



## Western Blotting 内参抗体的选择

在 Western Blotting 中使用内参，就是在试验中用内参对应的抗体检测内参蛋白。内参就是内部参照，一般是指管家基因编码表达的蛋白，它们在各个组织和细胞中的表达相对恒定，常用在检测蛋白的表达水平变化时做参照。

利用 Western Blotting 可比较在组织细胞蛋白上样等量时，不同条件或不同组织细胞中目的蛋白的表达量，特别是当目的蛋白表达量不高时，上样量的差别就极可能影响结果的分析。因此，在 Western Blotting 试验中，进行内参的检测，可以校正蛋白质定量、上样过程中存在的误差，保证实验结果的准确性；此外，内参可作为空白对照，检测蛋白转膜是否完全、整个 Western Blotting 显色发光体系是否正常。目前，在国内外发表的文章中，Western Blotting 作内参校正已成为一种惯例。

内参抗体种类很多，比如  $\beta$ -Actin、 $\beta$ -Tubulin、GAPDH、Lamin B、PCNA、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 等，下面简单介绍下选择内参抗体应遵循的原则：

### 一．样本种属来源

首先要考虑的就是实验样本来源于什么物种。

哺乳动物的组织或者细胞样本 通常选择  $\beta$ -actin、 $\beta$ -tubulin、GAPDH、Lamin B、PCNA、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 等。

植物来源实验样本，则可以选择 Plant actin、Rubisco 等。

其他来源样本研究较少，所以就应该参照文献报导，选择合适的蛋白作为内参。

### 二．目的蛋白分子量

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

### 三．目的蛋白表达部位

胞浆和全细胞蛋白： $\beta$ -actin、GAPDH、 $\beta$ -Tubulin 等

胞核蛋白：PCNA 等

核膜蛋白：Lamin B 等

胞膜蛋白： $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 等

线粒体蛋白：COX IV、VDAC1 等



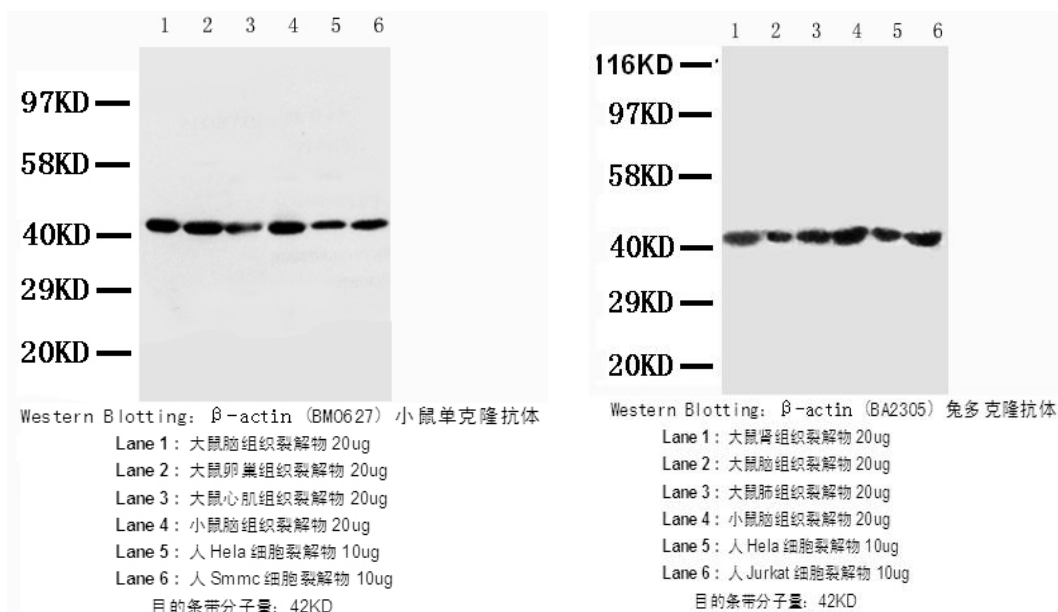
以上几条原则只是针对通常情况，但是需要注意的问题是——内参的选择需要考虑实际的试验环境。比如某些细胞中，由于组织缺氧、糖尿病等因素会导致 GAPDH 的表达增高，不适合做内参；比如在在凋亡实验时，Lamin 等也不适合作为内参。因此设计实验方案的时候应该考虑这些因素并查询相应文献，也应该注意内参表达出现异常。

