



bio-~~t~~echne®

SIMPLE WESTERN 高级实验优化

王娴婷 FAS

Tel: (+86) 185-1660-6926

E-mail: xianting.wang@bio-techne.com

PROTEIN SIMPLE -- 创新蛋白质分析技术专家



Jess/Abby/Wes
全自动 Western



FluorChem
多功能成像



Ella
微流控全自动 ELISA



Milo
单细胞 Western



MFI
微流成像颗粒计数分类仪



Maurice
CE-SDS + icIEF 双功能 CE

MEET SIMPLE WESTERN

JESS ABBY WES

超微量样品+自动化+定量



GEL-RUNNING AUTO
BLOT-FREE

TRANSFER-FREE
HANDS-FREE



原理及优势



数据分析

高级实验优化



01

影响结果的因素



02

优化思路



03

优化方法



影响结果的因素



优化思路



优化方法

I. 一抗

- 一个 **好的一抗** 是做好免疫学实验的前提

II. 样品浓度

- **信号** 与 **样品浓度** 应该有 **线性** 关系

III. 抗体稀释度

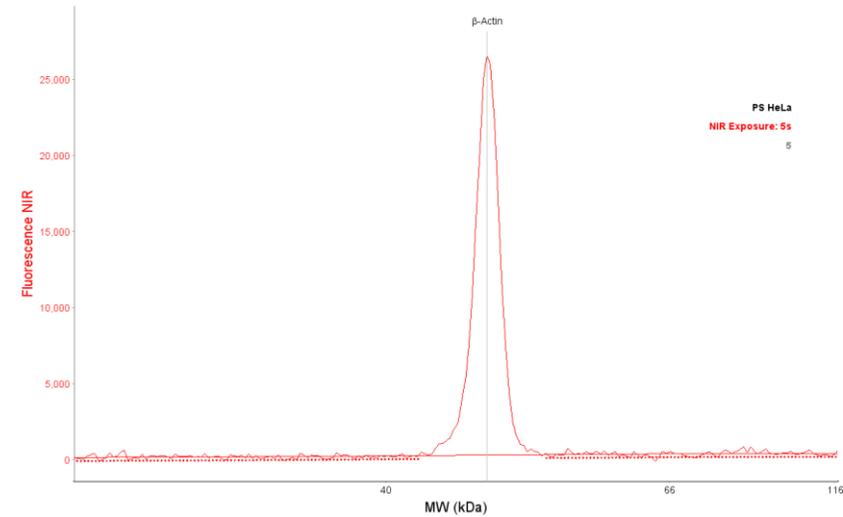
- 不会造成 “有或无” 的结果
- 与真实定量或重复性有关
- 优化好的抗体浓度应该是:
 - **足够高到饱和**
 - **背景足够低**

所有利用抗体定量的检测技术
都会涉及这三点

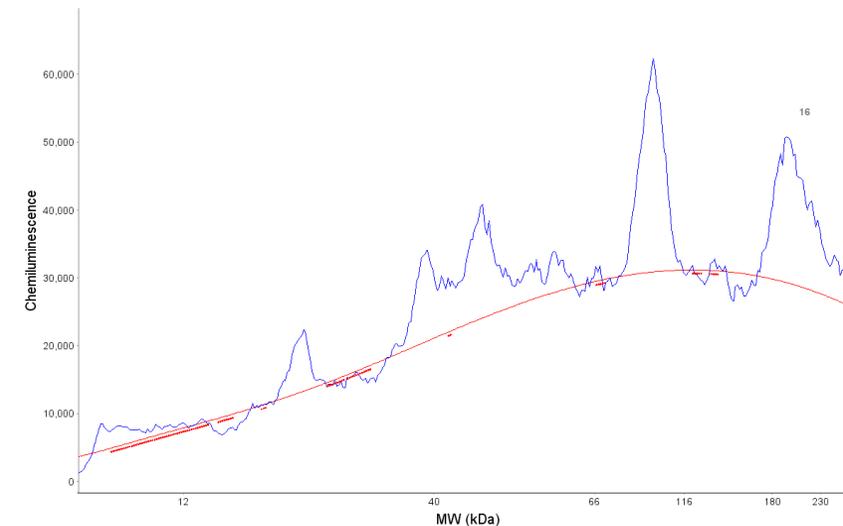
I. 一抗

免疫检测结果依赖于抗体质量

- 一个好的一抗:
 1. 高信噪比
 2. 低背景
 3. 条带符合预期
- 一个不好的一抗:
 1. 高背景
 2. 非特异条带
- 如果背景高:
 1. 测试新的一抗
 2. 测试不同的封闭液



背景 = ~300



背景 = ~30,000

I. 一抗

a) 一抗的选择对于一个好的免疫测定试验至关重要

- 抗体不好，免疫检测的结果也不会好

b) 寻找合适的抗体

- 寻找适用于 Simple Western 的抗体
- 寻找能在多种免疫测定中使用的抗体 (WB/IP)
- 筛选一种以上的抗体

ProteinSimple 抗体库:

<http://proteinsimple.com/antibody/antibodies.html>

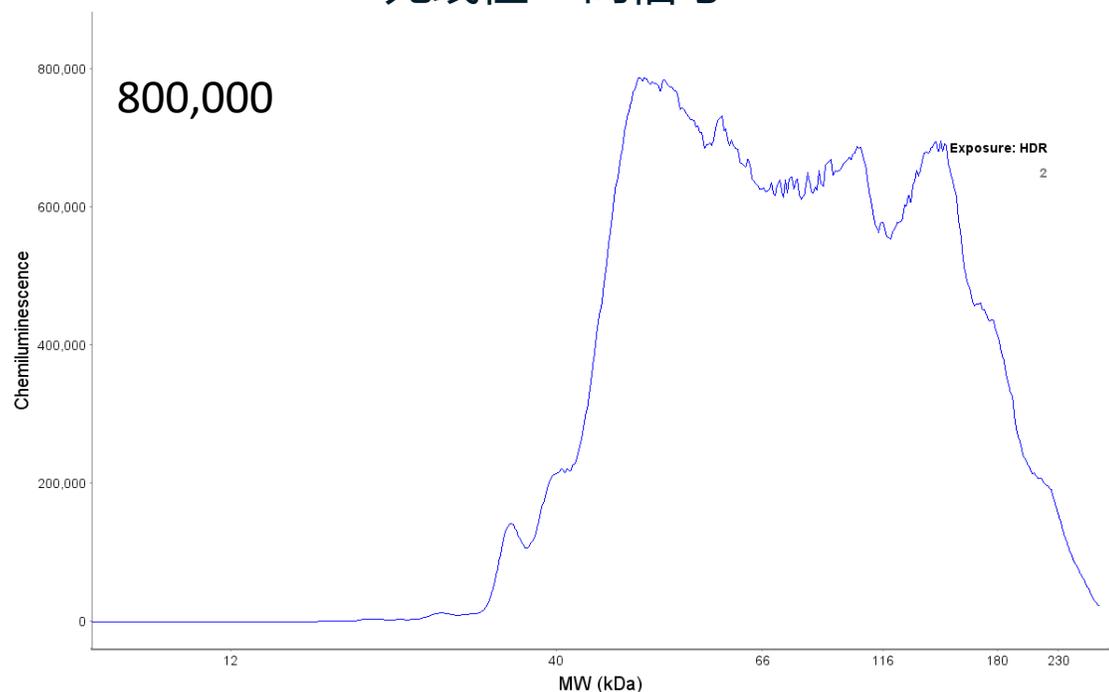
The screenshot shows the ProteinSimple website's antibody database interface. At the top, there is a navigation bar with links for ABOUT, PRODUCTS, APPLICATIONS, LEARN, SUPPORT, CONTACT, and SHOP. Below the navigation bar, the main heading reads "Simple Western antibody database" with a sub-heading "Get Simple Western Certified Abs from Novus Biologicals and R&D Systems too!". There are logos for SIMPLE WESTERN, R&D SYSTEMS, and NOVUS. A search bar is present with a "Go" button and a "Reset" button. Below the search bar, there are buttons for "Show All" and "Submit New Antibody". A pagination bar shows "Page: << 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 >>". Below the pagination bar is a table of antibody results.

