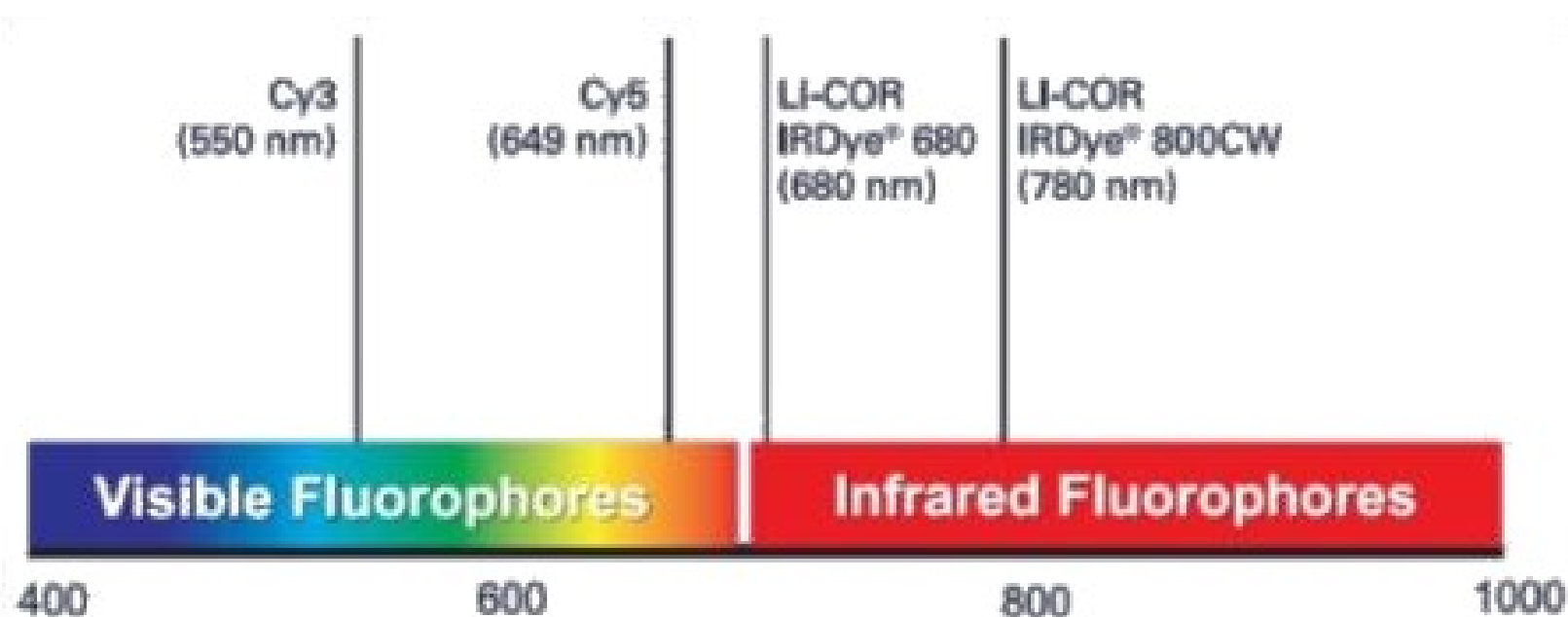


Odyssey DLx 红外激光双色图像 分析系统

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 720nm 和 820nm 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。

