

Far-Western Blot

Far-western blot 是一种检测蛋白间相互作用的分子生物学方法。它可以验证已知蛋白间的相互作用，或分析已知蛋白和未知蛋白间的相互作用。Far-Western blot 技术与 [Western blot](#) 相似。在 Western blot 实验中，用特异性抗体(一抗)去检测膜上的蛋白，HRP 标记的二抗与一抗结合，通过显影观察膜上的蛋白。而在 Far western blot 中，将靶蛋白固定在 PVDF/NC 膜上，用诱饵蛋白(已知蛋白)作为探针去检测膜上的靶蛋白，再利用特异性抗体孵育、检测，以此来分析靶蛋白和诱饵蛋白间的相互作用。

Far-western blot 分析范围

- 分析已知蛋白间的相互作用；
- 分析已知蛋白和未知蛋白间的相互作用；

Far-western blot 的优缺点

优点：

- 实验重复性好；
- Far-western blot 可以一次对多个组织样本进行分析；
- 具有相互作用的蛋白的分子量可以立即确定；

缺点：

- 实验过程涉及多个洗涤步骤，弱相互作用很难被检测到；
- 如果靶蛋白在组织中含量低则相互作用很难被检测到；
- 实验可能涉及蛋白变性及复性，无法检测依赖于天然结构的相互作用。

实验流程

Far-western blot 实验流程主要包括：①凝胶电泳；②转膜；③封闭；④孵育；⑤检测。下面对 Far-western blot 的实验操作流程做系统介绍。

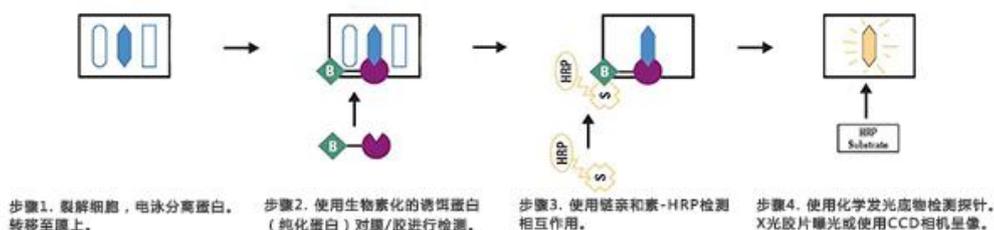


图 1：Far-western blot 实验流程

凝胶电泳

通过凝胶电泳将样品中不同大小的蛋白分离开来。电泳可以用[十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE](#)或天然 PAGE 分离。

转膜

样品中的蛋白在凝胶上分离后，将蛋白质从凝胶转移到膜上。此步骤的目的为将蛋白附着到膜的表面，使蛋白变得易于探测。在转膜的过程中需小心操作，避免污染问题。如果转膜过程存在污染，则最终检测结果会出现很高的背景。

封闭

转膜结束后一般采用异源性蛋白质封闭整张膜，以阻塞非特异性结合位点。常用的封闭剂有脱脂奶粉、BSA 等。需要说明的是，封闭剂有可能会发生交叉反应或者以其它的方式破坏待研究的蛋白相互作用，需要根据经验确定合适的封闭剂。

探针孵育

将诱饵蛋白与封闭后的膜共孵育，使诱饵蛋白与 NC 膜上相互作用的蛋白结合，孵育后洗去未结合的诱饵蛋白。探针蛋白通常可以利用大肠杆菌表达系统生产出来，虽然细胞裂解液也可以作为探针蛋白，但是为了降低实验背景，最好选择纯化的蛋白作为探针（诱饵蛋白的纯度越高，实验的成功率就越高）。

探针蛋白检测

检测探针蛋白的策略通常有以下几种：

- 未标记的诱饵蛋白 → 酶标记的诱饵特异性抗体 → 底物试剂
- 放射性标记的诱饵蛋白 → 暴露于胶片

- 生物素化的诱饵蛋白 → 酶标记的链霉抗生物素蛋白 → 底物试剂
- 融合标记的诱饵蛋白 → 标签特异性抗体 → 酶标记的二抗 → 底物试剂

实验对照设置

为了提高结果的准确性，需要设置合适的实验对照。例如，如果诱饵蛋白为 GST-融合蛋白，则单独设置一组 GST 标签实验组作为阴性对照，排除 GST 标签本身与膜上的靶蛋白存在非特异性结合的可能性。

Far-western blot VS. Western blot

	Far-western blotting	western blotting
实验目的	检测蛋白质间相互作用	蛋白检测
凝胶电泳	还原或非还原条件（通常）	还原（通常）或非还原条件
转膜	根据经验确定最佳的膜和转移系统	根据经验确定最佳的膜和转移系统
封闭	根据经验确定封闭剂	根据经验确定封闭剂
探针	诱饵蛋白	一抗
实验对照	需要	不需要

注意事项:

检测标记时，通常用酶（辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）标记抗体。相比之下，诱饵蛋白不选用酶标记，因为大的酶标记可能在空间上阻碍诱饵和靶蛋白之间结合。

相关阅读

- [免疫共沉淀 \(Co-IP\)](#)
- [生物膜干涉技术 \(BLI\)](#)
- [蛋白质芯片技术](#)