Protein Target ▲	Antibody Type	Vendor	Product Number	Protein Isoform	Species	Cell Model(s)	Separated by Size or Charge	Dilution	kDa on Simple Western	Matrix
14-3-3 γ	Primary	Novus Biologicals	NBP2-27202	14-3-3 gamma (γ)	Rabbit polyclonal	Human Brain lysate 0.5 mg/ml	Size-Jess/Wes, Sally Sue/Peggy Sue	1:50	33 kDa	12-230 kDa
14-3-3 γ	Primary	Novus Biologicals	NBP2-27370	14-3-3 gamma (γ)	Rabbit Polyclonal	Human Brain lysate 0.5 mg/ml	Size-Jess/Wes, Sally Sue/Peggy Sue	1:10	34 kDa	12-230 kDa

II. 样品浓度

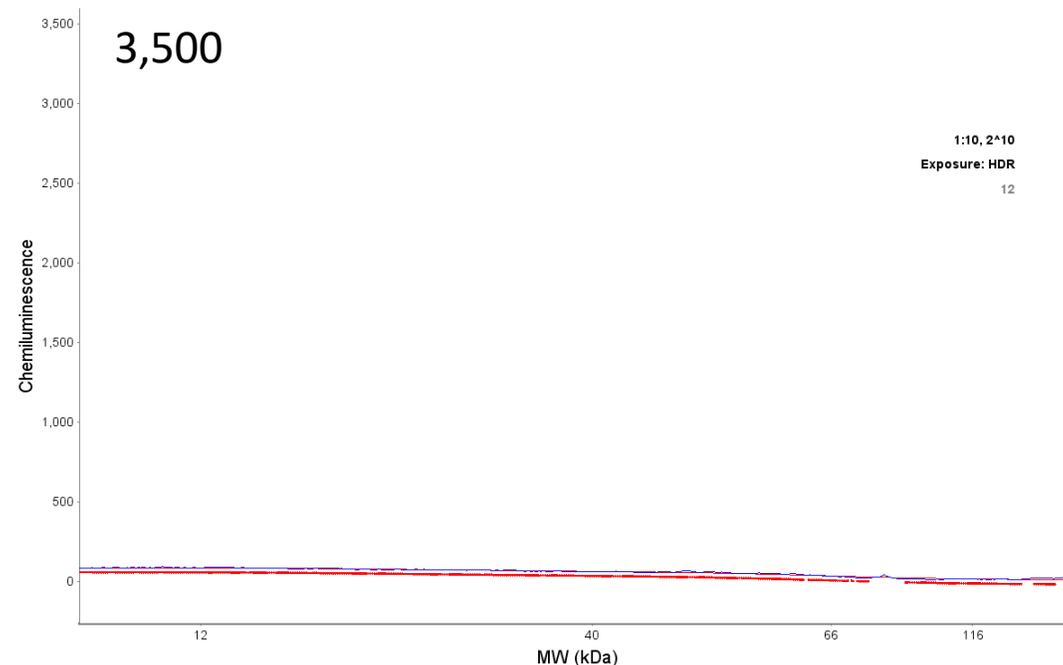
过量或过少的上样导致结果不好

无线性 - 高信号



- 峰情况反常 (本该是一个条带)
- 峰变宽
- 信号值高

无线性 - 低信号

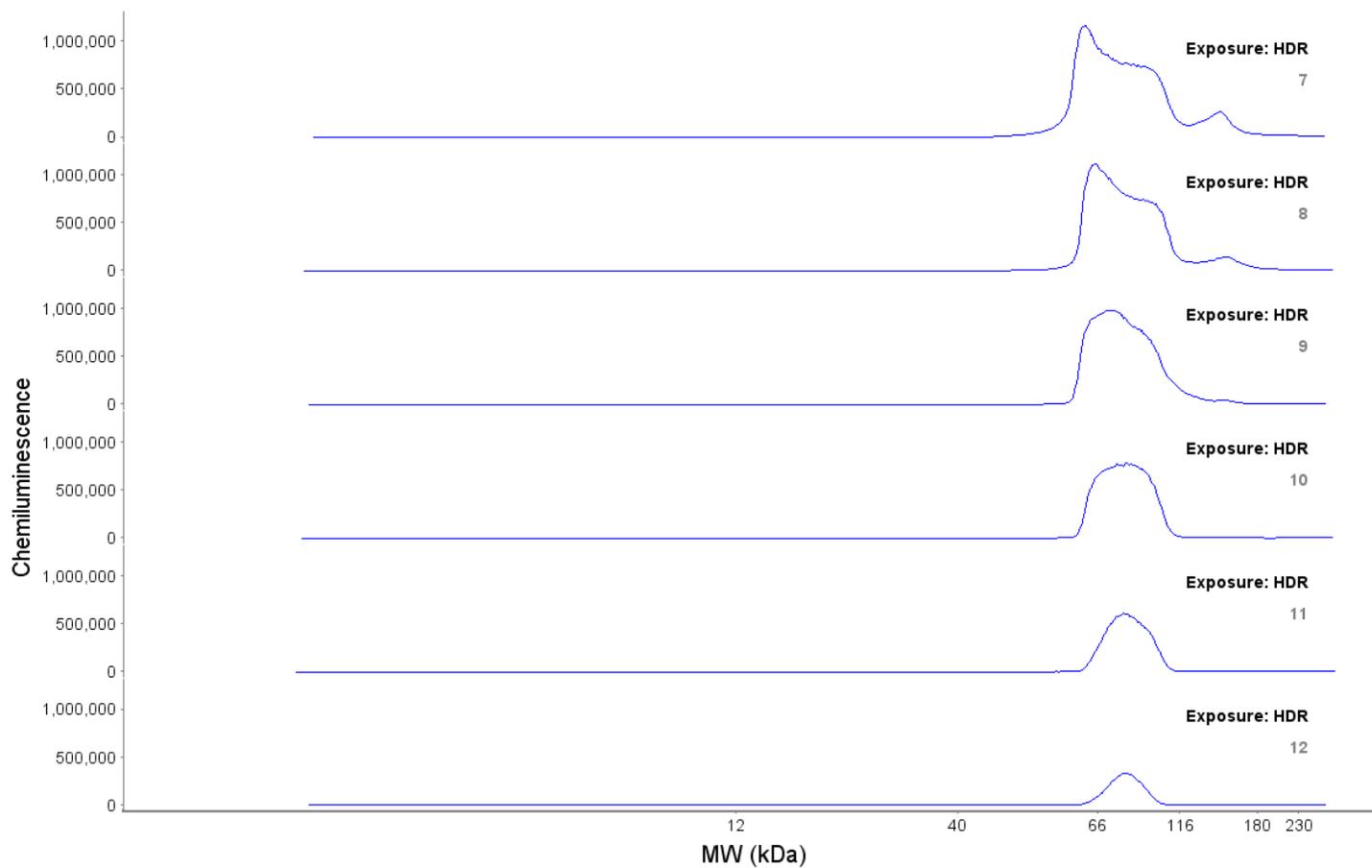
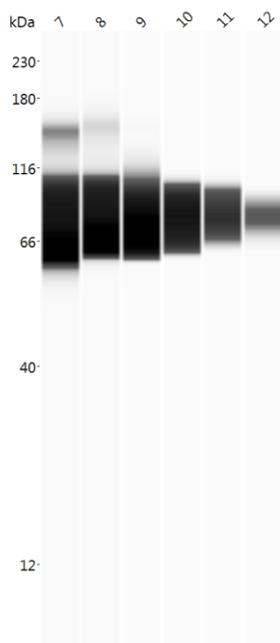


