

## 第五章 目标成分常用定性鉴别方法(二)

上节课内容:

1. 常用的化学鉴别法
2. 常用的色谱鉴别法
3. 常用的光谱鉴别法
4. 常用的电泳鉴别法

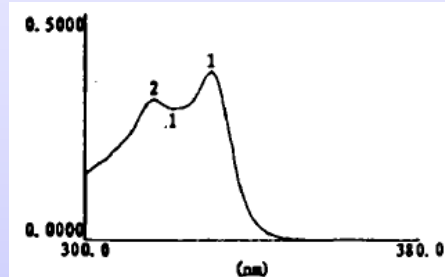
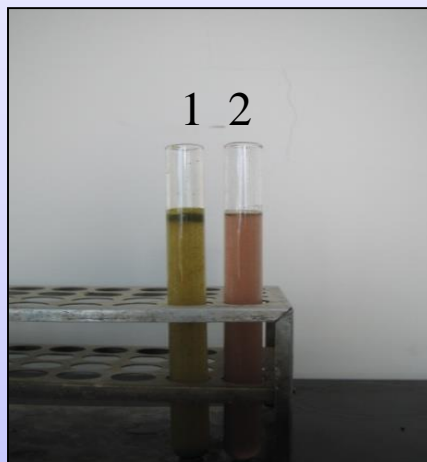
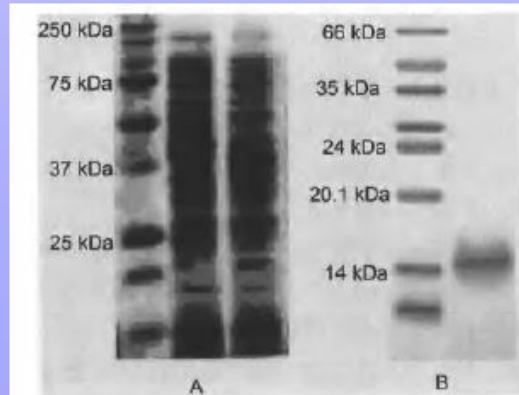
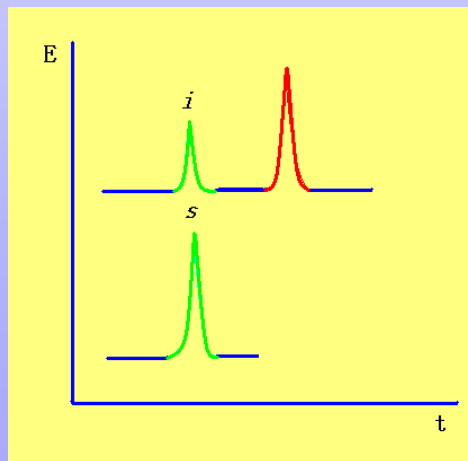
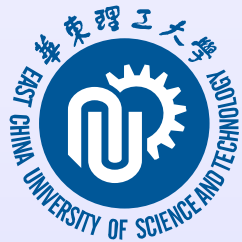


图1 蔡普生的紫外吸收光谱



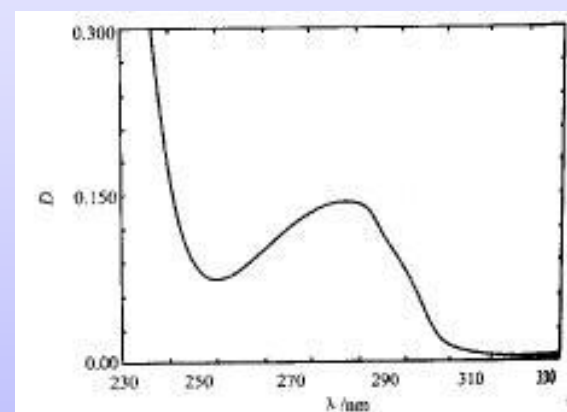


**问题：** 蛋白质常用的定性鉴别方法？



显色法

紫外光谱法



蛋白质紫外光谱图

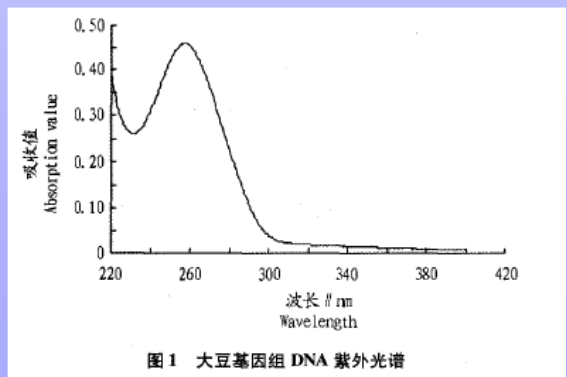
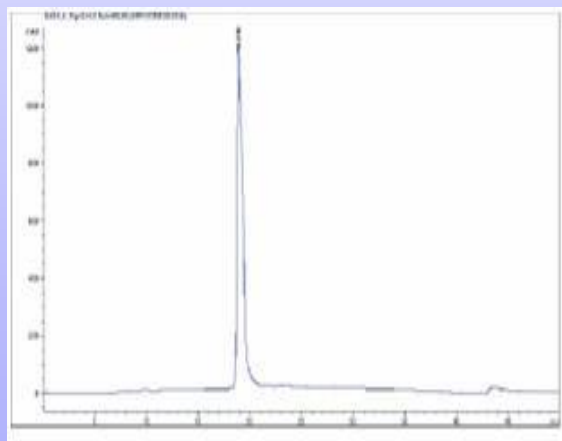


图1 大豆基因组 DNA 紫外光谱

HPLC法



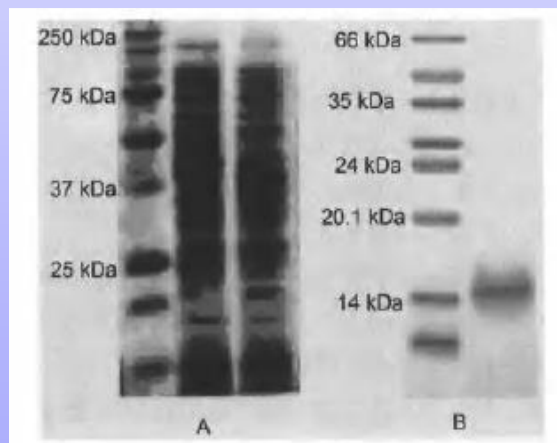
分子量较小的多肽

(正相HPLC)

大分子蛋白

凝胶过滤色谱 (GFC)

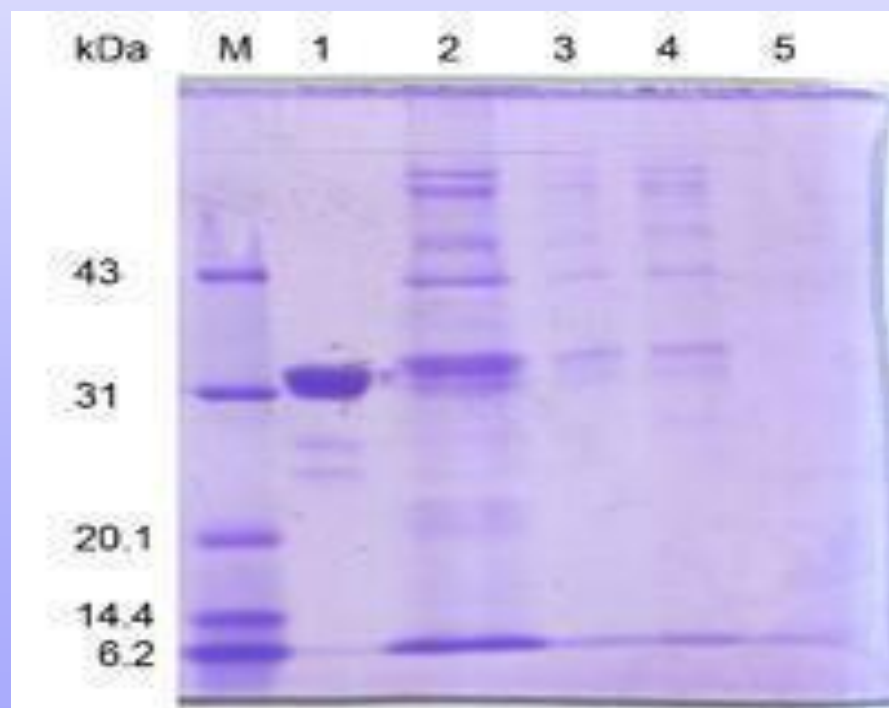
电泳法



问题：特异性？

## 定性鉴别方法：

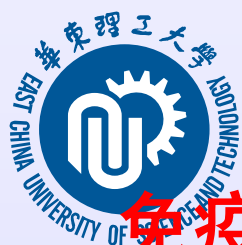
同时电泳样品和标准品，比较迁移率/分子量。



染色液：考马斯亮蓝R250

脱色液：甲醇、水、冰乙酸

特异性？



## 免疫标记技术(Immunolabeling Technique):

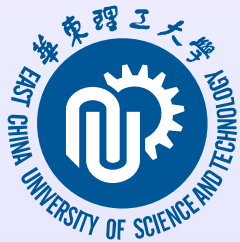
是将已知抗体或抗原标记上易显示的物质，通过检测标记物来反应抗原抗体反应的情况，从而间接地测出被检抗原或抗体的存在与否或量的多少。

常用的标记物有**荧光素、酶、放射性核素及胶体金**等。

或：

指用**荧光素、酶、放射性核素及胶体金**等作为示踪剂，标记的抗体或抗原进行的抗原抗体反应。

**类型：**免疫酶标技术，免疫荧光技术，放射免疫技术。



## 本节课内容：

**Western blot: 蛋白质免疫印迹技术**

**ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays)  
酶联免疫吸附技术**

针对**蛋白质**的**特异**定性鉴别

# 第一节 免疫印迹技术（Western blot）

## 原理：

免疫印迹技术（Western blot）是通过聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将蛋白质转移到膜（硝酸纤维素，or **PVDF**）上，然后**利用抗体进行检测**目标蛋白质。是检测**特定蛋白质**存在与否的技术。

是在蛋白质电泳分离和抗原抗体检测的基础上发展起来一项检测蛋白质的技术。它将**SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的高分辨力与抗原抗体反应的特异性相结合**，因与Southern早先建立的检测核酸的印迹方法Southern blot相类似，亦被称为Western blot。

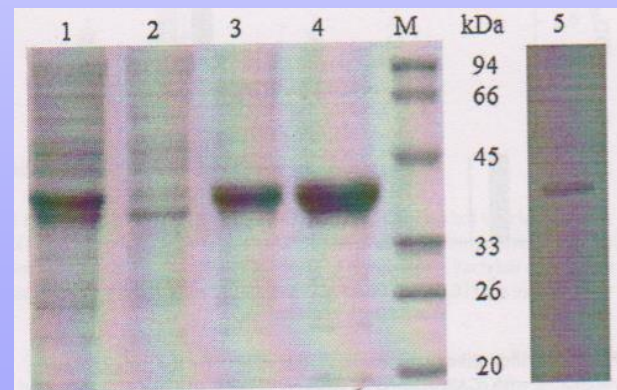
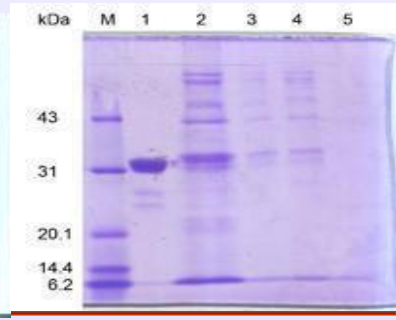
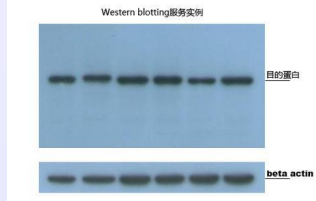


Fig. 1. SDS-PAGE and western blotting analysis of the rGAPDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Lanes: M, protein molecular weight marker; (1) supernatant of ultrasonicated cells lysate; (2) flow through; (3) elution; (4) elution; (5) Western blotting of purified rGAPDH with anti-GAPDH polyclonal antibody.



