

藥劑配製(總表)



項次	試劑名稱	配製說明					
		蒸餾水	緩衝液	充分搖勻	可分裝份數	分裝後每份容量	保存方式
1	酵素	10ml	-	呈現淡粉橘色 澄清液體	 *33份	0.3ml	冷凍保存
2	呈色劑	50ml	-	呈現淡黃色 澄清液體	 *33份	1.5ml	冷凍保存
3	基質	-	450ml	呈現透明 澄清液體	 *33份	13.5ml	冷凍保存
4	緩衝液	1000ml		呈現透明 澄清液體	使用量大者不需分裝		常溫保存
					使用量小者可用適當容器分裝		冷藏/冷凍保存
5	溴水		-		安瓶1cc / 2cc		常溫保存
					螺旋蓋4cc		常溫保存

*注意 1. 酵素第一次使用須先檢測酵素活性範圍(O.D值)，需連續2次都介於130~150之間，大於150加緩衝液稀釋，低於130加酵素粉提高活性。

2. 只能用蒸餾水或純水。

Step 1: 緩衝液配製



+

1000 ml 蒸餾水

充分混勻

確定完全溶解



1瓶緩衝液(大)

分裝保存

- 用量大-室溫陰涼處保存
30天
- 用量小-分裝冷藏保存
180天，使用前
須恢復至室溫。

注意事項

1. 使用**緩衝液**配製。
2. 較難溶解，建議前一天先配好。
3. 呈現**透明澄清**液體。

Step 2 : 酵素配製



1瓶酵素

+

10 ml 蒸餾水

充分搖勻，確定完全溶解



分裝冷凍保存

- 準備15ml塑膠離心管
- 農試所規定用 **綠蓋**
- **0.3 ml/管**
- 分裝**33管**
- 保存於**0°C**以下
- 可保存**180天**

注意事項

1. 只能用 **蒸餾水** 或 **純水**。
2. 呈現淡粉橘色 **澄清** 液體。
3. **酵素活性只有在第一次開瓶時進行測試**，不必每天調整！之後對照組O.D值高於150或低於130都不必再調整，但對照組O.D值最低不能低於90。

