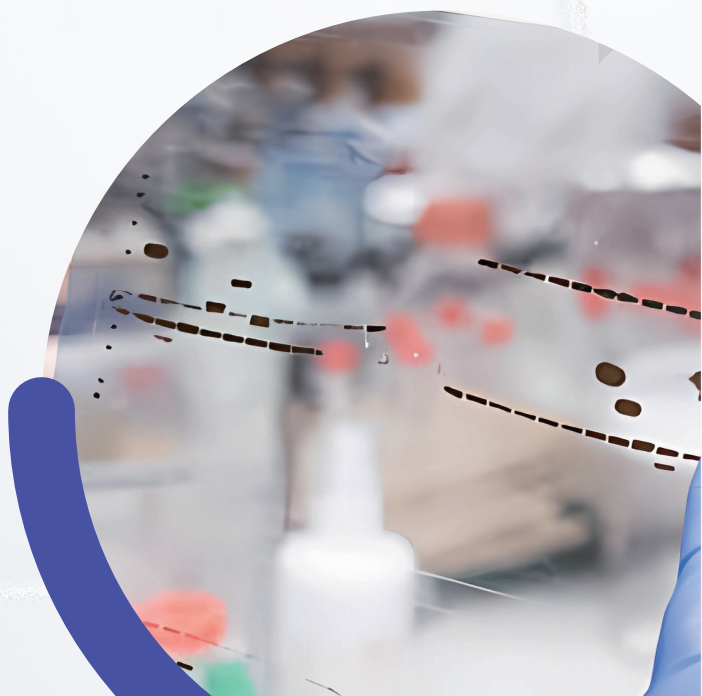


蛋白免疫印记 常见问题与解决方案

Western blot troubleshooting tips



正能生物

立足中国成都，服务全球用户

集抗体和蛋白研发、生产、销售于一体的生物高科技企业



☎ 4008 863 973 🌐 www.zen-bio.cn

成都正能生物 (zen-bioscience) 成立于 2007 年, 于 2013 年获得国家高新技术企业认证。拥有先进的蛋白研究方法, 建成了集工具类蛋白及抗体研发生产为一体的全流程平台。囊括多个领先的核心技术, 目前已获得 3 项国家发明专利, 5 项实用新型专利, 并有多项发明专利已进入实审。产品覆盖了现代生命科学研究的各大前沿领域, 包括癌症、免疫学、神经科学、心血管疾病、肿瘤干细胞、表观遗传学、内分泌和代谢等。

正能生物致力于为全球生命科学研究机构及生物技术企业研制高品质的蛋白及抗体产品, 从而促进生命科学和人类健康事业的发展!



