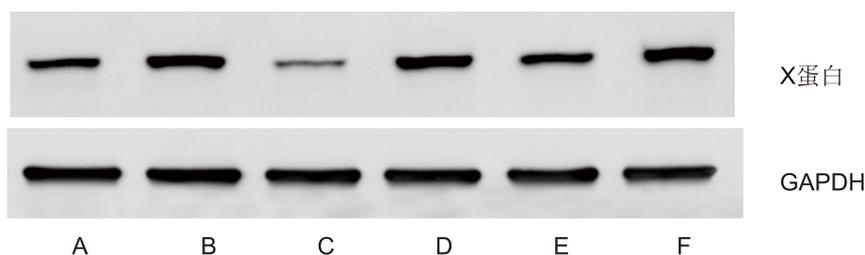


八、结果分析

关于Western Blot结果进行灰度分析，推荐使用Image-Pro Plus软件（下载不到的可来信咨询info@haigene.cn），它原理是应用IOD算法，它操作简单，结果可靠，重复性好。目的蛋白灰度=目的蛋白IOD/内参IOD，需要说明的是，灰度值只是一个相对值，不同组间的灰度值对比，反应的是目的蛋白的变化趋势。下面以实例说明其使用方法：



1. 首先，Image-Pro Plus软件只识别.TIF格式的图片，所以请将需要分析的图片转换为TIF格式，并裁切成只含目的条带的图片，

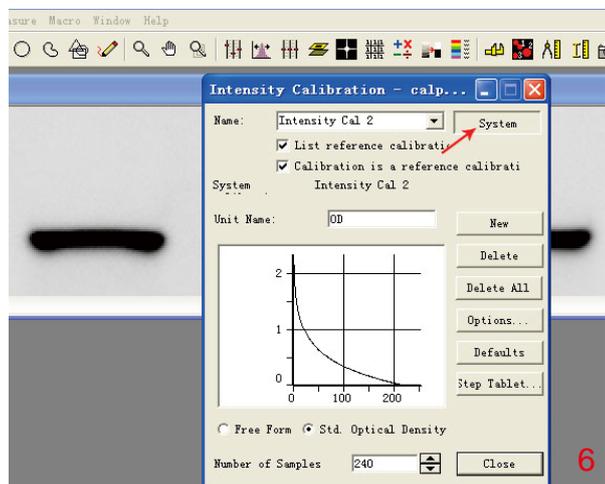
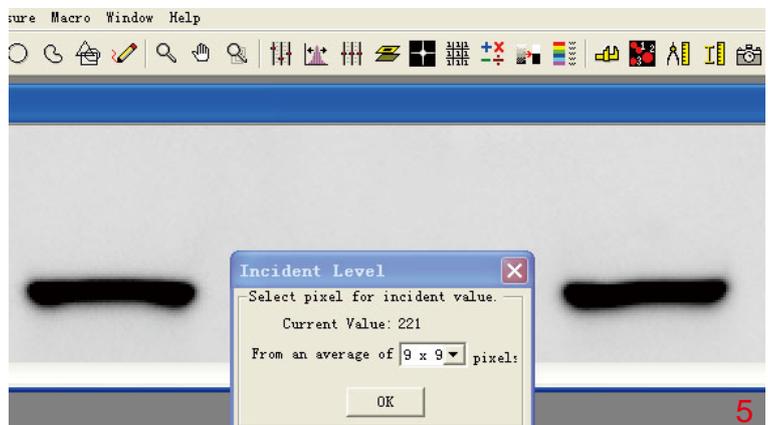
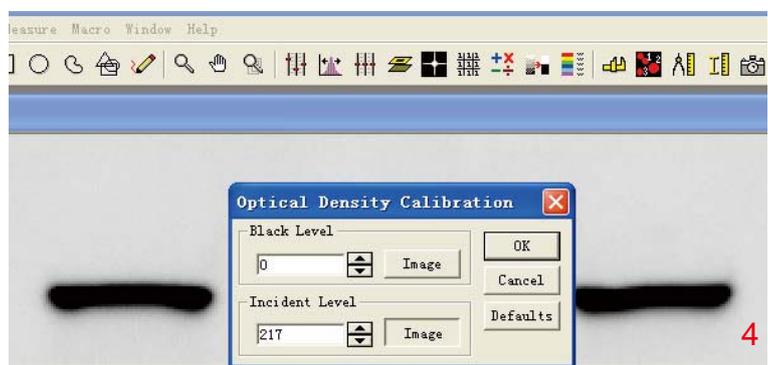
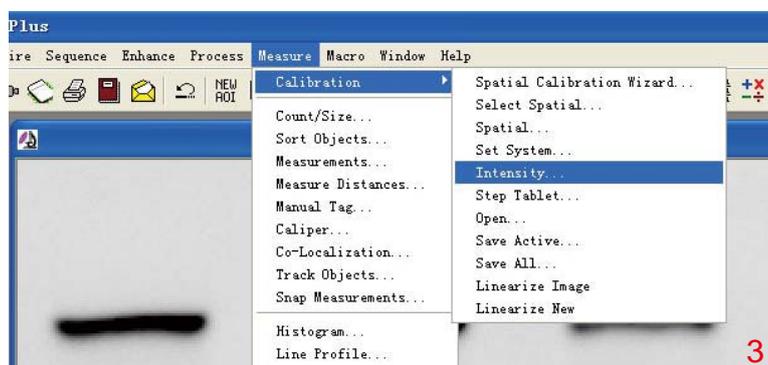


