

WB曝光后常见问题及解决方案



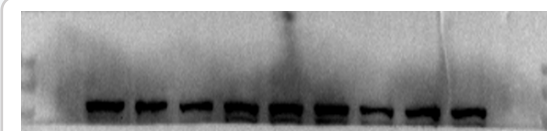
>> 无条带/目的信号极弱



- 可能原因：**
- 样本蛋白降解、上样量不足、抗体不匹配、转膜参数异常

- 解决方案：**
- 样本层面：全程冰上裂解，添加蛋白酶抑制剂，蛋白分装保存，避免反复冻融；适当提高低丰度蛋白上样量；
 - 抗体层面：核对一抗、二抗种属匹配性，合理调整抗体稀释比例与孵育时长；
 - 耗材选型：小分子蛋白优先使用0.22 μm膜；
 - 操作层面：核对转膜正负极，湿转采用冰水浴恒温转印，通过预染Marker验证转膜完整性。

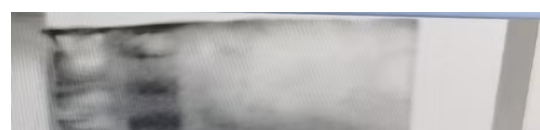
>> 膜整体背景偏高、底色发灰发黄



- 可能原因：**
- 封闭不充分、封闭液选型错误，抗体非特异性吸附；洗涤次数不足、残留游离抗体

- 解决方案：**
- 封闭优化：常规蛋白选用5%脱脂奶粉封闭1~2 h；磷酸化、修饰类蛋白禁用奶粉，更换5% BSA封闭；
 - 洗涤强化：每次孵育结束后TBST洗涤5次，每次5 min；
 - 抗体稀释：根据说明书梯度稀释抗体。

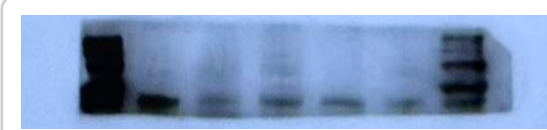
>> 条带过曝反白、中间空心



- 可能原因：**
- 蛋白上样量过大、抗体浓度过高；单次曝光时间过长，成像相机CCD信号饱和，底物快速淬灭

- 解决方案：**
- 梯度稀释蛋白样本与抗体，控制信号在线性检测区间；遵循短曝多次原则，分段调整曝光时间，避免单次长时间曝光。

>> 条带无法分离



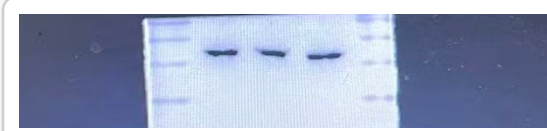
- 可能原因：**
- 蛋白上样量过载；目标蛋白存在亚型、磷酸化/泛素化修饰，分子量差值极小；选用凝胶浓度不匹配，分辨率不足

- 解决方案：**
- 梯度稀释蛋白降低上样量，缓解过载挤压；针对存在修饰、分子量差异小的蛋白，选用更高浓度分离胶，使用梯度胶、拉长电泳时长，依靠分子筛差异拉开修饰亚型

WB曝光后常见问题及解决方案



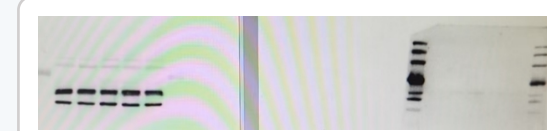
>> 哑铃状条带（两头宽、中间窄）



- 可能原因：**
- 灌胶时玻璃板底部残留气泡、杂质，导致局部电阻异常；凝胶聚合不均匀，分子筛孔径不一致

- 解决方案：**
- 灌胶前彻底清洗玻璃板，轻柔灌胶并敲击底板排气；凝胶静置充分凝固，避免外力干扰；上样前进行离心处理，去除蛋白中所含杂质。

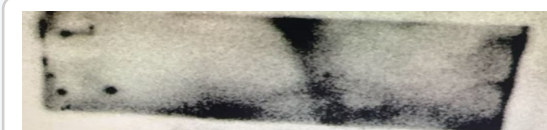
>> 蛋白marker被染色



- 可能原因：**
- 一抗与marker非特异性结合

- 解决方案：**
- 若条带清晰，建议更换marker；若条带不清晰，marker也被染色，建议更换一抗。

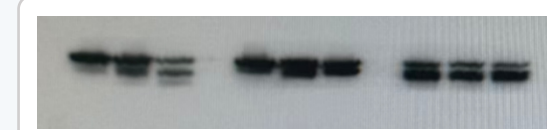
>> 膜上出现黑色污渍



- 可能原因：**
- 封闭液、抗体混入灰尘、脂肪颗粒或蛋白聚集体；滤纸碎屑、手套油脂污染膜面；孵育容器不洁

- 解决方案：**
- 封闭液、抗体使用前短暂离心或过滤处理，去除杂质沉淀；全程佩戴无粉手套，仅触碰膜边角，杜绝污染膜蛋白结合面；孵育盒、转膜夹、滤纸定期清洗更换，保证实验耗材洁净。

