

荧光蛋白质免疫印迹——入门指南

蛋白质免疫印迹是生命科学研究中的一项重要技术。尽管大多数生命科学研究者采用化学发光底物进行检测，但由于对多重分析的需求不断增加，现在越来越多的科学家正在使用荧光检测法。随着先进的数字成像仪器，如Invitrogen™ iBright™ FL1000成像系统的推出和荧光偶联技术的改进，现在科学家们已经拥有利用一系列荧光染料和抗体来进行免疫印迹检测的必备工具。这些进步不仅为进行荧光检测提供了便利，而且成本下降、灵敏度提高。总体而言，荧光检测法和化学发光检测法的免疫印迹流程类似，两种方法各有优点（表1）。在此我们向您分享我们关于荧光免疫印迹的实践经验，助您成功使用荧光免疫印迹。

优化的荧光检测注意事项

开始使用荧光免疫印迹时，需要对一些试剂和步骤进行优化，以保证背景荧光不会干扰到目标蛋白质的检测。以下为开始时的一些操作建议：

- 含有溴酚蓝的样品缓冲液会发出荧光，可能会增强背景荧光。建议考虑使用不含溴酚蓝的荧光相容性样品缓冲液，如Invitrogen™ 荧光相容性样品缓冲液（货号LC2570）。



建议： 如果使用含有溴酚蓝的样品缓冲液，则可在转印前使染料前沿与凝胶分离或在转印后从印迹膜上切下染料前沿，以防止产生背景荧光信号。

表1. 免疫印迹检测技术对比

	化学发光	荧光
信号源	酶促反应的间接信号	荧光基团的直接信号
信号持续时间	较短（几分钟到几小时）	较长（几天到几周）
灵敏度	优异，可用底物种类多样	良好，但可能需要更高浓度的二抗
一致性	印迹间可能存在差异	印迹间的重复性较高
检测	胶片和成像仪器	需要带有合适光源和滤光片的成像仪器
定量	单通道检测使标准化较为困难	带有内部对照的多重分析技术使标准化较易实现
其他注意事项	<ul style="list-style-type: none"> • 相似分子量的靶点需要进行剥离和印迹的重新检测 • 曝光时间可以较长，因为捕捉信号时不需要激发光源 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要注意避免荧光背景 • 由于少量的激发光会穿过滤光片，因此曝光时间更长会导致背景荧光较高。

- 建议减少凝胶中上样的分子量标记物的数量。可使用标准的预染分子量标记物，但是如果标记物包含荧光条带，则需对上样量进行优化，因为过度上样会增强背景荧光并增加对邻近泳道的信号渗透。Invitrogen™ iBright™ 预染蛋白质分子量标准品（货号LC5615）可提供预染蛋白质和用于检测的荧光条带。一般情况下，2–4 μL的iBright预染蛋白质分子量标准品足以看清楚和进行荧光检测。
- 为了消除主要的背景荧光源，可使用自发荧光较低的膜，包括硝酸纤维素NC膜和低荧光PVDF膜，如Thermo Scientific™ 低荧光PVDF转印膜（货号22860）。
- 建议只使用经过过滤的高质量缓冲液，如Thermo Scientific™ Blocker™ FL荧光封闭缓冲液（货号37565）。因为漂洗和封闭缓冲液中的微粒和污染物可能会遗留在膜上并产生荧光伪迹。另外，在封闭去污步骤中最好不要使用去污剂，因为普通的去污剂会有自发荧光并增强非特异性背景。
- 处理膜时必须佩戴手套并使用清洁的镊子，以尽量避免膜上出现可能会增强背景荧光并造成伪迹的污染和刮痕。
- 使用荧光法时二抗的浓度一般较高。需进行优化才能实现较高的信噪比，但不论是何种荧光偶联物，在iBright FL1000成像系统上成像的建议浓度范围一般均为0.4-0.1 μg/mL（1:5000–1:20000）（图1）。Invitrogen™ Alexa Fluor™ Plus二抗具有高信噪比和较低的交叉反应性，可减少优化所需的时间。



