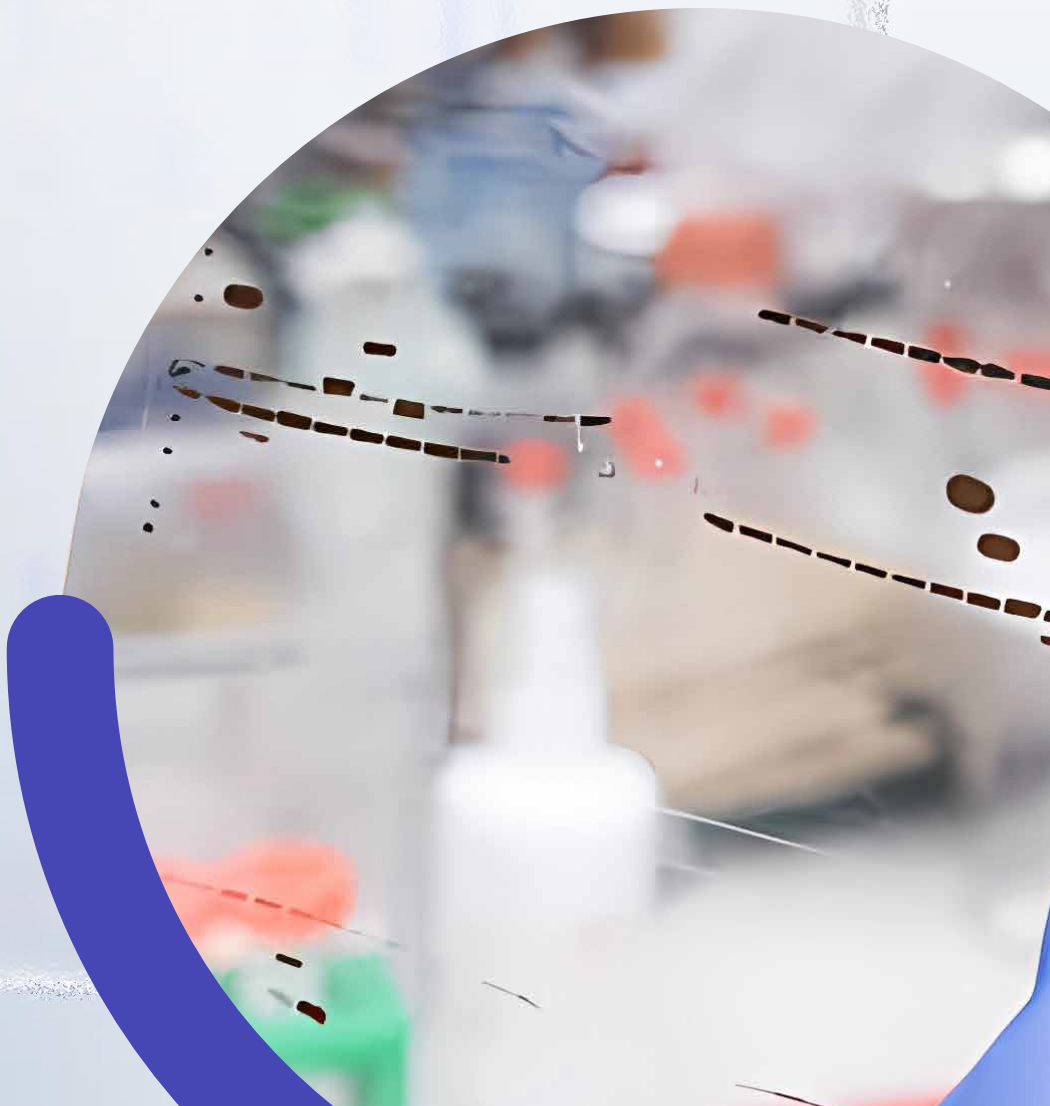


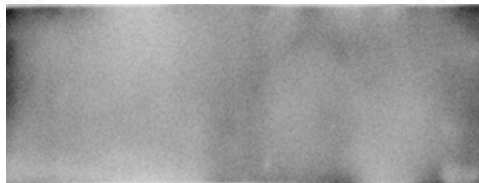
蛋白免疫印记 常见问题与解决方案

Trouble Shooting of Western Blot



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 1：膜上一片空白



原因 -1. 膜上根本没有蛋白

获取样本后，蛋白提取失败且未进行蛋白浓度检测。

处理方法

使用 BCA 法、Folin 酚法、Bradford 法等方法进行样本蛋白浓度检测，保证样本提取成功。

原因 -2. 样本中不表达目标蛋白

对样本中蛋白表达情况并不是很熟悉，可能需要检测的目标蛋白在样本中根本就没有表达。

处理方法

在参考文献或 Uniprot/NCBI 上查找对应蛋白的组织表达特异性，分析可能的表达量，判断自己样本中的表达情况。

原因 -3. 抗体未结合 / 抗体失效 / 一二抗不匹配

一抗鼠源，二抗却选了山羊抗兔；抗体与靶标结合失败；抗体存放不当或存放过久导致失效。

处理方法

重新选择配对的一二抗；买其他品牌的相同靶标抗体对照试验；将该抗体和样本寄回厂家进行质检。

原因 -4. 转膜效率低 / 失败

膜没有完全活化/靶蛋白分子量小于 10 kd/靶蛋白等电点等于或接近转移缓冲液 pH 值/甲醇浓度过高，蛋白沉淀 / 转膜时间不够。

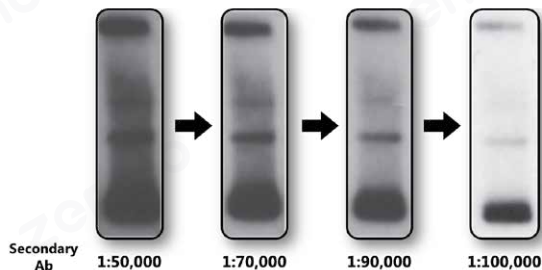