2. Image-Pro Plus打开需要分析的图片，剔除背景：

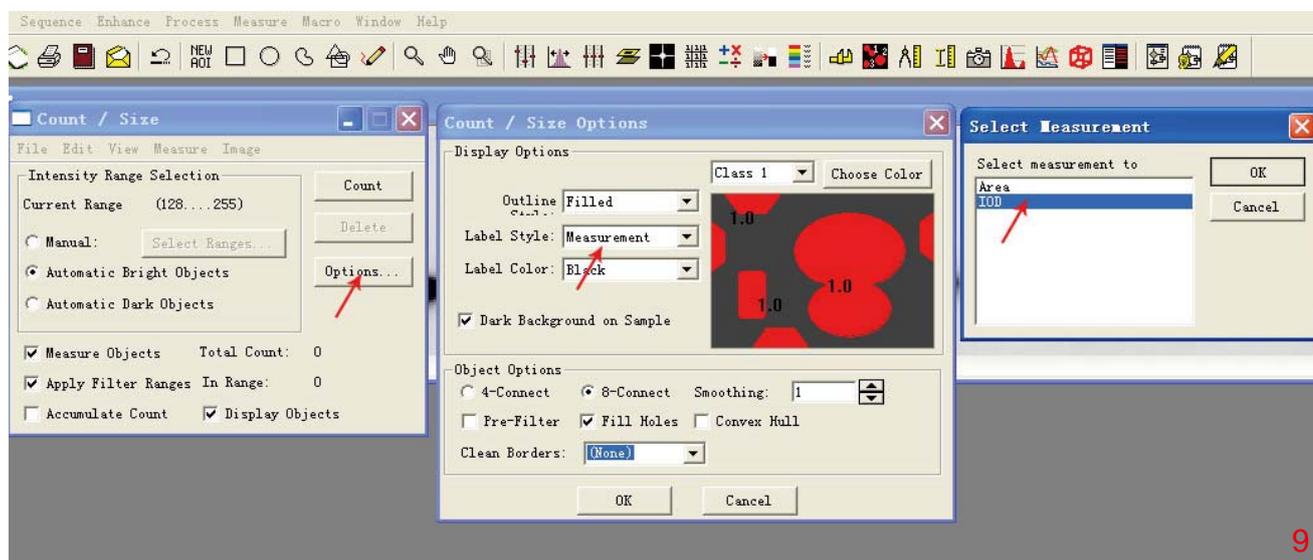
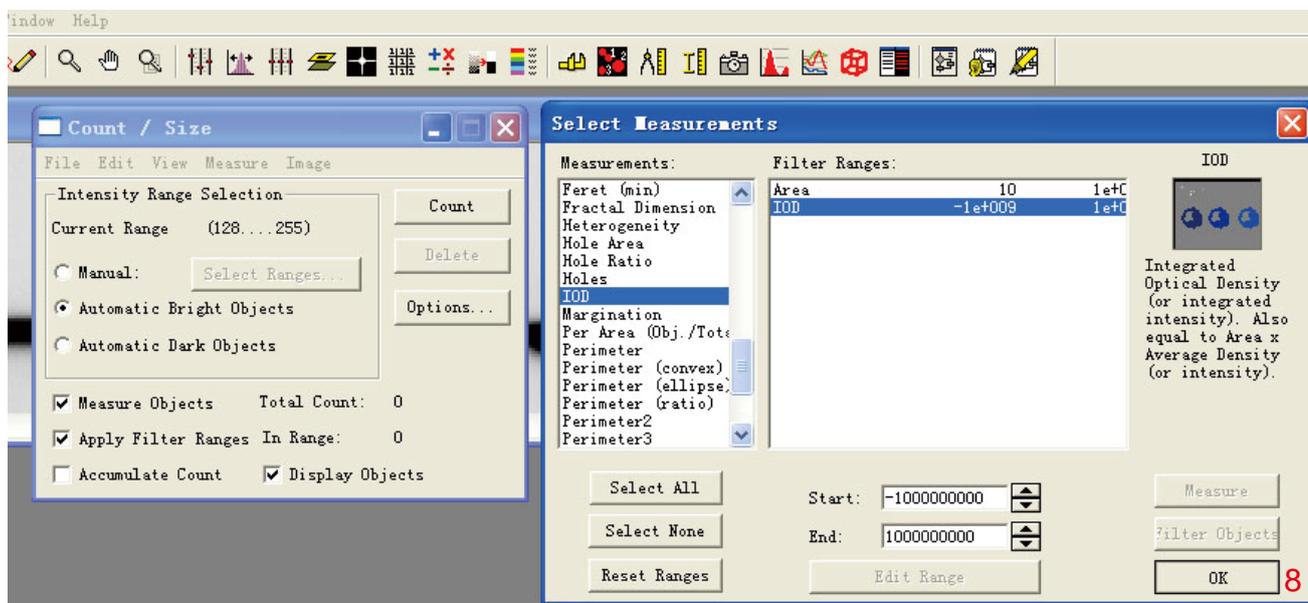
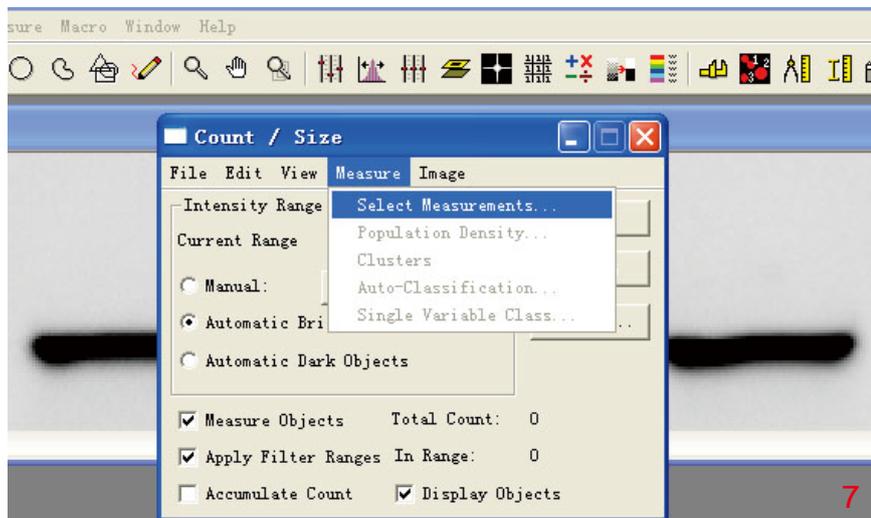
(1) 用放大镜放大目的区域，然后将放大镜功能还原，光标还原为指针。



(2) Measure-Calibration-Intensity-Options-Image, 在图片上的空白区域内点击, 选择背景最大 value 值以校正背景, 然后选OK-OK-System-Closed.

