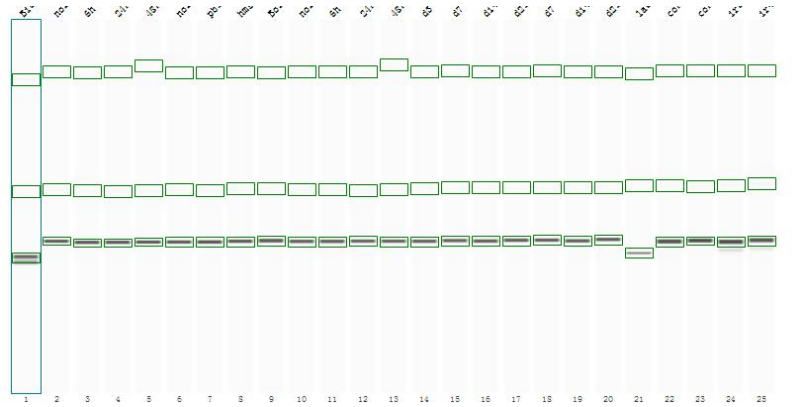
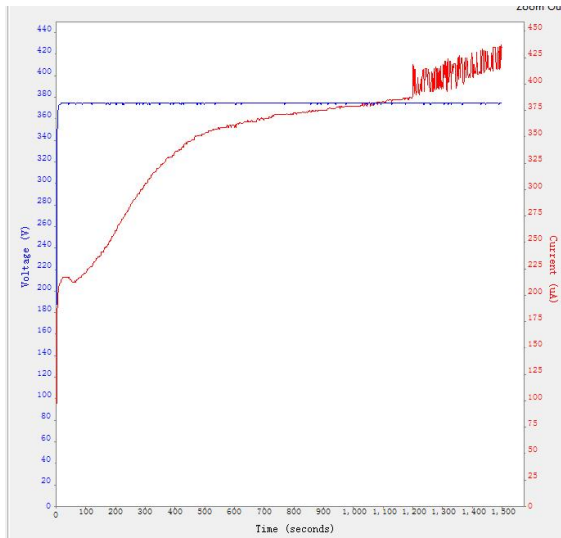
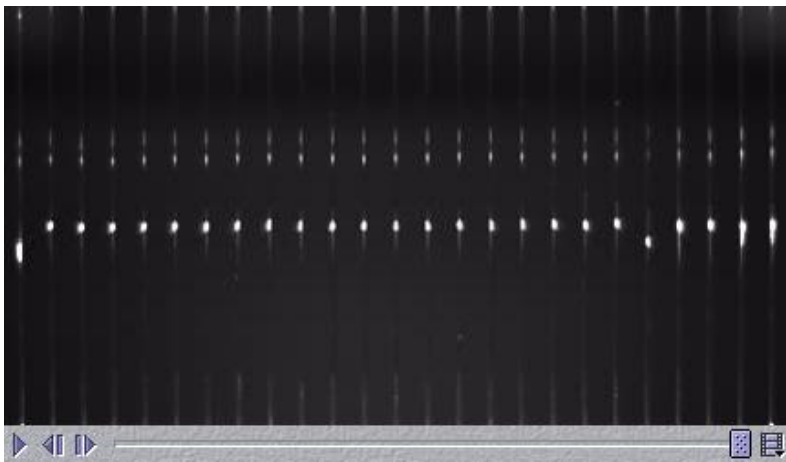
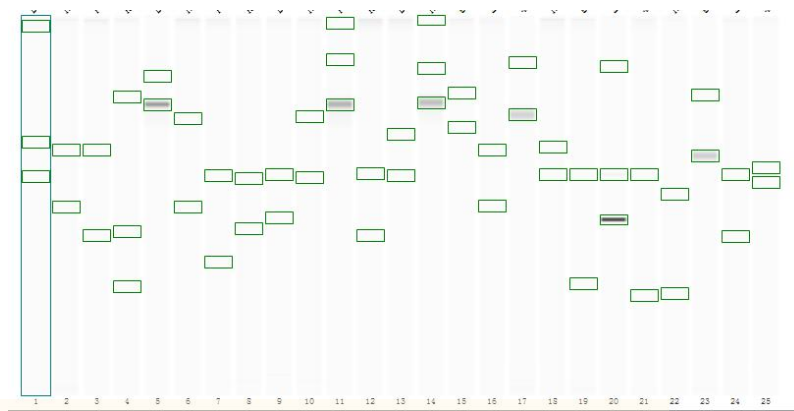
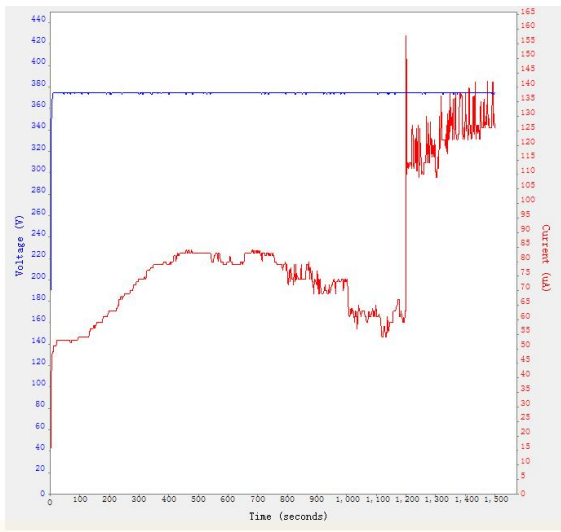


故障一：使用过期的分离试剂盒，毛细管内涂层可能失效，无法正常分离和捕获蛋白。

保质期内
正常呈现：



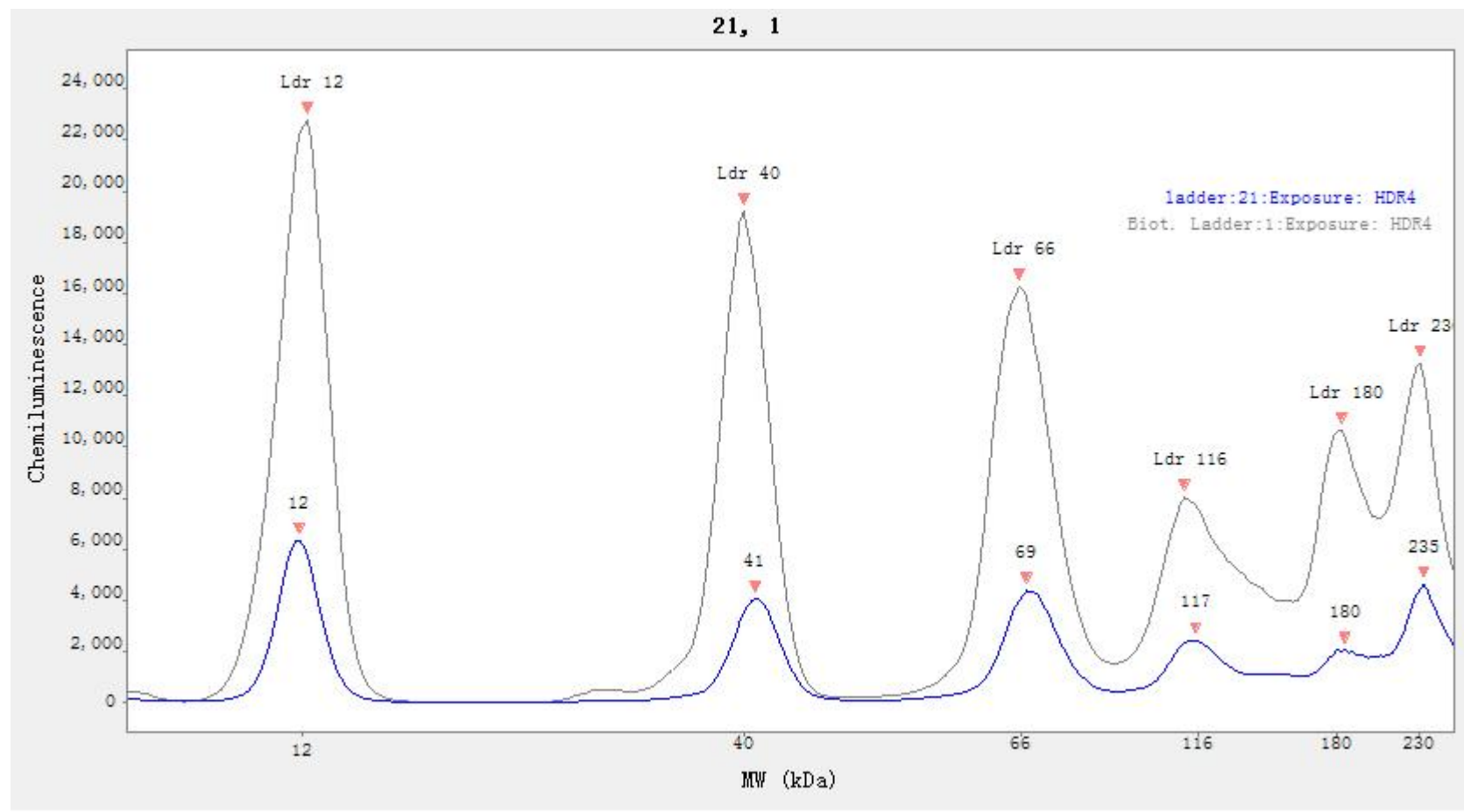
过期后
异常图像：



异常结果表现为：

1. 仅个别样本能分离，但迁移不畅，电泳过程受限；
2. 电流初始无法达到200微安，后续电流均不稳定，说明吸液受限；
3. 荧光内参分布错乱，连第一孔Ladder也无条带显影，排除溶液问题。

