

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，导致与四氧化钨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。

更多优质服务推荐

1

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。

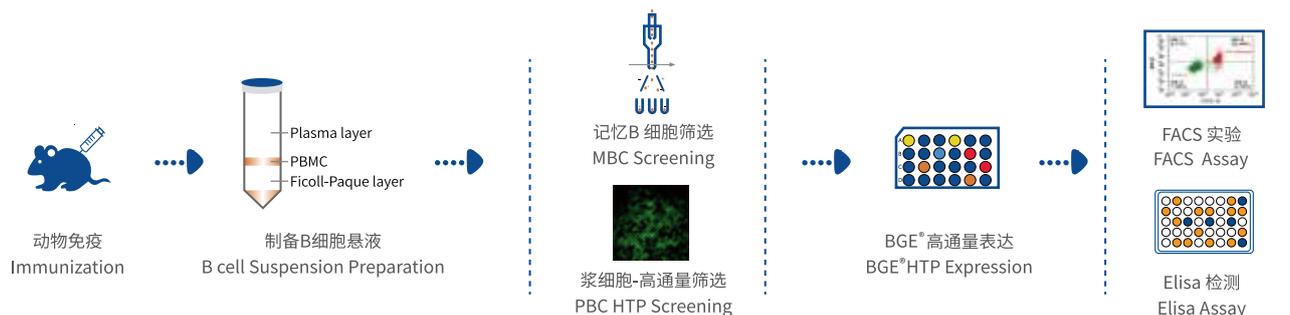
平台优势

- 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

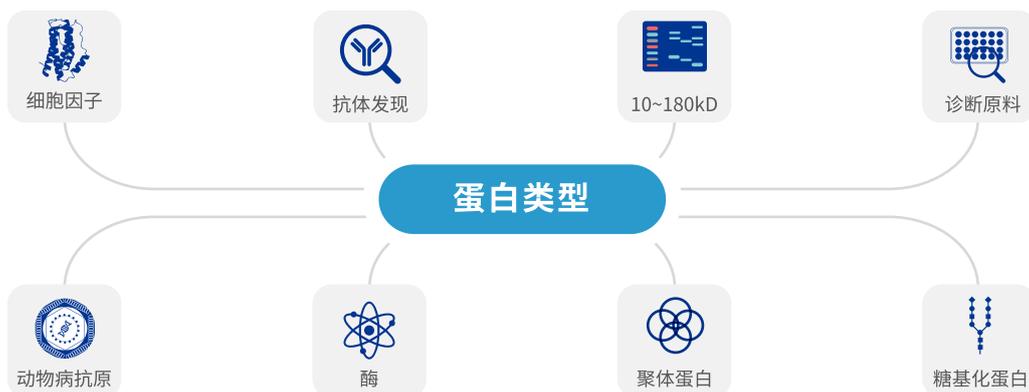


Recombinant Protein Expression Service

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。

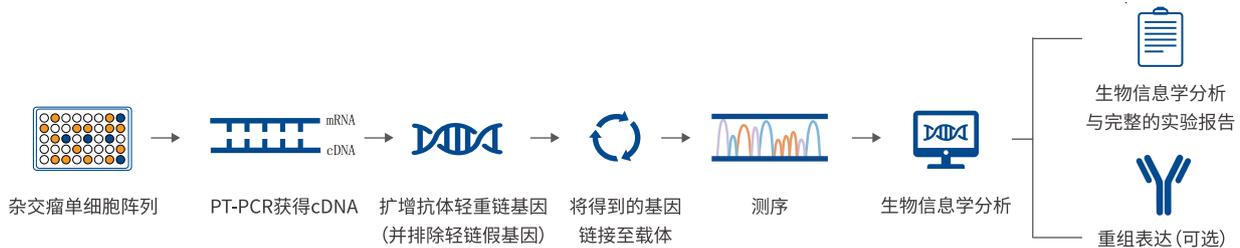
应用场景

- 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



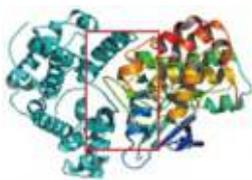
5

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。

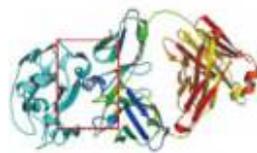
检测范围



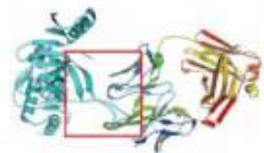
蛋白和蛋白



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



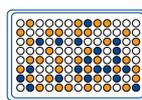
基因合成&质粒抽提



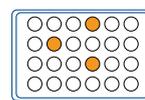
稳定转染



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