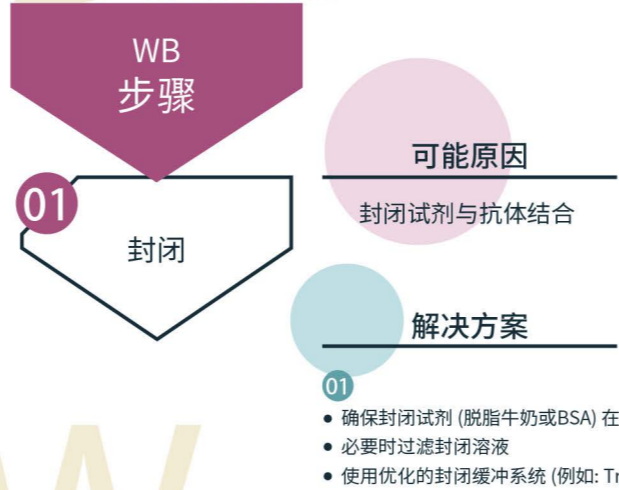


- 解决方案**
- 01 a 确保用于凝胶聚合的APS与TEMED有被适当添加与混合 (并且没有过期)
  - 01 b 电泳过程中降低电压
  - 01 c 电泳过程中降低电压
  - 01 d 根据目标蛋白的MW优化凝胶的百分比 (大蛋白→低凝胶百分比, 反之亦然)



- 可能原因**
- 01 a 样品中有杂质
  - 01 b 用优化过的提取试剂盒快速地进行全蛋白或亚细胞部分蛋白质制备
- 解决方案**
- 01 a 上样前, 样品混合均匀, 避免将沉淀物上样至孔中
  - 01 b 用优化过的提取试剂盒快速地进行全蛋白或亚细胞部分蛋白质制备



- 可能原因**
- 01 蛋白质过度上样
  - 02 抗体过量
  - 03 过度曝光
- 解决方案**
- 01 正确测量蛋白质浓度
  - 02 减少抗体量(增加稀释倍数)
  - 03 缩短曝光时间

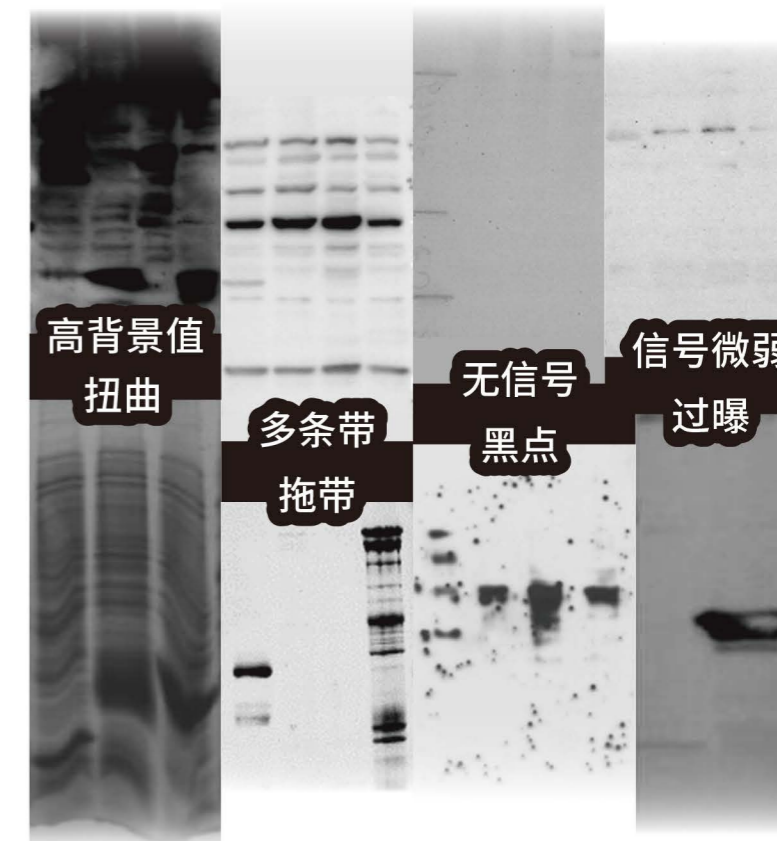
使用Trident femto Western HRP Substrate (GTX14698)与Trident pico Western HRP Substrate (GTX17435)做WB检测, 各种样品量与曝光时间如图所示:

	100 p9	20 p9	4 p9	0.8 p9	100 p9	20 p9	4 p9	0.8 p9
Trident femto Western HRP Substrate	[Western Blot Image]							
SuperSignal™ West Femto	[Western Blot Image]							
Trident pico Western HRP Substrate	[Western Blot Image]							
Clarity™	[Western Blot Image]							
Luminata™ Forte	[Western Blot Image]							