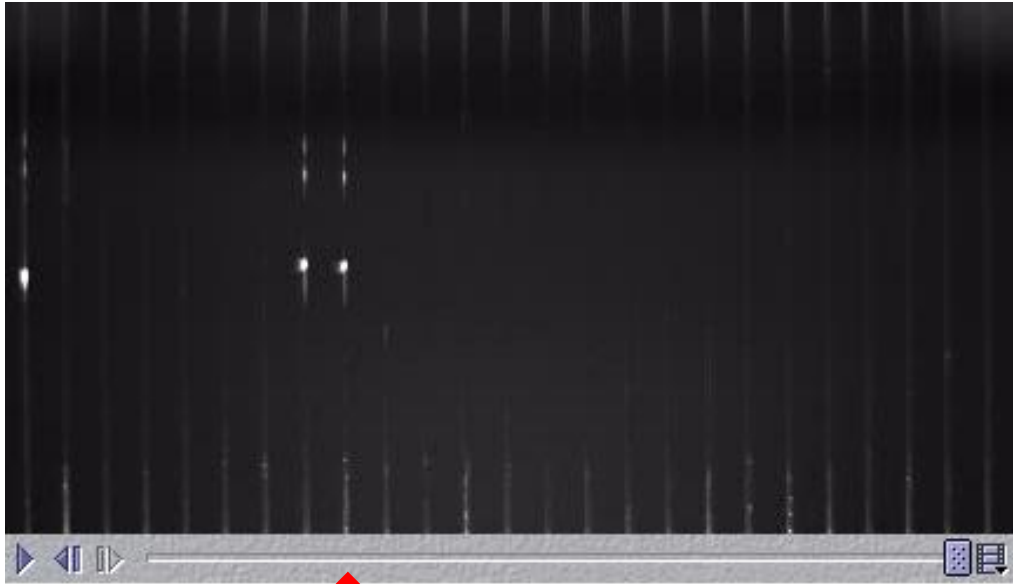
故障二：使用超过30天的Ladder，显影效果骤降。



现配Ladder

前一月配制的
Ladder

故障三：95度煮蛋白时受热不均匀，荧光内参错乱。

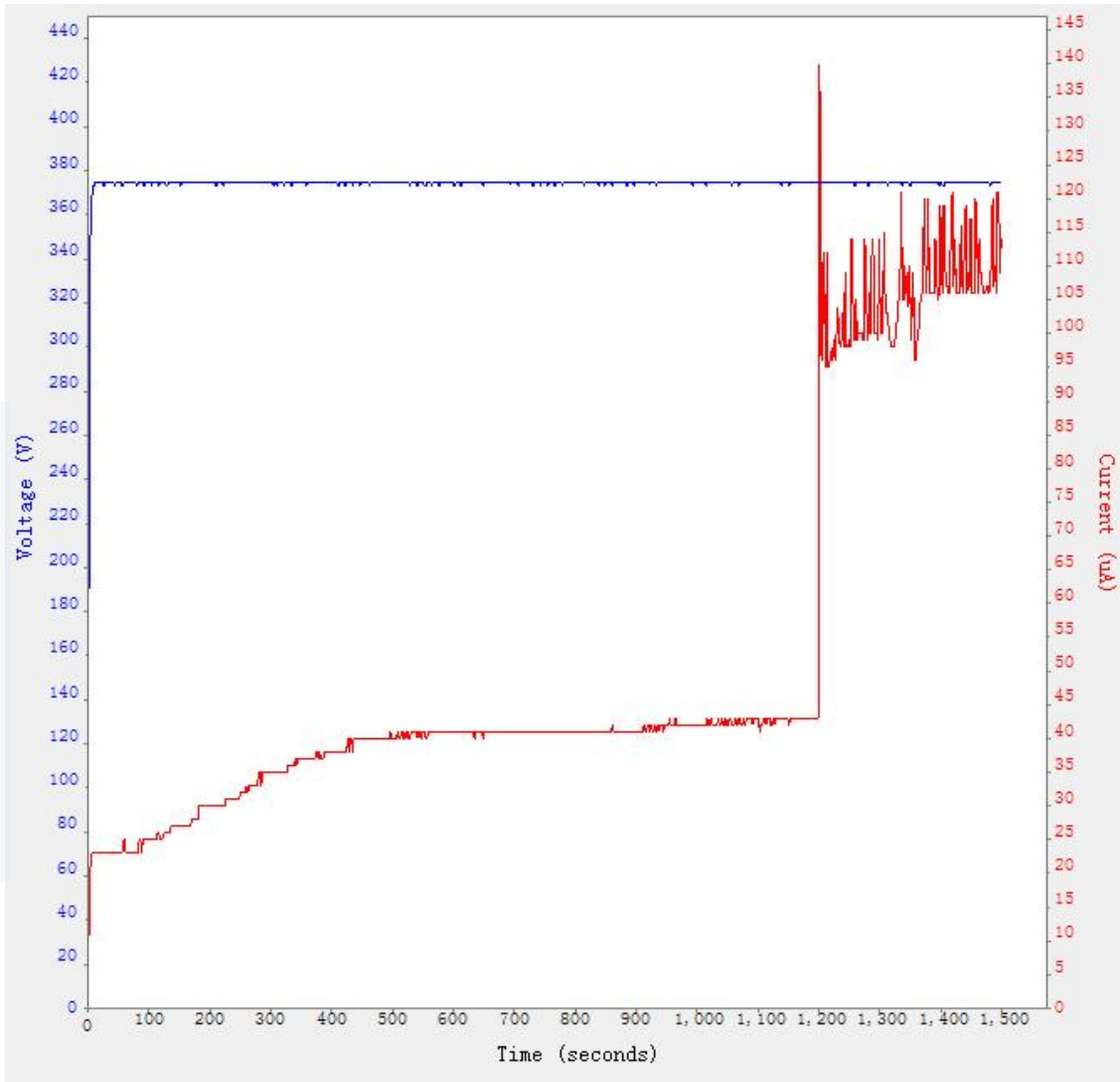


Ladder和两样品分离正常，其他分布不均。

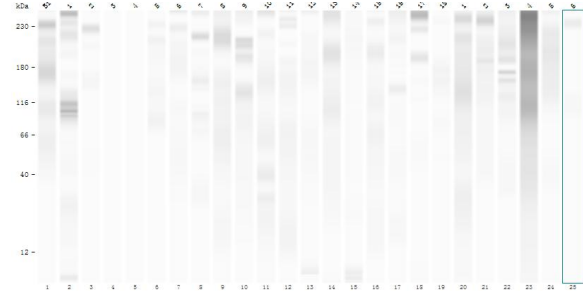
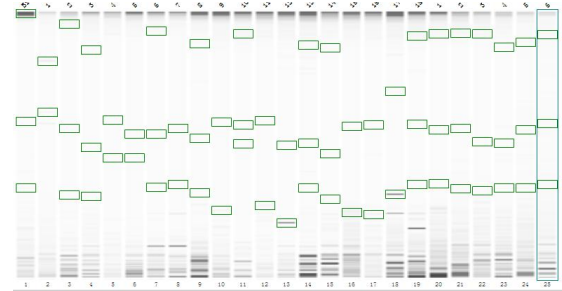
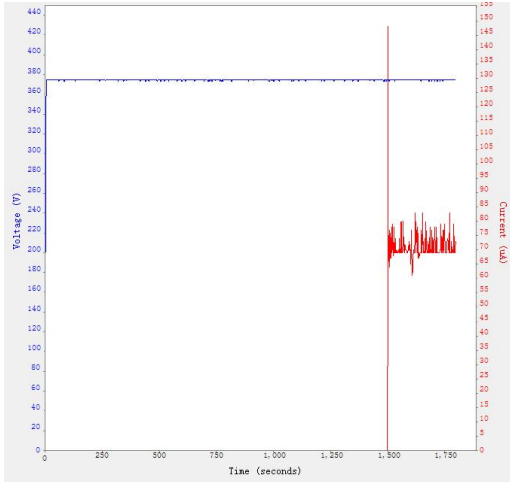
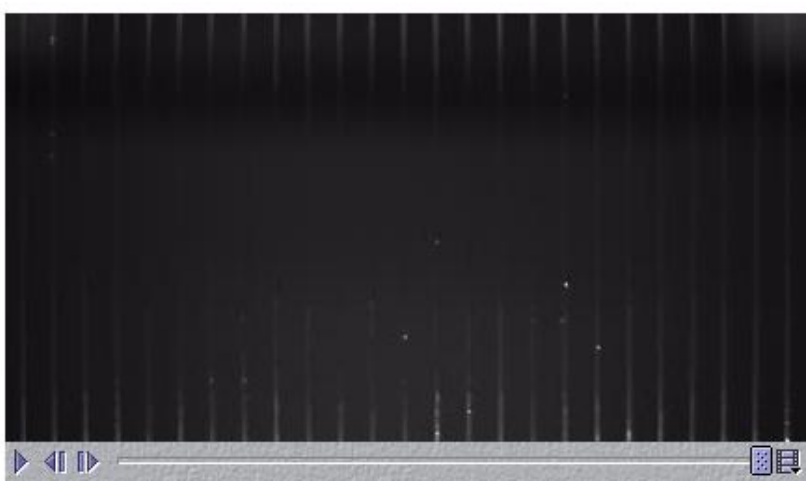
追溯原由在于：
煮蛋白时，用1.5ml离心管配制样本(过大)，应为PCR小管；

