



IF 常见问题分析

问题	原因	建议
背景过高	一抗质量不高	使用特异性高、效价高的一抗
	一抗 / 二抗浓度太高	Reduce the loading amount or decrease the concentration of the antibody
	降低一抗 / 二抗浓度	Change the gel percentage: use a higher percentage for small proteins and a lower percentage for large proteins
	封闭不完全	Ensure that the electrophoresis gel is in good state and horizontal position/ Ensure the sample extraction/ Reduce the sample amount
	增加蛋白封闭时间	
	洗涤不充分	增加冲洗次数与时间
	可通过调节荧光显微镜的参数来减低背景	
信号弱或无信号	无目的蛋白或表达量极少	选用表达量高的细胞或组织
	细胞通透性差	增加通透剂的作用时间或浓度
	一抗 / 二抗浓度太低	增大其浓度
	二抗选择错误 (种属不匹配)	选用与一抗种属相匹配的二抗
荧光淬灭快	荧光素本身特性决定, 光稳定性差	选用光稳定性好的荧光素二抗
	用普通的封片剂封片	选用防荧光淬灭剂封片
细胞有自发荧光	使用了戊二醛固定	在固定后荧光染色前进行荧光淬灭, 如使用 NaIO ₄ 、NaBH ₄ , 甘氨酸等, 染色前检查自发荧光
	材料本身 (如石蜡) 有自发荧光	设立阴性对照, 通过降低荧光显微镜的参数来消除背景染色
	细胞成分中能够产生自发荧光的分子 (例如核黄素、细胞色素等) 的含量高; 培养细胞中死细胞 / 活细胞比例高	