Step 3 : 呈色劑配製



+

50 ml 蒸餾水

充分搖勻
→
確定完全溶解



分裝冷凍保存

- 準備15ml塑膠離心管
- 農試所規定用橘蓋
- 1.5 ml/管
- 分裝33管
- 保存於0°C以下
- 可保存180天

注意事項

1. 只能用蒸餾水或純水。
2. 較難溶解，須充分搖勻。
3. 呈現淡黃色澄清液體。

Step 4 : 基質配製



充分混勻
→
確定完全溶解



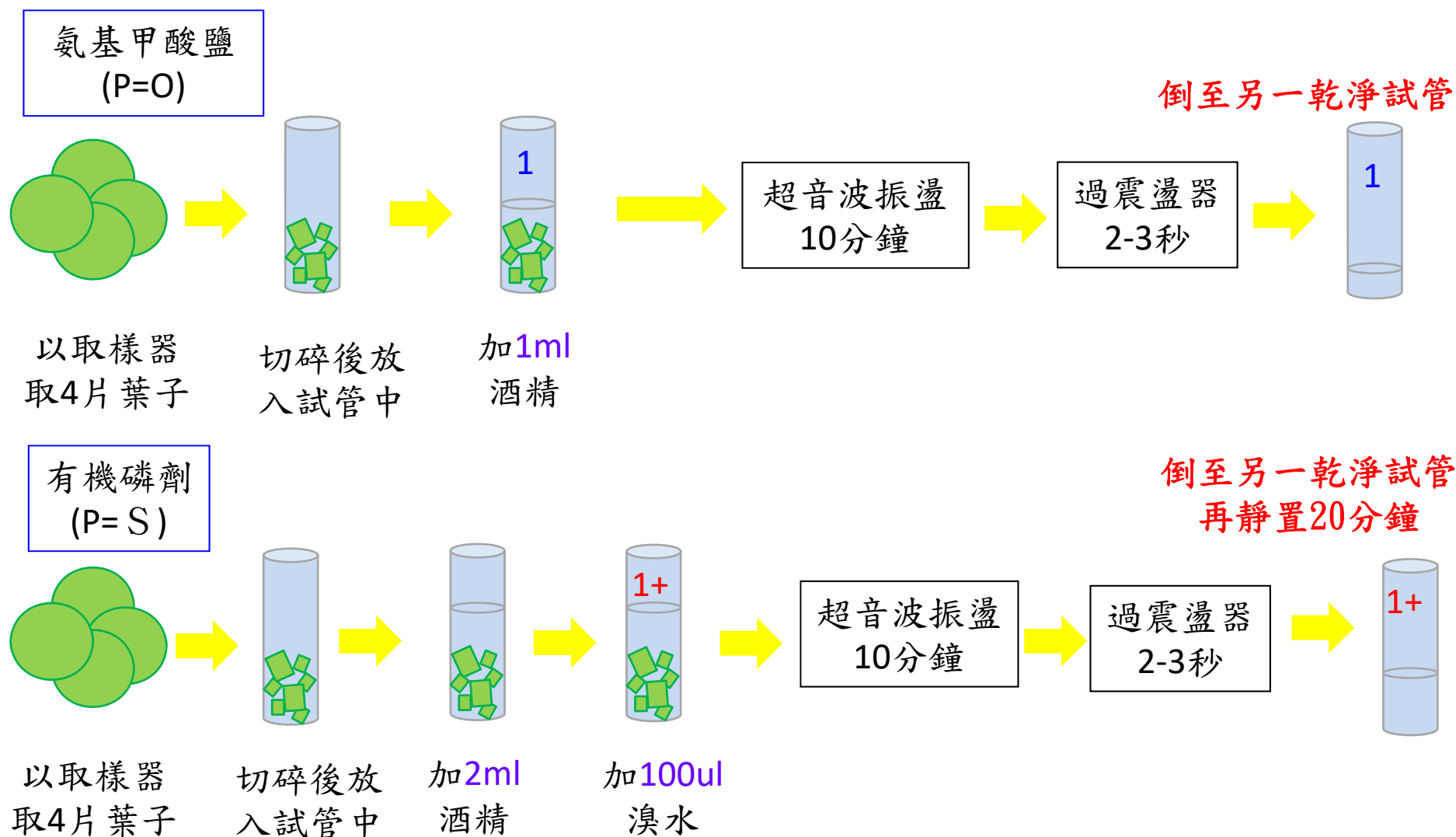
分裝冷凍保存

- 準備15ml塑膠離心管
- 農試所規定用 **藍蓋**
- **13.5 ml**/管
- 分裝**33**管
- 保存於**0°C**以下
- 可保存**180**天

注意事項

1. 使用 **緩衝液** 配製。
2. 呈現 **透明澄清** 液體。

樣品萃取流程



1、4重複樣品:

將20ul樣品萃取液放入最底下(每個樣品放4支)+980ul緩衝液(pH8.0)放入8連排小試管(圖1+2)。

2、2重複樣品:

將20ul樣品萃取液放入最底下(每個樣品放2支)+980ul緩衝液(pH8.0)放入8連排小試管(圖1+3)。

3、1重複樣品:

將20ul樣品萃取液放入最底下(每個樣品放1支)+980ul緩衝液(pH8.0)放入8連排小試管(圖1+4)。

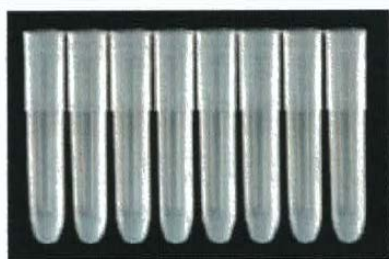


圖1、8連排小管

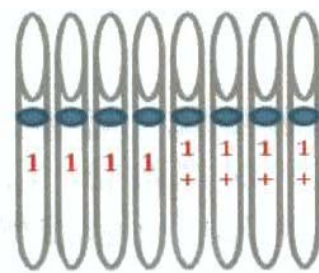


圖2、4重複編號

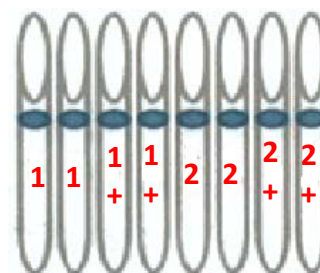


圖3、2重複編號

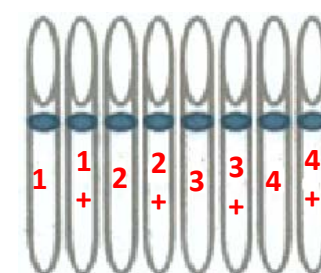


圖4、1重複編號

準備下列物品：

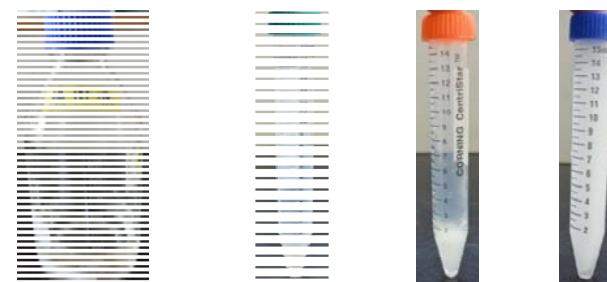
96孔檢驗盤1個



藥品槽3個



回復至常溫的藥劑



緩衝液 酵素 呈色劑 基質

個別標示

緩衝液

酵素液

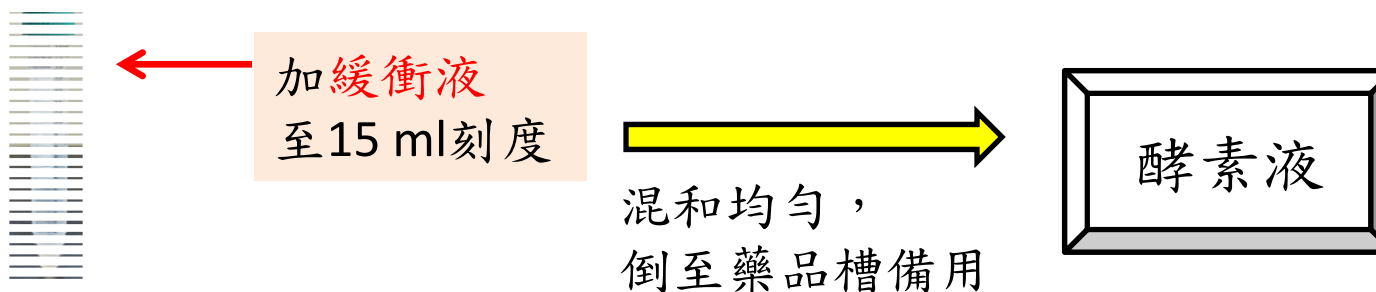
呈+基

酵素活性測試

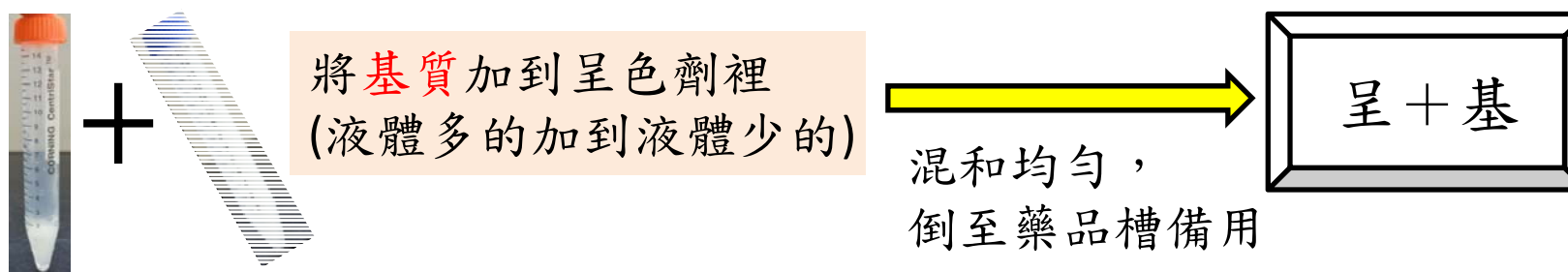


藥劑配製：

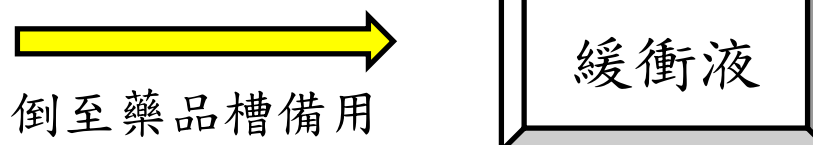
(1) 酵素：0.3 ml 酵素 + 14.7 ml 緩衝液 (總共 15ml) (需保留此綠蓋，作活性調整)



(2) 呈基混和液：1.5 ml 呈色劑 + 13.5 ml 基質 (總共 15ml)



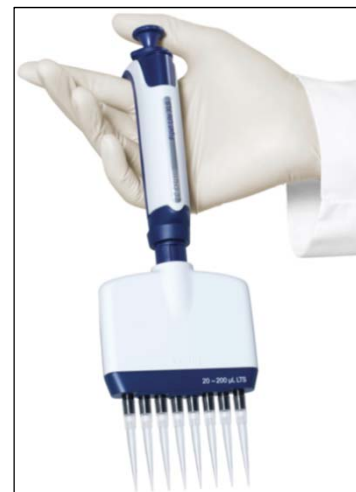
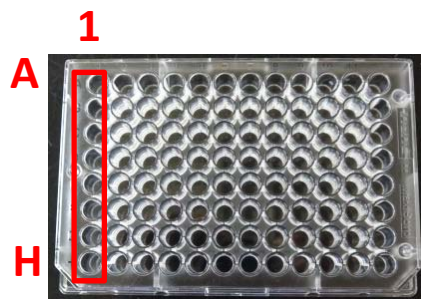
(3) 緩衝液：15 ml



檢驗步驟-酵素活性