PlatinumAb
精品抗体

经过多年不断筛选和沉淀, 品质可靠
更多样本、应用验证, 更多文献支持
更多的用户数据反馈



RecRabs®
重组兔单抗

性能卓越, 不仅具有较低的免疫原性
同时具备优越的稳定性和较长的半衰期
特异性更高, 亲和力更强, 靶标覆盖更广



Antibody Pair
ELISA 抗体对

经过严格的筛选配对和样本验证
高一致性、高灵敏度和高特异性



Hist-Plus®
病理级抗体

大量病理样本验证, 批间一致性高
实验结果稳定可重复



KO/KD
KO/KD 验证抗体

提高实验结果的可靠性
确保抗体的特异性

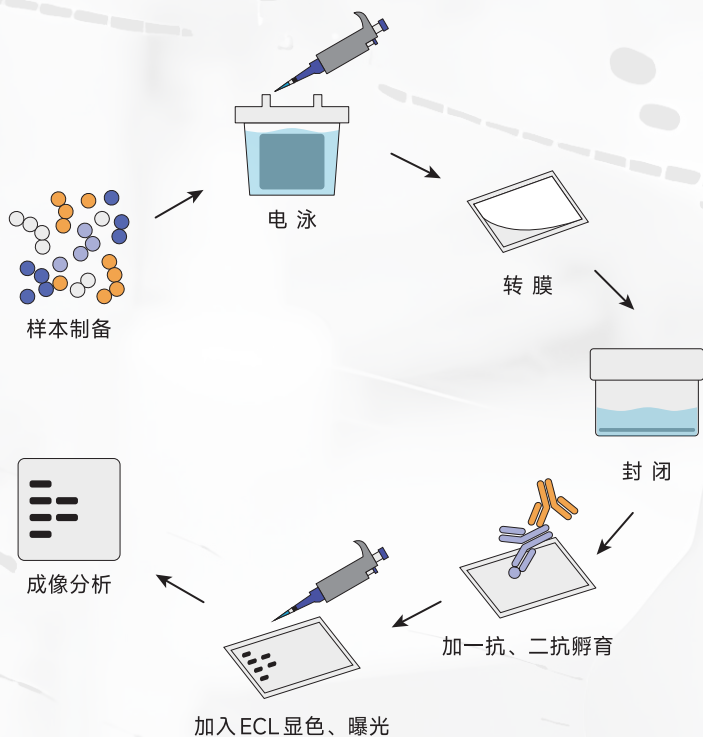


mIHC Kit
多重免疫荧光

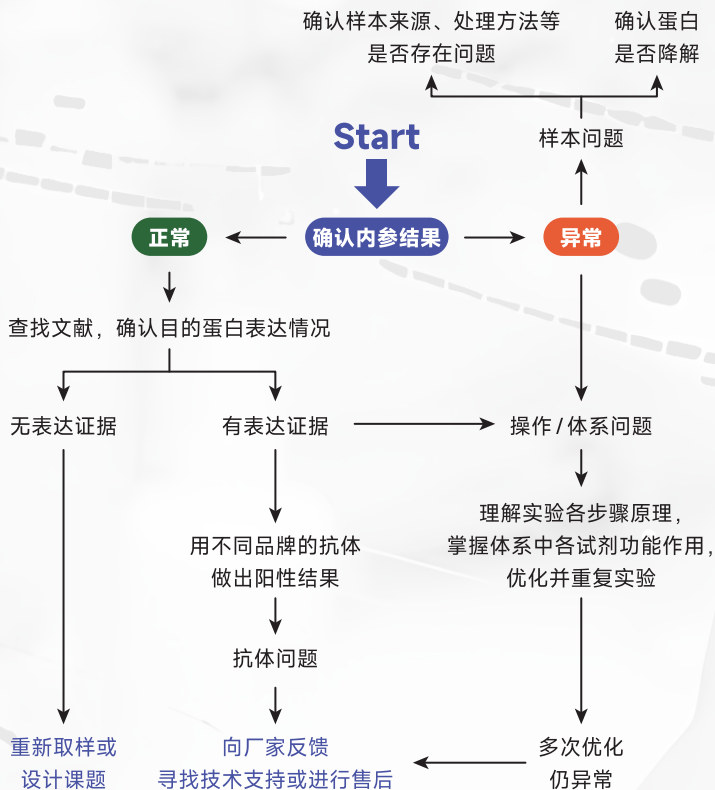
mIHC 用于荧光组化更有优势
适用于多种实验需求

WB 实验流程图

先通过电泳使不同蛋白按分子量大小在聚丙烯酰胺凝胶中进行分离，然后将凝胶中的蛋白质转移至转印膜上，随后用封闭剂覆盖转印膜上未吸附目标蛋白质的区域，最后通过“抗原 - 抗体”免疫反应来检测目标蛋白的表达水平。



WB 实验问题解决思路



Tel : 4008 863 973

转1: 产品咨询 ; 转2: 技术支持

周一至周五 : 09: 00 — 18: 00

Q&A 目录

案例 1：膜上一片空白	01
案例 2：膜曝光之后高背景	02
案例 3：不均匀 / 扭曲的条带	03
案例 4：条带反白	04
案例 5：非特异性条带	05
案例 6：膜上有黑色斑点	05
案例 7：条带周围出现多条杂带或大小与理论不符	06

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

不是很了解样本中蛋白的表达情况，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 / 一抗与二抗不匹配

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

重新选择匹配的一抗 / 二抗；买其他品牌的相同靶标抗体做对照试验；将该抗体和样本寄回厂家进行质检。

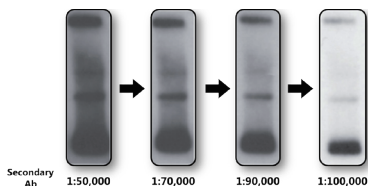
原因-4. 转膜效率低 / 失败

膜没有完全活化 / 靶蛋白分子量小于 10 kDa / 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。

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。

案例 3：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。

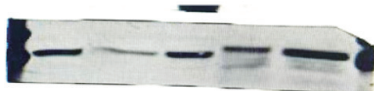


处理方法

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。

哑铃状条带

配制胶有问题，胶凝固后不均一，样品可能含有过多杂质。



处理方法

重新配制胶确保胶质量无问题，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。

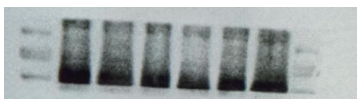


处理方法

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。

案例 4：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。

案例 5：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 6：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。

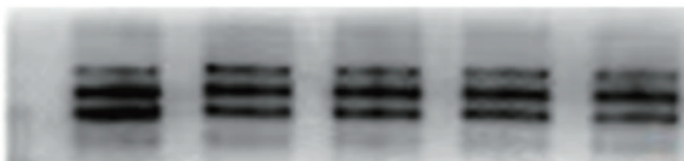
原因-2. 抗体凝胶非特异性结合

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。

案例 7：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

新检测出文献未报导蛋白 / 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

细胞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

确认目标蛋白是否具有不同的修饰作用 / 重新复苏细胞传代表达制样 / 选择单克隆抗体减少非特异性结合。

zenbio | 正能生物

Trusted Antibody Manufacturer Since 2007



PlatinumAb
精品抗体



RecRAbs®
重组免单抗



Hist®-Plus®
病理级抗体



Antibody Pair
ELISA抗体对



KO/KD
KO/KD验证抗体



mIHC Kit
多重免疫荧光

成都正能生物技术有限责任公司



扫码关注我们

☎ **4008 863973** 🌐 **www.zen-bio.cn**

地 址：四川省·成都市·高新区·天府生命科技园

邮 箱：support@zen-bioscience.com(技术支持)

sales@zen-bioscience.com(订购咨询)



正能各区域代理商联系方式



扫码查看代理商

- ①登录“正能官网”→ 顶部菜单栏【关于我们】→【联系我们】
- ②关注“正能生物”公众号 → 底部菜单栏【抗体订购】→【订购渠道】
- ③拨打“咨询热线”，转1