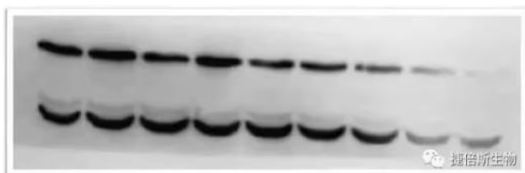


一、条带呈“微笑”或“倒微笑”状



No	原因分析	解决方法
1	条带呈“微笑U”状，凝胶冷却不均一，电泳槽老化	更换电泳槽
2	条带呈“倒U微笑”状，凝胶左右两头没有凝固好	重新制胶

二、目标条带没有信号



No	原因分析	解决方法
1	样品中可能含有蛋白酶，使蛋白样品分解成小分子。	添加蛋白酶抑制剂
2	目标蛋白浓度过低(低于检测下限)	加大上样量或提高目标蛋白浓度
3	转膜时间太短导致目标蛋白没有充分转移到膜上或者转膜时间过长导致样品穿膜	控制转膜时间并选择合适的转印膜
4	一抗的特异性不佳，导致一抗无法识别目标蛋白	选用高品质抗体
5	抗反复使用后导致效价降低，尽管还能与目标蛋白连接，但连接蛋白的数量太少	抗不宜反复使用
6	洗膜过度导致与一抗相结合的目标蛋白被洗掉	洗膜时间的频率和次数应有效控制，一般建议3次10分钟

三、图片背景过高，难以分辨条带



No	原因分析	解决方法
1	一抗浓度太高，导致抗体非特异性结合。	降低一抗浓度。
2	洗膜的时间和次数不够，导致其他蛋白没有清洗干净	提高洗膜时间和频率。
3	封闭物用量不足	提高封闭液浓度，孵育时保证封闭液完全浸没转印膜
4	封闭物使用不当	检测生物素标记的蛋白时不可用脱脂奶粉封闭。
5	封闭时间不够	室温37度封闭1小时以上，4度封闭过夜。
6	抗稀释度不适宜	对抗体进行滴度测试，选择最适宜的抗体稀释度
7	一抗孵育的温度偏高	建议4℃结合过夜

四、膜上出现黑点和黑斑



No	原因分析	解决方法
1	膜上其他部位与一抗或二抗非特异性结合，配置的封闭液可能没有完全溶解，使封闭牛奶一定要纯，封闭结束之前要清洗三遍之后再加一抗	配置封闭液后最好静止一下，封闭牛奶一定要纯，封闭结束之前要清洗三遍之后再加一抗
2	抗体与封闭试剂反应	使用前过滤封闭试剂
3	HRP 偶联二抗中有聚集物	过滤二抗试剂，去除聚集物

五、出现非特异性条带



No	原因分析	解决方法
1	一抗非特异性与蛋白结合，此种情况大多数情况是因为一抗特异性不好	更换一抗
2	目的蛋白有多个修饰位点，有些一抗还能结合其他蛋白的结合位点	更换一抗品种
3	蛋白样品降解，蛋白酶将目标蛋白分解成若干蛋白而这些蛋白同样可以被一抗识别	添加蛋白酶抑制剂

六、条带中出现整条白色空斑



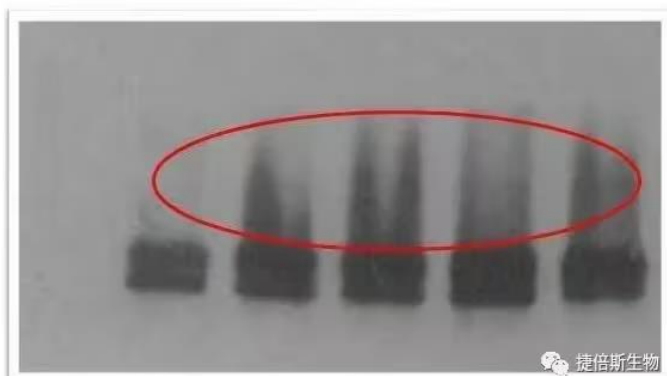
No	原因分析	解决方法
1	过高的蛋白上样量或一抗和二抗浓度过高都会促使底物过快的消耗，导致我们在做化学发光检测时，发光底物已经消耗殆尽而形成空斑	减少蛋白上样量稀释一抗和二抗的浓度

