



Immunohistochemistry Immunocytochemistry Western Blot Checklist

Abcam 提供 IHC/ICC/WB 實驗檢查清單，幫助您順利完成實驗！

progress happens together
abcam



Immunohistochemistry Checklist

說明：此清單用於協助您的 IHC 實驗，以便高速有效率的得到良好的實驗結果。

我們在每個實驗步驟中舉例出關鍵控制點 (Critical Control point)，您可在每一步進行時對照該清單並參考關鍵步驟進行操作。

確定實驗條件的關鍵步驟，確認後請在方框中 V / X，X 的地方再針對實驗是否需要再進行修改。

在實驗開始前，請先確認您的 IHC 切片類型：☐ 石蠟切片 ☐ 冷凍切片 ☐ 震動切片 切片厚度：_____ μm

關鍵控制點	具體操作注意事項	是否完成
樣本基本特性確認	蛋白本身的特性 · 確認蛋白的細胞位置，是否在組織中表現 · 確認蛋白在組織中表達是否有文獻或其他數據支持 · 蛋白是否跨膜蛋白 · 蛋白使否需要刺激或誘導才會表達 · 如需特殊處理，是否有文獻或其他數據支持	☐ ☐ ☐ ☐ ☐
	設置對照組 · 設定陽性對照(打星號!!) · 設定陰性對照(無或低表現組別)	☐ ☐
樣本固定	避免蛋白降解 · 組織檢體是否為新鮮製備 · 細胞是否從培養箱取出後立刻進行固定 · 使用 Paraformaldehyde 或福馬林對細胞進行固定 · 使用甲醇、乙醇或丙酮等有機溶劑對細胞進行固定 · 組織固定時間：_____小時 固定溫度：_____°C	☐ ☐ ☐ ☐ ☐
抗原修復	根據切片類型，確認是否需要進行抗原修復	
	合適的抗原修復液 · 使用(檸檬酸鈉, pH 6.0、Tris-EDTA, pH 9.0或其他 _____)	☐
合適抗原修復方式	合適抗原修復方式 · 使用蛋白水解酶抗原表位修復方法 · 使用 _____ 酶，進行抗原表位修復 · 酶濃度：_____ % 處理時間：_____ · 使用熱誘導抗原表位修復 · 修復時間：_____分鐘 修復溫度：_____°C	☐ ☐ ☐ ☐ ☐
阻斷	選用合適的阻斷液 · 使用阻斷液：5-10% 血清 / 5% BSA / 其他：_____ · 阻斷時間：_____分鐘 阻斷溫度：_____°C	☐ ☐
抗體反應	適合的抗體濃度 · 確認說明書上抗體的濃度： 一抗濃度：_____ 二抗濃度：_____ (稀釋比)	☐
	抗體物種 · 一抗物種：_____ 二抗物種：_____	☐
	培養時間/溫度 · 一抗時間：_____ 溫度：_____°C · 二抗時間：_____ 溫度：_____°C	☐ ☐
	適合培養條件 · 是否在濕盒中進行抗體培養以避免乾片現象發生 · 如果使用螢光二抗應在避光環境下培養	☐ ☐
偵測	化學訊號檢測 · 顯色液是否新鮮配置 · 顯色液比例：_____	☐ ☐
	螢光訊號檢測 · 染色完成的玻片是否放置於暗盒中 · 染色完成後是否馬上進行拍照存檔	☐ ☐

Note 1

- 如果蛋白為跨膜蛋白，則不建議使用有機溶劑對組織樣本進行固定
- 如果蛋白為跨膜蛋白，請確認抗體辨認的是胞內或胞外的部分

Note 2

- 樣本固定的時間取決於組織的大小與類型，但對於大多數樣本，會建議使用 4% PFA 固定，並在室溫培養 18~24 小時為最佳

Note 3

- 一般情況下，冷凍切片無須進行抗原修復，但如果是使用醛類試劑 (PFA) 進行固定的話，可使用蛋白酶抗原修復
- 建議針對不同切片測試多種抗原修復方法，以找到最適合的染色條件