于恒温金属浴（温控不佳）中进行加热，最好是用PCR仪。

电流异常



故障四：电极垫片弹出异常

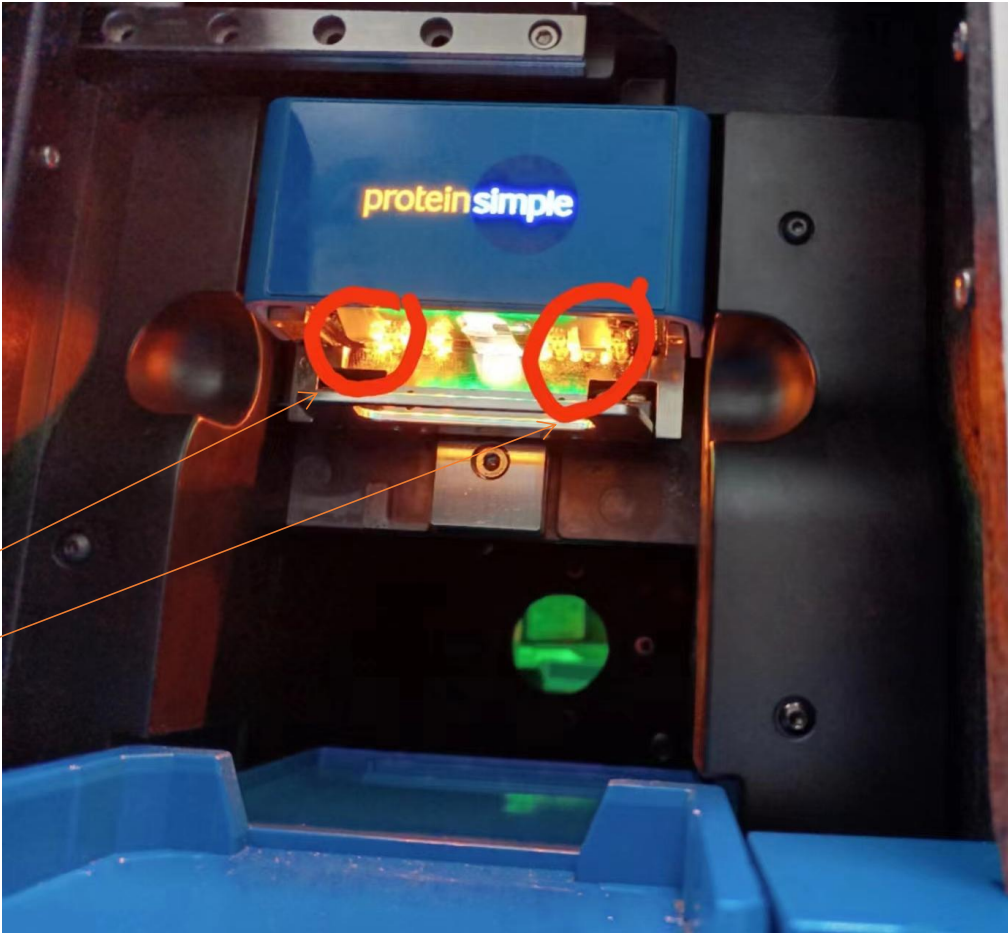


无显影、无电流、无具体图像。

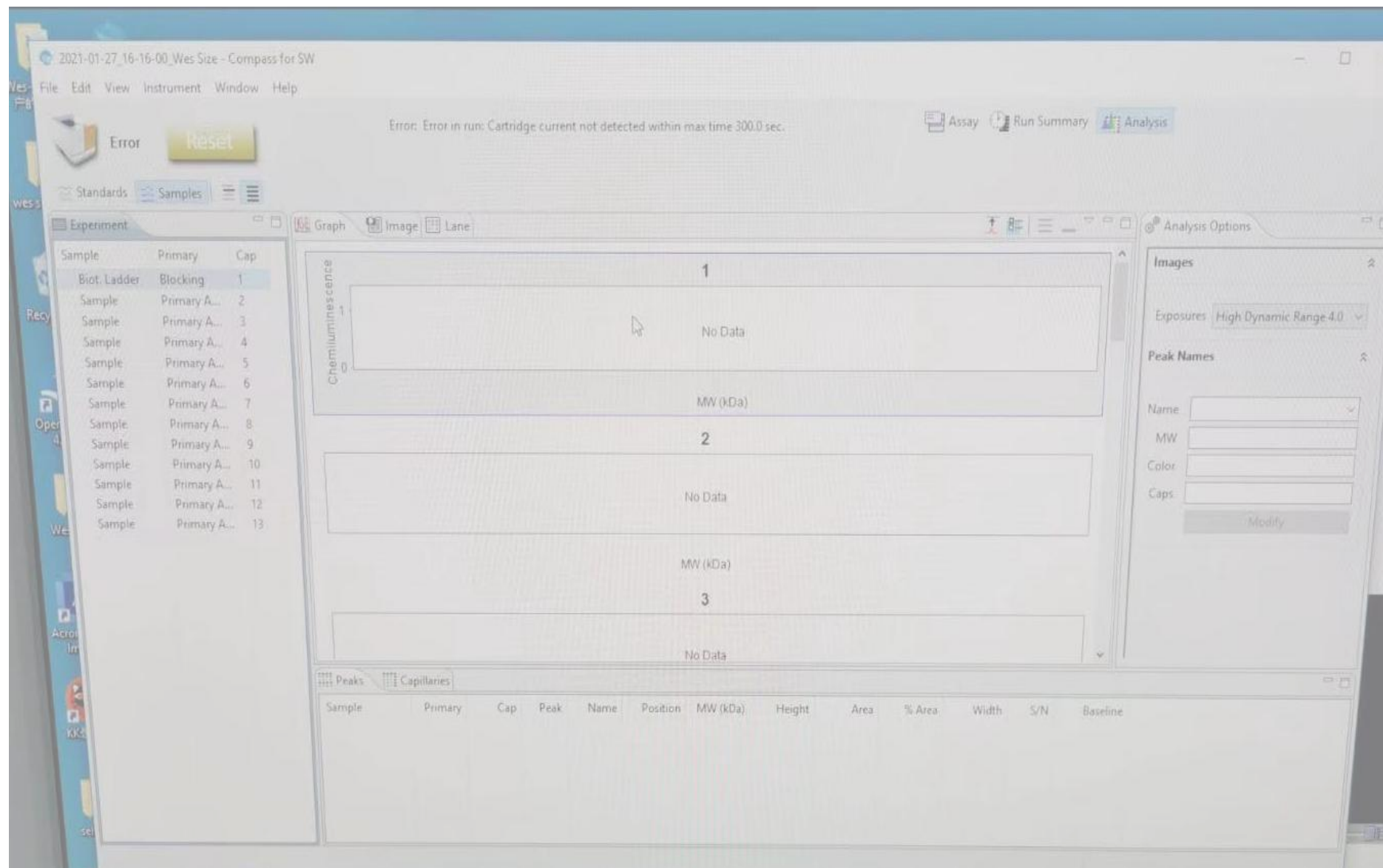
可能的原因为装载异常：

毛细管卡夹与运行模块上的垫片接触不良

自检后，两电极
垫片仍未归位。



故障五：分装板锡箔纸未撕开，无法进样。

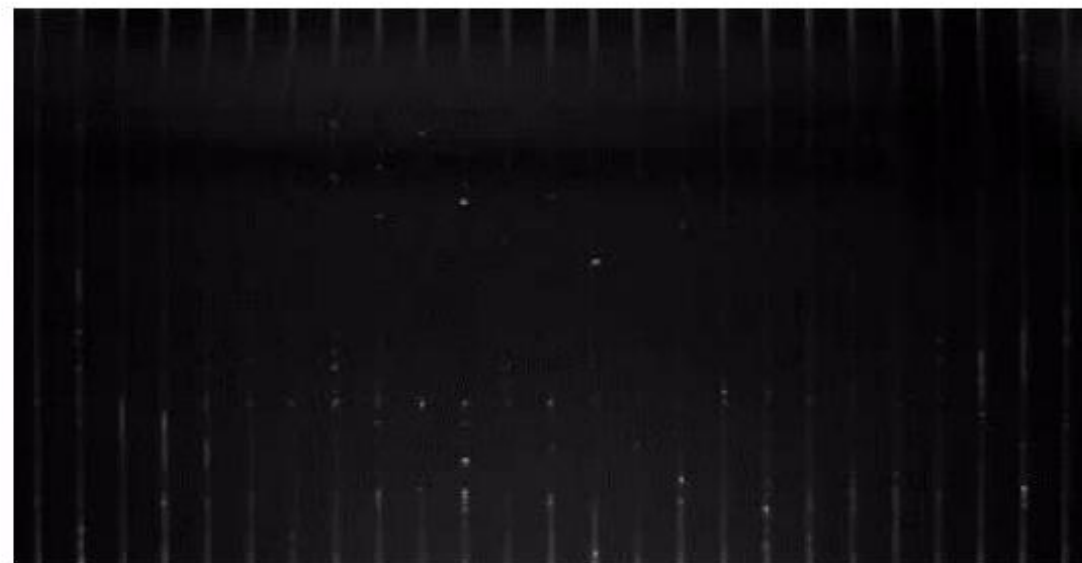


运行开始时：
无法吸样分离
仪器有异响、杂音分贝高
界面提示Reset按钮

点击Reset，开机门查看
为锡箔纸忘撕，此时毛细
管整体无折痕、弧度正常，
可重新运行程序。

1. 气泡
2. 毛细管未载入样品
3. 加样板内 Running Buffer 不足
4. 毛细管表面有污染

Separation (for 12-230 kDa)