## 典型印迹实验含三个步骤：

- ① 蛋白质的**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)** 分离:抗原等蛋白样品经SDS处理后带阴电荷，聚丙烯酰胺凝胶中从阴极向阳极泳动，分子量越小，泳动速度就越快。此阶段分离效果肉眼不可见（染色后才显电泳区带）。
- ② **转膜和封闭**:常用方法是毛细管虹吸法和电印迹法。将在凝胶中已经分离的条带转移至**硝酸纤维素膜**上。用非特异性，非反应活性分子（**脱脂奶粉或牛血清白蛋白**）封闭固体膜上未吸附蛋白质区域(**封闭**)。此阶段分离的蛋白质条带肉眼仍不可见。
- ③ 免疫学检测（**酶免疫定位**）：将印有蛋白质条带的硝酸纤维素膜（相当于包被了抗原的固相载体）依次与特异性抗体和酶标第二抗体作用后，加入能形成不溶性显色物的酶反应底物，使区带染色。常用的HRP底物为3,3'-二氨基联苯胺（呈棕色）和4'-氯-1'-萘酚（呈蓝紫色）。阳性反应的条带清晰可辨，并可根据SDS-PAGE时加入的分子量标准，确定各组分的分子量。



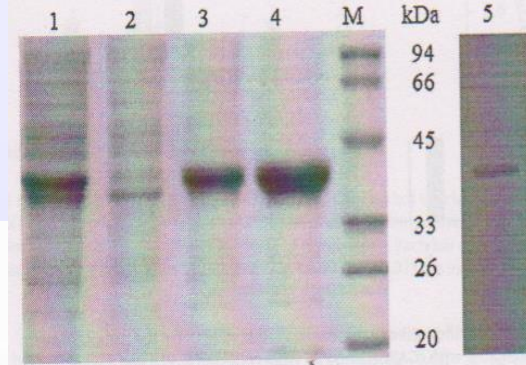
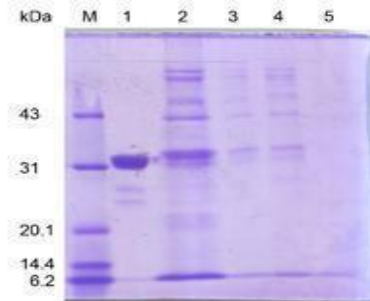
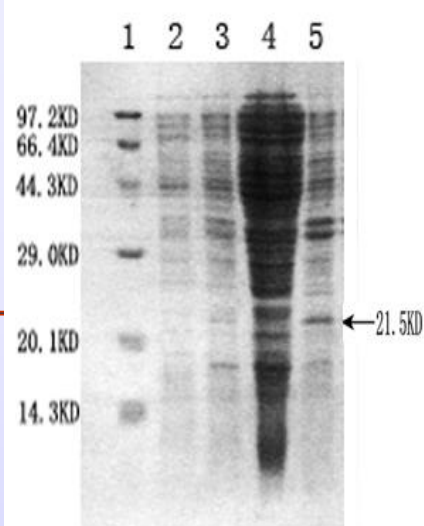
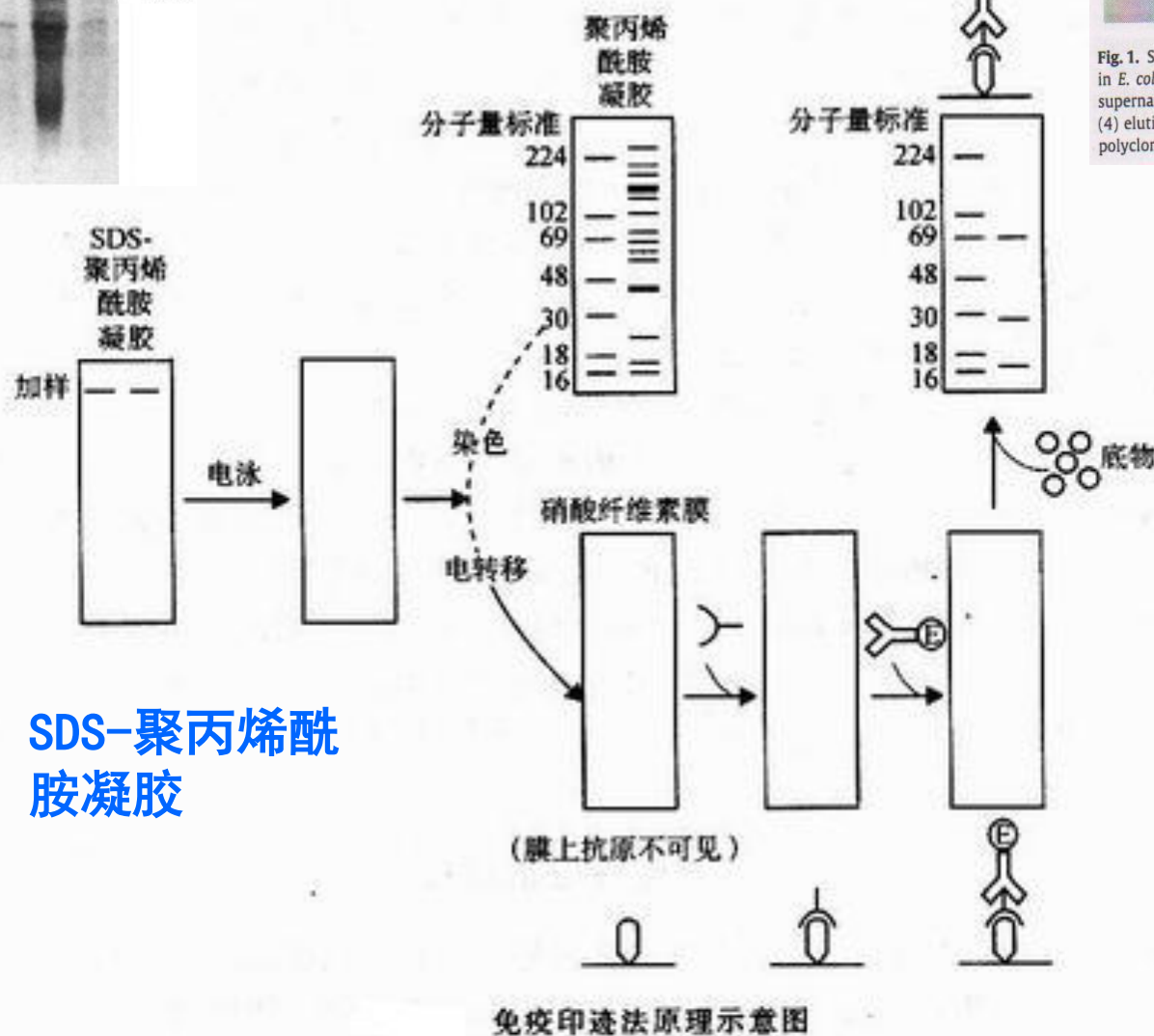
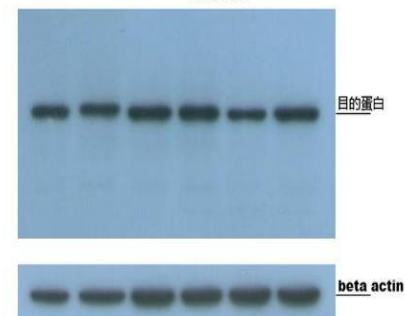
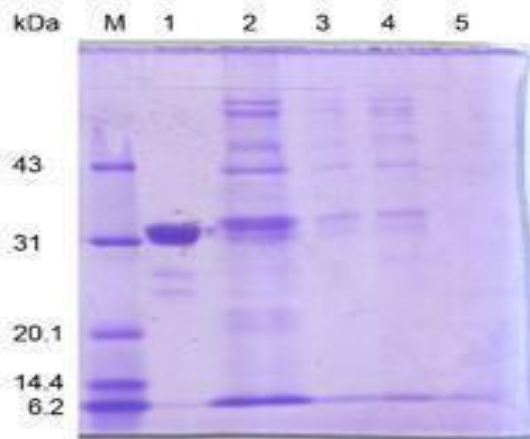


Fig. 1. SDS-PAGE and western blotting analysis of the rGAPDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Lanes: M, protein molecular weight marker; (1) supernatant of ultrasonicated cells lysate; (2) flow through; (3) elution; (4) elution; (5) Western blotting of purified rGAPDH with anti-GAPDH polyclonal antibody.



Western blotting服务实例





## Gel electrophoresis (SDS-PAGE)

(蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离)



## Transfer and Blocking (转膜和封闭)

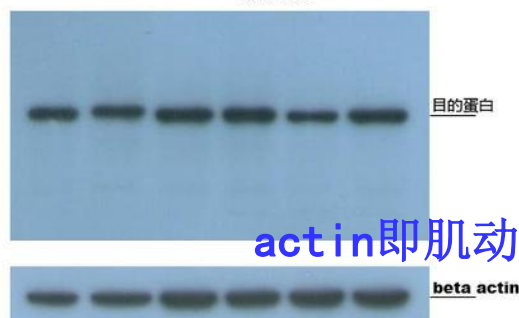


## Immunological Detection 免疫学检测 (酶免疫定位)



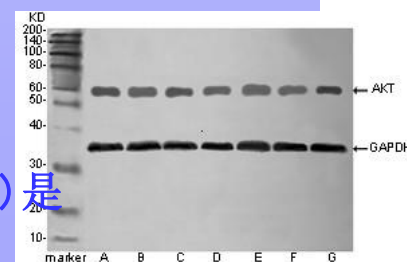
## Typical Western-blot Procedure

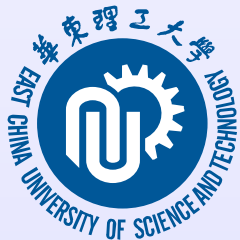
Western blotting服务实例



actin即肌动蛋白

GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 是参与糖酵解的一种关键酶





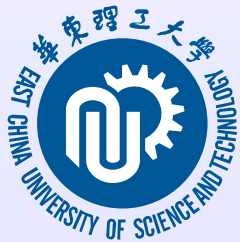
# 免疫学检测方法

通过**抗体与膜上抗原的特异性结合来定位抗原**。抗原可用易观察的标记的抗体进行检测。抗体本身可以标记，直接用于检测抗原，但更为常见的是，使用的抗体是非标记的，而用标记的二抗进行抗原定位。

免疫检测主要取决于抗原抗体的特异性，特别是能够识别膜上变性的和固定化抗原的抗体。

**间接检测法** (Two step detection )

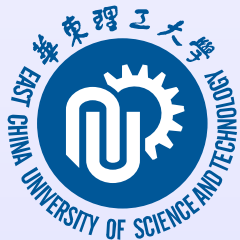
**直接检测法** (One step detection)



## 间接检测法 (Two step detection )

是指先使用非标记的一抗，然后用可与一抗结合的标记第二抗体（二抗）进行检测的方法。由于二抗分子是多价的，具有放大效应，因而灵敏度较高。因此，除非需要直接检测抗原的特异性，否则最好是选择间接法进行免疫印迹测定。

