

实验室玄学千千万，预测和结果不符占一半。

WB 实验是各位艾粉们，时常光顾的一个实验。但就是这样一个初级又常用的实验，却会出现各种稀奇古怪的问题。

怎么我的条带每次都不一样！

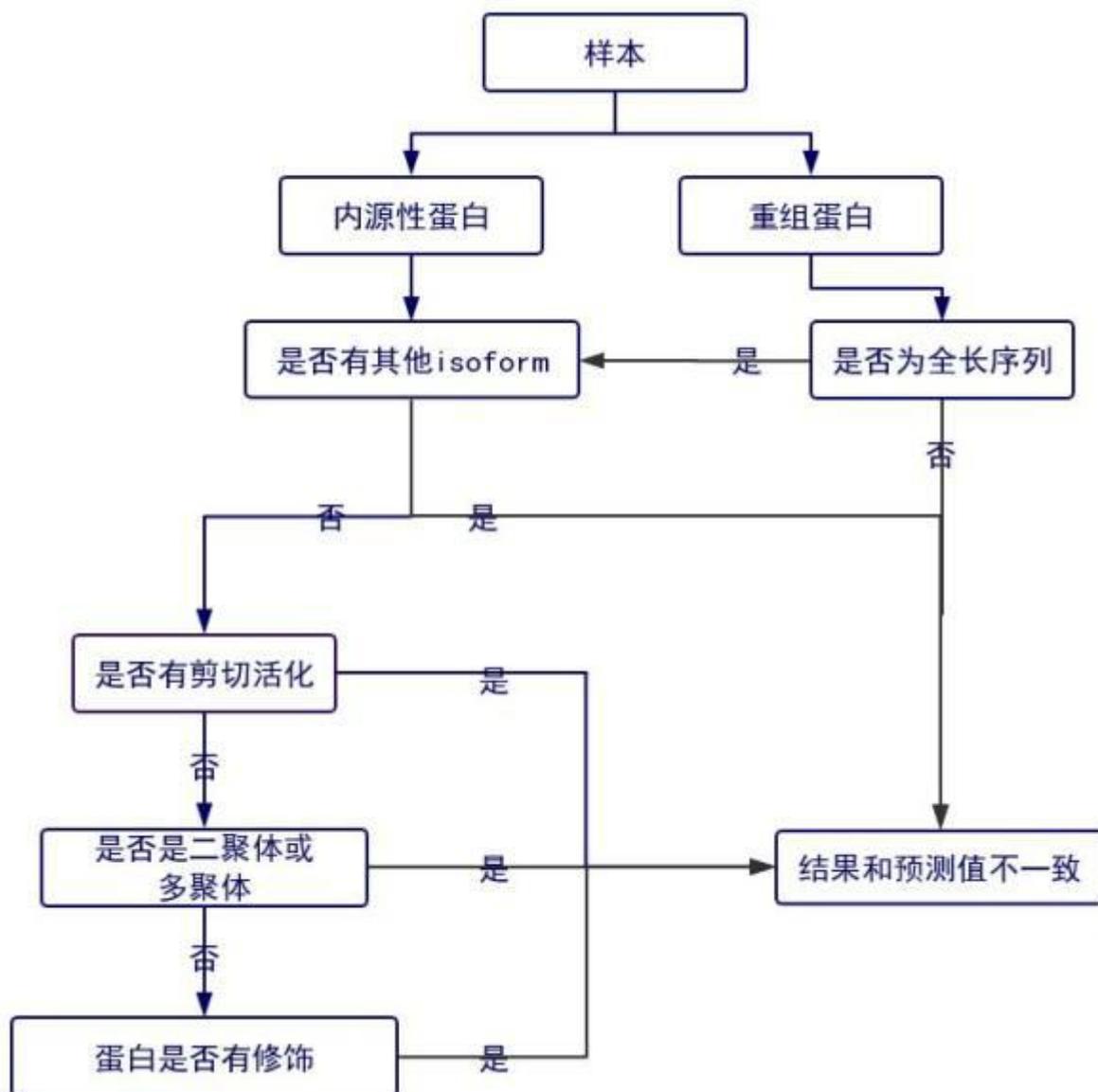
比如在 WB 实验鉴定蛋白时，我们得到的蛋白质条带大小常常会 and 预测值有所偏差。这是身患「强迫症」的艾粉们不能忍的。