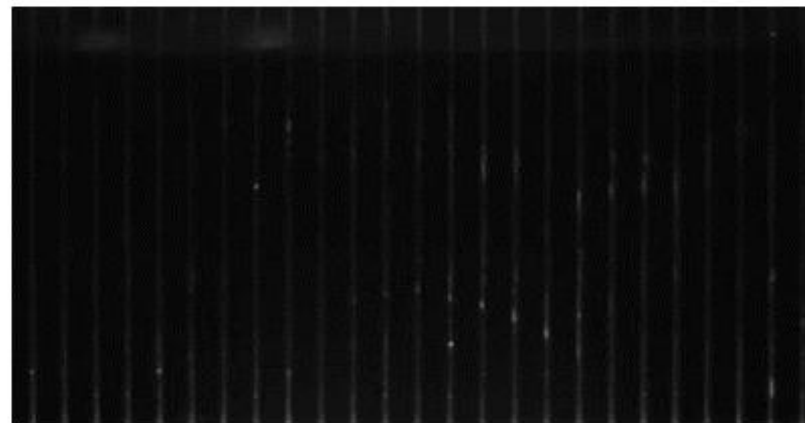


* 运行结束后请先回看分离视频检查是否正常

1. 气泡

- 一两个小白点出现并迅速移动
- 移动很快，在其余荧光内参前面
- 通常，荧光内参迁移在分离开始时是正常的
- 气泡离开毛细管后，荧光内参逐渐弥散

Separation Movie



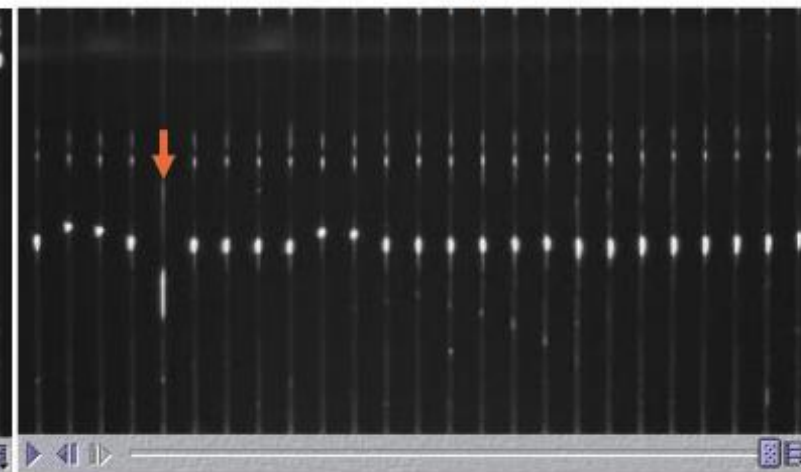
Beginning of the Separation



Middle of the Separation



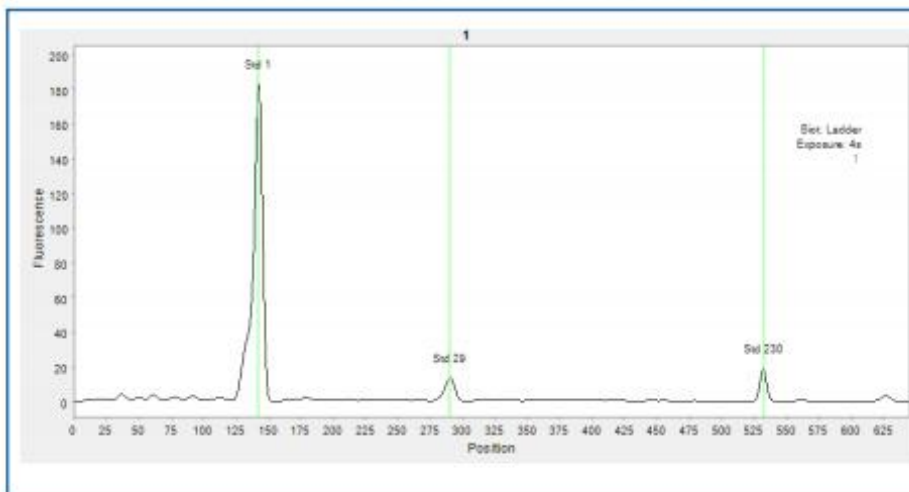
End of the Separation



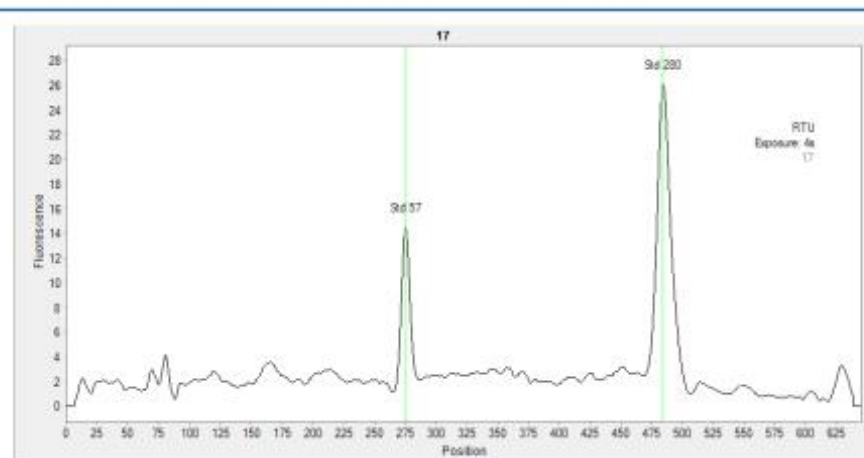
1. 气泡

good

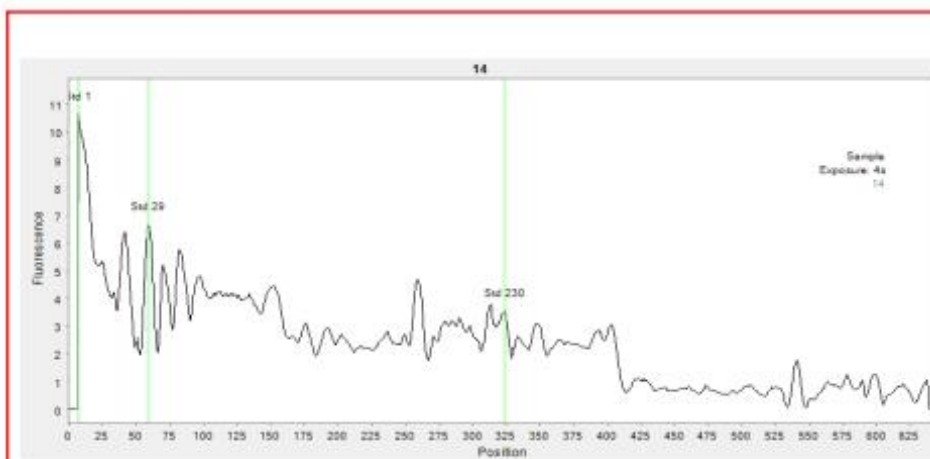
12-230kDa: Std 1, 29 & 230 KD



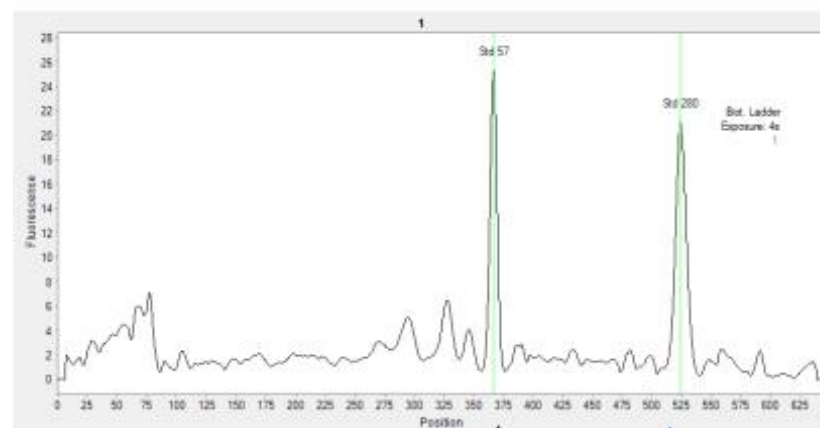
66-440kDa: Std 57 & 280 KD



bad



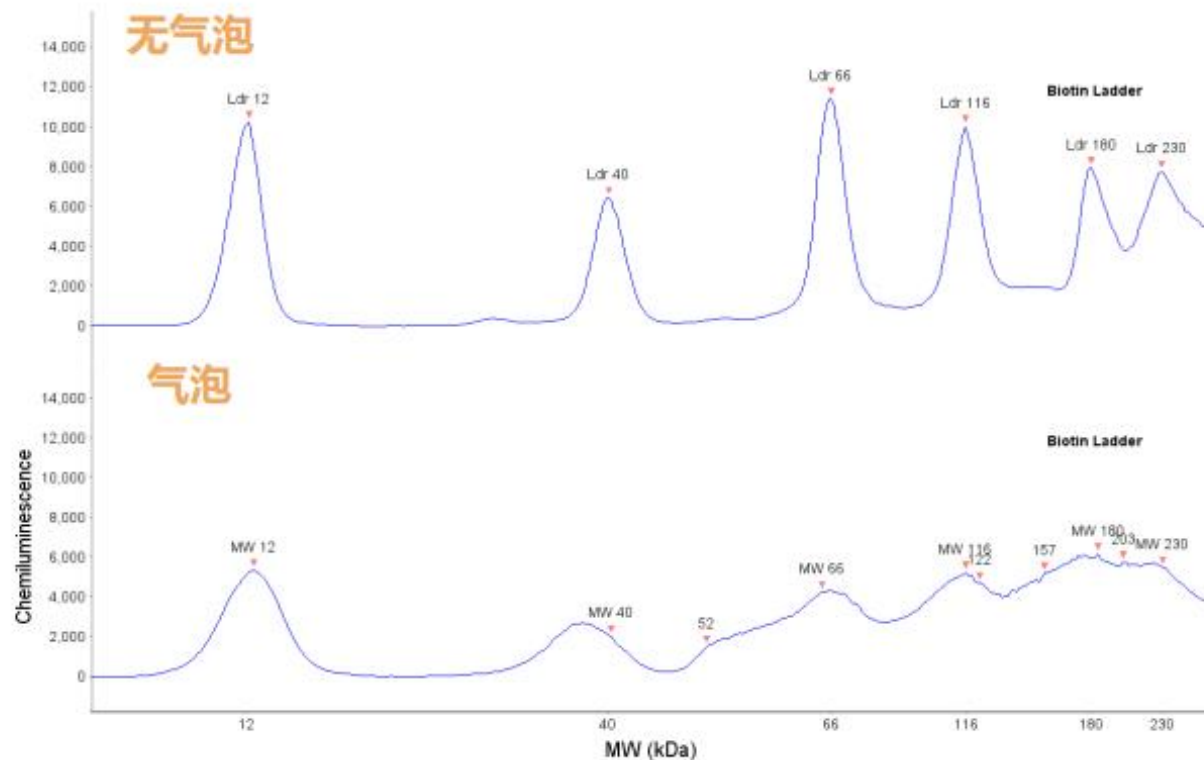
毛细管中有气泡



错误位置

1. 气泡

Analysis 视图:



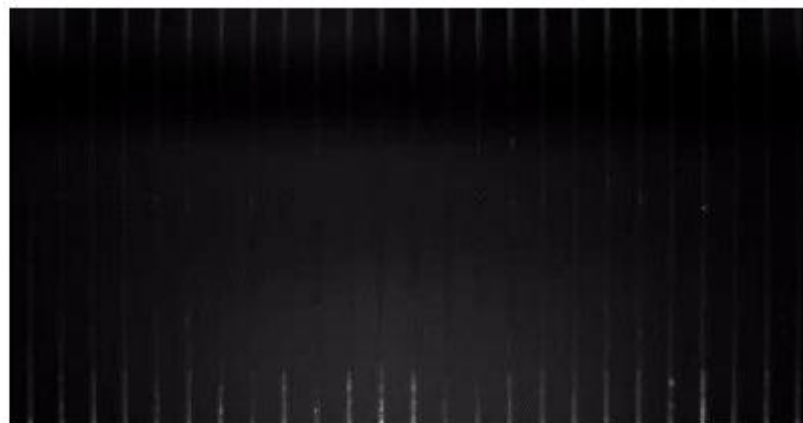
解决:

- 保证加样板 1,000xg 离心 5 分钟
- 如果还有气泡, 延长离心时间至10分钟

2. 毛细管未载入样品

- 许多小白点
- 以一组点的形式出现在每一根相近的毛细管中
- 非常迅速地移动到毛细管的末端
- 在空毛细管中没有荧光内参出现

Separation Movie



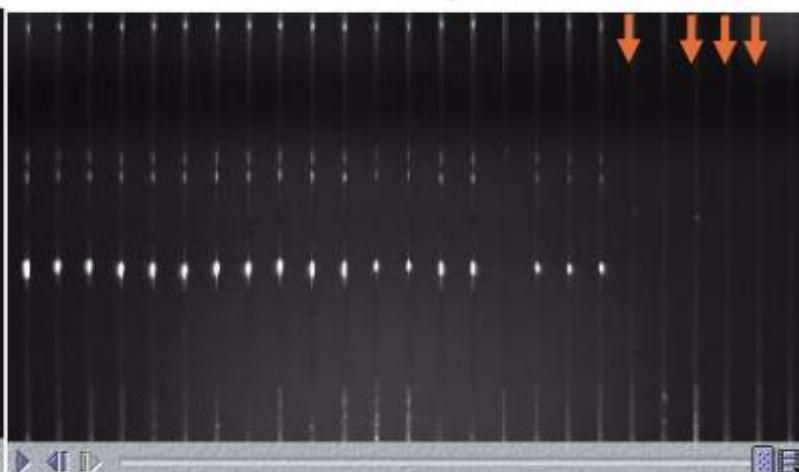
Beginning of the Separation



Middle of the Separation



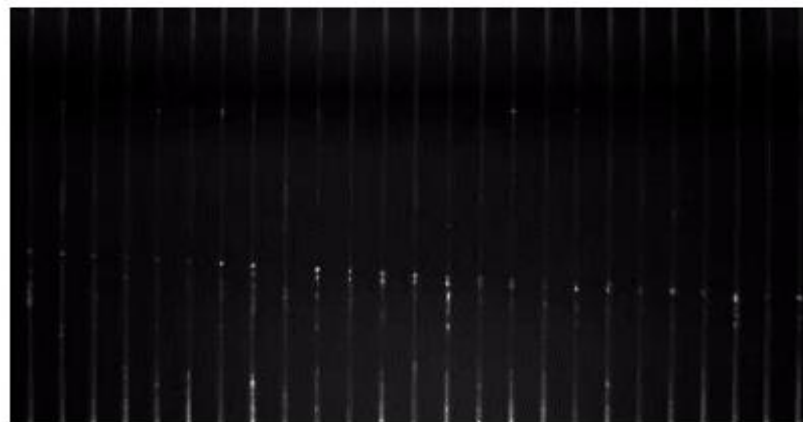
End of the Separation



3. 加样板内 RUNNING BUFFER 不足

- 内参没有一起分离，规律性出现无内参情况
- 在荧光内参 Image 窗格能看到样品塞，表明样品被加载到毛细管中，但荧光内参分离胶中没有迁移

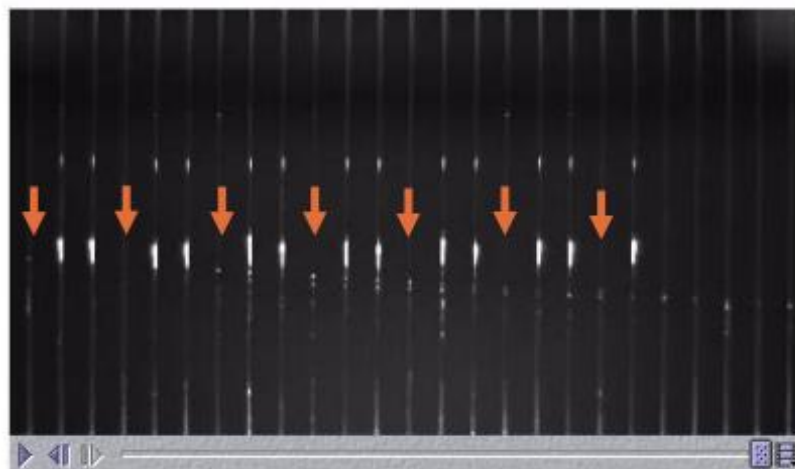
Separation Movie