- 未检测出峰
- 背景相对较低

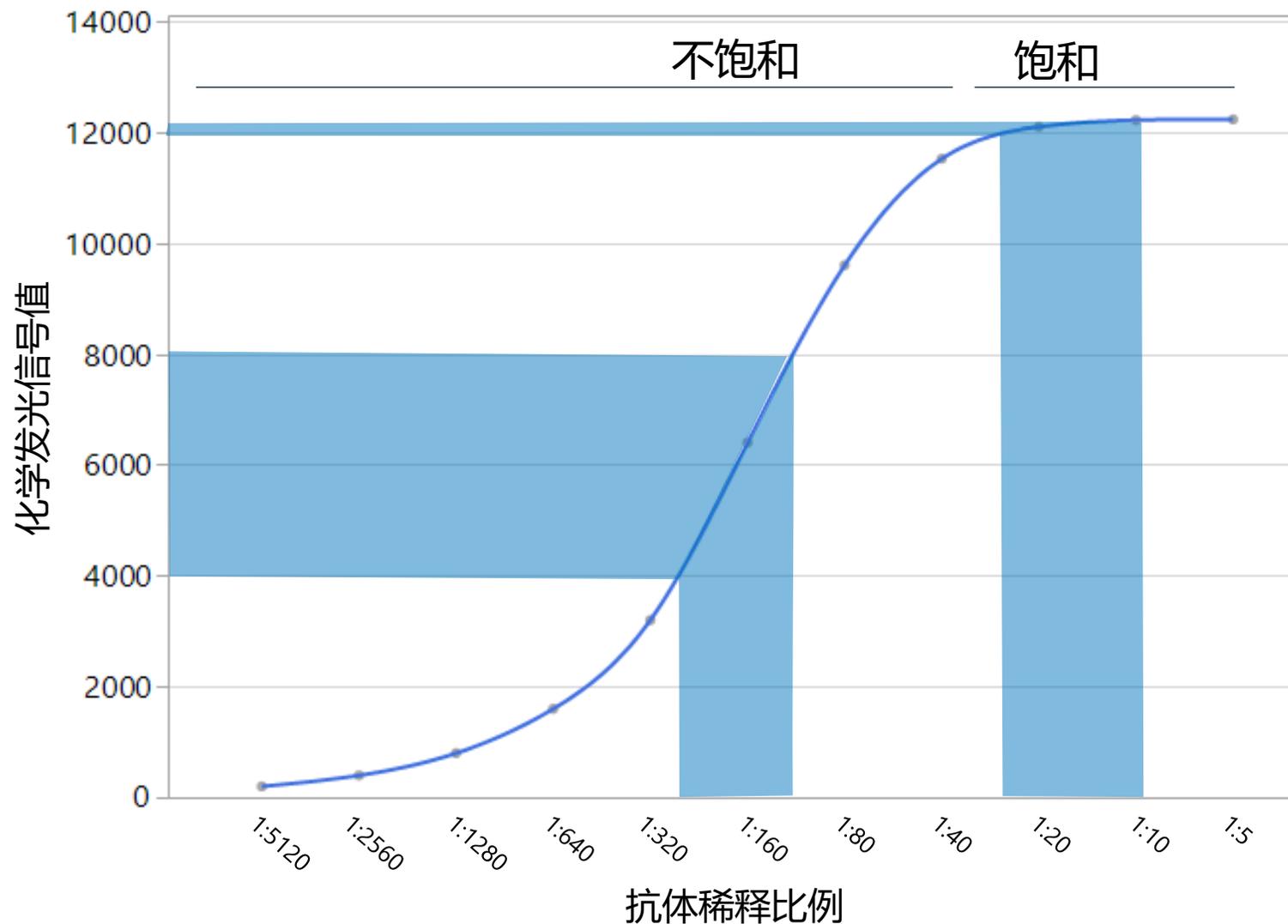
II. 样品浓度

样品需梯度稀释以确定线性范围

- 梯度稀释样品确定线性范围
- 信号“恢复”成单独的峰



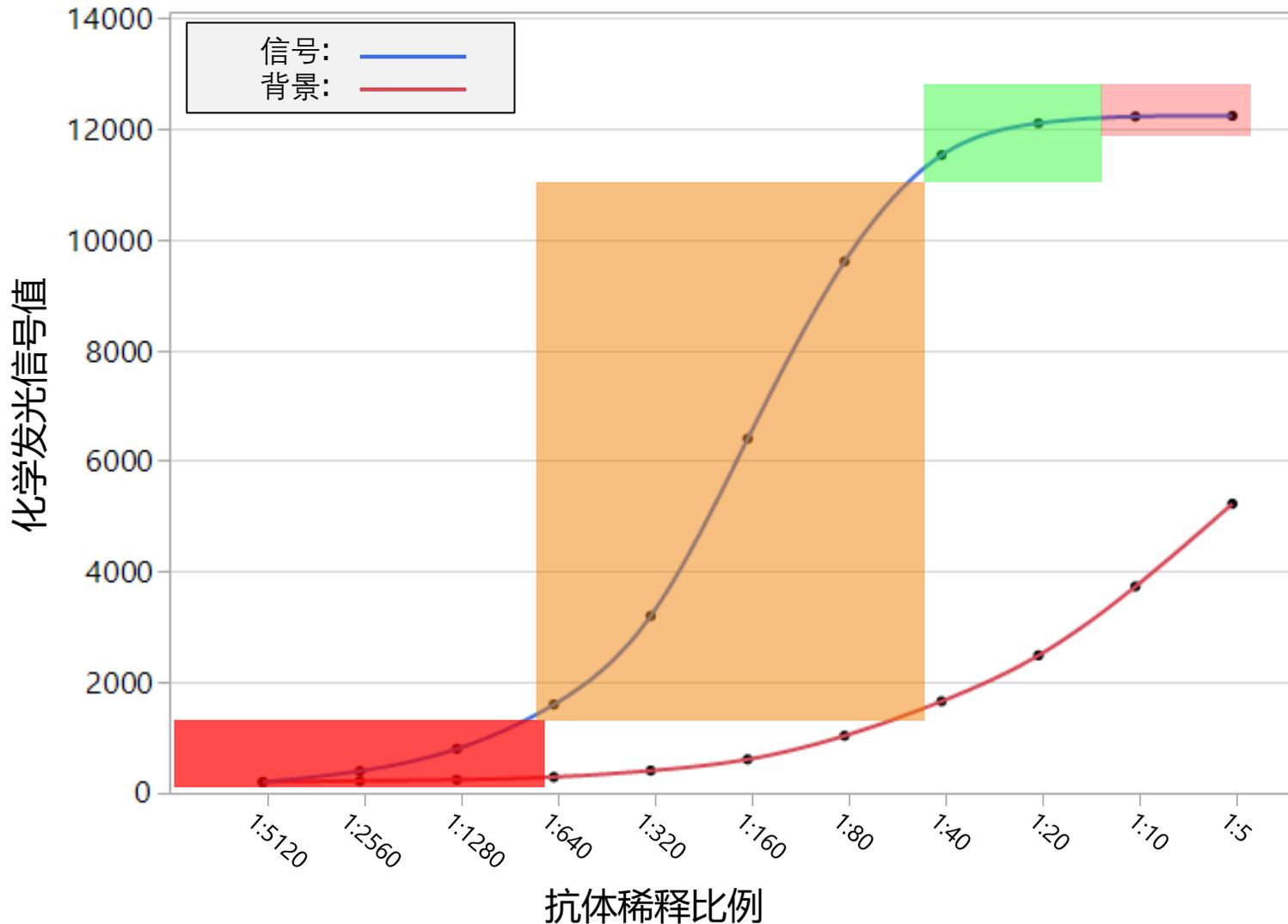
III. 抗体稀释度



抗体不饱和的免疫测定
会导致重复性不好

- 抗体不饱和，导致检测精确度不好
- 一旦您的抗体饱和，生物学重复的变异系数将大大降低

III. 抗体稀释度



- 优化好的抗体浓度:
 - 足够高到饱和
 - 不能太高导致背景提高
- 抗体浓度避免落在低浓度区间 (红色区) 以及指数期 (橙色区)
- 注意当抗体浓度太高, 可能会导致高背景 (浅红色区)
- **平台期的前端是最理想的浓度 (绿色区)**



影响结果的因素



优化思路



优化方法

- I. 信号灵敏度
- II. 重现性
- III. 免疫检测
- IV. 微调运行参数

I. 信号灵敏度

三种因素可以提高信号强度:

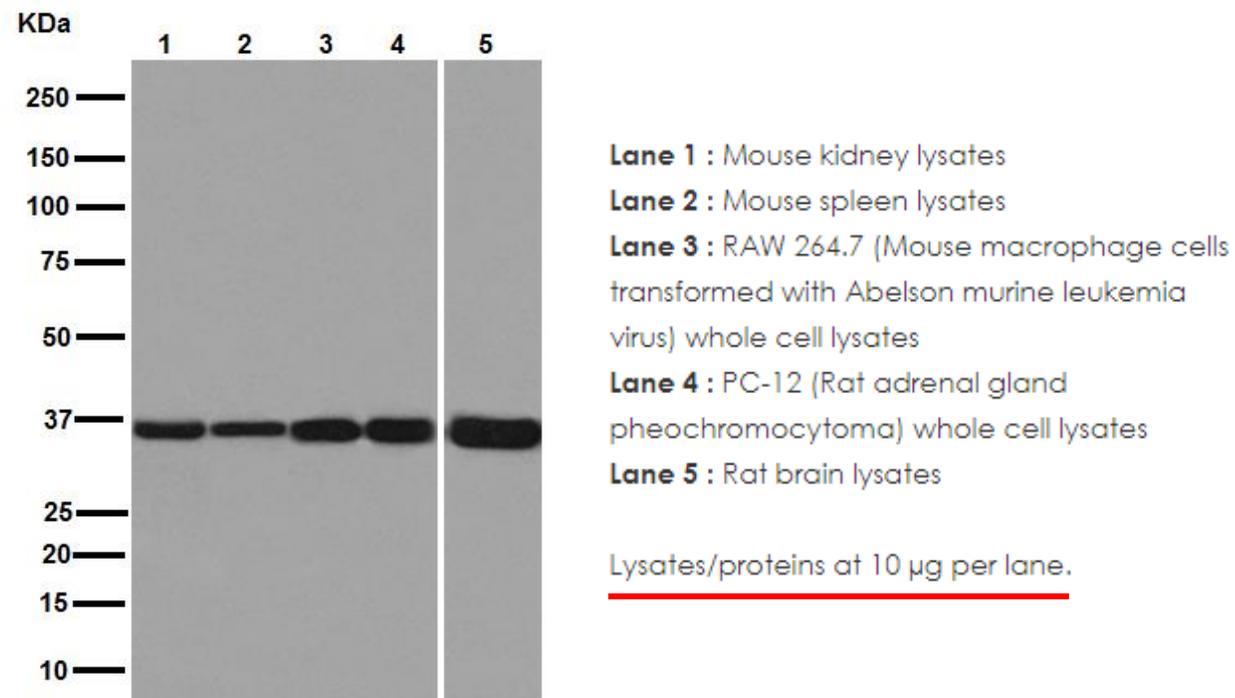
- 样品因素:
 - 增加最终蛋白的浓度
 - 考虑先进行样品免疫沉淀
- 抗体因素:
 - 增加抗体浓度
 - 考虑信号放大: 生物素化二抗+ strep-HRP
 - 考虑不同的抗体品牌
- 运行参数:
 - 增加样品上载时间
 - 增加抗体孵育时间