Note 4

- 如果後續使用螢光方法測定訊號，建議在阻斷液中加入 1% BSA 和最終濃度為 0.3 M 的甘氨酸，以降低自體螢光的干擾

progress happens together
abcam



Immunocytochemistry Checklist

說明：此清單用於協助您的 ICC 實驗，以便有效率得到良好的實驗結果。

我們在每個實驗步驟中舉例出關鍵控制點 (Critical Control point)，您可在每一步進行時對照該清單並參考關鍵步驟進行操作。

確定實驗條件的關鍵步驟，確認後請在方框中 V / X，X 的地方再針對實驗是否需要再進行修改。

關鍵控制點	具體操作注意事項	是否完成
樣本基本特性確認	蛋白本身的特性	· 確認蛋白的細胞位置，蛋白定位於 _____ ☐
		· 確認蛋白在細胞中表達是否有文獻或其他數據支持 ☐
		· 蛋白是否跨膜蛋白 ☐
		· 蛋白使否需要刺激或誘導才會表達 ☐
		· 如需特殊處理，是否有文獻或其他數據支持 ☐
	設置對照組	· 易降解蛋白會出現多條band ☐
		· 設定陽性對照 (打星號!!) ☐
		· 設定陰性對照 (無或低表現組別) ☐
	細胞狀態	· 細胞狀態是否良好 (型態、細胞大小、分化程度等) ☐
		· 細胞是否有汙染的情形 ☐
樣本固定	避免蛋白降解	· 待染色細胞數目 _____ 細胞密度 _____ % ☐
		· 細胞是否從培養箱取出後立刻進行固定 ☐
		· 使用 Paraformaldehyde 或 福馬林 對細胞進行固定 ☐
		· 使用 甲醇、乙醇 或 丙酮 等有機溶劑對細胞進行固定 ☐
		· 細胞固定時間: _____ 分鐘 固定溫度: _____ °C ☐
打洞	合適的打洞處理	· 根據蛋白在細胞的定位，確認是否需要進行打洞步驟 ☐
		· 使用試劑: Triton-X 100 / Tween 20 / 其他: _____ ☐
		· 打洞試劑濃度: _____ % 打洞溫度: _____ °C ☐
		· 打洞時間: _____ 分鐘 ☐
阻斷	選用合適的阻斷液	· 使用阻斷液: 5-10% 血清 / 5% BSA / 其他: _____ ☐
		· 如果後續使用螢光偵測，是否在阻斷液中加入 0.3M 甘胺酸 (glycine) 以消除游離醛基 ☐
		· 阻斷時間: _____ 分鐘 阻斷溫度: _____ °C ☐
抗體反應	適合的抗體濃度	· 確認說明書上抗體的濃度： 一抗濃度: _____ 二抗濃度: _____ (稀釋比) ☐
	抗體物種	· 一抗物種: _____ 二抗物種: _____ ☐
	培養時間/溫度	· 一抗時間: _____ 溫度: _____ °C ☐
		· 二抗時間: _____ 溫度: _____ °C ☐
	適合培養條件	· 是否在濕盒中進行抗體培養以避免乾片現象發生 ☐
偵測	螢光訊號檢測	· 如果使用螢光二抗應在避光環境下培養 ☐
		· 染色完成後的玻片是否放置於暗盒中 ☐
		· 染色完成後是否馬上進行拍照存檔 ☐
		· 如果進行多重染色實驗，是否選擇適合的螢光， 避免激發光與散色光波長重疊 ☐

Note 1

- 如果目標蛋白位於細胞內，透化步驟非常重要!!

Note 2

- 如果使用醛類 (例如 4% PFA) 固定，建議在室溫下固定 10-20 分鐘
- 如果是細胞核蛋白優先使用醛類固定。
- 如果使用有機溶劑 (例如 甲醇) 固定，建議在 -20°C 固定 5-10 分鐘
- 如果使用 甲醇 作為固定液，建議使用 80% 甲醇固定懸浮細胞，100% 固定貼壁細胞