建议：避免在膜上使用钢笔，因为许多墨水会发荧光。建议使用铅笔。

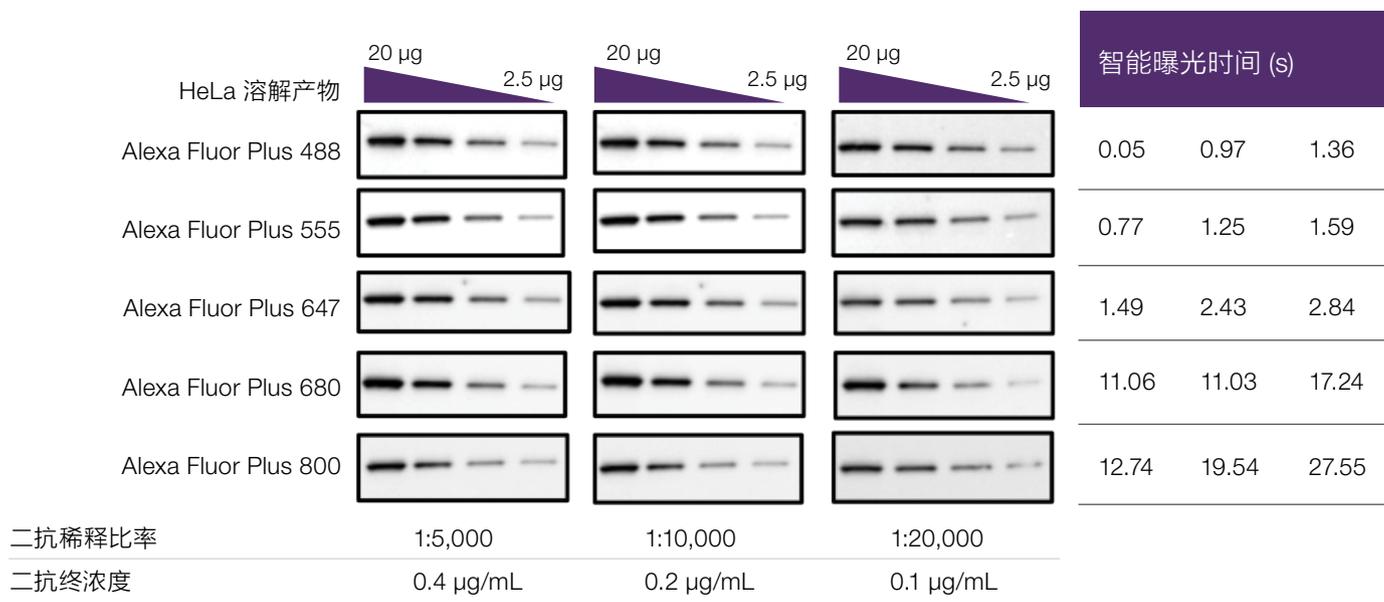


图1. 使用Alexa Fluor Plus荧光二抗可实现优异的检测和较高的灵敏度。图像以灰度显示以便进行对比。使用稀释度为0.4-0.1 μg/mL（1:5000–1:20000）的二抗时，曝光时间少于30s。对HeLa细胞裂解液进行连续稀释（每个泳道中上样20-2.5 μg），在SDS-PAGE凝胶上电泳，然后将其转印至硝酸纤维素膜上。先后使用1:1000稀释度的Invitrogen™ HDAC1多克隆抗体（货号 PA1-860）和1:5000、1:10000或1:20000稀释度的Invitrogen Alexa Fluor Plus二抗（货号A32731、A32732、A32733、A32734或A32735）进行过夜孵育。使用智能曝光工具iBright FL1000成像系统捕捉图像；每张膜的曝光时间列在右侧的表格中。所有图像均单独调整为同样的色度水平。