通常选用与辣根过氧化物酶偶联的抗免疫球蛋白抗体商品试剂来检测一抗，分别针对不同种属来源的一抗。这样，一个实验室只需备用针对小鼠，大鼠，家兔和其他一抗的少数几种通用试剂即可满足各种免疫印迹实验要求。



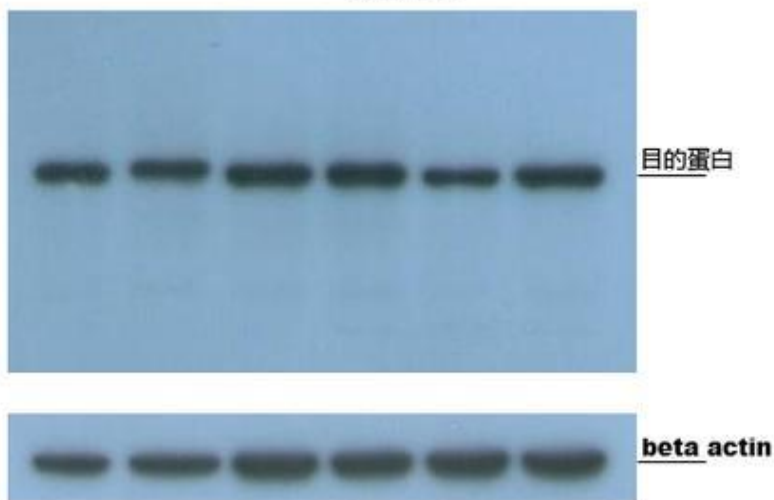
## Two step detection process

### (间接检测法)

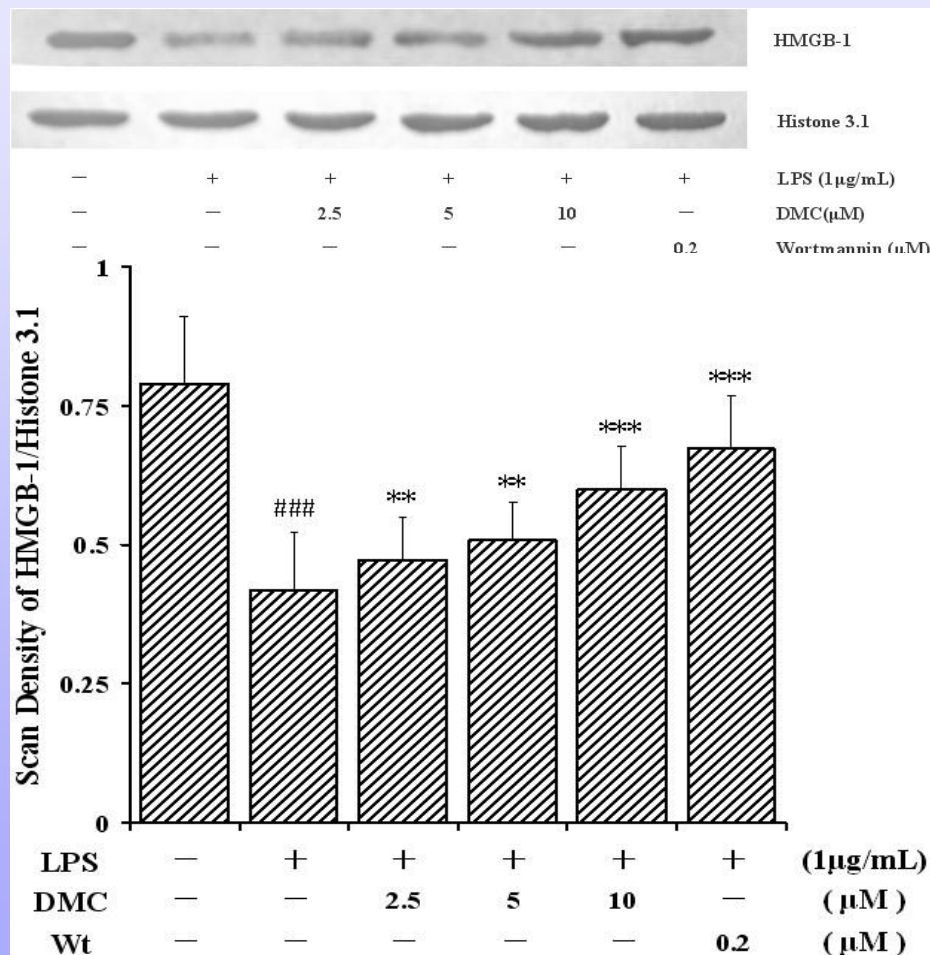
- (1) 用PBS漂洗印迹膜数次，加入**封闭液**。室温下孵育20min~2h或4°C过夜。
- (2) 从封闭液中取出印迹膜，用**PBS漂洗3次**，每次5min。
- (3) 加入**一抗**溶液。用PBS漂洗印迹膜4次，每次换液洗5min。
- (4) 加入标记的**二抗**溶液。用PBS漂洗印迹膜4次，每次换液洗5min。
- (5) 将经漂洗的印迹膜移至另一干净浅盘中(含相应的**底物**溶液)。
- (6) 拍摄照片，留作永久实验记录。

# Western-blot定性鉴别

Western blotting服务实例



鉴别：阳性反应



半定量：与内参比值



# Application

## 蛋白药物表达结果的定性鉴别

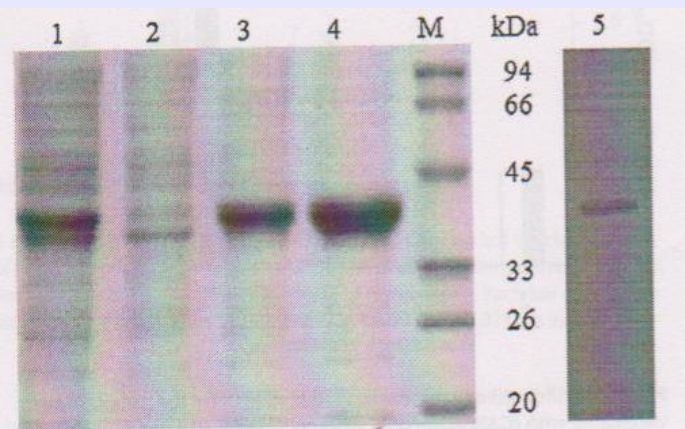


Fig. 1. SDS-PAGE and western blotting analysis of the rGAPDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Lanes: M, protein molecular weight marker; (1) supernatant of ultrasonicated cells lysate; (2) flow through; (3) elution; (4) elution; (5) Western blotting of purified rGAPDH with anti-GAPDH

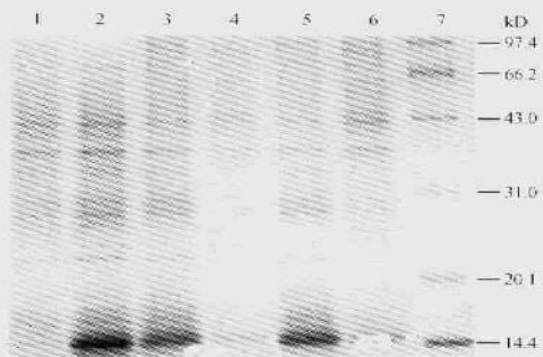


图2 SDS-PAGE 检测工程菌的表达和表达形式  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of rhIL-4 expression level and expression type in *E. coli*

1: before IPTG induction; 2: after IPTG induction; 3, 5: pellet from *E. coli* cell lysate; 4, 6: supernatant from *E. coli* cell lysate; 7: MW marker.

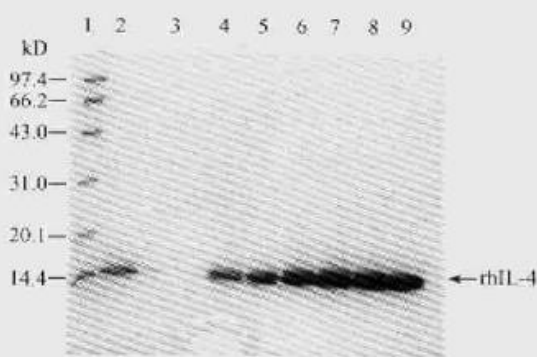


图7 rhIL-4 经 SP-Sepharose FF 层析纯化过程电泳图

Fig. 7 SP-Sepharose chromatography

MW maker; 2: supernatant of dialysis; 3: flow-through from SP-FF chromatography; 4~9: NaCl gradient eluted fractions from SP-Sepharose chromatography.

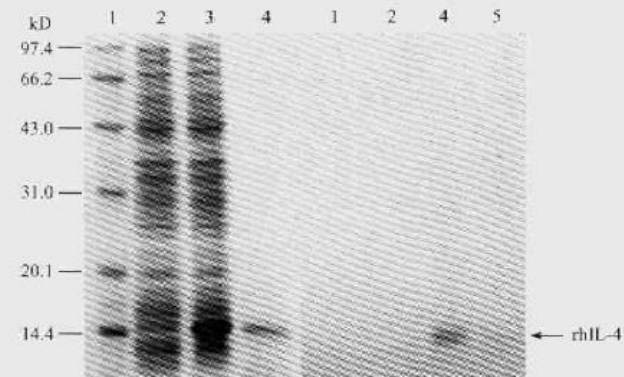


图8 工程菌表达产物和纯化蛋白的 Western-blotting 图谱

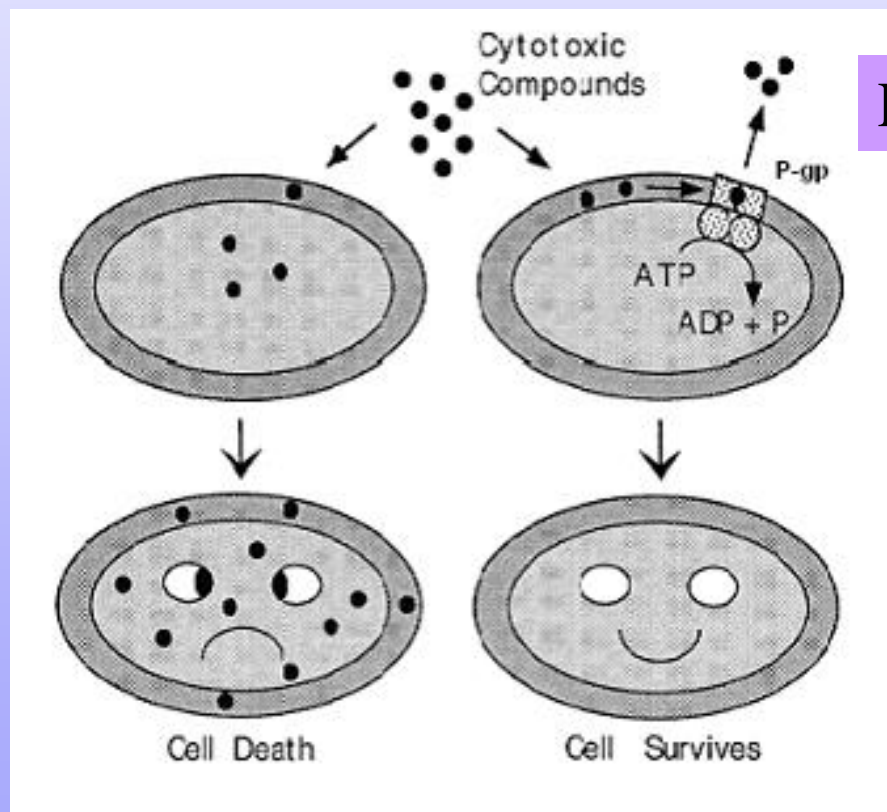
Fig. 8 SDS-PAGE and Western-blotting result

A: SDS-PAGE; B: Western blot.

