



# Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统培训手册



基因有限公司生命科学组

## 目 录

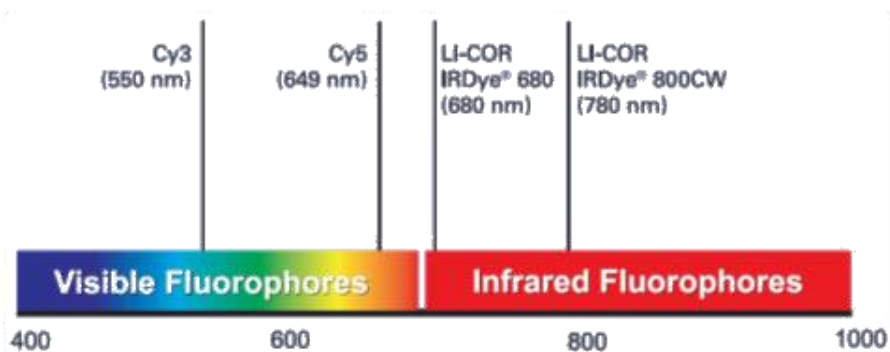
- 一、 Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统技术特点**
- 二、 系统安装条件**
- 三、 培训所需试剂设备及样品**
- 四、 安装及调试安排**
- 五、 培训程序及时间安排**
- 六、 仪器及试剂系统介绍**
- 七、 实验操作流程**
- 八、 软件操作流程**
- 九、 仪器使用注意事项**
- 十、 维护保养及常见问题处理**
- 十一、 附录**

## 一、Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统技术特点

大多数可见光谱荧光技术成像系统由于在可见光谱内具有很强的背景荧光,对于一些大分子的检测具有一定的局限性。

Odyssey 红外成像系统通过采用近红外荧光技术。近红外光谱具有低背景荧光可提供比可见光谱荧光更高的信噪比,而且灵敏度与化学发光相当,但不需要化学发光底物和胶片。Odyssey 红外成像系统采用双色染料同时检测,双色检测能够满足更多的检测需求,如,同一张膜上使用两种不同染料标记的的抗体以检测两种不同的蛋白。

### 系统原理



Odyssey 检测系统采用两个完全独立的检测通道——两种染料分别检测。2 个二极管激光器分别提供 685nm 和 785nm 的光源,2 个雪崩式光电二极管经过滤后检测 730nm 和 830nm 的荧光,因而可同时检测两种红外荧光染料的荧光信号。由于红外荧光染料的最大吸收值与 Odyssey 的两个红外激光器 680nm 和 780nm 激发波长相匹配,同时 IRDye700 和 IRDye800 的发射波长峰值相隔 100nm,因此可以给出最大的灵敏度和最小的信号交叉。

### 系统特点

1. 一台机器可同时实现近红外双色激光和化学发光实验。
2. 高灵敏度,无需信号放大步骤,信噪比高。
3. 近红外实验可直接检测,无需曝光和显色底物,不需要 X 光片,不需暗房,无放射废料产生,更环保。
4. 双色激光检测,可以在一次杂交中同时检测两种目的分子,直观,省时。
5. 宽广的线性范围,可用于高准确性定量。
6. 背景低,图像清晰,激光强度可调,不会丢失弱的信号。
7. 强有力的软件支持,结果分析和图象处理编辑很容易,简化了数据的管理和储存。

8. 系统操作和维护简单。

## 应用领域

应用领域：蛋白质研究。

具体包括：Western blot 分析， In-Gel Western 分析，考马斯亮蓝胶的扫描等。

## 二． 系统安装条件

1. 位置要求：稳定水平的操作平台放置设备，远离热源，避免阳光直射
2. 空间及载重要求：  
操作平台尺寸（长×宽×高）： 41.4 cm ×47 cm ×67.3 cm 仪器周围要留出至少 3cm 空隙，  
以方便散热。操作平台载重： 27kg。
3. 温度要求： 15-35℃，露点温度不超过 22℃。
4. 电源：通用插头 200-240 VAC (2 Amp); 50-60 Hz.。
5. 图像范围大小: 10 cm x 12 cm ；动态范围: 22 bit (>6 logs)。
6. 二极管激光器分别提供 685nm 和 785nm 的光源。
7. 其它：通用插头接线板（至少 3 个插孔）。

## 三． 培训所需试剂设备及样品

尊敬的用户，请提前准备以下物品。

1. Western Blot 实验所需试剂耗材（试剂详细配方可参考《分子克隆实验指南》）：

蛋白样品

SDS-PAGE 胶

电泳缓冲液

硝酸纤维素膜（NC 膜）或者 PVDF 膜

上样缓冲液

转膜缓冲液

PBS 或 TBS

封闭液

Tween-20

一抗

荧光标记的二抗 ( IRDye700 或 IRDye800 )

铝箔纸

Kimwipes®无尘纸(Kimberly-Clark 公司出品)

ddH<sub>2</sub>O

2. 其它配套试剂设备：

( 1 ) 蛋白电泳仪

( 2 ) 脱色摇床

( 3 ) 转膜仪

( 4 ) 分子生物学实验室常用工具：微量移液枪，枪头，量筒，离心管，离心机等。

## 四、安装及调试安排

1. 根据合同开箱验货，并明示到货情况
2. 系统安装
3. 系统调试及校准

## 五、培训程序及时间安排

请安排 2-4 名实验室长期工作人员参加培训，培训时间预计为一天，培训包括以下内容：

1. 基本原理讲解及讨论；
2. 软件基本功能综述及使用培训；
3. 用户实际操作及实验培训：

一般情况下，在 Western Blot 培训中我们将使用标准的测试 Western Blot 膜进行仪器使用和软件操作培训。如用户希望培训时用自己的样品进行实验，请根据第三部分内容提前做好相应实验准备，我们的培训将从二抗孵育开始，之前的 Western Blot 各实验步骤由用户自行完成。