猛男落泪，谁来看看到底问题在哪里？

如果是实验出错或者预测不准这种情况，小艾是没办法跳出手机屏幕救你了。

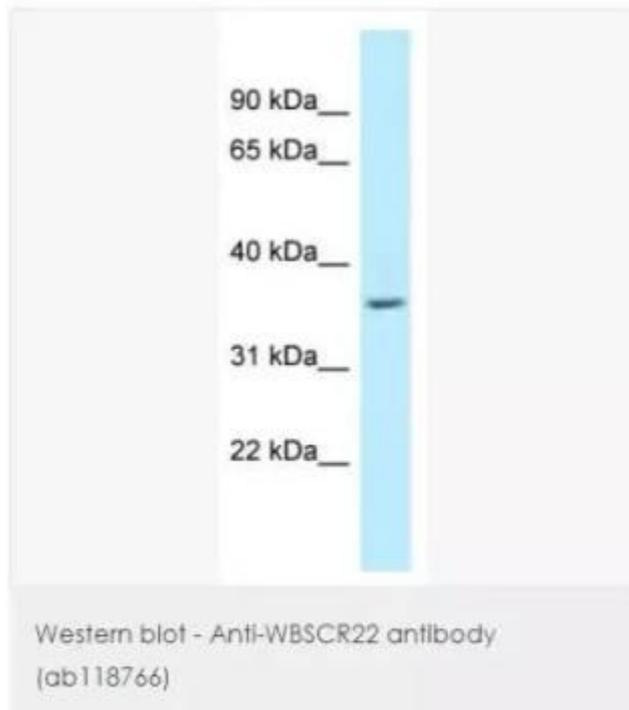
但这下面的 5 条准则，艾粉们倒是可以珍藏一下，在遇到蛋白质条带大小和预测值偏差的时候，拿出来分析一下。

我们可以对照着这张图来看原因。



下面小艾就来详细地讲解一下这 5 条具体是个啥。

当我们做 WB 实验鉴定蛋白的时候，最喜欢看到的是这样的条带：

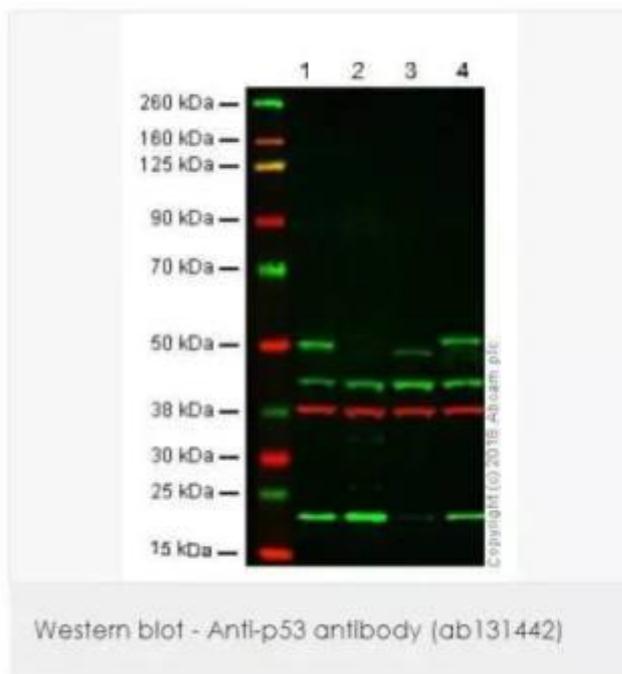


Anti-WBSCR22 antibody (ab118766) at 1 µg/ml
+ Human fetal liver lysate at 10 µg

Predicted band size: 34 kDa

Gel concentration: 12%.

但通常，自己做出来的，就会变成这样：



All lanes : Anti-p53 antibody (ab131442) at 1/500 dilution

Lane 1 : Wild type HAP1 whole cell lysate (20 µg)

Lane 2 : p53 knockout HAP1 whole cell lysate (20 µg)

Lane 3 : Saos2 (20 µg)

Lane 4 : A431 (20 µg)

Performed under reducing conditions.

Predicted band size: 53 kDa

是生活对我们这些实验小可爱下手了吗？

还是水逆没过去？

为什么 WB 跑了这么多次，

都和预测差了这么多？

当然不是那些玄学流原因啦。让我们科学地分析一下到底是哪里出了问题。

内源性蛋白 or 重组蛋白

查问题要从源头查起，所以各位艾粉们要先看一看样品是内源性蛋白还是重组蛋白？

如果是内源性蛋白还不打紧，如果是重组蛋白，那么马上就要看一看**重组蛋白是否为全长序列**了。假如样品是重组蛋白，还不是全长序列，那么条带大小一定会和预测大小不一致。

