Why choose the V3 Western Workflow from Bio-Rad?

您一定要知道的事：顛覆傳統的西方墨點法

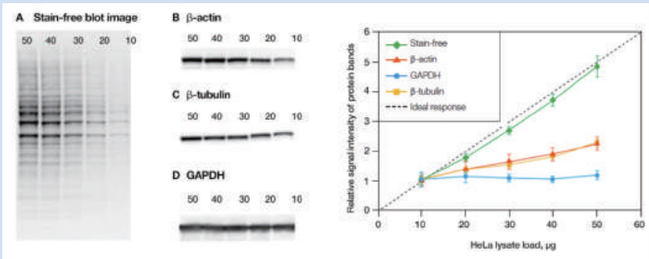
前言

西方墨點法 (Western Blot) 此技術已廣泛應用於蛋白質表現量之分析，然而傳統的 Western blot 常常需要花費 2~3 日才能完成，耗時久，且只能於實驗結束後獲得實驗數據，過程中如有失敗，於實驗結束後才會發現，因為過程不透明，不易找到失敗的主因。因此，BIO-RAD 提出一個新概念 V3 (Visualize, Verify, Validation) Western Workflow: 此過程主要可分為五個步驟，其中包含透過電泳及轉漬速度的提升以提高實驗的效率，並利用免染技術 (Stain-free technology)，使蛋白免染可視化，無須額外添加染劑，即可在凝膠以及膜上觀察蛋白質條帶，於實驗中進行多重監控及驗證，這項技術可讓 Western Blot 過程更為透明，以確保實驗的品質。

Stain-free technology

一個可信賴的 Western Blot 數據會有 target protein 的數據以及 loading control 來做 normalization。常見的 loading control 為 housekeeping protein，其中包含β-actin β-tubulin 及 GAPDH。然而，近年來越來越多期刊及研究指出 total protein 相比於 housekeeping protein 更適合應用於 western blot 實驗的 loading control。研究指出 housekeeping protein 的表現量會受到環境、轉錄後修飾調控及老化等因素的影響、因此在某些實驗中並不適用。

此外，研究數據顯示 housekeeping protein 無法完整的表現出蛋白濃度的線性，如圖一、分別使用 10~50 μg HeLa cell 裂解液 進行 western blot 實驗，發現無論是β-actin β-tubulin 及 GAPDH，都無法完整表達蛋白濃度的線性，而 stain-free 的 total protein 則是在 10~50 μg 下表現良好的線性。



圖一、比較10~50 μg HeLa cell lysate分別以stain-free total protein 及 house keeping protein 進行normalization的差異 (A) stain-free

另一方面，target protein 的表現量通常遠低於 housekeeping protein，因此為觀察 target protein 的表現量，經常需要增加蛋白質樣本體積量或濃度，此時亦可能造成 housekeeping protein 量過多，使其冷光的結果過曝，最終影響定量結果的準確性。

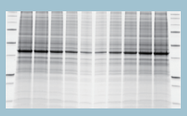
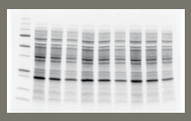
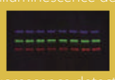
BIO-RAD 利用 stain-free 這項技術，透過在膠體內添加 trihalo compound ，trihalo compound 經 UV 激發後，會與蛋白質上的 tryptophan 結合發出螢光，不須額外染色，即可觀察凝膠以及膜上的蛋白表現，並獲得 total protein 之數據。Stain-free 與 Coomassie blue 及螢光染劑等不同，stain -free 與後續 immunodetection 之實驗相容，因此可用最少的樣本量達到最高的實驗效率。

快速

自信

精確定量

V3 Workflow 流程

步驟	流程		時間	數據	
1	分離蛋白		~15 min	 Protein separation at 300 V	使用免染預鑄膠、快速免染Acrylamide試劑組 (Mini-PROTEAN TGX Stain-free Gels、TGX Stain-free FastCast Acrylamide Kit)可在15~20 min內完成蛋白電泳。
2	確認蛋白樣貌		1 min	Stain-free image of pretransferred gel	經過電泳後的蛋白質膠，利用影像系統UV光源激發1~5 min，觀察實驗初步結果及確認loading control 是否合理。
3	蛋白轉漬		3–7 min	—	利用Trans-Blot Turbo System 進行蛋白質膠片轉漬，可將時間縮短至3~7分鐘，相比傳統的濕式轉漬可大量的縮短轉漬時間。
4	轉漬確認		2 min	 Stain-free image of blot	轉漬後的蛋白質膠可透過影像系統進行觀察，以確認轉漬效率。
5	確效及定量		~5 hr	Chemiluminescence detection  Fluorescence detection	轉漬後，利用影像系統觀察蛋白質膜獲得total protein之數據，接者進行immuno-detection相關實驗，並透過冷光或螢光的方式成像，使用影像系統獲得target protein之數據，獲得的數據後利用BIO-RAD的分析軟體Image Lab 來進行分析及定量。

結論

Western Blot 廣泛應用於蛋白質表現量之分析，然而隨著學術倫理意識提升，裁切、反覆 strip 及 reprobe 轉漬膜均可能造成數據之疑慮。透過 V3 Western Workflow 結合 stain-free technology 即可獲得 total protein 的數據，且與後續 Western blot 實驗相容，不需要裁切轉漬膜、stripping 及 reprobing 即可獲得 target protein 與 total protein 的實驗數據，隨著 Western Blot 技術的改良，V3 Western Workflow 使得 western blot 過程更加的透明化，並且大幅提升實驗的效率，Western Blot 儼然已進入下一個世代。

參考資料

1、https://www.bioradiations.com/defining-the-new-normal-in-quantitative-western-blot-data
2、BIO-RAD Bulletin 6360
3、BIO-RAD Bulletin 6873