## 六． 仪器及试剂系统介绍

1. 基本原理讲解。
2. 仪器系统组成和工作原理讲解。
3. 仪器基本注意事项。

## 七． 实验操作流程

### Western 操作参考流程 (以 PVDF 膜为例):

1. 吸去培养液，用预冷的 PBS 洗细胞两次。
2. 加入细胞裂解液，4℃放置 20min。
3. 用细胞铲刮下细胞，转移到 1.5ml 离心管，13000rpm，4℃，20min 取上清。
4. 取 20-100μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。
5. PVDF 膜用甲醇活化后于转移膜冲液中平衡，具体操作如下：  
用 100%的甲醇将膜浸湿后放置 1min  
用超纯水润洗后加入 1XTBS/PBS 浸泡 2min
6. 电泳胶置转膜缓冲液中平衡 20min。
7. 裁两张与胶同样大小的滤纸，置转膜缓冲液中平衡。
8. 转膜顺序：负极 - 转膜垫 - 专用滤纸 - 电泳胶 - PVDF 膜 - 专用滤纸 - 转膜垫 - 正极。
9. 电转后，封闭液中封闭 1hour。封闭液可以用 5%的进口脱脂奶粉 (用 PBS/TBS 溶解，若实验蛋白为磷酸化蛋白，则不能用 PBS)，因为 Tween-20 和 BSA 会对 Odyssey 造成高背景，在封闭完成前尽量不要让膜接触到这两种物质。
10. 封闭液稀释一抗，膜在一抗中室温 1h-4h 孵育或者 4℃过夜。

注：抗体的稀释倍数与抗体质量和实验中的蛋白样本相关，一般而言稀释比例在 1:200-1:5000，可以在抗体稀释液中添加 0.1-0.2% (终浓度) 的 Tween-20 来降低背景。

11. 用适当的 buffer 洗膜：1X TBS-T (0.1% Tween® 20) 或 1XPBS-T (0.1% Tween 20) 室温摇床洗膜 4 次，每次 5min。
12. 封闭液稀释二抗 (推荐 1:20000 稀释，可根据实际调整稀释比)，将稀释的二抗覆盖膜，室温摇床孵育 60min (注意避光)。

注:如果一抗稀释液中含有 0.1-0.2%的 Tween-20 ,则二抗稀释液也添加相同的 Tween-20 ,  
若使用 PVDF 膜可以加入终浓度为 0.01% SDS 以降低背景。

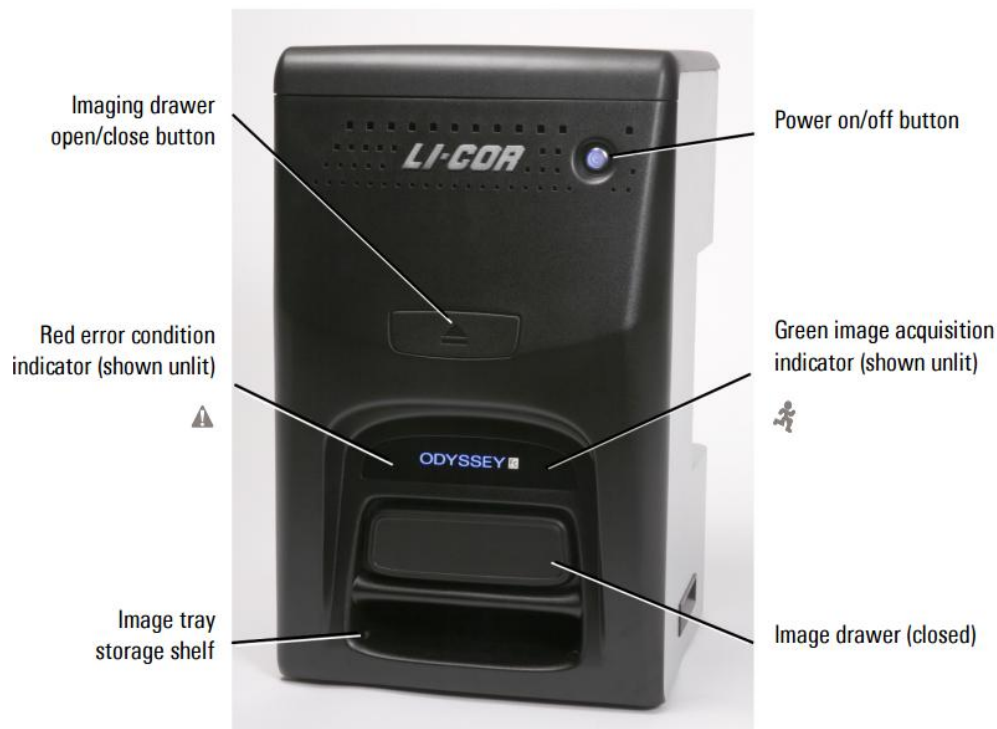
13. 用 1X TBST 或 PBST 摇床洗膜 4 次, 每次 5min。

14. 用 1X TBS/PBS 洗一次, 去除膜上残留的 Tween-20 , 接下来可直接进行扫描。

## 八. 软件操作流程

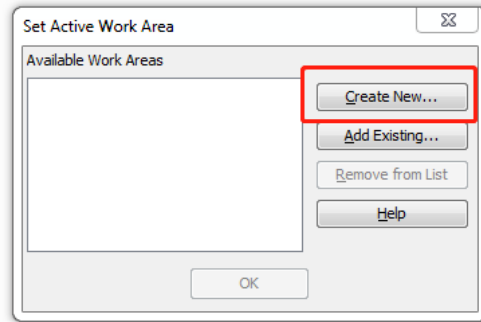
### (一) 开主机和软件

按住 Power 打开机器, Green image acquisition indicator 指示灯亮起, 双击电脑上的软件图标



### (二) 设置工作区域

首次点开软件图标, 系统会弹出 Set Active Work Area 对话框, 要求建立一个工作区域, 用于储存图片、分析结果和设置等信息。点击 Create New 按钮, 选择一个目录作为工作区域, 然后点 OK 确认。



### (三) 获取图像

#### 1. 放置样品

(1) 将大小不超过 10 x 12 cm 的膜或胶放入成像托盘(Imaging tray)中, 正面向上, 膜顶部向着机器后方。调整膜或胶的位置, 使之不超出托盘边界标识。

(2) 按下 Imaging drawer 按钮打开成像抽屉, 放入成像托盘, 按下 Imaging drawer 按钮关闭成像抽屉。

#### 2. 获取图像

(1) 点击 Acquire 标签, 显示图像获取功能界面。



(2) 确认状态栏显示“Ready”, 表示机器和软件是连通的。

(3) Setup 中将分析类型设为 “None”。

(4) 选择检测通道。对于用 EB 染料或者其他类似染料(如 SYBR 安全染料)的 DNA 胶, 单选 600 通道。对于红外荧光来检测胶或膜, 可选 700 或 800 通道。对于化学发光检测, 单选 Chemi 通道。对于考马斯亮蓝胶, 单选 700 通道。