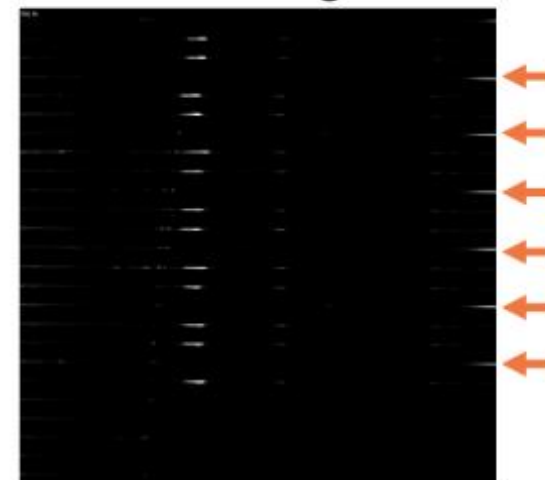
Beginning of the Separation



End of the Separation



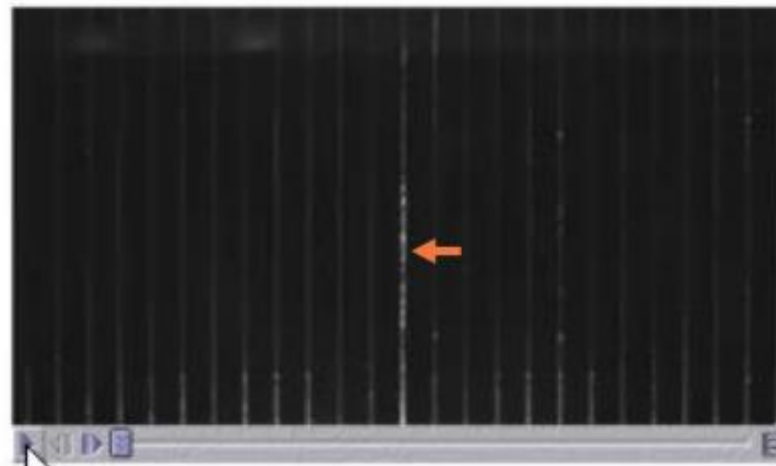
Standards Image View



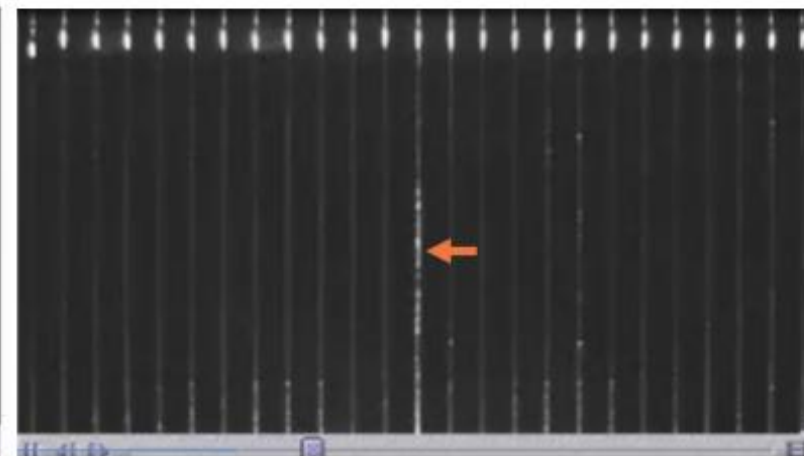
4. 毛细管表面有污染

- 静止的荧光伪影
- 伪影位于毛细管外侧
- 荧光内参迁移不受影响

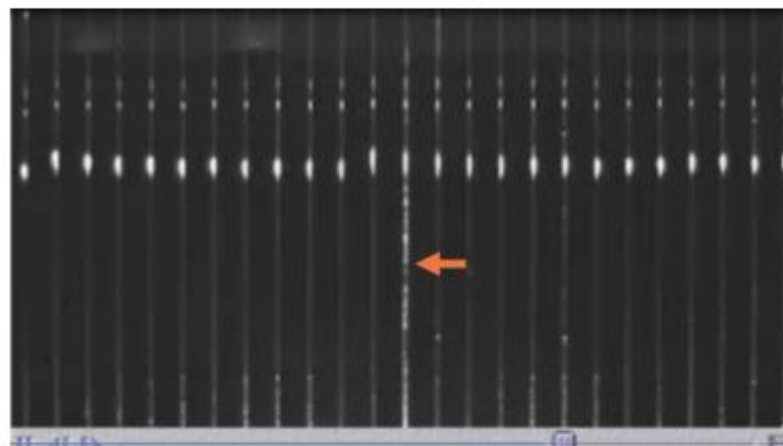
Separation Movie



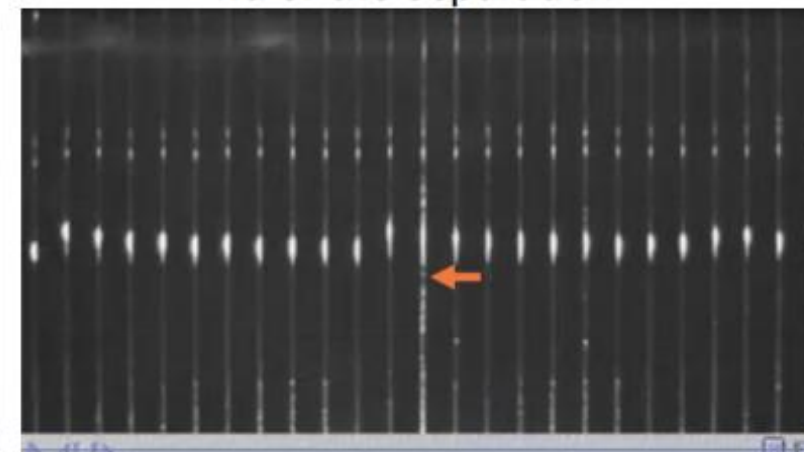
Beginning of the Separation

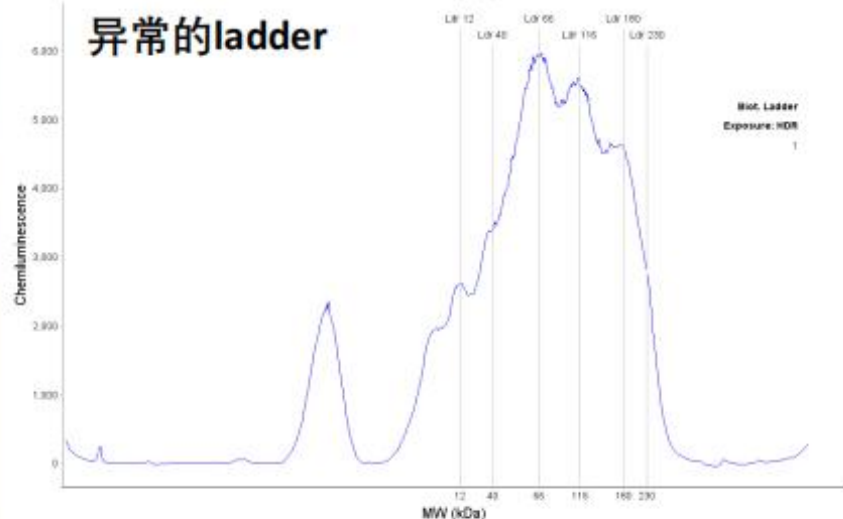
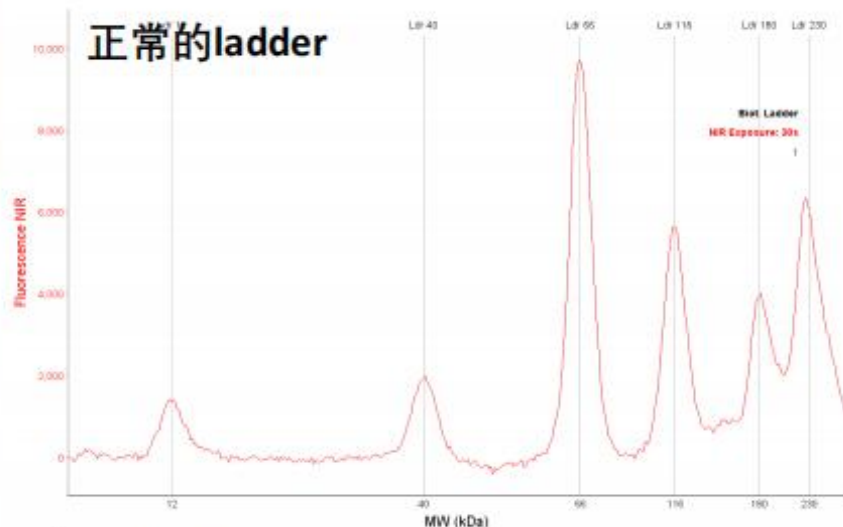