Western blot 原理比较

化学发光作用



Odyssey近红外荧光作用



荧光直接检测

● 信号持久

● 不需要底物

● 不需要底片/暗室



ON-SCREEN
Display

INFRARED
APD
DETECTOR

INFRARED
LASER
DIODE



Antigen on
membrane

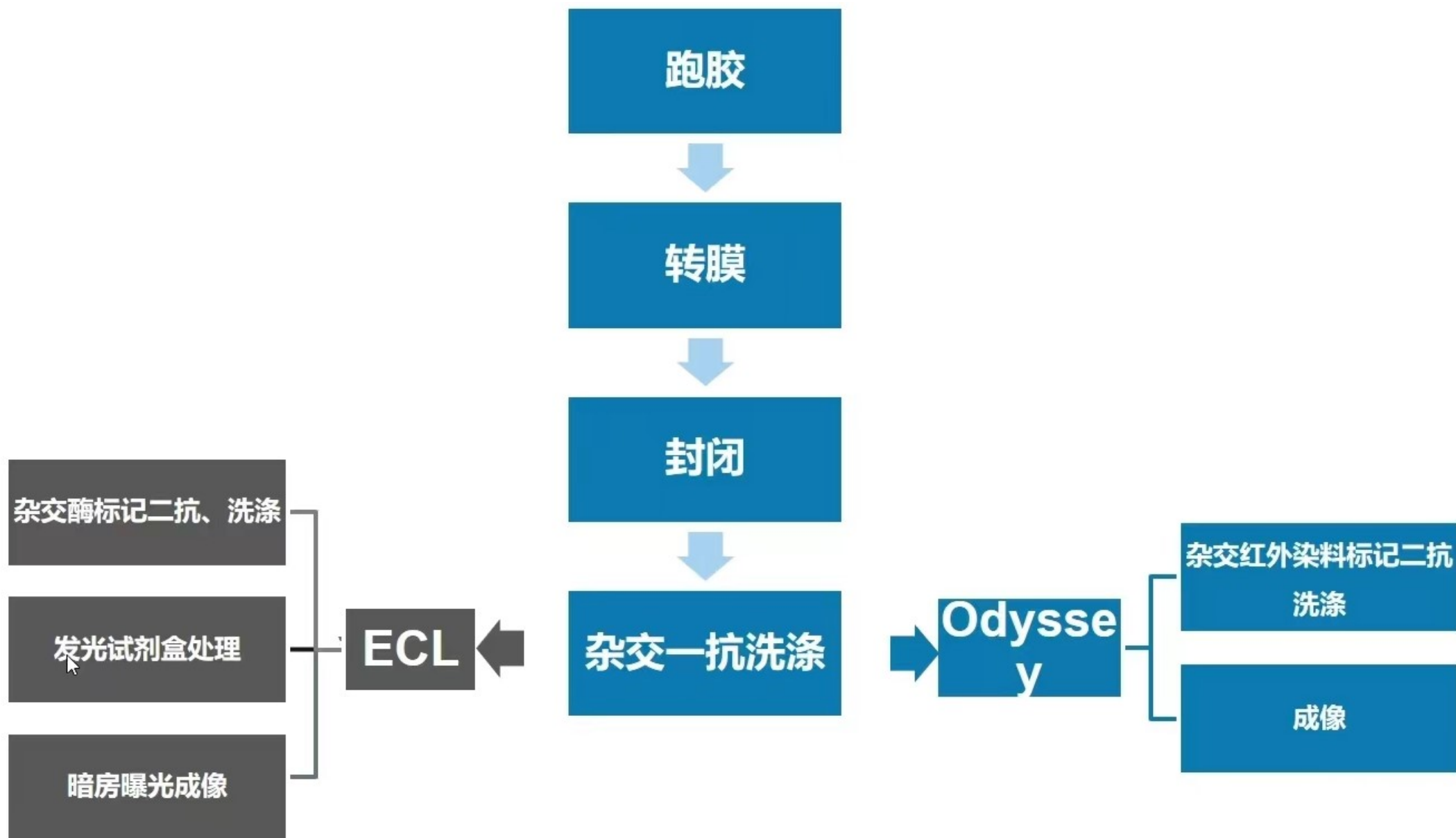


Primary antibody
binds to antigen



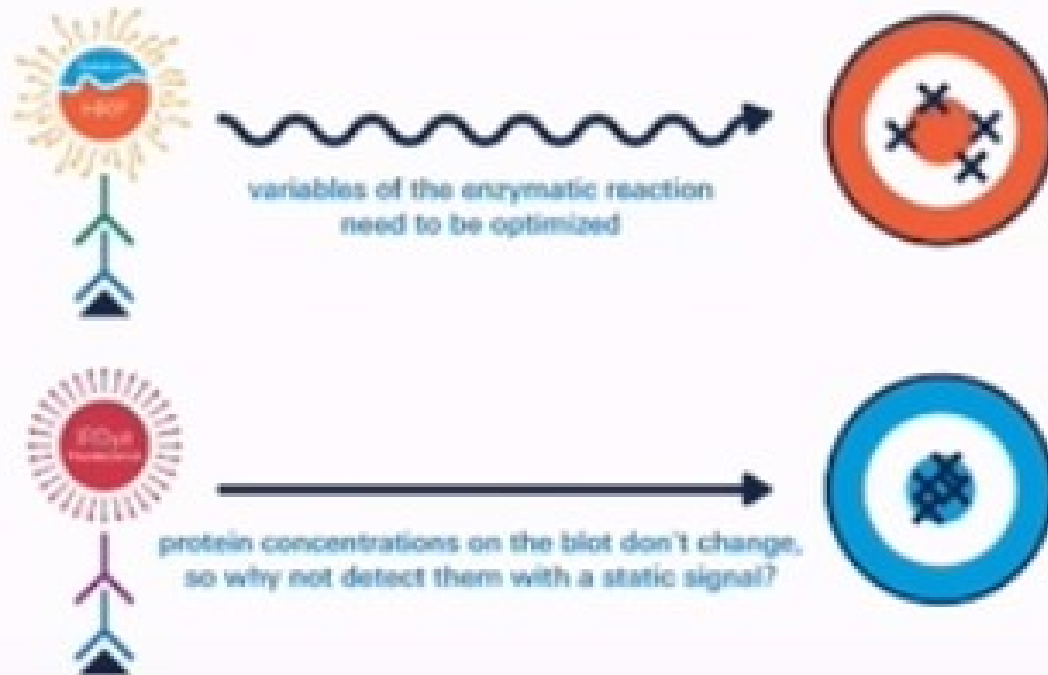
