

## 蛋白质免疫印迹法常见问题及解答

### 无信号

- 1、一抗和二抗不匹配：二抗需和一抗宿主的物种相同（一抗来自鼠，二抗便是抗鼠抗体）。
- 2、没有足够的一抗或二抗结合目标蛋白：使用高浓度抗体。4℃延长孵育时间。（如过夜）
- 3、封闭剂与一抗或二抗有交叉反应：使用温和的去污剂，如吐温-20，或更换封闭剂（常用脱脂奶粉、BSA、血清、明胶）。
- 4、一抗不识别待检物种的蛋白：参照说明书，对比免疫原序列和蛋白序列以确保抗体和目的蛋白会发生反应。设置阳性对照。
- 5、蛋白上样量不足：每条泳道蛋白上样量不超过 20ug，使用蛋白酶抑制剂并设置阳性对照。
- 6、组织中目的蛋白含量低：浓缩使信号最大化。
- 7、转膜不充分：使用可逆染色剂检测转膜效果，检查转膜操作是否正确。PVDF 膜需预先浸在甲醇中，然后浸到转移缓冲液中。
- 8、洗膜过度：勿过度洗膜
- 9、过度封闭使目标蛋白不能显色：使用 0.5% 奶粉或无奶粉代替 5% 奶粉的抗体稀释液。或更换封闭膜，减少封闭时间。
- 10、一抗失效：使用新鲜抗体，重复使用有效浓度会降低。
- 11、二抗受叠氮钠抑制：避免叠氮钠和 HRP 标记抗体一起使用。
- 12、检测试剂盒过期和底物失活：使用新鲜的底物。

### 背景高

- 1、未进行特异性封闭或封闭不充分：延长封闭时间，考虑更换合适的封闭剂。
- 2、一抗浓度过高：稀释抗体至合适浓度，以更高稀释度抗体延长孵育时间（耗时长，但特异性结合最好）。
- 3、二抗与封闭剂非特异性结合或反应：设置二抗对照（不加一抗）。
- 4、未结合蛋白质洗涤不充分：增加洗涤次数。
- 5、选膜不当产生的高背景：硝酸纤维素膜比 PVDF 膜背景低
- 6、膜干燥：在孵育过程中防止膜变干，每一步都要保证膜有充分的反应液，可放入搅拌子不断搅动或轻轻震荡使膜浸在溶液中。

### 多带现象

- 1、细胞传代次数过多，蛋白表达不同：使用原始未传代的细胞株，和现在的细胞株一起做平行对照实验。

- 2、体内表达的蛋白样本具有多种修饰形式如乙酰化、甲基化、烷基化、磷酸化、糖基化等：参考文献，使用试剂使样品去磷酸化、去糖基化来证明翻译后的修饰。
- 3、蛋白样本降解（蛋白质分子量降低）：在样品缓冲液中加入足够的蛋白酶抑制剂。
- 4、检测到未经报道过的新蛋白或同一蛋白家族中具有相似表位而结构不同的蛋白：查阅其他文献报道，或 BLAST 搜寻，使用说明书推荐的细胞株或组织。
- 5、一抗浓度过高，高浓度时常出现多条蛋白带：降低蛋白带和/或孵育时间。
- 6、二抗浓度过高，高浓度产生非特异性结合：降低抗体浓度，加入二抗对照（不加一抗）。
- 7、抗体未经纯化：使用亲和纯化的抗体，减少非特异条带。
- 8、目标蛋白形成多聚体：SDS-PAGE 电泳加样前，煮沸 10 min 而不是 5 min，使蛋白质解聚。

### 背景有不均匀的白色斑点

转膜时膜上有气泡或抗体在膜上分布不均：转膜过程中尽量去除气泡，抗体孵育时保持摇动。

### 背景有黑色斑点

抗体结合了封闭剂：过滤封闭剂

### 深背景出现白色条带

一抗或二抗加入过多：稀释抗体的浓度

### 目的条带染色过低/过高

- 1、分离不彻底
- 2、改变凝胶比例：分子量大的蛋白用低浓度胶，分子量小的蛋白用高浓度胶。

### 条带“微笑”效应

- 1、迁移过快
- 2、电泳温度过高（改变了 pH 值和迁移速度）。降低迁移速度或低温电泳。（冷库或冰上）。

### 相同蛋白杂交出现了不均匀条带

- 1、制备凝胶时，凝胶凝固太快，致使泳道中丙烯酰胺的比例不均匀。
- 2、参照凝胶的配方，在凝胶中加入适量 TEMED，放置时在凝胶顶部加入适量 0.1% SDS（水稀释）以防凝胶变干。

### 凝胶染色不均匀

- 1、细菌污染：4℃保存抗体并使用新鲜的缓冲液浸泡胶体。
- 2、抗体量不足：确保振荡条件下孵育膜或抗体充分覆盖膜。