常见问题 – 为什么在我的蛋白印迹中看到很多条带？

蛋白或者免疫印迹对在复杂混合物中检测蛋白抗原是一个常用的技术。样品首先由SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。然后分离的蛋白被转移到膜上（通常是硝化纤维、聚乙烯醇、尼龙）。这些膜与目标蛋白的特定抗体孵育，该抗体会与固定在膜上的蛋白条带结合。然后用检测系统对抗体进行观察，该检测系统通常基于与Ig链结合的二级蛋白质，该蛋白质与变色反应有关。
与理论预测相反，检测到一些条带是很常见的。虽然有可能抗体对蛋白质不完全特异，但其他因素也可能起作用:

- **抗原的蛋白水解分解。**这是很常见的，特别是如果样品储存时间长或者如果蛋白或膜在起始组织均质化后分离。所有附加条带表观分子量都低于全长蛋白。特别易受影响的是突触蛋白类和突触结合蛋白。蛋白酶抑制剂例如苯甲基磺酰氟、胃酶抑素或者亮抑酶肽的添加需要被考虑。

- **每个电泳泳道有太多蛋白或者检测系统太敏感。**凝胶过载是条带重影最常见的原因之一。固定的蛋白可提供一个浓缩的可吸附表面，使得某些免疫球蛋白G可与之非特异性结合。同样的，当使用高敏感性检测系统例如加强的化学荧光，则可以发现这些非特异性结合。起始材料的稀释系列通常可以澄清哪些信号是人造的。

- **无效率阻断。**多种不同的阻断试剂包括非离子型洗涤剂和/或蛋白已在文献中被描述。改变阻断条件可解决问题。

- **抗原浓度过低。**SDS-PAGE的清晰度只限于50 – 100条带。如果目标抗原的相对浓度过低（低于总蛋白的0.2%），会很难检测。例如，小突触泡蛋白/VAMP与细胞匀浆中的组蛋白结合，会干扰其检测。然后信号增强会导致人工条带外观。通过分馏或免疫沉淀反应富集抗原也应该被考虑。

几乎我们所有的抗体都成功地进行了免疫印迹测试，并在相对粗略的片段中检测出单个条带。
除此以外，一些条带并不总是次优实验条件或交叉反应的结果。许多蛋白具有多个亚型，一个抗体会检测到其中的一种以上。