IRDye labeled secondary
antibody binds to primary
antibody

Western blot 流程比较



Odyssey近红外成像特点

Fewer Variables with NIR



■ 准确定量

Wide linear dynamic range

■ 灵敏度高

Equal to or better than chemiluminescence

■ 双色检测

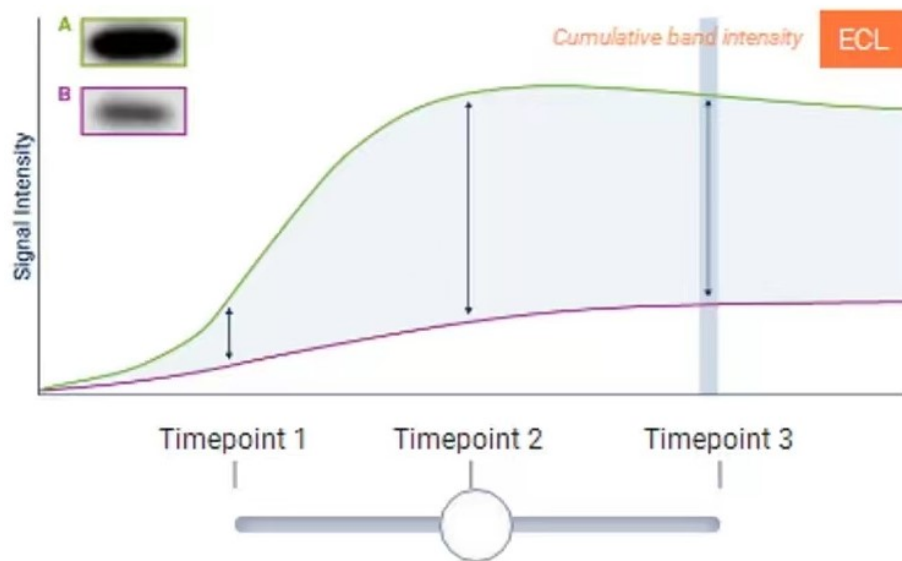
Normalization increases quantification accuracy

