



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	封闭液的选择与优化 增加封闭液中蛋白质浓度 优化封闭时间和温度 (常温2小时或4°C过夜) 封闭液中加入浓度0.05%Tween20 抗体稀释液中加入浓度 0.05%Tween20
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	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 降低二抗浓度 检测二抗与膜的交叉反应性
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	转膜后，染胶以决定转膜效率 使用丽春红染膜以决定转膜效率 保证转膜时胶与膜充分结合 滤纸 - 膜 - 胶，电极方向正确装配 根据说明书，对膜进行处理如湿润 电转时防止过热 使用阳性对照或预染 Marker 优化转移时间和电流 使用博士德转膜缓冲液 保证样品处理时，样品不被破坏（抗原决定簇）
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）