

Wes™ 全自动蛋白表达分析系统 简明用户手册



普诺森生物科技（上海）有限公司

Revision 3.5, Dec 2018

目录

1. 准备样品和抗体	3
2. 准备Wes	4
3. 加样	5
4. 上机操作	8
5. 运行状态和实验结束	9
6. 数据分析	10
7. 注意事项	16
8. 常见问题	17
9. 订购信息	18

1. 准备样品和抗体

1) 样品的制备方法与传统 Western 相同

- ◇ 样品保存在裂解液 (Lysis Buffer) 中
- ◇ 某些裂解液成分可能会对实验结果有影响
 - 建议查阅《Simple Western Buffer Compatibility.pdf》
- ◇ **不要加入** Western 上样缓冲液 (Loading buffer)

2) 通过 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度

- ◇ 浓度建议在 $3\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 或以上, 如果靶蛋白丰度低 (如磷酸化蛋白), 推荐上样终浓度 $2\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 其他靶蛋白可选择 $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$
- ◇ 如果裂解液中含有 SDS, 样品可用 $0.1 \times$ Sample Buffer 稀释
 - ProteinSimple 提供 $10 \times$ Sample Buffer, 需要取出部分用去离子水稀释成相应浓度后使用
 - $10 \times$ Sample Buffer 可以单独订购, 货号为 042-195
- ◇ 如果样品裂解时不含 SDS (如在 PBS 缓冲液中超声破碎), 样品需用 $1 \times$ Sample Buffer 稀释以保证有足量的 SDS 与蛋白质结合

3) 测定浓度后, 样品可分装冻存在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱直到使用时取出

4) 一抗稀释方法

- ◇ 使用 ProteinSimple 提供的 Antibody Diluent II 稀释后使用
- ◇ 建议购买 Wes 验证过的抗体, 货号和稀释度可查询抗体数据库:
<http://www.proteinsimple.com/antibody/antibodies.html>
- ◇ 如果您使用的一抗不在抗体数据库里, 建议比抗体说明书 (datasheet) 里推荐的 Western 浓度高 10–20 倍, 即抗体说明书推荐 1:1000, Wes 则用 1:50 - 1:100 的稀释度

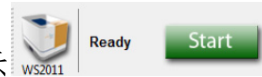
5) 二抗

- ◇ 目前 ProteinSimple 提供的商品化二抗有羊抗小鼠和羊抗兔, 您不需要准备这两种二抗
- ◇ 如果您的一抗种属来源不是小鼠和兔, 建议您搜索抗体数据库, 购买相应的二抗, 用 ProteinSimple 提供的 Antibody Diluent II 稀释后使用
- ◇ 如果您使用的二抗不在抗体数据库里, 请您与我们的技术支持联系

2. 准备Wes

- 1) 实验室的温度确保在 $18-24^{\circ}\text{C}$ 之间，湿度在 $20-60\%$ 之间。如果温度、湿度未达到要求，请打开空调、除湿机或其他相关设备，直到达到要求再开始实验。
- 2) 依次打开 Wes、电脑和 Compass 软件。

✧ 如果电脑连接上 Wes，会显示



✧ 如果电脑没有连接上 Wes，请点击 Instrument > Connect

- 3) 进行硬件自检。

- ✧ 点击 Instrument > Self-Test 进行 Wes 硬件自检，时间大约需要 10 分钟
- ✧ 我们建议您在使用前执行自检，以排除任何潜在的硬件问题

3. 加样

- 1) 请根据试剂盒内附的说明书要求进行操作
- 2) 下面以SM-W004和DM-001为例，介绍实验的具体过程：
 - a) 准备冰盒和碎冰，取出存放在 4 °C 的两个透明塑料盒（PS-ST01-EZ-8和DM-001），将其中的试剂冰上放置；



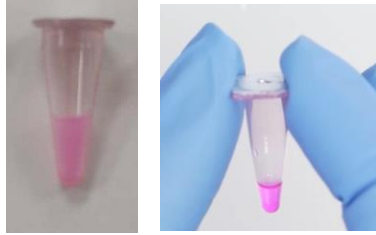
- b) 打开一包绿纸包（Standard Pack 1），取出里面 3 根管子；



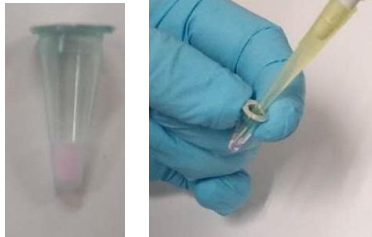
- c) 将所有 0.2mL 管的铝箔撕开或用手拿着枪头戳个洞；
 - d) 配制 DTT：透明管内有白色 DTT 粉末，加入 40 μ L 去离子水，吹打均匀；



- e) 配制 5 \times Master Mix（即Loading Buffer）：粉色透明管内有粉色 Master Mix 粉末，加入 20 μ L DTT 溶液（上一步配的，如果想进行非还原电泳，可以水代替DTT），20 μ L 10 \times Sample Buffer（在橙色试剂盒内），吹打均匀；



- f) 配制 Ladder（即marker，分子量标准品）：淡蓝色透明管内有粉色Ladder粉末，加入20 μL 离子水，吸打混匀即可，无需加热变性；



- g) 配制样品：

- 1个孔需要3 μL 样品（加入了Master Mix的），为了防止变性时的蒸发，建议1个孔配1.5个孔的量，假设样品浓度为 y ，以下为配制1个孔所需要的体积：

终浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	样品原液 (μL)	5 \times Master Mix (μL)	0.1 \times Sample Buffer (μL)	总体积 (μL)
0.2	$0.2 \times 4.5 / y$	0.9	$4.5 - (0.2 \times 4.5 / y) - 0.9$	4.5
1	$1 \times 4.5 / y$	0.9	$4.5 - (1 \times 4.5 / y) - 0.9$	4.5