荧光蛋白质免疫印迹流程

材料

- 硝酸纤维素膜或低荧光PVDF膜 (货号: 22860, 或同类产品)
- 经过过滤的封闭缓冲液 (如封闭剂FL荧光封闭缓冲液, 货号37565)
- 漂洗缓冲液 (如含0.05%Tween™-20去污剂的Tris缓冲液或磷酸盐缓冲盐水, 货号28360或28352)
- 一抗和荧光标记的二抗
- 孵育盘或容器 (如Thermo Scientific™ Mini或Midi凝胶孵育盘, 货号22843或22841)
- iBright FL1000成像系统或同类产品



建议: 可将等量的蛋白质样品用于荧光和化学发光法。一般根据靶点的丰度和样品的浓度上样10–50 µg的裂解液。

步骤

1. 完成蛋白质转印后, 用去离子水漂洗膜4次, 在摇床上洗涤, 每次持续5分钟。
2. 用去离子水将封闭剂FL荧光封闭缓冲液 (10×) 稀释至1×。
3. 在室温下用充足体积的封闭液孵育膜15至30分钟, 并摇晃。
4. 在室温下用稀释的二抗孵育膜1小时, 并摇晃。注意避光。
5. 用漂洗缓冲液漂洗6次并摇晃, 每次5分钟。注意避光。
6. 如需干燥膜, 为了在干燥时保证避光, 将膜放置在两片滤纸之间。将膜干燥可延长膜的储存时间并能够减少曝光时间。为防止光漂白将膜储存在阴暗处。
7. 可在膜仍然湿润时立即对其进行成像, 或在其变干后进行成像 (图2)。在成像前将每个印迹放入文件保护袋中或放在清洁表面上以防止污染。选择智能曝光工具, 如选择荧光检测法, 设定不同的荧光通道在iBright FL1000系统上成像。



建议: 不要往封闭液中添加去污剂, 否则可能会增强背景荧光。



建议: 对于一般孵育盒, 至少用15 mL封闭缓冲液 (对于mini印迹) 和30 mL的封闭缓冲液 (对于midi印迹), 以将膜完全覆盖。避免使用小体积, 因为摇晃和覆盖的不同会导致背景荧光较高或不均匀。



建议: 使用Alexa Fluor Plus二抗时, 将膜干燥可提高信噪比; 如果将膜适当储存, 信号可在几天到几周的时间内保持稳定。

4. 根据供应商的建议用封闭缓冲液稀释一抗。
5. 用一抗孵育膜1小时, 并轻轻摇晃, 4°C孵育过夜。
6. 用漂洗缓冲液漂洗膜6次并摇晃, 每次5分钟。



建议: 可减少漂洗时间, 可用蒸馏水冲洗孵育盒4次, 然后继续用漂洗缓冲液漂洗3次, 每次5分钟。

7. 用适当体积的漂洗缓冲液稀释偶联二抗, 浓度为0.1-0.4 µg/mL。或者, 也可用封闭缓冲液稀释二抗。将2 mg/mL的抗体储备液稀释为1:5000至1:20000:
 - 1:5000: 用15 mL的漂洗缓冲液稀释3 µL的二抗
 - 1:10000: 用15 mL的漂洗缓冲液稀释1.5 µL的二抗
 - 1:20000: 用15 mL的漂洗缓冲液稀释0.75 µL的二抗

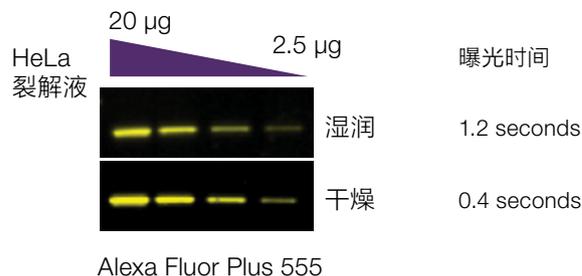


图2. 干燥或湿润的膜可提供相似的荧光成像结果。 对HeLa细胞裂解液进行连续稀释 (每个泳道中上样20~2.5 µg), 在SDS-PAGE凝胶上电泳, 然后将其转印至硝酸纤维素膜。先使用1:1000稀释度的HDAC1多克隆抗体 (货号PA1-860) 过夜孵育, 再用1:10000 (0.2 µg/mL) 稀释度的Invitrogen Alexa Fluor Plus 555山羊抗兔IgG (H+L) 高度交叉吸附二抗 (货号A32732) 在室温孵育1小时后检测。使用智能曝光工具在iBright FL1000成像系统上捕捉图像。每张膜的图像均单独调整为同样的色度水平。Alexa Fluor Plus 555信号为伪彩黄色。

