

Wes 实验条件优化



最重要的三点

- **一抗**

- 一个 **好的一抗** 做好免疫学实验的前提

- **样品浓度**

- **信号** 与 **样品浓度** 应该有 **线性** 关系

- **抗体稀释度**

- 不会造成 “有或无” 的结果
 - 与真实定量或重复性有关 (类似ELISA)
 - 优化好的抗体浓度应该是:
 - **足够高到饱和**
 - **背景足够低**

最重要的三点

- **一抗**

- 一个 **好的一抗** 做好免疫学实验的前提

- **样品浓度**

- **信号** 与 **样品浓度** 应该有 **线性** 关系

- **抗体稀释度**

- 不会造成“有或无”的结果
 - 与真实定量或重复性有关（类似ELISA）
 - 优化好的抗体浓度应该是：
 - **足够高到饱和**
 - **背景足够低**

所有利用抗体定
量的检测技术都
会涉及这三点

选择合适的抗体

- Simple Western 验证过的抗体

- ProteinSimple 抗体数据库
- 文献

} 搜索
[ProteinSimple.com](https://www.proteinsimple.com)

- 传统 Western 用过的抗体

- 与传统 Western 选择的抗体标准类似
 - 稀释度越高越好（说明抗体效价高）
 - 应用越广泛越好（说明抗原表位容易接近）

- 与传统Western和ELISA类似，**越多备选一抗越好**

抗体浓度

- Wes 需要的抗体浓度更高，但体积更少，所以总体用量与传统 Western 相当
- 如果推荐用于传统 Western 的浓度：则用比推荐浓度高 100 倍, 20 倍, 4 倍来摸索条件
 - 例如，传统 Western 推荐浓度 1:1000, 则 Wes 浓度为 1:10, 1:50, 1:250
- 如果没有浓度推荐，可用 1:10, 1:50 和 1:250 或 50 μ g/mL, 10 μ g/mL, 2 μ g/mL

样品制备和蛋白定量

- Wes 样品制备条件
 - 默认条件：1% SDS, 5min, 95°C
 - 可能需要调整
 - 较低的变性温度
 - 较短的变性时间
 - 不同的裂解液 (变性剂)
- 有任何疑问，请依照传统Western的样品制备方法
- 总蛋白定量
 - 推荐染料法测定试剂盒（如BCA或Bradford）

小贴士:

蛋白裂解液如有特殊成分，请参阅我们的<[Simple Western Buffer Compatibility Table](#)>

样品终浓度

没有做过 Western

– 细胞/组织裂解物（内源性）：

- 0.02 mg/mL, **0.2 mg/mL**, 2 mg/mL

mg/mL



– 过表达细胞裂解物：

- 0.005 mg/mL, **0.05 mg/mL**, 0.5 mg/mL

– 重组蛋白：

- 0.1 $\mu\text{g/mL}$, **1 $\mu\text{g/mL}$** , 10 $\mu\text{g/mL}$

$\mu\text{g/mL}$



注意：样本浓度最高不超过 2-3 mg/mL

样品终浓度

做过 Western

- 比传统Western终浓度高 **3倍** 作为起始浓度
- 从该浓度开始，依次稀释 **5倍**
 - 例如传统 Western 上样浓度是 0.33mg/mL
 - Simple Western 相应浓度 (/每孔)
 - 1mg/mL (3X)
 - 0.2mg/mL (0.6X)
 - 0.04mg/mL (0.12X)

Wes 上的第一次实验设计

第一次 Wes 实验原则

第一次实验 的目的是确定最佳的样本/抗体浓度，
为以后的实验做准备

对于每一个新抗体

1. **必须**测试 3 种抗体稀释度（最高浓度 1:5）
2. 最好测试 3 种样品浓度
3. 设定无样品对照
4. 设定阳性对照（阳性样本+阳性抗体）
5. 使用默认 Wes 程序

Simple Western 优化模板介绍



Simple Your Western It's time!