多个 isoform 辨仔细

如果确定了样品是内源蛋白，那就要看看我们的目标蛋白是不是有其他的 isoform，这个我们通常会去查看 NCBI 或者 SWISSPROT 来确认。

The screenshot shows a protein entry page with the following content:

- Sequences (4+)**
- Sequence status¹: Complete.
- Sequence processing¹: The displayed sequence is further processed into a mature form.
- A red box highlights the text: **This entry describes 4 isoforms¹ produced by alternative splicing.** Next to it are buttons for "Align" and "Add to basket".
- Below that, it says: "This entry has 4 described isoforms and 9 potential isoforms that are computationally mapped." with buttons for "Show all" and "Align All".
- A section for **Isoform Somatic-1** (identifier: **P12821-1**) [UniParc] with buttons for "FASTA" and "Add to basket".
- A note: "This isoform has been chosen as the 'canonical' sequence. All positional information in this entry refers to it. This is also the sequence that appears in the downloadable versions of the entry."
- A "Hide" link.

▲ SWISSPROT 会标出有些基因有多种 isoform

做着实验，结果换了别的 isoform 可就一顿瞎忙活啦。

剪切活化要注意

如果在 SWISSPROT 或者权威的文献里提到了，样品的这个蛋白需要剪切活化，那么结果又要和预测值不同啦。

成倍增长多聚体

如果蛋白大小和预测值有明显倍数关系，那就要考虑一下这个蛋白是不是二聚体或者多聚体啦。

蛋白修饰要变大

如果排除了以上 4 条原因，预测值和实验结果不一致，那就是因为我们面对的蛋白质，是个善变的对象，它不仅会剪切活化，还有在翻译表达后修饰。

比如：比如甲基化、乙酰化、磷酸化、糖基化、烷基化、生物素化、谷氨酸化、甘氨酸化、硫酸化、异戊二烯化、硫辛酸化、磷酸泛酰巯基乙胺基化.....balabala。

在不同状态下的蛋白质还会有不同的修饰。加入了官能团肯定会让蛋白质比预测值偏大。在日常的实验中，糖基化是比较常见的修饰，一般会导致跑出来的条带比预测值大那么一些。

Amino acid modifications					
Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Glycosylation ¹	38	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 1 Publication		1
Glycosylation ¹	54	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 2 Publications		1
Glycosylation ¹	74	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 1 Publication		1
Glycosylation ¹	111	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 2 Publications		1
Glycosylation ¹	146	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 2 Publications		1
Disulfide bond ¹	157 ↔ 165		# 1 Publication		
Glycosylation ¹	160	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# Sequence analysis		1
Glycosylation ¹	318	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 1 Publication		1
Glycosylation ¹	445	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 1 Publication		1
Glycosylation ¹	509	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# 3 Publications		1
Glycosylation ¹	677	N-linked (GlcNAc...) asparagine	# Sequence analysis		1
Glycosylation ¹	695	N-linked (GlcNAc...) (complex) asparagine	# 2 Publications		1
Glycosylation ¹	714	N-linked (GlcNAc...) (complex) asparagine	# 3 Publications		1
Disulfide bond ¹	757 ↔ 763		# 1 Publication		
Glycosylation ¹	760	N-linked (GlcNAc...) asparagine; partial	# 1 Publication		1
Glycosylation ¹	942	N-linked (GlcNAc...) asparagine; partial	# 1 Publication		1
Disulfide bond ¹	957 ↔ 975		# 1 Publication		
Disulfide bond ¹	1143 ↔ 1155		# 1 Publication		
Glycosylation ¹	1191	N-linked (GlcNAc...) asparagine; partial	# 1 Publication		1
Modified residue ¹	1299	Hydroxyproline	# 1 Publication		1

▲ SWISSPROT 会给出蛋白质修饰位点信息，各个都有支持依据哦~

让小艾最后再总结一下。

当 WB 大小和预测值不一致时

- 确定蛋白是内源的还是外源的，如果是外源蛋白是不是全长序列；
- SWISSPROT 数据库查询该蛋白是否有其他 isoform；
- SWISSPROT 和文献查询蛋白质是否有剪切活化，剪切活化造成蛋白变小；
- 确定蛋白质是否是二聚体或多聚体。
- NCBI 和 SWISSPROT 查询蛋白质表达后是否有修饰，如有修饰会导致蛋白质增大；

以上就是小艾给出的 5 条小贴士，拿去分析下自己的条带问题绝对是绰绰有余了。如果用了这 5 条，还是没找到问题在哪里，那就要回过头看看是不是预测不准或者实验出错啦。