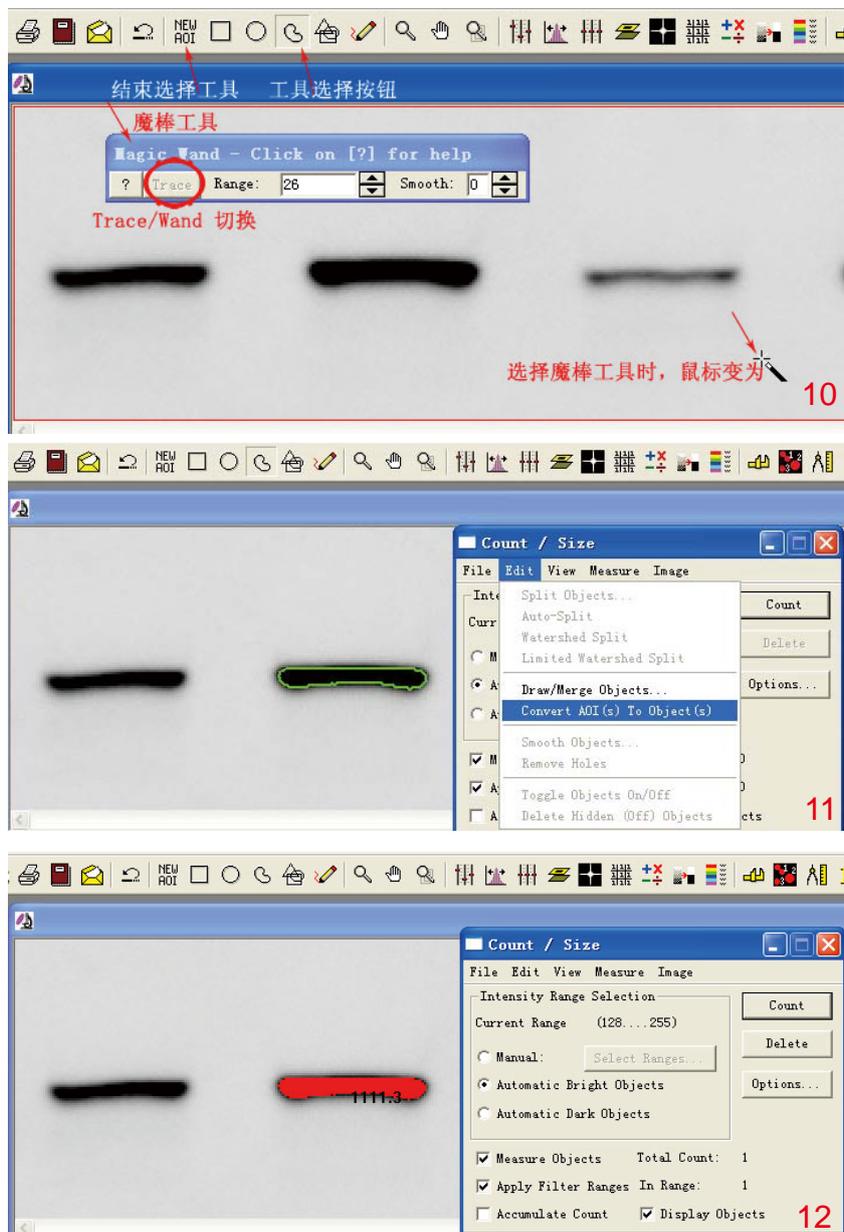


3.Measure-Count/Size-Measure-Select measurements, 选择IOD为测量指标。然后调整结果显示方式: Options-Lable Style调为Measurement, 然后选择IOD为显示值, 然后点击OK。

