

Western Blot实验 常见问题排查与应对指南



目 录

一、无目标蛋白条带问题应对	01
二、样本提取质量问题应对	01
三、高背景问题应对	03
四、蛋白条带与理论分子量存在偏差问题应对	04
五、蛋白多条带问题应对	05
六、小分子量蛋白WB检测针对性技术建议	06
七、大分子量蛋白WB检测针对性技术建议	06
八、同一张膜进行多个蛋白靶标的同时检测针对性技术建议	06
九、内参选择相关建议	07
十、蛋白磷酸化修饰检测建议	08
十一、凝胶配制、电泳及转膜相关问题应对	08
十二、其他各类问题	09

一、无目标蛋白条带问题应对

问题描述：丽春红染色有结果，但是后面杂不出目的蛋白的预期条带，是为什么呢？

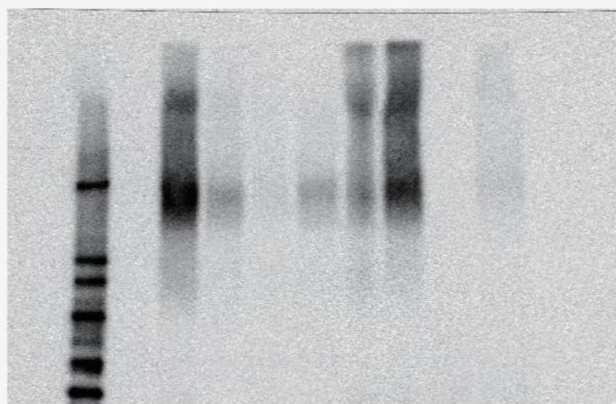
- ◆ 答：丽春红染色主要是来对转移到膜上的所有蛋白进行一个显色，从而初步判断蛋白转移过程是否正常。它只能说明膜上是不是有蛋白，但对某一个具体蛋白是不是在这些蛋白里面是无法直接判断的。如果目的蛋白无法在WB当中检测到结果，涉及因素比较多，需要逐一排查各类可能的问题。其中一个比较简单的办法，就是对内参蛋白的WB结果进行分析，首先排查整个转移和抗体杂交过程是否存在异常。另外，使用确定有目的蛋白表达的阳性细胞裂解物同时进行WB平行检测，来排查样本和试剂两方面的问题。具体来说，需要确定以下几个基本问题：
- ◆ A) 目的细胞是否表达这种蛋白，丰度如何？是否有别的实验方法已经证明？比如mRNA水平检测等。
 - ◆ B) 是否使用阳性细胞裂解物作为阳性对照进行过平行检测？我们建议通过文献或数据库，确定合适的阳性细胞裂解物，用于排查实验过程当中问题，这是最好和最快捷的方法。
 - ◆ C) 提取蛋白的细胞裂解液中是否加入蛋白酶抑制剂，防止降解。
 - ◆ D) 是否按照我们建议的标准操作流程进行实验？我们可以提供标准操作流程来用于排查实验过程当中问题。

二、样本提取质量问题应对

问题描述：我的总蛋白提取后，发现样本裂解物偶尔有不溶物，还有的有沉淀，有的很清亮，为什么呢？

问题描述：我的不同实验组样品利用BCA法进行浓度测定后，按照相同上样量30 μg 进行体积计算，然后上样进行WB检测后，依然发现内参条带存在明显差异，感觉BCA法测定存在误差，有什么很好的方法去解决吗？

