



Odyssey CLx 近红外双色荧光成像系统



Odyssey CLx Image Studio 3.1

操作指南



基因有限公司

2013年9月

目录





序言

亲爱的用户，您好：

非常感谢您选购我公司的 LICOR Odyssey 双色红外激光成像系统，我们将竭诚为您提供优质的售后服务。为了您能更好地了解、使用仪器及相应软件，我们特编辑此 Odyssey 用户手册，本手册包括：odyssey 快速操作指南，软件操作指南，western blot protocol，odyssey 抗体选购指南，odyssey 检测 western blot 实验小贴士等内容。

本手册同时也提供了安装工程师，应用工程师及仪器和试剂销售员的联系方式，您在仪器使用过程中及抗体选择方面有任何问题、疑问，请您及时和我们联系，一个及时的通知能节约您的时间，也能帮助我们更好地了解仪器和软件。联系我们时请您提供：仪器型号、软件名称，版本、错误代码、实验目的、操作系统、维修历史等相关资料。

联系方式：

电话：025-83248692/83248693

传真：025-86639365

基因有限公司

Tel: 025-83248692/83248693

Fax: 025-86639365



编者言：

本手册系原版英文说明书编译而来，希望它能为您操作该软件时带来帮助。由于译者的水平限制，手册中可能存在错误和遗漏，如与英文说明书发生冲突，请以英文原版说明书为准。本手册只作为您操作的参考依据，不能作为其他评定标准。

联系方式

购买机型：

购买时间：

联系方式

安装工程师：

仪器销售人员：

试剂销售人员：



目录

Odyssey CLx Image Studio 快速操作指南.....	1
打开 Image Studio 软件.....	1
如何创建一个新的工作区域:	1
将膜放在 Odyssey CLx 仪器的成像面板上.....	1
打开 Acquire 图标.....	1
导出采集好的图片.....	2
导出一张用于打印的图片.....	错误! 未定义书签。
导出一张用于打印的图片.....	2
Odyssey CLx Image Studio 3.1	3
第一章: 入门指南.....	4
软件安装.....	4
Windows 7, XP , vista 系统.....	4
仪器操作.....	4
打开 Image Studio 软件	5
第二章: 图像采集.....	6
图像采集.....	6
点击 Acquire 图标.....	6
查看图像和数据.....	7
第三章 图像文件.....	8
图像导入.....	8
图像、数据导出.....	8
第四章 图像显示.....	10
图像查看.....	10
Display 图像显示	10
图像外观调整.....	11
第五章 定量分析.....	15
手动添加和设定框选图像.....	15
自动调整.....	16
背景扣除.....	16
显示.....	16
浓度.....	17
图像注释.....	17
第六章 Western & MPX™ Western 定量分析	18
Western 定量分析.....	18
导入图片.....	18
泳道设置.....	19
设定 Marker.....	20
创建新 marker	20
自动识别条带.....	21
手动编辑条带.....	21
单通道信号归一化.....	21
查看表格.....	22



MPX™ Western 定量分析	22
第七章 孔板&网格定量分析.....	24
孔板分析.....	24
设定模板.....	24
孔板分析背景扣除.....	25
第八章 In-Cell Western™定量分析.....	26
In-Cell Western 分析	26
定义孔类型.....	27
定义关联孔.....	28
ICW 表格.....	29
网格表.....	29
第九章 小动物图像分析.....	30
导入小动物图像软件分析模块.....	30
应用自动框选工具.....	32
使用修建工具.....	32
第十章 表格.....	34
Images Table 图像表格	34
增加/移除 image 信息栏显示信息.....	34
编辑图像显示栏.....	35
数据导出.....	36
第十一章 图像打印&生成报告.....	37
图像打印.....	37
图像保存为 PDF 文件	37
打印报告.....	38
保存 PDF 格式报告	39
Western Blot Protocol	40
(中文版)	40
I. 需要的试剂.....	41
II. Western 检测方法.....	42
III. 双色检测指南.....	44
IV. 膜的 Stripping.....	45
V. Western 检测优化.....	45
VI. 常用提示.....	46
VII. 考马斯亮蓝染色蛋白凝胶检测.....	47
VIII. 常见问题.....	48
In-Gel Western Protocol.....	52
(中文版)	52
I. 所需试剂.....	53
II. 描述.....	53
III. 双色 In-Gel Western 蛋白检测指南	54
IV. 电泳.....	54
VII. Stripping 和 Reprobing	56
VIII. 常见问题.....	56
In-Cell Western Protocol.....	59



EGF 对 A431 细胞刺激效应的评	59
I. 需要的试剂.....	60
II. 养细胞、刺激和检测 A431 细胞对 EGF 的反应.....	60
III. 实验注意事项.....	63
IV. 实验结果.....	64
Odyssey 抗体选购指南	71
Odyssey 检测 Western Blot 的实验小贴士	72

Odyssey CLx Image Studio 快速操作指南

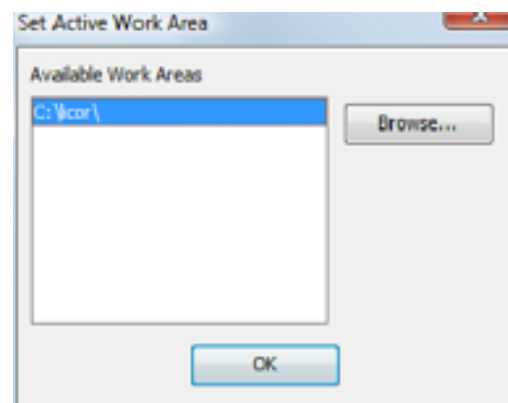
打开 Image Studio 软件



1. 双击打开 Image Studio 软件图标。
2. 选择工作区域或创建一个新的工作区域，点击 OK。工作区域即存放图像、分析和成像参数设置的文件夹。

如何创建一个新的工作区域：

1. 点击 Browse 打开文件选择窗口。
2. 选择或建立一个新的文件夹并命名。
3. 点击 Open，这个文件夹就成为有效的 work area。选中并点击 OK 进入软件界面。



将膜放在 Odyssey CLx 仪器的成像面板上

1. 打开 Odyssey 仪器盖子，用超纯水或甲醇浸湿的无尘纸清洁扫描面板。
2. 将膜正面朝下放置在扫描面板上，避免产生气泡，注意不要有太多的水。

打开 Acquire 图标

1. Status: 若仪器连接正常，在这一栏显示 Ready。
2. Setup: 选择 No Analysis; 若选择 Analysis, 则图像采集后软件会自动定义泳道和条带。
3. Channels: 选择 700 通道或 800 通道或 700、800。若选择 Auto (推荐), 会有更宽的动态范围; 反之, 则手动调整 intensity 的数值 (比如 actin 扫描 intensity 可设为

4. Scan Controls: Western 膜成像默认设置为 169 μm , Medium, 0.0mm。
5. Scan Area: 选择 Draw New, 划出膜面积大小的矩形框。
6. 点击 Start 开始扫描。



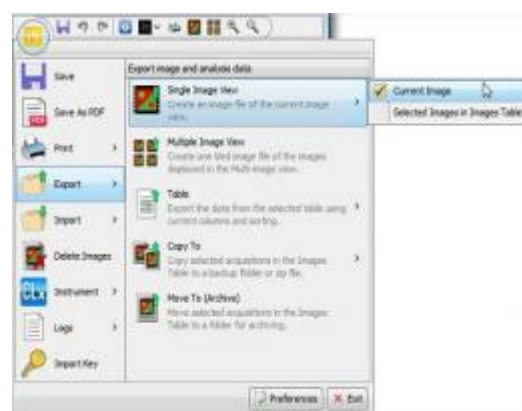
导出采集好的图片

1. 点击软件左上角的 IS 图标，下拉菜单里面 Export 选择 Copy To。点击 Backup Folder 或者 Zip File。
2. 选择要保存的路径，点击 Save 进行保存。



导出一张用于打印的图片

1. 图片可以导出为 TIFF, PNG, 或 JPEG 格式。
2. 点击软件左上角 IS 图标，下拉里面 Export 选择 Single Image View, 点击 Current Image。
3. 在对话框里面选择要保存图片的 size, resolution 和图像格式, 选择保存路径, 点击 Save。





Odyssey CLx Image Studio 3.1

软件操作指南



第一章：入门指南

软件安装

Windows 7, XP , vista 系统

将安装光盘插入驱动器

双击软件图标：Win_Image_Studio_Installer_3.x.x.exe.

单击 next，并按照安装向导完成安装

Macintosh®电脑

将安装光盘插入驱动器

双击软件图标：MacImageStudio-3.x.dmg

点击 Agree to accept the license agreement.

将 Image Studio icon 拖进 Applications folder 完成安装。



仪器操作

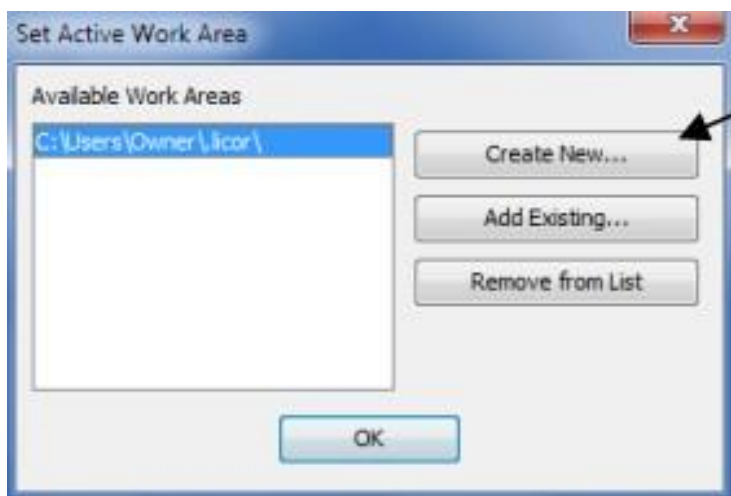
- 1、打开仪器前后两个开关，（注：后面开关打开后，无特殊情况时无需关闭。只需操作前面开关即可）。
- 2、打开 Odyssey 仪器盖子，用超纯水或甲醇浸湿的无尘纸清洁扫描面板。
- 3、将膜正面朝下放置在扫描面板上，避免产生气泡，注意不要有太多的水。

打开 Image Studio 软件

- 1、双击打开 Image Studio 软件图标。
- 2、选择或创建一个新的工作区域，点击 OK。工作区域即存放图像、分析和成像参数设置的文件夹

新建一个工作区域： 点击 Create New—新建一个文件夹---点击 Save—点击 OK

选择已有工作区域： 点击 Add Existing ---选择一个文件夹---点击 OK



第二章：图像采集

在图像采集开始之前，确认仪器开关已打开，确认仪软件与仪器已连接，扫描面板已清洁：

图像采集

点击 Acquire 图标

1、Status 状态：若仪器连接正常，在这一栏显示 Ready。



2. Setup 设置：

当扫描 western 膜时：

从第二个按钮下拉菜单中选择 No Analysis；若选择 Analysis，则图像采集后软件会自动定义泳道和条带。

当扫描参数有任何的修改时，点击 set up 第一个按钮 custom 下的 save current scan preset，保存现有的扫描条件。

3. Channels 通道：点击工具栏中的 Auto 按钮，仪器将根据图像信号情况自动调节扫描强度，以取得更宽的动态范围。如果没有点击 Auto，需要手动调节通道的扫描强度。

4. Scan Controls 扫描设置：设置分辨率和焦点

Western 膜成像默认设置为 resolution 169 μ m，扫描质量 Lowest ,focus0mm，

Western 孔板成像默认设置为 resolution 169 μ m，扫描质量 Lowest ,focus3.0mm，

详细说明：分辨率(Resolution)：有5种设置分别是21、42、84、169、337 μ m，典型设置为169，数字越小分辨率越高，但扫描时间也越长。

扫描质量(Quality)：决定膜上设定区域内有多少检测信号组成图像上的一个像



素，典型设置为Medium

焦距（Focus Offset）：膜membrane为0，孔板plate 为3.0，胶gel为胶厚度的1/2

5、扫描区域

用Scan Area栏中的按钮进行扫描区域的设置。首先从第一个按钮的下拉菜单中选择No Image，查看整个扫描面板区域。选择Draw New---在扫描网格中画适当大小的扫描面积。

6、scanner 扫描仪

所有参数设置好后，点击 start 开始，如果要终止点击 stop/cancel，结束/取消扫描。

也可以点击预览 Preview 按钮，以最快的时间、较低的分辨率得到图像结果，满足客户的预览的需求，然后再进行高质量的图片扫描。

查看图像和数据

图像扫描结束后，图像和数据也随之产生。图像显示在屏幕上，图像的数据则显示在下方的 Images Table 中，图像的名称也可以更改。

- 1) 双击下方的 Image Name
- 2) 输入新名称，结束后点击 enter
- 3) 如需调节图像的外观可参考第四章内容。

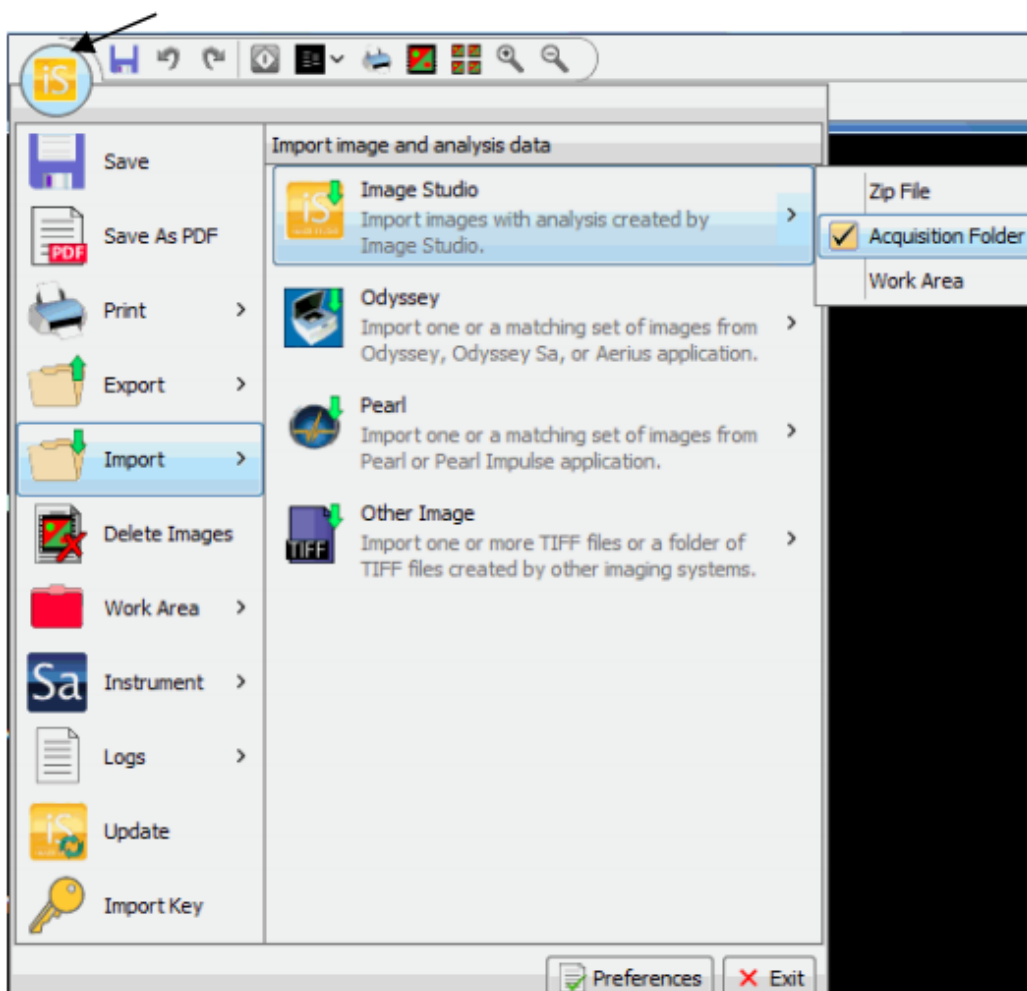
第三章 图像文件

图像导入

1、点击软件左上角的 IS 图标--- Import 选项---image studio---Acquisition Folder ---选择图片---点击打开---完成导入图片

注：如果是 odyssey 其他版本软件如（版本 1，2，3），导入图片时：

点击软件左上角的 IS 图标--- Import 选项---odyssey---选择图片---点击打开---完成导入图片



图像、数据导出

1、图片可以导出为不同分辨率的 TIFF，PNG，或 JPEG 格式

2、在 image 界面选择要导出的图片---点击软件左上角的 IS 图标---Export---

Singe Image View(导出单张图片)

Muliple Image View(导出多张图片)

Movie (导出 movie)/Copy Image(复制图片到文件夹)

Move Image(转移图片到文件夹)

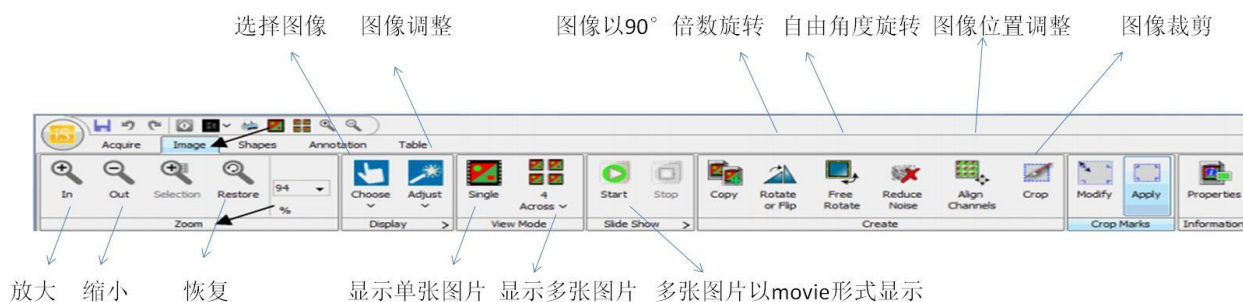
3、在对话框里面选择要保存图片的 size, resolution 和图像格式, 选择保存路径, 点击 Save



第四章 图像显示

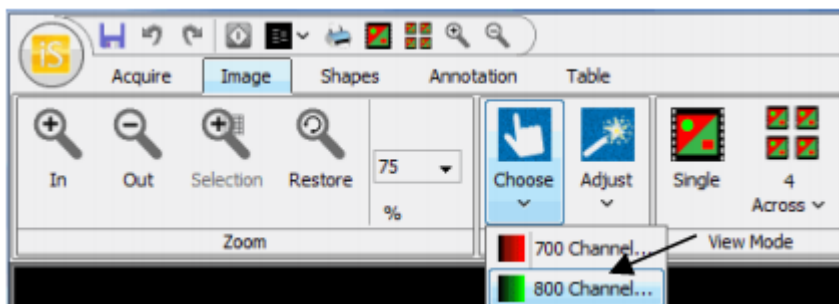
图像查看

点击进入 Image 界面，各个按钮功能介绍如下：

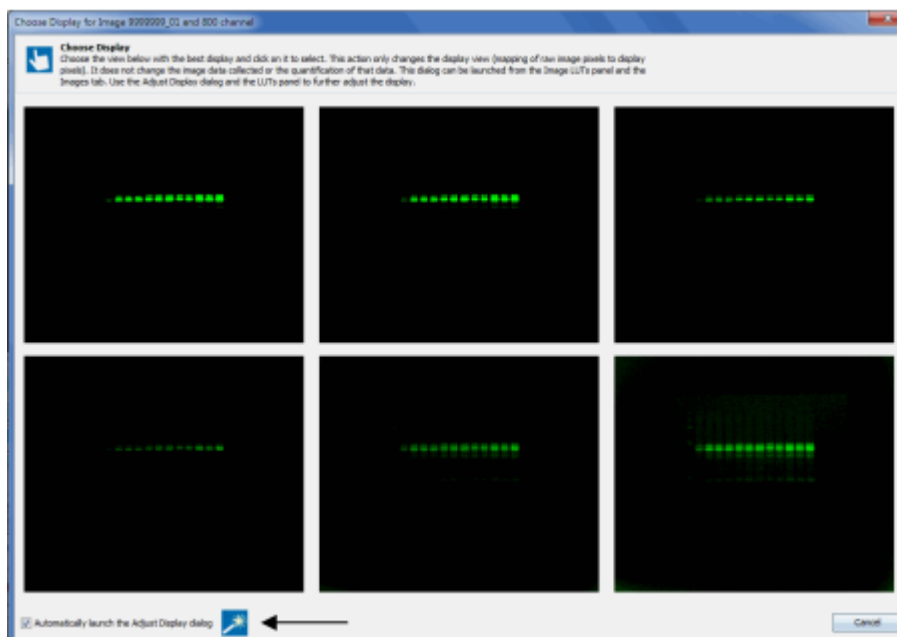


Display 图像显示

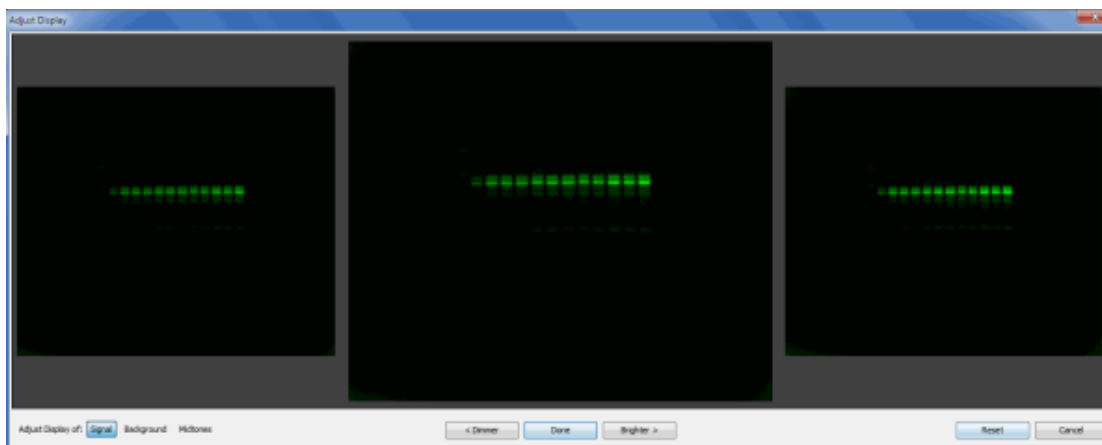
1、Choose 点击 Choose 选择要调整的通道 800/700nm



---选择一张效果最好的图像



---对选中的图像进行信号或者背景调节---点击 **Brighter** 逐渐增强/点击 **Dimmer** 逐渐减弱---调整结束点击 **Done**



2、Adjust: 也可点击 **Adjust** 对选中的图像进行信号或者背景调节---点击 **Brighter** 逐渐增强/点击 **Dimmer** 逐渐减弱---调整结束点击 **Done**