1: MW marker; 2: bacterial lysate before induction; 3: bacterial lysate after induction; 4: purified rhIL-4.

## 肿瘤多药耐药蛋白表达的测定

### 多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)



P-gp protein

MDR1 gene

MRP1 protein

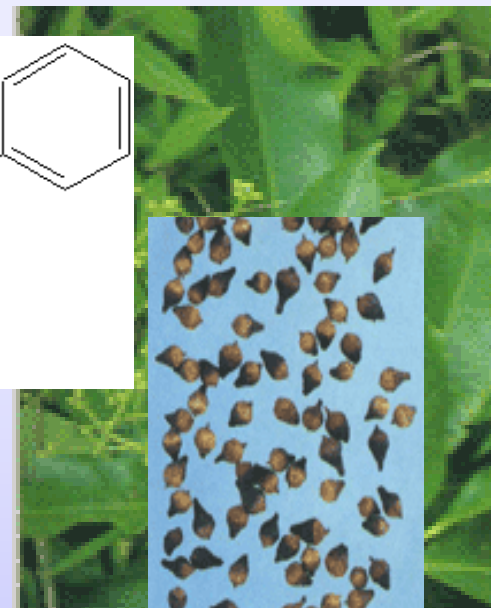
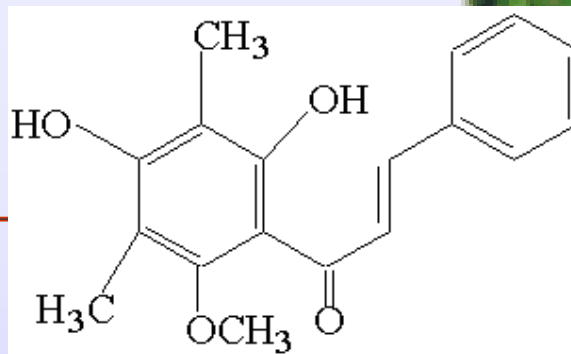
MRP1 gene

MDR发生机制

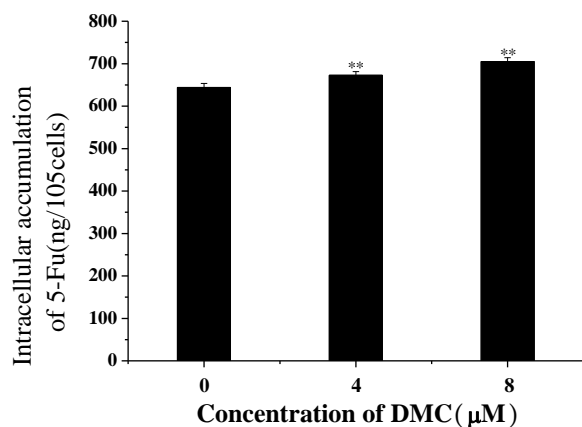




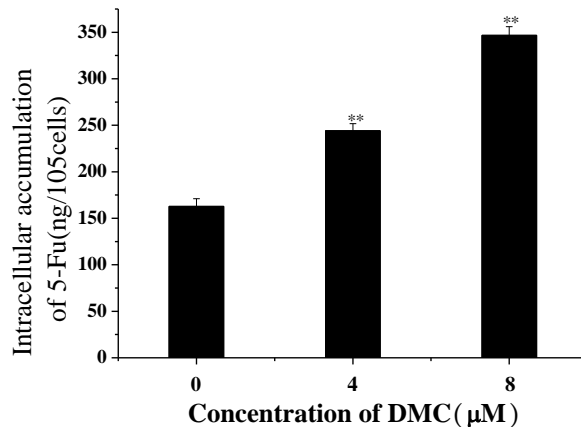
\* 水翁花是桃金娘科植物水翁的花蕾，  
味苦、性寒，广东民间常做凉茶应用。



水翁花



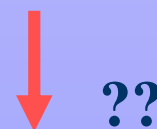
DMC对BEL-7402细胞  
内5-Fu积累量的影响



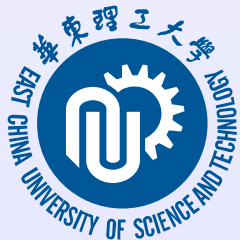
DMC对BEL-7402/5-Fu细胞  
内5-Fu积累量的影响

P-gp protein

MRP1 protein



??

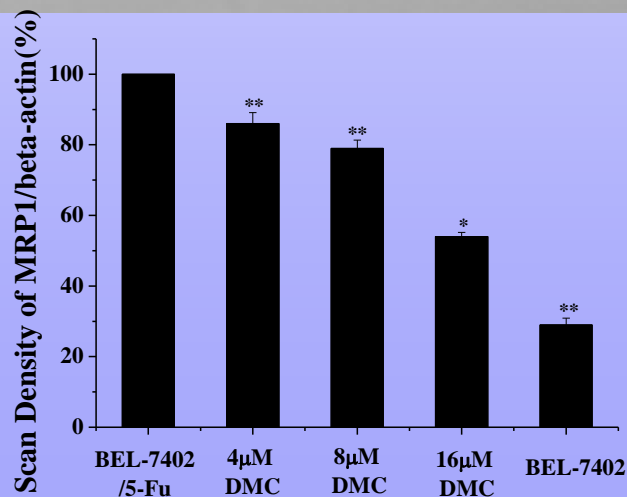


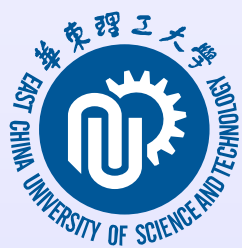
## Western-blot法测定DMC对MRP1 蛋白表达的影响

MRP1



$\beta$ -actin



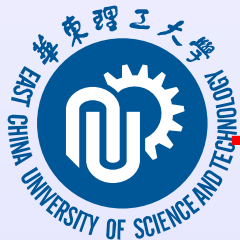


## 第二节 ELISA技术

### ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) 酶联免疫吸附技术

ELISA是一种**免疫酶标**技术。

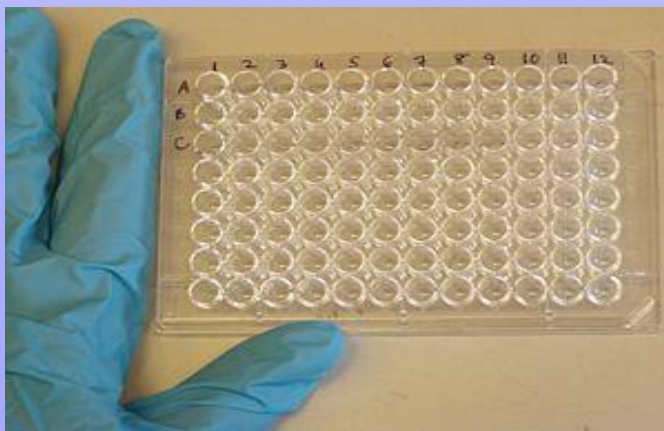
ELISA是以免疫学反应为基础，将**抗原、抗体的特异性反应**与**酶对底物的高效催化作用**相结合起来的一种**敏感性**  
很高的试验技术。



# The Principle Of ELISA

## 基本原理有三条：

- (1) 抗原或抗体能以物理性地**吸附于固相载体表面**，可能是蛋白和聚苯乙烯表面间的疏水性部分相互吸附，并保持其免疫学活性；
- (2) 抗原或抗体可通过共价键与酶连接形成**酶结合物**，而此种酶结合物仍能保持其免疫学和酶学活性；
- (3) 酶结合物与相应抗原或抗体结合后，可根据加入**底物**的颜色反应来判定是否有免疫反应的存在，而且颜色反应的深浅是与标本中相应抗原或抗体的量相关，因此，可以按底物显色的程度显示试验结果。

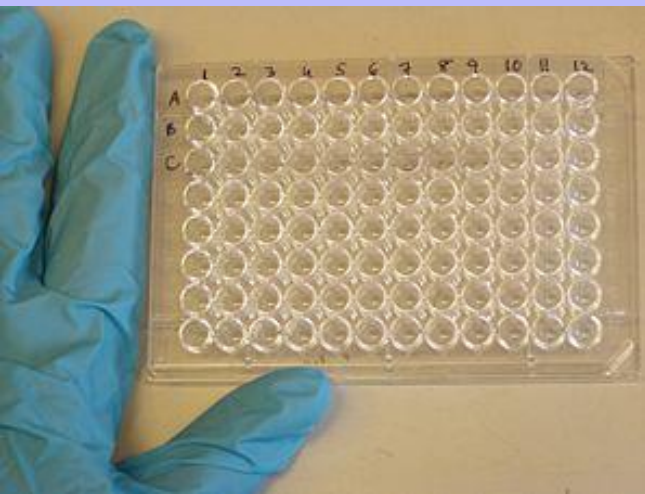




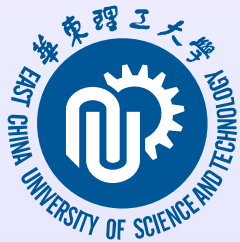
# Elisa 技术中三种必需试剂

## (Three necessary reagents in Elisa)

- 免疫吸附剂(**Immunosorbent**): 固相的抗原或抗体
- 酶联物(**Conjugate**): 酶标记的抗原或抗体
- 底物(**Substrate**): 酶反应的底物



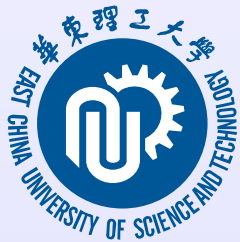
A 96-well microtiter plate being used for ELISA



# ELISA 主要种类 (Types of ELISA)

- **Sandwich ELISA**(双抗体夹心法测抗原, 双抗原夹心法测抗体)
- **Indirect ELISA** (间接法测抗体)
- **Competitive ELISA** (竞争法测抗原/抗体)

根据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件，可设计出各种不同类型的检测方法。



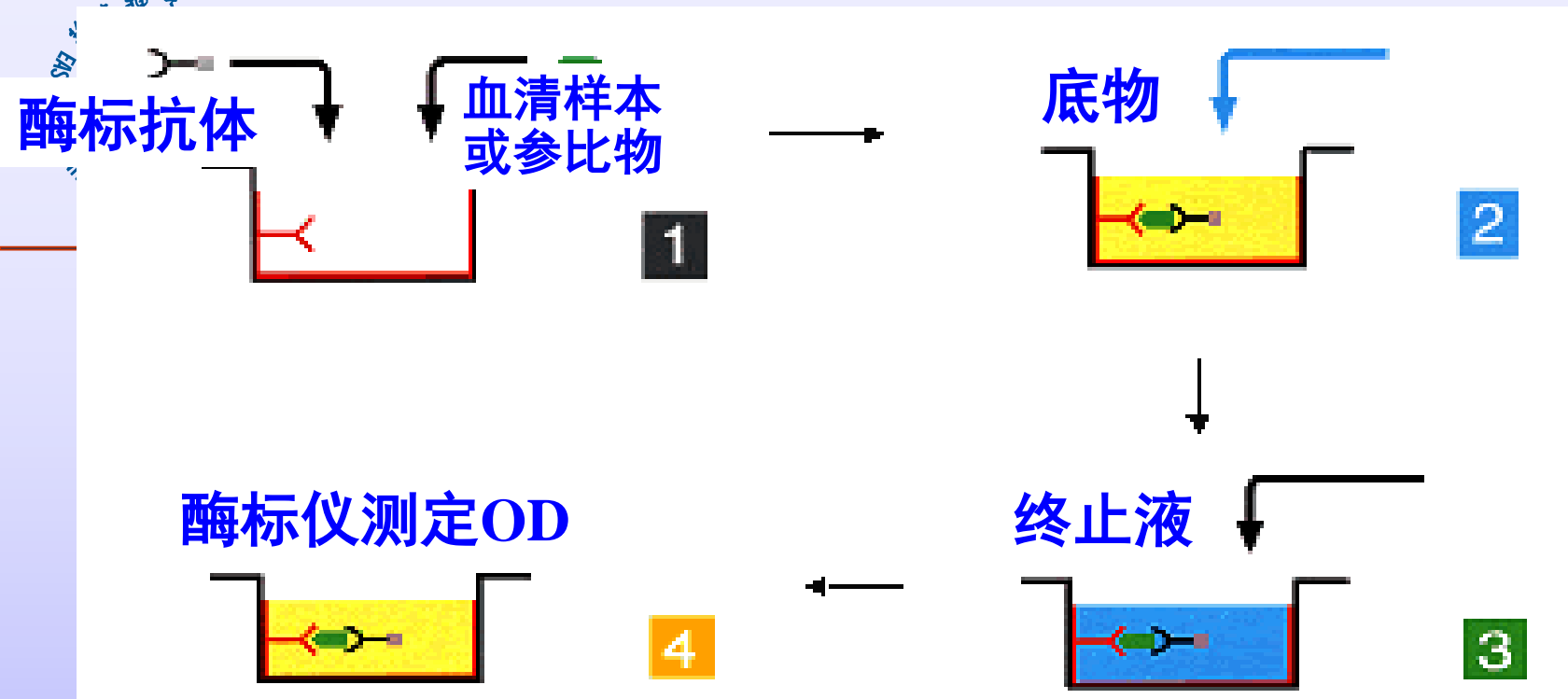
# 双抗体夹心法测抗原(Sandwich ELISA)