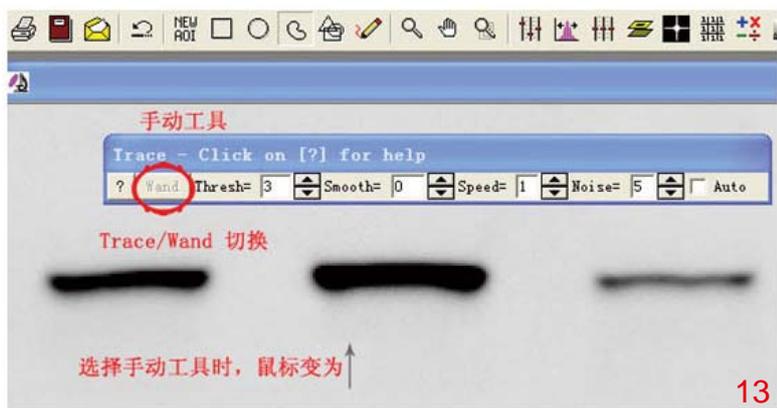


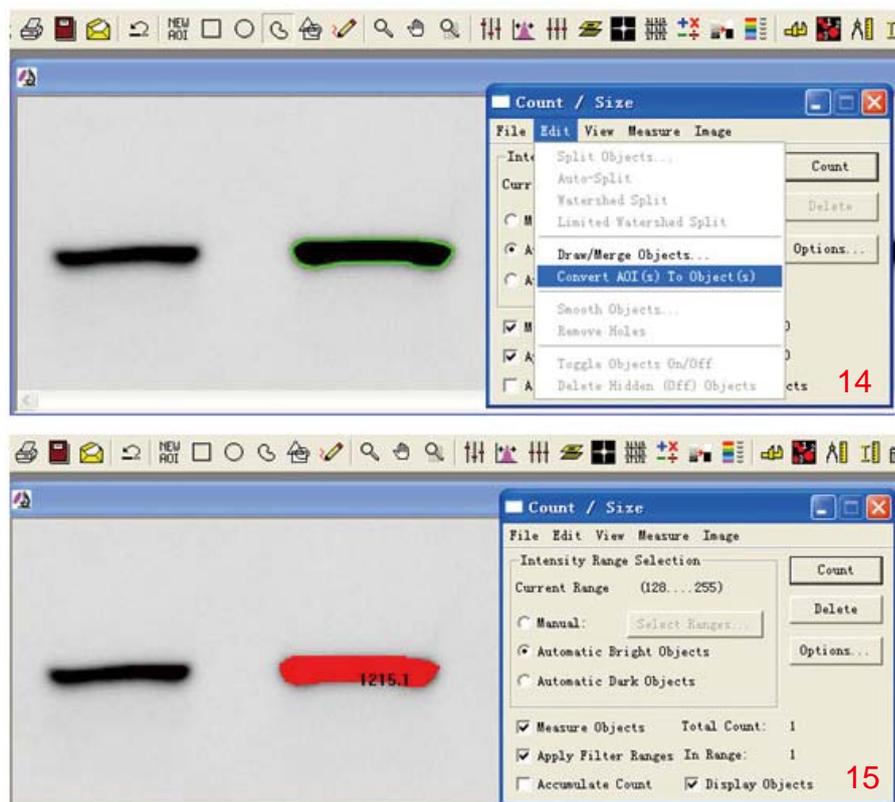
4.选择目的条带：魔棒法和手动法，选择条带后，点击右键，Count/Size-edit-convert AOI to object,得出IOD值。