1. 開啟儀器電源，進入程式Skanlt for Multiskan FC 3.1 / 按Login進行登入。
2. 點選Home / Open / 酵素活性程式。
3. 按STAR改檔案名稱(如當天日期：20170613郝安心)。
4. 準備1個96孔檢驗盤，將八爪自動吸管調至50 μ l，先取50 μ l緩衝液，再加50 μ l酵素液，最後加入50 μ l呈+基，於96孔檢驗盤A1-H1同一排，不須計時，直接將檢驗盤放入儀器中按OK，儀器開始檢測。



5. 點選Reports/酵素活性結果，看酵素活性測試結果，酵素活性範圍(平均OD變化值：130-150，大於150加緩衝液稀釋，小於130加酵素粉提高活性。

調整酵素活性之公式

1. 酵素活性範圍：O.D.值130-150。

當酵素活性低於130時，靠經驗添加**酵素粉**提高活性。

當酵素活性高於150時，可用下列公式計算加入**緩衝液**稀釋，

緩衝液添加量=(實測酵素O.D.值-140)÷140 x 酵素液總體積

2. 範例：酵素活性實測平均O.D.值為300，總體積15ml時應添加多少緩衝液才能將酵素活性降低至酵素活性範圍內？以酵素活性範圍之中間值140為計算基準。計算如下：

(1) 第一次活性測試： **$(300-140) \div 140 \times 15\text{ml}$** 酵素液=17ml緩衝液。

將17ml緩衝液加入15ml酵素液中混合均勻後再複測活性，求得酵素活性O.D.值為160，高於標準值，須再加入緩衝液稀釋。

(2) 第二次活性測試： **$(160-140) \div 140 \times (15\text{ml}+17\text{ml})$** 酵素液=4.5ml緩衝液。

