

高雄醫學大學



Western blot 操作流程

文件編號：ES-3-08

版 本：1.0 版

製定日期：104 年 07 月 28 日

擬案單位：生物醫學暨環境生物學系 N932 實驗室

	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	1 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

修 訂 紀 錄

修訂日期	修訂內容摘要	修訂頁次	版本
20150728	新制訂		1.0



	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	2 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

1. 目的：

為使本實驗室進行 western blot 西方點漬法實驗時環安衛目標與標的，並實施及維持管理方案，特訂定本程序。

2. 範圍：

適用於 N932 實驗室 western blot 實驗。

3. 依據：

勞工安全衛生法規及本系場所安全衛生工作守則等相關規定。：

4. 權責：

4.1 實驗室負責人：負責監督實驗進行中的安全與衛生，行管理人應實行之責任。

4.2 實驗執行者：遵守本程序規範之事宜。

5. 作業內容：

5.1 Western blot 流程，如「附件一」。

5.2 收取細胞樣品

5.2.1 將處理完成之細胞以非無菌 1XPBS wash，並將一盤細胞收入一管微量離心管中。

5.2.2 若非立即開始實驗則放入-80 度 C 冰箱冷凍。

5.3 蛋白質樣本萃取

5.3.1 每管微量離心管加入 100ul 的 lysis buffer。

5.3.2 加入 0.1ul 的 protease inhibitor，若所壓抗體具磷酸根需同時加入 0.1ul 的 phosphatase inhibitor。

5.3.3 將細胞樣本以超音波細胞破碎儀進行 25 回的超音波震盪擊破細胞。

5.3.4 將細胞樣本放置於碎冰上 10 分鐘。

5.3.5 以微量離心管低溫離心機將細胞樣本進行 1 萬 2 千轉，4 度 C 的離心 3 分鐘。

5.3.6 將上清液自離心後的細胞樣本中抽出，放入新的微量離心管中，完成蛋

	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	3 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

白質樣本萃取。

5.4 Elisa reader

- 5.4.1 將 11ul 的 blank, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 濃度的 standard 分別加入新的微量離心管，並加入 2ul 的 lysis buffer。
- 5.4.2 將 2ul 的蛋白質樣本加入新的微量離心管，並加入 9ul 的去離子水與 2ul 的 lysis buffer。
- 5.4.3 將 reagent A 和 reagent B 的 BCA 以 1:50 的比例配成 BCA buffer。
- 5.4.4 每管微量離心管加入 200ul 的 BCA buffer。
- 5.4.5 將微量離心管加熱 37 度 C，20 分鐘。
- 5.4.6 將微量離心管內溶液個別放入 96 孔盤內。
- 5.4.7 將 96 孔盤放入 Elisa reader 得到吸光度 data。
- 5.4.8 經過計算後得到 SDS 電泳所需的蛋白質樣本劑量。

5.5 製作 SDS 膠體與 SDS 電泳

- 5.5.1 架好膠台後以酒精測試膠台是否會漏水。
- 5.5.2 依照配方表配製上下膠溶液。
- 5.5.3 加入下膠溶液約 7.5ml，並將 RO 水加在下膠上方壓膠。
- 5.5.4 約 20 分鐘下膠凝固後，將 RO 水倒掉。插上尺梳，並加入上膠溶液。
- 5.5.5 等待上膠凝固後完成 SDS 膠體。
- 5.5.6 此時吸取經過計算後所需劑量的蛋白質樣本放入新的微量離心管中，並加入 5ul 的 2 倍 sample buffer。
- 5.5.7 將 5.5.6 步驟中完成之溶液放入 100 度 C 熱水 3 分鐘。
- 5.5.8 架好 SDS 電泳槽並將膠體移至電泳槽上，加入 1X Chamber buffer 約 250ml。
- 5.5.9 將 sample marker 與 5.5.7 步驟中煮好的 sample 個別加入膠體的 well 中。

	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	4 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

5.5.10 設置電源供應器為 100 伏特 90 分鐘，開始電泳。

5.6 轉漬

5.6.1 架設轉漬槽，在槽內放入 transfer buffer。

5.6.2 將完成電泳的 SDS 膠體自電泳槽中取出。

5.6.3 依照網架、海綿、濾紙*3、NC paper、SDS 膠體、濾紙*3、海綿、網架的順序放置，並將網架闔上扣緊。

5.6.4 將網架放入轉漬槽並蓋上蓋子。

5.6.5 設置電源供應器為 350 毫安培，180 分鐘，開始轉漬。

5.7 Blocking

5.7.1 將 NC paper 自轉漬槽中取出，並以 RO 水清洗。

5.7.2 將 NC paper 泡入 BSA 中，並放置在 shaker 上 4 到 12 小時。

5.8 1 抗

5.8.1 將舊的 BSA 吸出，重新加入新的 BSA。

5.8.2 加入適當比例的 1 抗。

5.8.3 放置在 shaker 上 4 到 16 小時。

5.9 2 抗

5.9.1 將舊的 BSA 吸出，加入 TTBS 並放置在 shaker 上 wash 10 分鐘。

5.9.2 重複 5.7.6 步驟 3 次

5.9.3 將舊的 TTBS 吸出，加入 TBS 並放置在 shaker 上 wash 5 分鐘。

5.9.4 加入新的 BSA 並加入適當比例的 2 抗。

5.9.5 放置在 shaker 上 4 到 12 小時。

5.10 壓片

	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	5 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

5.10.1 重複 5.9.1 到 5.9.3 步驟一次。

5.10.2 將 ECL reagent A 與 reagent B 以 1:1 的比例配成 ECL 作用溶液。

5.10.3 以 NC paper 沾取 ECL 作用溶液，放入透明塑膠夾。

5.10.4 將透明塑膠夾放入冷光儀。

5.10.5 以冷光儀拍照，得到 data。

6. 安全守則：

6.1 操作前先閱讀標準操作程序及守則。

6.2 開始工作前先檢查儀器與器材是否良好。

6.3 使用中注意勿潑灑或打破藥品。

6.4 使用完畢之儀器清洗乾淨及關閉電源。

6.5 使用完畢之膠體集中處理以維護環境安全。



	文件類別	操作手冊	版本	1.0
	文件名稱	Western blot 作業指導書	頁次	6 OF 6
	文件編號	ES-3-08	製修日期	104.07.28

附件一 Western blot 制作流程