- 将配制好的样品放在95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5分钟；
 - 变性结束后将样品取出，冰上冷却5分钟。冷却后涡旋振荡混匀，再短暂离心，放在冰上待用；
- h) 配制一抗：一抗用 Antibody Diluent II 稀释后放在冰上待用；
- 每孔需要10 μL 稀释后的一抗，根据总数适当放量1-2个孔



- i) 二抗即开即用无需配制；
- j) 配制发光液：Lumino-S 和 Peroxide 各取200 μL ，涡旋振荡混合，放在冰上待用；



- k) 从橙色试剂盒里取出板子，将配制好的试剂依次加入板内：
- 注意！加样时可用反相吸液法，即第二档吸，第一档打，这样可以留少量液体在枪头中，以避免将枪头中的空气吹入液体内形成气泡。

A 行：A₁ 为 Ladder，5 μ L，其余孔为样品，体积 3 μ L

B 行：Antibody Diluent II（抗体稀释液），体积 10 μ L

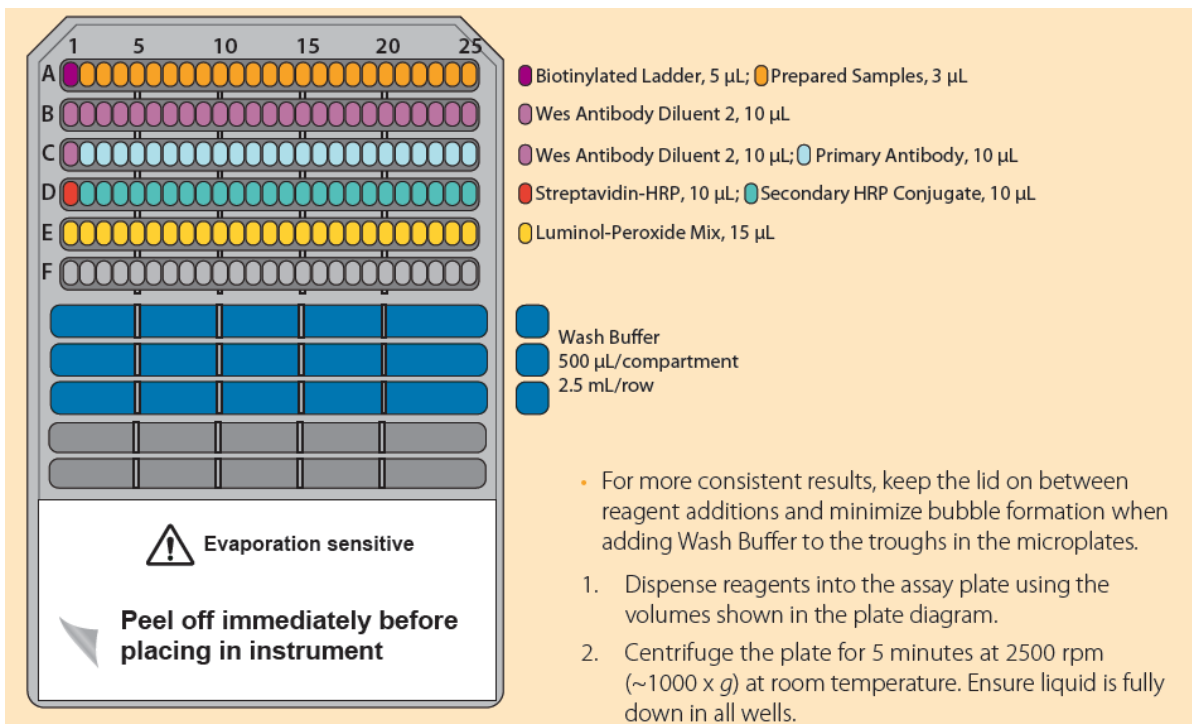
C 行：C₁ 为 Antibody Diluent II，其余孔为稀释的一抗，体积 10 μ L

D 行：D₁ 为 Streptavidin-HRP，其余孔为相应的二抗，体积 10 μ L

E 行：发光液，体积 15 μ L

F 行：空

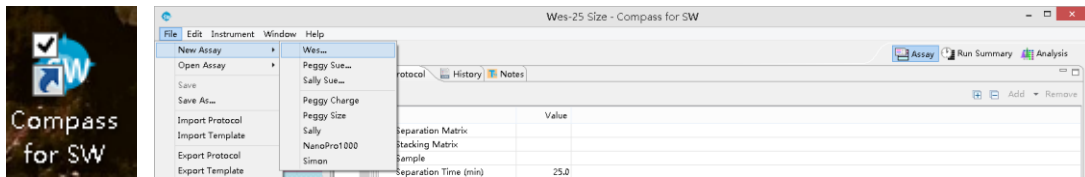
紧邻 F 行的三大行内每格加入 500 μ L Wash Buffer（Wash Buffer 在橙色试剂盒内）



- l) 盖上盖子，配平后在室温 2500 rpm ($\sim 1000 g$) 离心 5 分钟；
- 注意！一定要加盖子
 - 注意！离心机不能制冷
 - 离心后检查并确认孔底无气泡

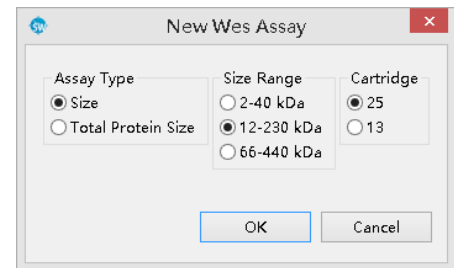
4. 上机操作

- 1) 双击打开Compass for SW，在点击 File > New Assay;



- 2) 在弹出的新窗口中选择相应的程序，点击 OK 加载;

- ✧ 默认程序的参数已经过优化（推荐）
- ✧ Western 的 Assay Type 为 Size
- ✧ 根据板上标注的分子量范围选择 Size Range
- ✧ 根据毛细管包装上标注的数目选择 Cartridge