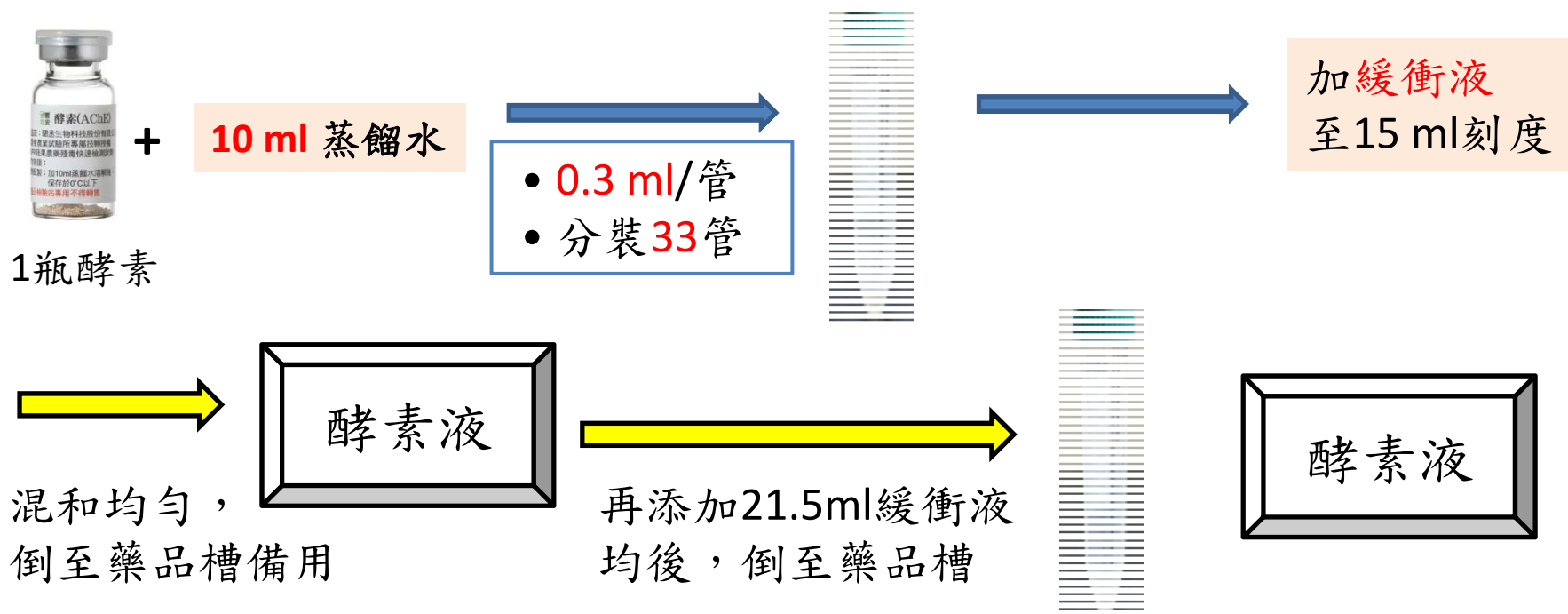
再將4.5ml緩衝液加入32ml酵素液中混合均勻再複驗活性，以此類推反覆測試至確定酵素活性落入標準範圍內。

調整酵素活性之公式

3. 酵素活性只有在第一次開瓶時進行測試，不必每天調整！

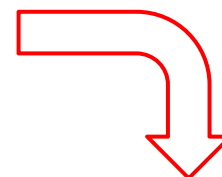
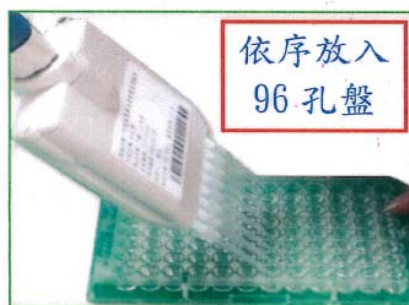
承上例，需再添加**21.5ml**緩衝液(手寫記住此添加量)，
後續檢測，請將**剩餘32管綠蓋離心管**(酵素液)，

