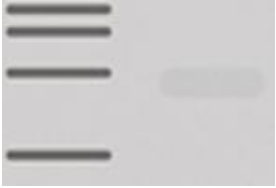




Western Blot 常见问题解析

所有的实验和模型系统都是不同的，因此有时即使按照标准实验方案操作，可能也无法获得预期的结果。我们针对背景高、信号弱或无信号，有杂带等，提出了可能的原因及一些解决方法，希望能有所帮助。

结果	具体问题	原因及解析	解决方案
无信号或条带模糊	蛋白 marker 在内所有条带都很模糊或者没有信号 	转膜不充分	转膜过程中，用滚轮除去三明治夹心中的气泡，确保凝胶和膜充分接触
			确保转印三明治以正确的方向放置在转印设备中
			PVDF 膜需预先浸在甲醇中活化，然后浸到转印缓冲液中
			使用可逆染色剂丽春红检测转膜效果
			增加转印时间或电压
		过度洗膜	缩短洗涤时长或减少洗涤次数
	蛋白 marker 条带正常，	洗涤或孵育缓冲液污染	使用新鲜配制的无菌缓冲液
		成像时曝光时间多短	延长曝光时间
	蛋白 marker 条带正常，	样本制备不成功	采集合适的样本，添加蛋白酶抑

样本泳道条带模糊或没有信号 		制剂，全程在冰上进行
	一抗二抗不匹配	二抗需和一抗宿主相同，且对应实验应用。如一抗是兔抗，做 WB，则可选择山羊抗兔-HRP
	抗体浓度过低	增加抗体浓度，延长孵育时间，如 4℃孵育过夜
	样本中无靶蛋白或蛋白含量低	增加上样量，每泳道蛋白上样量不低于 20-30μg
		选择表达靶蛋白的样本，浓缩样本使信号最大化
	转膜不充分	转膜过程中，用滚轮除去三明治夹心中的气泡，确保凝胶和膜充分接触
		确保转印三明治以正确的方向放置在转印设备中
		PVDF 膜需预先浸在甲醇中活化，然后浸到转印缓冲液中
		使用可逆染色剂丽春红检测转膜效果
		增加转印时间或电压
	与膜的结合不充分	对于分子量大于 100kDa 的蛋白，建议在转膜缓冲液中添加终浓度为 0.1%的 SDS，将甲醇浓度降至 10%或更低
		对于分子量小于 20kDa 的蛋白，建议用 0.22μm 的 PVDF(NC)膜，转膜缓冲液中添加 20%甲醇，不加 SDS
	抗原被封闭液掩	减少封闭液中的蛋白浓度，尝试

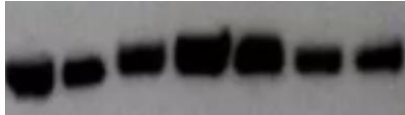
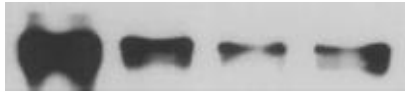
		盖	换一种封闭液
		缓冲液中含叠氮化钠	叠氮化钠会抑制 HRP，避免与 HRP 标记抗体一起使用
		化学发光底物的信号太弱	增加膜与底物的孵育时间
			增加胶片曝光时间
			样品蛋白含量低时，建议使用超敏 ECL 发光液
		膜已剥离并重新检测	避免同一张膜的多次重复剥离
			缩短在剥离液中的孵育时间，以防止抗原丢失
		跨膜蛋白	跨膜蛋白高温煮沸，蛋白容易交缠在一起，导致抗原表位无法暴露使用，未煮沸的样本，如室温孵育 15 分钟
	重组蛋白或过表裂解液，未出现条带	重组蛋白或表达载体不合格	使用考马斯亮蓝染色或银染色进行验证，或用标签抗体进行检测
		不是全长蛋白，抗体的免疫原不在该蛋白序列	使用免疫原在这该蛋白序列中的抗体
		免疫原和标签位于同一端，导致标签可能阻碍抗体的识别	重新构建重组蛋白或过表达载体，不要让免疫原和标签位于同一端，或者使用免疫原不靠近标签的抗体
高背景 		抗体浓度过高，导致非特异性结合	降低一抗或二抗的浓度
		封闭液选择不当	不要在亲和素-生物素系统中使用牛奶进行封闭。牛奶中含有生物素，这会导致背景过高。