(1) 魔棒法选择适用于蛋白条带轮廓清楚、带型规整且各条带之间不发生融合。

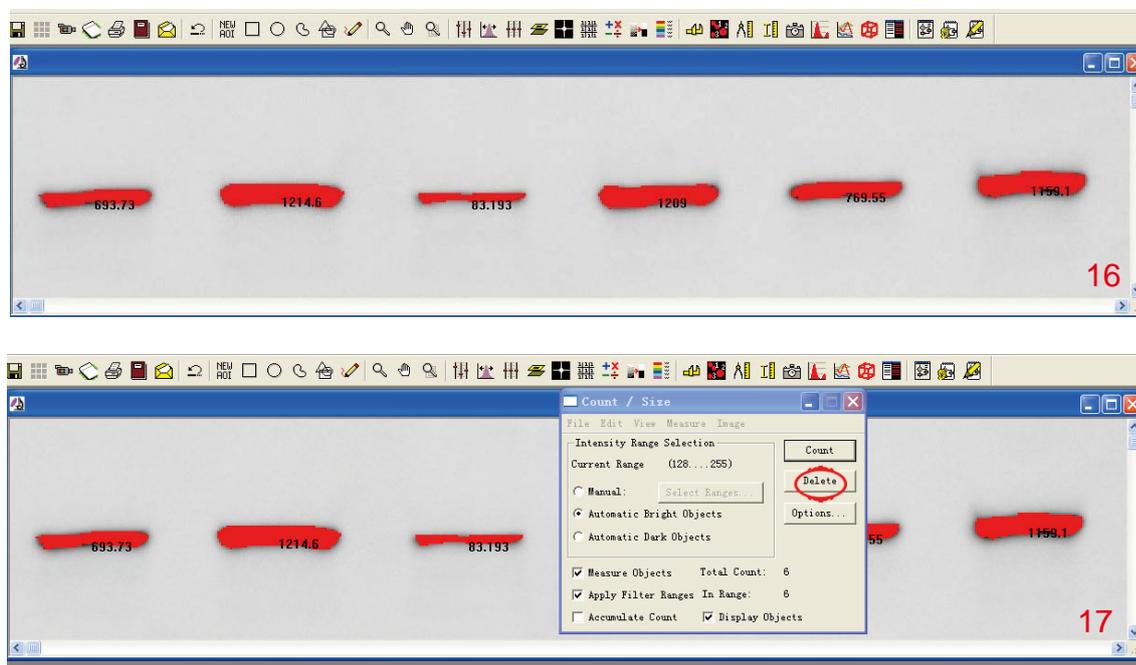


(2) 手动法主观性较强,选择标准要尽可能一致。

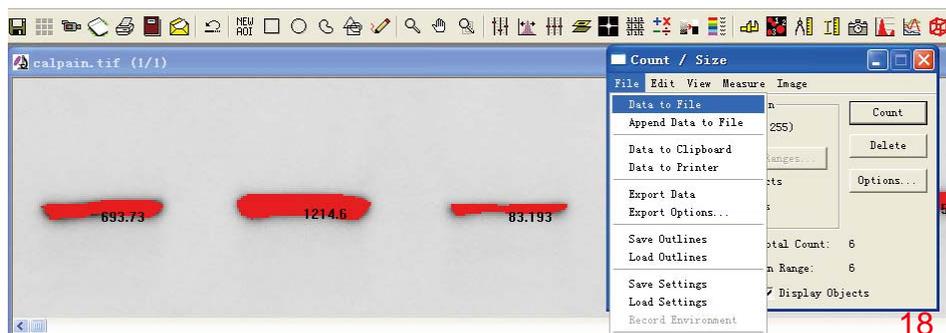




5. 同样方法测量其他条带，测完所有条带时需重复测量可点击Delete删除。



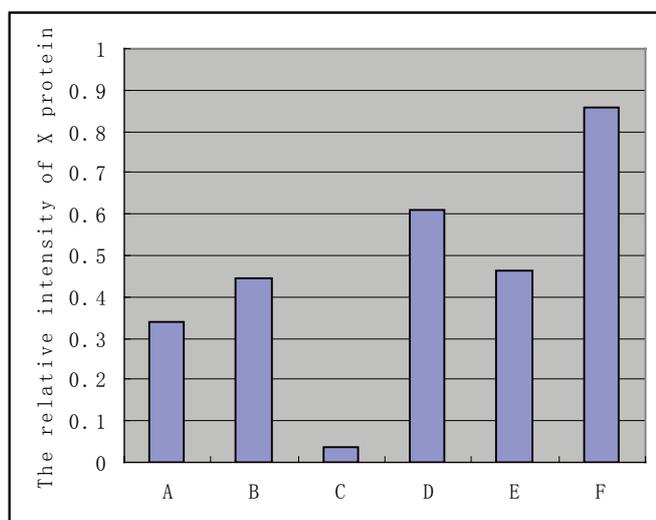
6. 统计IOD值：Count/Size-View-measurement data，然后输出结果。