(5) 标准模式下拖动滚轴, 可选择固定的时间。点击 Channel 旁边的箭头, 可切换到拓展模式, 选择任意的时间

(6) 参数设置完毕, 点击“Acquire Image”获取图像。

(7) 若需要在获取图像过程中停止操作, 可点击 cancel 进行停止。



### 3.查看图片和数据

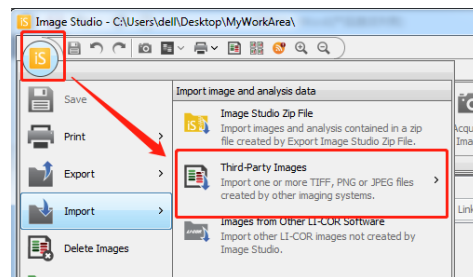
图片会出现在屏幕上。图片数据则出现在图片下方的表格中。双击表格的 Image Name 处，可修图片名字。

#### (四) 导入及导出

##### 1. 导入图片或 Zip 格式文件

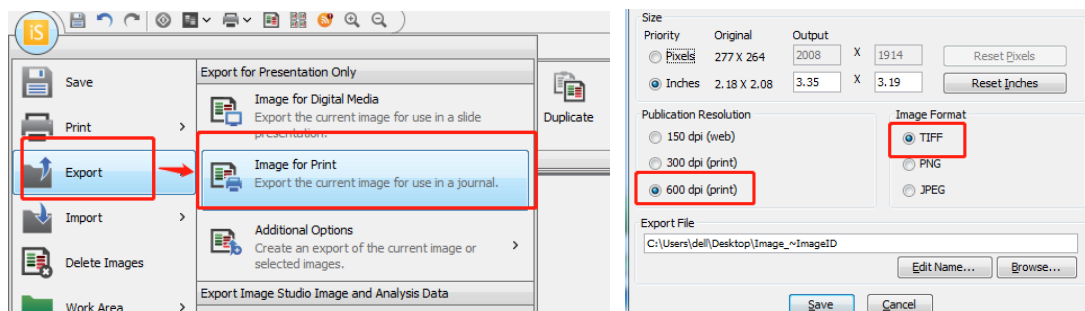
(1) 点击 Application Menu 按钮，将鼠标移动到 Import，选择 Third-Party Images/ Image Studio Zip File。

(2) 到目录下选择文件，点击 Open。

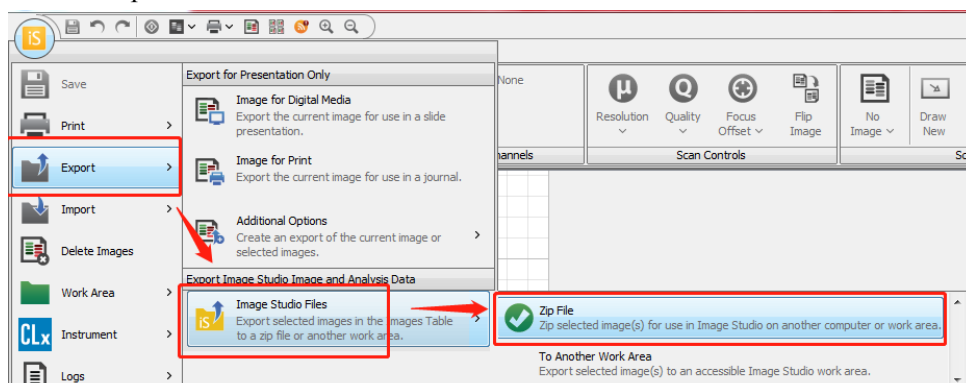


##### 2. 导出图片或 Zip 格式文件

(1) 点击 Application Menu 按钮，将鼠标移动到 export，在 Image for Print 栏中选择需要导出的图片类型及分辨率，文章发表推荐 600dpi，TIFF 格式。

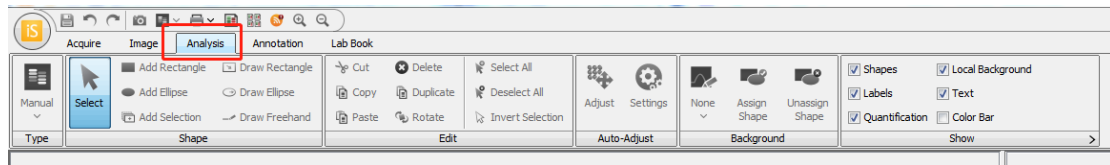


(2) 点击 Application Menu 按钮，将鼠标移动到 export，在 Export Image Studio and Analysis Data 中选中 Zip File 即可导出包括分析数据的文件



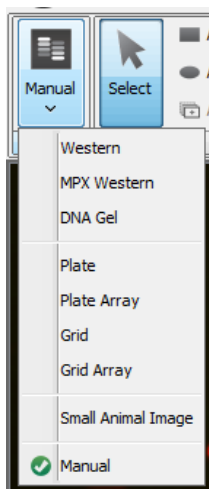
## (五) Analyze

### 1. Analyze 栏介绍



#### (1) 分析方式选择

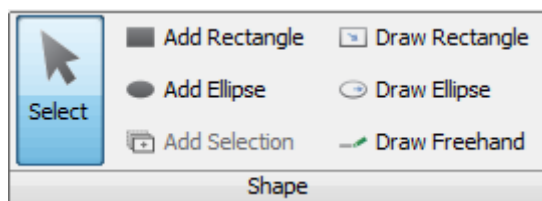
在“Type”栏内选择需要的分析方式



<b>Western</b>	Western Blot 自动分析
<b>MPX Western</b>	多重 Western Blot 自动分析
<b>DNA Gel</b>	DNA 胶自动分析
<b>Plate</b>	孔板自动分析
<b>Plate Array</b>	板式芯片自动分析
<b>Grid</b>	网格模式自动分析
<b>Grid Array</b>	网格芯片自动分析
<b>Small Animal Image</b>	小动物成像分析
<b>Manual</b>	手动分析

#### (2) 形状选择

在“Shape”栏选择需要添加的选框形状。点击 Select 按钮或键盘上 Esc 键，可对图形进行拖动，当图形上出现箭头可拉动箭头改变图形大小。点击键盘上 Del 键可删除图形。