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

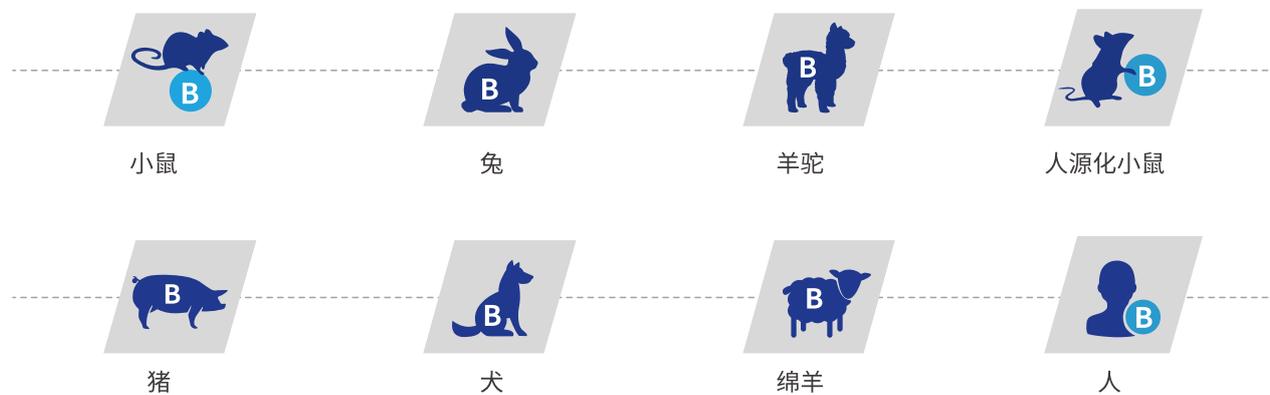
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

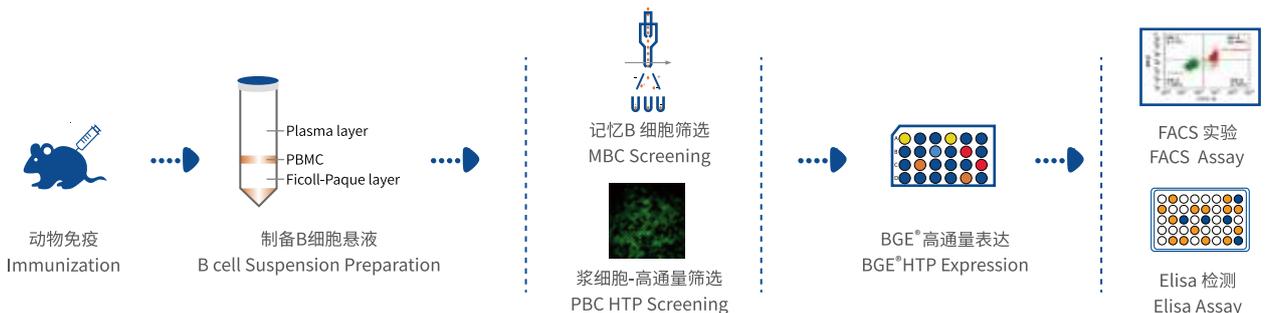
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

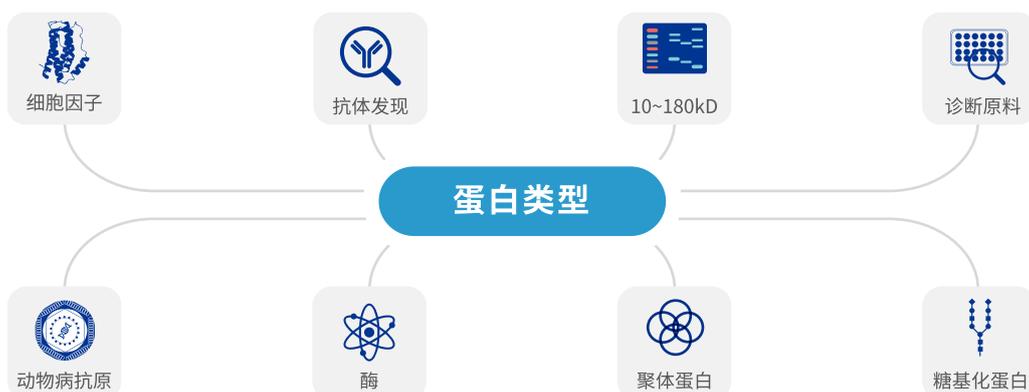


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

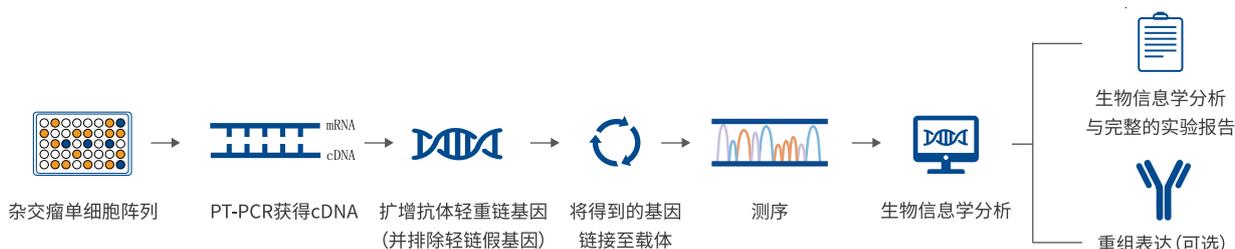
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



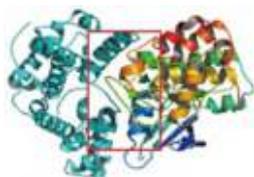
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

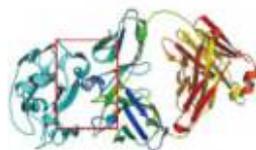
检测范围



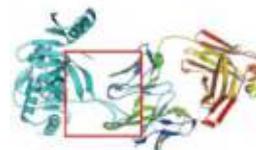
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



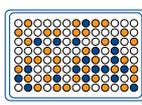
基因合成&质粒抽提



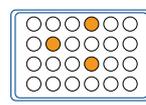
稳定转染



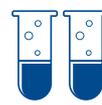
On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L