7. 同样方法获得内参的IOD值，目的蛋白灰度值=目的蛋白IOD/内参蛋白IOD。

	X 蛋白 IOD	GAPDH IOD	X 蛋白灰度
A	693.73	2054.132	0.337724158
B	1214.6	2735.894	0.443949948
C	83.193	2313.47	0.035960267
D	1209	1979.973	0.610614387
E	769.55	1660.205	0.463527095
F	1159.1	1347.701	0.860057238

8. 按照统计结果做出柱状图，如组间有重复，可分析标准差。



九、溶液配制

1XTris-Glycine电泳缓冲液		1XTris-Glycine转膜液		1XTBST
Tris	3g	Tris	5.8g	NaCl 4.4 g, 1M Tris-HCl (pH 8.0) 10ml, 加入300ml的去离子水, 溶解后加入0.25ml Tween 20后充分混匀。加去离子水定容至500ml后, 4℃保存。
Glycine	14.4g	Glycine	2.9g	
SDS	0.5g	甲醇	200ml	
无需调整pH		加去离子水定容至	1 L	
加去离子水定容至	1 L			

1XPBS	显影液	定影液			
NaCl	8g	显影粉小包:	5.2g	定影粉小包:	16.7g
KCl	0.2g	显影粉大包:	39.6g	定影粉大包:	58.5g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.89g	加去离子水定容至	1L	加去离子水定容至	1L
KH ₂ PO ₄	0.27g	显影粉 (厂家: 双龙)		定影粉 (厂家: 双龙)	
加入约800ml去离子水, 充分搅拌, 盐酸调节pH至7.4, 定容至1L, 高压灭菌。					

十、常见问题及解决办法

1. 信号弱或无信号



可能原因	解决办法
封闭剂不合适	封闭剂可能与目的蛋白有亲和性而干扰了检测, 减少封闭剂的用量或孵育时间或换别的封闭剂。
抗体反应时间不够	增加一抗孵育时间
抗体浓度太低或失活	多次冻融或细菌污染的溶液都会影响抗体的质量, 增加抗体浓度或用新鲜的抗体溶液, 避免反复冻融。
检测试剂失效	使用新鲜或保存得当的底物。
蛋白转膜效率低	根据实际情况调整转膜液, 提高转膜效率。
显色反应时膜过干	在加显色剂时膜不要沥的过干, 可将膜重新在TBST或水中浸湿再显色。
叠氮化物抑制HRP	反应试剂中避免出现叠氮化物。

2.背景高



可能原因	解决办法
漂洗不充分	增加漂洗液体积和漂洗次数。
二抗浓度过高	降低二抗浓度，减少二抗孵育时间。
封闭剂与抗体发生交叉反应	更换封闭剂或漂洗液中加Tween20。
过渡曝光	缩短曝光时间。
检测试剂过量	曝光前尽量将ECL沥干。

3.发光时间短或发生淬灭

可能原因	解决办法
ECL质量差	使用质量合格的ECL，现配现用。
加检测试剂前没有沥干膜	加ECL前尽量沥干膜，除去膜上多余的液体。
转移至保鲜膜上时有多余液体	尽量除去膜上多余的检测试剂。