## ■ 工作原理:

利用连接于固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上两个抗原决定簇结合, 形成**固相抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物**。由于反应系统中固相抗体和酶标抗体的量相对于待测抗原是过量的, 因此**复合物的形成量与待测抗原的含量成正比**。测定复合物中的酶作用于加入的底物后生成的有色物质量(OD值), 即可确定待测抗原含量。

是检测抗原最常用的ELISA, 适用于检测分子中具有至少两个抗原决定簇的多价抗原, 而不能用于小分子半抗原的检测。

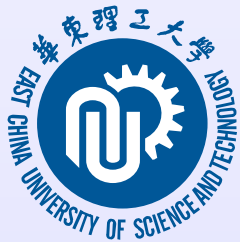
乙肝标志物中HBs-Ag(表面抗原)的检测常采用本法



### ■ 操作步骤：

- (1) 将特异性抗体与固相载体联结，形成固相抗体。**洗涤**除去未结合的抗体及杂质。
- (2) 加受检标本，保温反应。标本中的抗原与固相抗体结合，形成固相抗原抗体复合物。**洗涤**除去其他未结合物质。
- (3) 加酶标抗体，保温反应。固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合。**彻底洗涤**未结合的酶标抗体。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检抗原的量相关。
- (4) 加底物显色。固相上的酶催化底物成为有色产物。通过比色，测知标本中抗原的量。





# 双抗原夹心法测抗体

- 反应模式与双抗体夹心法类似。用特异性抗原进行包被和制备酶结合物，以检测相应的抗体。与间接法测抗体的不同之处为以酶标抗原代替酶标抗抗体。此法中受检标本不需稀释，可直接用于测定，因此其敏感度相对高于间接法。**乙肝标志物中抗HBs的检测常采用本法。**本法关键在于酶标抗原的制备，应根据抗原结构的不同，寻找合适的标记方法。

- 工作原理：

利用连接于固相载体上的抗原和酶标抗原分别与样品中被检测抗体分子上两个抗原结合位点结合，形成**固相抗原-抗体-酶标抗原**免疫复合物。由于反应系统中固相抗原和酶标抗原的量相对于待测抗体是过量的，因此复合物的形成量与待测抗体的含量成正比（在方法可检测范围内）。测定复合物中的酶作用于加入的底物后生成的有色物质质量（OD值），即可确定待测抗体含量。

## 操作步骤：

- (1) 将特异性抗原包被固相载体。孵育一定时间，使形成固相抗原，洗涤除去未结合的抗原和杂质。
- (2) 加待检标本，孵育，使标本中的抗体与固相载体上的抗原充分反应，形成固相抗原抗体复合物。洗涤除去其他未结合物质。
- (3) 加酶标抗原，孵育，使形成**固相抗原-待测抗体-酶标抗原夹心复合物**。洗涤除去未结合酶标抗原。
- (4) 加底物显色。固相上的酶催化底物产生有色产物, 通过比色, 测标本中抗体的量。

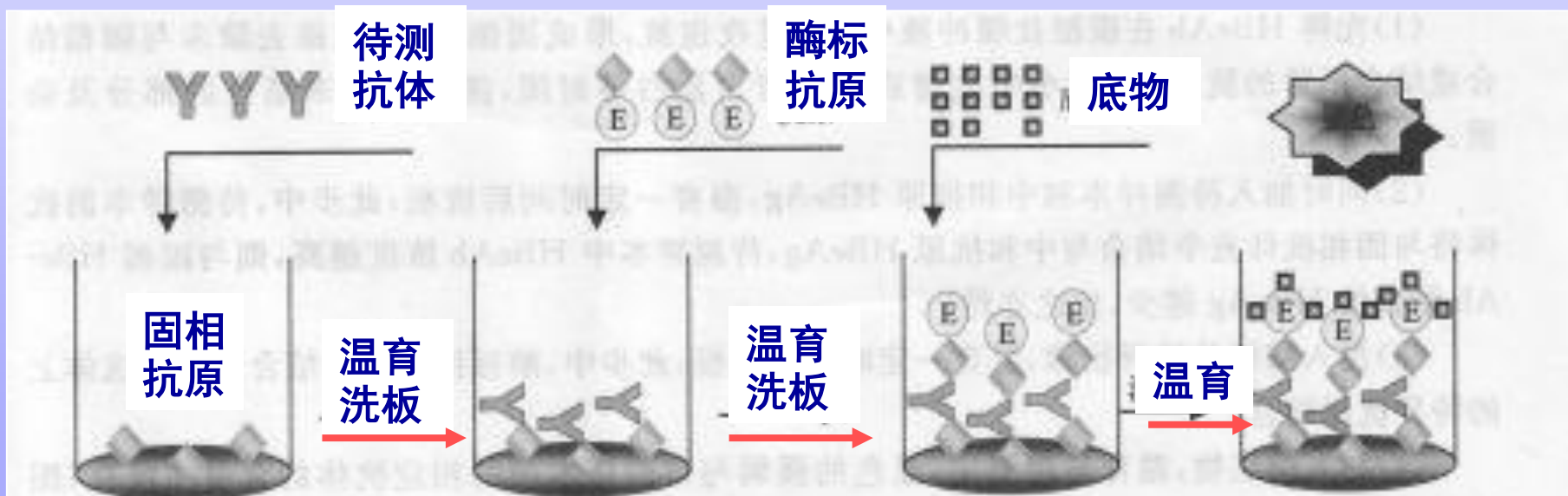
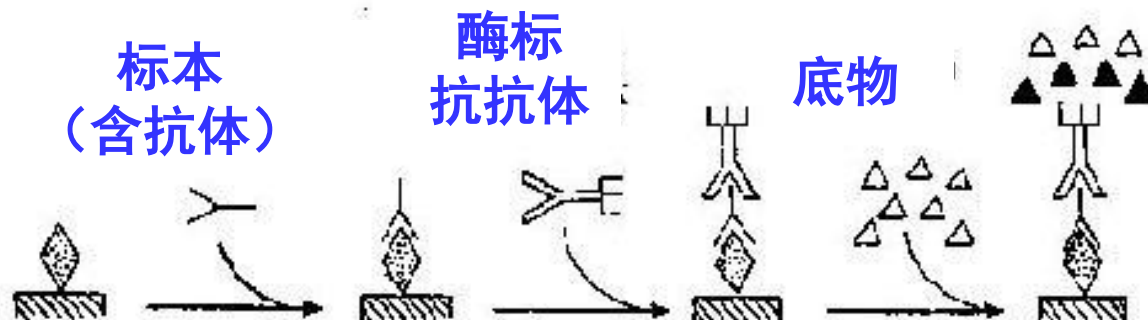
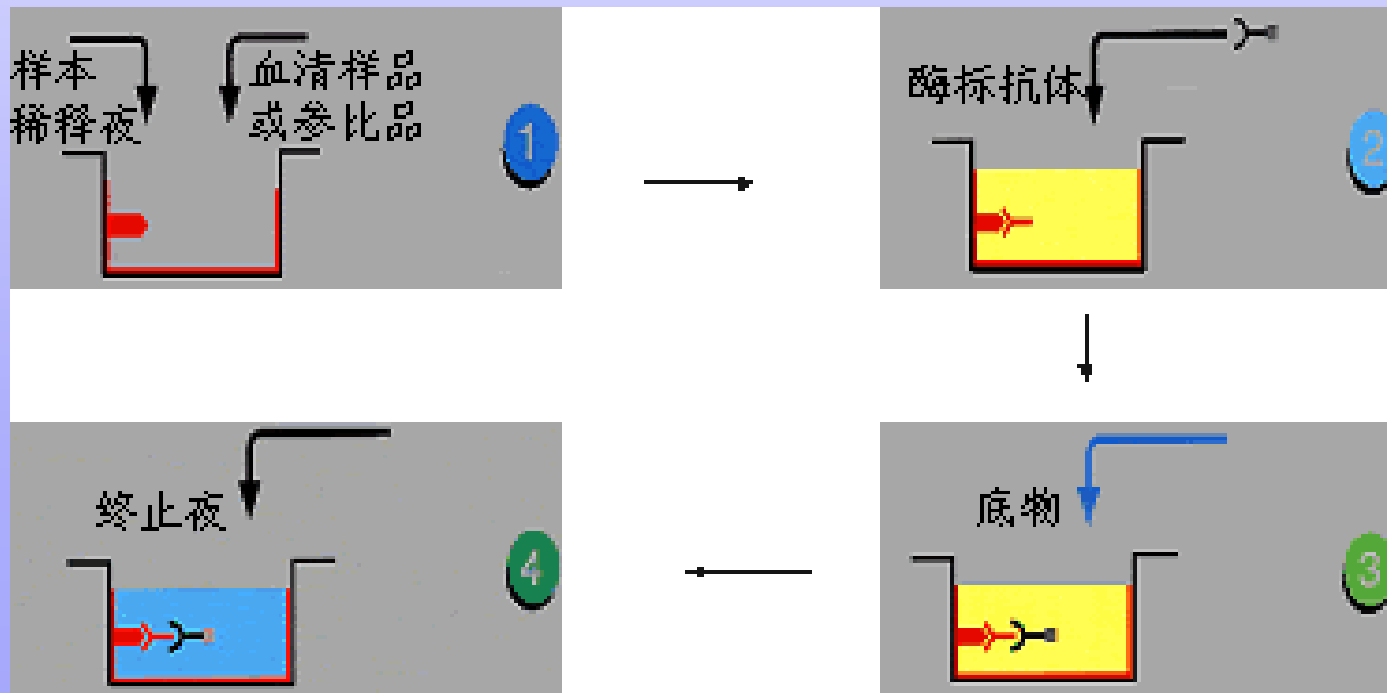