问题描述：我的样本做完WB检测，发现膜上整个泳道背景深，有很多长长的拖尾，条带也是歪歪扭扭，这是什么问题？



◆ 答: 当蛋白提取不佳造成总蛋白纯度不足或离子浓度过高时, 会造成测定的误差 (BCA法蛋白浓度测定受到多种裂解物成分的影响), 继而导致上样误差等问题。甚至, 由于蛋白当中含有多种杂质成分, 导致蛋白在电泳时受到杂质成分影响, 影响电泳行为和最终条带质量。因此, 我们建议: A) 使用足量的蛋白裂解液进行细胞裂解, 可以适当提高SDS的浓度 (比如使用1% SDS裂解液), 配合多种机械破碎方式 (如组织破碎仪处理、匀浆、研磨等方法), 确保细胞或组织裂解充分; B) 当提取组织样本时, 进行超声处理, 使用最大功率为100 W的模式, 调至最大功率的30-40%, 5秒钟超声1次, 间隔10秒, 循环超声3-5次; C) 如提取样本后第一次测定蛋白浓度后, 发现浓度偏高 (超过10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 建议利用样本裂解液进行适当稀释并混匀后, 再进行浓度测定, 使最终测定浓度处于1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 为宜; D) 如样本提取后, 高速离心后仍然发现上清不够清亮, 存在不溶物, 可以考虑使用吸附柱式蛋白提取试剂盒进行纯化, 得到的蛋白纯度会大大提升, 然后再进行蛋白浓度测定或进行后续步骤的WB检测, 准确率也会大大提高。

问题描述: 我的蛋白提出来浓度很低, 跑的条带特别淡, 有什么解决方法吗?

答: 您提到这个蛋白提出来浓度很低的情况, 在蛋白的提取过程上肯定是要做一些调整的。我们首先要提到足够的蛋白, 总的组织或细胞量, 裂解液的体积和裂解强度都要足够。一般来说我们建议细胞或组织样本量和裂解液体积之间要有一个适当的比例关系, 可以参考下表进行裂解液体积的确定;

样本类型	样本量	裂解液类型	裂解液体积
细胞样本	96 孔板每孔细胞 ($\sim 1 \times 10^5$ 细胞数)	RIPA 裂解液	20 μL
	24 孔板每孔细胞 ($\sim 5 \times 10^5$ 细胞数)	RIPA 裂解液	50 μL
	12 孔板每孔细胞 ($\sim 1 \times 10^6$ 细胞数)	RIPA 裂解液	100 μL
	6 孔板每孔细胞 ($\sim 2 \times 10^6$ 细胞数)	RIPA 裂解液	200 μL
	10 cm 直径培养皿对应细胞 ($\sim 1 \times 10^7$ 细胞数)	RIPA 裂解液	500 μL -1000 μL
组织样本	20 mg	RIPA 裂解液或 1% SDS 裂解液	200 μL (以此类推)

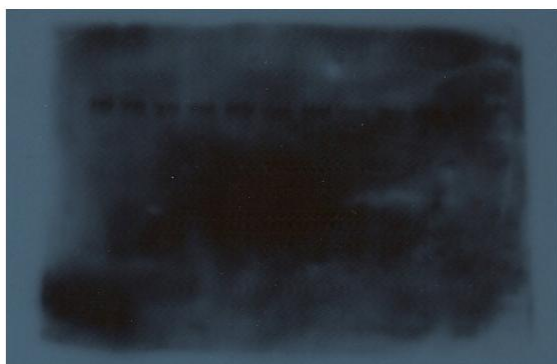
◆ 答: 我们建议: A) 使用足量的蛋白裂解液进行细胞裂解, 可以适当提高SDS的浓度 (比如使用1% SDS裂解液), 配合多种机械破碎方式 (如组织破碎仪处理、匀浆、研磨等方法), 确保细胞或组织裂解充分; B) 当提取组织样本时, 进行超声处理, 使用最大功率为100 W的模式, 调至最大功率的30-40%, 5秒钟超声1次, 间隔10秒, 循环超声3-5次;

问题描述: 我最近做WB, 想检测iNOS蛋白, 但是发现实验结果不稳定, 比如有的时候第一次提蛋白后能够检测到, 后面就检测不到了, 这是怎么回事?