准确定量——信号稳定

准确定量：信号更稳定

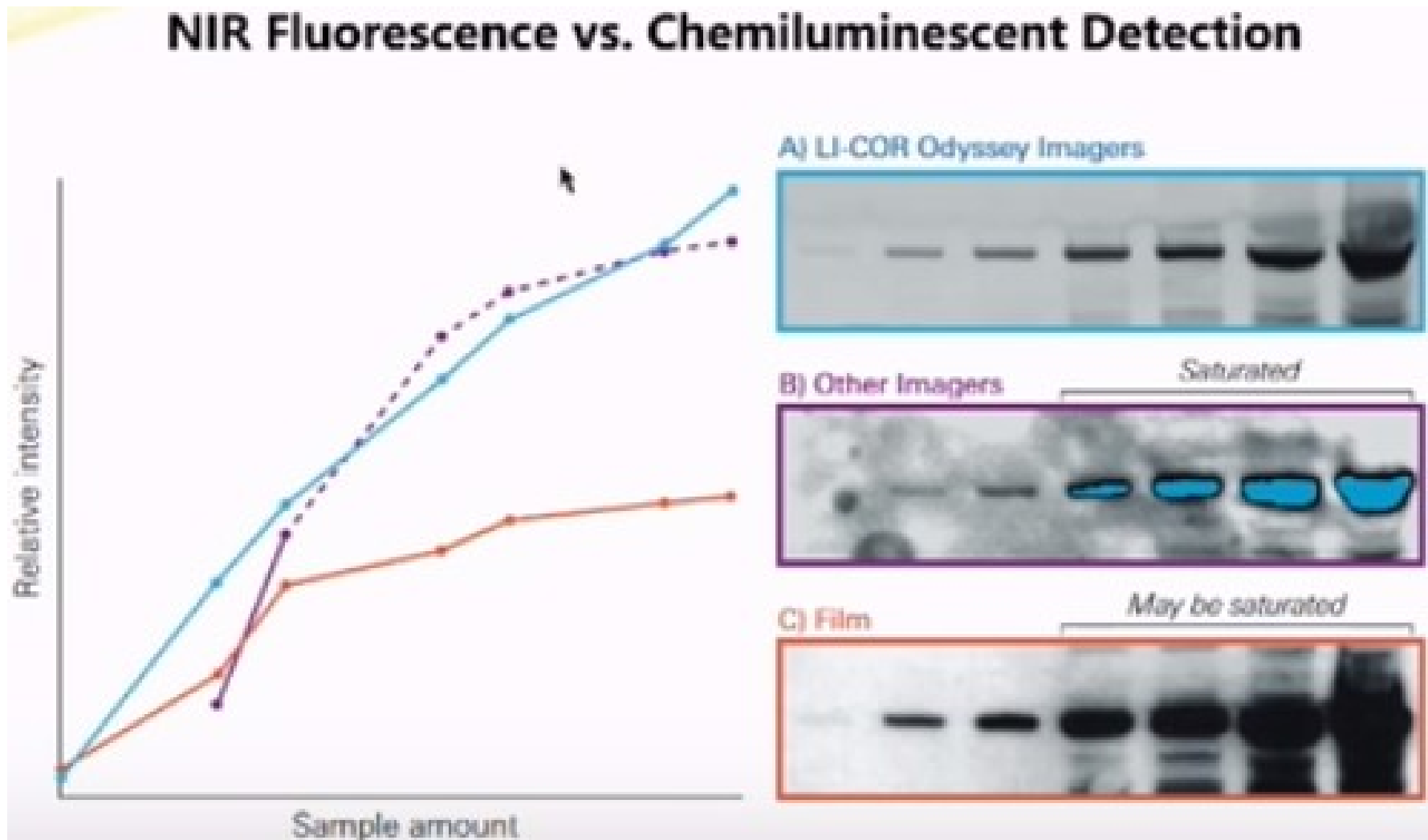


信号稳定；信号与浓度成比例；不同条带间信号比值恒定；能准确定量。



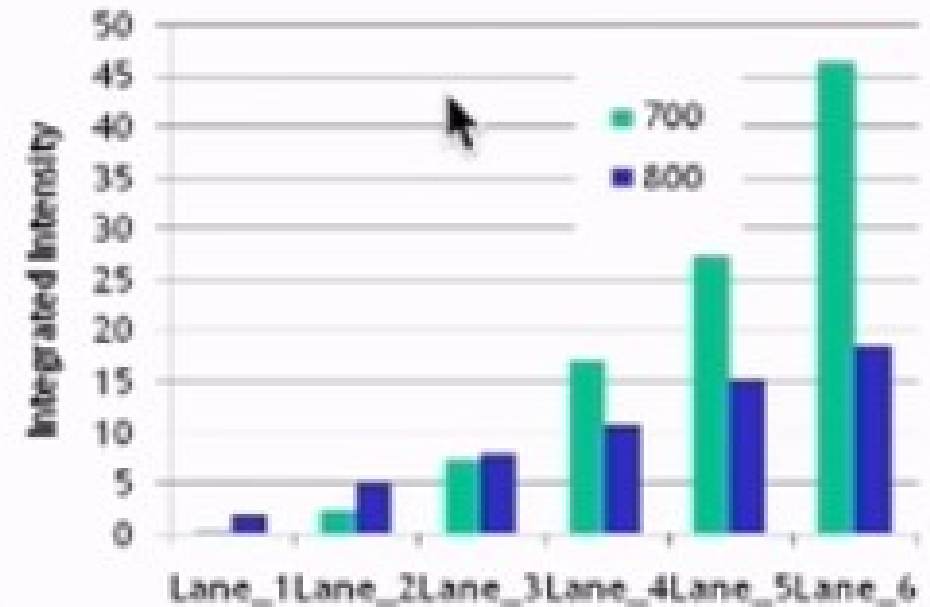
信号非线性变化；信号与浓度不成比例；不同条带间信号比值变化；容易过曝；因此不能准确定量。