图 2-7 双抗原夹心法测抗体

# "Indirect" ELISA (间接法测抗体)



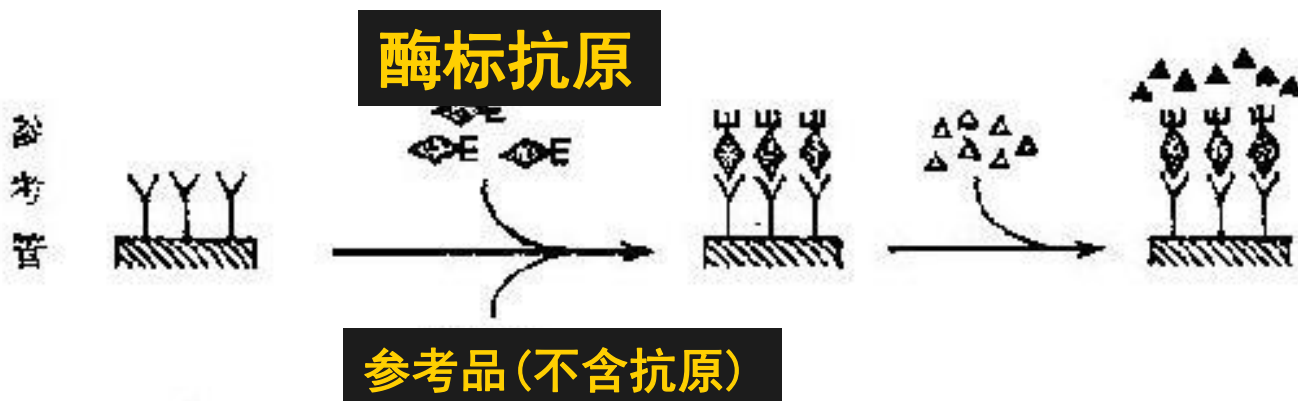
固相抗原



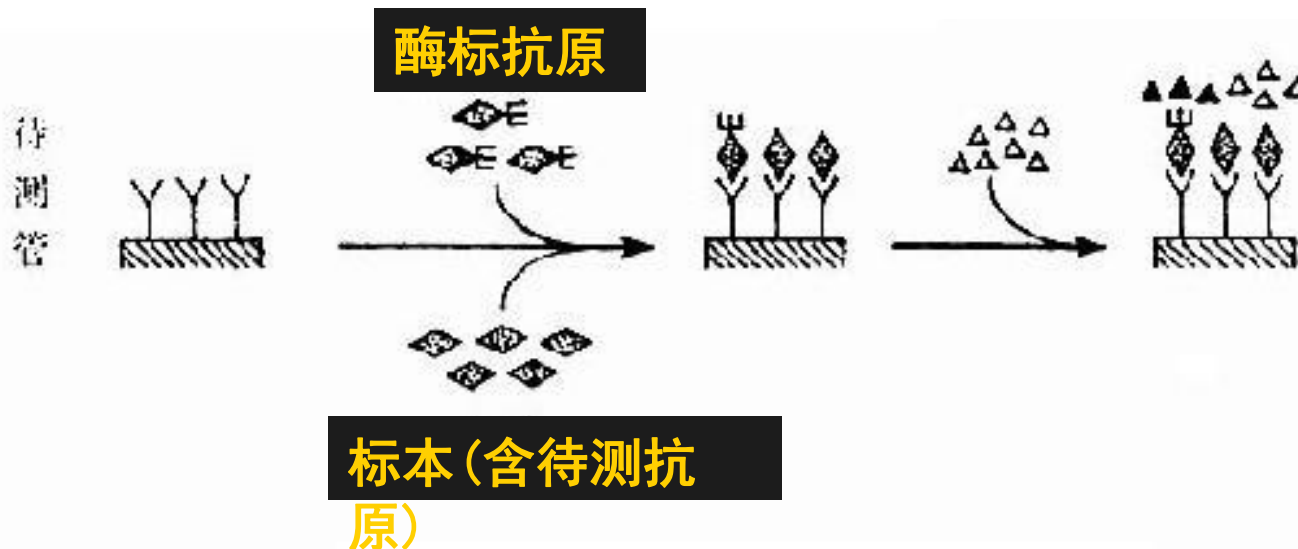
# Competitive ELISA

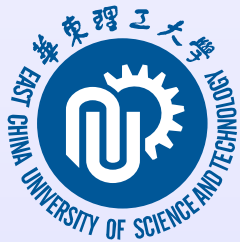
## 竞争法测抗原/抗体

参考管



待测管

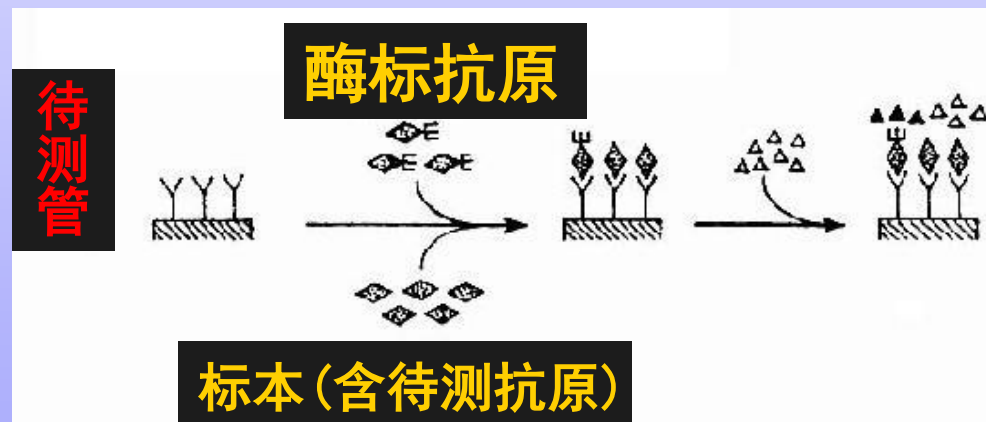
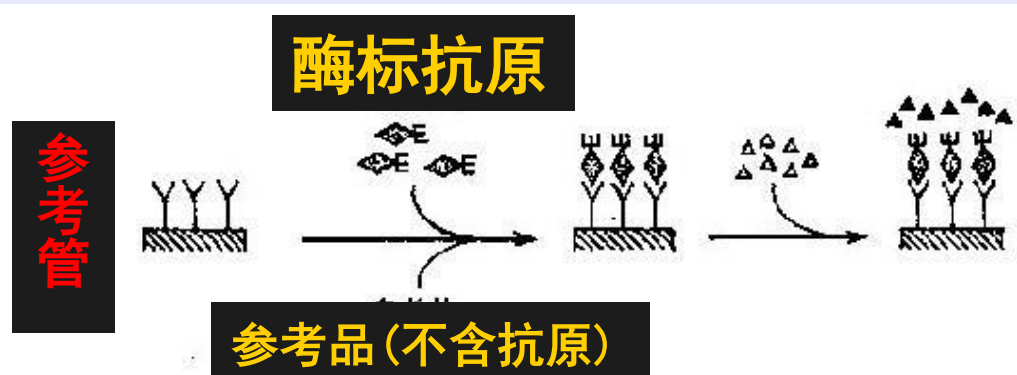


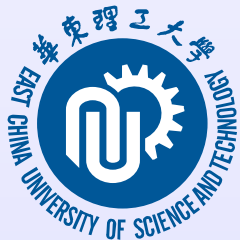


竞争法可用于测定抗原，也可用于测定抗体。小分子抗原或半抗原缺乏可作夹心法的两个以上的位点，因此不能用双抗体夹心法进行测定，可以采用竞争法模式。其原理是**标本中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合**。标本中抗原量含量愈多，结合在固相上的酶标抗原愈少，最后的显色也愈浅。小分子激素、药物等ELISA测定多用此法。

以测定抗原为例，受检抗原和酶标抗原竞争与固相抗体结合，因此结合于固相的酶标抗原量与受检抗原的量呈反比。操作步骤如下：

- (1) 将特异抗体与固相载体连接，形成固相抗体。洗涤。
- (2) **待测管**中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液，使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原，则酶标抗原能顺利地、与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合，竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会，使酶标抗原与固相载体的结合量减少。**参考管**中只加酶标抗原，保温后，酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量。洗涤。
- (3) 加底物显色：参考管中由于结合的酶标抗原最多，故颜色最深。参考管颜色深度与待测管颜色深度之差，代表受检标本抗原的量。待测管颜色越淡，表示标本中抗原含量越多。





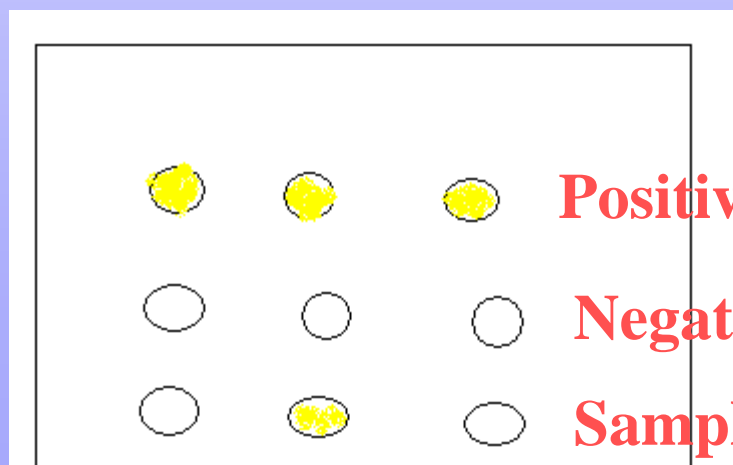
# Control design

Positive control(阳性对照)和Negative control(阴性对照)

阳性对照品应与检测组分相一致

阴性对照品须先行检测确定不含待测物

定性鉴别



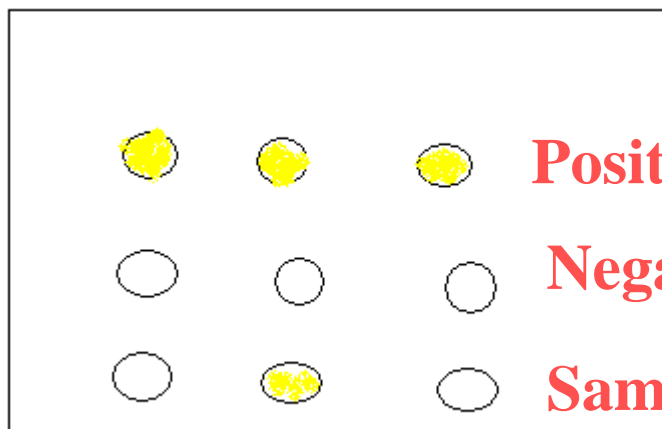
Positive control

Negative control

Sample

## 定性鉴别

(Qualitative detection)