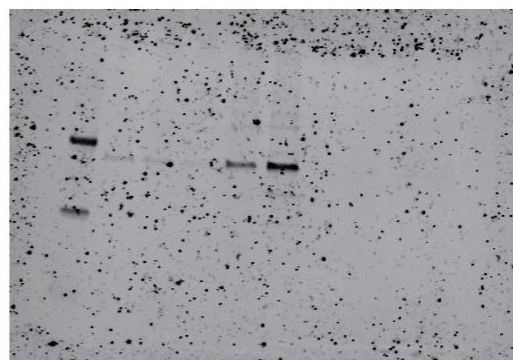
◆ 答: 从您的描述来看, 应该还是和蛋白稳定性有很大的关系。这个实际上也和这个iNOS这个蛋白本身不稳定有关系, 所以我们就格外注意, 做这个蛋白的时候尽量要获得满意和比较确信的结果, 最好使用新鲜制备的样本来做, 这是第一条。第二条就是说要尽可能的减少这个样本的降解的可能性, 那就加足量的蛋白酶抑制剂, 当然在后续重复这个实验结果的时候, 如果发现检测有不稳定的情况, 最好是这个结果不要采用。如果我们的生物学重复并没有严格去做, 那么您这个结果也是不可信的。最好的办法就是严格进行生物学重复, 即每次从模型构建开始, 新鲜制备样本立刻进行WB检测, 虽然会费事, 但是重复后的结果会更加可信。

三、高背景问题应对

问题描述：我的WB结果看起来脏脏的，感觉到到处都是黑乎乎的，似乎蒙着一层东西，这是为什么？



问题描述：蛋白质印迹膜上的有很多黑点，这是怎么回事？



答：一般背景较高，与如下多个可能原因有关：

- 1- 样本提取效果不佳，纯度不够；
- 2- 封闭步骤没有做好，比如封闭液失效，或封闭不完全；
- 3- 抗体（包括一抗和二抗）浓度过高，膜洗涤不充分，可以造成抗体在膜上的非特异结合，导致高背景；
- 4- 操作过程中膜过度干燥，或膜被污渍附着；
- 5- 发光液质量问题，或过多的发光液残留于膜上，或曝光过度。

综合上述原因，我们建议：

- 样品是否来源于组织，如果是组织样品，我们建议：A) 使用足量的蛋白裂解液进行细胞裂解，可以适当提高SDS的浓度（比如使用1% SDS裂解液），配合多种机械破碎方式（如组织破碎仪处理、匀浆、研磨等方法），确保细胞或组织裂解充分；B) 当提取组织样本时，进行超声处理，使用最大功率为100 W的模式，调至最大功率的30-40%，5秒钟超声1次，间隔10秒，循环超声3-5次；C) 如提取样本后第一次测定蛋白浓度后，发现浓度偏高（超过10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ），建议利用样本裂解液进行适当稀释并混匀后，再进行浓度测定，使最终测定浓度处于1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 为宜；D) 如样本提取后，高速离心后仍然发现上清不够清亮，存在不溶物，可以考虑使用吸附柱式蛋白提取试剂盒进行纯化，得到的蛋白纯度会大大升高，以减少WB实验后的背景信号；
- 封闭液新鲜配制，最好使用高质量的实验级脱脂奶粉来配置封闭液，并且充分溶解和混匀后使用，保证足够的封闭时间；
- 调整一抗和二抗的稀释比例，使用更高的稀释比例，通过多次WB实验对结果加以优化；并且一抗孵育温度不宜过高，最好4度过夜；
- 抗体孵育后，充分洗膜，可以适当增加洗涤时间；
- 确保发光液在效期内，使用适量的发光液去显影，可以把多余发光液从膜的侧边用吸水纸吸走，适当缩短曝光时间；

问题描述：目标带是空白，周围有背景，是为什么？如何应对？

- ◆ 答：原因：条带中心部位高浓度HRP将底物消耗过快，中间部位底物消耗完后无法发光，造成条带中部空白即“反白现象”。
- ◆ 针对性建议如下：
- ◆ 上样量可以适当减少；
- ◆ 调整一抗和二抗的稀释比例，使用更高的稀释比例，通过多次WB实验对结果加以优化；并且一抗孵育温度不宜过高，最好4度过夜；
- ◆ 抗体孵育后，充分洗膜，可以适当增加洗涤时间；
- ◆ 确保发光液在效期内，使用适量的发光液去显影，可以把多余发光液从膜的侧边用吸水纸吸走，适当缩短曝光时间；