准确定量——检测范围广

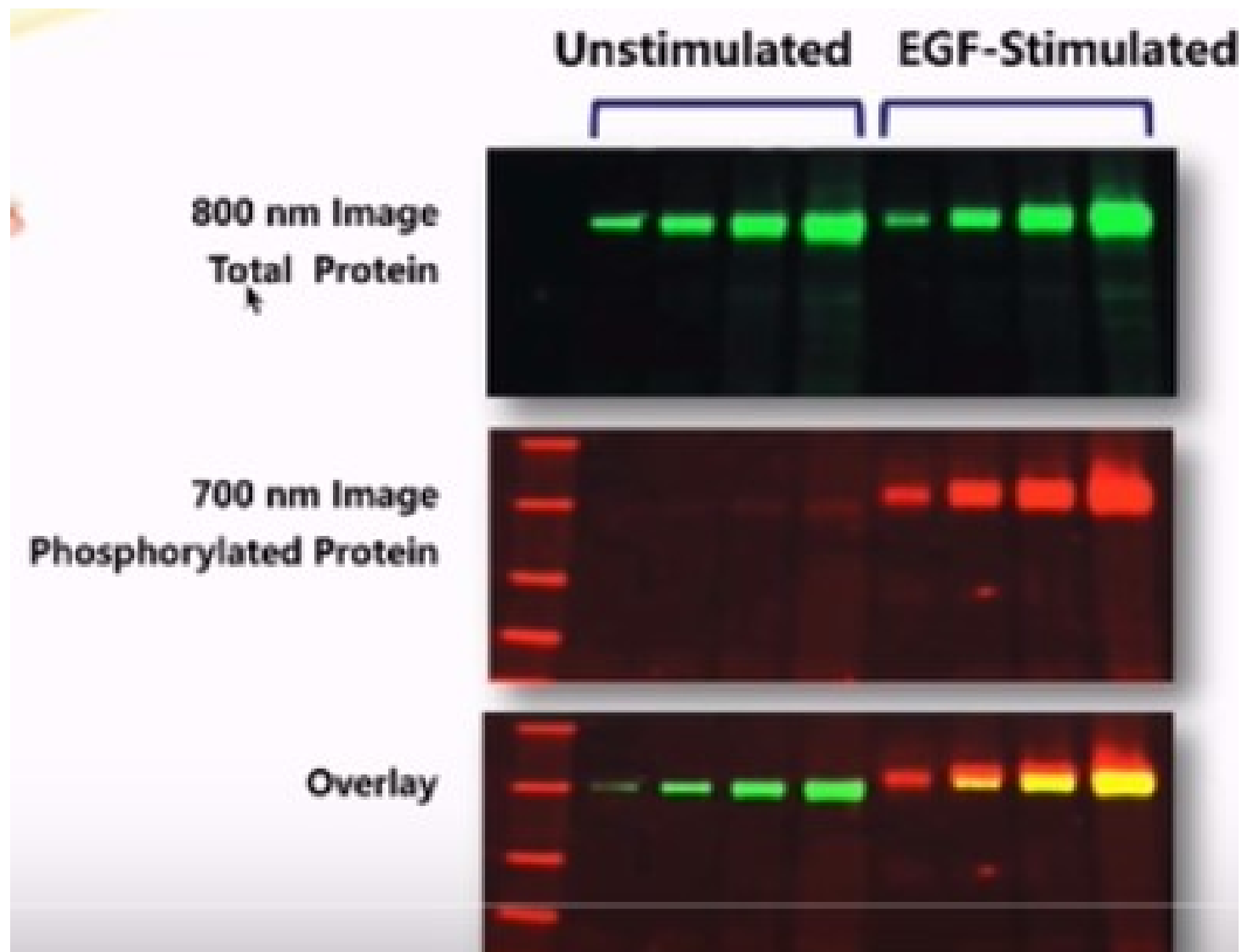


双色检测——同时成像

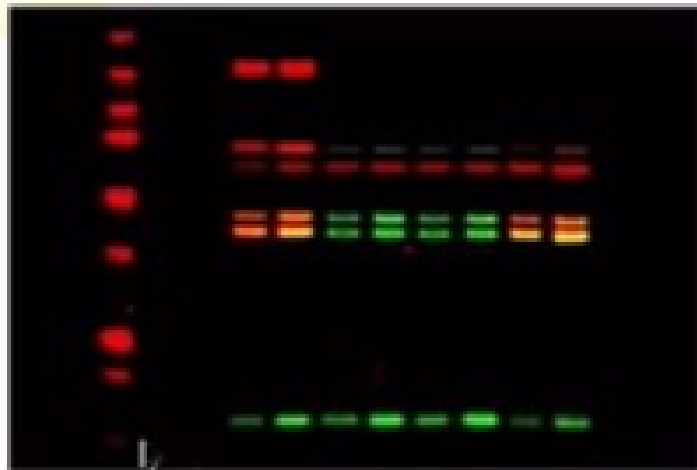
保障相同的杂交条件，结果同时输出，
直接比对，减少误差。



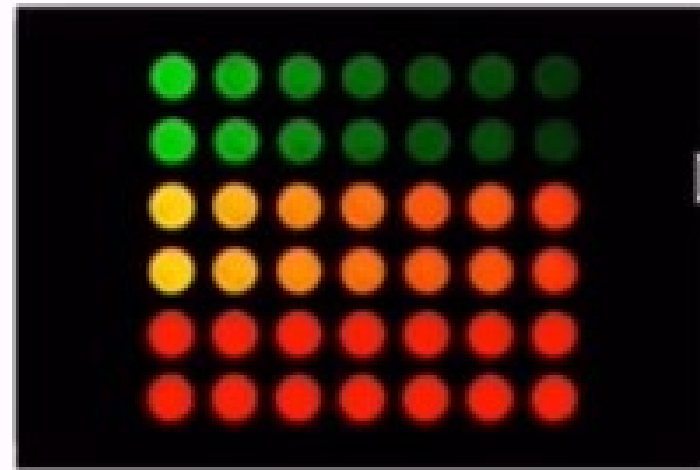
磷酸化实验



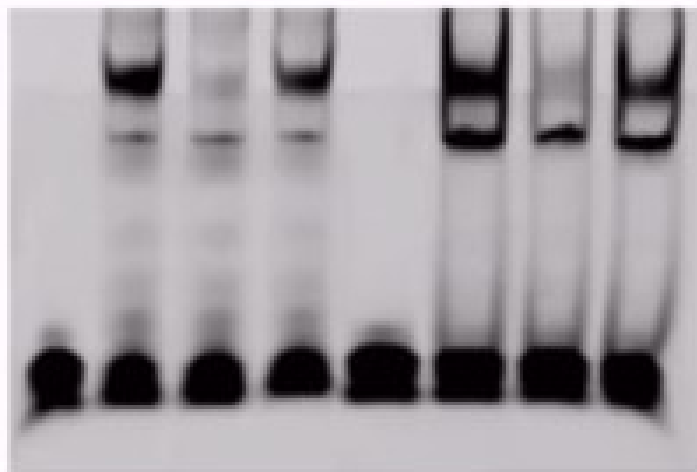
Odyssey DLx主要应用



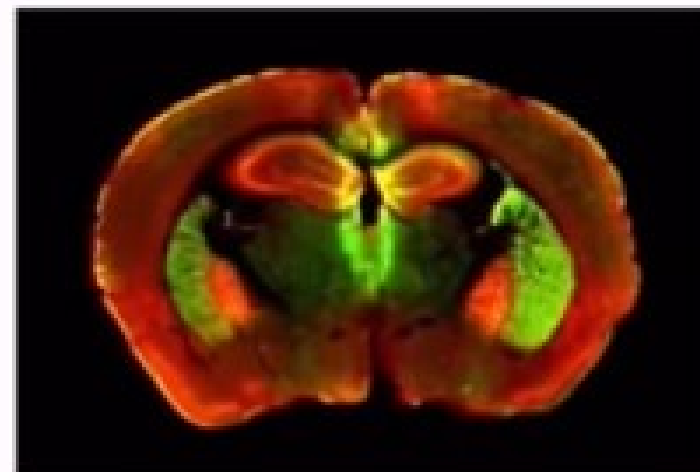
NIR Fluorescent Western Blot