Middle of the Separation



End of the Separation





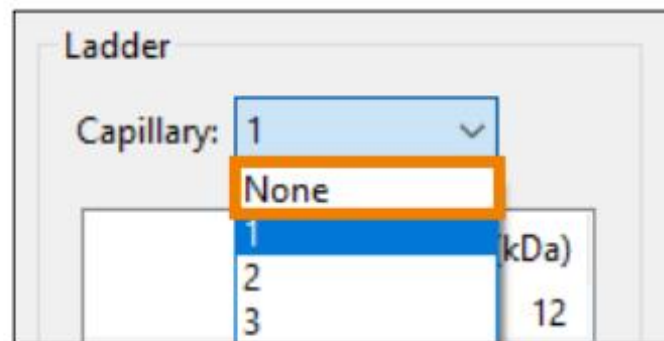
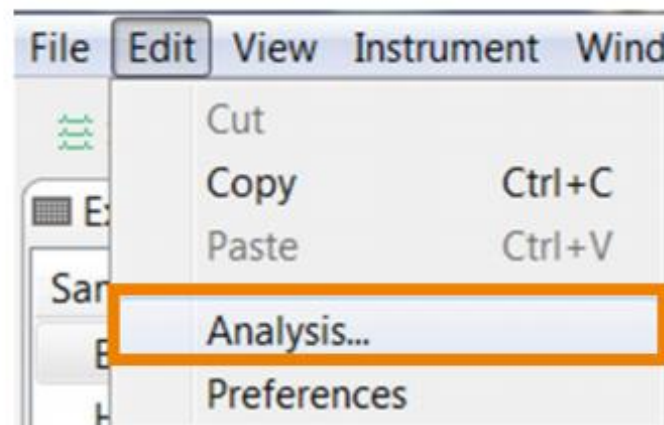
分子量 LADDER 如果有问题，可以关闭

步骤:

1. 点击“Edit” → “Analysis...”
2. 点击“Ladders”
3. 在“Capillary” 中:
 - 选择“None”
4. 点击 “OK”

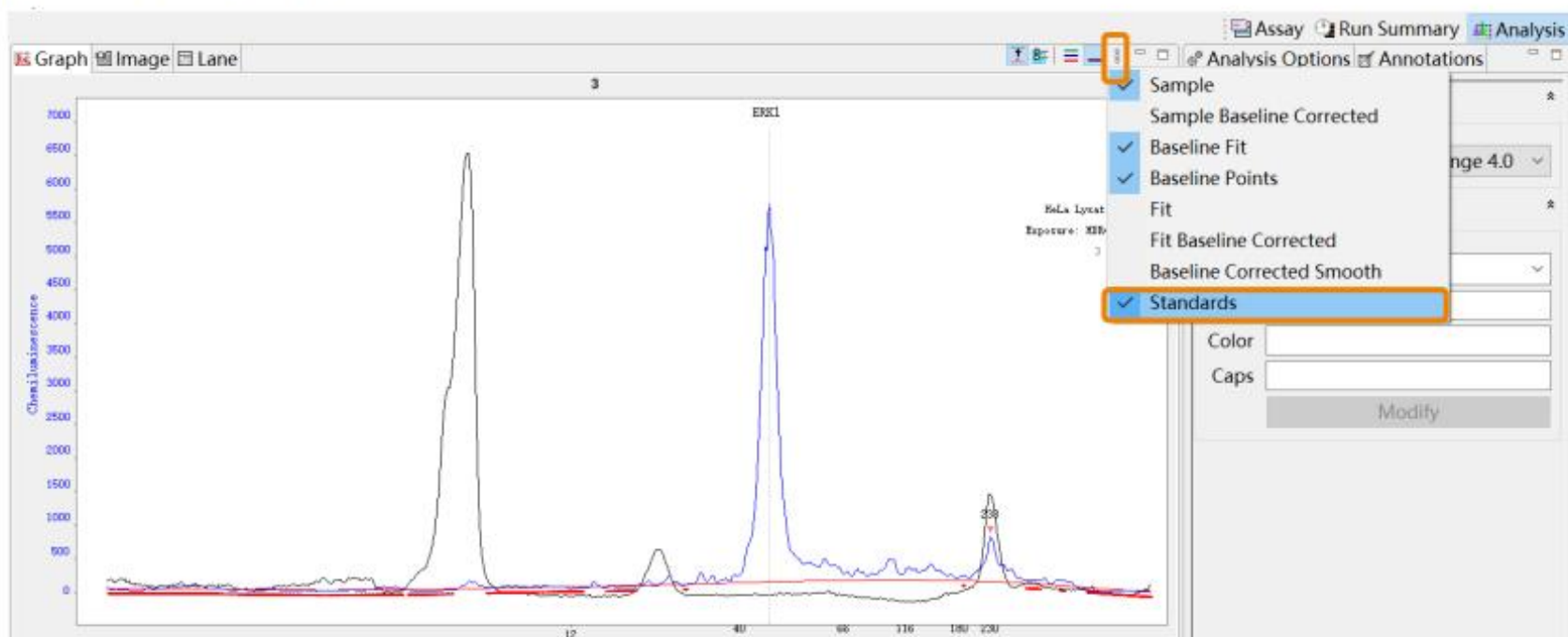
在没有 ladder 情况下，软件根据每个毛细管中的荧光内参来计算分子量

- 此时计算的分子量准确度不高



怎么鉴定?

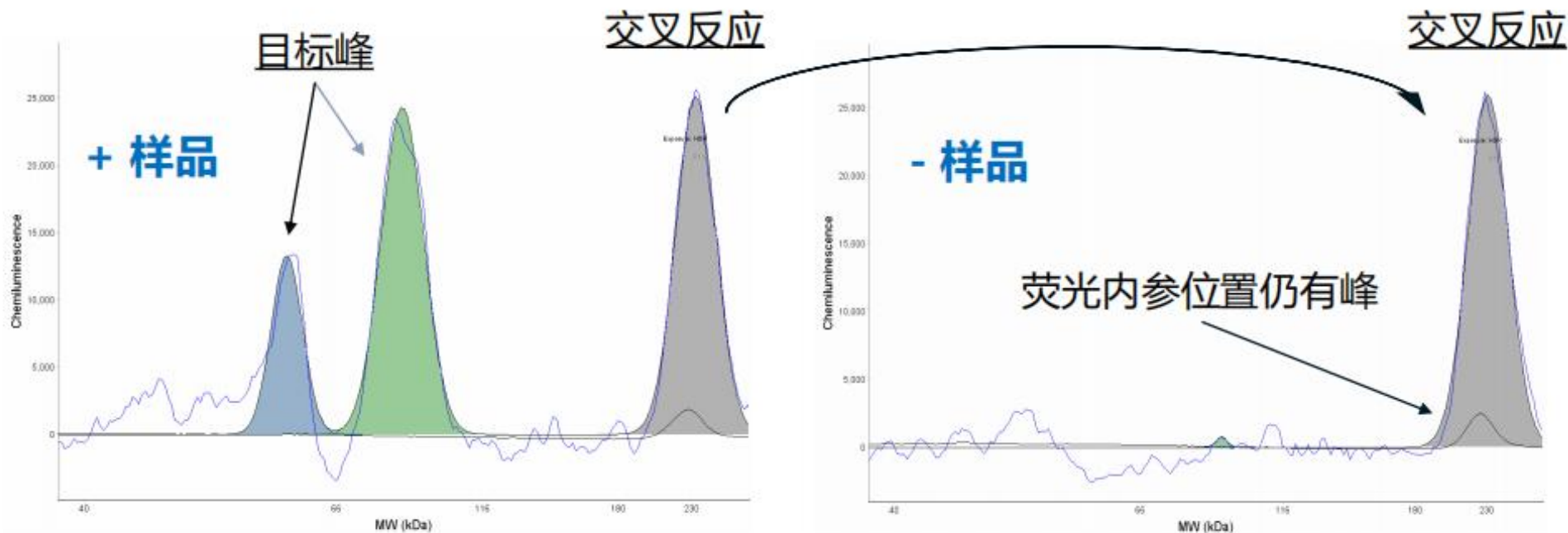
1. 预期外的峰，更荧光内参分子量吻合
 2. 荧光内参和这些峰高度重叠
 3. 无样品阴性对照中有对应峰
 4. 样品稀释但该峰高不变
- ▶ 12-230 kit: 1 kDa, 29 kDa, 230 kDa
 - ▶ 66-440 kit: 57 kDa, 280 kDa
 - ▶ 2-40 kit: 1 kDa, 26 kDa



怎么鉴定?