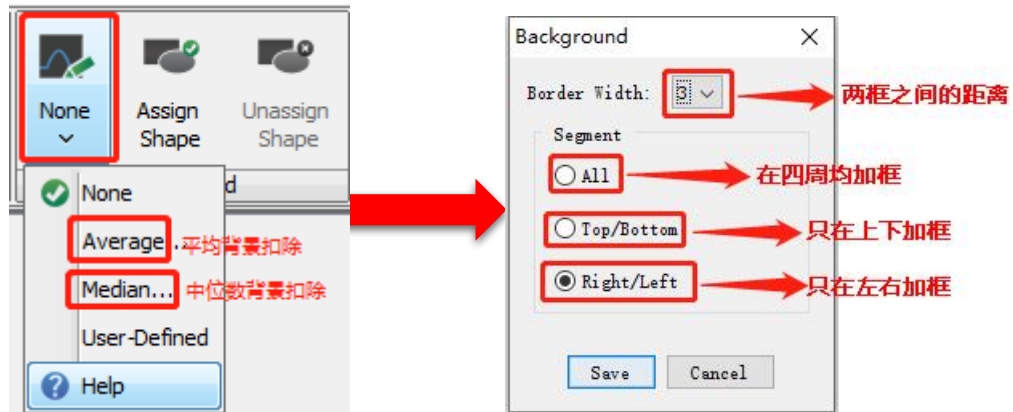
<b>Add Rectangle</b>	自动添加矩形
<b>Draw Rectangle</b>	自定义添加矩形
<b>Add Ellipse</b>	自动添加椭圆
<b>Draw Ellipse</b>	自定义添加椭圆
<b>Add Selection</b>	对选中的框进行复制添加

#### (3) 背景扣除

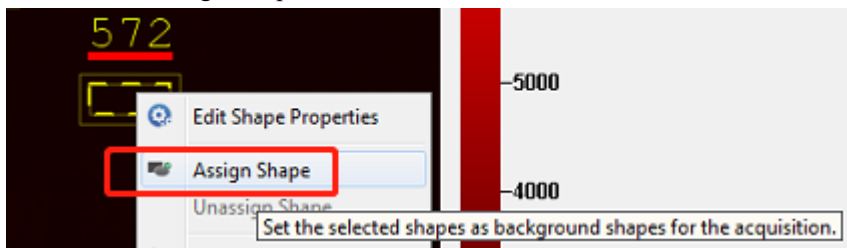
a. 在“Background”界面选择背景扣除方式以及扣除区域，推荐选择“Median”

若左右两个条带靠得较近，可以选择扣除目的条带框及背景框上下的背景

若上下两个条带靠得较近，可以选择扣除目的条带框及背景框左右的背景

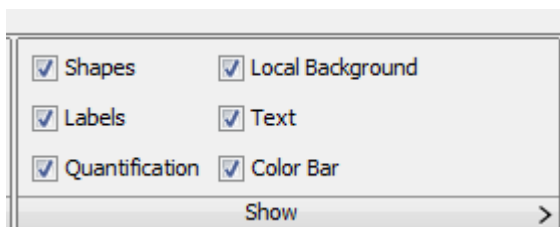


b.自定义背景扣除：点击“Draw Rectangle”或“Add Rectangle”按钮，在图像上选框后点击右键，选择“Assign Shape”。



### (3) 图像显示

在“show”界面，选择框选条带的显示信息。

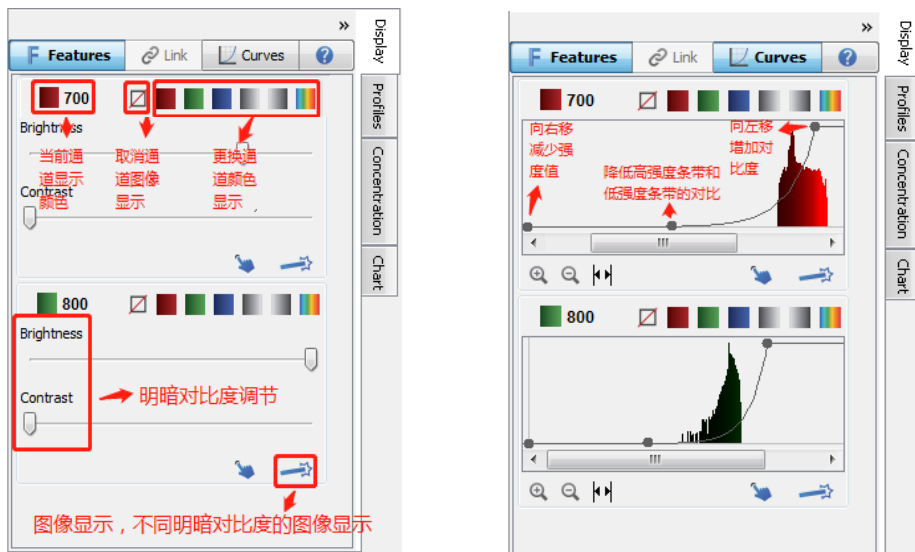


Shapes	显示形状
Local Background	背景信号值
Labels	标签
Text	注释
Quantification	定量
Color Bar	色条

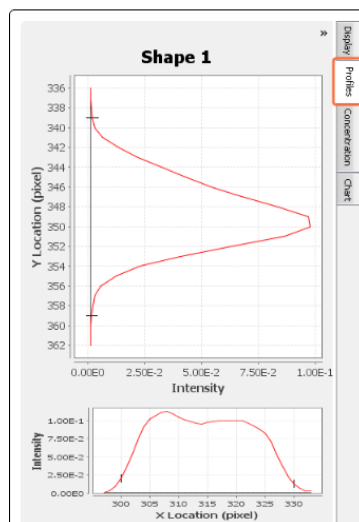
## 2.Display

(1) Features，点击“Features”用于切换图像上标注的显示或隐藏。

(2) 图像调节，点击 curves 可切换调节模式，具体调节情况如下图所示



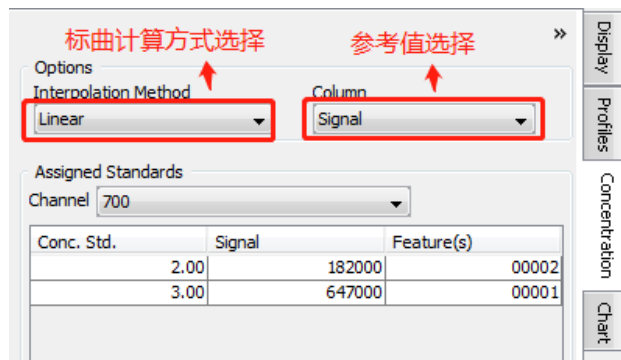
(3) profiles 用于查看选中条带的像素强度及位置



(4) concentration, 用于绝对定量中未知样品浓度计算

①在“columns”添加  标准曲线浓度和浓度选项

②在“concentration”中选择标曲计算方式和参考值

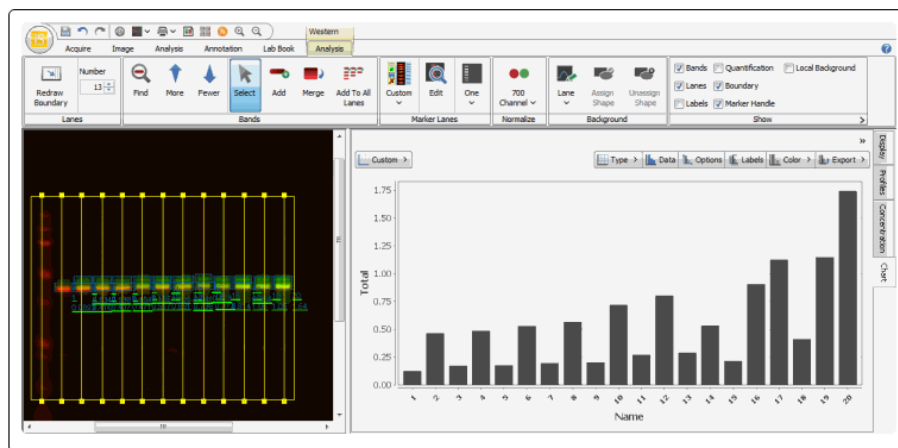


- ③在“Shape”栏中输入标准样品的浓度值(至少需要定义两个点),即可在 concentration 栏中得到相应未知样品浓度,具体如下图所示:

Image Name	Channel	Name	Signal	Total	Area	Bkgnd.	Type	Sensitivity	Conc. Std.	Concentration
0001076_03	700	2	182000	318000	171	794	Signal		2.00	2.00
0001076_03	700	1	647000	786000	176	794	Signal		3.00	3.00
0001076_03	700	3	205000	363000	200	794	Signal			2.05
0001076_03	700	4	137000	365000	288	794	Signal			1.90

## (5) Chart

选中相关的条带,可以在“Chart”界面查看图表结果



## (6) 结果查看


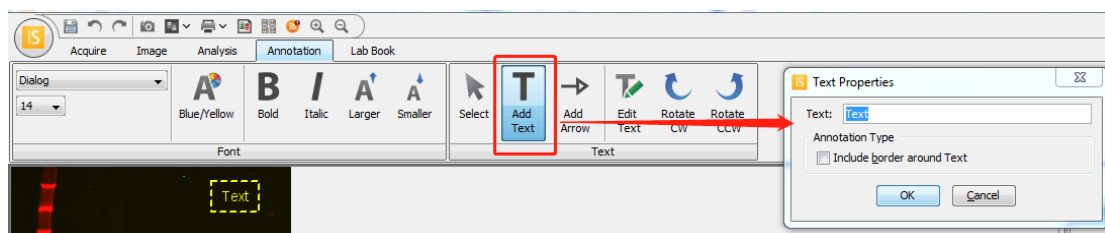
在软件下边栏“shapes”处可查看数据结果,点击“columns”添加需要查看的选项,  导出结果,或者可以通过复制导出结果。

Image Name	Channel	Name	Signal	Total	Area	Bkgnd.	Type	Sensitivity	Conc. Std.	Concentration
0001076_03	700	2	182000	318000	171	794	Signal		2.00	2.00
0001076_03	700	1	647000	786000	176	794	Signal		3.00	3.00
0001076_03	700	3	205000	363000	200	794	Signal			2.05
0001076_03	700	4	137000	365000	288	794	Signal			1.90
0001076_03	700	5	0.00	55600	70	794	Background			1.61

## (六) 图像添加注释

1. 点击 Annotation 栏,选择 Add,在图上需添注释处点击,出现文本框,输入添加的文本。勾选 Include border around Text 可在文本外加框,选 Arrow 在图上加箭头。双击文本,可进行修改。

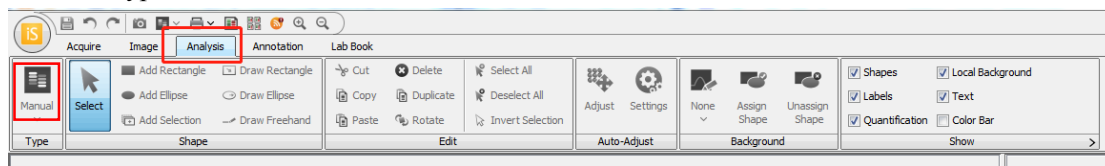


2. 点 Select 或键盘 Esc 键, 选择添加的注释, 可进行拖动, 或选 Edit Text 可修改文本, 或选 Rotate CW/Rotate CCW 可顺时针/逆时针旋转文本, 或选 Font 栏的 Bold、 Italic、 Larger 和 Smaller 可对文本进行粗体、斜体、变大和变小操作。
3. 若选定的是箭头, 可点击 Increase 或 Decrease Length 改变其长度。在 Font 栏选择可改变其大小。

## (七) 数据分析举例

### 1、手动模式

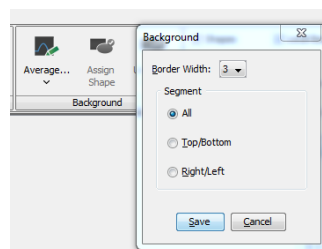
(1) 在“type”栏内选择“manual”模式





(2) 在“shape”栏内选择“Add Rectangle”, 框选出需要分析的条带。



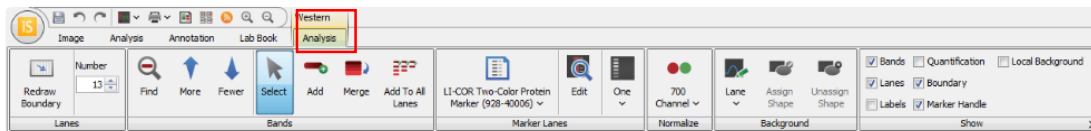
(3) 在“Background”界面选择背景扣除方式以及扣除区域。



(4) 在软件下边栏“shapes”处可查看数据结果, 点击 “columns” 添加  需要查看的选项,  Report > 导出结果, 或者可以通过复制导出结果。

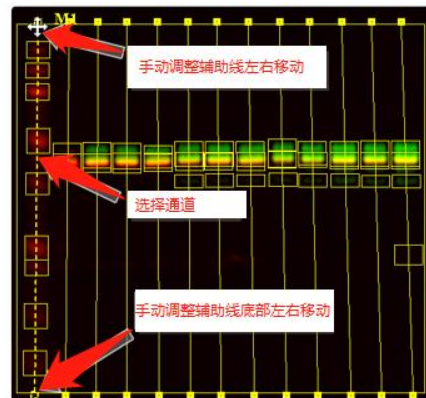
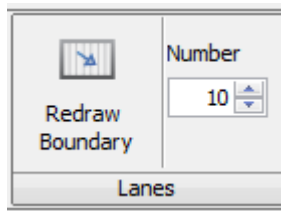
### 2. Western 模式

(1) 在“type”栏内选择“western”模式



## (2) 区域选定

在“Lanes”中点击“Redraw Boundary”，通过在图像中画框，确定条带的区域；在“Number”中填写条带数目，尽量让竖线穿过条带中央，可以按照下图所示的模式调整图像



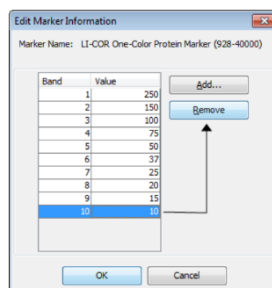
## (3) 条带选择

点击“find”查找条带，点击“more”或“less”调整系统选择的条带数量。

在“bands”栏内，点击“Add”图标可在任意位置上添加条带，点击 **Add to All Lanes** 可在任意行添加条带，点击 **Merge** 合并同一泳道的相邻条带。

## (4) Marker 设置

在“Marker Lanes”栏中，点击 **Select Marker Lanes Set list** 选择对应大小的 marker。点击 **Edit** 可以编辑选中的预设 marker。



## (5) 均一化设置


- 将 700 channel 或 800 channel 定义为均一化通道，其中“Normalization Factor”为均一化通道中，相应条带信号值除以最高的条带信号值。“Normalization Signal”为信号值除以“Normalization Factor”。

- 在背景选择中选择适合的背景定义型

Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
9999999_01	700	M1	B09	1.06	15.0	840	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B08	1.56	20.0	840	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B07	1.41	25.0	532	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B06	6.43	37.0	784	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B05	2.70	50.0	784	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B04	8.09	75.0	728	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B03	7.19	100	560	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B02	2.56	150	504	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B01	1.43	250	672	NaN	NaN
9999999_01	800	L12	B03	0.0773	50.9	612	0.107	0.725
9999999_01	700	L12	B01	14.0	62.1	680	19.3	0.725
9999999_01	800	L12	B02	1.30	63.2	714	1.79	0.725
9999999_01	800	L12	B01	0.403	69.9	408	0.555	0.725
9999999_01	800	L11	B03	0.0466	50.9	544	0.0792	0.588
9999999_01	700	L11	B01	11.4	62.1	680	19.3	0.588
9999999_01	800	L11	B02	0.841	63.2	714	1.43	0.588
9999999_01	800	L11	B01	0.255	69.9	408	0.433	0.588
9999999_01	800	L10	B03	0.0635	51.2	544	0.0970	0.655
9999999_01	700	L10	B01	12.6	62.1	680	19.3	0.655
9999999_01	800	L10	B02	1.12	63.2	714	1.71	0.655

## (6) 数据查看

选择“Western Bands”查看相关数据

在软件下边栏“shapes”处可查看数据结果，点击“columns” 添加需要查看的选项，


 Report > 导出结果，或者可以通过复制导出结果。

Image Name	Channel	Lane Name	Name	Signal	Size	Area	Normalized Signal	Normalization Factor
9999999_01	700	M1	B09	1.06	15.0	840	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B08	1.56	20.0	840	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B07	1.41	25.0	532	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B06	6.43	37.0	784	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B05	2.70	50.0	784	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B04	8.09	75.0	728	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B03	7.19	100	560	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B02	2.56	150	504	NaN	NaN
9999999_01	700	M1	B01	1.43	250	672	NaN	NaN
9999999_01	800	L12	B03	0.0773	50.9	612	0.107	0.725
9999999_01	700	L12	B01	14.0	62.1	680	19.3	0.725
9999999_01	800	L12	B02	1.30	63.2	714	1.79	0.725
9999999_01	800	L12	B01	0.403	69.9	408	0.555	0.725
9999999_01	800	L11	B03	0.0466	50.9	544	0.0792	0.588
9999999_01	700	L11	B01	11.4	62.1	680	19.3	0.588
9999999_01	800	L11	B02	0.841	63.2	714	1.43	0.588
9999999_01	800	L11	B01	0.255	69.9	408	0.433	0.588
9999999_01	800	L10	B03	0.0635	51.2	544	0.0970	0.655
9999999_01	700	L10	B01	12.6	62.1	680	19.3	0.655
9999999_01	800	L10	B02	1.12	63.2	714	1.71	0.655

## (八) 关闭机器

关闭成像抽屉，短按电源开关，关闭机器。



## 九． 仪器使用注意事项

1. 为了保证实验结果，推荐使用 Immobilon®-FL PVDF 膜或 NC 膜。
2. 不要用手直接拿膜，建议用平头镊子夹取膜的边角，以免在膜上留下手印，影响实验结果。
3. 扫膜前，建议用滚轮将气泡赶掉。
4. 操作环境的温度应保持在 15-35℃，露点温度不超过 22℃，以保证激光头的正常工作。
5. 确保仪器后部的通风口保持畅通。
6. 将湿膜放在放入成像托盘(Imaging tray)中，调整其位置，使之不超出托盘边界标识。少量液体可保持膜或胶的湿润，但液体量不能过多，以避免扫描时液体流入机器内部。
7. 扫描时，请不要打开仪器的成像抽屉。
8. 扫描完成以后，请及时清洁成像托盘，清洁方法见维护保养章节。
9. 请避免频繁的开关机。
10. 请不要在安装操作软件的电脑上安装其它无关程序和上网，以保持系统的稳定。

## 十． 维护保养及常见问题处理

1. 由于仪器在保养中需要移动，须在保养前取出成像托盘(Imaging tray)和其他机器内含物。
2. 在保养前，机器必须先断电。
3. 用湿布和温水清洁机器外部（擦拭过程中，布不能过湿）。
4. 清洁成像托盘时，先移出托盘里的样品，然后用 100%甲醇清洁托盘，然后再用水清洗干净，最后擦干或空气晾干。注意：切勿用丙酮清洁成像托盘，以免损坏托盘。
5. 托盘要远离化学溶剂和可燃物。待彻底干燥后才可以使用。
6. 检测连接线和电源有否磨损、线圈外露或接头松动。
7. 检查仪器后部通风口是否有灰尘，如有灰尘要及时清理。
8. 如机器出现不响应的状态，可按住电源开关至少 5 秒关闭机器。然后检查机器的连接线是否连好，然后再重启机器。如还有问题，可向相关技术和维修部门获取帮助和信息。

## 十一、附录

### 1. 通道参数 (各通道的激发/发射光波长)

Channel	Excitation	Emission
600 nm	520 nm	600 nm
700 nm	685 nm	730 nm
800 nm	785 nm	830 nm
Chemiluminescence	none	Visible

### 2. Licor Fc 600 通道适用染料

Odyssey Fc 包含一个 532nm 的散射光源, (支持最大 520nm 激发光以及最大 600nm 的检测波长)。适用于 Ethidium Bromide 以及 SYBR Safe DNA stain 的染色检测, 可以用于琼脂糖胶检测。支持 SYBR Green I (Life Technologies), GelStar (FMC), Gel Red™(Biotium), Gel Green™ (Biotium) 以及 Nancy-520 (Sigma) stains 染料的检测。

### 3. Licor 商品化的荧光标记二抗 (IRDye800CW 和 IRDye680RD/LT), 详细信息可参见以下链接

<https://www.licor.com/bio/reagents/irdye-secondary-antibodies>

#### (1) 800 通道二抗

Name	Host	Reactivity	Target Isotype
IRDye <sup>®</sup> 800CW Donkey anti-Chicken IgG (H + L)	Donkey	Chicken	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Donkey anti-Goat IgG (H + L)	Donkey	Goat	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Donkey anti-Guinea Pig IgG (H + L)	Donkey	Guinea Pig	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L)	Donkey	Mouse	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L)	Donkey	Rabbit	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Human IgG (H + L)	Goat	Human	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Goat	Mouse	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgG <sub>1</sub> -Specific	Goat	Mouse	IgG <sub>1</sub>
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgG <sub>2a</sub> -Specific	Goat	Mouse	IgG <sub>2a</sub>
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgG <sub>2b</sub> -Specific	Goat	Mouse	IgG <sub>2b</sub>
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Mouse IgM (μ chain specific)	Goat	Mouse	IgM
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	Goat	Rabbit	IgG
IRDye <sup>®</sup> 800CW Goat anti-Rat IgG (H + L)	Goat	Rat	IgG

## ( 2 ) 700 通道二抗

Name	Host	Reactivity	Target Isotype
IRDye <sup>®</sup> 680RD Donkey anti-Chicken IgG (H + L)	Donkey	Chicken	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Donkey anti-Goat IgG (H + L)	Donkey	Goat	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Donkey anti-Guinea Pig IgG (H + L)	Donkey	Guinea Pig	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Donkey anti-Mouse IgG (H + L)	Donkey	Mouse	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Donkey anti-Rabbit IgG (H + L)	Donkey	Rabbit	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Goat anti-Human IgG (H + L)	Goat	Human	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Goat	Mouse	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Goat anti-Mouse IgM (μ chain specific)	Goat	Mouse	IgM
IRDye <sup>®</sup> 680RD Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	Goat	Rabbit	IgG
IRDye <sup>®</sup> 680RD Goat anti-Rat IgG (H + L)	Goat	Rat	IgG

4.start kit 信息如下所示，具体可参见链接：

<https://www.licor.com/bio/reagents/western-blotting-kits>

Start kit	
Product Ordering Information	Components
Odyssey® Western Blotting Kit I RD [P/N 926-32081]	IRDye® 800CW Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (TBS) Blocking Buffer 10 Immobilon®-FL PVDF Membranes (0.45 µm, 10 cm x 10cm)
Odyssey® Western Blotting Kit II RD [P/N 926-32082]	IRDye 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (PBS) Blocking Buffer 10 Immobilon®-FL PVDF Membranes (0.45 µm, 10 cm x 10cm)
Odyssey® Western Blotting Kit III RD [P/N 926-32083]	IRDye® 800CW Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (PBS) Blocking Buffer 10 Odyssey Nitrocellulose Membranes (0.22 µm, 7 cm x 8.5 cm)
Odyssey® Western Blotting Kit IV RD [P/N 926-32084]	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (PBS) Blocking Buffer 10 Odyssey Nitrocellulose Membranes (0.22 µm, 7 cm x 8.5 cm)
Odyssey® Western Blotting Kit V RD [P/N 926-35010]	IRDye® 800CW Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (TBS) Blocking Buffer 10 Immobilon®-FL PVDF Membranes (0.45 µm, 10 cm x 10cm)
Odyssey® Western Blotting Kit VI RD [P/N 926-35011]	IRDye 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (TBS) Blocking Buffer 10 Immobilon®-FL PVDF Membranes (0.45 µm, 10 cm x 10cm)
Odyssey® Western Blotting Kit VII RD [P/N 926-35014]	IRDye® 800CW Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (TBS) Blocking Buffer 10 Odyssey Nitrocellulose Membranes (0.22 µm, 7 cm x 8.5 cm)
Odyssey® Western Blotting Kit VIII RD [P/N 926-34015]	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) IRDye 680RD Goat anti-Mouse Secondary Antibody (0.1 mg, 1 mg/mL) 500 mL Intercept™ (TBS) Blocking Buffer 10 Odyssey Nitrocellulose Membranes (0.22 µm, 7 cm x 8.5 cm)