四、蛋白条带与理论分子量存在偏差问题应对

问题描述：一些蛋白条带在WB显影后发现与说明书图片不符，有一定偏差，是不是抗体有问题？

- ◆ 答：对于这个问题，我们也在其他用户使用当中碰到，并不一定是抗体的问题，要根据实际情况加以判断。
- ◆ A- 如果是1~5 KD的偏差，都是正常的，因为很多蛋白在不断被研究中发现，存在多种蛋白翻译后修饰，如磷酸化、泛素化、糖基化等，会造成蛋白电泳行为的偏移，从而影响蛋白实际条带的位置；
- ◆ B- 如果是蛋白被体外的蛋白酶降解，也会造成分子量变小的情况，这种情况下蛋白分子量偏移较大，同时显影结果当中会有“拖尾”现象，需要考虑样品制备和保存的问题，防止降解；
- ◆ C- 所使用的细胞系是否多次传代，因为多次传代的肿瘤细胞，有可能出现蛋白分子量偏移的问题，主要是转录本发生了变化；
- ◆ D- 肿瘤细胞或组织某些基因表达模式会发生异常（比如异常的转录起始位点或异常加工过程），造成蛋白对应的基因mRNA存在异常转录本，从而影响该蛋白的实际分子量；
- ◆ E- 一些蛋白复合体在裂解时没有充分分离，个别情况下会存在条带偏差，如ATG5-ATG12复合体，当使用ATG5的抗体去杂交，就有可能出现ATG5-ATG12复合体的条带；
- ◆ F- 个别情况下，蛋白对应基因发生异位，造成重组蛋白，影响分子量；
- ◆ G- 如果出现条带比预期分子量成倍增加的时候，考虑是不是存在多聚体的情况；
- ◆ H- 抗体质量问题，特异性受到影响，建议使用蛋白高丰度表达的阳性对照裂解物或基因敲除(KO)细胞裂解物进行上样，然后进行WB检测，去查找抗体是否有问题；
- ◆ I- 蛋白序列性质带来的大小偏差：很多蛋白中有内在无序区域IDR (intrinsically disordered region)，一个蛋白中如果有较多比例的IDR，会造成蛋白电泳行为的偏移，表观分子量大于理论分子量；
- ◆ J- 蛋白电泳条件的变化，如蛋白marker在不同电泳缓冲液中的表观分子量有微小变化，从而影响我们对目的蛋白分子量的判断；蛋白电泳距离在两个实验中并不完全一致，也会对靶蛋白分子量判定带来变化。

五、蛋白多条带问题应对

问题描述：一些蛋白条带在WB显影后发现与说明书图片不符，出现多个条带，是不是抗体有问题？

- ◆ 答：对于这个问题，我们也在其他用户使用当中碰到，并不一定是抗体的问题，要根据实际情况加以判断。
- 有一些研究者在没有经过仔细查证的情况下，偏执地认为某一个蛋白的WB检测结果一定会是一个单一条带，那这个是不正确的，或者说这是一个不妥当的想法。WB结果出现多条带的原因有如下常见的几个方面：
- ◆ 1- 蛋白存在异构体。建议首先通过专业的数据库（一般我推荐uniprot）去查阅某一个目的蛋白可能存在的分子量不同的异构体（异构体是指同一个基因会由于转录或mRNA加工过程，产生好几个不同的分子量的蛋白）。这个抗体在识别这些蛋白的时候，就会同时识别这几个异构体，它自然也就多个条带。这个可以通过异构体的理论分子量来进行排查。
- ◆ 2- 第二种情况就是存在修饰，因为很多蛋白都是有翻译后修饰的，包括磷酸化、糖基化、泛素化等，那么就在蛋白某一些氨基酸上多了一些基团，它会造成电泳行为的改变，并在某一些分子量周边较小的范围内出现多个条带，这是另外一种情况。
- 上述两种情况我们可以通过这个条带的具体的分布，要结合这个具体的结构图片来进行一个针对性的判断。
- 通过具体的基因敲除（KO）或敲低（KD）细胞样本进行WB验证分析，你就知道其中哪一个（或一些）条带是真正与目的蛋白相关的。
- ◆ 3- 蛋白也可能存在降解，蛋白降解之后，它也有可能出现一些距离较远的较小分子量区域出现多个条带。通过观察泳道内的条带情况，是可以分辨的，比如降解的蛋白常常出现条带大小不一，也会在泳道内带有一些背景信号。
- ◆ 4- 抗体的特异性不佳，导致抗体识别了一些无关蛋白，出现预期理论分子量之外的条带。
- 如果是多抗，可以通过抗体稀释比例调整来尽量优化，得到相对满意的结果。另外，选择特异性较高的单抗来最终解决这个问题。
- ◆ 5- 组织样本会在样本制备过程当中，带有一些杂质蛋白，会带来一些非特性的干扰。可以通过结合机械破碎的组织蛋白提取方式，对提取的蛋白样本进行一些纯化过滤来减少杂质蛋白成分。

