kinase OsGSK3 to Modulate Brassinosteroid Signaling	Plant cell	11.277	抗体定制	水稻
31530735	Intra-Kernel Reallocation of Proteins in Maize Depends on VP1-Mediated Scutellum Development and Nutrient Assimilation	Plant cell	11.277	抗体定制	玉米
30962394	Maize VKS1 Regulates Mitosis and Cytokinesis during Early Endosperm Development	Plant cell	11.277	抗体定制	玉米
32155285	miR-210 participates in hepatic ischemia reperfusion injury by forming a negative feedback loop with SMAD4	Hepatology (Baltimore, Md.)	17.425	ELISA	RK00006
33305325	Entropy subspace separation-based clustering for noise reduction (ENCORE) of scRNA-seq data	Nucleic Acids Res	16.971	ELISA	RK00719
33009518	Targeting a positive regulatory loop in the tumor-macrophage interaction impairs the progression of clear cell renal cell carcinoma	Cell Death Differ	15.828	ELISA	RK00077
31924786	Arf1-mediated lipid metabolism sustains cancer cells and its ablation induces anti-tumor immune responses in mice	Nature Communications	14.919	ELISA	RK01574
34678143	Glycogen accumulation and phase separation drives liver tumor initiation	Cell	41.582	NGS	RK20351,RK20303
33523829	Abnormal neocortex arealization and Sotos-like syndrome-associated behavior in Setd2 mutant mice	Sci Adv	14.136	NGS	RK20202,RK20282
31585088	Integrated Proteogenomic Characterization of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma	Cell	41.582	分子酶	RK20400
32017896	LARP7-Mediated U6 snRNA Modification Ensures Splicing Fidelity and Spermatogenesis in Mice	Molecular Cell	17.97	分子酶	RK20400
33473107	Endonuclease G promotes autophagy by suppressing mTOR signaling and activating the DNA damage response	Nat Commun	14.919	分子酶	RK20400,RK21203
32867860	Bradymonabacteria, a novel bacterial predator group with versatile survival strategies in saline environments	Microbiome	14.65	分子酶	RK21203
32789178	NuRD mediates mitochondrial stress-induced longevity via chromatin remodeling in response to acetyl-CoA level	Sci Adv	14.136	分子酶	RK21020
33523838	N6-methyldeoxyadenine and histone methylation mediate transgenerational survival advantages induced by hormetic heat stress	Sci Adv	14.136	分子酶	RK20400,RK21203

为全球生命科学工作者提供更好的产品和服务
Empowering Global Life Science with Superior Products and Services

欢迎关注并与我们联系，ABclonal，您身边的实验专家！



爱博泰克科研号



爱博泰克实验加油站



爱博泰克线上商城



爱博泰克视频号



爱博泰克科研小助手