II. 重现性

变异系数来源于多个方面

- 移液误差 (小体积!)
- 不同人员
- 稀释方式
 - 梯度稀释 vs. 直接稀释
- 裂解液的蛋白定量
- 样品间的生物学重复
- 抗体不饱和
- 试剂
 - 抗体不同批次
 - 保存条件
- 定量方法
- 仪器使用+耗材

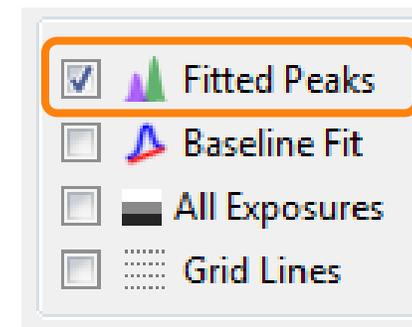
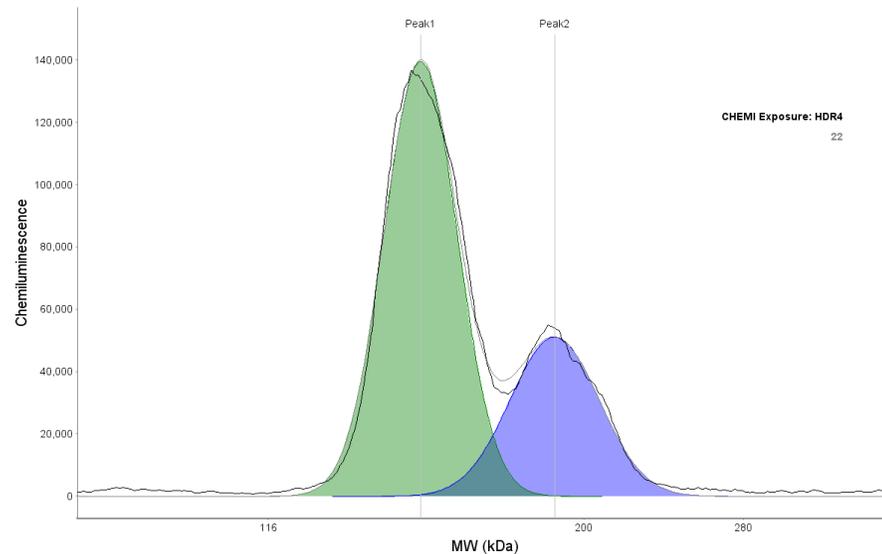
Abcam GAPDH 抗体 [EPR16891]



II. 重现性

Compass for SW 软件默认用高斯拟合 Gaussian fits

1. 确保软件正确识别并拟合每个峰
2. 确保拟合峰和实际峰形吻合



II. 重现性

System Control 在荧光 Master Mix 中

- System Control 蛋白可帮助减少实验误差

042-196

[Buy Online](#)

10X System Control Primary Antibody-Rabbit

To be used with rabbit primary antibody to Antibody Diluent. Detects system controls. Match with Standard pack 1, 2, 3 or 4 (250 µl/vial)

042-191

[Buy Online](#)

10X System Control Primary Antibody-Mouse

To be used with mouse primary antibody to Antibody Diluent. Detects system controls. Match with Standard pack 1, 2, 3 or 4 (250 µl/vial)

- 不同规格技术重复的 CV 水平

DESCRIPTION	TOTAL PROTEIN SPECIFICATION	CHEMILUMINESCENCE SPECIFICATION	FLUORESCENCE SPECIFICATION	PROTEIN NORMALIZATION SPECIFICATION
Sizing CV		<10%		
Intra-assay CV		<15%		<20%
Inter-assay CV		<20%		N/A

III. 免疫检测

样品制备也会影响实验结果

- 默认 Wes/Jess 样品处理条件:
 - 40mM DTT (还原), 1% SDS, 95°C 加热 5 mins
- 根据目的蛋白属性调整处理条件: 如 更低的温度, 或者更长/短的加热时间
- 参照文献里报道的目的蛋白在传统 WB 上的处理条件
- 不同的裂解液, 参照裂解液兼容性表, 或者在线网址: <https://proteinsimple.docebosaas.com>

**Simple Western Size Assay Buffer Compatibility
(Wes, Sally Sue, and Peggy Sue)**



Lysis Buffer Compatibility Table

LYSIS BUFFER	USAGE	VENDOR & CATALOG	RANGE TESTED	CHEMI SIGNAL	CHEMI RESOLUTION	FLUORESCENT STANDARDS/ MW SIZING	RECOMMENDATIONS
--------------	-------	------------------	--------------	--------------	------------------	----------------------------------	-----------------

III. 免疫检测

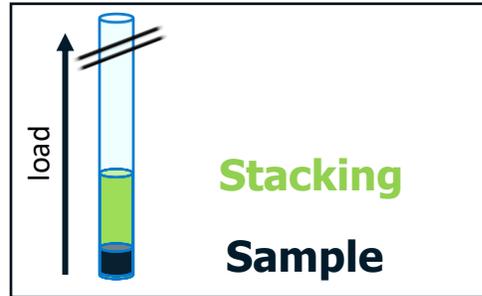
合理的对照可帮助评估免疫实验

类型	目的	如何:
无一抗	确定二抗和样品的非特异结合情况	用封闭液替代一抗
0.1X Buffer + FL Master Mix (无样品)	确定一抗和荧光内参等是否有非特异性结合	用0.1X Sample Buffer + 1X FL master mix 替代样品
无生物素标记试剂(总蛋白检测试剂盒)	确定在细胞或组织裂解液中是否有内源性类生物素分子	用 Antibody Diluent 替代生物素化的试剂
重组蛋白	确定目的蛋白的分子量, 最小化细胞/组织裂解物背景复杂性	使用约 50-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度
过表达细胞裂解液	确定目标峰	转染后的细胞裂解液, 作为阳性对照.
野生型 Vs 基因敲除样品	确定目标峰	调节目标蛋白对应的 RNA 转录水平, 然后作为阴性/阳性对照。
血浆/血清加标	检测临床样品前, 确定血浆/血清中目的蛋白的检测可行性	获得纯的重组目标蛋白, 与血清进行不同比例(如: 10, 20, 40% 等).混合后检测