问题描述：我做一个蛋白p38，发现有多条带，后来我查了一下，是因为存在多个亚型，导致出现多条带，那么我该如何获取条带的密度值进行定量呢？

- ◆ 答：p38 MAPK是1993年由Brewster等人在研究高渗环境对真菌的影响时发现的。以后又发现它也存在于哺乳动物的细胞内，也是MAPKs的亚类之一，其性质与JNK相似，同属应激激活的蛋白激酶。已发现p38MAPK有5个异构体，分别为p38 α （p38）、p38 β 1、p38 β 2、p38 γ 、p38 δ 。其分布具有组织特异性：p38 α 、p38 β 1、p38 β 2在各种组织细胞中广泛存在，p38 γ 仅在骨骼肌细胞中存在，而p38 δ 主要存在于腺体组织。因为p38 MAPK确实存在多个异构体，而且这些异构体都是非常重要的。一般来说如果没有特别指出的话，我们都不会单独对某一个亚型进行检测。市面上针对p38MAPK的大多数抗体是可以同时识别这些不同异构体的，也就是它反映的是p38各个异构体的一个总量。而这个时候，我们往往会圈选它多个亚型多个条带一个总体的intensity（比如利用软件分析灰度值），来进行各个样本之间的一个表达量的分布的一个评估。

六、小分子量蛋白WB检测针对性技术建议

问题描述：对于分子量小于20kD（如Caspase-3、LC-3等）的一些蛋白，如何进行针对性WB技术方面的调整，来得到更好的结果？

- ◆ 答：A) 使用较高浓度（12-15%）的蛋白分离胶进行蛋白电泳分离，电泳时间不宜过长，防止蛋白跑出胶块；B) 在转移阶段，在转移缓冲液当中增加甲醇含量到20%，建议选择0.22 μM规格PVDF或NC膜进行转移；C) 缩短转膜的时间，建议在1小时以内。

七、大分子量蛋白WB检测针对性技术建议

问题描述：对于分子量大于200kD的一些蛋白，如何进行针对性WB技术方面的调整，来得到更好的结果？

- ◆ 答：针对性技术建议如下：
- 按照上面第二部分“样本提取质量问题应对”的样本提取流程建议进行样本制备，确保蛋白溶解性良好，杂质含量少；
- ◆ 上样缓冲液与样本充分混合，煮沸，确保样本的可溶性；
- ◆ 适当对PAGE分离胶浓度进行一个调整，配制8%或者以下浓度，确保凝胶凝固均匀；
- ◆ 转印缓冲液中含有0.1%的SDS，降低转印缓冲液中的甲醇浓度到10%或更低；
- ◆ 200-250mA，稳定电流模式，转移2小时或更长；但必须控制温度，保证低温电泳和电转。

八、同一张膜进行多个蛋白靶标的同时检测针对性技术建议

问题描述：如何在同一张膜上实现多个分子量不同蛋白的检测？

- ◆ 答：有两种方法可以实现：
- A) 将蛋白印记完成后的膜按照预期分子量进行裁切后，分别进行杂交；
- B) 一些蛋白的对应抗体通过预实验，发现混合后不会出现交叉反应，也不会影响各自蛋白的检测（即按照不同蛋白对应抗体的最佳稀释比例，在同一管抗体稀释液当中稀释混合后进行检测获得的WB结果，与任何一个抗体单独稀释和检测没有明显差别，需要通过提前做预实验确定），可以用稀释后多种抗体的混合物在整张膜上进行杂交，所使用的一抗最好是同一个种属来源，方便同种二抗选择、杂交和检测。