Note 3

- 良好的細胞培養習慣，確保細胞型態正常是為後續 ICC 實驗奠定基礎。
- 細胞滿度依照細胞適合條件進行調整。

Note 4

- 如果使用醛類 (例如 4% PFA) 固定，建議使用 0.1-0.25 % Triton-X 100 室溫打洞 10 分鐘
- 如果要對胞內蛋白進行偵測，建議使用 0.2-0.5% Tween 20 室溫打洞 10-30 分鐘

progress happens together
abcam



Western Blot Checklist

說明：此清單用於協助您的 WB 實驗，以便高速有效率的得到良好的實驗結果。

我們在每個實驗步驟中舉例出關鍵控制點 (Critical Control point)，您可在每一步進行時對照該清單並參考關鍵步驟進行操作。

確定實驗條件的關鍵步驟，確認後請在方框中 V / X，X 的地方再針對實驗是否需要再進行修改。

關鍵控制點	具體操作注意事項	是否完成
樣本選擇和處理	· 確認蛋白的細胞位置，蛋白定位於 _____	☐
	· 確認蛋白在組織或細胞中是否表達	☐
	· 是否需要透過誘導提高表達量	☐
	· 轉譯後修飾的分子量與預測值可能不同	☐
	· 多異構體蛋白會出現多條 band	☐
	· 易降解蛋白會出現多條 band	☐
設置對照組	· 設定陽性對照 (打星號!!)	☐
	· 設定陰性對照	☐
樣本製備	避免標靶蛋白降解	☐
	· 添加複合蛋白酶抑制劑 (PI)	☐
	· 涉及蛋白修飾的，加入相對應的去修飾酶抑制劑	☐
	富集標靶蛋白	☐
	· 選擇合適的裂解緩衝液	☐
	· 超音波震盪破碎處理	☐
低溫環境	· 樣品一律放在冰上	☐
	· 蛋白 95°C 變性 5-10 分鐘	☐
蛋白質變性	· 多重跨膜蛋白，建議不煮蛋白	☐
	· 以 Bradford、Lowry 或 BCA 分析測定樣本蛋白濃度	☐
濃度測定	· 以 Bradford、Lowry 或 BCA 分析測定樣本蛋白濃度	☐
電泳	選擇合適的電泳分離膠濃度	☐
	· 使用建議的 SDS-PAGE 濃度梯度膠，或依照分子量選擇適合濃度的分離膠：分子量 _____，分離膠濃度 _____	☐
蛋白質的上樣量	· 大於 20 µg 總蛋白質	☐
轉漬	調整轉漬緩衝液的 SDS 與 Methanol 濃度	☐
	· 選擇適合的緩衝液	☐
	SDS 濃度：_____ %，Methanol 濃度：_____ %	☐
	不同分子量蛋白選擇合適的 PVDF 轉漬膜	☐
PVDF 轉漬膜	· PVDF 轉漬膜孔徑：_____ %	☐
	· 使用麗春紅對轉漬膜進行染色，確認轉漬效率	☐
檢視轉漬效率	· 如果使用螢光標記檢測，請確保麗春紅完全清洗乾淨	☐
阻斷	· 依照抗體說明書或文獻，選用阻斷液	☐
	· 依照實驗結果，更換阻斷液	☐
抗體反應	適合的抗體濃度	☐
	· 確認說明書上抗體的濃度： 一抗濃度：_____ 二抗濃度：_____ (稀釋比)	☐
	抗體物種	☐
	· 一抗物種：_____ 二抗物種：_____	☐
	培養時間/溫度	☐
避免不當操作影響實驗結果	· 一抗時間：_____ 溫度：_____ °C	☐
	· 二抗時間：_____ 溫度：_____ °C	☐
新鮮配製的抗體	· 避免膜乾掉、裁錯，充分清洗膜避免非特异性結合	☐
	· 使用新鮮配製的抗體，避免重複利用	☐
偵測	化學訊號檢測	☐
	· 避光配製 ECL 冷光試劑，現配現用	☐
	· 冷光試劑用量充足，可均勻覆蓋整張轉漬膜	☐
螢光訊號檢測	· 確保 Bromophenol blue 遠離目標條帶	☐

Note 1

- 目標蛋白質分子量較小，使用 0.22 µm 孔徑 PVDF 轉漬膜
- 目標蛋白質分子量較大，使用 0.45 µm 孔徑 PVDF 轉漬膜

Note 2

- 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

Note 3

- 分子量平均 4-40 kDa，分離膠濃度 20%
- 分子量平均 12-45 kDa，分離膠濃度 15%
- 分子量平均 10-70 kDa，分離膠濃度 12.5%
- 分子量平均 15-100 kDa，分離膠濃度 10%
- 分子量平均 25-200 kDa，分離膠濃度 8%

Note 4

- 麗春紅的注意事項
- 轉漬之前確認膠與膜之前是否有氣泡，可藉由麗春紅幫助判斷有無氣泡干擾