IV. 微调运行参数

通过调整浓缩胶和样品的上载时间来增强信号或提高分辨率

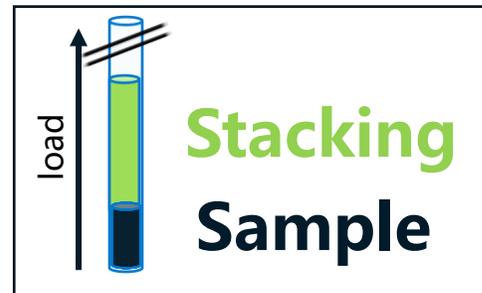
默认上载



默认上载

- 样本和浓缩胶的上样时间固定

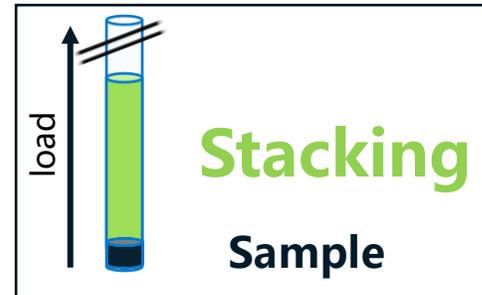
增加信号



增加浓缩胶和样品上载量

- 用于增强信号
- 保持 Stacking/Sample 比例不变

增加分辨率



仅增加浓缩胶上载量

- 增加峰的锐利度和分辨率
- 保持默认样品上载量



影响结果的因素



优化思路



优化方法

优化方法

I. 定性

II. 定量

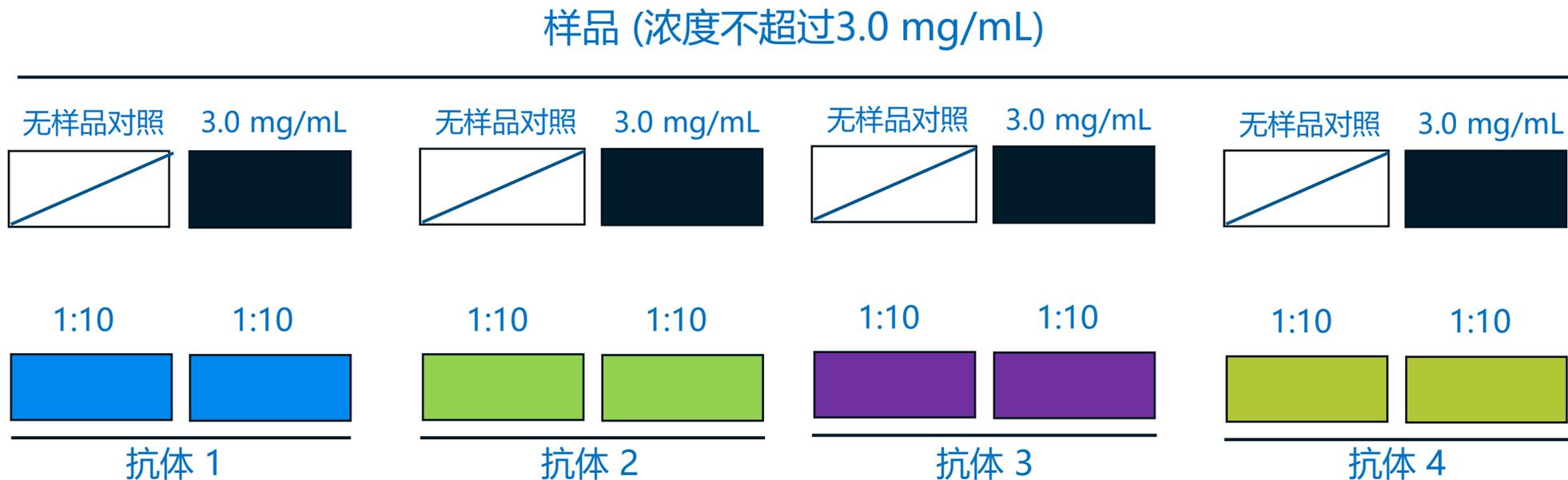
III. 多因子检测

I. 定性

一般推荐简单的抗体筛选来优化 **定性** 实验

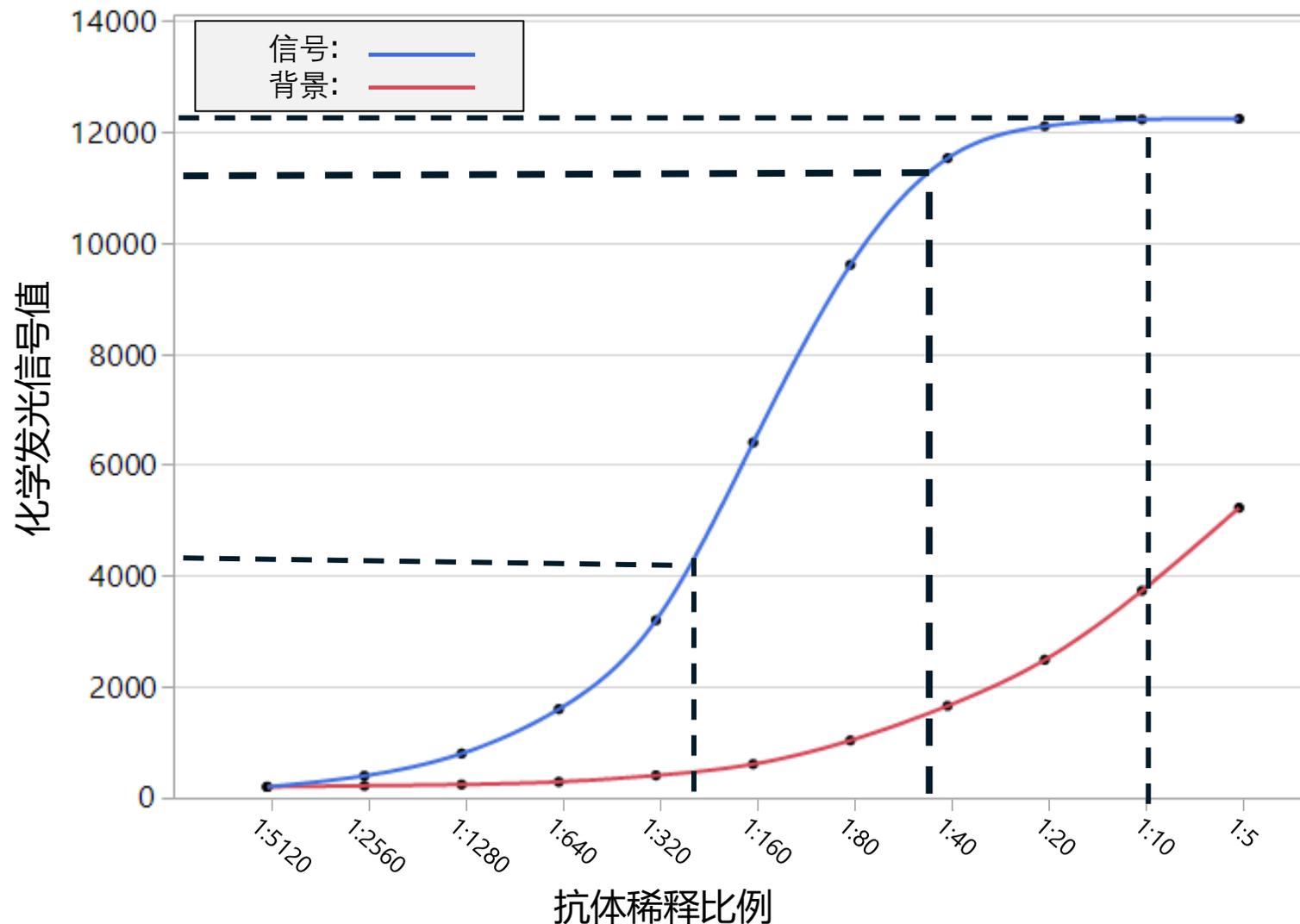
- 筛选新抗体时，尝试高的抗体浓度
 - **1:10** 或者 **1:50**
- 如果做过传统 western blot，测试 **100倍** 或者 **20倍** 于传统 WB 的浓度。
 - 如果传统 WB 使用 1:2000 的抗体稀释度
 - 在 Simple Western 上尝试 1:20 (100x) or 1:100 (20x) 的抗体浓度。
- 此外增加一个 “无样品对照” 测试抗体背景
- 使用高的样品浓度 (不超过 3 mg/mL)

I. 定性



- 测试多种抗体的目的 (最多12 种抗体)
- 每种抗体用量不超过 2 μ L
 - 如果抗体浓度为1:50, 则抗体用量不超过1ul
- 无样品对照用于测试抗体背景