\* SuperSignal™ West Femto, Clarity™与Luminata™ Forte分别是Thermo Fisher Scientific, Bio-Rad与EMD Millipore的注册商标, 商标持有人与GeneTex无关, 亦无同意此次实验结果。

# Western Blot 问题排除

www.genetex.com



免疫印迹, 通常也被称为western blotting, 是一种蛋白研究的基本技术, 虽然每个实验室都有自己的方法, 但基本的步骤大致相同, 然而, 对一种应用的熟悉, 并不保证会得到干净又可发表于文献的结果, 获得无背景值的漂亮信号常常需要系统性的问题排除, 才能够快速且正确的改善糟糕结果, 因此, 我们将免疫印迹整个过程中可能常出现的问题列出来, 并针对这些问题提供解决方案。



# 高背景值或多条带

## 解决方案

- 01 a**
- 适当的煮沸样品，以确保适当的蛋白质变性
  - 将DTT (dithiothreitol) 或 2-ME (2-mercaptoethanol) 新鲜添加到样品缓冲液中，以还原双硫键
  - 检查目标蛋白的同种型和/或可变剪接信息
- 01 b**
- 检查转译后修饰
- 02**
- 使用含有蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液
  - 在冰上进行蛋白质提取
  - 分装样品，并避免重复冻融
  - 用优化过的提取试剂盒快速地进行蛋白质提取 (例如: Trident Total Protein Extraction Kit (GTX16372))
- 03**
- 正确测量蛋白质浓度
  - 优化上样量以观察特定信号
- 04**
- 改成硝化纤维素膜 (PVDF膜的整体信号发展比硝化纤维素膜更敏感)
- 05**
- 增加封闭时间
  - 确定合适的封闭缓冲液 (3-5%脱脂牛奶或BSA) 或使用优化过的封闭缓冲系统 (例如: Trident Universal Protein Blocking Reagent (animal serum free) (GTX30963))
- 06**
- 检查抗体数据表上建议的稀释倍数
  - 将抗体在含有封闭试剂或优化过的封闭缓冲系统的TBST缓冲液中孵育过夜
  - 选择抗原亲和和纯化抗体 (例如: GeneTex抗体)
- 07**
- 增加洗脱步骤的次数或时间
  - 增加洗脱液中洗涤剂剂的浓度
  - 用含有0.1% Tween 20的缓冲液洗脱 (例如: Trident 10X TBST (GTX30976))
- 08**
- 降低二抗浓度
  - 仅与二抗一起孵育 (无一抗) 作为对照
- 09**
- 缩短曝光时间
  - 使用化学冷光成像系统评估信号强度随时间的变化

分子量	胞浆/全细胞	细胞核	细胞骨架	粒线体	血清
> 120 kDa		Nuclear Matrix protein p84 (GTX70220)	Vinculin (GTX113294)		
70-80 kDa				SDHA (GTX101689)	Transferrin (GTX112729)
60-70 kDa		Lamin B1 (GTX103292)			Albumin (GTX102419)
50-70 kDa			alpha Tubulin (GTX112141)	HSP60 (GTX110089)	
40-50 kDa			beta Tubulin (GTX101279)		
	beta Actin (GTX109639)		beta Actin (GTX629630)		
30-40 kDa	GAPDH (GTX100118)	TBP/TFIID (GTX634166)			
20-30 kDa		PCNA (GTX100539)	Cofilin (GTX102156)	COX4 (GTX114330)	
< 20 kDa	Cyclophilin A (GTX104698)	Histone H3 (GTX122148)		Cytochrome C (GTX108585)	

货号	产品	包装
GTX400005	Trident RIPA Lysis Buffer	100 ml
GTX16372	Trident Total Protein Extraction Kit	5/20 Tests
GTX30963	Trident Universal Protein Blocking Reagent (animal serum free)	100 ml
GTX48887	Trident PBS (tablets)	100 tablets