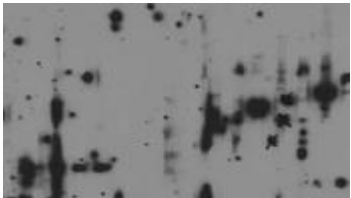
		检测磷酸化蛋白时，避免使用磷酸盐缓冲液（如 PBS）和含磷酸化蛋白的封闭剂（如牛奶或酪蛋白）。可以使用含 BSA 的 Tris 缓冲液（如 TBS）封闭。
		使用碱性磷酸酶（AP）标记物时，应选择 Tris 缓冲体系（TBS）的封闭液，因为磷酸盐缓冲液（PBS）会干扰 AP 的活性。
	非特异性位点的不充分封闭	增加封闭液中的蛋白浓度
		优化封闭时间和温度。在室温（RT）下封闭至少 1 小时，或在 4°C 下封闭过夜
		在封闭液中添加 Tween 20 去垢剂有助于减少背景，但是过多的去垢剂会干扰抗体结合，通常 0.05% 的终浓度比较合适
		使用包含 0.05% Tween 20 去垢剂的封闭液稀释抗体
	洗涤不充分	增加漂洗次数和漂洗缓冲液的体积
		将 Tween 20 去垢剂添加到洗涤液中，终浓度为 0.05%。如果 Tween 20 去垢剂的浓度过高，它 would 从膜上剥离蛋白质
	印迹膜处理不当	根据说明书润湿并活化膜
		处理膜时，请始终戴上干净的手套并使用镊子
		始终用液体覆盖膜以防止干燥

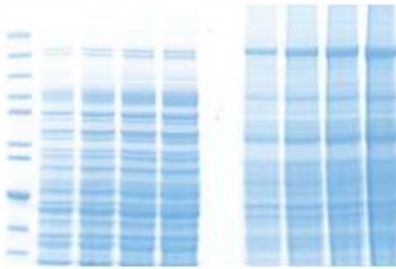
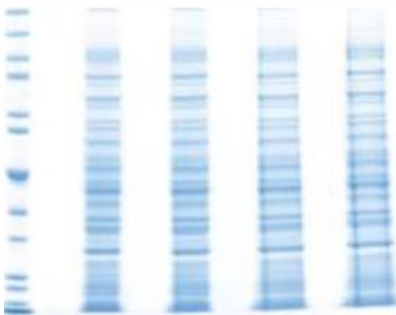
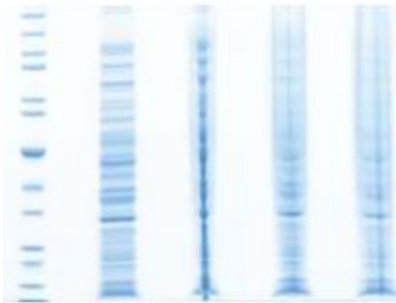
		所有孵育过程中都要进行震荡
		小心处理膜——损坏膜会引起非特异性结合
	设备或材料被污染	在使用之前制备新鲜的缓冲液并过滤
		只能使用干净且无污染的电泳设备、印迹设备和培养皿
	化学发光底物的信号太强	减少印迹的成像或曝光时间
		换用灵敏度更低的底物
		缩短膜与底物的孵育时间。
		孵育结束后，完全去除底物
		降低抗体浓度，特别是 HRP 和 AP 标记二抗的浓度
	二抗发生非特异结合	添加不含一抗的对照，尝试使用预吸附二抗
	印迹膜变干	用缓冲液覆盖膜，防止膜在孵育过程中变干
	在一个容器中孵育两个或多个膜	确保将它们背靠背放置
	印迹成像时，曝光时间过长	尝试缩短曝光时间
	膜选择导致的高背景	硝酸纤维素（NC）膜产生的背景比 PVDF 膜低，如果高背景存在，可考虑使用硝酸纤维素（NC）膜
	裂解方法强度不够	使用高强度裂解方法，以增强信号，减少非特异性条带
非特异条带或多条带	蛋白降解	如果在低分子量处看到多个条带，很可能就是这个原因引起的。

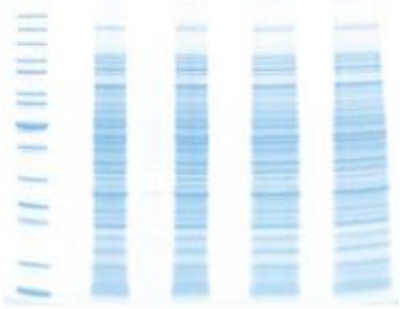
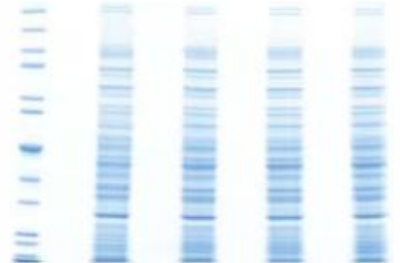
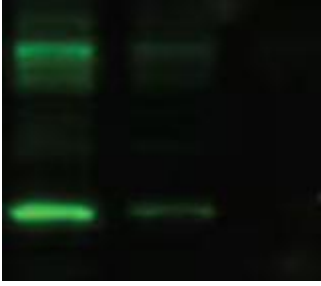