每次檢驗時，打開其中一管，**直接灌緩衝液到15ml後**，倒入藥品槽，
再以綠蓋離心管計量，**添加21.5ml緩衝液**至藥品槽。

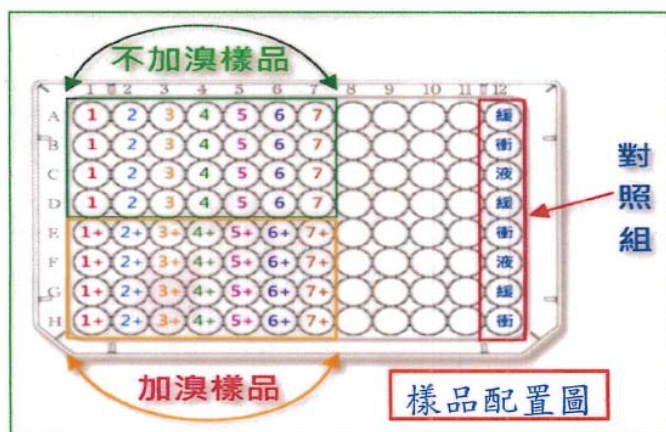


樣品檢測步驟 *以4重複為例

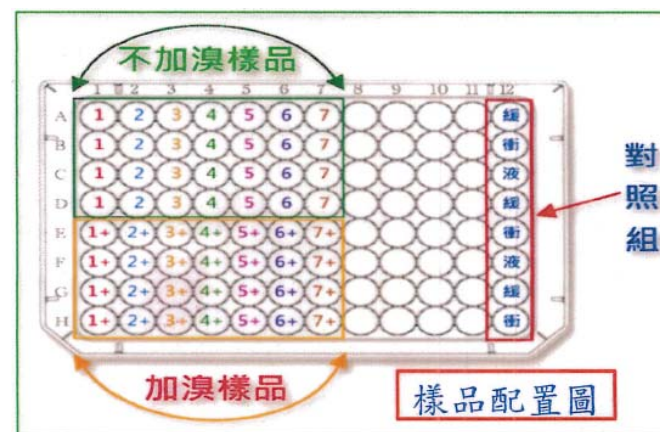
1. 準備2個96孔檢測盤，同步放入「樣品組」及「對照組」備用
 - (1) 樣品組(A1-H11): 50μl樣品稀釋液分別放入2個檢驗盤中
 - (2) 對照組(A12-H12): 50μl緩衝液(pH8.0)分別放入2個檢驗盤之最後一排