处理方法

使用甲醇充分浸透膜，成半透明状后取出，保证其完全活化；选择小孔径的膜，缩短转膜时间；可尝试使用其他缓冲液如 CAPS 缓冲液 (pH 10.5) 或使用低 pH 值缓冲液如乙酸缓冲液；降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替；对于厚的胶以及高分子量蛋白需要延长转膜时间。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 2：膜曝光之后高背景



原因 -1. 封闭不完全

膜的空白部分结合了一抗，导致二抗的非特异性结合，显影曝光导致高背景。

处理方法

延长封闭时间。

原因 -2. 一抗 / 二抗浓度过高

一抗 / 二抗浓度过高，导致其与背景特异性结合。

处理方法

梯度稀释各试剂进行预实验，找到最优体系。

原因 -3. 封闭剂选择错误

不合适的封闭剂会导致抗体在背景上与封闭剂非特异性结合。

处理方法

更改封闭剂种类。

原因 -4. 膜处理不当

因为操作不当导致的膜污染 / 一抗洗脱不完全导致的高背景。

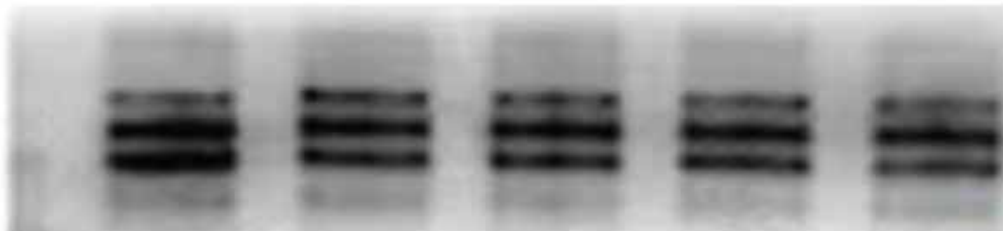
处理方法

提高实验技巧，完善实验细节；增加洗脱时间，必要时可加入 tween-20。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 3：条带周围出现多条杂带或大小与理论不符