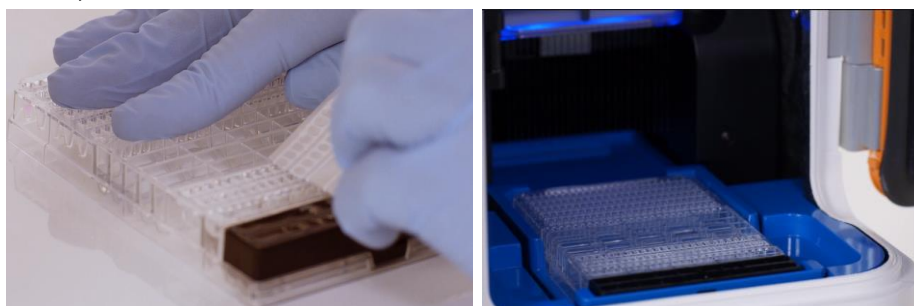


- 3) 轻轻触碰 Wes 门上部的银色区域，打开门;
- 4) 撕开毛细管的包装，取出毛细管放入 Wes;

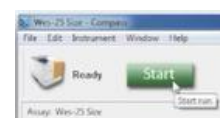
 - ✧ 注意！请从黑色基座两侧拿取，不要直接接触毛细管



- 5) 将离心后的板子取出，一手按住板子，一手撕去封膜，将板子放入 Wes;

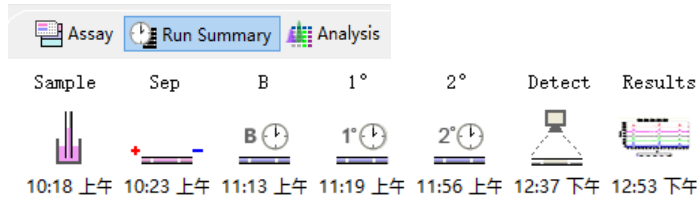


- 6) 关门，稍等 5 秒钟等门锁止，点击 Start 开始运行;
- 7) 弹出的对话框内可选择文件的存储位置，默认路径：我的文档\Compass\Runs 文件夹内。

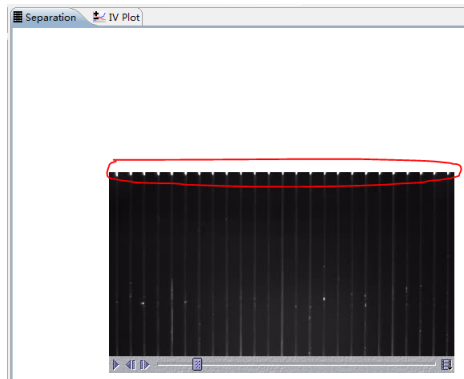


5. 运行状态和实验结束

- 1) 开始运行以后，Compass 软件会自动进入 Run Summary 界面，并显示实验的步骤和时间



- ◇ 开始运行后10分钟可以看到蛋白质进入毛细管内；

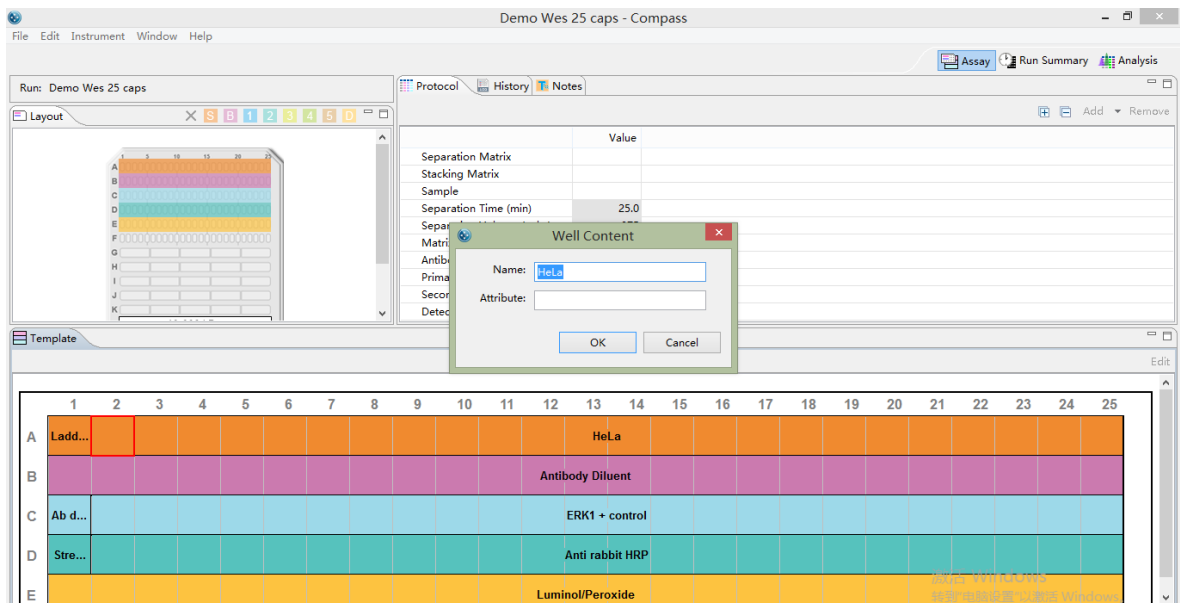


- ◇ 无需等待实验结束，结果可第二天再来看
- 2) 实验结束后，轻触开门，将毛细管和板子取出丢弃；
 - 3) 依次关闭 Compass 软件和电脑。
- ◇ 如果在一周内还要使用 Wes，Wes 可以不关机