1. 预期外的峰, 跟荧光内参分子量吻合
2. 荧光内参和这些峰高度重叠
3. 无样品阴性对照中有对应峰
4. 样品稀释但该峰高不变

- ▶ 12-230 kit: 1 kDa, 29 kDa, 230 kDa
- ▶ 66-440 kit: 57 kDa, 280 kDa
- ▶ 2-40 kit: 1 kDa, 26 kDa



如果一抗和荧光内参交叉反应了，怎么办？

1. 如果这些峰跟您的目的蛋白峰互不干扰:

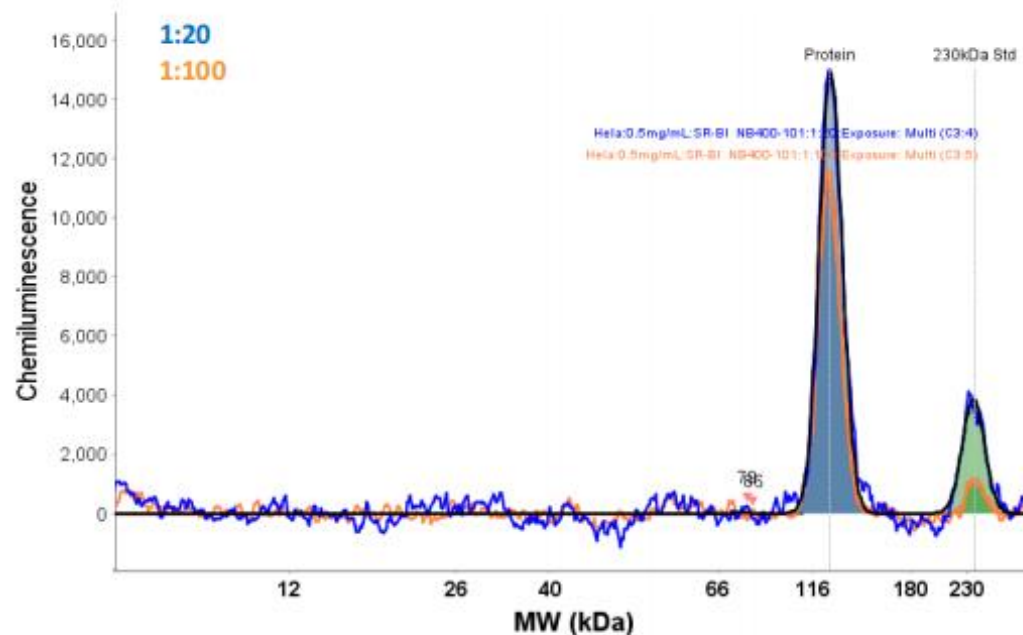
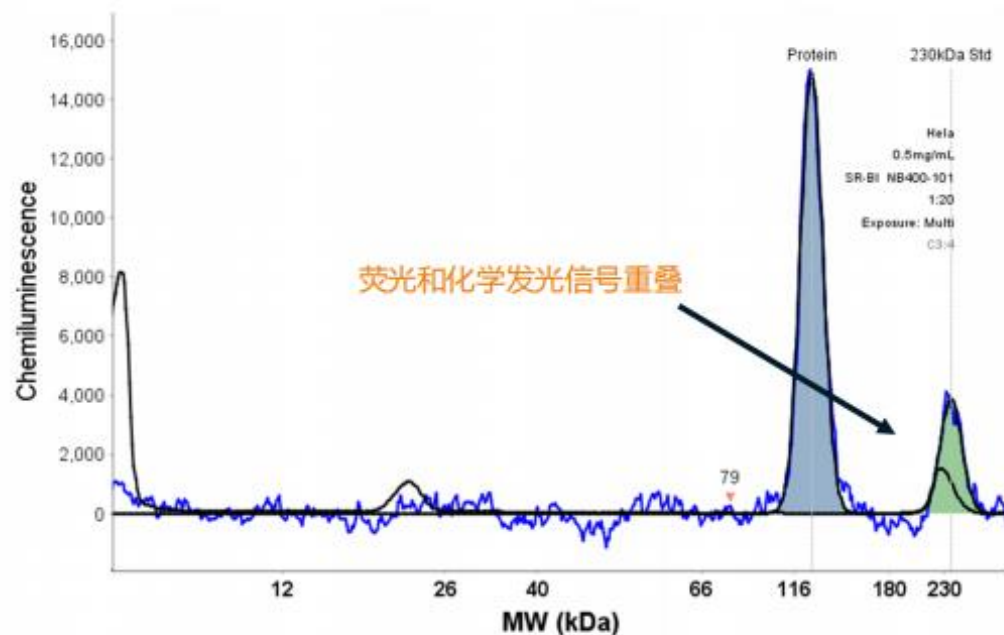
- 可不处理

2. 如果这些峰跟您的目的蛋白距离很近或者互相干扰:

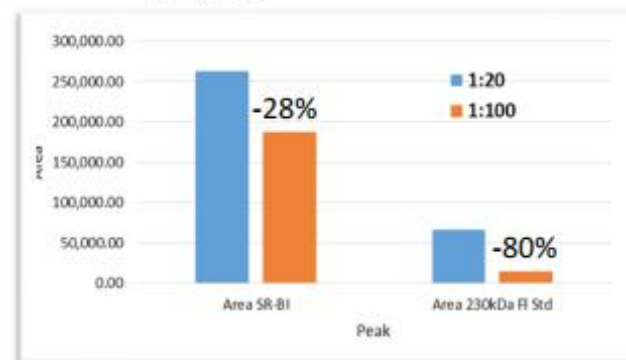
- 更换与荧光内参不结合的抗体
- 对于 230kDa 荧光内参的交叉反应 (最常见):
 - a. 使用 2-40kDa 里的 5X FL-Standard pack (Part# PS-FL05-8)
 - b. 预计会有轻微的失真
或者
 - c. 在保证抗体饱和的情况下，稀释抗体浓度

抗体和荧光内参交叉反应

例：通过稀释一抗，降低一抗于荧光内参的非特异结合



抗体5倍稀释后，荧光内参信号下降相比于目的信号下降，更显著



0.5mg/mL HeLa, SR-B1 抗体 (Novus, NB-400-101)

现象	可能原因	解决方法
实验结束后没有或找不到运行结果文件 (run file)	Wes 和 电脑主机的通讯连接断开	确认Wes处于开机状态，打开Compass软件，确认连接Wes，点击Instrument > Runs...，在出现的窗口内找到运行结果文件，点击Save As保存
3个荧光内参全部弥散无法辨认	Wes 板子没有在室温保存，造成试剂成分沉淀析出	Wes 板子需要在实验开始前室温 (18 – 24 °C) 放置至少24小时以上
荧光内参分离谱图与预期不符	使用了错误的荧光内参	请核对白色纸包上的标记，Standard Pack 1为12-23okD，Standard Pack 2为66-44okD
荧光内参跑出了毛细管	板子上机前没有离心。板子在运输过程中或者上样时有气泡	上机前室温离心，确保各孔内无气泡。如果再离心后看到有气泡，请用枪头将其戳破

荧光内参进入了毛细管，但是没有进一步分离	Wes 板子被冷藏或冷冻过，造成试剂成分析出	Wes 板子需要在实验开始前室温 (18 – 24 °C) 放置至少24小时以上
Graph View 发现靶蛋白分子位置有凹坑	化学发光信号淬灭	选择短的曝光时间 (例如 5s) 查看结果。可减少样品浓度
化学发光信号与蛋白量不成线性	不在检测的线性范围内	通过样品梯度稀释确定实验的检测上限和下限
化学发光信号重复性差	抗体不够量	通过抗体梯度稀释确定最佳的抗体稀释度
Total Protein 试剂盒批次内重复性差	Biotin Labeling Reagent 没有充分重悬 Biotin Labeling Reagent 不是新鲜制备	Reconstitution Agent 1 和 Reconstitution Agent 2 混合后上下吸打 6 – 10 次，保证充分混匀 在上机前 30 分钟内制备 Biotin Labeling Reagent