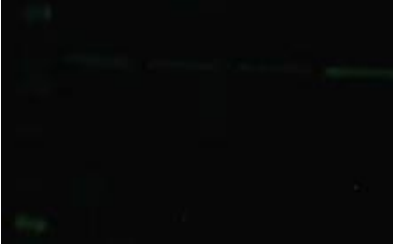
		使用新鲜的裂解液，添加蛋白酶抑制剂
	蛋白质形成多聚体	在分子量（预期条带分子量的 2 倍或 3 倍）处看到额外条带，很可能就是这个原因引起的 如果样本还原不充分，一些蛋白质会因二硫键的形成而形成二聚体、三聚体或更大的多聚体 延长样本在上样缓冲液中的煮沸时间
	修饰，如重度糖基化	如果在分子量处出现多条带或者拖尾，很可能是这个原因引起 可以尝试样本去糖基化，使用未煮沸的裂解液
	蛋白质存在前体、剪切体等多种形式	查看文献，了解切割位点的位置以及包含抗体免疫原序列的片段
	细胞系传代次数过多	细胞系频繁传代，逐渐导致其蛋白质表达谱出现差异 使用原始未传代的细胞系，与这些细胞系一起做平行对照实验。。
	条带为非特异性条带	用封闭肽来区分特异性和非特异性条带。只有特异性条带能被封闭掉 使用基因敲除裂解液或不表达靶蛋白的样本
	抗体浓度过高	降低抗体浓度，特别是一抗的浓度
	上样量过高	减少上样量

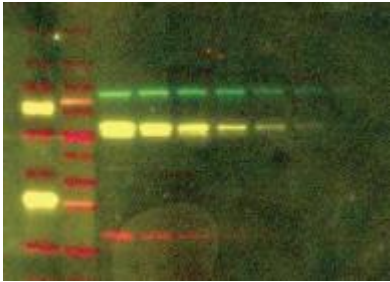
	化学发光底物的 信号太强	减少印迹的成像或曝光时间
		更换特异性更好的抗体
		缩短膜与底物的孵育时间
条带分子量不对	翻译后修饰	查询文献，看是否存在糖基化、磷酸化、前体蛋白剪切、泛素化等翻译后修饰
	蛋白质自身性质	蛋白质本身的电荷影响、转录异构体的存在、同源和异源聚合体和复合体等
	实验体系的影响	如蛋白 marker 不准、电泳影响、蛋白提取过程中发生降解等
微笑条带 	电压过高或电泳 温度过高	降低电压，在冷室或冰浴中进行电泳
皱眉条带（某条条带变形） 	SDS-PAGE 中有 气泡或不溶性颗粒	配胶中使用无杂质的液体
皱眉条带 	凝胶和玻璃挡板 底部有气泡，或者 两边聚合不完全	调整装置
哑铃条带 	凝胶不均匀	配制胶有问题，胶凝固后不均一，样品中可能含有过多杂质 重新配制凝胶，确保胶质量无问题；样品使用前离心
条带不均匀	凝胶聚合不均匀	检查凝胶配方，确认添加的 TEMED 是否适量

		确保凝胶在凝固时完全被缓冲液覆盖
条带呈白色（ECL 检测时） 	一抗和二抗的浓度可能过高	抗体浓度过高，底物很快被消耗，此时吸收的光非常少，导致成像时出现白色条带
竖条纹 	样品中含有不溶性颗粒	样品充分溶解混匀，必要时离心去除
条带拖尾 	样品溶解不好；存在蛋白降解；电泳液反复多次使用	样品充分溶解混匀后上样；尽量使用新鲜样本；使用新鲜配制的电泳缓冲液
条带粘连 	上样量太多；分离胶和浓缩胶之间有间隙，样品串孔	减少上样量和提高配胶质量
条带空泡 	转膜时膜上有气泡	用滚轮除去气泡，确保凝胶和膜充分接触
背景有不均匀的黑色斑点	封闭液未完全溶解，或抗体在膜上分布不均	封闭液确保充分溶解，封闭结束后用 TBST 清洗三遍再加一抗；抗体孵育时保持震动