原因 -1. 目标蛋白具有多种修饰形式

磷酸化、甲基化、乙酰化、糖基化等不同修饰作用在同一关键通路枢纽靶标上，此为正常结果。

原因 -2. 蛋白表位相似但结构不同

新检测出文献未报到蛋白 / 同一家族蛋白构型不同 / 细胞株纯度不够，接受该结果作为分析对象。

原因 -3. 细胞传代过多，蛋白表达异常

多次传代发生基因组紊乱，二倍体消失或其他编码表达异常的现象。

原因 -4. 多克隆抗体

多克隆抗体与其他抗原的交叉反应导致非特异性条带较多。

处理方法

如果杂带和目标条带距离较远可以进行裁膜处理，如果杂带和目标条带较近无法通过裁膜避免，则需要更换单克隆抗体。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 4：非特异性条带



原因 -1. 抗体对于目标蛋白没有特异性

抗体与蛋白非特异性结合。

处理方法

更换抗体。

原因 -2. 蛋白降解

蛋白在提取过程中出现了降解的情况，导致实验失败或非特异性条带出现，通常会同时出现内参条带不清晰的情况。

处理方法

使用新鲜制备的标本，并使用新配蛋白酶抑制剂，在提取蛋白的过程中全程冰上操作。

案例 5：膜上有黑色斑点



原因 -1. 抗体与封闭剂非特异性结合

封闭剂有杂质，或脱脂奶粉未溶解完全。

处理方法

增加封闭后的洗涤时间。

原因 -2. 抗体凝胶非特异性结合

转膜之后膜上残留的凝胶颗粒与抗体非特异性结合。

处理方法

增加封闭后的洗涤时间。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 6：不均匀/扭曲的条带

微笑条带

电泳速度过快，电压过高，电泳温度过高，使得胶变形。



处理方法

通过减少电压等减慢电泳速度，可在冷室或者冰浴中进行电泳或者改变电泳 pH。

皱眉条带

凝胶和玻璃挡板底部有气泡，挡板两边聚合不完全。



处理方法

配胶时充分混匀，排空空气。

某条条带变形

WB 结果中其它条带均正常，某条条带出现变形，如下图所示，出现该现象可能的原因是 SDS-PAGE 胶中有气泡或者不溶性颗粒。



处理方法

配胶过程中要小心，使用无杂质的液体，同时要注意排除气泡。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 6：不均匀/扭曲的条带

哑铃状条带

配置胶有问题，胶凝固后不均一，样品可能含有过多杂质。



处理方法

重新配置胶，确保胶质量无问题来避免该现象出现；在样品使用前对其进行离心，以去除过多杂质。

条带粘连

出现该现象的原因可能是上样量太多，分离胶和浓缩胶之间有间隙，样品窜孔。



处理方法

通过减少上样量和提高配胶质量来避免该问题。

条带拖尾

样本中蛋白溶解不好，导致检测结果出现严重的拖尾现象。



处理方法

加样前煮沸样品，离心取上清进行检测。



蛋白免疫印记常见问题与解决方案

案例 7：条带反白

条带中间或周围出现白圈

条带中间白圈是由于转膜过程中膜和胶之间存在气泡。

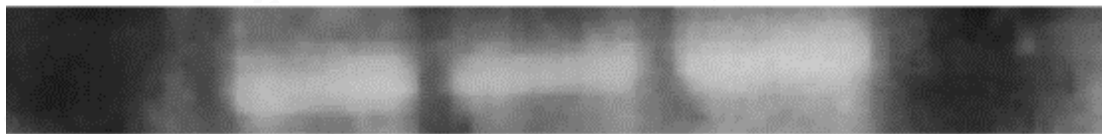


处理方法

在转膜过程中要尽量去除气泡，使膜，滤纸和胶紧密结合，保持膜的充分浸润。

条带反白现象

一抗浓度过高，二抗上HRP催化活力太强，局部能量消耗过大，导致能量不足，无法发光，使得条带出现反白现象。



处理方法

降低一抗和二抗浓度。

