

免疫印迹 (Western Blot) 的常见问题 (FAQ)

1. Western blot 结果中的背景为什么较高?

可能的原因及建议

1. 膜封闭不够——延长封闭的时间；选择更加适合的封闭液。
2. 一抗稀释度不适宜——对抗体进行滴度测试，选择最适宜的抗体稀释度。
3. 一抗孵育的温度偏高——建议 4°C 结合过夜。
4. 膜在实验过程中干过——实验过程中要注意保持膜的湿润。
5. 检测时曝光时间过长——减少曝光时间。

2. Western blot 结果中杂带较多

可能的原因及建议

6. 目的蛋白有多个修饰位点（磷酸化位点、糖基化位点、乙酰化位点等），本身可以呈现多条带。
查阅文献或进行生物信息学分析，获得蛋白序列的修饰位点信息，通过去修饰确定蛋白实际大小。
7. 目的蛋白有其它剪切本——查阅文献或生物信息学分析可能性。
8. 样本处理过程中目的蛋白发生降解——加入蛋白酶抑制剂；样本处理时在冰上操作。
9. 上样量过高，太敏感——适当减少上样量。
10. 一抗特异性不高——重新选择或制备高特异性的抗体。
11. 一抗不纯——纯化抗体
12. 一抗或者二抗浓度偏高——降低抗体浓度。

3. Western blot 结果中无信号或显示信号弱

可能的原因及建议

13. 检测样本不表达目的蛋白——选择表达量高的细胞作为阳性对照，用于确定检测样本是否为阴性。
14. 检测样本低表达目的蛋白——提高上样量，裂解液中注意加入蛋白酶抑制剂。
15. 转移不完全或过转移——可以用丽春红染膜并结合染胶（考马斯亮蓝）后确定条带是否转至膜上或转移过头；适当调整转膜的时间和电流。
16. 抗体不能识别测试种属的相关蛋白——购买抗体前应当认真阅读抗体说明书，确定其是否能够交叉识别测试种属的对应蛋白。
17. 一抗孵育时间不足——建议 4°C 结合过夜。

18.二抗与一抗不匹配——选择针对一抗来源的种属的抗体。

19.洗膜过度——洗膜时间不宜过长，加入的去垢剂不宜过强或过多，建议使用 0.1%的弱去垢剂 Tween-20。

4. 其它现象：

20.膜上多处出现黑点或黑斑——抗体与封闭试剂发生非特异性的结合。

21.反白（条带显白色）——目的蛋白含量太高或者一抗浓度偏高。

22.蛋白分子量偏低或偏高——胶浓度不适合，高分子量要用低浓度胶；小分子蛋白要用高浓度胶。

5. TBS 与 PBS 的区别

PBS 的缓冲能力强于 TBS（因为混合缓冲液在一定的离子强度下常常具有更宽的缓冲范围），TBS 在 PH7.0 以下缓冲能力较弱（不过 PBS 易污染）。但我们常常要根据我们实验目的选用合适的缓冲液，如在蛋白纯化中进行阴离子交换层析，阳离子缓冲液首选 TBS；阳离子交换层析时，阴离子缓冲液则首选 PBS。

Western blot 中使用 TBS 和 PBS 均可，只是要根据需要选择合适的浓度。

6. Western 是否可以同时加两种或者多种一抗

通常情况下只加一种一抗。做 Western 在同一张膜上检测目的蛋白和内对照，也是先上目的蛋白的一抗、二抗，ECL 显色、压片、洗片；漂洗以后，再上内对照的一抗、二抗，ECL 显色、压片、洗片。

7. PVDF 与 NC 膜的区别

PVDF 膜价格较贵，可重复使用，但结合能力较强。

NC 膜价格比较便宜，应用较广，结合牢固性较 PVDF 膜差，韧性也不如 PVDF，不能重复使用，但蛋白吸附容量高，亲水性较好。

8. Western 一抗的选用

理论上单抗比多抗的特异性要好，但单抗种类较少一般价格偏高，所以一般来说多抗足够了。

9. Western 抗体和 ELISA 抗体的区别

一般来说用于 western 的抗体主要识别氨基酸序列特异性；而可用于 ELISA 的抗体则要看抗原种类，有些是识别氨基酸序列特异性，有些是识别构像特异性。所以一般根据抗体说明书来确定。

做免疫印迹时选择抗体主要应考虑两个问题，一是所选抗体是否能识别凝胶电泳后转印至膜上的变性蛋白，另一个是所选抗体是否会引起交叉反应条带。

10. “短路”现象的产生和处理

如果纸、膜比凝胶大就比较容易形成短路了，上下两层滤纸也不能因过大而相互接触，这样同样会短路，电流不会通过胶和滤纸。转移前和转移过程中看看电压就行，正常的半干是慢慢变高的，最后结束时一般是开始的 1.5-3 倍都是正常的。一般 Buffer 和滤纸选的对就不会短路。