		
蛋白条带分辨率低，泳道有纵向条纹且不直 	泳道的蛋白上样量过高	减少蛋白上样量
样品过粘，样品泳道边缘有纵向条纹，哑铃型条带，泳道变宽 	样品中盐离子浓度过高（硫酸铵）	进行透析以降低盐浓度 电泳前，将样品浓缩并重新溶解于低盐缓冲液中 确保样品中的盐浓度不超过 100 mM
蛋白质聚集导致形状诡异的狭窄泳道 	DNA 污染	上样前去除 DNA 以降低粘度
泳道宽度不一致，泳道变宽	样品中盐离子浓度过高（氯化	高盐浓度导致电导率增加，从而影响蛋白质迁移，可能导致蛋白

	钠); 电泳液中去垢剂浓度过高 (SDS 或 Triton X-100); RIPA 浓度高	质条带扩散到包含正常盐浓度样品的相邻泳道中 透析降低盐浓度, 样品浓缩重溶于低盐缓冲液, 确保样品中盐浓度不超过 100mM; 保持 SDS 与非离子型去垢剂的比例在 10:1 或更大, 减少影响电泳前稀释样品, 降低裂解缓冲液的终浓度
泳道边缘有阴影 	裂解液或样品缓冲液中的还原剂过多	SDS-PAGE 中, 还原剂 DTT (二硫苏糖醇) 和 TCEP (三 (2-羧基乙基) 膦) 的终浓度应小于 50 mM, β-ME (β-巯基乙醇) 还原剂的终浓度应小于 2.5%
荧光 WB 非特异和弥散条带 	抗体特异性不强	使用在 western blot 中充分验证的抗体
	多重检测中的抗体交叉反应	选择远亲物种的一抗
		选择预吸附的二抗
	多重检测时, 邻近通道荧光渗漏	优化一抗和二抗的用量
		避免同时使用光谱相近的标记物, 尤其在信号非常强的情况下 确保使用成像仪检测到的荧光染料 使用仪器上的自动曝光功能确定每个通道上的最佳曝光时间
信号弱或无信号	抗体特异性不强, 效价低	增加一抗浓度, 使用新鲜抗体, 避免多次重复使用稀释的抗体 确保一抗具有理想的滴度, 并对

		待检测的抗原具有特异性
		对于低丰度样本，增加一抗的用量和凝胶上样量
		延长抗体孵育时间，4℃孵育过夜
		使用抗体增强剂
	成像/曝光时间太短	延长曝光时间
	仪器设置不正确	确保选择了正确的激发和发射光范围
	去垢剂使用不当	减少或去除去垢剂
	封闭液可阻断抗原	一些封闭液会过度封闭印迹并影响抗原与抗体的结合，特别是当封闭时间超过 1 小时后
		用洗涤缓冲液稀释一抗
		尝试其他封闭液
	上样量不足	蛋白上样量过高可能会掩盖靶蛋白，降低抗体的识别能力
		蛋白上样量过低会导致抗原不足
		对裂解物进行梯度稀释，以确定最合适的蛋白上样量
	转印效果不佳或转印后蛋白质丢失	检查转印条件，确认蛋白质已转移
		检测新的靶蛋白时，可能需要重新优化转印条件
背景高、不均匀、有斑点	膜污染导致高背景	使用干净的镊子和孵育盒处理膜
		确定适合的封闭液，动物血清或脱脂牛奶这类封闭液可能导致交叉反应。
		在封闭步骤中限制去垢剂的使用

		用，常用去垢剂可自发荧光，通常会增加非特异性背景。封闭后，可以使用去垢剂。
	蛋白 marker 上样量过高，导致假信号	减少蛋白 marker 上样量
	漂洗或稀释溶液不合适	使用含有 0.1–0.2% Tween 20 去垢剂的漂洗缓冲液
		用 0.05% Tween 20 去垢剂制备二抗稀释液
		增加漂洗的次数或漂洗时间
	二抗浓度过高导致高背景	优化二抗稀释比
	膜干燥导致背景斑点或不均匀	在所有孵育步骤中，确保液体充分覆盖整个印迹膜，震荡孵育
	膜选择不当	选择低荧光 PVDF 膜和 NC 膜
	印迹膜上有灰尘或指印	使用干净的镊子进行处理，避免用手直接接触膜
		使用干净的孵育托盘或孵育盒-先用甲醇冲洗，再用水冲洗，有助于溶解并去除残留的染料
		如果使用湿转方法，需要清洁转印装置和沾满灰尘的耗材，避免产生斑点
		印迹成像前，用乙醇擦拭成像系统的托盘表面，去除灰尘、棉绒和残留物