第一盤



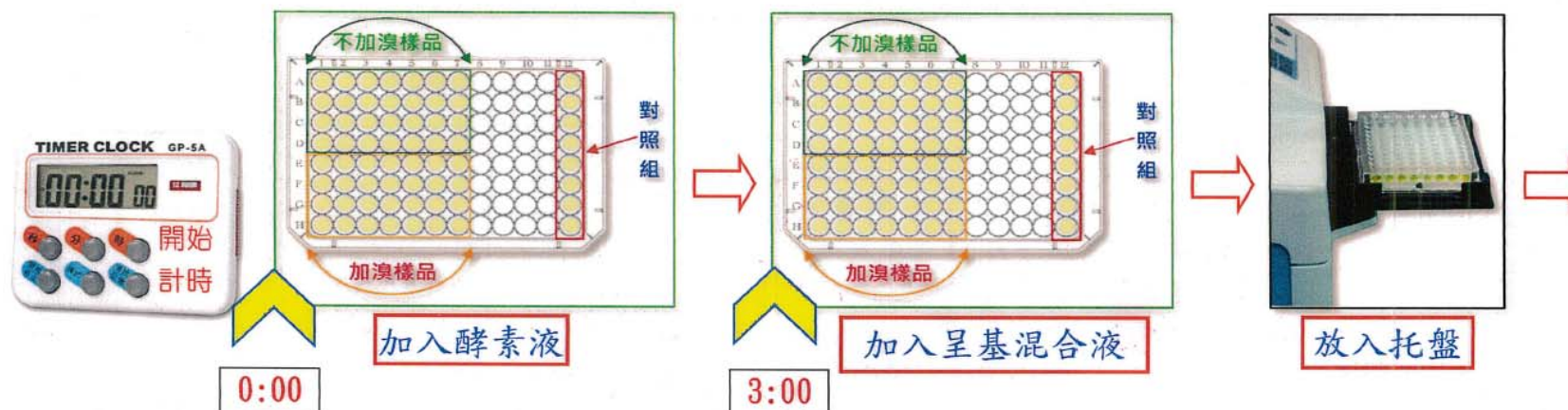
第二盤



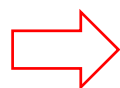
樣品檢測步驟

2. 開啟儀器電源，進入程式Skanlt for Multiskan FC 3.1/按Login進行登入
3. 點選Home/ Open/ 殺蟲劑*1、2或4重複(依當日檢驗件數進行選擇)
4. 點選Protocol/ Filter/ Pos.1-Abs405-405nm(確認波長在405nm)
5. 按▶Start 修改檔名，例如20150427郝安心(切記!先不要按OK，待放入檢驗盤後再按，不然儀器會空跑)
6. 輪流上機:
 - (1) 取第一盤，按下計時器開始計時(0秒)，加入50μl酵素液(含樣品組及對照組，於3分鐘內完成該動作)。3分鐘整加入50μl呈+基混合液(含樣品組及對照組)，完成後立刻將檢驗盤放入儀器，按OK，震盪10秒後儀器開始檢測(讀2分鐘)。
 - (2) 接著取第二盤，開始計時(0秒)，加入50μl酵素液，3分鐘整加入50μl呈+基混合液，完成後立刻將檢驗盤放入儀器，按OK，儀器開始檢測(讀2分鐘)。
7. 查看檢驗結果：點選Reports/樣品測試結果，凡抑制率超過35%之樣品依規定處置。

樣品檢測步驟



按OK



儀器震盪10秒後
開始檢測 (讀2分鐘)

接著取第二盤
重複上述步驟

報表整理



- 1.清除空白位置：進入Layout/Plate1(第一盤)將非樣品區框起來，按
✖ Delete刪除，Plate2(第二盤)亦比照處理。
- 2.建立樣品名稱：進入Layout/Plate1(第一盤)將樣品位置全部框起來，
按右鍵選Edit samples逐一修改樣品名稱，Plate2(第二盤)則會同步修改。
- 3.儲存及列印報告：
 - (1)進入Home按Save。
 - (2)將原始資料轉成PDF檔，進入Reports/Print/選擇PDF印表機，
檢查資料原始OD值、平均OD值及樣品結果是否正確，按列印，
選擇檔案存放位置及輸入檔案名稱，存檔。
- 4.報表回傳：可將原始資料檔案轉成PDF檔後，以mail方式寄回。

樣品複驗



1.複驗對象：

(1)樣品抑制率大於35%，(2)抑制率小於-10%，(3)當日樣品出現超過一半數結果，比如40個抑制率內超過20個抑制率均為負數，以上皆須進行複驗。

2.進入程式Skant for Multiskan FC 3.0/Home/ Open/ 殺蟲劑*1、2或4複驗。

3.點選Protocol/ Filter/ Pos.1-Abs405-405nm(確認波長在405nm)按 Start 修改檔名，例如20150427郝安心複驗。

4.照樣品檢測步驟6.進行複驗。

5.測試完畢，依報告整理方式印出複驗結果。

取樣器具清洗方式



*用具：塑膠管、玻璃試管、取樣鋼管、鑷子、砧板、八連排

清洗方式：

使用刷子+清潔劑泡泡水+刷洗後再用清水沖洗乾淨
倒置晾乾



96孔盤清洗方式



96孔盤清洗

手拿兩側，避免刮傷



清水沖洗3-5次甩乾



蒸餾水沖洗2次甩乾



酒精沖洗2次甩乾



倒蓋晾乾



酒精潤洗