11. Western Blot 的染色

23. 阴离子染料是较常用的，特别是氨基黑，脱色快，背景低检测极限可达到 1.5 μ g，考马斯亮蓝虽然与氨基黑有相同的灵敏度，但脱色慢，背景高。丽春红 S 和快绿在检测后容易从蛋白质中除去，以便进行随后的氨基酸分析。缺点是：溶剂系统的甲醇会引起硝化纤维素膜的皱缩或破坏。不能用语正电贺的膜。灵敏度低。

24. 胶体金，灵敏度高，检测范围可到 pg 级，但染色比稳定。

25. 生物素化灵敏度位于 1、2 之间，可用于任何一种膜。

12. 大分子量蛋白转移效率低的解决方法

可以在转移缓冲液中加入 20% 甲醇（是指终浓度），因为甲醇能增加蛋白质和 NC 膜的结合能力，同时可以延长高分子量蛋白质转移时间；转移缓冲液加入终浓度 0.1% SDS，也是为了增加转移效率；选用优质的转移膜，或使用小孔径的 NC 膜（0.2 微米）；使用戊二醛交联。太大时还可以考虑用琼脂糖胶；提高转移电压 / 电流；增加转移时间。

13. DAB 显色、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶显色原理

DAB 显色在辣根过氧化酶的作用下能形成一种灰褐色的产物，该产物难溶于醇和其他有机溶剂，DAB 的氧化还能引起聚合作用，导致与四氧化钼反应而增加其染色强度和电子密度。碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶显色中，酶将奈酚磷酸（底物）水解成酚类和磷酸。酚和无色的重氮盐（显色原）结合而产生有色的、不溶性偶氮染料。

14. 酶显色与荧光显色的优缺点

免疫酶技术就是用酶标记已知抗体（或抗原），然后与组织标本在一定条件下反应并结合，结合形成的复合物中所含有的酶分子遇到底物时，会催化底物水解、氧化或还原，从而发生显色反应。免疫酶组化技术分为酶标记法与非标记抗体技术，前者是将酶通过交联剂结合在抗体分子上，形成酶标记抗体。后者是将酶作为抗原与相应的特异性抗体连接进行的免疫反应，称为非标记抗体酶技术。

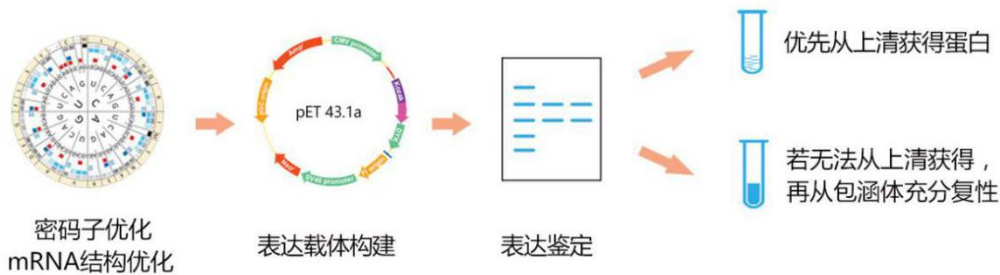
免疫荧光技术中的荧光抗体染色标本不能长期保存，对组织细胞的细微结构分辨不清，但免疫酶技术则能克服上述不足，标记免疫酶技术的敏感性更优于免疫荧光法。酶显色产物具有较高的电子密度，经过适当处理还可以进行免疫电镜观察。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

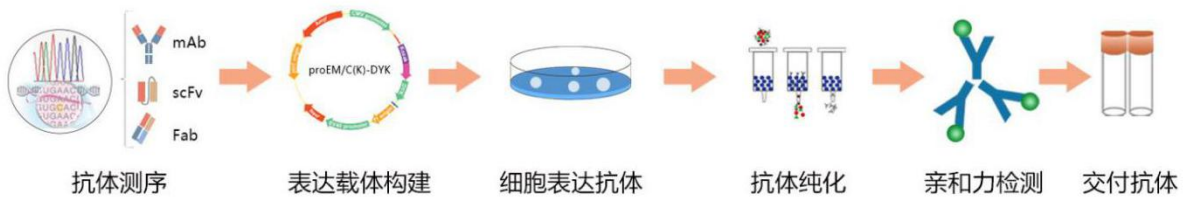
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

