



## Western Blotting 实验疑难解答指南

### 1. 高背景

原因	解决办法
抗体浓度太高	优化降低一抗和二抗的浓度
二抗聚集	0.2um 膜过滤或更换新二抗
抗体孵育温度过高	4°C孵育
二抗非特异性结合或与封闭剂交叉反应	设置二抗对照(不加一抗),降低二抗浓度
一抗或二抗与封闭剂有交叉反应	在孵育和洗涤液中加入 Tween-20 减少交叉反应.
封闭液不适合	比较尝试不同的封闭液
封闭不完全	<p>封闭液的选择与优化</p> <p>增加封闭液中蛋白质浓度</p> <p>优化封闭时间和温度 ( 常温2小时或4°C过夜 )</p> <p>封闭液中加入浓度0.05%Tween20</p> <p>抗体稀释液中加入浓度 0.05%Tween20</p>
封闭不充分	延长封闭时间, 更换合适的封闭剂 ( 脱脂奶粉, BSA, 血清等 )
抗体与其它蛋白质交叉反应	<p>更换不同的封闭液; 勿在含生物素体系中使用脱脂奶粉封闭</p> <p>降低二抗浓度</p> <p>检测二抗与膜的交叉反应性</p>
漂洗不完全	增加漂洗时间和缓冲液体积



	漂洗液中加入浓度 0.05% Tween20
曝光时间太长	缩短曝光时间
膜的问题	使用干净镊子；戴手套操作 换一张新膜 用足够的液体，膜始终保持湿润 孵育时使用脱色摇床 避免膜重叠，互相覆盖 小心操作，勿毁损膜
洗膜不充分	增加洗涤次数
膜不合适	NC 膜比 PVDF 膜背景低
膜干燥	保证充分的反应液，避免出现干膜现象
缓冲液污染	使用新缓冲液过滤缓冲液
仪器污染	保证所有仪器，用具干净确保膜上无残留胶



**2. 信号弱或者无信号**

原因	解决办法
转膜不完全	<p>转膜后，染胶以决定转膜效率</p> <p>使用丽春红染膜以决定转膜效率</p> <p>保证转膜时胶与膜充分结合</p> <p>滤纸 - 膜 - 胶，电极方向正确装配</p> <p>根据说明书，对膜进行处理如湿润</p> <p>电转时防止过热</p> <p>使用阳性对照或预染 Marker</p> <p>优化转移时间和电流</p> <p>使用博士德转膜缓冲液</p> <p>保证样品处理时，样品不被破坏（抗原决定簇）</p>
蛋白质与膜结合不充分	20% 甲醇于转膜缓冲液；
	低分子蛋白质透过膜；使用小孔径膜
抗体	增加抗体浓度；抗体与抗原结合差；抗体丧失活性
抗原不足	增加上样量
抗原被封闭液遮蔽	试用不同的封闭液
	优化封闭液中蛋白质浓度
	缩短封闭时间
缓冲液里有叠氮钠	去掉叠氮钠
曝光时间太短	延长曝光时间
底物孵育时间太短	5 分钟



膜上蛋白质被消化	封闭物质可能有蛋白质降解活性
蛋白质样品在储存过程中降解	重新制备样品
一抗、二抗等不匹配	订购试剂时认真选取一抗与组织种属，一抗与二抗或/和底物与酶系统之间相匹配的抗体及底物。可通过设置内参可以验证二级检测系统的有效性。
一抗或/和二抗浓度低	增加抗体浓度，延长孵育时间
封闭剂与一抗或二抗有交叉反应	封闭时使用温和的去污剂，如 Tween20，或更换封闭剂（常用的脱脂奶、BSA、血清或明胶等）。
一抗不识别目的物种的靶蛋白	检查说明书，设阳性对照
样本中无靶蛋白或靶蛋白含量过低（抗原无效）	设置阳性对照，如果阳性对照有结果，但标本没有则可能是标本中不含靶蛋白或靶蛋白含量太低。后者可增加标本上样量至少每孔 20-30ug 蛋白,样本制备时使用蛋白酶抑制剂,或分级提取目的蛋白。
转膜不充分,或洗膜过度	使用丽春红检测转膜效果,PVDF 膜需浸透,需正确的转膜操作,勿过度洗膜
过度封闭	使用含 0.5%脱脂奶或无脱脂奶的抗体稀释液,或更换封闭剂,减少封闭时间
一抗失效	使用有效期内抗体,分装保存,避免反复冻融取用,工作液现配现用



二抗受叠氮钠抑制	所用溶液和容器中避免含有叠氮钠(HRP 的抑制剂)
酶和底物失效	直接将酶和底物进行混合，如果不显色则说明酶失活了。 选择在有效期内、有活性的酶联物,使用新鲜的底物.
膜没有完全均匀湿透	PVDF 膜使用 100%甲醇浸透膜
靶蛋白分子量小于 10,000	选择小孔径的膜，缩短转移时间
靶蛋白等电点等于或接近 转移缓冲液 pH 值	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
甲醇浓度过高	过高甲醇浓度会导致蛋白质与 SDS 分离，从而沉淀在凝胶 中，同时会使凝胶收缩或变硬，从而抑制高分子量蛋白的 转移。降低甲醇浓度或者使用乙醇或异丙醇代替



### 3. 非特异性条带

原因	解决办法
SDS 非特异性结合到胶上的蛋白质	转膜后充分清洗不用 SDS
细胞传代次数过多，使其蛋白表达模式的分化	使用原始或传代少的细胞株，或平行实验
蛋白样本降解	使用新鲜制备的标本，并使用蛋白酶抑制剂
新蛋白或同族蛋白的分享同种表位的不同剪接方式	查其它文献报导，或 BLAST 搜寻，使用说明书报导的细胞株或组织
抗体未纯化	使用单克隆或亲和纯化的抗体，减少非特异条带
蛋白存在二聚体或多聚体	SDS-PAGE 电泳上样前，煮沸 10 min，以增强蛋白质解聚变性
许多蛋白质有多个亚型，分子量都不同	查阅文献或进行生物信息学分析，抗体针对几个亚型，就会有几个条带
蛋白本身有多个修饰位点	查阅文献或进行生物信息学分析，获得蛋白序列的修饰位点信息，确定分子量
一抗浓度过高	在满足一定的敏感性的情况下，降低一抗浓度
二抗引起的非特异条带	免疫球蛋白是一个超家族，而标本中含有大量的类似球蛋白的抗原，容易和二抗引起反应，尤其是在变性的情况下，在满足敏感性要求的前提下，荧光标记一抗，酶标兔抗荧光就可以解决这个问题



蛋白的降解	同前
上样量过高	适当减少上样量
洗涤不完全	可适当延长洗涤时间
封闭不好	延长封闭的时间；选择更加适合的封闭液

#### 4. 弥散型条带

原因	解决办法
抗体浓度太高	降低抗体浓度
蛋白质上样量太多	降低蛋白质上样量
迁移过快、电泳温度过高	降低电泳速度，低温电泳（冷室）