建议使用的二抗

用于免疫印迹的宽范围Invitrogen Alexa Fluor和Alexa Fluor Plus偶联二抗可提供不重叠光谱, 以进行多重分析。同一泳道里的多个靶点蛋白可以用不同颜色的荧光展现出来。我们的Alexa Fluor Plus二抗兼具更好的灵敏度和更低的背景荧光, 可获得更好的多重分析结果。以下是用于蛋白质免疫印迹的二抗示例。



Alexa Fluor

订购信息

抗体	偶联物	数量	货号
山羊抗小鼠IgG (H+L) 高度交叉吸附二抗	Alexa Fluor Plus 488	1 mg	A32723
	Alexa Fluor Plus 555	1 mg	A32727
	Alexa Fluor Plus 647	1 mg	A32728
	Alexa Fluor Plus 680	1 mg	A32729
	Alexa Fluor Plus 800	1 mg	A32730
山羊抗兔IgG (H+L) 高度交叉吸附二抗	Alexa Fluor Plus 488	1 mg	A32731
	Alexa Fluor Plus 555	1 mg	A32732
	Alexa Fluor Plus 647	1 mg	A32733
	Alexa Fluor Plus 680	1 mg	A32734
	Alexa Fluor Plus 800	1 mg	A32735

如需了解更多有关二抗的信息, 请访问 thermofisher.com/secondaryantibodies



如需了解更多有关Alexa Fluor Plus二抗新产品的信息, 请访问
thermofisher.com/alexafuorplus

条款及条件适用。如需了解我公司有关抗体性能保证的所有详细信息, 请访问 thermofisher.com/antibody-performance-guarantee

疑难解答

问题	可能原因	解决方案
总体背景水平高	二抗浓度较高, 导致背景增强	• 降低抗体浓度
	一抗浓度较高, 导致检测到非特异性条带	
	封闭步骤中的去污剂可能是导致荧光检测法时有背景荧光的一个来源	• 使用不含去污剂的封闭缓冲液
	漂洗不足会导致背景荧光较高, 信噪比较低	• 增加漂洗次数和/或每次漂洗所使用的缓冲液体积 • 将Tween-20去污剂加入到漂洗缓冲液中, 使最终浓度达到0.05%
	曝光时间过长	• 减少曝光时间 • 在iBright FL1000系统上使用智能曝光工具获取优化图像
背景荧光水平不均匀	漂洗和孵育体积较低	• 对于一般孵育盒, 应当使用至少15 mL的体积 (对于mini印迹) 和30 mL的体积 (对于midi印迹), 以将膜完全覆盖
	PVDF没有用甲醇或乙醇进行适当预湿处理, 或在印迹时没有保持充分湿润	• 在蛋白质转印和转印缓冲液平衡前, 确保用甲醇或乙醇使膜充分湿润 • 如果印迹过程中膜变干, 几秒内用100%的甲醇或乙醇将其再次湿润并在继续进行封闭步骤前用去离子水冲洗。
信号弱或无信号	一抗浓度不够	• 增加一抗浓度
	抗体可能已失去活性	• 进行斑点杂交, 以测定其活性
	曝光时间过短	• 增加曝光时间 • 在iBright FL1000系统上使用智能曝光工具获取优化图像
	仪器设置错误	• 确保为荧光基团选择了正确的激发和发射波长

如需了解智能凝胶成像系统, 请访问 thermofisher.com/ibright

如需了解严格验证的抗体, 请访问 thermofisher.com/antibodies

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021- 61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

生命科学产品和服务业务

北京市朝阳区东三环北路2号南银大厦1711室
邮编 100027
电话 010-84461802

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众号

赛默飞世尔科技在全国共有21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC