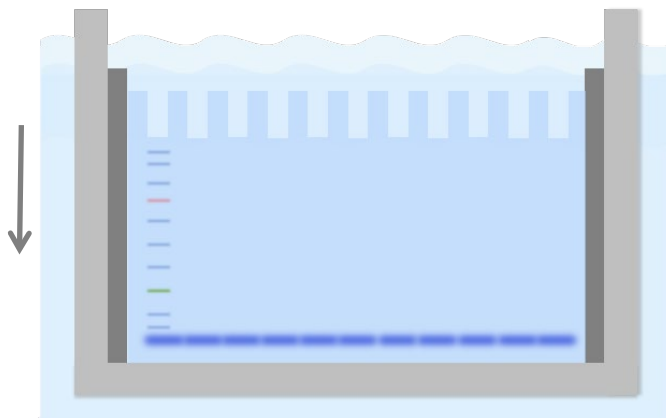


## WB 实验结果常见问题分析

小分子量蛋白跑的比较快  
根据蛋白分子量大小分开



### 1, 电泳完 marker 形状正常但转完膜 marker 出现涣散?

一般是因为胶跟膜贴合不够紧密。有些三明治夹时间久了会变形，一般是中部向外凸，导致夹的不够紧。如果三明治夹未发生明显变形，有可能是海绵用久了，可以加多点滤纸或者加多一层海绵。

### 2, 条带不整齐、畸形、拖尾?

- (1) 可能是由于胶凝固不均匀，建议待胶完全凝固后上样；
- (2) 可能是有气泡在胶的下边缘，建议电泳前，检查凝胶避开有气泡的位置上样；
- (3) 转膜过程中胶与膜中间有气泡，建议转膜时充分排除气泡，多检查几遍；
- (4) 条带拖尾，可能原因是蛋白杂质较多。

可能出现的条带	原因	怎么解决
微笑条带：整体出现“~”形状	一是电泳速度过快； 二是电泳温度过高，使得胶变形。	可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：成现“一”皱眉状	可能是由于装置不合适，特别是凝胶和玻璃挡板底部有气泡，或者两边聚合不完全。	可通过调整装置来避免该问题
其它条带均正常，个别条带出现变形：“一 一 ~ 一 一”	该现象可能的原因是 SDS-PAGE 胶中有气泡或者不溶性颗粒。	在配胶过程中药消息，避免使用有杂质的液体



哑铃状条带：“—”	一是由于配置胶有问题，胶凝固后不均一；二是样品可能含有过多杂质。	一可重新配胶，确保胶的质量；二样品使用前对其离心，以去除多余杂质。
条带粘连：不同孔目标条带连在一起，中间无间隔	可能是上样量太多，或者是制胶问题，分离胶和浓缩胶之间有间隙，样品窜孔。	可通过减少上样量和提高配胶质量来避免该问题。

### 3, 显影后条带“两端粗中间细”？

- (1) 转膜没做好散热，由于转膜槽中心部离外槽的冰块或者冰水混合物最远，故中心部散热最差，导致中心部蛋白转膜效率下降。
- (2) 孵抗体时，未充分覆盖膜，比如中间有气泡、膜不平整。
- (3) 活化前中间部膜被污染过，导致该部位的正电荷被中和了一部分。

### 4, 泳道背景高？

常见原因是一抗特异性不好；一抗二抗浓度过高；蛋白提取不纯；封闭不足；清洗不充分等。建议降低一抗浓度、孵育时间以及缩短二抗孵育时间；增加封闭液浓度和封闭时间；增加膜的洗涤次数、时间或严格程度。

### 5, 条带信号太低甚至无信号？

可能是上样量不足；样品的问题，蛋白提取不充分；也可能是抗体问题，过期或者稀释浓度太高；洗涤过程中蛋白被从膜上洗掉。

建议：利用丽春红对膜染色，若有条带在，则进一步排查抗体问题，若没有观察到条带，则是样品问题。

注：丽春红带负电荷，可以与带正电荷的氨基酸残基结合，同时丽春红也可以与蛋白的非极性区相结合，从而形成红色的条带，用来评估蛋白印迹的转印效率。在 0.1% NaOH 中短暂孵育即可脱色，染色剂不会改变膜结合蛋白，随后的 Western 印迹检测不受影响。

### 6, 孵完抗体的膜想要再次孵育新的抗体又不想再次转膜怎么办？

可以使用博鹭腾蛋白印迹膜再生液（WS001）进行洗脱，用于去除结合在蛋白印迹膜（PVDF 膜或 NC 膜）上的一抗和二抗的洗涤液。在不影响目的蛋白的情况下，可使同一



张蛋白印迹膜进行多次抗体检测。省去反复电泳和转膜等步骤，操作简单快速。