问题描述：如何在同一张膜上实现磷酸化蛋白和总蛋白的检测？

- ◆ 答：很多时候我们需要同时在一张膜上进行磷酸化蛋白和总蛋白的检测，一般我们会先在第一轮杂交，用磷酸化抗体进行杂交，获得磷酸化蛋白的条带。然后我们会利用蛋白再生液 (stripping buffer) 将原有的抗体（包括一抗和二抗）洗脱，注意洗涤时间一般在30分钟内，否则会造成蛋白信号的衰减（建议严格按照蛋白再生液 (stripping buffer) 的标准操作说明书进行）。然后，再对膜重新进行TBST洗涤和封闭，进行后续第二轮总蛋白抗体的杂交和显影。

九、内参选择相关建议

问题描述：内参都有哪些呢，有没有什么选择的标准呢？

- ◆ 答：内参蛋白一般都是一些持家基因表达的蛋白，即在不同实验条件处理下表达量基本不变的蛋白。最常见的三种内参蛋白是： β -actin (43KD)、GAPDH (37KD)、Tubulin (55KD) 等，可用于胞浆和全细胞蛋白的WB检测。同时，也需要根据目的蛋白的分子量范围进行合理的选择，以避免内参蛋白与目的蛋白分子量过于接近，不利于后续实验结果分析。但实际上，并没有任何一个蛋白在任何模型和实验条件下都不发生变化。随着研究的不断发展，一些通常使用的内参蛋白也有可能不再适合作为内参蛋白，要求我们在某些情况下应该避免。如GAPDH，在一些代谢相关模型中（如缺氧引起的自噬模型），会发生一定的修饰和表达变化，因此进行代谢相关研究，要谨慎使用。又如actin微丝组分，在一些细胞骨架相关（如肿瘤转移）研究中，是应该谨慎考虑的。

问题描述：如果是细胞不同组分提取后的蛋白，如何选择合适的内参，来校正上样量呢？

- ◆ 答：对于不同的细胞组分，有不同的内参蛋白选择，供大家参考。

内参蛋白	理论分子量大小	使用范围	ABclonal 推荐产品
Na-K-ATPase	100kDa	细胞膜	A11683
VDAC1/Porin	31kDa	线粒体	A19707
COX IV	16kDa	线粒体	A11631
TBP	38kDa	细胞核	A11600
Histone H3	15kDa	细胞核	A17562, A22348
Lamin B1	67kDa	细胞核	A11495

十、蛋白磷酸化修饰检测建议

问题描述：我在做蛋白磷酸化的分析，有时候检测不到信号，有哪些方面需要注意一下？

- ◆ 在细胞培养和模型建立阶段就要注意，要进行合理的模型构建方式，确定合理的刺激条件（比如通过预先摸索过的合理的刺激物、作用终浓度和处理时间），设立合适的阳性对照（利用已知公认的刺激条件单独设置一个样本组）。通过合适的这个刺激物制备的阳性对照品，可以帮助来排查样本制备、试剂和实验操作的问题。
- ◆ 因为磷酸化非常的不稳定，新鲜制备的样品所获得的结果是最有效和最可信的。因此，我们建议使用含有充足的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的样本裂解液来新鲜制备样本，尽量第一时间检测，避免使用反复冻融的样本来进行重复检测。
- ◆ 按照我们建议的WB标准操作流程来进行操作，使用经过严格验证的高质量磷酸化特异性抗体来进行检测，确保结果的可信和可重复性。