6. 数据分析

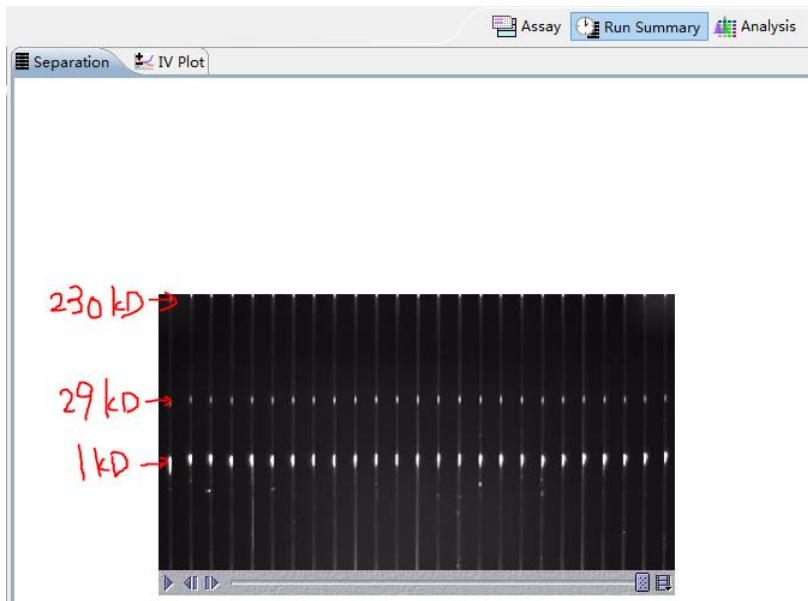
1) 板型布局:

- ✧ 如果实验开始前没有来得及设定布局, 请在实验结束后设定;
- ✧ 点击进入Assay界面, 在Template里面双击任意孔会弹出新窗口, Name 填入名称, Attribute 填入终浓度, 可以利用 ctrl+c 和 ctrl+v 进行孔复制粘贴, 也可以利用 shift 和 ctrl 连续选择多个孔进行填充, 甚至可以从 Excel 复制过来粘贴;

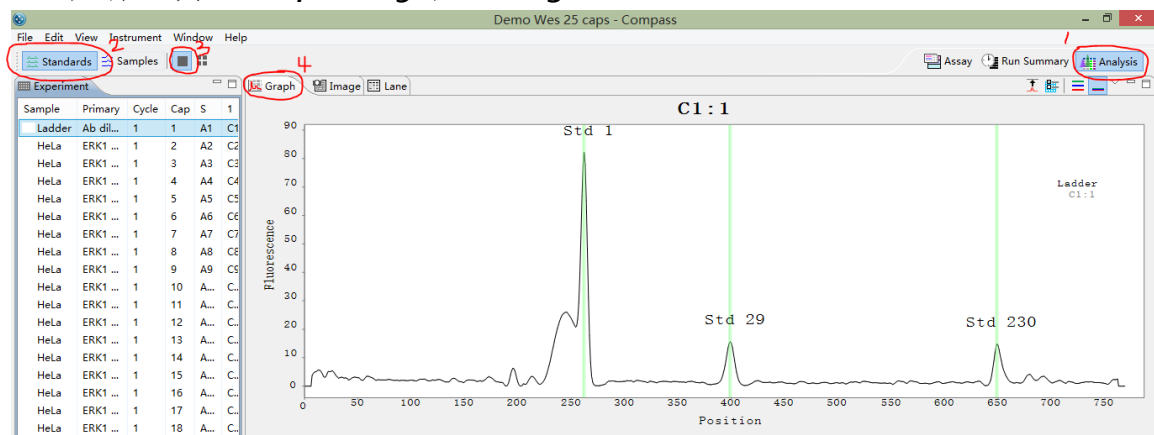


2) 检查荧光内参:

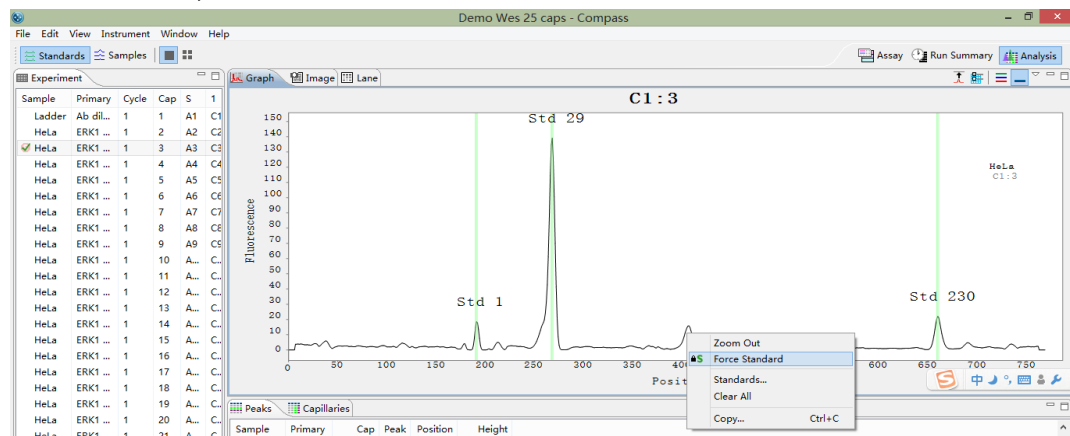
- ✧ 荧光内参是校正毛细管与毛细管之间电泳迁移率差异, 如果荧光内参定位错误, 会影响靶蛋白的分子量计算
- ✧ 每根毛细管内含有 1kD, 29kD 和 230kD 这三个荧光内参
- ✧ 进入 Run Summary 界面, 在 Separation 里检查每根毛细管内是否含有三个荧光内参;



随后切换到 Analysis 界面，选择 Standards > Single View > Graph，检查每一根毛细管里荧光内参定位是否正确。荧光内参在 Graph 里被标注为 Std 1, Std 29 和 Std 230



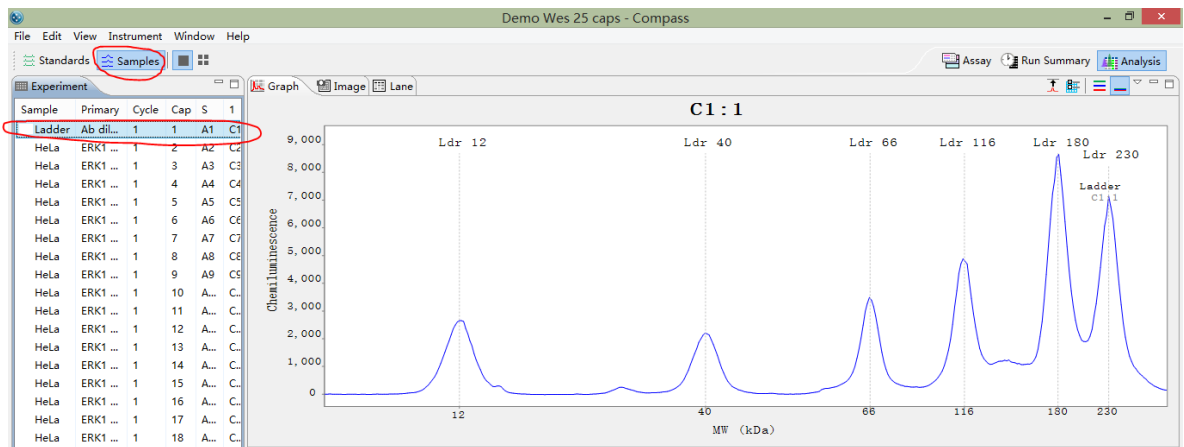
如果出现定位错误，在正确的峰上点击鼠标右键调出菜单，然后选择 Force Standard 来校正，如果校正出错，可选择 Clear All 恢复默认设置；



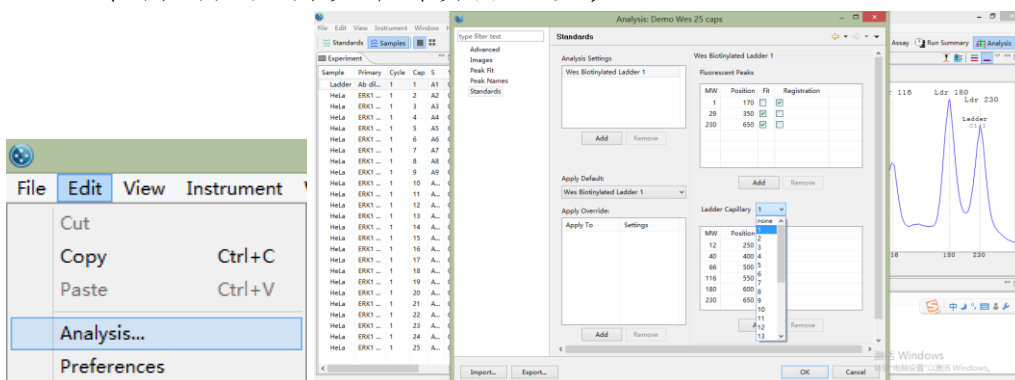
小贴士：1kD 的荧光内参通常信号最强

3) 检查Ladder:

✧ 选择 Samples > Ladder, 检查 Ladder 的 6 个峰 (12kD, 40kD, 66kD, 116kD, 180kD和230kD) 的分子量是否正确, 正常谱图如下所示:



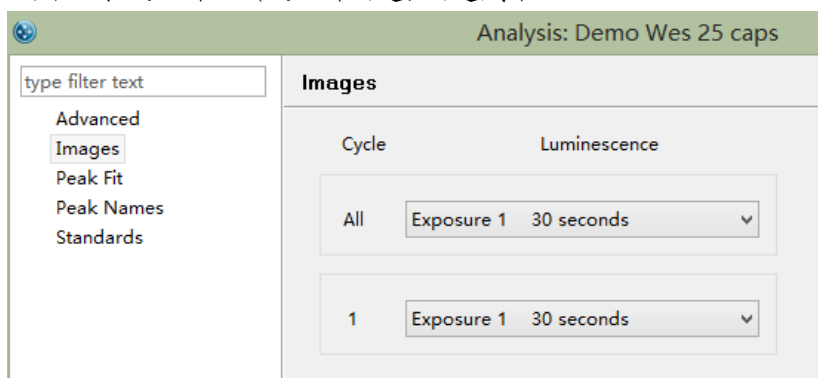
✧ 如果 Ladder 分子量不正确, 则不能利用 Ladder 来计算分子量, 可以在 Edit > Analysis... > Standards > Ladder Capillary 里面设成 None, 这样软件就不会通过 Ladder 计算分子量, 而是依靠每根毛细管内的荧光内参来计算分子量;

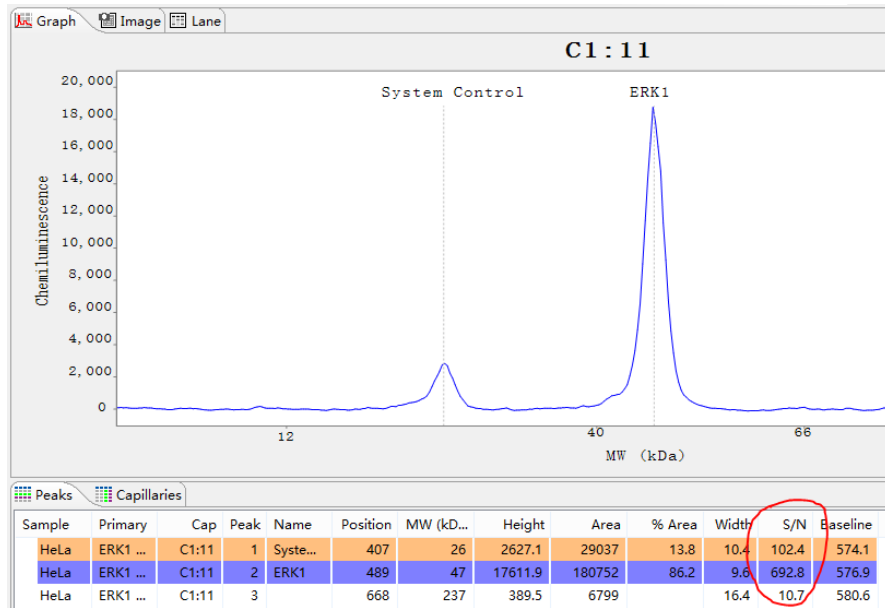


4) 检查样品:

✧ 完成上述步骤后才可以查看样品的结果;

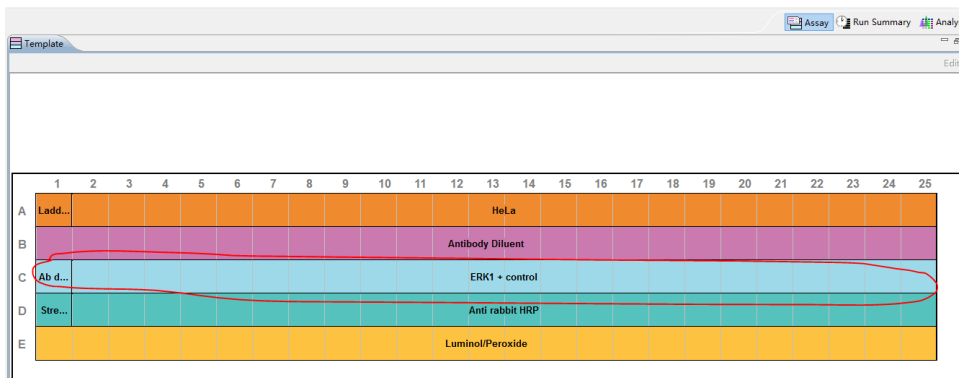
✧ 注意在 Edit > Analysis... > Images 里选择不同曝光时间, 同时查看靶蛋白的 S/N 值 (S/N 值越大越好)

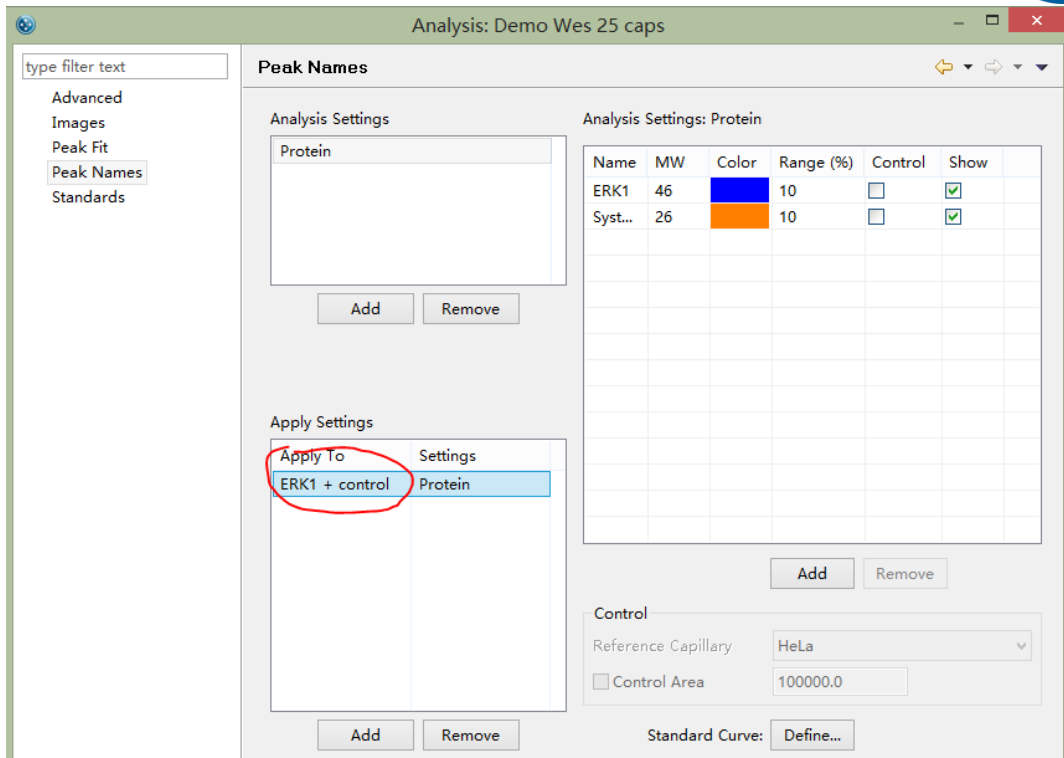




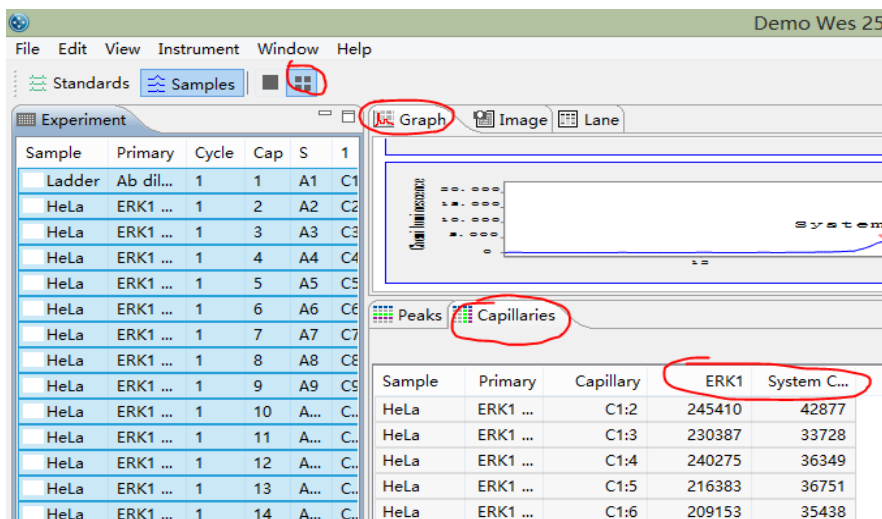
5) 数据和图片导出：

- ✧ 在Edit > Analysis... > Peak Names里面设定靶蛋白的分子量（需要根据Wes上跑出来的分子量设定）
- ✧ Apply To 这里有下拉箭头，只要您在Assay里面命名了一抗的名称，这里会有相应的选择出现，您可以将设定的靶蛋白分子量应用到加了该靶蛋白一抗的孔上