II. 定量



至少需要摸索 3 个抗体浓度

- 为了确定抗体饱和浓度,
 - 至少需要测试3种抗体浓度, 观察曲率
 - 抗体浓度跨度区间需要合适

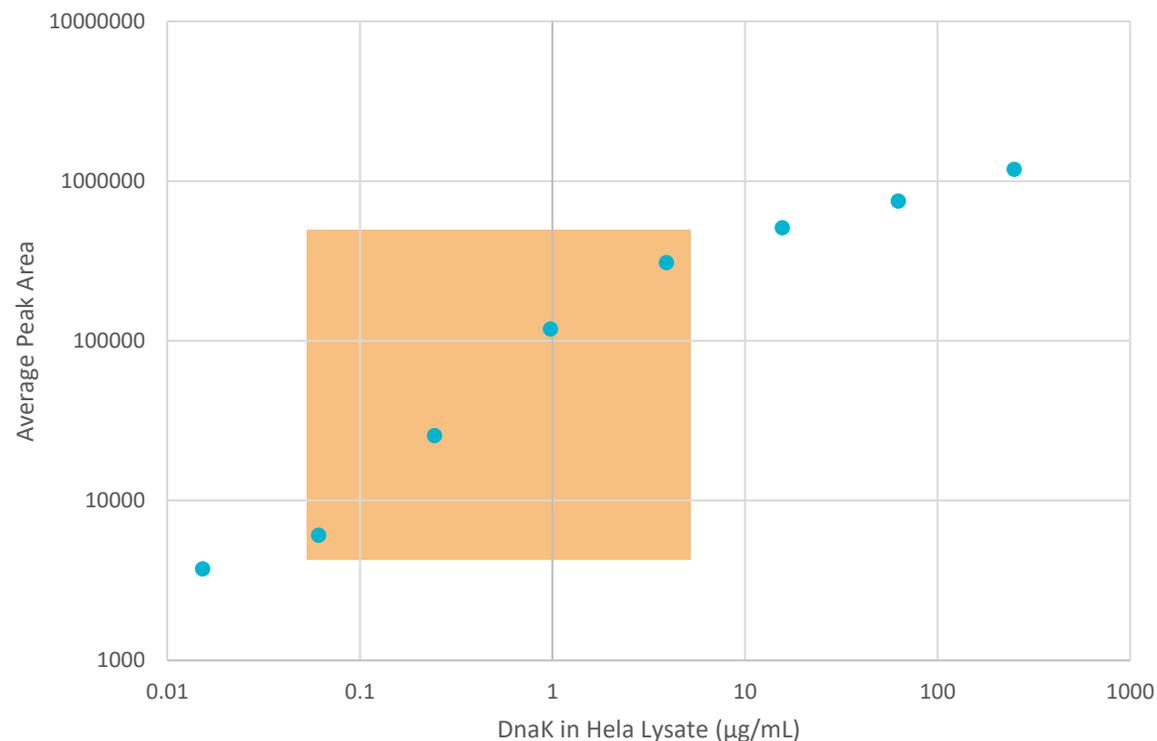
II. 定量

一抗 5 倍梯度稀释可帮助确定抗体是否饱和

- 对于大部分抗体，测试 **1:10, 1:50, 和 1:250** 三种稀释倍数
 - 或者 **100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$** 三种不同抗体浓度
- 或者，如果您的抗体在传统 WB 上工作过，稀释倍数大于1000
 - **测试 100倍, 20倍, 4倍** 于传统 WB 的抗体浓度
 - 例如，在传统 WB 中稀释倍数为 1:2000, 在Simple Western 条件摸索中，尝试 1:20, 1:100, 和 1:500 三种抗体浓度

II. 定量

动态范围 ~ 4.2 log



确定线性范围对于定量试验来说同样重要

样品浓度需要令目标蛋白浓度落在定量线性范围内

理想情况下, 落在橙色区间

Jess 上梯度稀释- DnaK, NIR

II. 定量

样品4倍梯度稀释能帮助确认样品的定量线性区间

- 常用细胞/组织裂解液浓度:

- 2.00 mg/mL

- 0.50 mg/mL

- 0.125 mg/mL

4倍稀释

4倍稀释

- 优化样品浓度之前，需要了解您研究的特殊需求

- 其它样品的摸索浓度：

- 表达丰度高的细胞裂解液

- 0.5 mg/mL

- 0.1 mg/mL

- 0.02 mg/mL

- 重组蛋白，纯化后的蛋白

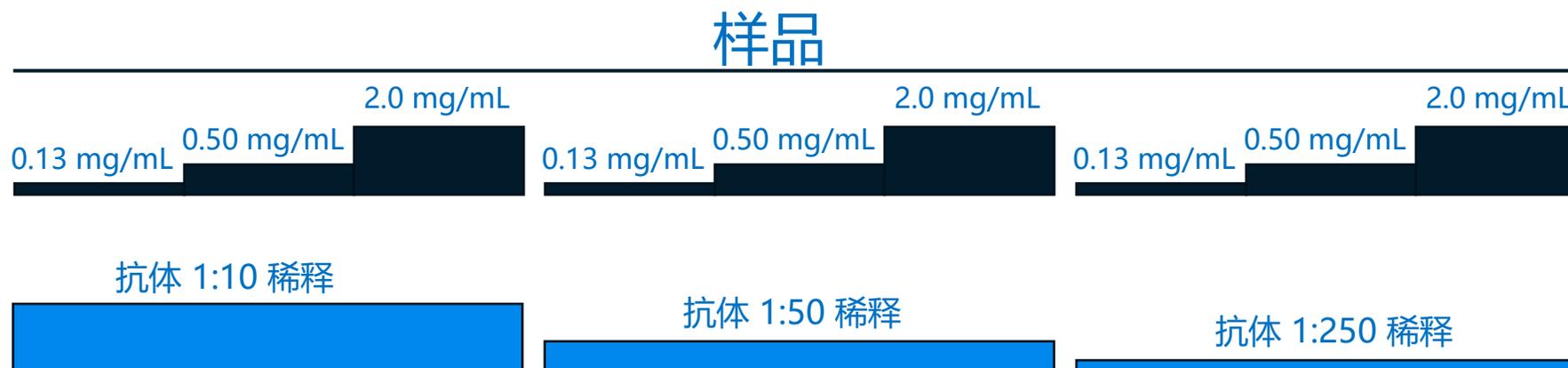
- 10 µg/mL

- 2.0 µg/mL

- 0.4 µg/mL

II. 定量

- 3 种抗体浓度 X 3 种样品浓度, 共 9 根毛细管

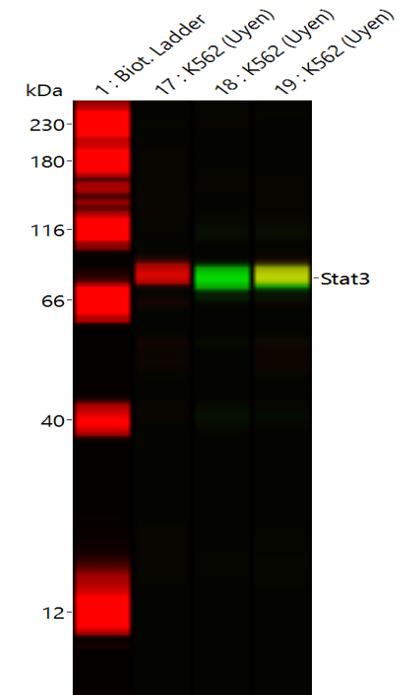
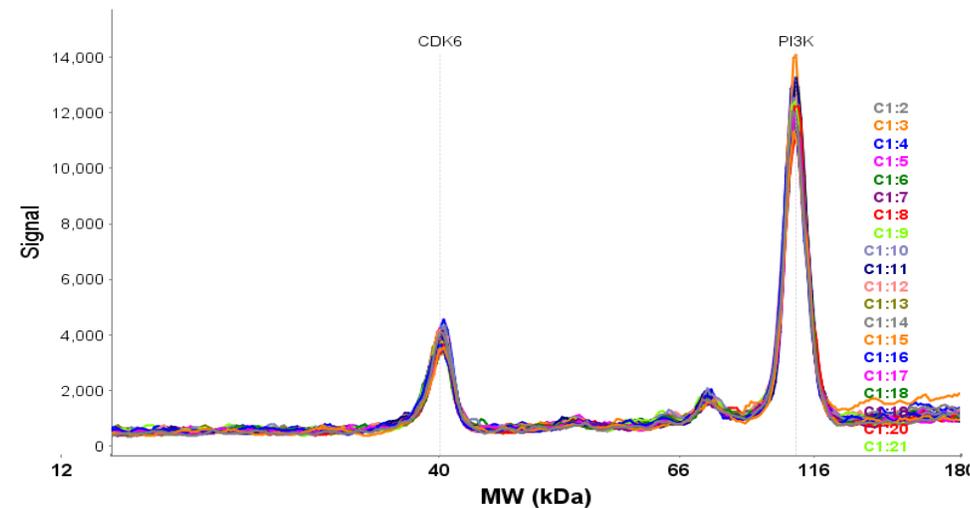
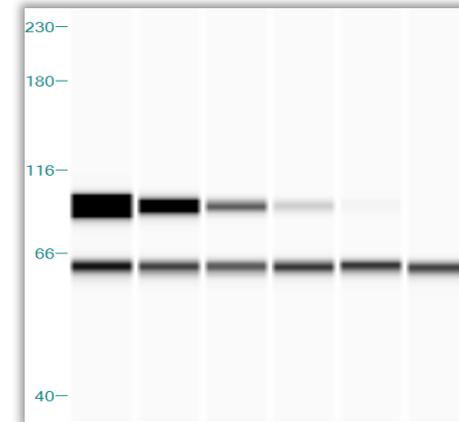


- 两个关键阴性对照
 - 无一抗对照 (测试样品和二抗的交叉反应情况)
 - 无样品对照 (测试一抗背景)
- 共 11 根毛细管, 25 根毛细管卡盒可优化 2 种样品和一抗