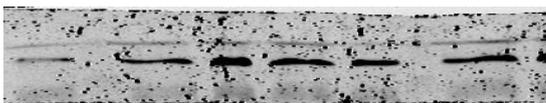
4.小分子蛋白检测效果差

可能原因	解决办法
小分子蛋白被大分子封闭剂掩蔽	选用酪蛋白或低分子量PVP作为封闭剂。
SDS阻止蛋白转膜	将转膜液中的SDS去掉。

5.大分子蛋白检测效果差

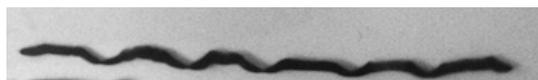
可能原因	解决办法
转膜效率差	优化转膜条件，增加转膜液中SDS的浓度至0.1%。 将转膜液中的甲醇的浓度降低至10%。

6.斑点背景



可能原因	解决办法
封闭剂发生聚集	滤器过滤封闭剂，或充分溶解封闭液，避免出现颗粒状物质。
二抗发生聚集	滤器过滤二抗溶液，或充分溶解，避免出现颗粒状物质。
转膜的海绵不干净	用清水冲洗干净，转膜前在转膜液中浸湿。

7. 条带连在一起



可能原因

上样量太多

样品中盐浓度过高

解决办法

一般上样10-20 μ l，最多不超过30 μ l。

将样品适当稀释。

8. 条带向下或向上弯曲



可能原因

凝胶聚合不均

电压过高

凝胶底部有大量气泡

样品中含有基因组DNA

解决办法

灌胶前务必把各组分混合均匀。

浓缩胶在50-80V，分离胶在120-150V。

赶净气泡。

在提取蛋白时按比例加入Benzonase核酸酶

9. 泳道背景



可能原因

样品中含有基因组DNA

样品中含有不溶物

冻存样品未完全融化

解决办法

在提取蛋白时按比例加入Benzonase核酸酶

将样品13000rpm离心10min，取上清。

手掌握住EP管几分钟，使样品完全融化，肉眼看无可见颗粒

10. 条带变白



可能原因

一抗浓度使用过高

解决办法

将一抗稀释2-5倍。

11.在移到保鲜膜之前有信号，盖上保鲜膜之后就没有信号了

可能原因	解决办法
ECL发生淬灭	换用新的或质量好的ECL发光液。
保鲜膜不干净或有液体	换用干净的保鲜膜。

12.电泳时样品发生渗漏



可能原因	解决办法
玻璃板和凝胶分离	加样时切勿用力太大。
加样时吸头深入太深，深过胶孔底部	加样时只要深入胶孔上半部缓慢加入即可。

13.发光Marker无条带

可能原因	解决办法
转膜时三明治顺序铺反	凝胶和膜的顺序要铺放正确。
二抗不起作用	更换新的二抗。
转膜液使用时间过久	更换新的转膜液。

14.整张胶片发黑

可能原因	解决办法
二抗浓度使用过高	稀释二抗，一般至少稀释2倍以上。
胶片在使用或保存中曝光	换用新的胶片，并务必避光保存。

英文材料与方法撰写

Material and Methods for Western Blot

Briefly, total protein was extracted by Super RIPA Lysis Buffer with Benzodase nuclease (HaiGene, Harbin, China). Then 30ug of total protein was subjected to SDS-PAGE gel. After electrophoresis, the proteins were transferred onto NC membrane (PALL, Mexico). 15min of Western Signal Enhancer (HaiGene, Harbin, China) treatment of the membrane was aimed to increase the ratio of signal to noise. After blocking, the membrane was incubated overnight with the respective primary antibody at the recommended dilution at 4°C. The following were the primary antibodies: Beclin 1 antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Apg12 antibody (Abcam, Cambridge, USA), β -actin antibody (Genscript, Nanjing, China). The membrane was washed three times with Tween20/TBS for 5min each time and then incubated with the appropriate secondary antibody for 30min. After washing for three times with Tween20/TBS, the membrane was treated with Super ECL reagent (HaiGene, Harbin, China). The final results were scanned by LAS-4000 Imaging System (FujiFilm, USA), PC Western Blot Marker120 (HaiGene, Harbin, China) was as the protein standards to determine the target signal. The data were quantified by automated densitometry using Image P-Plus. Densitometric data were normalized by β -actin in triplicate and the average was shown above the Western blot as a ratio of control sample.