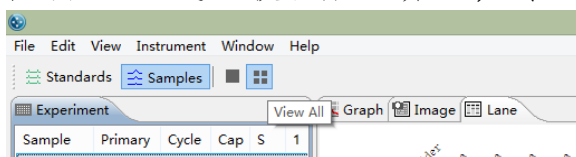




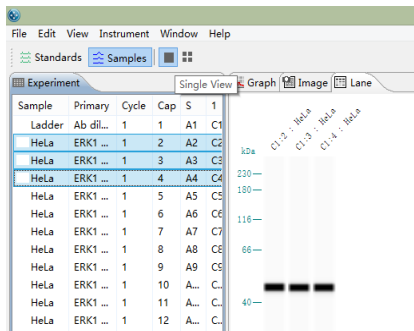
- 6) 点击 OK 保存设置并退出。样品中靶蛋白的名字将会自动标注在 Graph 里。这时候您点击 Capillaries，这里将会显示您靶蛋白的条带密度值 (Area)，您可以利用 Ctrl+A 将 Capillaries 里的数值全部选中，然后复制粘帖在 Excel。



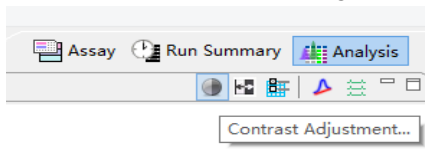
- 7) 点击 Lane 进入模拟胶图界面，可以点击 View All 全部选中；



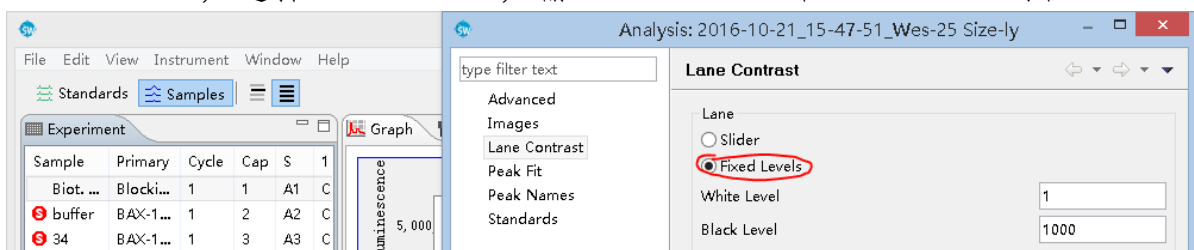
- 8) 也可以点击 Single View，然后利用 Ctrl 键选择您想要的某几个泳道；



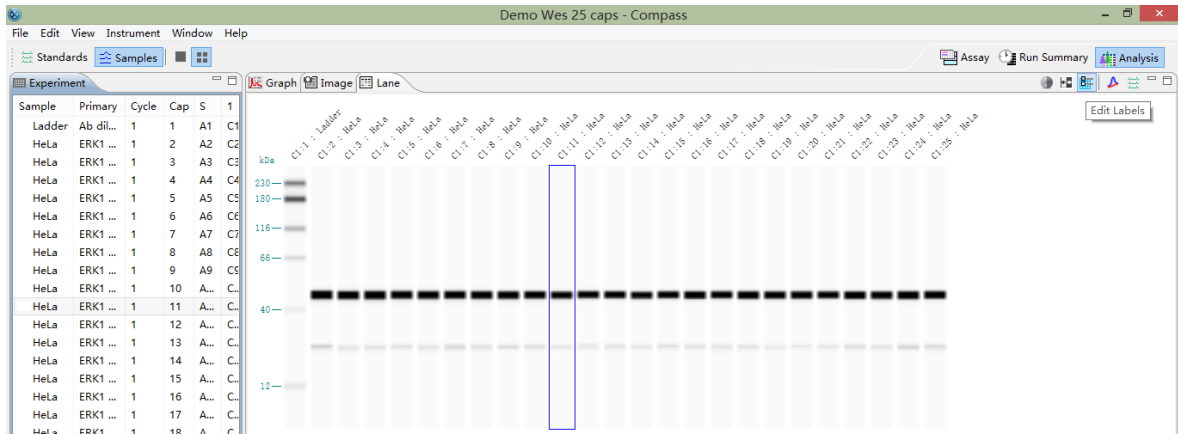
9) 右上角的 Contrast Adjustment... 可以调整图像对比度;



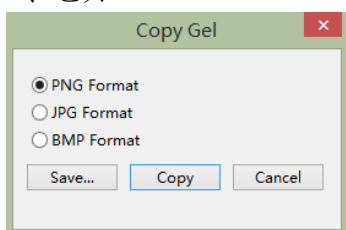
◇ 如果您想精确调节对比度, 可以进入 Edit>Analysis...>Lane Contrast, 选择 Fixed Levels, 输入 White Level 和 Black Level 的值。



10) 右上角的 Edit Labels, 可以显示/隐藏图片上方的文字标注;



11) 图片调整好以后, 在图片上点击鼠标右键, 出现 Copy, 选中 Copy, 出现新窗口, 选择相应的保存格式, 点击 Save... 可将图片另存在您指定的地方。



注意事项

- 1) 试剂盒务必请按要求存放，橙色试剂盒要保存在 $18-24^{\circ}\text{C}$ ，如果不小心冷藏或冬季室温过低，需要在 $18-24^{\circ}\text{C}$ 放置 24 小时后才能使用，否则电泳会出现异常；
- 2) 若使用旧包装的Standard pack, Ladder 务必和样品一起变性；
- 3) 加样时避免打出气泡，尤其样品中的气泡很难戳破；
- 4) 如果加样过程中要暂停，请务必盖上车盖，以减少蒸发；
- 5) 加样后务必盖上车盖，才能去离心；
- 6) 加完样板子务必离心；
- 7) 板式离心机请勿制冷；
- 8) 毛细管和板上的封膜都在实验即将开始前才打开，请勿提前打开；
- 9) 毛细管和板子都是一次性的，请勿重复使用；
- 10) 更多实验优化，参见《Size Assay Development Guide.pdf》；
- 11) 使用2-40kD试剂盒，Compass软件必须升级到v3.0版本或以上；
- 12) Compass软件不限制安装，最新版可从网站下载：
<http://www.proteinsimple.com/compass/downloads/>
- 13) 如果您有任何问题，可联系我们的技术支持，或拨打 4000-863-973。