## 5. 常见问题及解决方法

问题：高背景，且背景均匀分布	
可能原因	建议
封闭液中有 Tween-20 存在	在封闭完成前不要让膜接触到 Tween-20
封闭液中有 BSA	永远不要将 BSA 用于封闭或者抗体稀释，BSA 会造成不可逆的高背景
没有使用最佳的封闭试剂	对不同的封闭液进行比较找到最适合自己的体系的封闭液；另外可以延长封闭时间
硝酸纤维素膜上的背景	在稀释的抗体中加入 Tween-20 从而降低背景。Tween-20 的浓度需要根据所用的一抗进行优化，一般为 0.05-1%

PVDF 膜上的背景	减少或者除去稀释抗体中的 Tween-20 特别是在使用牛奶作为封闭液的时候
抗体浓度太高	优化一抗和二抗的稀释倍数
洗膜不彻底	增加洗膜次数和洗膜液的量。确保洗膜液中含有 0.1% 的 Tween-20, 必要时可提高 Tween-20 的浓度。但要注意, 过量的 Tween-20 (0.5-1%) 可能会使信号减弱。
封闭液有污染, 污染物和抗体发生交叉反应	用 Odyssey 配套的封闭液, 而不是牛奶。牛奶里经常会有 IgG, IgG 会和抗羊的二抗发生交叉反应。
使用的抗体量不合适	增加抗体的量, 使膜完全浸没其中。
膜的污染	操作要小心, 处理膜的时候使用镊子, 要防止膜干掉。
<b>问题: 背景上有不均匀的斑点分布</b>	
<b>可能原因</b>	<b>建议</b>
封闭液中同时处理了多张膜	如果多张膜同时放在一起进行封闭, 请确保封闭液的量能够使所有的膜都能接触到溶液同时移动自如。
膜被 Ponceau S 污染	Ponceau S 和膜接触后即使 Ponceau S 已被洗脱仍会使膜的背景增高
膜没有始终保持湿润, 部分被吹干	使膜始终保持湿润状态。特别是要重复使用膜的时候这一点非常重要。 如果使用 PVDF 膜, 记住要先把膜用 100% 甲醇浸湿。
使用的镊子和容器被污染	镊子在接触过抗体, 特别是染料标记的二抗后要洗干净。脏的镊子会将染料带到膜上, 无法洗脱。 孵育时使用干净的镊子和容器
<b>问题: 信号微弱或者没有信号</b>	

可能原因	建议
蛋白没有成功从胶中转移出来	<p>检查转移液是否正常,检查转膜过程的各个步骤是否正确</p> <p>用 Odyssey 预染 marker 指示转膜情况,另外转膜后对胶进行染色以确定没有蛋白留在胶中</p>
检测过程中蛋白从膜上丢失	<p>过长的封闭时间或者抗体稀释液中高浓度的 Tween-20 ( 0.5-1% ) 会导致膜上抗原部分丢失</p>
使用的抗原量不足	<p>增大跑胶时的上样量 ;使点样孔尽可能的小从而浓缩抗原。</p>
使用了错误的封闭液	<p>为了提高灵敏度和结合得牢固度,使用 Odyssey 封闭液。</p>
转移过程中蛋白没有保留在膜上	<p>转膜后先让膜在空气中自然风干,再去封闭。这样能使蛋白结合得更为牢固。</p> <p>根据所用的抗原对转膜条件和时间进行优化。检查转膜时的“三明治”中间是否有气泡。</p> <p>尝试其他牌子或者类型的膜(不同的抗原同膜结合的能力不同)</p> <p>在转移液中添加 20%的甲醇会有助于抗原同膜的结合(注意:甲醇会使胶的孔径缩小对大蛋白的转移会造成阻碍)</p> <p>转移液中的 SDS 会降低转移的蛋白同膜的结合力,特备是那些低分子量的蛋白。尝试降低或者去除 SDS (注意:溶液中不超过 0.5%的 SDS 对某些蛋白来说确实能提高转移效率)。</p> <p>小蛋白在转移过程中会穿过膜。使用孔径小一些膜或者缩短转移时间。</p>
使用的抗体量不足	<p>一抗的结合力也许不够强。增加抗体的量,</p>

	<p>优化出最适合的浓度。</p> <p>延长一抗得孵育时间 ( 室温下 4-8 小时或者 4°C 过夜 )。</p> <p>增加二抗的量，优化出最适合的浓度。</p> <p>由于放置时间过长或者保存不当抗体失去作用；用 dot blot 检测抗体。</p>
膜的类型不合适	尝试另一种膜。硝酸纤维素膜要比 PVDF 膜灵敏度更高。
<b>问题：出现非特异性或者非预期的条带</b>	
<b>可能原因</b>	<b>建议</b>
抗体浓度过高	<p>减少抗体用量。</p> <p>缩短抗体孵育时间。</p> <p>增加抗体稀释液中 Tween-20 的量</p>
双色实验中抗体间的交叉反应	<p>对所用一抗和二抗的来源、种属再次检查 ( 请参照附件中关于双色 western 部分 )。</p> <p>双色实验中交叉反应很可能出现。减少二抗用量可使这种情况出现的机会降低。</p> <p>双色反应之前先做一下单色实验，从而了解哪些是目的条带以及目的条带所在的位置。</p> <p>如果可能的话，避免同时使用鼠抗和兔抗。</p> <p>因为这两个种属的亲缘关系很近，在某些情况下，鼠抗会和兔的 IgG 发生反应，兔抗也会和鼠的 IgG 发生反应。</p>
信号从一个通道流失到另一个通道	<p>如果某个通道的信号非常强 ( 接近或处于饱和状态 )，其中一小部分的信号会流失到另一个通道。要解决这一问题，可以在扫描时减弱该通道的激发强度。同时在以后的实验中减少蛋白点样量以及使用的抗体量。</p>



基因售后服务  
微信:GeneGroup005



Gene Brightens Every Life · BioTech Connects the World  
基因燃亮生命 · 生物技术连接世界

欢迎您关注“基因售后服务”微信公众号。

如有任何问题或建议，您可以通过“基因售后服务”中的“微客服”功能与我司取得联系，也可以直接致电或电邮联系我司售后服务团队。

联系电话：

华北/东北/西北地区：010-51665161-222

华东/华中地区：021-64951899-230

华南/西南地区：020-85524840-1029

电子邮件：[service@genecompany.com](mailto:service@genecompany.com)