Positive control

Negative control

Sample

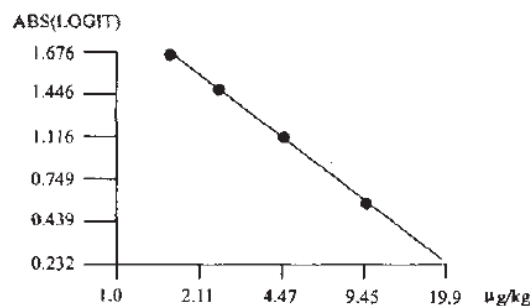
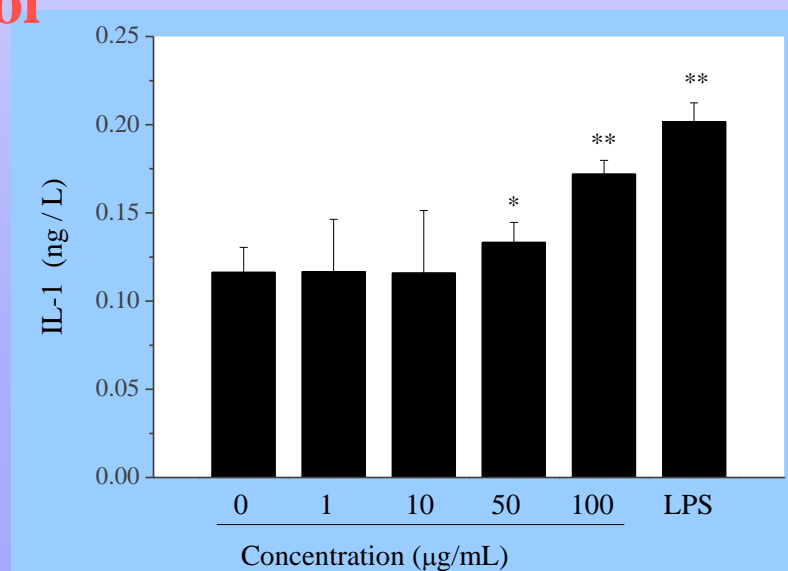
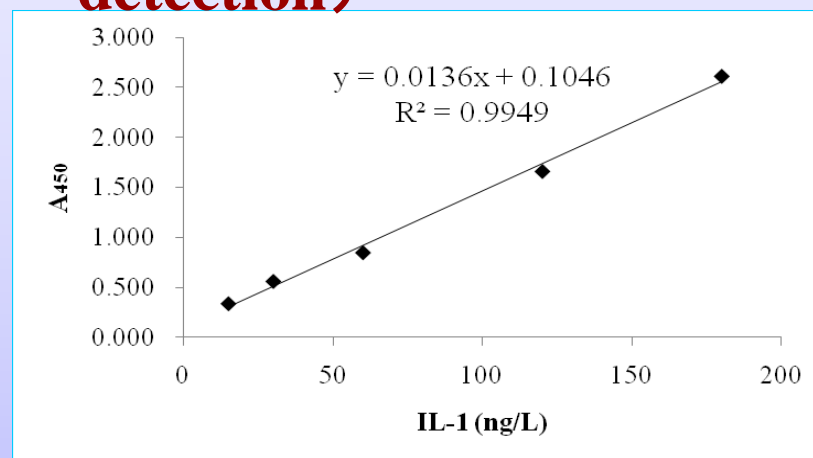


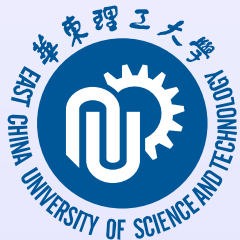
图1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的标准曲线

## 定量测定

(Quantitative detection)







# The Application Of ELISA

## Sandwich ELISA

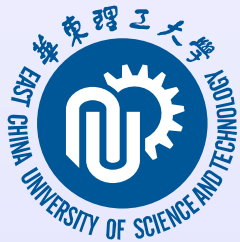
### 1. 乙型肝炎血清标志物

Sandwich ELISA detect Hepatitis B serum Signs  
( antibody and antigen)

乙肝病毒标志物，就是俗称的乙肝 “两对半”

- Hepatitis B surface antigen (HBs-Ag) : 表面抗原
- Hepatitis B surface antibody (HBs-Ab): 表面抗体
- HBeAg : E-抗原
- HBe-Ab: E-抗体
- HBc-Ab- IgG:核心抗体IgG

大三阳：1, 3, 5 (+) ； 小三阳：1, 4, 5 (+)



## 2. HIV-1 p24 antigen detection (Sandwich Elisa )

### 双抗体夹心ELISA法检测HIV-1 p24抗原

近年来艾滋病病毒(HIV)感染在全世界迅速蔓延，我国自1985年发现艾滋病(AIDS)以来，HIV / AIDS的流行趋势亦日趋严重，因此建立、发展与完善HIV检测方法对于HIV / AIDS的防治尤为重要。HIV-1 p24抗原的检测日益受到世界各国的高度重视。而双抗体夹心ELISA法不失为一种比较合适的方法。

**p24抗原：** 24 kDa的蛋白质,是HIV病毒颗粒的主要结构蛋白。

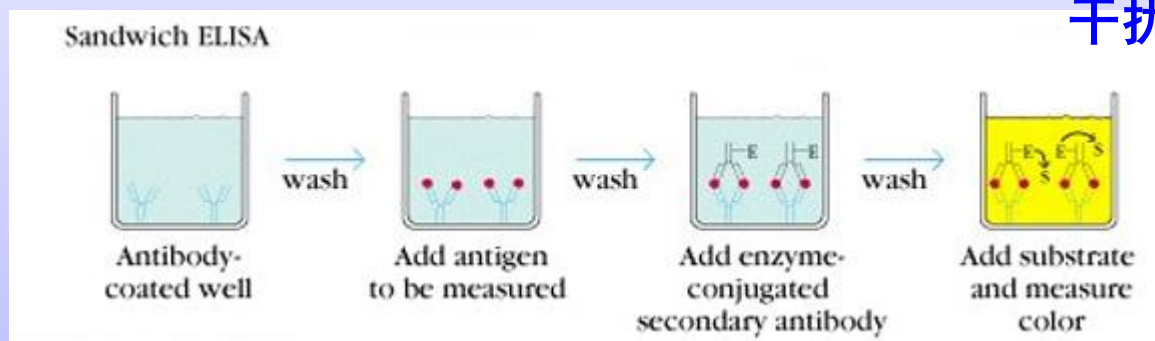


## Sandwich ELISA

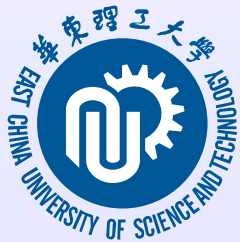
### 3. 细胞因子（IL-1）的检测

#### ■ ELISA法检测细胞因子IL-1含量的原理

白细胞介素IL  
肿瘤坏死因子TNF  
干扰素IFN .....



采用**双抗体夹心法**测定标本中小鼠白细胞介素1 (IL-1)。用纯化的IL-1 抗体包被微孔板，制成**固相抗体**，往包被单抗的微孔中依次加入IL-1，再与HRP 标记的IL-1 抗体结合，形成**抗体-抗原-酶标抗体复合物**，洗涤后加底物TMB **显色**。TMB 在HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和IL-1 呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度，通过标准曲线计算样品IL-1浓度。



## ■ 松树前花青素对小鼠巨噬细胞Raw264. 7分泌IL-1的影响

RAW264. 7细胞悬浮液,  $5 \times 10^5$ 个/mL, 接种于96孔细胞培养板, 100  $\mu$  L/孔

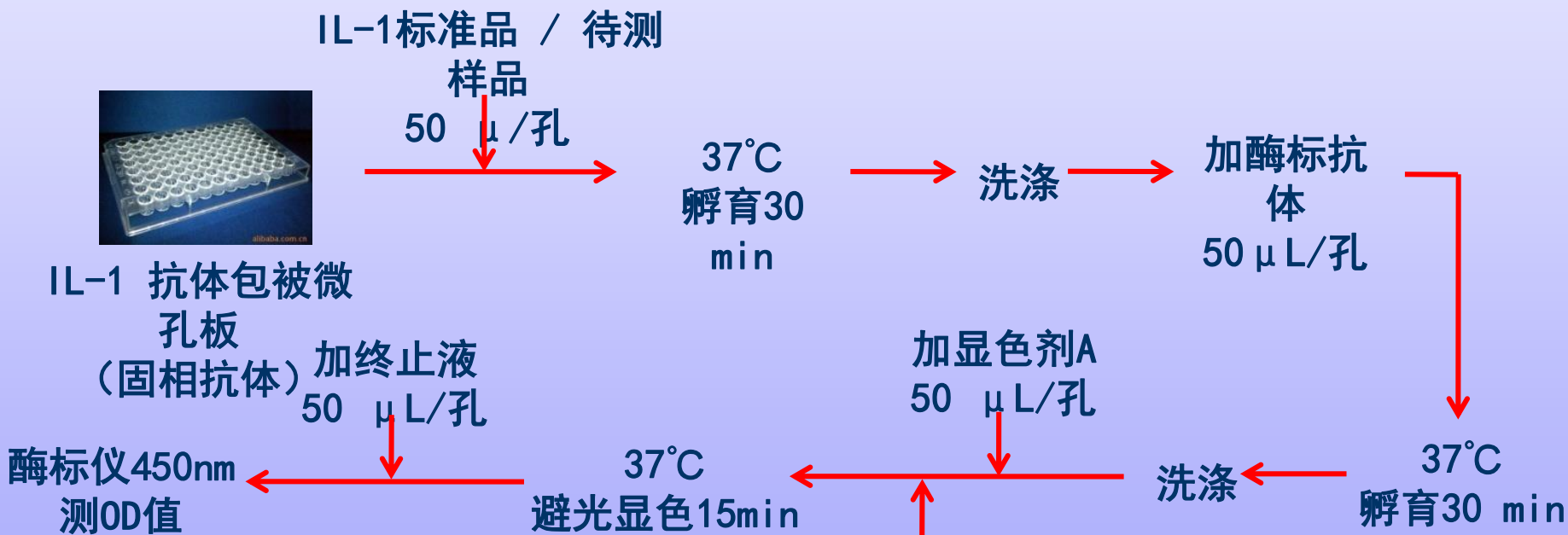
↓  
37°C培养4 h

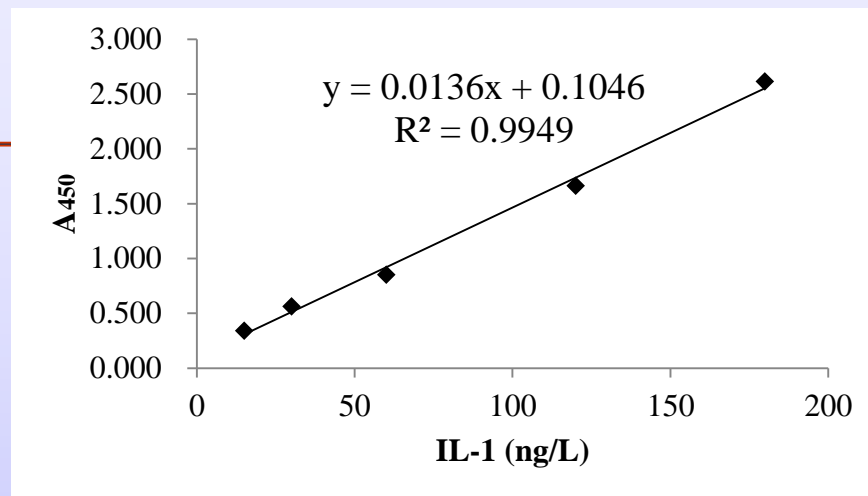
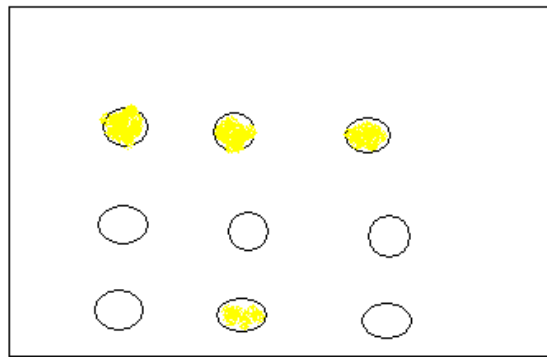
↓  
添加不同浓度药物 ( $\mu$  g/mL)  
同时设置空白对照组及阳性对照 (LPS 5  $\mu$  g/ml)

↓  
培养24h

↓  
无菌管收集细胞培养上清液, 离心20 min (3000转/min)