7. 常见问题

现象	可能原因	解决方法
实验结束后没有或找不到运行结果文件 (run file)	Wes 和 电脑主机的通讯连接断开	确认Wes处于开机状态，打开Compass软件，确认连接Wes，点击Instrument > Runs...，在出现的窗口内找到运行结果文件，点击Save As保存
3个荧光内参全部弥散无法辨认	Wes 板子没有在室温保存，造成试剂成分沉淀析出	Wes 板子需要在实验开始前室温 (18 – 24 °C) 放置至少24小时以上
荧光内参分离谱图与预期不符	使用了错误的荧光内参	请核对白色纸包上的标记，Standard Pack 1为12-230kD，Standard Pack 2为66-440kD
荧光内参跑出了毛细管	板子上机前没有离心。板子在运输过程中或者上样时有气泡	上机前室温离心，确保各孔内无气泡。如果再离心后看到有气泡，请用枪头将其戳破
荧光内参进入了毛细管，但是没有进一步分离	Wes 板子被冷藏或冷冻过，造成试剂成分析出	Wes 板子需要在实验开始前室温 (18 – 24 °C) 放置至少24小时以上
Graph View 发现靶蛋白分子量位置有凹坑	化学发光信号淬灭	选择短的曝光时间 (例如5s) 查看结果。可减少样品浓度
化学发光信号与蛋白量不成线性	不在检测的线性范围内	通过样品梯度稀释确定实验的检测上限和下限
化学发光信号重复性差	抗体不够量	通过抗体梯度稀释确定最佳的抗体稀释度
Total Protein 试剂盒批次内重复性差	Biotin Labeling Reagent 没有充分重悬 Biotin Labeling Reagent 不是新鲜制备	Reconstitution Agent 1 和 Reconstitution Agent 2 混合后上下吸打 6 – 10 次，保证充分混匀 在上机前 30 分钟内制备 Biotin Labeling Reagent

8. 订购信息

项目	订货号
Anti-Rabbit Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-001
Anti-Mouse Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-002
No secondary Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-003
Biotin Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-004
Anti-Human IgG Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-005
Anti-Goat Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-006
Total Protein Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue	DM-TP01
12-230kDa Wes Separation Module 8x25 capillary cartridges	SM-W004
12-230kDa Wes Separation Module 8x13 capillary cartridges	SM-W002
66-440kDa Wes Separation Module 8x25 capillary cartridges	SM-W008
66-440kDa Wes Separation Module 8x13 capillary cartridges	SM-W006
2-40kDa Wes Separation Module 8x25 capillary cartridges	SM-W012
2-40kDa Wes Separation Module 8x13 capillary cartridges	SM-W010
Wes 12-230 kDa Total Protein Master Kit with Split Buffer for 104 data points	PS-TP09
Fluorescent 5XMaster Mix 1 (12-230kD)	PS-FL01-8
Fluorescent 5XMaster Mix 3 (66-440kD)	PS-FL03-8
Fluorescent 5XMaster Mix 5 (2-40kD)	PS-FL05-8
10xSystem Control Primary Antibody - Rabbit	042-196
10xSystem Control Primary Antibody - Mouse	042-191
Streptavidin - HRP	042-414
Chemiluminescent Substrate	PS-CS01
Anti-Rabbit Secondary Antibody	042-206
Anti-Mouse Secondary Antibody	042-205
20X Anti-rabbit HRP Conjugate	043-426
Milk-free Antibody Diluent	043-524



NP1000 超微量蛋白修饰谱图研究平台

主要功能：

利用靶蛋白各修饰体（如磷酸化）的电荷差异进行分离，后续通过靶蛋白泛抗体即可获得靶蛋白的修饰谱图，有助于发现靶蛋白的新异构体或表征某类异构体的丰度（如磷酸化百分含量等），从而阐明信号转导通路和调控机理。

独有技术优势

1. 可以对微量样本进行分析：

本平台是目前唯一可用于超微量样品检测的蛋白质研究平台。可检测样本包括：

- ◇ 激光捕获显微切割（LCM）样本
- ◇ 体外培养的细胞
- ◇ 原代细胞
- ◇ 干细胞（肿瘤干细胞、胚胎干细胞）
- ◇ 外周血单个核细胞
- ◇ 无细胞体液（脑脊液、血清等）
- ◇ 流式细胞仪分选细胞

2. 可以有效区别蛋白质表达的异构体，翻译及后修饰等，并进行定量分析：

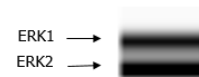
如检测蛋白质磷酸化、糖基化、乙酰化等修饰，用于揭示疾病发生的机理或寻找新的生物标志物以及信号通路研究等。应用领域包括：

- ◇ 细胞信号通路研究
- ◇ 细胞死亡和凋亡通路研究
- ◇ 细胞耐药性：如激酶抑制因子的药效研究
- ◇ 分子靶向药物的作用机理研究
- ◇ 生物标志物的发现和验证：如肿瘤和神经退行性疾病的特异性生物标志物
- ◇ 干细胞研究：如造血干细胞和胚胎干细胞的分化
- ◇ 蛋白质纯度分析：如单克隆抗体纯度分析
- ◇ 蛋白质翻译后修饰和异构体、差异表达研究

3. 完整的靶蛋白修饰谱图：

本平台可用靶蛋白的泛抗体来检测靶蛋白质的电荷异构体，而无需使用针对各种异构体的特异性抗体（如磷酸化位点特异性抗体），极大增强实验的灵活性以及降低实验成本。

传统 Western



NP1000