>> 条带弥散、边缘模糊发雾



- 可能原因：**
- 转膜三明治夹层存在气泡、滤纸褶皱破损；转膜温度过高，蛋白扩散漂移；小分子蛋白吸附不牢固，洗膜过程轻微脱落

- 解决方案：**
- 转膜组装时逐层排气，用玻璃棒轻柔滚动夹层，彻底消除气泡，保证胶、膜、滤纸紧密贴合；转膜液提前4℃预冷，全程冰水浴湿转；小分子蛋白优先使用0.22 μm膜。



WB曝光后常见问题及解决方案



>> 条带微笑弯曲



可能原因:

电泳高电压产热导致局部孔径受热变形；电泳缓冲液反复使用，离子强度失衡



解决方案:

- 电泳缓冲液现配现用，最多重复使用2次；优化电泳参数，降低电压慢速电泳，减少产热；电泳槽可外置冰水降温，平衡凝胶温度。

>> 膜上出现规则白色圆孔



可能原因:

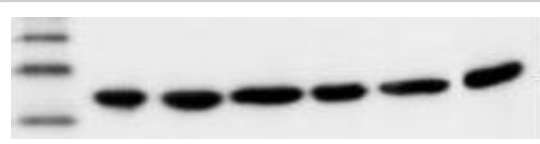
转膜时膜与胶之间存在微小气泡，阻碍电子传递；ECL显色时抗体浓度局部过高导致信号淬灭



解决方案:

- 所有实验步骤全程排气，保证膜、胶完全贴合液体，无气泡残留；显影时严格按说明书比例稀释发光液，保证发光液均匀覆盖整张膜。

>> 边缘泳道条带弯曲变形



可能原因:

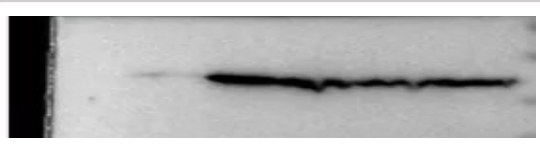
凝胶边缘电场分布不均、散热速度更快，产生边缘效应；电泳槽缓冲液液面不平，电流传导不均



解决方案:

- 实验时空置凝胶最左右两侧泳道；保证电泳槽内外液面平齐，弱化边缘电场干扰。

>> 相邻条带粘连融合



可能原因:

上样量过大导致相邻条带边界模糊；分离胶分辨率不足



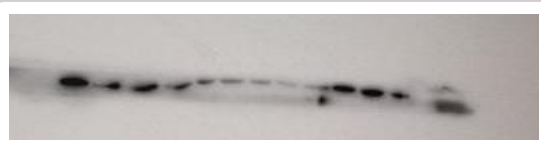
解决方案:

- 降低上样体积与蛋白总量，避免蛋白横向扩散溢出泳道；保证电泳缓冲液充足、电压稳定，根据分子量适配胶浓度，防止不同泳道蛋白横向交融边界模糊。

WB曝光后常见问题及解决方案



>> 条带形态扭曲、移位变形



可能原因:

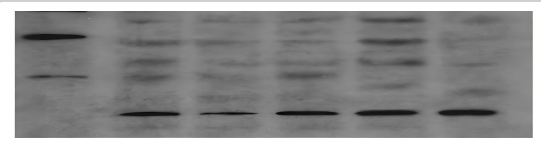
凝胶凝固过程受震动、风吹干扰，内部应力不均；灌胶残留微小气泡，改变蛋白电泳路径



解决方案:

- 凝胶全程水平静置凝固，规避震动、气流干扰；严格把控灌胶流程，彻底排出气泡，保证胶面平整。

>> 非特异性和弥散条带多



可能原因:

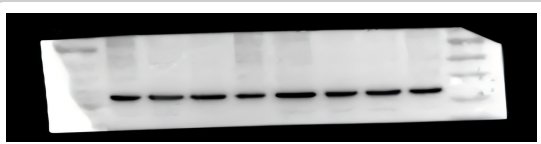
蛋白降解，上样量过大；抗体浓度过高



解决方案:

- 做好蛋白低温防护，减少上样量；区分蛋白天然修饰与杂带，样本离心去除聚团；优化封闭方案，稀释抗体，增加洗涤次数。

>> 条带形状不一



可能原因:

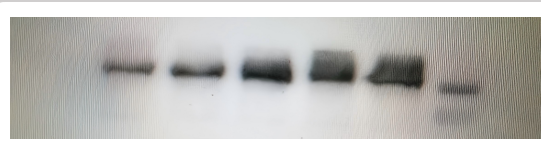
各泳道上样量体积相差过大；各样品Loading Buffer浓度不一样



解决方案:

- 统一总上样体积，用PBS/裂解液补齐；向所有样本加入等量同浓度Loading Buffer，保证稀释比例完全相同。

>> 条带拖尾



可能原因:

蛋白降解或者聚集；电泳缓冲液反复使用，离子强度失衡；电泳电压过高



解决方案:

- 全程低温加蛋白酶抑制剂，样品离心取上清；降低上样量；凝胶现配，电泳缓冲液现配现用，最多重复使用2次；降低电泳电压。

