abcam

WB Checklist

使用【Western Blot 實驗檢查清單】時，請於確實做到的部分打 ☑，沒有實施的部分打 ☒，以便後續排查原因 。

	關鍵控制點	具體操作注意事項	完成？
樣本製備	了解目標蛋白，選擇正確的樣本	確認目標蛋白質在待測細胞或組織樣本中是否表現	
		確認目標蛋白質的細胞定位（細胞膜、細胞質、細胞核）	
		確認目標蛋白質是否需要經過誘導處理才能大量表現	
		確認目標蛋白質是否具有轉譯後修飾	
		確認目標蛋白質是否存在有其他異構物	
		確認目標蛋白質是否不穩定、容易降解	
	避免目標蛋白降解	在裂解緩衝液中添加 Protease Inhibitor Cocktails	
		涉及轉譯後修飾的，已添加相應的去修飾酶抑制劑	
		樣本全程置於冰上	
	萃取目標蛋白質	依據目標蛋白質特性選用裂解緩衝液	
		使用超音波破碎處理細胞	
	測定樣本蛋白質濃度	使用 Bradford 或 BCA 等方式測定樣本蛋白質濃度	
電泳分離	選用合適的蛋白質樣本變性條件	95°C 加熱 5~10 分鐘	
		〔多重跨膜蛋白〕37°C 或 70°C 加熱 10 分鐘	
	選用合適的電泳膠體濃度	目標蛋白質分子量 ，分離膠體濃度	
	確保蛋白質樣本上樣量充足	>20 μg 總蛋白	
	設立實驗對照組	陽性對照 ，陰性對照	
		Loading Control	
轉漬	依據目標蛋白分子量大小調整轉漬緩衝液的 SDS 與 Methanol 濃度	目標蛋白質 <100 kDa，轉漬緩衝液含 20% Methanol	
		目標蛋白質 >100 kDa，轉漬緩衝液含 10% Methanol、0.1% SDS	
	選用合適的 PVDF 轉漬膜	目標蛋白質 <10 kDa，使用 0.2 μm 孔徑 PVDF 轉漬膜	
		最終偵測訊號為螢光型式，使用低螢光背景值 PVDF 轉漬膜	
	檢視轉漬效率	使用麗春紅對轉漬膜進行染色，確認轉漬效率	
阻斷	選用合適的阻斷液	依據抗體說明書或文獻，選用阻斷液	
		依據自行測試結果，選用阻斷液	
抗體反應	妥善處理轉漬膜	確保轉漬膜沒有處於乾燥狀態，且沒有經過裁剪	
	適當的抗體濃度	一級抗體稀釋比例 ，二級抗體稀釋比例	
	使用新鮮配製的抗體	抗體為新鮮配製，沒有重複使用	
	反應後充分沖洗轉漬膜	抗體反應後已充分沖洗過轉漬膜，減少非專一性結合反應	
訊號偵測	遵循化學冷光訊號檢測注意事項	避光配製 ECL 冷光試劑，且現配現用	
		ECL 冷光試劑用量充足，可均勻覆蓋整張轉漬膜	
	遵循螢光訊號檢測注意事項	確保 Bromophenol blue 遠離目標條帶	
		使用鉛筆而非原子筆標記轉漬膜	

電泳膠體濃度對照表

Protein Size	Gel
4–40 kDa	20%
12–45 kDa	15%
10–70 kDa	12.5%
15–100 kDa	10%
25–200 kDa	8%

Loading Control 對照表

Protein	Size
Histone H3 ●	15 kDa
COX IV ●	17 kDa
Cofilin ●●	19 kDa
Cyclophilin B ●	24 kDa
PCNA ●	29 kDa
VDAC1/Porin ●	31 kDa
Cdk4 ●	34 kDa
GAPDH ●	37 kDa
TBP ●	38 kDa
Actin ●●	42 kDa
b-Actin ●●	42 kDa
YY1 ●	45 kDa
b-Tubulin ●●	49 kDa
a-Tubulin ●●	50 kDa
HDAC1 ●	55 kDa
HSP60 ●	60 kDa
Lamin B1 ●	66 kDa
NaK ATPase ●	113 kDa
Vinculin ●	124 kDa

● Whole Cell
● Cytoskeleton
● Membrane
● Nuclear
● Mitochondrial