III. 多因子检测

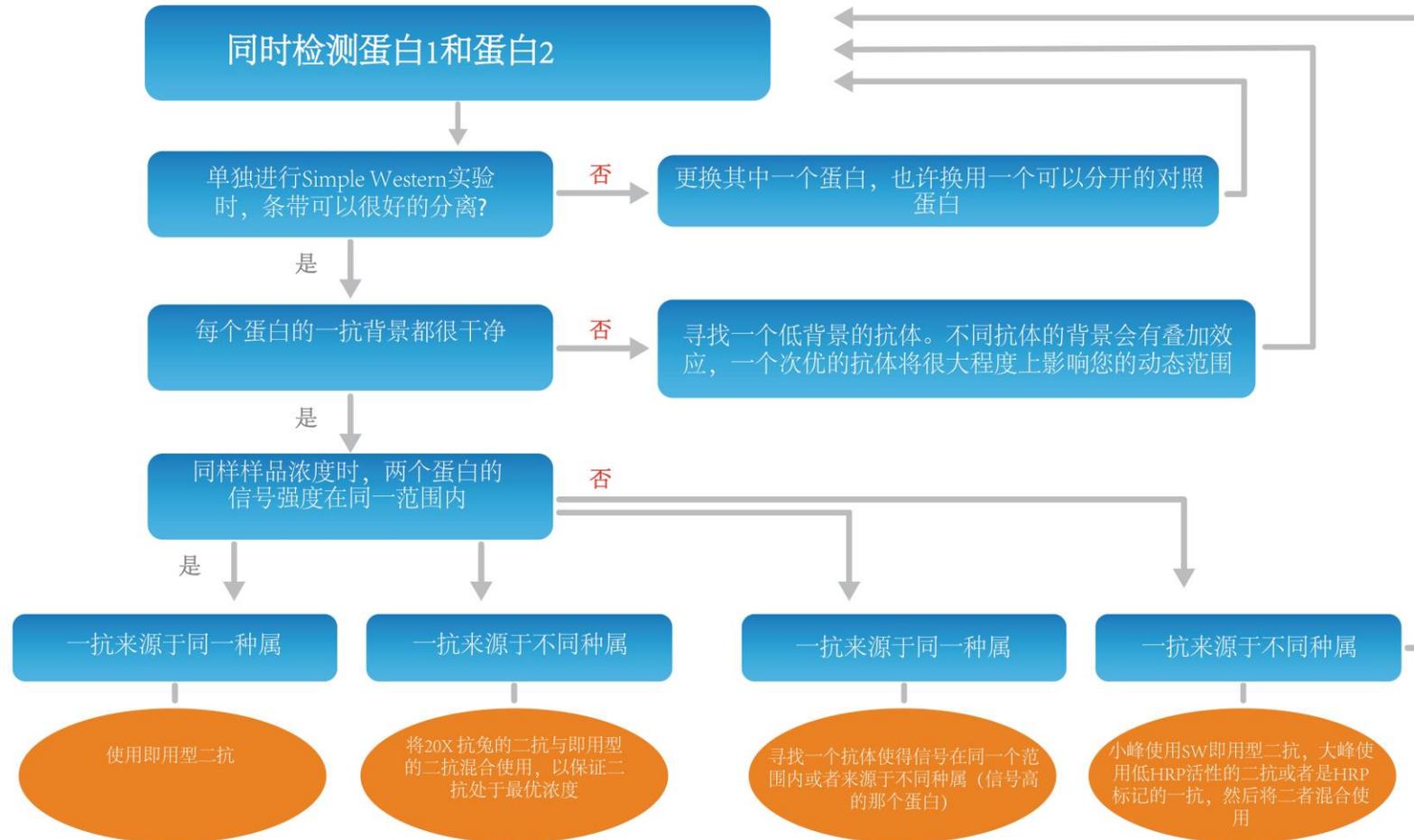
多因子检测需要考虑什么？

- 目标蛋白的分子量差异
- 各个目标蛋白独立进行过条件优化
- 单独靶标的背景
- 一抗种属
- 二抗种属



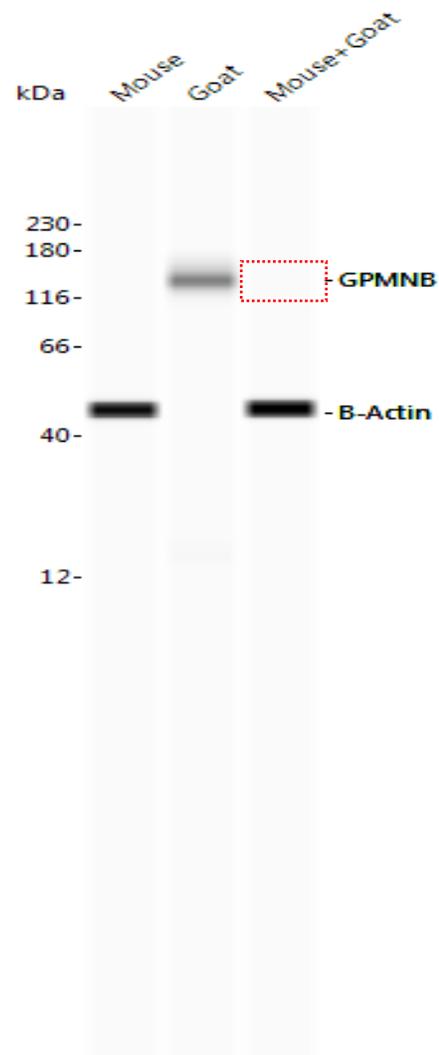
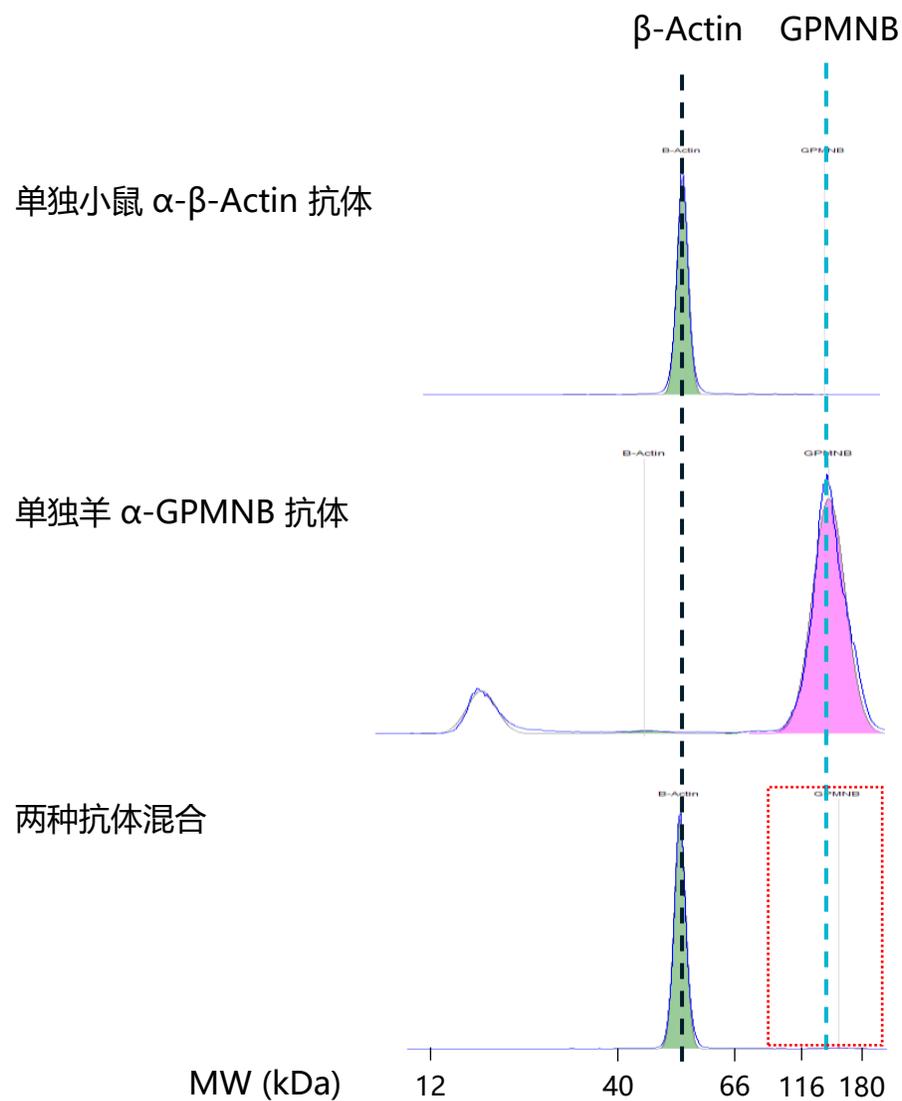
III. 多因子检测

化学发光多因子检测工作流程



摘自：“Multiplexing with Simple Western”