四. 博士德生物提供了多种内参蛋白抗体,帮助客户选择最合适的内参蛋白抗体。

### $\beta$ -Actin

Actin 即肌动蛋白，是细胞的一种重要骨架蛋白。Actin 大致可分为六种，其中四种是不同肌肉组织特异性的，其余两种广泛分布于各种组织中，包括  $\beta$ -actin 和  $\gamma$ -non-muscle actin。针对大多数组织和细胞来说的， $\beta$ -actin 作为内参是公认的，它由375个氨基酸组成，分子量大小为42KD 左右，广泛分布于细胞浆内，表达量非常丰富，其含量占有所有细胞总蛋白的50%。但是在某些特殊的情况下，如脂肪组织或细胞内， $\beta$ -Actin 的表达量就很少。

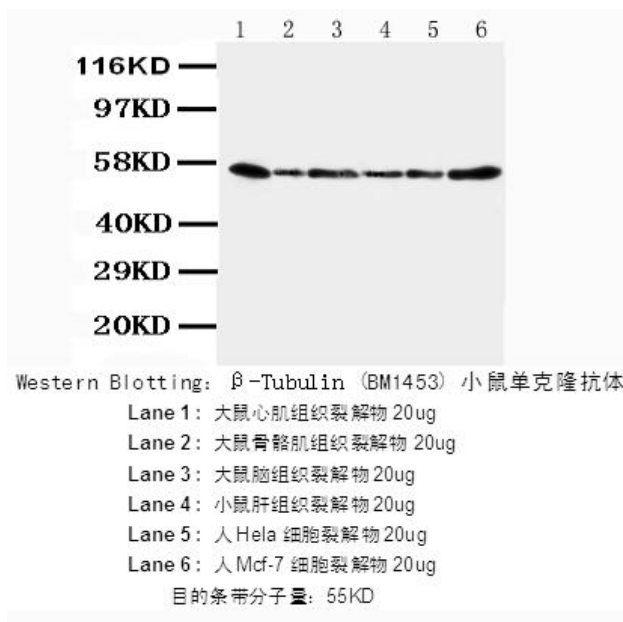
实验图例：



### Tubulin

Tubulin 即微管蛋白，是细胞的一种骨架蛋白。Tubulin 分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  等多种 tubulin，其中  $\alpha$ -Tubulin 和  $\beta$ -Tubulin 可以形成异源二聚体，也是形成微管的最主要的两种 Tubulin。 $\alpha$ -tubulin 和  $\beta$ -tubulin 分子量分别为55kDa 和50kDa，其实际检测条带均在55kDa 左右。作为内参， $\beta$ -tubulin 的蛋白水平通常不会发生改变，因此被广泛用于 Western Blotting，其作为上样量是否一致的参照，也常被用于免疫染色，观察细胞的微管结构。

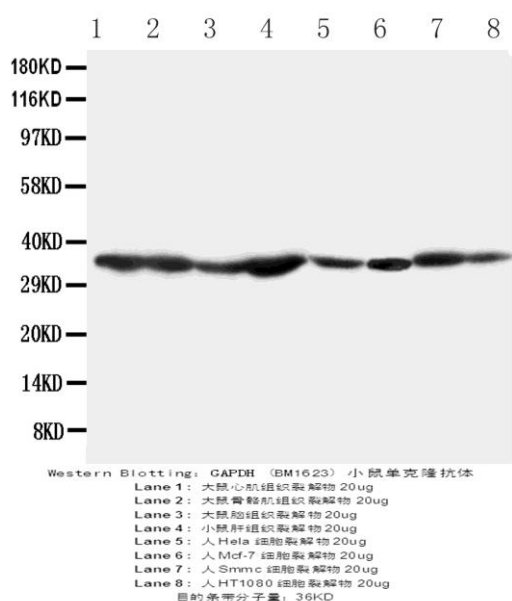
实验图例：



### GAPDH

GAPDH 即甘油醛-3-磷酸脱氢酶，是参与糖酵解的一种关键酶，催化糖酵解的第六步，它还参与核转录、DNA 复制和修复以及细胞凋亡等。它由4个30-40kDa 的亚基组成，分子量146kDa，检测条带大约在36kDa。GAPDH 基因几乎在所有组织中都高水平表达，广泛用作 Western Blotting 的内参。但请注意,某些生理因素,如缺氧和糖尿病,会增加 GAPDH 在特定的细胞和组织的表达。