## 解决方案

### 可能原因

- a 蛋白质结构 (多聚体或亚型)
- b 蛋白质转译后修饰

蛋白质降解

蛋白质上样过量

使用不适合的膜

封闭不足

一抗非特异性结合

洗膜不足

二抗非特异性结合

过度曝光

## WB 步骤



## 解决方案

### 可能原因

感兴趣的蛋白质表达量低

蛋白质降解

蛋白质上样不足

转印不完全或过度转印

- \* 用丽春红、酰胺黑或印度墨染膜确认转印效果
- \* 用预染色蛋白质标记(见GTX50875与GTX16376)评估蛋白质是否转印成功

过度封闭

一抗用量不足

过度洗脱

a 使用不正确的二抗

b 二抗用量不足

信号曝光不足

# 信号微弱或无信号

## 解决方案

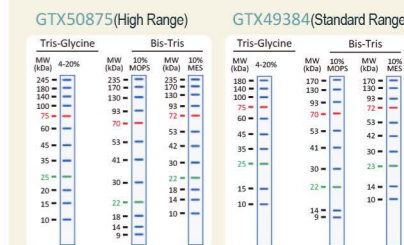
- 01**
- 增加蛋白质样品的上样量
  - 通过刺激诱导目标蛋白表达
  - 使用特定的亚细胞分类或膜分离，以增加目标蛋白丰度
  - 使用免疫沉淀，以增加目标蛋白丰度
  - 查看抗体说明书，并设置一个推荐的阳性对照样本
- 02**
- 使用含有蛋白酶抑制剂或磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液
  - 在冰上进行蛋白质提取
  - 分装样品，并避免重复冻融
  - 用优化过的提取试剂盒快速地进行蛋白质提取 (例如: Trident Total Protein Extraction Kit (GTX16372))
- 03**
- 正确测量蛋白质浓度
  - 每孔至少上样20-30 µg蛋白质
  - 确保使用适当的样品缓冲液与跑胶缓冲液
- 04**
- PVDF膜: 转印前，用甲醇活化膜
  - 硝化纤维素膜: 转印前，用转印缓冲液预浸膜
  - 根据目标蛋白大小调整转印时间 (蛋白质越大，需要的转印时间越长)
  - 通过降低转印电压或时间，避免过度转印小蛋白质
- 05**
- 调整封闭时间 (室温1-3小时)
  - 降低封闭试剂浓度
  - 使用优化过的封闭缓冲系统 (例如: Trident Universal Protein Blocking Reagent (animal serum free) (GTX30963))
- 06**
- 如果目标蛋白质太少，则增加抗体浓度
  - 将孵育时间延长至4°C过夜
  - 检查抗体效期
  - 避免重复使用一抗
  - 使用信号增强试剂盒 (例如: SignalPlus Antibody Enhancer- for Western Blot (GTX49999))
- 07**
- 减少洗膜步骤的次数或时间
- 08 a**
- 使用针对一抗的特定宿主物种与免疫球蛋白类型的二抗
- 08 b**
- 参见一抗的建议解决方案 (如上)

货号	产品	包装
GTX50875	Trident Prestained Protein Ladder (High Range)	500 µl
GTX49384	Trident Prestained Protein Ladder (Standard Range)	500 µl
GTX16376	Trident Blue Prestained Protein Ladder	500 µl
GTX400006	Trident plus Western HRP Substrate	500 ml
GTX17435	Trident pico Western HRP Substrate	100ml/500ml
GTX14698	Trident femto Western HRP Substrate	100/200 ml
GTX49999	SignalPlus Antibody Enhancer (for Western Blot)	50 ml



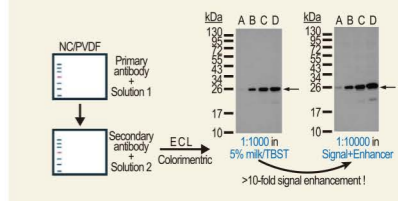
Trident Prestained Protein Ladder (Standard Range: GTX49384) (High Range: GTX50875)

- ✓ 立即可用
- ✓ 一般WB, 每孔2-5 µl
- ✓ 包含10 (GTX49384)或12 (GTX50875)种预染色蛋白质的三色蛋白质标准液
- ✓ 包含1条绿色(25 kDa)与一条红色(75 kDa)条带, 及不同分子量的蓝色条带
- ✓ 覆盖范围广泛, 分子量从10 kDa到245 kDa
- ✓ 与多种缓冲液系统兼容: Tris, MOPS, MES
- ✓ 与PVDF, 尼龙和硝化纤维素膜相容



用SignalPlus Antibody Enhancer (for Western Blot) (GTX49999)而不是用传统稀释溶液 (如TBST) 稀释您的抗体, 可以看到检测目标蛋白质跟消除不良背景的能力显著增加。

- ✓ 立即可用
- ✓ >10倍信号增强
- ✓ 改善您的抗体特异性
- ✓ 与硝化纤维素膜和PVDF相容
- ✓ 与化学发光和比色两种呈色系统兼容



**09**

- 确认HRP底物试剂未过期
- 通过斑点印迹确认底物活性
- 确认抗体稀释缓冲液中不含 sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 因为它会干扰HRP的活性
- 延长信号曝光时间
- 使用高敏感度的HRP底物试剂 (例如: Trident pico Western HRP substrate (GTX17435)或 Trident femto Western HRP substrate (GTX14698))