III. 多因子检测



多因子检测，
有些一抗混合时不兼容

III. 多因子检测

对于不同宿主来源一抗，一抗和二抗浓度饱和都很重要

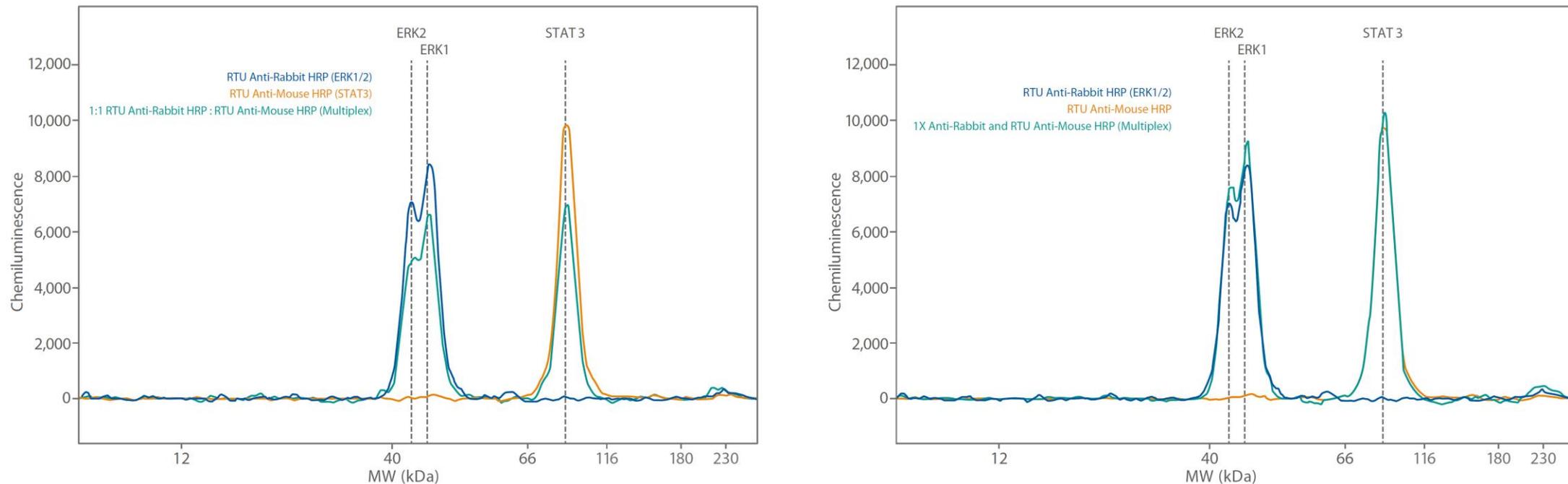


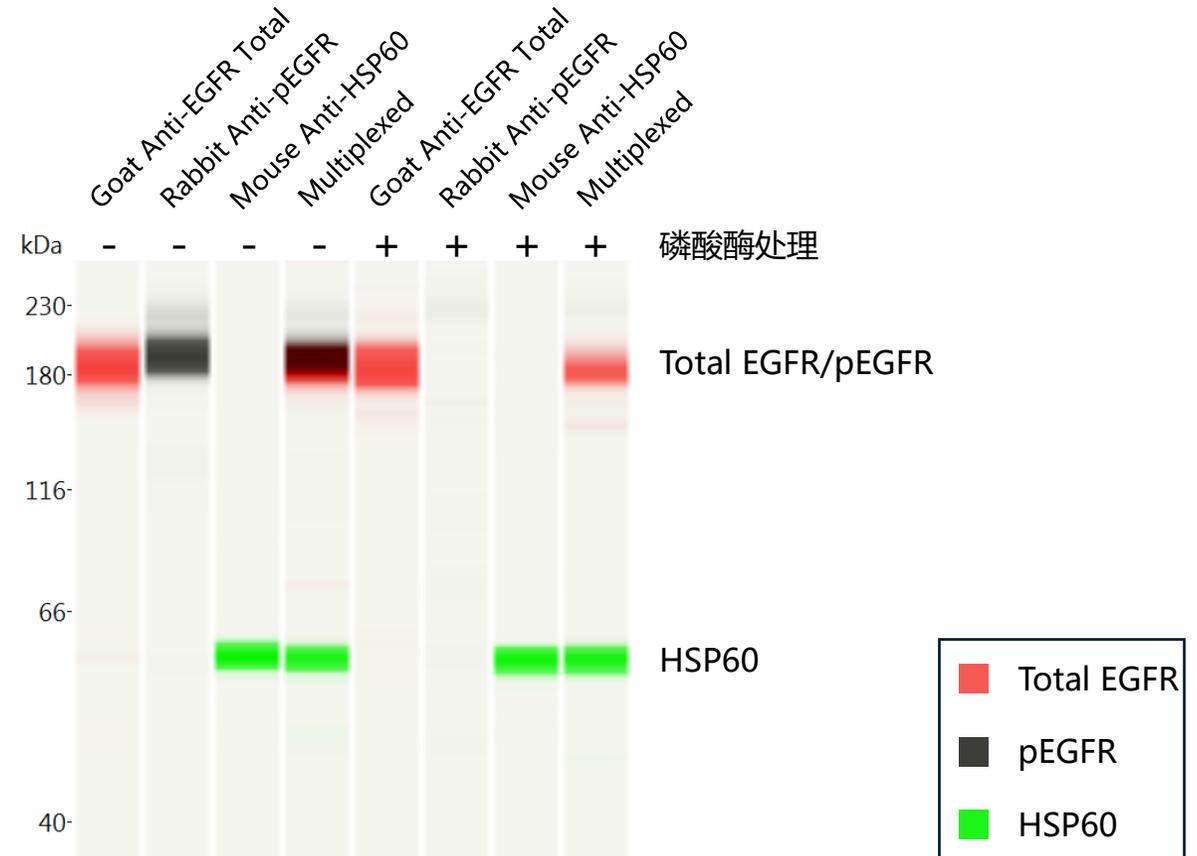
图2. 多重检测的一抗来源于不同种属。(左), 将 RTU anti-mouse 和 RTU anti-rabbit 的二抗 1:1 混合, 同时检测 ERK1 (rabbit anti-ERK1 RTU, PN 042-206) 和 STAT3 (mouse anti-Stat3, CST, 9139, 1:50)。(右), 将 20X anti-rabbit 二抗混入 RTU anti-mouse 二抗, 不影响二抗的饱和度, 和单独进行实验相比, 实验结果一致。

抗兔和抗小鼠二抗 1:1 混合时, 信号有明显下降, 而使用 20X 抗兔二抗和 1X 抗小鼠二抗混合时, 信号无明显下降。

摘自: “Multiplexing with Simple Western”

III. 多因子检测

JESS 能在同一根毛细管中检测总目标蛋白，磷酸化蛋白和内参蛋白



III. 多因子检测

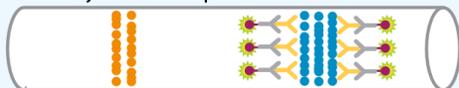
Load Matrix and Sample



Separate & Immobilize



Antibody 1 Immunoprobe



Detect and Quantitate Target 1



RePlex (remove antibody from 1st Immunoprobe)



Antibody 2 Immunoprobe (or Total Protein Assay)



Detect and Quantitate Target 2



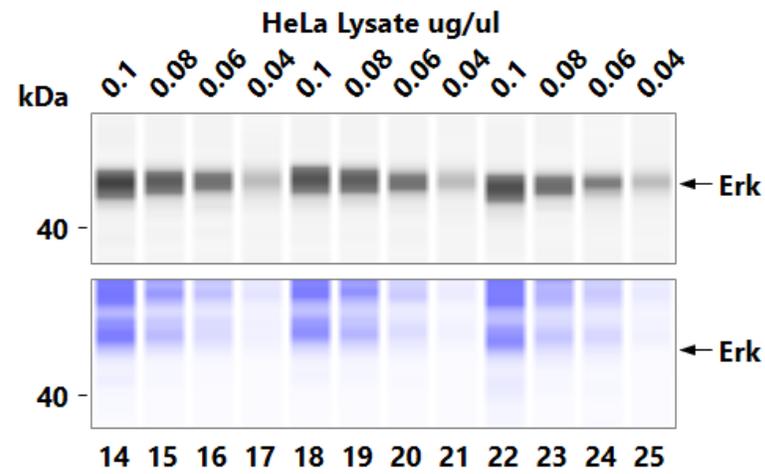
一根毛细管内进行**两轮免疫学检测** (2次连续检测, 每轮只测1个靶点)

可用于**化学发光、荧光及总蛋白检测**

节省单个数据点检测费用

利用**Simple Western**技术独有的蛋白质与毛细管共价交联固定

Linearity of Total Protein Assay



Total Protein

HeLa/Erk with RePlex and TP
Lane_annotation_training_file.cbz

公众号报修流程



PROTEINSIMPLE SIMPLE YOUR PROTEIN ANALYSIS



4000-863-973



FluorChem
• Simple Imaging



Ella
• Simple ELISA



MFI
• Simple Particle Analysis



Jess/Wes/Abby
• Simple Western



Milo
• Simple Sc-Western



Maurice
• Simple icIEF + CE-SDS