实验图例：

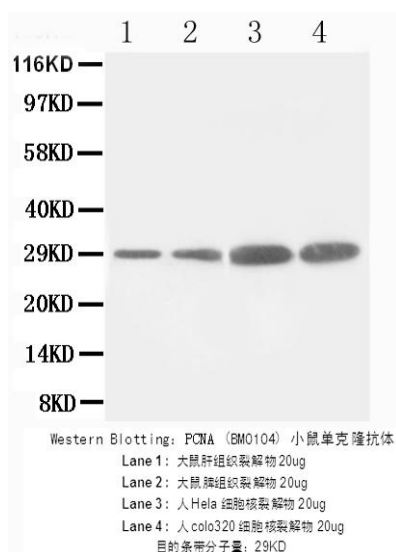




### PCNA

PCNA 即增殖细胞核抗原,因其只存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内而得名,以后的研究发现 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标。它在细胞核内合成,并存在于细胞核内,由261个氨基酸组成,分子量为29KD。

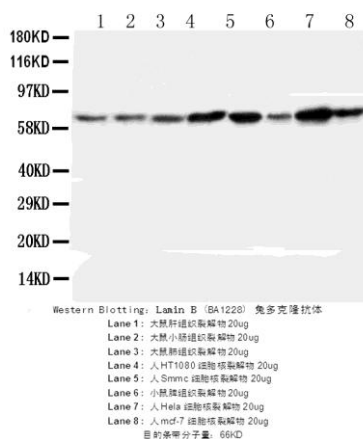
实验图例:



### Lamin B

Lamin B 即核纤层蛋白 B, 是凋亡关键因素 Caspase 家族的作用靶子,受 Caspase 的剪切而活化,位于核膜。其由 586 个氨基酸组成,分子量为 66KD。

实验图例:

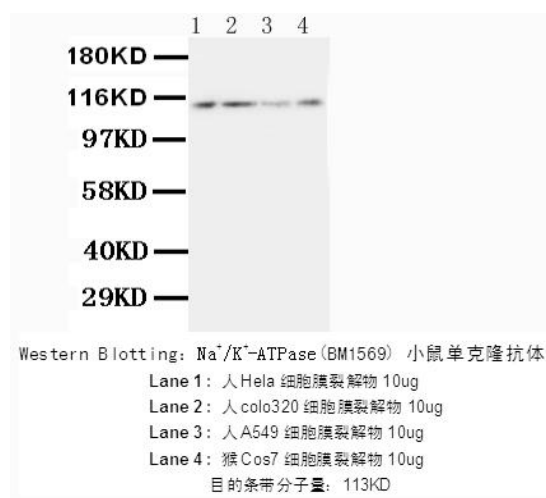




**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 即 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶或 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 泵, 它会使细胞外的 Na<sup>+</sup>浓度高于细胞内, 当 Na<sup>+</sup>顺着浓度差进入细胞时, 会经由本体蛋白质的运载体将不易通过细胞膜的物质以共同运输的方式带入细胞。其由 1023 个氨基酸组成, 分子量为 113KD。

实验图例：



博士德生物内参抗体及对应二抗抗体：

内参一抗抗体	产品编号	适用范围
β-Actin	BM0627 小鼠抗人、大小鼠、多种动物单克隆抗体	胞浆和全细胞
	BA2305 兔抗人、大小鼠、多种动物多克隆抗体	
GAPDH	BM1623 小鼠抗人、大小鼠、多种动物单克隆抗体	胞浆和全细胞
β-Tubulin	BM1453 小鼠抗人、大鼠、小鼠、兔等单克隆抗体	胞浆和全细胞
PCNA	BM0104 小鼠抗人、大鼠、小鼠、兔等单	细胞核



	克隆抗体	
Lamin B	BA1228 兔抗人、大鼠、小鼠等多克隆抗体	细胞核（不去除核膜的样本）
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	BM1569 小鼠抗人、大小鼠、兔、多种动物单克隆抗体	细胞膜

二抗抗体	产品编号	适用范围
羊抗小鼠	BA1050 0.1ml	小鼠单抗
	BA1051 1ml	
羊抗兔	BA1054 0.1ml	兔多抗
	BA1055 1ml	