## ■ 测定方法



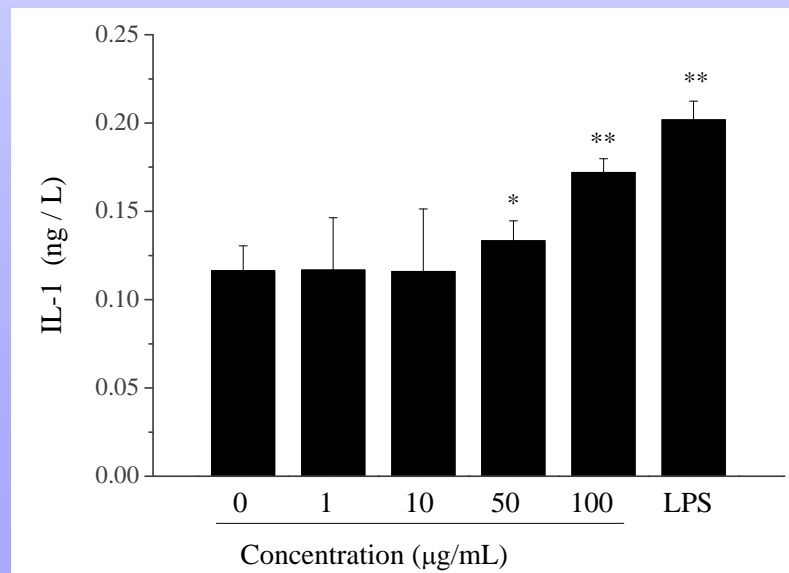


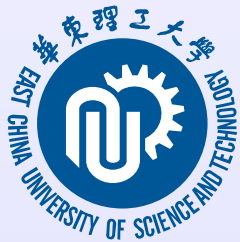
## ■ IL-1标准曲线及样品含量计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

根据样品的OD 值和标准曲线的直线回归方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

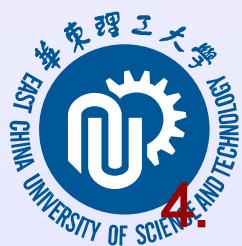
## 药物对小鼠巨噬细胞Raw264.7分泌IL-1的影响





# 食品安全鉴定

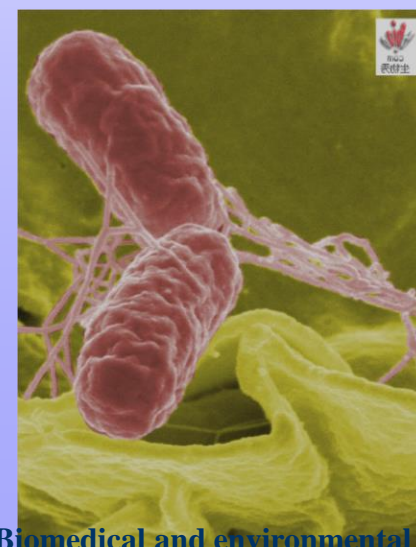
- 食品中毒素的检测（黄曲霉素B<sub>1</sub>，瘦肉精、农药残留等）
- 食品中有害微生物的检测（沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等）



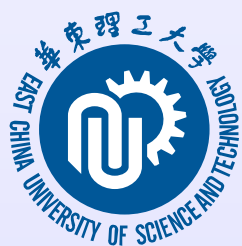
## 4. 食品中有害微生物（沙门氏菌）的检测

### Sandwich Elisa

- 沙门氏菌 (*Salmonella*) 属肠杆菌科，革兰氏阴性肠道杆菌，绝大多数有鞭毛并能运动；
- 沙门氏菌引起的急性传染病。临床表现主要分为胃肠炎型（即食物中毒）、伤寒型、败血症型及肠道外局灶性感染。
- 沙门氏菌具有复杂的抗原结构，一般可分为3种：
  - 菌体 (O) 抗原
  - 鞭毛 (H) 抗原
  - 表面 (Vi) 抗原







# 食品安全- 毒素、农残/兽残等检测

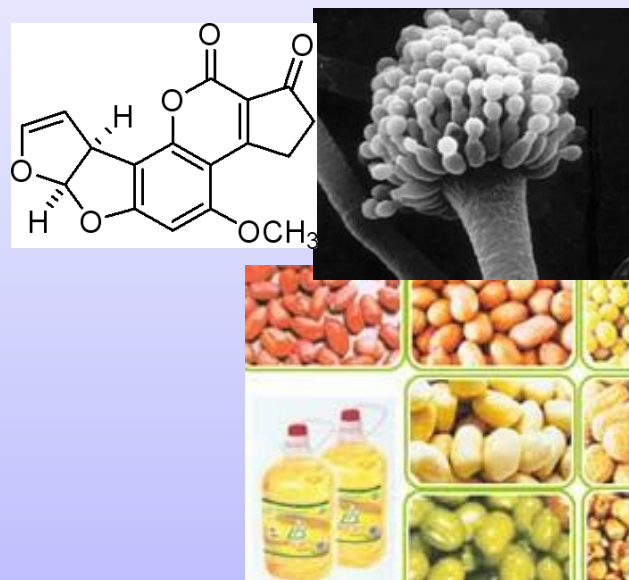
## Competitive Elisa

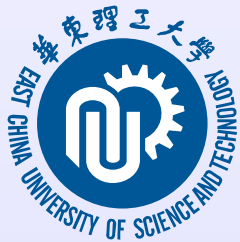
食品中毒素（黄曲霉素B1）的检测；  
食品中克伦特罗（瘦肉精）残留量的  
测定；  
食品中农药残留（甲胺磷）的检测



## 食品中毒素（黄曲霉素B1）的检测

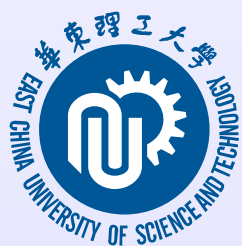
- **黄曲霉毒素 (Aflatoxins)**，是黄曲霉 (*a. flavus*) 和寄生曲霉 (*a. parasiticus*) 产生的代谢产物，**剧毒**。  
主要存在于被黄曲霉污染过的粮食、油及其制品中，如花生、花生油、玉米等中最为常见。
- 已分离鉴定出黄曲霉毒素共有12种，**以黄曲霉素B1的毒性最强**，比氰化钾的毒力大10倍，比砒霜大68倍，致癌力是二甲基硝胺的75倍，是甲基胆蒽的900倍，半数致死量为0.36毫克/公斤体重。
- **毒性机理**：黄曲霉毒素分子中的双呋喃环结构，能干扰信息RNA和DNA的合成，进而干扰细胞蛋白质的合成，导致动物全身性损害。





## 食品中毒素（黄曲霉素B1）的检测

- 中华人民共和国国家标准中测定食品中黄曲霉毒素B1的方法共有2种：
  - 薄层板荧光检测法：黄曲霉毒素B1最低检出浓度为 $5\mu\text{g/kg}$ ；
  - ELISA检测法：黄曲霉毒素B1最低检出浓度为 $0.01\mu\text{g/kg}$ 。



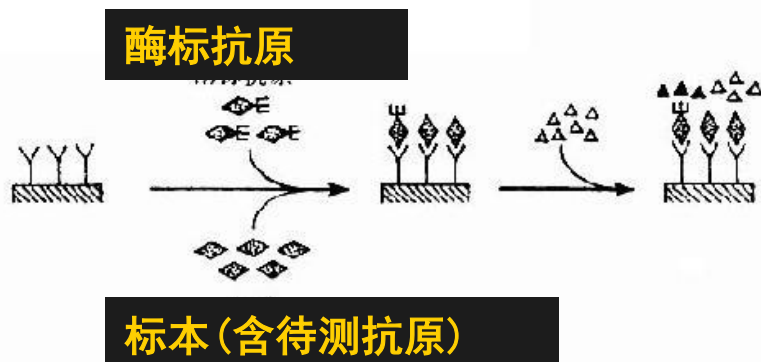
# 食品中毒素（黄曲霉素B1）的检测方法

## 竞争Elisa

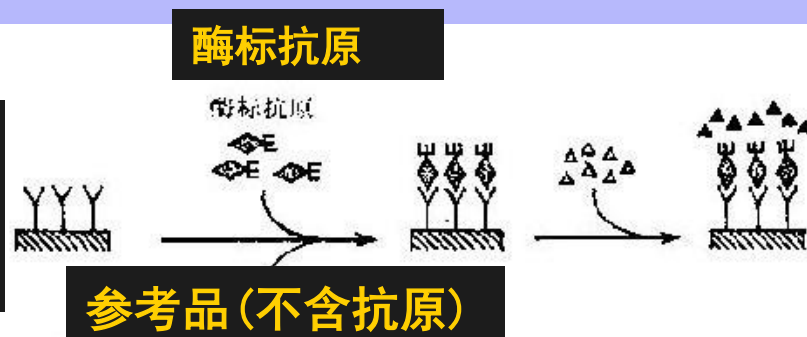
### ■ ELISA法检测黄曲霉素B1含量的原理

酶标板微孔包被有抗黄曲霉毒素抗体，加入酶标记黄曲霉毒素结合物和含黄曲霉毒素标准液或样品提取液。游离的黄曲霉毒素和酶标结合物竞争抗体结合部位。洗去没有被抗体结合的酶标记结合物。加入底物进行酶的催化显色反应。结合的酶标记物使无色的底物产生蓝色。加入反应停止液后颜色由蓝色变为黄色。颜色的深浅可以反映样品黄曲霉毒素含量的多少。用酶标仪可准确定量样品中黄曲霉毒素的浓度。

待测管



参考管



# 食品中毒素（黄曲霉素B<sub>1</sub>）的检测

## ■ 实验材料

- ✓ 抗黄曲霉毒素B<sub>1</sub>抗体；
- ✓ 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准溶液；
- ✓ 酶标记黄曲霉毒素结合物
- ✓ 洗涤液；
- ✓ 底物溶液；
- ✓ 反应终止液；



# 食品中毒素（黄曲霉素B<sub>1</sub>）的检测

## ■ 测定方法

酶标记黄曲霉毒素结合物  
+  
黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准溶液/样品  
溶液

混合  
100  $\mu$ l/孔

酶标板微孔包被有  
抗黄曲霉毒素抗体



室温孵育  
15min

洗涤

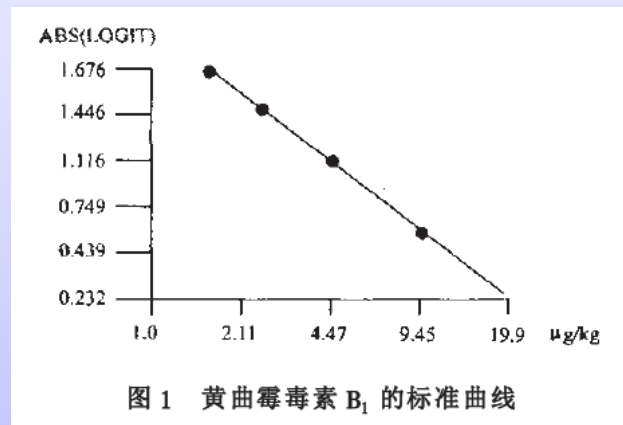
加入底物  
100  $\mu$ L/孔

酶标仪490nm测出OD值

终止显色反应

终止液100  $\mu$ L/孔

室温  
5 min



# 问题

1. 进行  $\beta$ -半乳糖酶检测的Western blot实验中，在蛋白质转膜后，实验员忘记用脱脂奶粉封闭处理硝酸纤维素膜。会产生什么影响？
2. Western blot实验是否必须设Marker？Western-blot法测定DMC对MRP1蛋白表达的影响时，蛋白上样量是否要求相同？