图像外观调整

通过屏幕右上方 LUTs 查看并且调整图像的外观

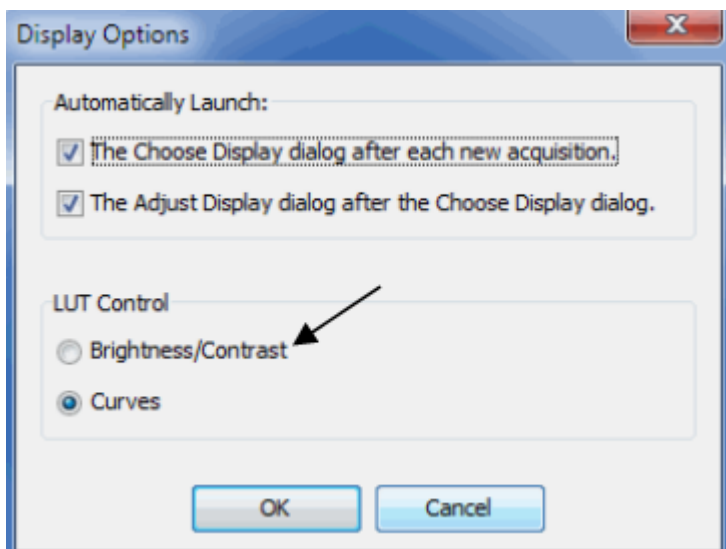
1、The Look Up Tables (LUTs)

点击屏幕右上方 LUTs 查看每个通道图像的像素强度直方图，有如下两种显示方式曲线直方图和滑块图

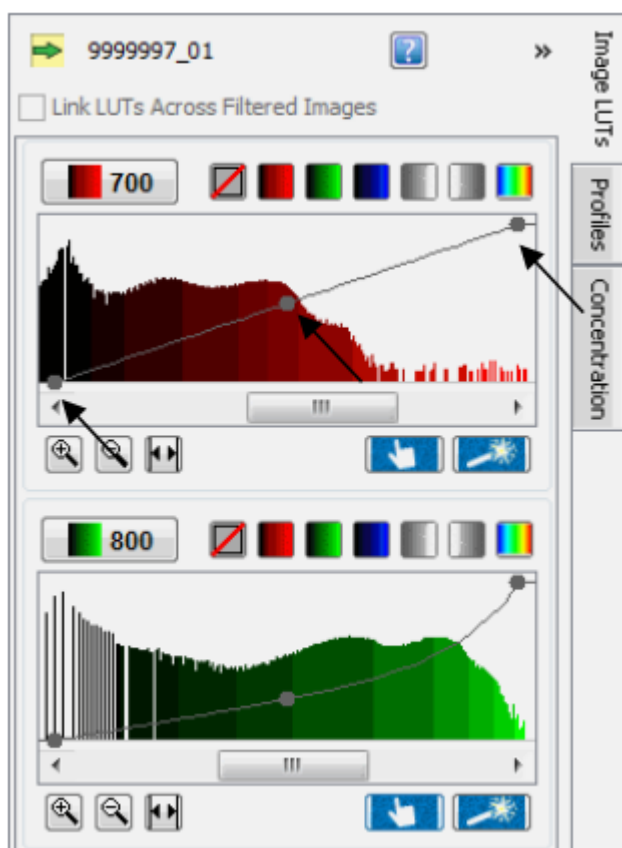


2、点击 **Display >** ---选择 **Brightness/Contrast** 和 **Curves** 其中一种方式---点击

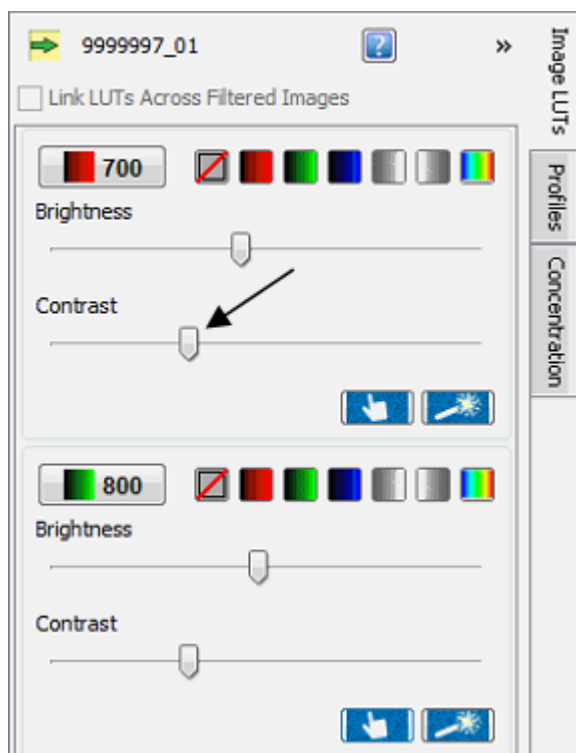
Ok



3、Curves: 通过拖动曲线对图像进行调整



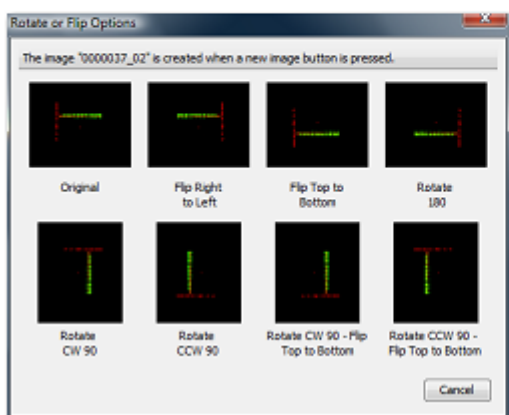
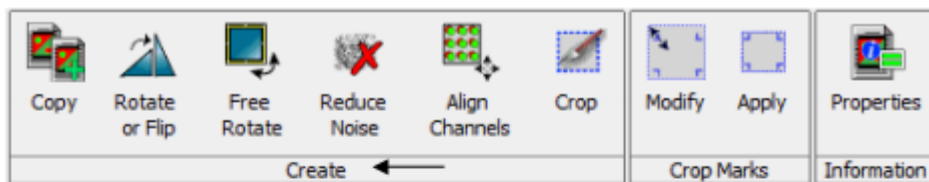
Brightness/Contrast 拖动滑块进行调整



Creat

原始图像不动，通过 Creat 来对原始图片进行复制/旋转/裁剪等操作来创建新图像

Rotate or Flip 对图像进行 90° 倍数旋转



Free Rotate 图像自由角度旋转



Reduce Noise

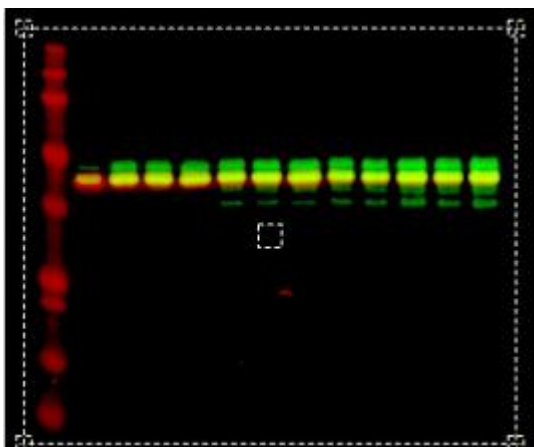
点击 Reduce Noise 打开降噪处理窗口，选择合适的选项。警告：进行降噪处理后会影响图像的数据集定量结果。

Align Channels

单击 Align Channels，以其中一个通道图像为参照，用箭头对另一通道图像进行上下左右位置的调整---点击 OK

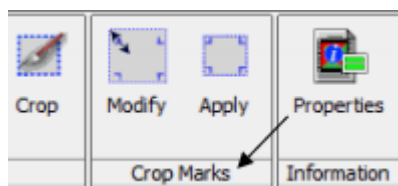
Crop the Image 裁剪图像

点击 Crop---调整裁剪区域---点击 OK



Crop Marks 裁剪标记

通过调节裁剪标记来定义打印或导出图像的大小



单击 Apply---单击 Modify---拖动中间小框来设定裁剪图像位置---拉动大框角落设定裁剪图像大小---点击 OK 确定。

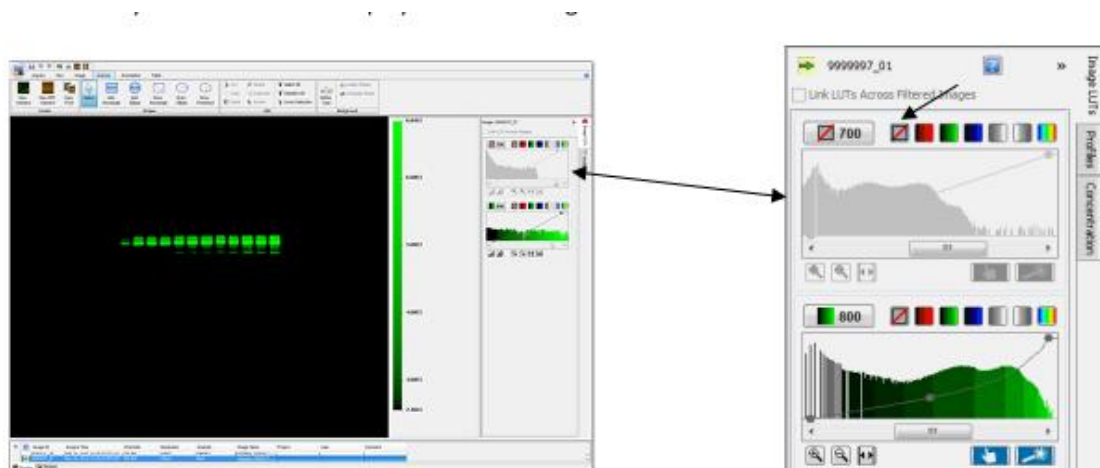
第五章 定量分析

手动添加和设定框选图像

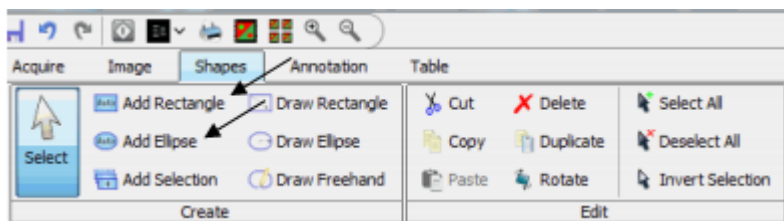
1、点击 shapes—Analysis type 下拉菜单中选择 Manual.



2、首先点击屏幕右上方的 LUTs 的 800 按钮，选择单通道进行定量分析



3、点击 Auto Add Rectangle 或者 Auto Add Ellipse---鼠标置于条带或细胞中央---单击鼠标（出现虚线框）---通过拖动虚线框来确定框选条带/细胞位置或者点击 Adjust （自动调整位置）---进行定量分析



4、点击 Draw Rectangle/Draw Ellipse---手动绘制图形

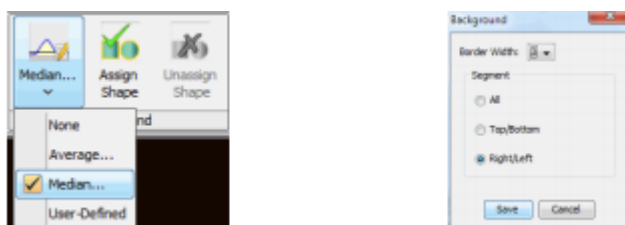
5、点击 Select All---Duplicate---通过屏幕右上方的 LUTs 选择 700 通道,将 800 通道所有框选形状复制到 700 通道进行定量分析

自动调整

- 1) 手动绘制图形后, 点击选中图形
- 2) 点击 Auto Adjust 后, 软件自动将图形移动到最合适的位置

背景扣除

点击 Background 组---单击第一个按钮下拉菜单 Median---Border Width 设定为 3---segments 选择 Right/Left---点击 Save 保存



设置客户自定义背景

- 1) 点击 Background 组---单击第一个按钮下拉菜单 User-Defined
- 2) 在您认为可以设为背景的位置添加框选图形
- 3) 选中框选图形
- 4) 点击 Background 组 Assign Shape

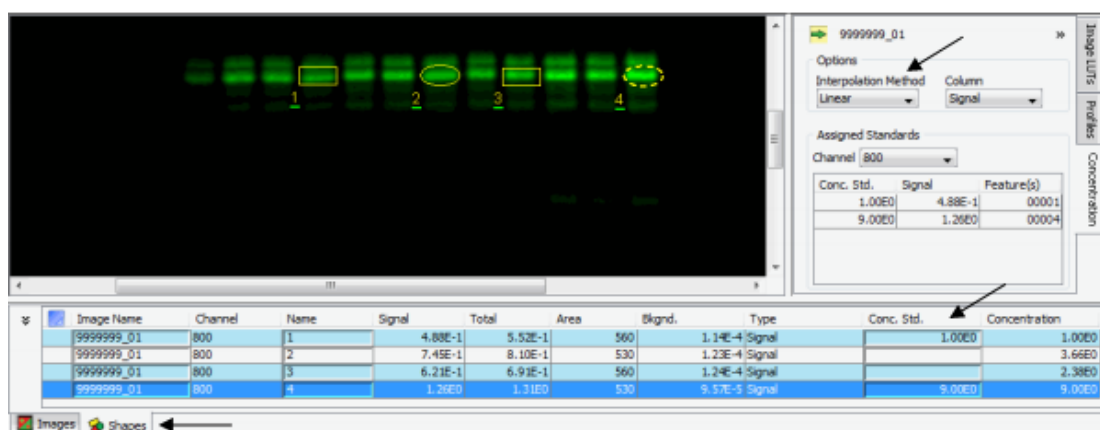
显示

点击 show---勾选软件界面要显示的内容

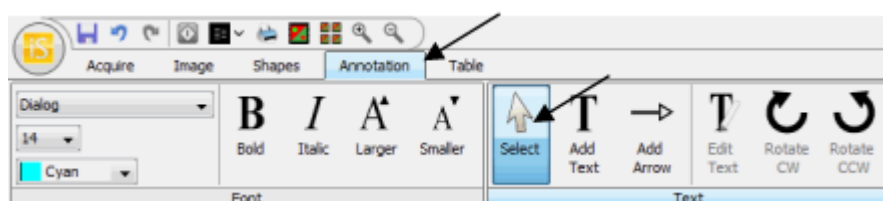
浓度

Image studio 软件仅需两个标准品就可以对样品定量, 两个以上标准品可使得分析更加准确。

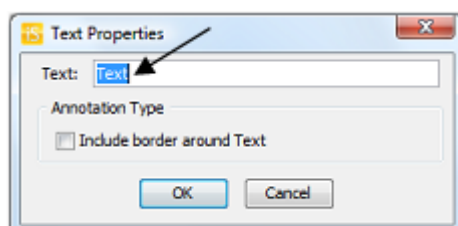
点击界面下方的 shapes 表格---分别双击 shape1 和 shape4 并输入浓度值为 1 和 4---点击 LUTs Concentration---选择 Interpolation Method 为 Linear---即可给出其他框选的条带/细胞浓度值。



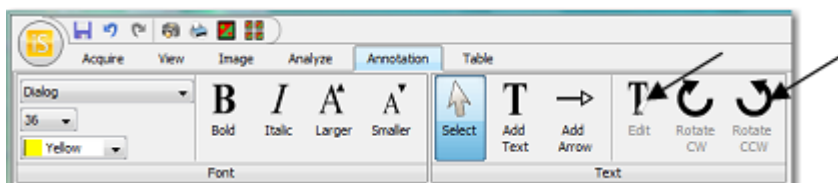
图像注释



点击 Annotation---点击 Add Text---键入注释文字---点击 OK 确定。



点击 Add Arrow ---绘制箭头--- 点击 Rotate CW / Rotate CCW 旋转箭头



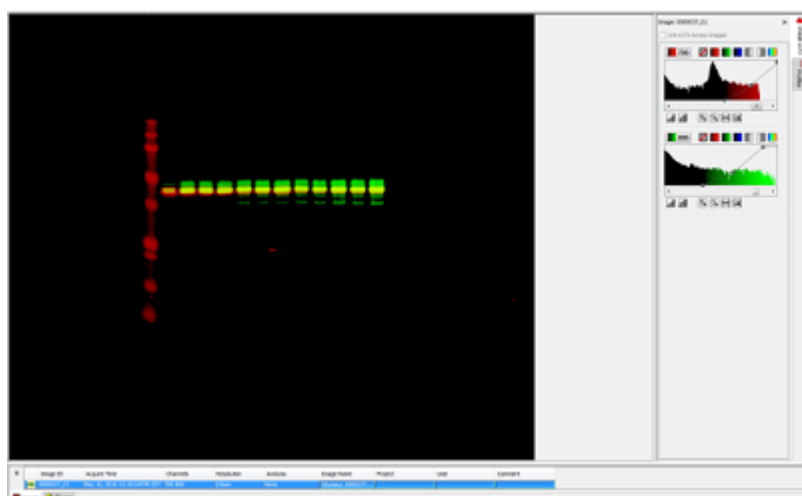
第六章 Western & MPX™ Western 定量分析

Western & MPX™ Western 分析用于对 western 条带和泳道进行快速的定量分析

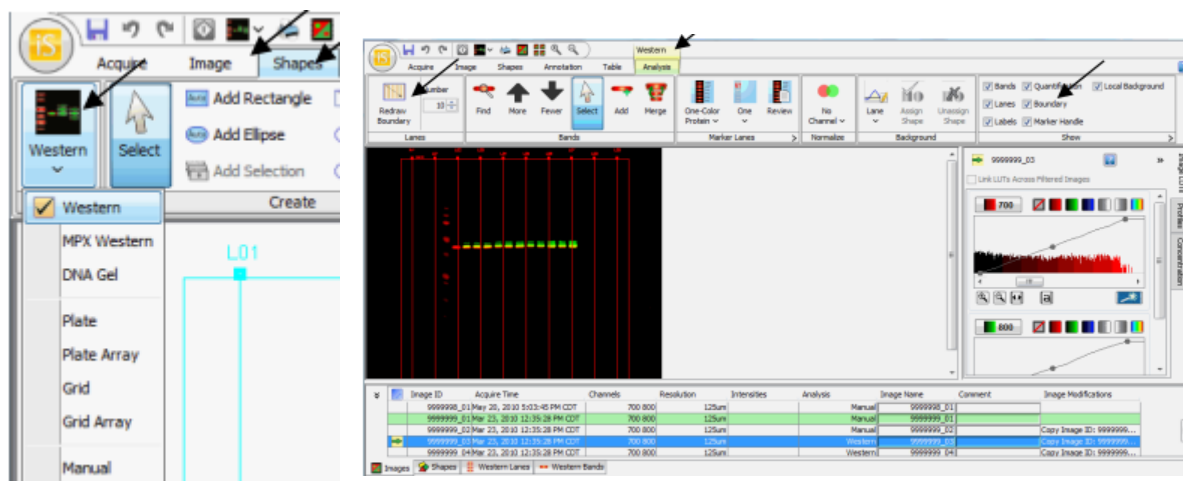
Western 定量分析

导入图片

Image Studio software CD 导入图片：点击 IS 图标下拉菜单中 Import---点击 Copy From---选择 Image Examples 中 ‘‘9999999_01’文件夹---点击 Open

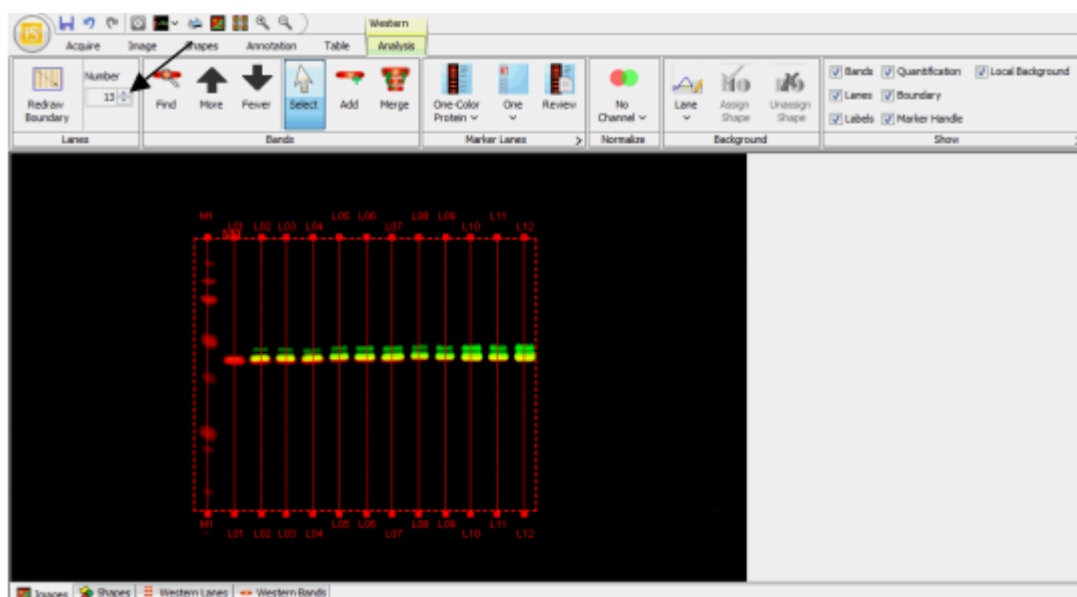


点击 Shapes---快速启动栏中选择 Western

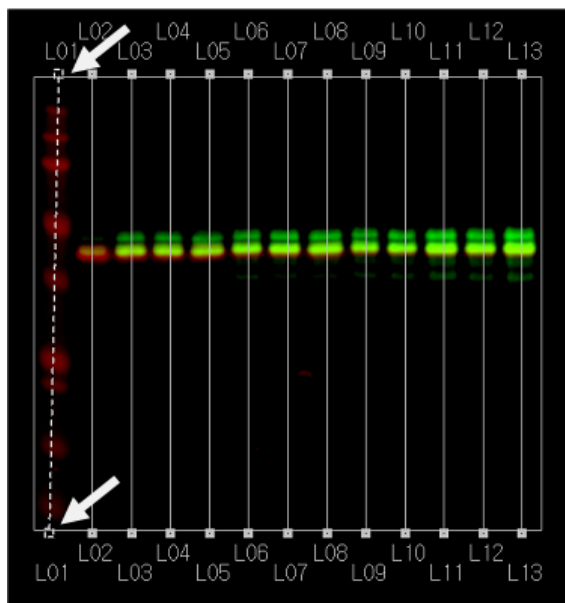


泳道设置

- 1、点击 lanes
- 2、点击 Redraw Boundary 可显示/禁用泳道边框
- 3、点击 Number 上下箭头，使泳道边框数与泳道数相匹配



- 4、如果要进一步调整泳道边框，单击边框成虚线，按住键盘上 shift 键，拖动虚线顶底部使其置于泳道中央即可

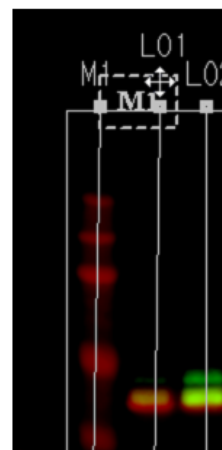


5、设置泳道 marker 时，点击屏幕其他位置使虚线变为实线

设定 Marker

每个 Marker 泳道都会被标记为 M 1、M 2、M 3，如果只有一个 marker 泳道，它可以在任何位置；如果有两个 marker 泳道，位置一般在两侧。

- 1、单击 Marker Lanes 组第一按钮并选择 One-Color Protein
- 2、单击 Marker Lanes 组第二按钮并选择 One
- 3、单击 Marker 泳道框使其变成虚线
- 4、拖动四光标置于 Marker 泳道框线上，
选定的泳道即为 Marker 泳道
- 5、单击 Review---单击 OK 确定



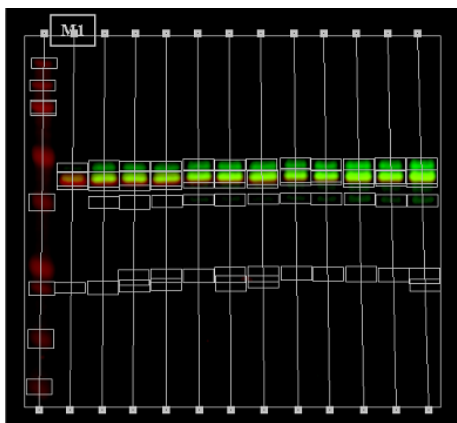
创建新 marker

- 1、单击 Marker Lanes 箭头
- 2、单击 New---键入新 marker 名称---单击 OK
- 3、单击 Add---键入分子量---点击 OK
- 4、重复第 3 步，这一系列的分子量将按从高到低顺序排序
- 5、点击 OK

注：新创建的 Marker 将出现在 Marker 下拉菜单中供选用

自动识别条带

点击 Bands 组 Find --- 点击 Fewer, 灵敏度降低, 识别条带减少; 点击 More 识别条带增多



手动编辑条带

- 1 手动编辑条带时, 只能在单通道下进行
- 2、手动增加选框: 单击 Bands 组 Add---选择要进行定量的条带
- 3、手动删除选框: 单击条带时框选线变成虚线---点击键盘上的 delete 键即可删除
- 4、手动移动选框: 单击条带时框选线变成虚线---将选框移动至其他条带
- 5、手动调节选框大小: 单击条带时框选线变成虚线---拖动左右/上下光标调节其大小
- 6、条带合并: 选中将要合并的两个或者两个条带 (框选线变成虚线) ---点击 Merge---条带即进行了合并

单通道信号归一化

- 1、应用 western 进行定量并进行信号归一化时, 泳道首先要并且只能定义一条条带为 marker (标准条带)
- 2、选择 Lane
- 3、点击 Normalize 并且选择 700 channel
- 4、从 Western Bands Table 查看 Normalized Signal 列, Marker 信号值显示为

‘NaN’，其他泳道中的条带将显示归一化后的值。

Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Conc. Std.	Concentration	Normalized Signal
9999999_01	700	M1	B07	8.67E-1	25.0	560		NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B08	1.36E0	20.0	616		NaN	NaN
9999999_01	700	L01	B01	1.95E1	59.6	748		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L02	B01	1.78E1	60.2	748		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L03	B01	1.65E1	60.2	816		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L04	B01	1.82E1	60.7	748		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L05	B01	1.07E1	61.2	748		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L06	B01	1.50E1	61.2	680		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L07	B01	1.46E1	61.8	680		NaN	1.95E1
9999999_01	700	L08	B01	7.32E0	62.4	680		NaN	1.95E1
9999999_01	800	L02	B01	4.32E-1	61.8	612		NaN	4.72E-1
9999999_01	800	L03	B01	4.79E-1	61.8	680		NaN	5.65E-1
9999999_01	800	L04	B01	5.06E-1	61.8	680		NaN	5.39E-1
9999999_01	800	L05	B01	5.17E-1	62.9	612		NaN	9.37E-1
9999999_01	800	L06	B01	6.82E-1	62.9	578		NaN	8.84E-1
9999999_01	800	L07	B01	7.40E-1	62.9	578		NaN	9.84E-1

查看表格

单击屏幕下方的 Western Lanes 和 Western Bands，可以查看有关泳道和条带的
数据信息。

MPX™ Western 定量分析

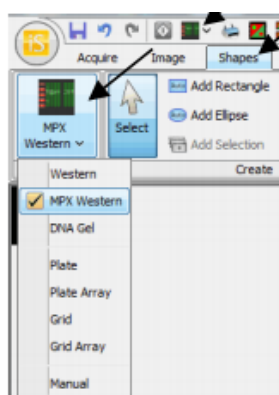
1、导入图片

Image Studio software CD 导入图片：点击 IS 图标下拉菜单中 Import---点击 Copy
From---选择 Image Examples 中 ‘9999998_01’ 文件夹---点击 Open

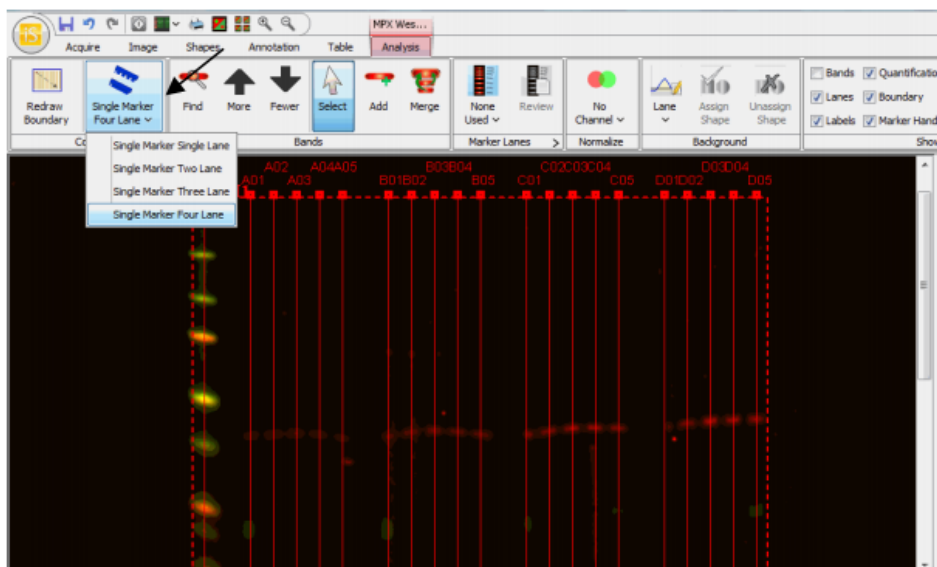
2、从屏幕右上方的 LUTs 调整图像外观

3、点击 Shapes

4、快速启动栏中选择 MPX Western



5、点击 Comb 组 Single Marker Four Lane



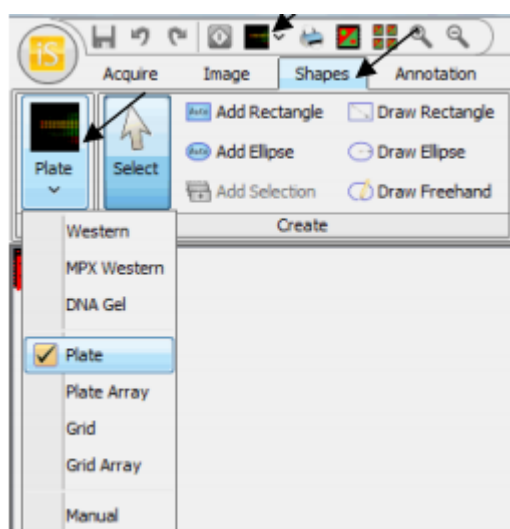
- 6、调整选框
 - 7、Marker Lanes 组---点击 Two-Color Protein
 - 8、点击 Find 自动识别条带
 - 9、点击---background subtraction 扣除背景
- 即完成了 MPX Western 的定量分析

第七章 孔板&网格定量分析

孔板&网格定量分析可快速方便地应用于一系列图形的定量分析。孔板/网格分析用于与微孔板/微孔板阵列相关的定量分析。

孔板分析

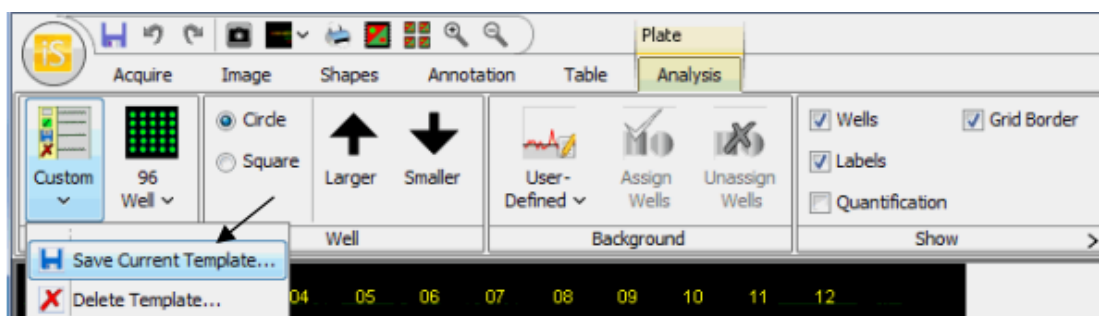
点击 shapes 按钮---快速启动按钮中选择 Plate---下拉菜单中选择 96 Well& Circle 形状---即可对孔板进行框选进而完成定量分析



设定模板

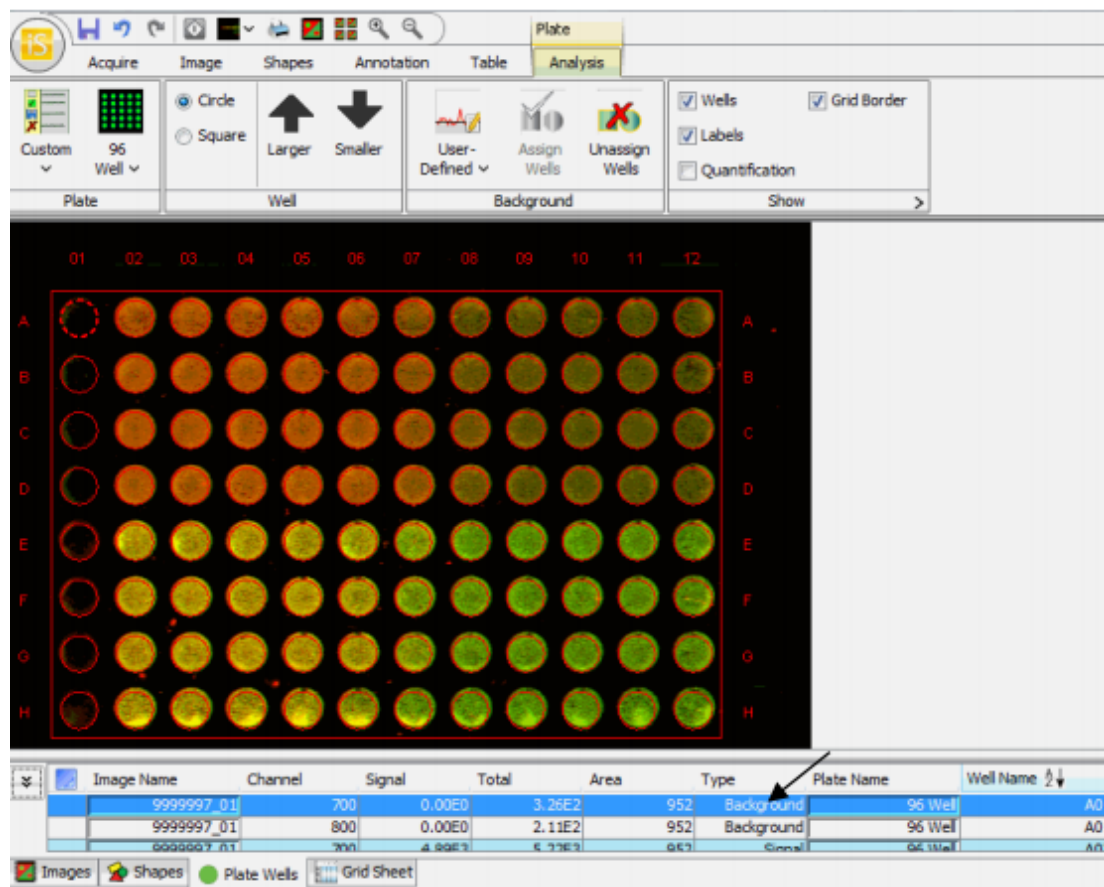
可把当前网格参数设置设定为模板用于后续分析。

从 Plate 组第一个按钮下拉菜单中选择 Save Current Template---键入模板名称---即完成了用于后续分析的模板的设置。



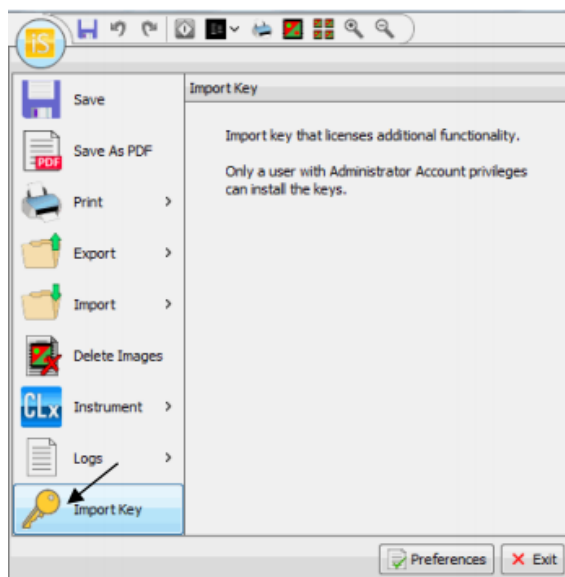
孔板分析背景扣除

Background 第一个按钮下拉菜单中选择 User-Defined---image 界面点击任意孔为背景孔---点击 Background 组 Assign Well---即完成了孔板背景扣除设置



第八章 In-Cell Western™定量分析

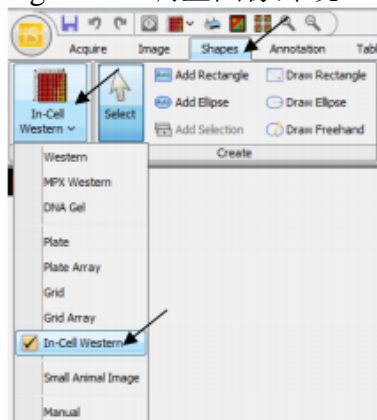
- 1) 如果您的电脑操作系统是 Windows®Vista 或者 Windows 7®系统，右击 Image Studio 软件图标，选择“Run as Administrator.”
- 2) 点击应用图标---点击 Import Key，如下图所示：



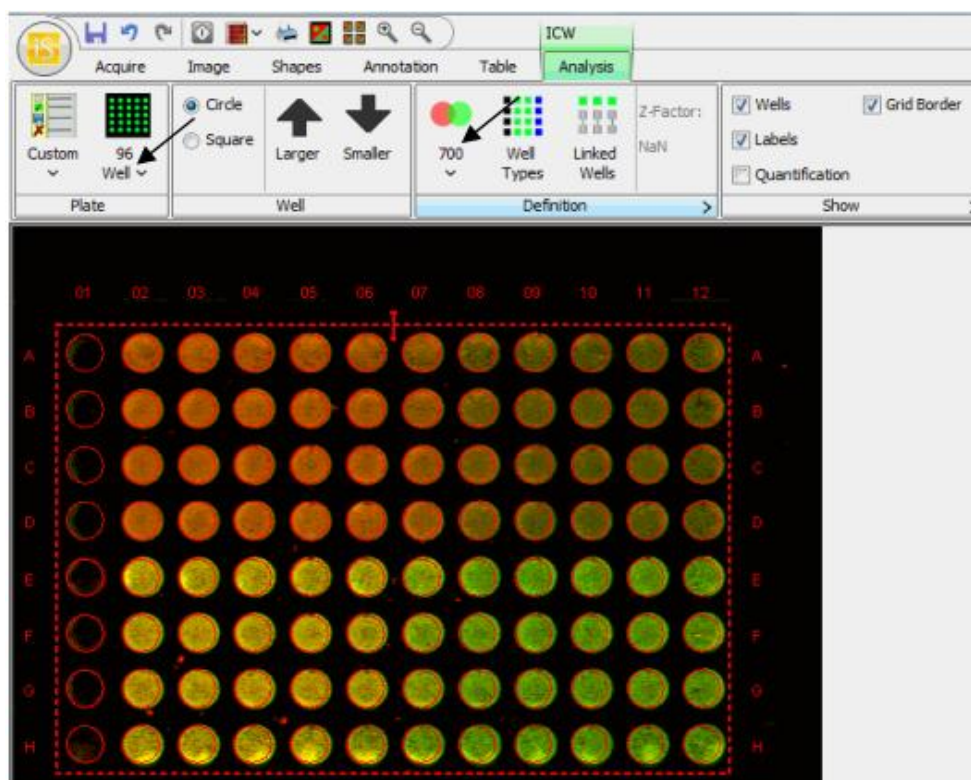
- 3) 打开 In-Cell Western key 文件，点击 Open。
- 4) 点击 OK,重新打开软件。

In-Cell Western 分析

- 1) 导入 CD 中的 Image Examples 文件夹中的 ‘9999997_01’
- 2) 点击窗口右侧的 Image LUTs 调整图像外观
- 3) 点击 Shapes



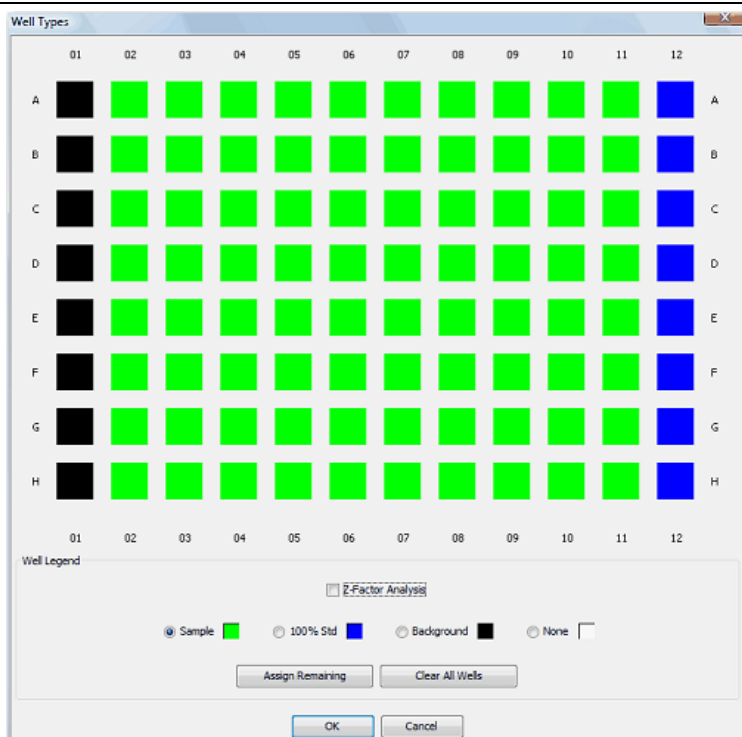
- 4) 点击 In-Cell Western 开始进行 n-Cell Western 分析
- 5) Plate---下拉菜单中选择 96 Well& Circle 形状---点击 well 中 Larger /Smaller 调整框选孔大小-
- 6) Definition 组第一按钮下拉菜单中选择 700 作为标准化通道



定义孔类型

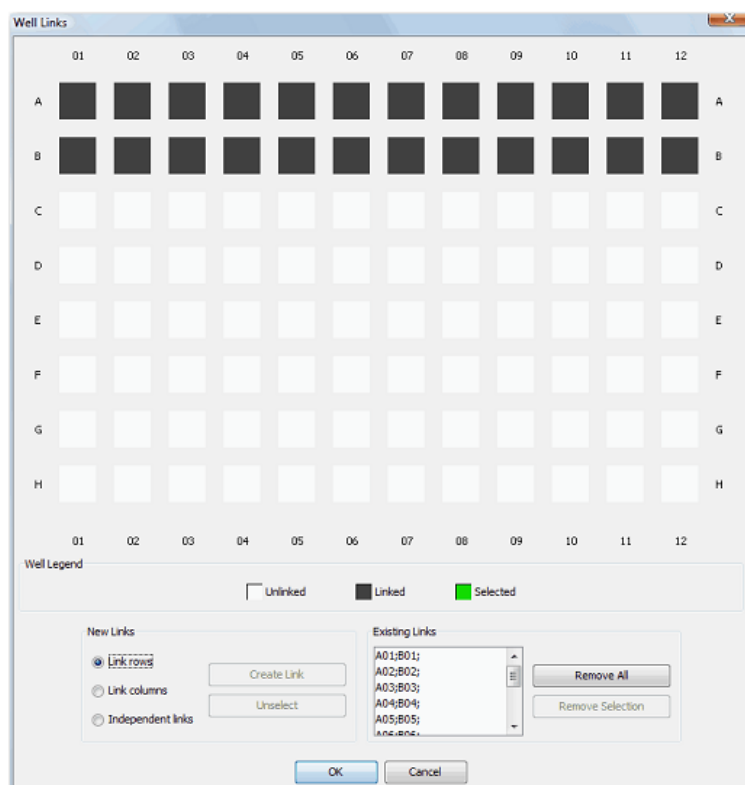
点击 Definition 组第二按钮 Well Types

- 1、定义背景孔:选择 well type 对话框下 Background---选择第一列为背景孔列
- 2、100%标准孔:选择 well type 对话框下 100% Std ---选择最后一列为标准孔列
- 3、100%样本孔: 选择 well type 对话框下 Sample ---选择 2-11 列为样本孔列
- 4、点击 OK



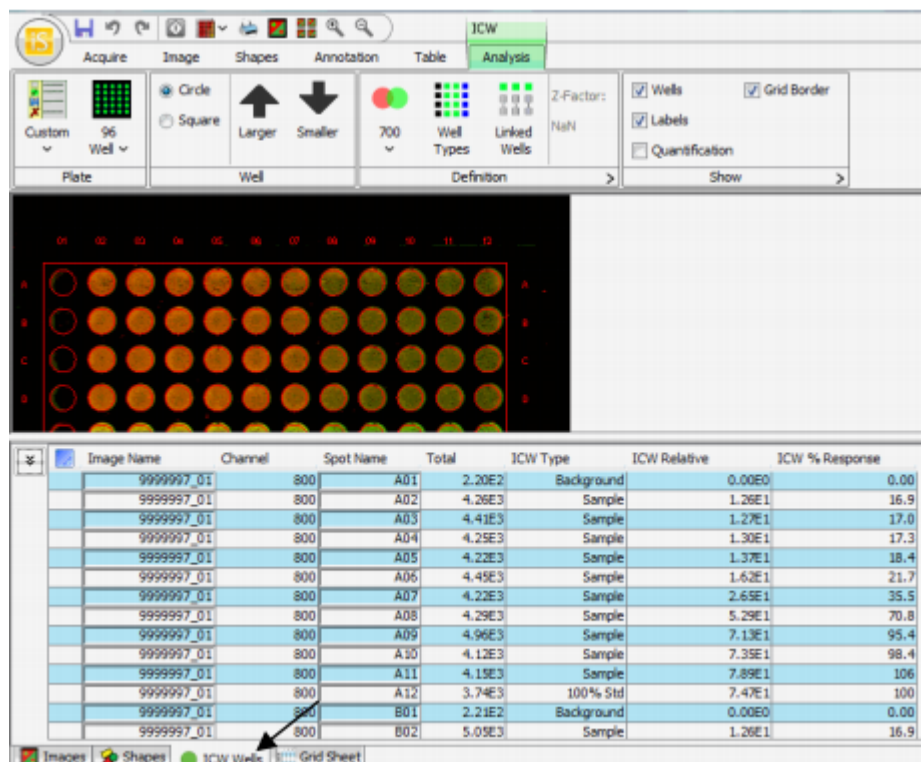
定义关联孔

点击 Definition 组第三个按钮 Linked Wells---选择上面两列---选择 Link Rows---Well Links 对话框中点击 Create Link---点击 OK



ICW 表格

点击窗口底部的 ICW Wells 查看 ICW 表格



网格表

点击窗口底部的 Grid Sheet 查看每个孔相关数值---从 Field /Channel 下拉菜单选择相关参数

Field: ICW Relative Channel: 800

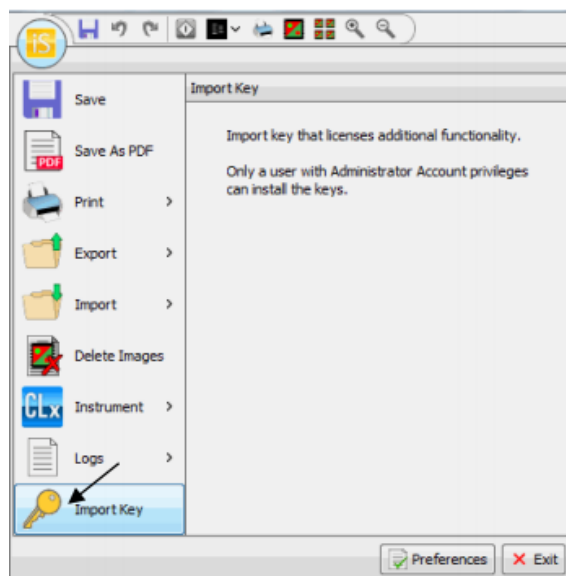
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
B	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
C	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
D	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
E	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
F	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
G	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1
H	0.00E0	1.26E1	1.27E1	1.30E1	1.37E1	1.62E1	2.65E1	5.29E1	7.13E1	7.35E1	7.89E1	7.47E1

第九章 小动物图像分析

Image Studio 软件中导入小动物图像分析模块。

导入小动物图像软件分析模块

- 1) 如果您的电脑操作系统是 Windows®Vista 或者 Windows 7®系统，右击 Image Studio 软件图标，选择“Run as Administrator.”
- 2) 点击应用图标---点击 Import Key，如下图所示：



- 3) 打开 Small Animal Image Analysis key 文件夹，点击 Open。
- 4) 点击 OK,重新打开软件。

分析小动物图像

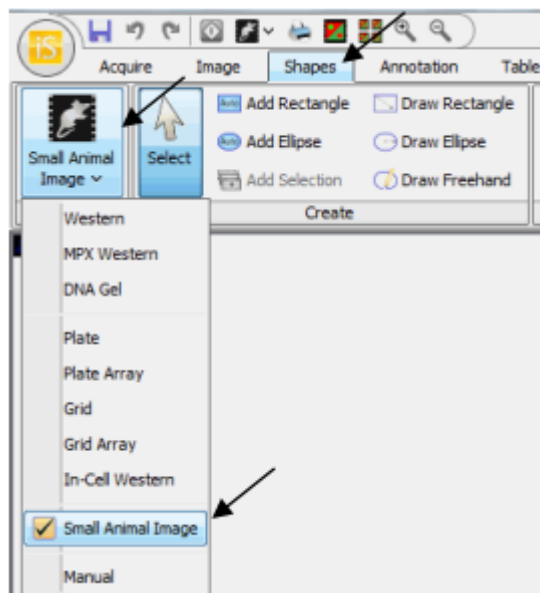
本次以示例图像为例为您介绍小动物活体图像分析流程。示例图像保存在以 Small Animal Image is ‘0000192_01 命名的 Image Examples 文件夹中。

从 Image Studio 软件 CD 的 Image Examples 文件夹中导入编号为 ‘0000192_01’ 的图像。

- a. 点击应用图标中的 Import---点击 Copy From (Import Acquisition)
- b. 在 Image Examples 中选择 ‘0000192_01’，点击 Open 以显示图片，文件将显

示在图像表格中。

2) 在屏幕右侧的 Image LUTs 中调节图像外观



3) 点击工具栏中的 Shapes

4) 点击 Small Animal Image 打开小动物分析图标以分析图像，后者从快捷图表中选择 Small Animal Image 以达到相同目的。

设置背景

1) 在 Shape 栏中点击 Draw Ellipse

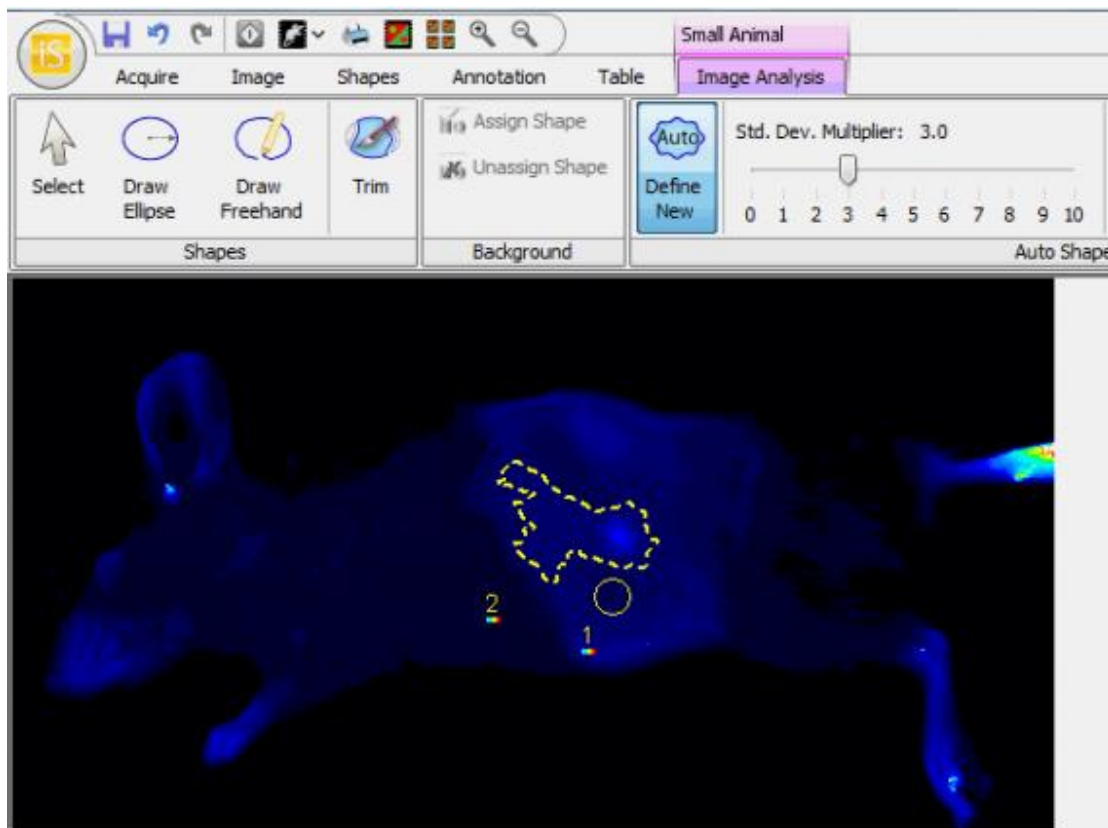
2) 在图像中画如下图所示的形状。



3) 点击 Background group 中的 Assign Shape，将所画形状设置为背景

应用自动框选工具

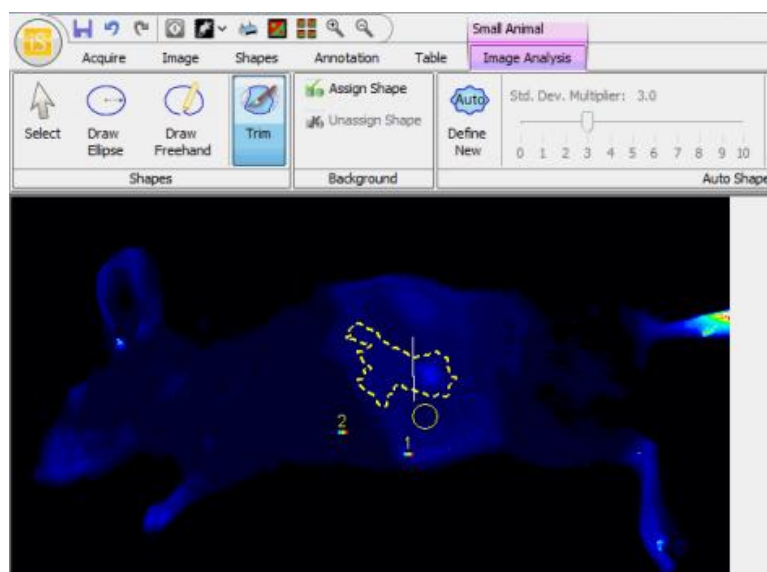
- 1) 在自动框选工具栏中点击 Define New



- 2) 点击荧光图像的中央区域。
- 3) 点击 Shape 栏中的 Select
- 4) 点击图像的任何位置，软件会自动框选实线绘制的形状。

使用修建工具

- 1) 点击并选中 shape2，选中后实线变为虚线。
- 2) 点击 Shape 栏中 Trim
- 3) 在 shape2 中画一条线，其被分割成两个图像。



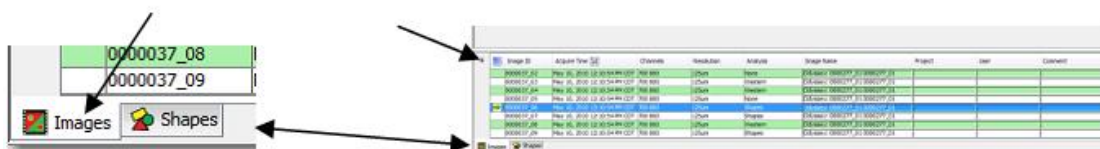
- 4) 点击选中被框选图像的左侧，删除之。
- 5) 点击图像的任意位置，软件自动识别荧光信号

第十章 表格

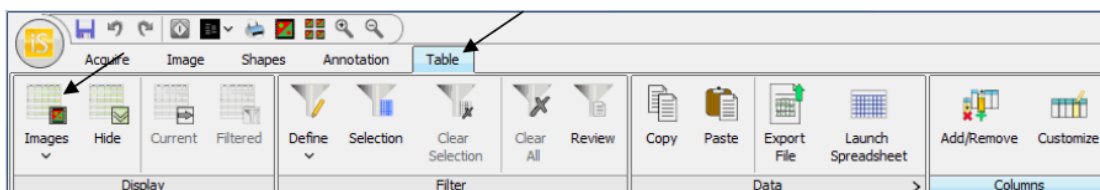
Odyssey CLx 图像的所有结果都储存在打开软件时建立的存储文件中，这些数据结果可以在 Images Table 中进行查看，移动，增加，删除，分类等操作。

Images Table 图像表格

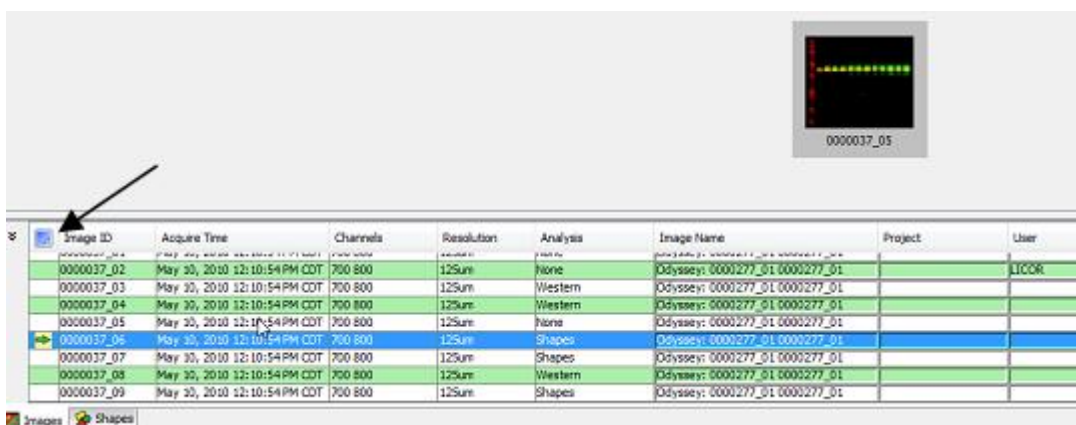
1、查看/隐藏图像表格：点击屏幕下方 Images 查看图像表格信息，双击左侧箭头可隐藏图像表格信息



也可在 Table 界面下，点击 Images--- Hide 隐藏图像表格信息



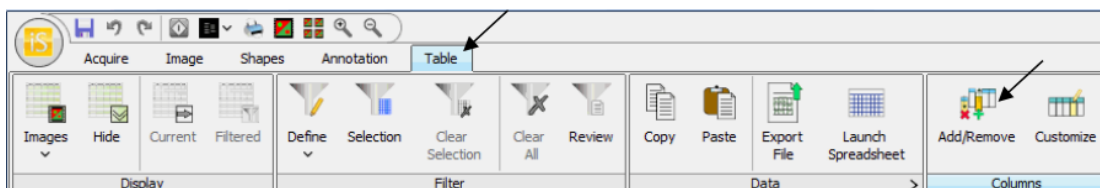
2、双击左上角 ，全选图像；选中一个图像栏，右击可进行图像的复制、删除、查看图像属性等信息。



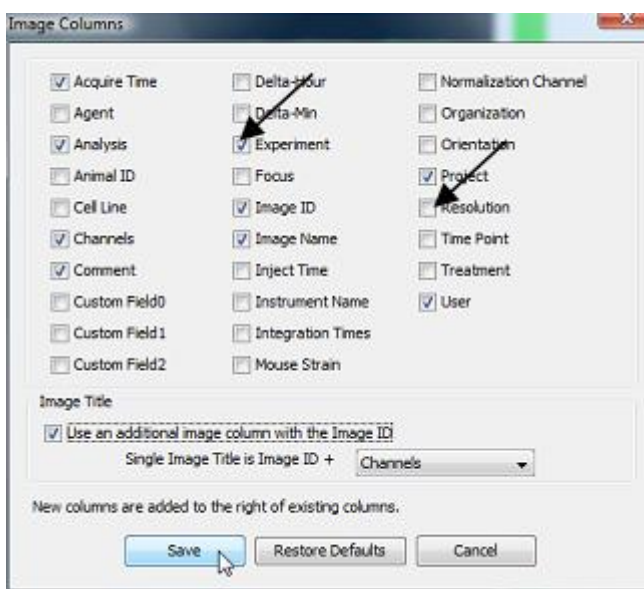
1)

增加/移除 image 信息栏显示信息

单击 Table---单击 Add/Remove



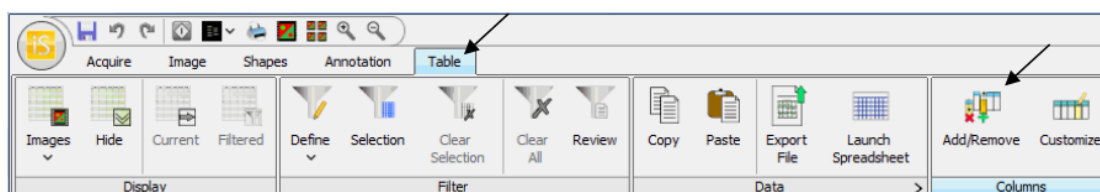
---对话框中勾选或去除信息



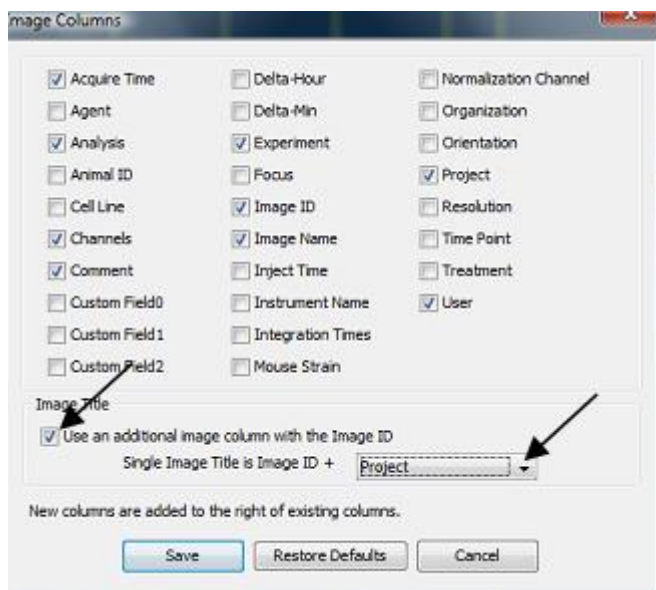
---点击 Save 保存---修改内容即体现在 image 信息栏中

编辑图像显示栏

单击 Table---单击 Add/Remove



单击 Use an additional image column---单击 Project 下拉菜单---选择要增加的信息---点击 Save 保存。



数据导出

有以下几种方式进行数据导出操作：

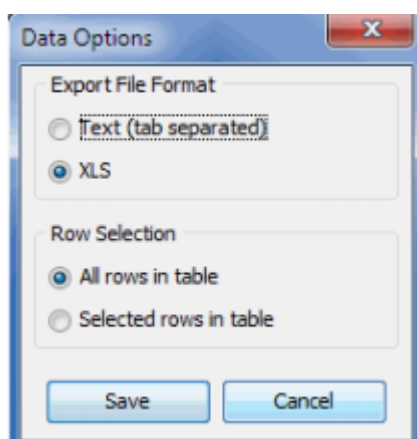
点击软件左上角 IS 图标---Export ---Table

点击 Table---Data---copy---到目标电子表格中

点击 Table---Data---Launch Spreadsheet ---选择存储路径---Save

点击 Data (>)---选择文件格式 text /xls---选择 all rows /selected rows---

Save 保存

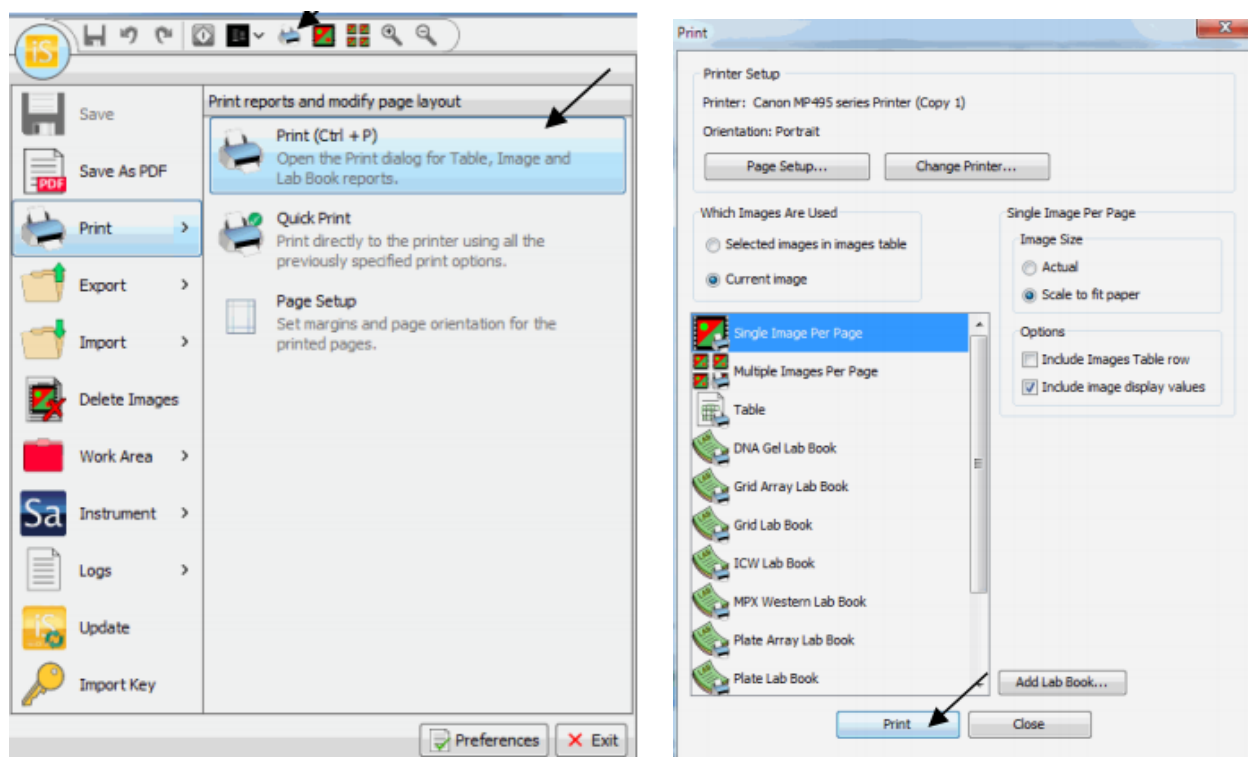


第十一章 图像打印&生成报告

图像打印

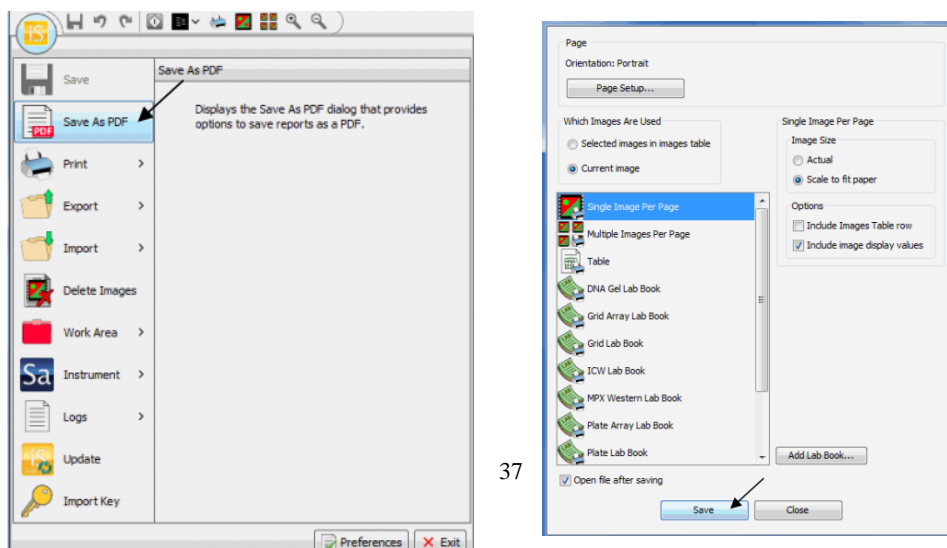
点击快速启动工具栏打印图标---键盘输入 Ctrl+P---选择存储路径---Save

或者点击软件左上角 IS 图标---点击 Print---点击 Print---选择存储路径---Save



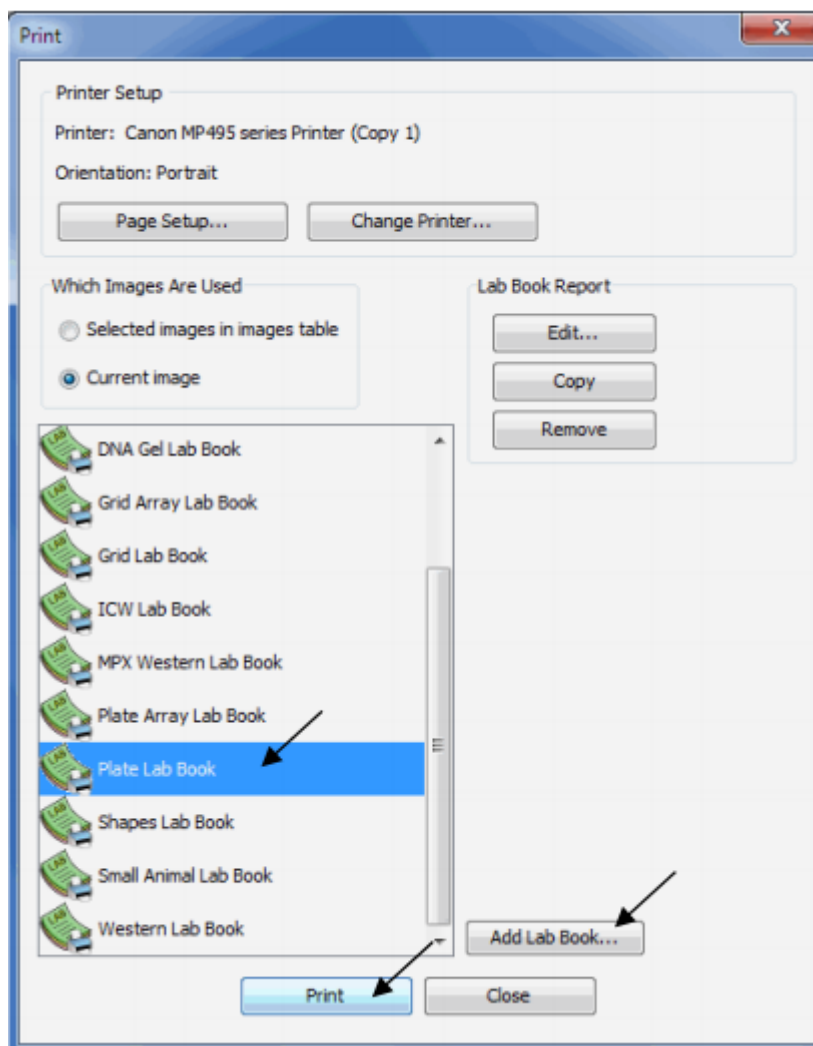
图像保存为 PDF 文件

点击软件左上角 IS 图标---选择 Save As PDF.--- 点击 Save 保存



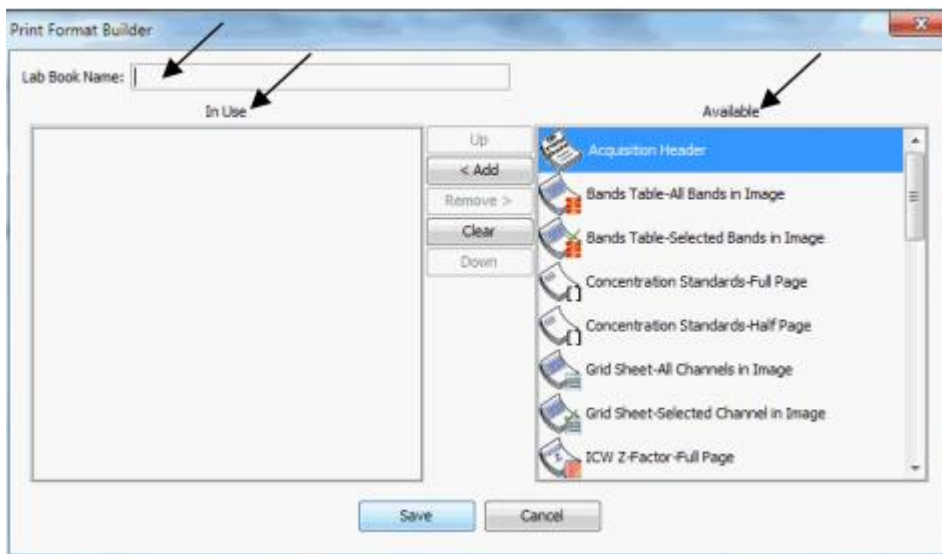
打印报告

默认格式：点击软件左上角 IS 图标---点击 Print---选择 Plate Lab Book---点击 Print---选择存储路径---Save



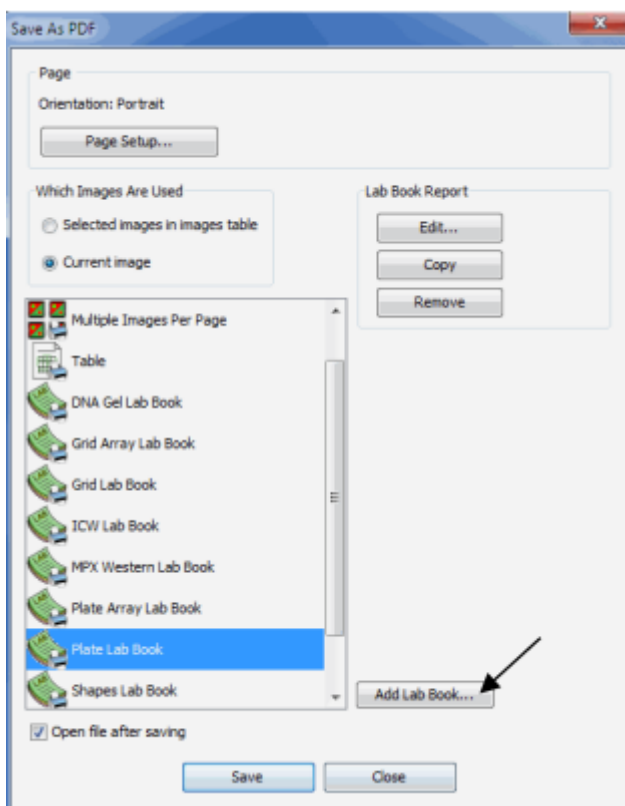
自定义格式报告：

点击软件左上角 IS 图标---点击 Print--- Add Lab Book---选中添加内容---点击 Add---点击 Save---点击 Print---选择存储路径---Save



保存 PDF 格式报告

点击软件左上角 IS 图标---选择 Save As PDF.--- 选择 Plate Lab Book---点击 Save 保存---选择存储路径---Save





Western Blot Protocol

(中文版)



目录

I. 需要的试剂.....	- 1
II. Western 检测方法.....	- 2 -
III. 双色检测指南.....	- 4 -
IV. 膜的Stripping.....	- 4 -
V. Western 检测优化.....	- 5 -
VI. 常用提示.....	- 6 -
VII. 考马斯亮蓝染色蛋白凝胶检测.....	- 6 -
VIII. 常见问题.....	- 7 -

I. 需要的试剂

- NC（硝酸纤维素）膜或PVDF 膜
- Odyssey 封阻液（Li-COR, Cat.#927-40000）
- 一抗
- 近红外染料标记的二抗（Li-COR）*
- Tween®-20
- PBS 洗脱液
- 双蒸水
- 润湿PVDF 膜的甲醇
- SDS（如果需要的话）

其他的封阻液（如果需要的话）

* IRDye™ 800CW 染料标记的二抗也可以从Rockland 采购，Alexa Fluor® 680 染料标记的二抗也可以从Invitrogen 采购。

Odyssey 系统上适用的荧光染料：

Dye	Sensitivity	Odyssey Channel
IRDye™ 800CW	+++	800
IRDye™ 800	+++	800
IRDye™ 680	+++	700
IRDye™ 700DX	++	700
Alexa Fluor® 680	+++	700
Alexa Fluor® 700	++	700
Alexa Fluor® 750	++	700/800 (not recommended; signal appears in both channels)
Alexa Fluor® 647	+	700
Cy®5.5	++	700
Cy®5	+	700

有关适用染料的最新信息请查询Li-COR 的网站。

II. Western 检测方法

NC 膜和PVDF 膜都可以做蛋白印迹，但是NC 膜效果更佳。能够使用纯硝酸纤维素更好。按照标准程序将蛋白从凝胶转到膜上，转移膜时只能使用镊子夹住边缘。转膜后，按照如下步骤操作：

1.	将膜在PBS 中润湿几分钟。如果使用PVDF 膜，先要在100% 甲醇溶液中迅速预湿，再放入PBS 之前先浸入双蒸水里。注意： ⚠但多数钢笔墨水或记号笔在Odyssey 下有荧光，墨水被洗掉然后又再到处沉淀在膜上，产生大斑点和条纹，使用铅笔或 Odyssey 专用的记号笔可避免该问题。PVDF 膜只能使用铅笔（润湿在甲醇中，墨水会被洗脱下来）
2.	Odyssey 封阻液封阻膜1 小时，保证有足够的封阻液以完全淹没膜（建议最少0.4 ml/cm ² ）注意： ⚠必要时，封阻也可以在4℃ 过夜完成⚠封阻时切勿加入Tween-20，在未结束封阻之前膜不能和Tween-20 有任何接触，否则会造成背景过高⚠使用 Odyssey 封阻液往往比其他封阻液得到的结果灵敏度更高。脱脂奶粉或干酪素溶于PBS 也可以作为封阻液和抗体的稀释溶液，但是脱脂奶粉对PVDF 膜会造成较高的背景，如果使用0.1%的干酪素溶液,建议溶于0.2×PBS ⚠当使用抗羊的抗体，则脱脂奶粉溶液会影响检测，而且在4℃条件下腐败的速度也很快，因此被稀释保存或重复使用不呼超过几天⚠Odyssey 封阻液与PBS 1:1 稀释不会影响检测⚠Odyssey 封阻液可被保存、重复使用⚠含有BSA 的封阻液，但是有些情况下会造成膜的背景过高。因此不推荐使用含BSA 的封阻液，除非一抗专门要求使用BSA 作为封阻液
3.	用Odyssey 封阻液稀释一抗，最佳稀释比率取决于所用抗体和经验，推荐开始的范围在1:1000 ~ 1:5000 。为了降低背景，在孵育之前稀释抗体时加入0.1-0.2% 的Tween 20， Tween-20 的最佳浓度也决定于抗体。注意： ⚠双色检测要求抗体来源于不同的宿主，如兔和鼠。详细信息请参考III. 双色检测指南
4.	室温下，孵育一抗60 min 或更长时间并缓慢摇动（一抗不同孵育最佳时间也不同），使用足够的抗体溶液以覆盖整张膜。
5.	室温下用足量的PBS + 0.1% Tween-20 溶液轻柔洗膜4 次，每次5 min 。



6.	用Odyssey 封阻液稀释红外染料标记的二抗，避免装有二抗的试剂瓶长时间见光。推荐稀释比率为1:15,000（建议稀释范围：1:5,000 – 1:25,000）。与稀释一抗一样，二抗稀释时也加入Tween-20。如果需要也可加入SDS，但请注意下文提示。注意：⌘检测量少的蛋白，则需要的二抗稍多（1:5,000 – 1:10,000）⌘千万注意，切勿污染二抗试剂瓶⌘稀释的二抗可在4℃避光保存并重复使用。但是为了得到最佳的灵敏度和效果，最好使用新鲜的二抗稀释溶液⌘稀释二抗时加入0.01% - 0.02% SDS（也加Tween-20）可以降低背景，特别是使用PVDF膜时。但是，切勿在封阻或稀释一抗时加入SDS。请见V. Western 检测优化，为什么、怎样使用SDS 稀释二抗。
7.	室温条件下轻摇孵育二抗30-60 min，此期间避光操作。注意：孵育超过60 min 可能会增加背景
8.	室温下用足量的PBS + 0.1% Tween-20 溶液轻柔洗膜4次，每次5 min。避光操作。
9.	用PBS 冲洗去除Tween-20。这时膜已可以准备扫描。注意：⌘选择合适的通道扫描（见I. 需要的试剂）⌘扫描前，膜避光保存⌘如果准备做stripping 或再次使用，要保持膜湿润，如果膜一旦干燥，则stripping 的效果将会降低⌘如果需要扫描前膜可以干燥，干膜的信号可能更强。扫描后抹还可以再次被润湿⌘避光条件下，膜上的荧光信号可以保持数月或更长。膜可干燥保存也可在PBS 缓冲液内4℃保存。⌘如果膜上的信号过强或过弱，重新扫描的时候相应地调低或调低扫描亮度

分子量Marker

若在凝胶电泳时用的是Odyssey 预染分子量Marker (LI-COR)，则在700 通道可见，600 通道也可以看见淡信号非常微弱。如果Marker 被数次反复冻融，则会降解，则在800 通道出现数条高分子量条带，出现这种情况请换用新的Marker。

其他来源的蓝色预染分子量Marker 也可用于Odyssey。仅需使用常用量1/3，若是用量过大则分子量条带过强，则会影响样品泳道的成像。如果使用彩色Marker，一些条带可能不会在Odyssey 上看到。

优化提示

- 严格遵循此protocol
- 每对抗体-抗原最佳的封阻液是不同的。某些一抗可能在不同的封阻液中降号或非特异条带。如果检测蛋白出现困难，或许更换封阻液会得到意外的结果。如果某种封阻液用化学发光方法可行的话，则在Odyssey 上继续使用

用它。液用化学发光方法可行的话，则在Odyssey 上继续使用它

- 加入像Tween-20 的去垢剂可降低背景和非特异条带详细内参参考

V. Western

优化

- 为了避免膜上出现斑点，使用前后双蒸水浸泡塑料托盘并配制缓冲液，切勿将膜放入接触过考马斯亮蓝的容器
- 移动膜时只能是用镊子夹住其边缘
- 在将膜放入或取出抗体孵育溶液之后，用双蒸水或乙醇彻底清洗镊子，否则会在墨背景上造成难以去除的斑点或条纹
- 扫描时，首先要擦干净Odyssey 扫描面板上的灰尘或残骸等，这些污物影响成像质量或污染膜，如果在膜上使用硅树脂垫子，则要将与膜接触的一面弄干净，否则灰尘或其他杂物会落在膜上，切勿使用纸巾擦拭垫子，否则会产生更多的斑点
- 扫描时不要使用塑料包裹膜
- 如果准备做Stripping，则千万不能膜变干燥，膜变干燥或局部出现干燥都会降低Stripping 的效率

III. 双色检测指南

利用红外染料标记的抗体在不同的信号通路（700 通道和800 通道），同一张膜上的两种不同抗原可同时被检测到。双色检测需要仔细选择一抗和二抗。

下述指南有助于双色检测试验的设计：

- 两种一抗的种属来源要不同，这样才二抗的特征才能有所区别（例如来源于兔和鼠的一抗分别需要抗兔和抗鼠的二抗来匹配）
- 在组合双色试验的一抗之前，往往需要对每个一抗单独在膜上检测，看是否出现预期的条带和可能低背景条带。轻微的交叉反应会在两种抗体间发生，这就使检测的问题更复杂，特别是抗原量比较大的情况下。如果出现交叉反应，则减小蛋白的上样量或减小抗体的用量
- 一个抗体标记700 通道的染料，则另一个抗体只能标记800 通道的
- 双色检测优先选用高交联吸附力的二抗，否则会出现交叉反应
- 为了不影响双色检测，避免两种分别来源于亲缘关系太近的小鼠和大鼠的一抗同时使用，如果不得不这么使用的话，必须先做每种抗体的单色检测，确定出现预期的带形
- 如果可能，二抗应该选择来源于同一宿主（例如，羊抗鼠和羊抗兔）以减小二抗之间的反应。因为二抗不会识别来源于其他种属的免疫球蛋白。

如果进行双色检测，则遵循标准的Western protocol 并有以下区别：

- 第3 步，在抗体稀释缓冲液中混合两种一抗，同时与膜孵育（第4 步）。
一抗必须来源于不同宿主
- 第6 步，在抗体稀释缓冲液中混合染料标记的两种二抗，同时与膜孵育（第7 步）

IV. 膜的Stripping

PVDF 膜可以Stripping ，一般不使用NC 膜。如果准备Stripping ，则膜成像前后以及成像过程中都不能干（尽可能保证膜的湿润状态）。其他检测方法中常用的Stripping 技术在Odyssey 上也可以使用。Stripping 缓冲液：25 mM pH2.0 的甘氨酸 + 1-2% SDS

Stripping 程序：

1.	室温下在Stripping 缓冲液中摇动孵育10-15 min
2.	换掉Stripping 缓冲液，再摇动孵育10-15 min
3.	在PBS + 0.1% Tween-20 溶液中摇动冲洗5 min
4.	PBS 溶液浸泡后，在337 μm 的分辨率下快速扫描看信号是否完全去除，如果仍信号残留则重复上述步骤，特别是强带或抗体。经常更换Stripping 缓冲液会有作用的。
5.	当做下次检测时，重新封阻30-60 min ，并作后续的抗体孵育

提示：

- 如果膜被过度剥离，会造成目标蛋白丢失，扫描膜看 stripping 是否完全，如果出现过度剥离，则减小 Stripping 缓冲液中的 SDS 用量
- 根据抗原抗体反应的强度，决定 stripping 的强度，如果很强，则可以通过把 SDS 浓度从 1%提高至 1.5-2% ， 或者预热 stripping 缓冲液至 65 $^{\circ}\text{C}$ ，把热缓冲液倒入在室温下摇动，也可使用恒温摇床。如果温度提高，则需要经常扫描，检查是否过度剥离

V. Western 检测优化

当从原有的Western 方案向Odyssey 转换时，或使用一个新的一抗时，一抗浓度的优化尤为重要，以达到的灵敏度和稳定性。

3 个因素需要优化：一抗浓度、染料标记的二抗浓度、抗体稀释液内的去垢剂浓度。

一抗浓度

一抗在质量、亲和力和浓度上存在较大的差异。正常工作浓度范围取决于所用一抗的特性和目标抗原的量。建议稀释比率为1:500、1:1500 和1:10,000（开始可参照以前化学发光法的浓度）。优化一抗的浓度将其效果发挥到最大并妥善保存。

二抗浓度

建议稀释比率为1:5000、1:10,000 和1:20,000。二抗的用量与被检测抗原的多少密切相关——如果被检测蛋白量越大，则需要的抗体量就越小

去垢剂浓度

稀释抗体时加入去垢剂可有效降低膜上的背景。由于使用的抗体、膜和封阻液的种类不同，去垢剂的浓度也不同。有些一抗与抗原结合的不是很牢，过多的去垢剂会降之洗掉。在封阻未结束之前，不要让去垢剂与膜接触，否则背景会很高。

Tween-20

- 在未结束封阻之前，不能出现 Tween-20
- 用封阻液稀释一抗和二抗时均加入 Tween-20 。建议，NC 膜最终浓度为 0.1-0.2%，PVDF 膜为 0.1%（浓度太高则背景也高）
- 洗脱液内含 0.1% Tween-20

SDS:

- 二抗稀释液中加入 0.01 - 0.02% 的 SDS 可显著降低整章膜的背景，并减少或消除非特异条带。但很重的一点就是用量要少，作为一种离子去垢剂 SDS 的用量在检测任何步骤使用过量，都会破坏抗原-抗体反应。
- 对 PVDF 膜降低背景更有效
- 封阻或稀释一抗时切勿加入 SDS。一抗孵育时如果存在 SDS 则会大大降低信号强度只能在稀释二抗时加入 SDS
- 封阻液稀释二抗时，可同时加入 0.1 - 0.2% 的 Tween 和 0.01 - 0.02% 的 SDS。
- 洗脱液只能包含 0.1% Tween-20 ，但决不能有 SDS
- 某些抗体-抗原反应对 SDS 非常敏感，允许的浓度非常低（小于 0.01%）。可用滴定

VI. 常用提示

- 封阻未结束之前切勿将膜与 Tween-20 接触，否则膜背景会过高
- 牛奶封阻液可能会含有 IgG 而与羊抗的抗体反应，会显著增加背景和降低信号
- 为延长封阻液使用时间或降低使用量：重复使用封阻液稀释抗体；与 PBS 1:1 稀释；过量使用的封阻液护守保存在 4℃ 数天（不要倒回原是试剂瓶，分开保存）

- 抗体4℃避光保存，切勿反复冻融，否则抗体性能会降低。减小见光时间，避免试剂抗体试剂瓶，使用前快速稀释。若抗体溶液出现微粒，则需要先离心再使用。
- 二抗孵育和洗脱时，尽可能避光操作
- 做胶时选用齿最窄的梳子，以利用上样后浓缩目标蛋白
- 试验中抗体抗原不同，则最佳的转膜条件、膜和封阻试剂也有所不同。如果出现背景高，信号弱时，最先要解决的就是换另一种封阻液
- 为了达到最佳的灵敏度，请使用NC膜
- 微量的纯化蛋白可能不能有效转膜，可以加一些相同分子量的非特异蛋白，产生“携带”效果，提高转膜效率
- 对于 <100kDa 的蛋白，无SDS 的Tri-甘氨酸缓冲液溶液中转膜（含20% 的甲醇）。SDS 无论对于PVDF 还是NC 膜都会降低蛋白和膜的结合效率
- 转膜前先把胶浸泡在转膜缓冲液中10 - 20min，可以起到平衡凝胶并去除SDS 的作用。
不会将SDS 带入转膜槽中
- 要最大化蛋白和膜的结合力，转膜后可完全风干膜（约1-2h）
- 切勿过封阻。长时间封阻，尤其是用2%或浓度更高的脱脂牛奶，会造成膜上目标蛋白的损失（*J. Immunol. Meth.* 122:129-135, 1989）
- 为了增强信号，可尝试延长室温下一抗的孵育时间或4℃过夜

VII. 考马斯亮蓝染色蛋白凝胶检测

Odyssey可以扫描考马斯亮蓝（甲醇溶和水溶）染色的凝胶，可在700 通道成像，800 通道有微弱信号。Odyssey较常规检测灵敏度高，水溶的染色液灵敏度最高；水中对凝胶过夜退色效果更好。

凝胶检测步骤：

1.	在褪色液或水中完全浸泡凝胶去除染料颗粒，这些颗粒会造成像结果上出现斑点
2.	将凝胶放在扫描面板上，不要产生气泡。考马斯亮蓝染色凝胶部建议使用硅树脂垫子，因为完全去掉垫子上的污物有些困难
3.	700 通道扫描凝胶。焦距是凝胶厚度的1/2（即1mm 厚的凝胶，焦距设置为0.5mm）
4.	扫描结束后拿掉凝胶， 仔细清洁玻璃扫描面板，除去残留污渍
5.	如果仍出现条纹，用戴手套的手指无屑纸巾揩凝胶。制干胶也可以解决条纹问题或在干胶溶液中洗胶不超过5min 防止灵敏度降低。还可以使用Odyssey软件中的filter/noise 消除功能以减小条纹（见Odyssey使用指南）



VIII. 常见问题

问题	可能原因	解决办法	
高背景、不规则分布	封阻液中使用了 Tween-20	封阻之前膜不能和 Tween-20 接触	
	封阻液中使用了 BSA	封阻液中含有 BSA 可导致高背景, 加入 SDS 以降低背景或更换封阻液	
	未使用优化的封阻试剂	比较不同的封阻液选择最佳的使用; 延长封阻时间	
	NC膜的背景	抗体稀释液中加入 Tween-20 降低背景。加入 SDS 稀释二抗	
	PVDF膜的背景	抗体稀释液中 Tween-20 的浓度降低至 0.1%。加入 0.01-0.02% 的 SDS 稀释二抗	
	抗体浓度过高	优化一抗和二抗的浓度	
	洗脱不足		增加洗脱次数和缓冲液体积
			确定缓冲液内含 0.1% 的 Tween-20, 必要时也可增加。过量的 Tween-20 (0.5-1%) 也会降低信号
缓冲液内的杂物和抗体交叉反应		将牛奶换成 Odyssey 封阻液。牛奶中可能存在的 IgG 会与羊抗的二抗交叉反应	
抗体体积不足		使用足够体积的抗体使膜一	
高背景、不规则分布 (接上页)	抗体体积不足 (接上页)	直完全浸入液体中 (体积不足时也可使用热密封袋)。切勿使膜任何位置干燥 在摇床上孵育	
	膜污染	小心使用镊子移动膜。膜不能干燥。使用干净的盒子、袋子或托盘	
背景出现不规则的气泡或条纹	小体积体系内同时封阻多张膜	多张膜同时封阻时, 使用足够体积的缓冲液, 膜可自由移动并完全被液体	



		淹没
	膜未完全润湿或出现局部干燥	膜一直处于润湿状态，如果膜要重复使用或作剥离则这一点很重要 若使用PVDF膜，则需要先用100% 的甲醇润湿
	镊子或盘子已被污染	在镊子从抗体溶液拿出后仔细清洗，特别是染料标记的二抗溶液。脏镊子会在膜上留下不能洗掉的染料沉淀 孵育时，使用洁净的盘子、袋子或托盘
	扫描面板或硅树脂垫子不干净	每次使用时仔细清洁面板和垫子。灰尘、碎屑或残留物都会在膜上造成条纹
	不合适记号笔或钢笔在膜上做记号	只能使用铅笔或Odyssey专用记号笔在膜上标记
	未使用最好的封阻试剂	使用不同封阻剂，一抗的表现也不同
	抗体量不足	一抗结合力可能过低，增加抗体的量环更换其他来源的抗体 延长一抗孵育时间（室温4-8 小时，或4℃过夜） 增加一抗或二抗的用量并优化 更换为其他可替代的二抗 一抗或二抗可能过保质期或保存不当而失效
	去垢剂使用过量；信号被洗脱掉	减少抗体稀释液中的Tween-20 和/或SDS的含量。推荐SDS浓度为0.01 – 0.02% ， 某些抗体可能要求更低的浓度
	蛋白上样量过低	提高上样量，制胶时使用齿最
背景出现不规则的气泡或条纹（接上页）		窄的梳子
	蛋白转膜质量不高蛋白	检查转膜缓冲液和转膜



	转膜质量不高（接上页）	步骤 使用预染分子量Marker监控转膜。转膜后对凝胶染色，确保凝胶不能被着色
	检测过程中蛋白损失	封阻时间太长或抗体稀释液中去垢剂含量过高都会造成膜上抗原的损失
	转膜过程中蛋白不能保留在膜上	转膜后膜完全风干（1-2h），将有助于不可逆转的结合
		加入20%的甲醇也利于蛋白与膜的结合。注意：甲醇会缩小凝胶的孔径，因而可能会阻止大分子量蛋白的转膜
转膜缓冲液内的SDS可能会对膜上的蛋白造成干扰，特别是小分量的蛋白，因而减小或不用SDS。注意：对某些蛋白SDS能提高转膜效率		
非特异或非目标条带	抗体浓度太高	降低抗体用量
		缩短抗体孵育时间
		抗体稀释液中提高Tween-20的用量
		二抗稀释液中增加或提高SDS用量
	未使用优化的封阻液	更换封阻液
	双色检测中的交叉反应	核对抗和二抗的来源和宿主种属（见III. 双色检测指南）
只使用高吸附的二抗		
双色检测存在交叉反应的可能，可减小二抗的用量降低发生交叉反应的几率		



		<p>尽可能避免同时使用抗小鼠和抗大鼠的抗体，由于种属亲缘关系太近，一定程度上抗小鼠的抗体与大鼠的IgG会发生反应，同样的反应也存在于抗绵羊和抗山羊的抗体之间</p>
<p>非特异或非目标条带（接上页）</p>	<p>信号在两个通道之间的泄露</p>	<p>检查所用的染料。像Alexa Fluor 750 荧光染料在两个通道之间都可发光，不推荐使用</p>
		<p>如果信号在一个通道很强（接近或达到饱和），则可能会在另一个通道有少量泄露，调低扫描亮度可解决此问题</p>
		<p>以后的实验可以降低蛋白上样量或抗体用量</p>



In-Gel Western Protocol

(中文版)



目录

I. 所需试剂.....	- 1 -
II. 描述.....	- 1 -
III. 双色In-Gel Western 蛋白检测指南.....	- 1 -
IV. 电泳.....	- 2 -
V. In-Gel Western 检测Protocol	- 2 -
VI. 优化.....	- 3 -
VII. Stripping 和Reprobing	- 3 -
VIII. 常见问题.....	- 4 -

I. 所需试剂

Odyssey 试剂

- 近红外染料标记的二抗 (LI-COR) *

其他试剂

- 电泳所用的 SDS 凝胶
- 50% 异丙醇 + 5% 乙酸 (超纯水配制)
- 封阻液 (5% BSA)
- 一抗
- Tween-20
- PBS 缓冲液
- 超纯水

* IRDyeTM 800CW 染料标记的二抗也可以从Rockland 采购, Alexa Fluor[®] 680 染料标记的二抗也可以从Invitrogen 采购。

II. 描述

Western 蛋白检测需要电泳分离蛋白混合样品, 然后再将分离后的蛋白从凝胶转到NC 膜或PVDF 膜上。Odyssey 可以不需要转膜而直接在凝胶中检测蛋



白，这个技术可大大节省时间和费用，而且还能消除转膜、封阻过程中可变因素的影响。

In-Gel Western 检测仅需常规的Odyssey 试剂而无须特殊的试剂盒。

电泳之后，凝胶在异丙醇乙酸溶液里简单固定之后，冲洗，然后和传统的Western 检测一样，在凝胶上孵育、洗脱。湿胶直接在Odyssey 上扫描。该过程无需底物、塑料包裹和曝光底片。用Odyssey 在凝胶上还可以实现两个蛋白的双色检测。

In-Gel 检测可以快速得到实验结果，也能让结果更准确，因为避免转膜过程中蛋白的损失等问题。如果目标蛋白转膜效果不好（比如，转膜过程中，大分子量蛋白很难从膜中转出，或小分子量蛋白穿过膜），In-Gel 检测避免这类问题。然而重要的是请注意In-Gel 检测能不能作定量。

III. 双色In-Gel Western 蛋白检测指南

双色检测的抗体谨慎选择是非常重要的，否则会出现交叉反应。关于一抗和二抗的选择请参考以下指南：

- a. 两个二抗要求必须是高吸附性的，以消除交叉反应
- b. 两个一抗必须是来源于不同种属的宿主，这样才可以被不同特性的二抗区分并识别（如，一抗来源于兔和小鼠的，可分别被抗兔和抗小鼠的二抗识别）
- c. 两个二抗必须来源于同一种属的宿主，以避免二抗之间的交叉反应。样品中可能存在的其他种属免疫球蛋白是不会被二抗识别的
- d. 一个二抗标记IRDye 800 的染料，则另一个就要标记IRDye 680 （或Alexa Fluor 680 、Cy 5.5 等）
- e. 双色检测之前，先对每个抗体单独作转膜检测看是否达到预期效果。可能会出现轻微的交叉反应，特别是抗体用量过大时，是检测的问题更复杂。如果确实存在交叉反应，将降低蛋白的上样量或抗体的用量。
- f. 为了取得最佳的结果，双色检测尽量避免同时使用来源于小鼠和大鼠的一抗。因为亲缘关系太近，不可能完全避免交叉反应。如果确实要同时使用这两种一抗，则需要先祖但通道检测的预实验

双色检测实验方案的调整


1. 对于双色外检测，请遵照下文的标准操作步骤并作如下的调整：使用两种染料标记的二抗
2. 确定抗体特性和宿主来源的合适性，以免出现交叉反应
3. 在第5 步，用抗体稀释液混合两种一抗，同时与凝胶孵育
4. 在第8 步，用抗体稀释液混合两种二抗，同时与凝胶孵育

IV. 电泳

1.	<p>电泳分离目标蛋白</p> <p>注意:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 凝胶类型会影响 In-Gel Western 检测的成功和灵敏度。因此需要对凝胶作优化 ● 凝胶厚度和丙烯酰胺的浓度会影响抗体分子进入凝胶。通常建议凝胶浓度不高于 12%，厚度在 1-1.5mm ● 不同预制胶的表现也有一定的差异。推荐 NOVEX Tris-glycine 预制胶，当然，其他的预制胶也可以使用
----	--

V. In-Gel Western 检测 Protocol

2.	电泳之后分开两块玻璃板，浓缩胶（堆积胶）可能会造成扫描时高背景。如果出现叠加，可用手术刀切除浓缩胶，并且切一个角作为记号
3.	50%异丙醇 + 5%乙酸（超纯水配制）中孵育凝胶 15min，溶液足量保证凝胶被完全淹没并可自由移动，缓慢摇动

	 重要: 凝胶轻拿轻放，积压会在扫描图像上出现斑点或指纹
4.	<p>去掉异丙醇/乙酸，超纯水洗 15 分钟并缓慢摇动。足量水保证凝胶完全淹没且可自由移动。凝胶可能会卷曲并/或浮在液面，轻轻铺平凝胶或反转，保证液体完全覆盖凝胶。凝胶表面残留的酒精会造成条带扩散</p> <p>■ 提示: 如果需要，可在这步暂停，在水中 4℃ 保存过夜</p>
5.	只要还没有开始准备孵育抗体就不要做封阻。在含有 0.1%Tween 的 Odyssey 封阻液、PBS 或 5%BSA (BSA 效果最好) 中按照需要的浓度稀释一抗。由于 In-Gel Western 检测的灵敏度不及标准的 Western 检测，一抗的用量应较平时的量多一些。确定凝胶被抗体稀释溶液完全淹没。缓慢摇动孵育一抗 1h
6.	一抗孵育可延长至 7h，或 4℃ 过夜
7.	在足量的 PBS + 0.1%Tween-20 缓慢摇动分 3 次洗胶 10min
8.	在含有 0.1%Tween-20 合适的封阻液中按 1:1000 – 1:5000 的比例稀释抗体，缓慢摇动凝胶上孵育二抗 1h，避光操作。足够的溶液已完全覆盖凝胶
9.	在足量的 PBS + 0.1%Tween-20 缓慢摇动分 3 次洗胶 10min
10.	PBS 中洗胶 5min
11.	湿胶直接放在 Odyssey 系统扫描面板上，可直接扫描或塑料包裹防止凝胶干燥。焦距设置为凝胶厚度的 1/2。如果浓缩胶未切除，可在扫描成像图片后，用 Odyssey 软件裁剪
12.	如果扫描背景过高，可将凝胶浸泡在 PBS 过夜之后再扫描。4℃ 避光保存。在 4℃ 凝胶可被保存数日

VI. 优化

对于您的目标蛋白或凝胶，In-Gel Western protocol 可能需要优化。然而，无



论怎样，In-Gel Western 检测的灵敏度都不及标准的Western 检测。转膜对蛋白有浓缩作用，而在凝胶里，蛋白石分布在整个凝胶厚度上的。

对于优化有如下原则：

- „ ■ 优化抗体稀释液及其Tween-20 的浓度，可优化信噪比
- 使用不同的抗体稀释缓冲液，包括单独的PBS、Odyssey 封阻液、脱脂牛奶、BSA、Pierce SuperBlock 等。不同的封阻液的效果也有很大不同。BSA 效果最佳（通常转膜Western检测不推荐使用BSA，然而在
- „ In-Gel Western 中BSA 效果非常好）

VII. Stripping 和Reprobing

In-Gel Western 检测也可作Stripping 和Reprobing 。Stripping 缓冲液推荐 25mM Glycine-HCl pH 2.0 + 2%SDS 。足量剥离液中室温条件下，剥离凝胶 30-60min ，每15-30min 换一次剥离缓冲液。之后在PBS + 0.1%Tween-20 中全面洗胶。为了监控剥离效果，高分辨率（337 μm ）快速扫描凝胶。完成剥离的时间取决于原始信号的亮度，以及一抗和抗原结合的强度。

VIII. 常见问题



问题	可能的原因	解决办法
凝胶背景高	浓缩胶存在	电泳后切掉浓缩胶
	抗体用量过大	降低二抗的浓度
	由于孵育的缓冲液用量不足造成的背景不均匀	每个步骤(固定、洗脱和抗体孵育)都是用足够的缓冲液且凝胶可自由移动
	挤压可造成背景上出现斑点	轻拿轻放凝胶、并每次只能接触凝胶边缘
	凝胶未彻底洗脱	使用足量的缓冲液凝胶可自由移动。防止凝胶粘在容器底部 延长洗脱时间或增加洗脱次数,室温下凝胶避光浸泡在 PBS 中过夜也能降低背景
无信号或信号弱	抗体用量不足	增加一抗和/或二抗的量。4℃过夜孵育一抗
		In-Gel Western 检测没有转膜检测那么灵敏,需要相应增加样品上样
	稀释一抗的缓冲液不理想	尝试不同的稀释液,对于某些一抗的效果是有影响的
		建议缓冲液含 3-5%BSA, Odyssey 封阻液和 PBS 或 TBS (都含 0.1%Tween-20)。其他封阻液(脱脂牛奶、干酪素、其他商业化封阻液)和 Tween-20 的浓度也可尝试
	凝胶类型不理想	In-Gel 检测推荐 NOVEX 的预制胶。其他来源的或自制的凝胶也可使用,但可能灵敏度降低或需要更多的优化
	抗体未完全或不均匀进入凝胶	丙烯酰胺含量太高,可降低胶浓度增加抗体溶液体积,保证凝胶完全浸没在抗体中
确定凝胶已被充分固定。某些单克隆抗体对凝胶内残留的酸很敏感,遇到这样的问题,可在固定液中去除乙酸或延长水洗时间		
凝胶在异丙醇/乙酸溶液中时间过长	蛋白会从凝胶中损失。固定只能 15min	
条带模糊或不规则	凝胶类型不合适	In-Gel 检测推荐 NOVEX 的预制胶。其他来源的或自制的凝胶也可使用,但可能灵敏度降低或需要更



		多的优化
	上样量过大	尝试降低蛋白上样量; 如果条带内的蛋白上样量太高则条带会出现“满是斑点”
	凝胶固定不充分	如果按照上述方案问题依然存在, 可尝试调节异丙醇或乙酸
非特异或非目标条带	抗体浓度太高	减少抗体用量或缩短抗体孵育时间
	双色检测中抗体交叉反应	跻身选用抗体, 见III. 双色 In-Gel Western 蛋白检测指南
	一抗稀释缓冲液不理想	尝试不同的稀释液, 对于某些一抗的效果是有影响的
		建议缓冲液含 3-5%BSA, Odyssey 封阻液和 PBS 或 TBS (都含 0.1%Tween-20)。其他封阻液 (脱脂牛奶、干酪素、其他商业化封阻液) 和 Tween-20 的浓度也可尝试
两个通道之间的信号泄露	如果信号在一个通道很强 (接近或达到饱和), 则可能会在另一个通道有少量泄露, 调低扫描亮度或减少抗体的用量可解决此问题	



In-Cell Western Protocol

EGF 对A431 细胞刺激效应的评



目 录

I. 需要的试剂.....	- 1
II. 养细胞、刺激和检测A431细胞对EGF的反应.....	- 1
III. 实验注意事项.....	- 4
IV. 实验结果.....	- 5

I. 需要的试剂

Odyssey 试剂

- IRDye 800CW 标记的山羊抗小鼠的二抗 (LI-COR Cat.# 926-32210) *
- IRDye 680 标记的山羊抗兔二抗 (LI-COR Cat.# 926-32221) *
- LI-COR 和Rockland 也有其他类型IRDye 800CW 标记的二抗; Invitrogen 也有其他类型Alexa Fluor 680 二抗
- Odyssey 封阻液 (LI-COR Cat.# 927-40000)

其他试剂

- 1×PBS 洗脱液
- 细胞培养试剂 (血清, DMEM, 胰岛素, 1×PBS)
- 20% Tween-20 EGF (表皮生长因子) (Upstate Cat.# 01-107)
- 37% 甲醛 10% Triton X-100 Nunc 96 孔板 (Nunc Cat.# 167008)
- 下述的一抗

特别注意: 磷酸化EGFR 和磷酸化ERK 分别从CST 和Santa Cruz 购买。血清饥饿细胞要达到最大的反应。

II. 养细胞、刺激和检测A431 细胞对EGF 的反应

1.	按照标准的细胞培养步骤, 在DMEM 和10% 小牛血清 (FCS; Gibco) 的长颈瓶中培养A431 细胞, 直到达到80-90% 的细胞覆盖度 (confluency) (约 1.5×10^7 个细胞)
2.	去除培养基、灭菌的1×PBS 洗细胞, 然后再用胰岛素酶化细胞
3.	离心法转移细胞培养基和细胞小球
4.	轻轻敲打管壁, 去除上清和悬浮的细胞球。避免用移液器大力吸打或用Voetex 震荡, 以保证细胞的完整性
5.	用全培养基稀释细胞至20ml , 并用血球计计数
6.	用全培养基稀释细胞至200,000 细胞/ml





7.	轻轻的充分混合细胞悬浮液						
8.	灭菌条件下，向 96 孔板每孔分装 200 μ l 细胞悬浮液（40,000 细胞/孔）						
9.	孵育细胞并监测细胞密度，直到每个孔内细胞都汇合，这个过程大约需要 3 天						
10.	加热不含血清的培养基（D-MEM；Gibco）到 37 $^{\circ}$ C						
11.	用真空器抽气去除微孔板内的全培养基						
12.	向每个孔内更换 200 μ l 不含血清、预热的培养基，孵育 4-6h						
13.	在另一个 96 孔板的每个孔内分装 100 μ l D-MEM						
14.	第一和第二个孔不加 EGF（休眠细胞对照）。其余的孔内加入 EGF，浓度按倍比梯度从 0.2-100ng/ml。实验设计见图 1。						
15.	抽气法去除每个孔内的饥饿培养基						
16.	将分装微孔板内的 EGF 稀释溶液转移到含有细胞的微孔板内						
17.	37 $^{\circ}$ C 孵育 7.5min						
18.	准备新鲜的 固定缓冲液 ： <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr> <td>1\timesPBS</td> <td style="text-align: right;">45.0 ml</td> </tr> <tr> <td>37%甲醛</td> <td style="text-align: right;">5.0 ml</td> </tr> <tr> <td>3.7%甲醛</td> <td style="text-align: right;">50.0 ml</td> </tr> </table>	1 \times PBS	45.0 ml	37%甲醛	5.0 ml	3.7%甲醛	50.0 ml
1 \times PBS	45.0 ml						
37%甲醛	5.0 ml						
3.7%甲醛	50.0 ml						
19.	抽气法去除含有 EGF 的培养基，迅速加入 150 μ l 的新鲜 固定缓冲液 固定细胞，免摇动在室温条件下孵育 20min。 加固定缓冲液时，小心地用移液器沿管壁加入，避免使细胞分离						
20.	准备 Triton 洗脱缓冲液 ：						
21.	抽气法去除 固定缓冲液						
22.	用 Triton 洗脱缓冲液 分 4 次洗脱细胞，每次 200 μ l 5min，以保证可以渗透细胞 注意： <ul style="list-style-type: none"> ● 每次洗脱可在摇床上进行，室温条件下 5min ● 洗脱过程中，切勿让孔/细胞变干，每次操作之后快速加入洗脱液 						
23.	抽气法去除 Triton 洗脱缓冲液						
24.	每个孔内，小心地从管壁加入 150 μ l LI-COR Odyssey 封阻液（#927-40000），在摇床上缓慢摇动室温下孵育 1.5h。 注意： <ul style="list-style-type: none"> ● 一种封阻液不是对每对抗原-抗体的效果都理想的，某些一抗在不同的封阻液中可能会出现信号大幅度降低或表现非特异性条带。如果目标蛋白不能被检测，尝试更换一种封阻液可能会大大改善实验结果。如果以前化学发光所用的封阻液和一抗效果不错，那么在 In-Cell Western 中继续使用这个抗体和封阻液 ● Odyssey 封阻液于其他封阻液相比，具有更高的灵敏度和高稳定的表现。脱脂奶粉或干酪素溶于 PBS 也可用于封阻和稀释抗体。如果使用抗羊的的抗体，则脱脂奶粉封阻液会有干扰，而且即使 4$^{\circ}$C 条件下很容易腐败，所以难以长期保存，且只能在数天之内重复使用。如果使用干酪素，推荐在 0.2\timesPBS 缓冲液里浓度为 0.1% ● 也可使用含有 BSA 的封阻液，但某些情况下会造成背景过高，所以通常不推荐使用这类封阻液，除非一抗特别要求封阻液含有 BSA 						



25.	<p>在 LI-COR Odyssey 封阻液中稀释抗体要注意如下提示：</p> <p>一抗可以按照不同组合加入，通常一种抗体可以抗磷酸化目标蛋白，另一种抗体是抗目标蛋白（无论磷酸化状态如何）。下列建议的一抗组合取决于被检测的目标蛋白：</p> <ol style="list-style-type: none"> Phospho-EGFR Tyr1045（兔，1:100 稀释，CST 2237） Total EGFR（小鼠，1:500 稀释，Biosource International AHR5062） Phospho-EGFR Tyr1045（兔，1:100 稀释，CST 2237） Total ERK2（小鼠；1:75 稀释，Santa Cruz Biotechnology SC-1647） Phospho-ERK（小鼠，1:100 稀释，Santa Cruz Biotechnology SC-7383） Total ERK1（兔，1:200 稀释，Santa Cruz Biotechnology SC-94） Phospho-EGFR Tyr1045（兔，1:100 稀释，Cell Signaling Technology 2237） Phospho-ERK（小鼠，1:100 稀释，Santa Cruz Biotechnology SC-7383） 								
26.	在大批微孔内分别加入 50 μ l 的 LI-COR Odyssey 封阻液，作为由于近红外染料标记的二抗可能产生背景的对照。实验设计见图 1 的例子								
27.	在加入微孔前充分混合两种一抗溶液								
28.	抽吸其他微孔内的封阻液并加入 50 μ l 已混合好的一抗，一抗溶液应该覆盖管底								
29.	<p>室温条件下缓慢摇动，孵育一抗 2h</p> <p>注意：</p> <ol style="list-style-type: none"> 为达到最高的灵敏度，4$^{\circ}$C 不摇动孵育过夜 为防止细胞干燥，过夜孵育时需盖住微孔板 								
30.	<p>准备 Tween 洗脱液：</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%;">1\timesPBS</td> <td style="text-align: right;">995 ml</td> </tr> <tr> <td>20% Tween-20</td> <td style="text-align: right;">5 ml</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td>1\timesPBS + 0.1% Tween-20</td> <td style="text-align: right;">1000 ml</td> </tr> </table>	1 \times PBS	995 ml	20% Tween-20	5 ml			1 \times PBS + 0.1% Tween-20	1000 ml
1 \times PBS	995 ml								
20% Tween-20	5 ml								
1 \times PBS + 0.1% Tween-20	1000 ml								
31.	从管壁缓慢加入 Tween 洗脱液，以免使细胞分离。使用足量的洗脱液（200-500 μ l），在室温条件下缓慢摇动，洗脱 5min								
32.	重复洗脱步骤 4 次以上								
33.	<p>计算试验的二抗用量，在 Odyssey 缓冲溶液中稀释荧光标记的二抗注意如下提示。为了降低背景，加入 Tween-20 最终浓度为 0.2%</p> <ol style="list-style-type: none"> Goat anti-rabbit IRDyeTM 680 (1:200 dilution; LI-COR Cat# 926-32221) Goat anti-mouse IRDyeTM 800CW (1:800 dilution; LI-COR Cat# 926-32210) <p>建议稀释浓度范围：1:200-1:1,200</p> <p> 避免抗体试剂瓶长时间暴露在光线下</p>								
34.	充分混合抗体溶液，每个孔内加入 50 μ l 二抗溶液，室温下避光缓慢摇动，孵育 60min								
35.	<p>沿管壁加入 Tween 洗脱液（第 30 步），避免使细胞分离。使用足量的洗脱液（200-500μl），在室温条件下缓慢摇动，洗脱 5min</p> <p> 避光操作</p>								
36.	重复洗脱步骤 4 次以上								



37.	洗脱结束之后，从孔内完全去除洗脱液。翻转微孔板底部朝上，在纸巾轻轻敲打，去除残留的洗脱液。为了得到更好的效果，应立即扫描微孔板，当然也可以在 4℃ 避光保存数周
38.	扫描前，用无屑湿纸清洁扫描面板和微孔板底部
39.	用 700nm 和 800nm 两个通道同时扫描，均选择中等质量、169 μ m 的分辨率、3.0mm 的焦距、亮度为 5

III. 实验注意事项

微孔板的选择会显著影响实验结果，因为每种微孔板有各自的特性，包括孔深、孔板自身荧光和管与管之间的信号交叉。对于微孔板的选择请注意如下的事项：

- 微孔内的In-Cell Western 检测无液体存在，为避免结果出现管与管之间交叉信号，可使用黑管壁透明管底的微孔板。切勿使用白微孔板，因为白色管壁表面的自身荧光会产生显著的噪音信号
- In-Cell Western 要求使用灭菌微孔板做细胞培养，推荐使用如下的微孔板：
 - 96 well format Nunc™ (Part Number 161093, 165305)
 - 96 well format Falcon™ (Part Number 353075, 353948)
 - 384 well format Nunc™ (Part Number 164688, 164730)
 - 384 well format Falcon™ (Part Number 353961, 353962)
- Odyssey 对微孔板要求从扫描面板到微孔板的目标检测区域最大距离不超过 4.00mm 。如果使用上述推荐的微孔板，扫描时焦距为3.0mm
- 如果使用其它微孔板，则可能需要调高或调低焦距以优化分辨效果和检测效果。优化是必须的，先用0.5 、1.0、2.0、3.0 和4.0 分别扫描孔板内的试验样本和对照，选择结果信噪比最高的焦距作为扫描参数
- 为了达到最高灵敏度，扫描前孔板避光保存。如果扫描后需要保存孔板，则需在室温条件下或4℃避光保存
- 首次扫描可将700 和800 通道的亮度都设为5，如果扫描结果饱和或太亮，则再扫描时使用较低的亮度（如：2.5）。如果信号太弱，则调高亮度值（如：7.5）
- 扫描质量可选择中等到最低，扫描分辨率推荐为169 μ m，可在最短的时间内达到满意的结果。如果使用较高的扫描质量或分辨率，则需要更长的扫描时间
- 为了验证一抗的特异性，可像在孔板内一样做细胞裂解物的 WesternBlot，在 Odyssey 上检测，如果出现明显的非特异条带信号，则需要更换一抗，以避免In-Cell Western 结果中的非特异信号

IV. 实验结果

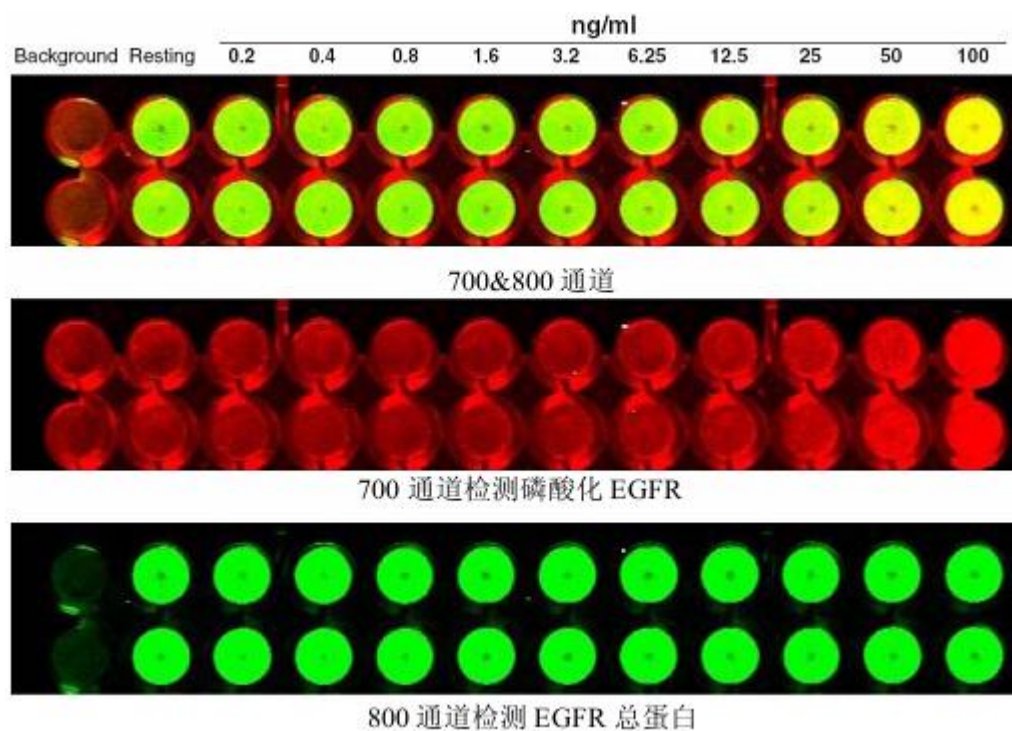
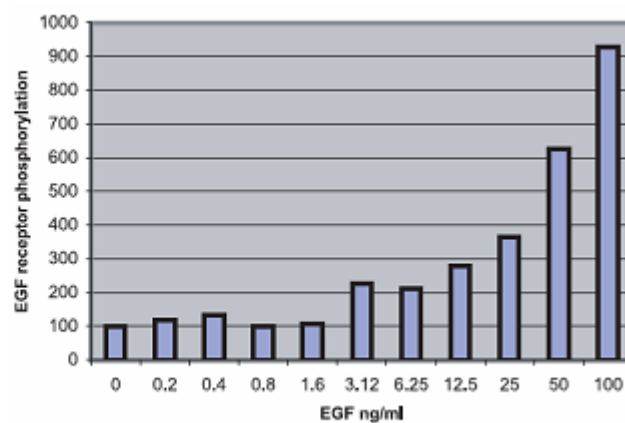


图 1. 通过磷酸化 EGFR (Tyr1045) 的特异抗体检测 A431 细胞对 EGF 的剂量效应。用 700 通道和 800 通道在 96 孔板上作 In-Cell Western 分别检测 EGFR 总蛋白 (作为校正蛋白) 和磷酸化 EGFR。背景孔内只加二抗而不含一抗。左图表示相对定量数值, 代表 EGFR 的磷酸化水平



EGF 刺激后同时定量检测 EGFR 磷酸化水平和 ERK 总蛋白

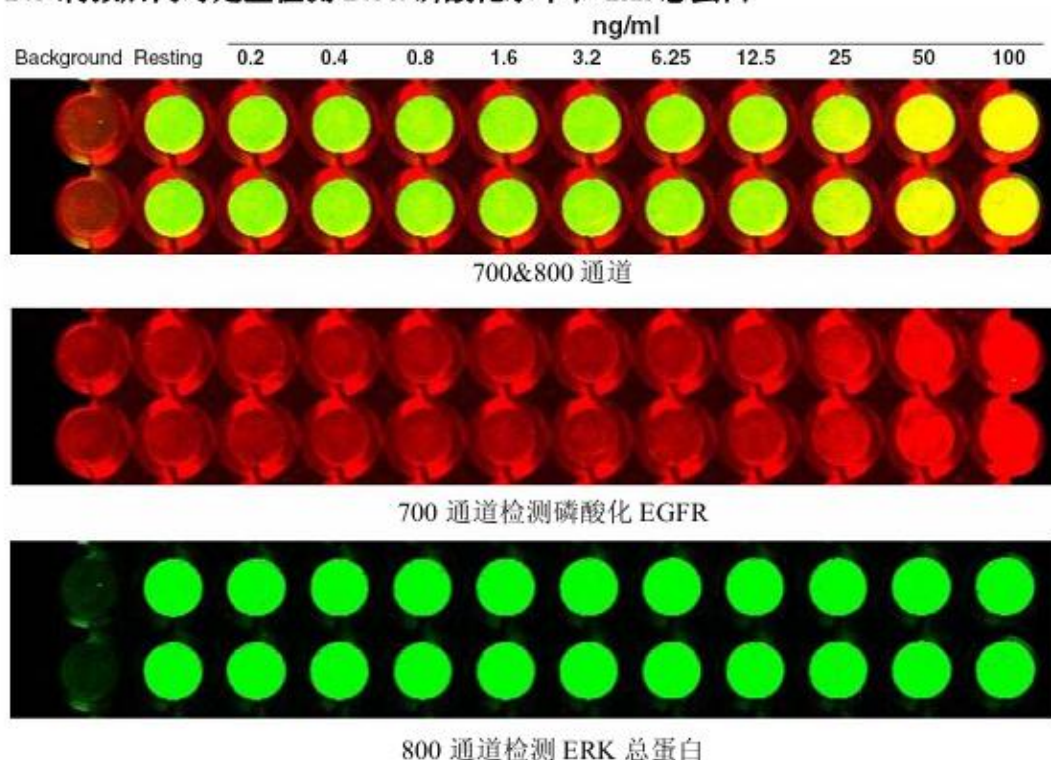
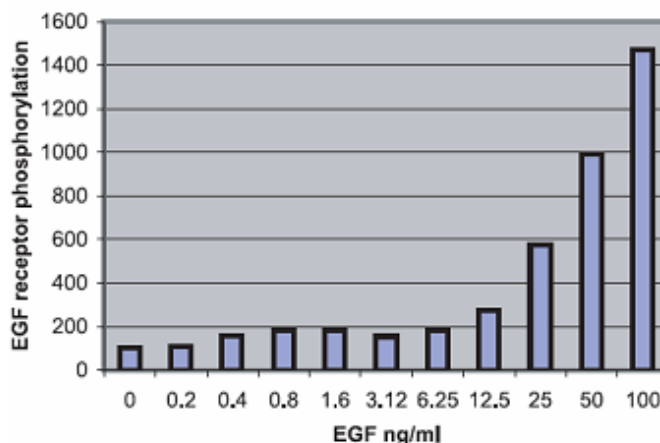


图 2. 通过磷酸化 EGFR (Tyr1045) 的特异抗体检测 A431 细胞对 EGF 的剂量效应。用 700 通道和 800 通道在 96 孔板上作 In-Cell Western 分别检测 ERK 总蛋白 (作为校正蛋白) 和磷酸化 EGFR。背景孔内只加二抗而不含一抗。左图表示相对定量数值, 代表 EGFR 的磷酸化水平



EGF 刺激后同时定量检测 ERK 磷酸化水平和 ERK 总蛋白

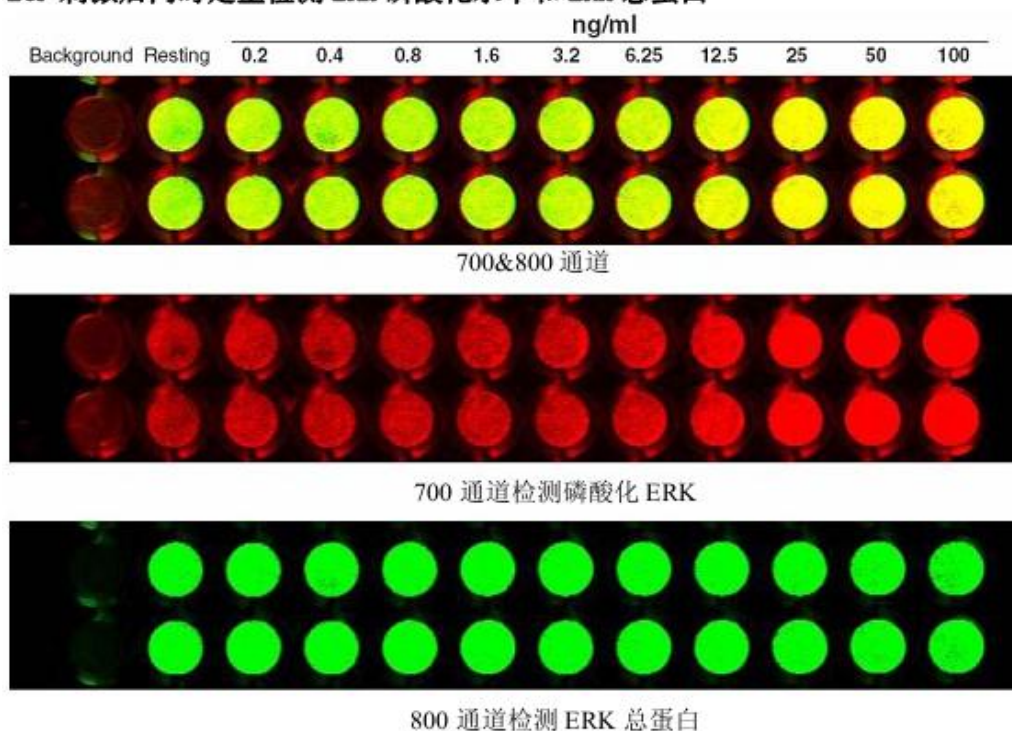
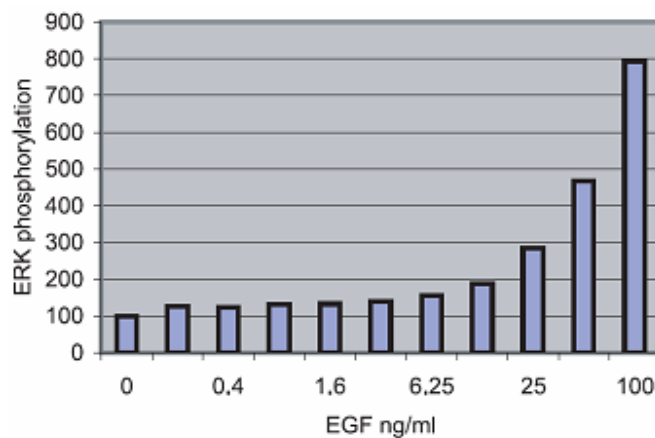


图 3. 通过磷酸化 ERK (Tyr204) 的特异抗体检测 A431 细胞对 EGF 的剂量效应。用 700 通道和 800 通道在 96 孔板上作 In-Cell Western 分别检测 ERK 总蛋白 (作为校正蛋白) 和磷酸化 ERK。背景孔内只加二抗而不含一抗。左图表示相对定量数值, 代表 ERK 的磷酸化水平



EGF 刺激后同时定量检测磷酸化 EGFR 蛋白和磷酸化 ERK 蛋白

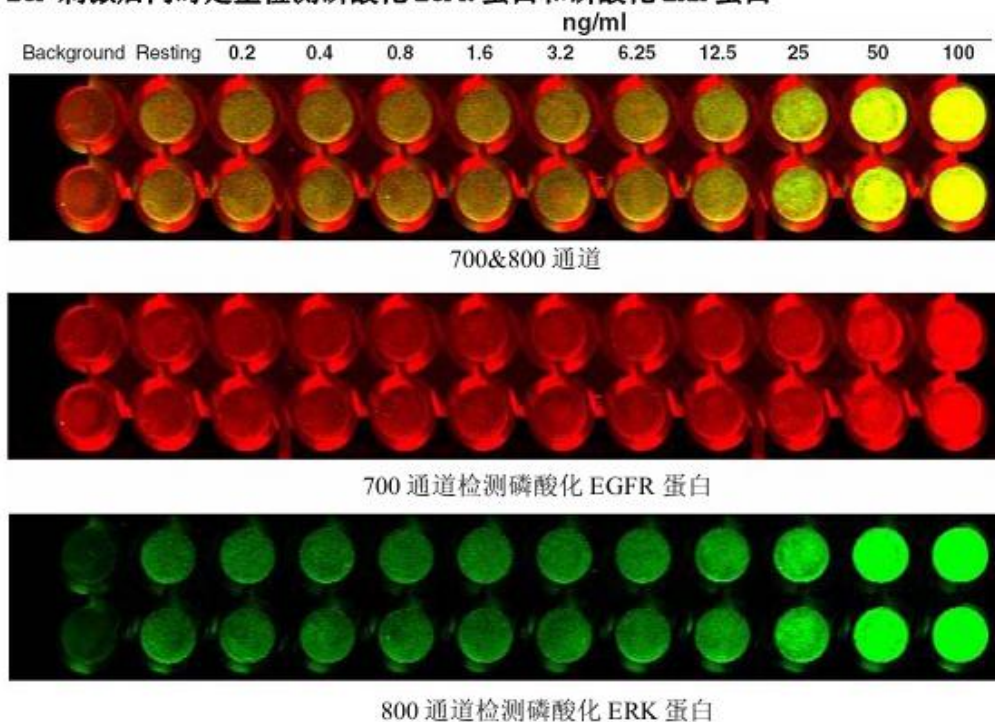
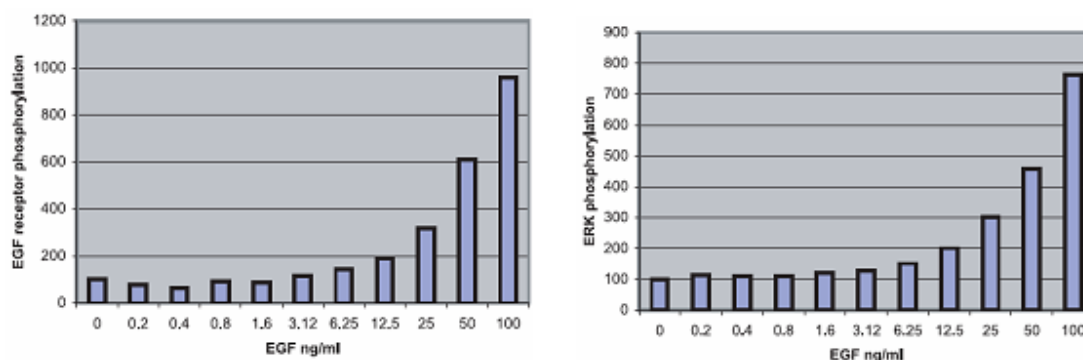


图 4. 通过磷酸化 EGFR 蛋白 (Tyr1045) 和磷酸化 ERK (Tyr204) 的特异抗体检测 A431 细胞对 EGF 的剂量效应。用 700 通道和 800 通道在 96 孔板上作 In-Cell Western 同时检测磷酸化 EGFR 蛋白和磷酸化 ERK 蛋白。背景孔内只加二抗而不含一抗。



常规Western Blot 验证In-Cell Western 信号的特异性

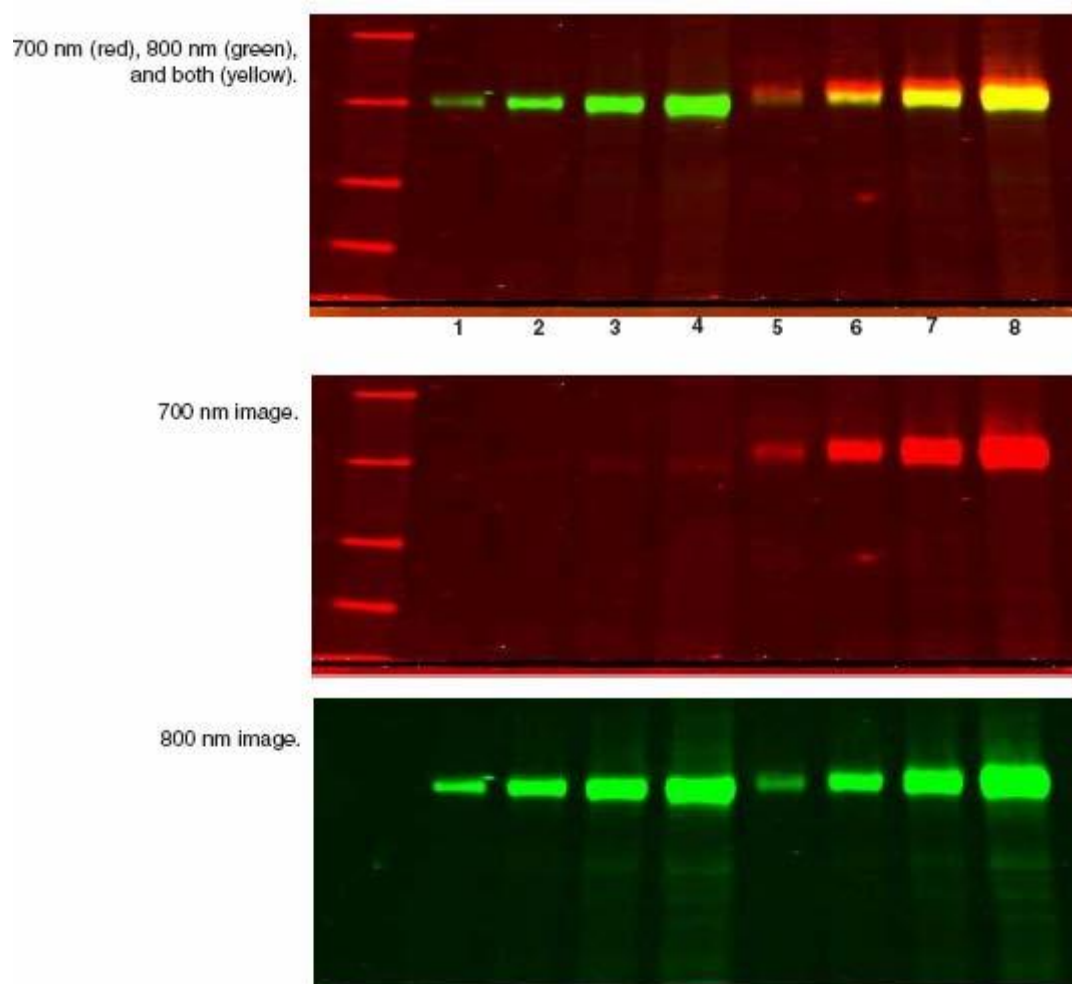
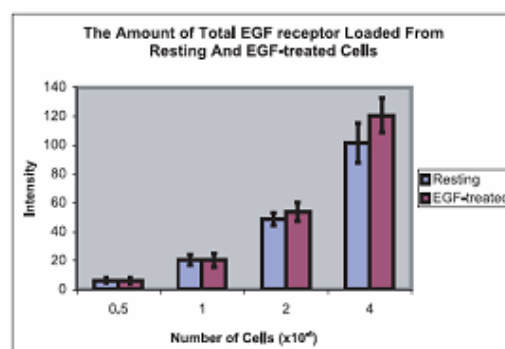
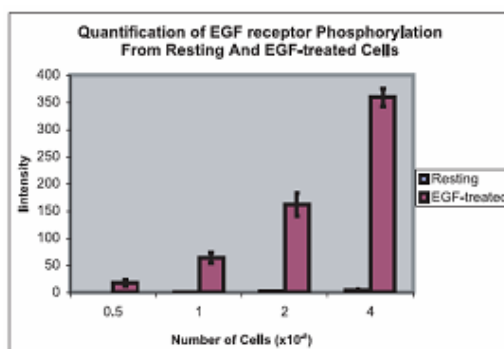


图 5. 同时在休眠细胞和 EGF 刺激 A431 细胞的裂解物中检测 EGFR 总蛋白和磷酸化蛋白。倍比稀释的休眠细胞裂解物（泳道 1-4）和倍比稀释 EGF 刺激的 A431 细胞裂解物（泳道 5-8）分别上样，然后再同时检测 EGFR 磷酸化蛋白（700 通道，红色）和 EGFR 总蛋白（800 通道，绿色）



在休眠细胞和EGF 刺激A431 细胞的裂解物中同时检测磷酸化EGFR 蛋白和 ERK 总蛋白

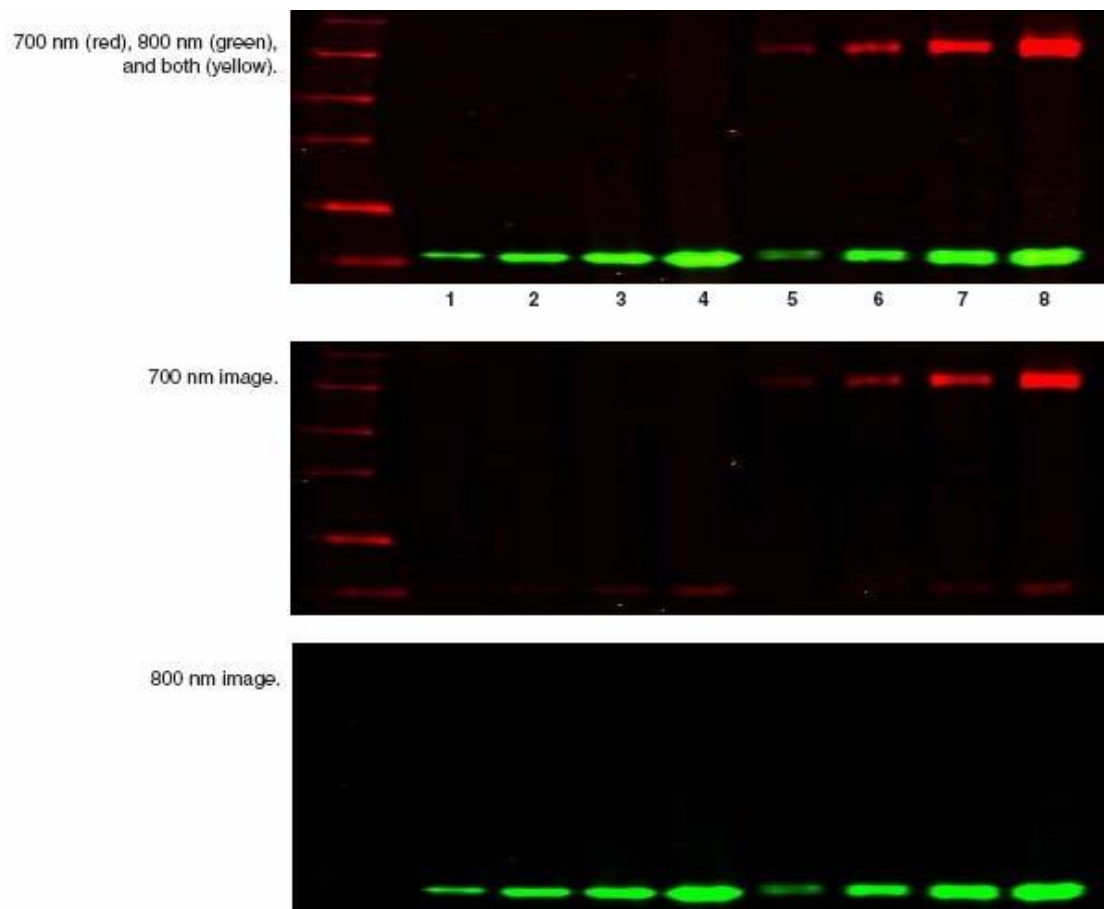
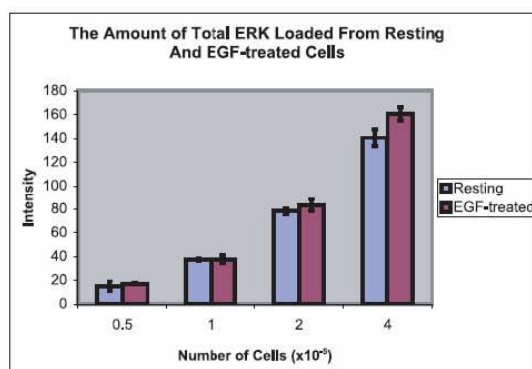
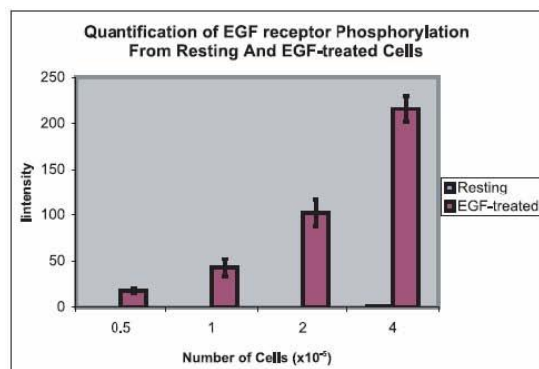


图6. 倍比稀释的休眠细胞裂解物（泳道1-4）和倍比稀释EGF 刺激的A431 细胞裂解物（泳道5-8）分别上样，然后再同时检测EGFR 磷酸化蛋白（700 通道，红色）和ERK 总蛋白（800 通道，绿色）



在休眠细胞和EGF 刺激A431 细胞的裂解物中同时检测ERK 总蛋白和磷酸化蛋白

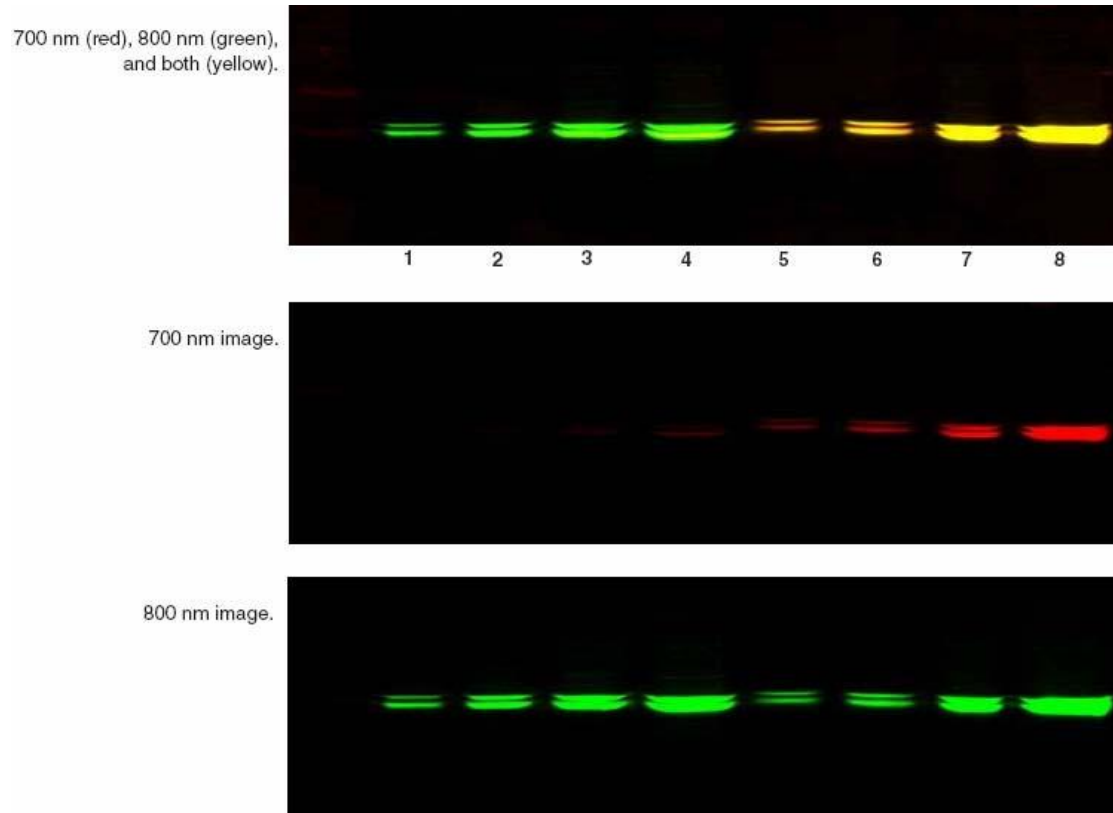
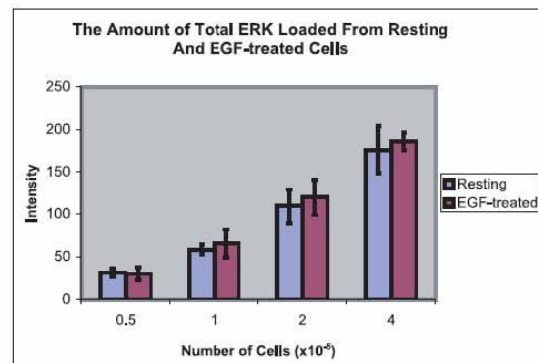
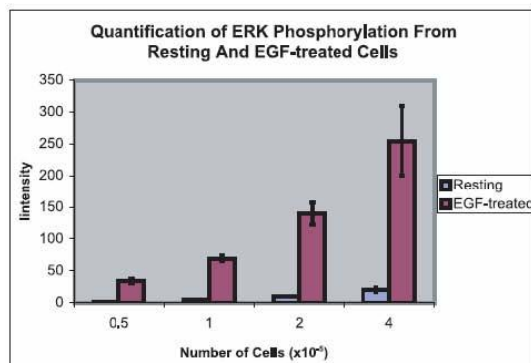


图7. 倍比稀释的休眠细胞裂解物（泳道1-4）和倍比稀释EGF 刺激的A431 细胞裂解物（泳道5-8）分别上样，然后再同时检测ERK 磷酸化蛋白（700 通道，红色）和ERK 总蛋白（800 通道，绿色）





Odyssey 抗体选购指南

货号	描述
800nm 通道红外荧光二抗	
926-32210	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), 0.5mg
926-32280	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgM (μ chain Specific), 0.5mg
926-32211	IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 0.5mg
926-32212	IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L), 0.5mg
926-32213	IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), 0.5mg
926-32214	IRDye 800CW Donkey anti-Goat IgG (H + L), 0.5mg
926-32218	IRDye 800CW Donkey anti-Chicken IgG (H + L), 0.5mg
926-32219	IRDye 800CW Goat anti-Rat IgG (H + L), 0.5mg
926-32411	IRDye 800CW Donkey anti-Guinea Pig IgG (H + L), 0.5mg
926-32232	IRDye 800CW Goat anti-Human IgG (H + L), 0.5mg
926-32350	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG ₁ Specific, 0.5mg
926-32351	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG _{2a} Specific, 0.5mg
926-32352	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG _{2b} Specific, 0.5mg
Odyssey 封阻液	
927-40000	Odyssey® Blocking Buffer, 500ml
货号	描述
700nm 通道红外荧光二抗	
926-32221	IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 0.5mg
926-32222	IRDye 680RD Donkey anti-Mouse IgG (H + L), 0.5mg
926-32223	IRDye 680RD Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), 0.5mg
926-32224	IRDye 680RD Donkey anti-Goat IgG (H + L), 0.5mg
926-32228	IRDye 680RD Donkey anti-Chicken IgG (H + L), 0.5mg
926-32229	IRDye 680RD Goat anti-Rat IgG (H + L), 0.5mg
926-32421	IRDye 680RD Donkey anti-Guinea Pig IgG (H + L), 0.5mg
ICW 相关试剂	
7263	PhosphoPlus® p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) In-Cell Duet
7255	PhosphoPlus®Akt (Ser473) In-Cell Duet
7261	PhosphoPlus® S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) In-Cell Duet
7257	PhosphoPlus® p38 MAPK (Thr180/Tyr182) In-Cell Duet
2855	Phospho-4E-BP1(Thr37/46) Rabbit mAb
9661	Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody

更多抗体、试剂及试剂盒信息，请咨询基因有限公司（021-64951899）



Odyssey 检测 Western Blot 的实验小贴士

步骤/问题	应用说明
膜的选择	建议选择 NC 膜或者低荧光背景的 PVDF 膜。
封闭	建议使用脱脂奶粉配置封闭液，不建议使用 BSA，封闭液中切勿含有 Tween-20，且在封闭的步骤完成之前都不要让膜接触到 Tween-20。因为 BSA 和 Tween-20 在 700nm 通道都产生自发荧光，会带来较高的背景。
孵育、洗涤	在孵育完二抗后，用 PBST 清洗完未结合的二抗，之后再再用 PBS 将膜进行清洗，以洗净 Tween-20。
双色检测	建议用 700nm 通道检测内参蛋白，用 800nm 通道检测目的蛋白。因为内参蛋白的表达量通常高于目的蛋白，而 800nm 通道的灵敏度高于 700nm 通道。在抗体的选择方面，一抗应当选择不同的种属来源。例如，我们要检测人细胞系来源的蛋白质 A（内参）和 B（目的），可以选择 Mouse 来源的 A 的一抗和 Rabbit 来源的 B 的一抗，将这两种一抗同时进行孵育；再用 IRDye 680（700nm 通道）标记的 Goat-anti-Mouse 的二抗和 IRDye 800CW（800nm 通道）标记的 Goat-anti-Rabbit 的二抗同时孵育膜以结合相应的一抗。在用 Odyssey 扫描时，可以适当调低 700nm 和提高 800nm 通道的检测强度。