十一、凝胶配制、电泳及转膜相关问题应对

问题描述：怎样才能让条带更漂亮，凝胶配制、电泳及转膜操作应该注意什么？

- ◆ 答：关于WB的配胶及电泳操作，提供2个小建议：
 - ① 胶越均匀，条带越窄，分离越均匀。因此，倒胶之前，一定要充分混匀(不要有气泡)，玻璃板一定要干净，利用双蒸水或异丙醇隔离时，一定要缓慢加上去，避免扰动分离胶，造成凝胶浓度不均；
 - ② 电压越小，条带越漂亮，浓缩胶55V，分离胶75V就能跑得很好，但是实验的时间会适当延长。

凝胶配制、电泳及转膜常见问题排查

- ◆ ① “~” 条带呈笑脸状

原因：凝胶不均匀冷却，中间冷却不好；电泳系统温度偏高，而且电场强度太大(电泳的电场大致呈现U形，所以因为赶时间而加大电压可能会出现这个)。
- ◆ ② “^” 条带呈皱眉状

原因：可能是由于装置不合适，特别可能是凝胶和玻璃挡板底部有气泡，或者两边聚合不完全。
- ◆ ③ 条带拖尾

原因：样品溶解不好，或存在一定程度地蛋白降解。
- ◆ ④ 纹理(纵向条纹)

原因：样品中含有不溶性颗粒，可能抽提蛋白时出了问题。
- ◆ ⑤ 条带偏斜

原因：电极不平衡或者加样位置偏斜，一定要在平面操作台上电泳，胶要做好。

⑥条带两边扩散

原因：加样量过多，弥散至孔周围了，减少上样量或者使用5X上样缓冲液。

⑦条带中空

原因：凝胶没有配好，转膜时有气泡或者碎胶块。

问题描述：电泳及转膜时候胶有时候会收缩或者发热怎么应对？

答：出现这种问题，主要是凝胶里的水分被电泳产热蒸发了。建议检查整个电泳和转移体系，包括电泳缓冲液、转移缓冲液是否保持较好的缓冲能力，如有必要可以全部更换；另外，检查三明治结构是否保持充分浸润，三明治结构是否过紧，导致导电效果不佳；电泳电压和转移电流是否过大，利用冰浴保证低温电泳和电转。

十二、其他各类问题

问题描述：“我原来在你们这买的一支抗体，开始的时候是好的，怎么用着用着到现在就曝光不出来了啊？”

答：这个情况可以从两个方面考虑一下，首先是实验样本的排查，不同批次准备的实验样品是否存在不稳定性，或保存不当或反复冻融引起的样本质量变化。我们建议您选择一个合适的阳性对照（利用已知公认的刺激条件或高表达的细胞系提取蛋白，单独设置一个样本组）。通过合适的阳性对照品，可以帮助来排查问题到底出在样本制备，还是试剂和实验操作的问题。

还有一种可能是抗体的保存问题。我们的抗体出于防冻的目的会在其中添加甘油，在使用过程中环境的变化可能会影响抗体在溶液中的分布和稳定性。建议就是每次抗体从冰箱取出后，最好在冰上进行操作，先将原管的抗体混匀，再快速进行吸取操作，及时将原管抗体放回冰箱。另外，一般我们都建议将抗体保存于-20℃冰箱，建议不要更换为更低的保存温度。

如果通过使用阳性裂解物进行实验排查后，发现抗体确实无法再正常使用，我们也会通过售后技术人员合理为您处理抗体质量问题。

问题描述：“为什么我用你们的蛋白marker和抗体，在曝光的时候marker也会出现条带啊？”

答：其实，蛋白marker是由很多的重组蛋白染色后按一定比例添加组合而构成的，而每次我们使用蛋白marker同样品一起跑胶并转印到膜上后，在一抗杂交阶段，这些蛋白marker中某些未知的蛋白组成成分，蛋白序列可能与一抗识别的抗原序列有相似（甚至完全相同的序列），那就会和一抗产生交叉反应，进而显影。说来很有意思，我们有一些客户还专门会去寻找这种能和目的蛋白一起曝光出来的蛋白marker。对于您的这个问题，我们建议通过裁膜的方式将蛋白的marker条带先进行一步分离，只要您的目的条带正常显影，没有受到干扰，我想这个问题不需要太担心。