

TROUBLESHOOTING



Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Es treten flächig Schlieren auf der Membran auf.	Der Transferpuffer wurde nicht ausreichend aus der Membran ausgewaschen, bevor die Inkubation mit den Antikörpern gestartet wurde.	Waschen vorab optimieren. Beachten, dass die Membran voll benetzt ist und in Waschpuffer frei schwimmen kann. Ggf. stärker schütteln während des Waschens.
Es treten schwarze Punkte auf der Fläche der Membran auf.	Die Bildung von schwarzen Spots auf Western Blot Membranen ist ein bekanntes Problem, zu dem es verschiedene Theorien der Ursachen gibt. Tatsächlich ist es ein multi-faktorielles Problem und es kann nur durch Optimierung aller Schritte gelöst werden. Auch Gel-Komponenten, die vor allem durch hohe Temperatur bei der Elektrophorese und beim Blotten aus dem Gel freigesetzt und dann auf die Membran übertragen werden, können zur Spot-Bildung beitragen.	ReadyTector® Lösung nur nach Anweisung und mit dem richtigen ReadyTector® Waschpuffer sowie dem ReadyTector® Chemiluminescent Substrate zusammen verwenden. Alle Waschschrte und die Inkubation in reichlich Lösung durchführen und dafür sorgen, dass die Membran immer frei in der jeweiligen Lösung schwimmt. So können Spots weitgehend reduziert werden. Aber auch dann sind unserer Erfahrung nach vereinzelte Spots nicht ganz auszuschließen.
Es tritt ein flächiger Hintergrund auf der Membran auf.	Das Waschen hat nicht funktioniert.	Alle Waschschrte sorgfältig und nur mit dem speziellen ReadyTector® Waschpuffer durchführen. Die Membran muss dabei immer gut benetzt sein und frei in der Lösung schwimmen. Zudem muss gut geschüttelt werden, so dass die Membran in der Lösung immer leicht in Bewegung ist. Nach der Antikörper-Inkubation vier Waschschrte durchführen.
	Die Blockierung hat nicht funktioniert. Dies kann durch falsches Waschen vor Beginn der Antikörper-Inkubation hervorgerufen werden.	Waschen optimieren. Siehe oben.
	Die Blockierung hat nicht funktioniert.	Für die Inkubation mit der Membran ausreichend ReadyTector®-Inkubationslösung verwenden. Die Membran soll darin gut benetzt sein und frei schwimmen. 20 ml für eine Membran in Mini-Gel-Größe sind ausreichend.
	Nach der Substrat-Detektion wurde die Membran zu lange im Imager bzw. auf dem Röntgenfilm ausgelesen.	Expositionszeit verkürzen. In vielen Fällen ist der Hintergrund mit ReadyTector® geringer, als mit dem sequentiellen Verfahren. Daher können auch die Expositionszeiten insgesamt reduziert werden. Die Geräte-Einstellungen sollten ggf. angepasst werden.

TROUBLESHOOTING



Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Keine Banden, die Membran zeigt keinen Hintergrund.	Der Primärantikörper ist zu niedrig affin. Er kann in ReadyTector® nicht an das Zielprotein binden. Die Blockierung hat funktioniert, daher zeigt die Membran keinen Hintergrund.	Die beste Lösung wäre es, den primären Antikörper gegen einen besseren Antikörper mit höherer Affinität auszutauschen. Wenn das unmöglich ist, kann man die Inkubation mit dem Antikörper auf 2 h oder mehr (ggf. über Nacht bei 4°C) verlängern. Zudem kann man die Primärantikörperkonzentration in der höchsten empfohlenen Konzentration von 0,5 µg/ml einsetzen. Sofern auch das nicht zu einem guten Ergebnis führt, sollte man das sequentielle Verfahren verwenden und mit diesem Antikörper auf die schnelle Einschritt-Reaktion mit ReadyTector® verzichten.
	Das Protein ist nicht oder nicht in ausreichender Menge auf der Membran vorhanden.	Die Proteinlösung, die Gelaufftrennung und das Blotten überprüfen. Sicherstellen, dass das gesuchte Protein auf der Membran vorhanden ist.
Die gesuchten Banden sind ok, aber zusätzliche Banden sind zu sehen.	Der Antikörper bindet nicht nur das Zielprotein, sondern auch andere Proteine. Da niedrig affine, unspezifische Bindungen in ReadyTector® reduziert werden, ist davon auszugehen, dass die zusätzlichen Banden auf echter Bindung des Antikörpers beruhen. Der Primär-Antikörper erkennt also spezifisch auch andere Proteine.	Ein Wechsel des Primärantikörpers auf einen nicht-kreuzreagierenden Antikörper ist eine Möglichkeit, das Problem zu beheben. Alternativ kann man zu einem sequentiellen Verfahren der Immundetektion wechseln und dabei für die Bindung des Primärantikörpers LowCross-Buffer® als Antikörper-Verdünnungslösung einsetzen. LowCross-Buffer® verhindert niedrig bis mittel affine Bindungen und reduziert so unspezifische Banden und Kreuzreaktivitäten. Die Verringerung der Konzentration des Primärantikörpers kann das Problem ebenfalls reduzieren.
	Der Sekundär-Antikörper bindet an Proteine aus der Probe. Ein Beispiel hierfür wäre eine Probe aus Hundeserum. Hier erkennt der in ReadyTector® verwendete Sekundär-Antikörper zwar spezifisch den Maus-Primärantikörper, aber der Sekundärantikörper würde auch die schwere (ca. 50 kDa) und leichte Kette (ca. 25 kDa) des Hunde-IgG's erkennen, da der in ReadyTector® verwendete Sekundär-Antikörper nicht gegen Immunglobuline aus Hund präadsorbiert wurde. ReadyTector® Anti-Mouse-HRP wurde gegen Serumproteine aus folgenden Spezies präadsorbiert: Rind (Bv), Hamster (Hs), Mensch (Hu), Kaninchen (Rb), Ratte (Rt) und Schaf (Sh).	Wenn bei der Detektion von Proteinen aus Hundeserum die Banden bei 50 kDa und 25 kDa stören, sollte ein sequentielles Verfahren mit einem gegen Hund präadsorbierten Sekundär-Antikörper verwendet werden. Mit ReadyTector® Anti-Mouse-HRP lassen sich die zusätzlichen Banden nicht verhindern.