七、条带中出现白圈



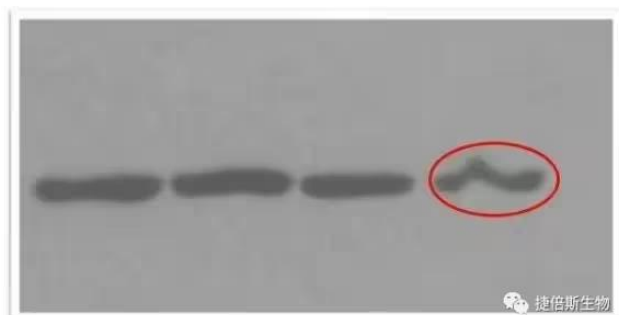
No	原因分析	解决方法
1	转膜时候，膜与胶之间有气泡	制作“三明治”时，注意赶走气泡。通常将电转液倒入一个盘子里，液体高度与第一层滤纸齐平，然后往滤纸上浇一些转膜液，把电泳胶用清水清洗后平铺在滤纸上，随后在确认滤纸与胶之间无气泡后，再往胶上浇一些电转液，之后用双手的拇指和食指轻轻夹住PVDF膜两侧中间，使膜成U型，再将U型底部接触到胶的中间，慢慢往两边放下膜，这样可以减少气泡。上层滤纸同样用U型的放置方法，可以用玻璃棒贴实一下，然后盖上海绵垫

八、条带拖尾



No	原因分析	解决方法
1	这种情况很容易出现，因为导致条带拖尾的原因很多，可能性较大的是一抗浓度太高，作用时间太长或蛋白量过大	根据情况调整蛋白量，同时降低一抗的浓度，缩短一抗的时间

九、条带变形



No	原因分析	解决方法
1	胶体中存在气泡，或不溶性杂质，胶不均不平整	配胶时用的烧杯，水，SDS，tris等干净无杂质。贴边角加入液体，凝固时避免大幅度动作触碰

十、条带呈哑铃状



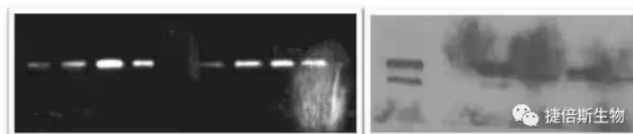
No	原因分析	解决方法
1	出现哑铃状条带的问题，最大的可能性就是胶没有配置好，胶凝固后不均一。另外还有一种可能就是样品中含有太多杂质，没有离心下来，然后杂质沉淀在孔的中间，蛋白被挤到两边的中间，蛋白被挤到两边	把胶配好，不合格的胶坚决不能用

十一、最边缘条带弯曲



No	原因分析	解决方法
1	电泳电流不均一	换电泳槽，或者不使用两边的孔

十二、背景非均一性



No	原因分析	解决方法
1	膜可能干过	在每一步的操作过程中，都需要注意不要让膜干掉，确保蛋白面不要被风干很长时间，一定要用不漏水的封闭盒并盖上盖子，防止过夜16个小时液体流失

十三、其他问题

No	原因分析	解决方法
1	蛋白分子量偏高或者偏低。	可能是胶的浓度与目的蛋白的浓度不对应，比如说100KD的蛋白你用12%的胶跑，或者说20KD的蛋白你用6%的胶跑
2	蛋白质降解	蛋白质降解后很可能在比原来位置低的地方出现主带，然后会出现一些其他
3	所有条带连成一片没有间隔	原因最可能是上样量过多，其次是样品弥散(比如电泳长时间停止样品弥散)