In-Cell Western™ Assay



EMSA / Gel Shift Assay



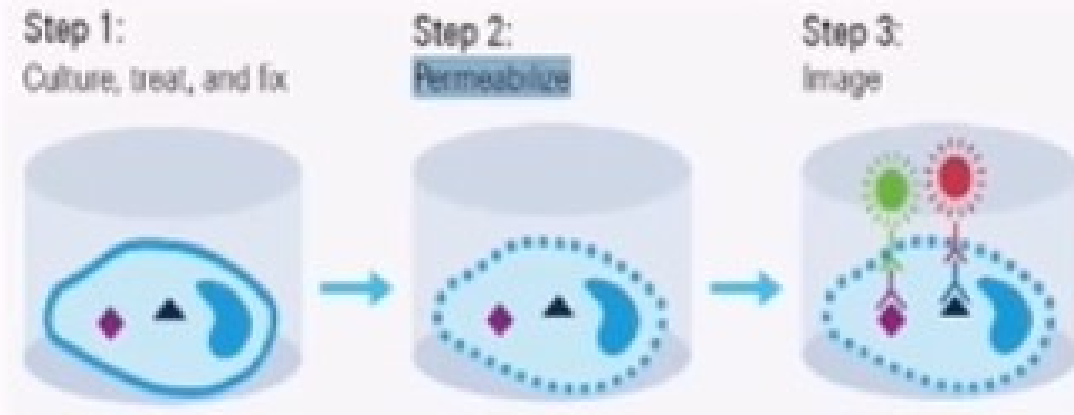
Tissue Section

In-Cell Western (ICW)

ICW分析是在微孔板（96或384孔）中进行的免疫荧光定量分析，结合了Western Blot的特异性和ELISA的可重复性和高通量。

特点：

- » 原位检测
- » 通量高
- » 高度可重复



In-Cell Western (ICW)

	WB	ICW
细胞培养	✓	✓
细胞裂解	✓	
抽提蛋白	✓	
电泳	✓	
转膜	✓	
抗体孵育	✓	✓
洗脱	✓	✓
成像	✓	✓
样品通量	10, 12	96, 384

In-Cell Western Assay: <5 hours, 96+ Samples

<1 hr

3-4 hr

Fix and
permeabilize

Antibody incubations

Western Blotting: >7 hours, 10-24 Samples

1-2 hr

1 hr

4-5 hr

Lyse cells, transfer
lysates (fractionate)

SDS-PAGE

Membrane transfer, blocking, antibody incubations

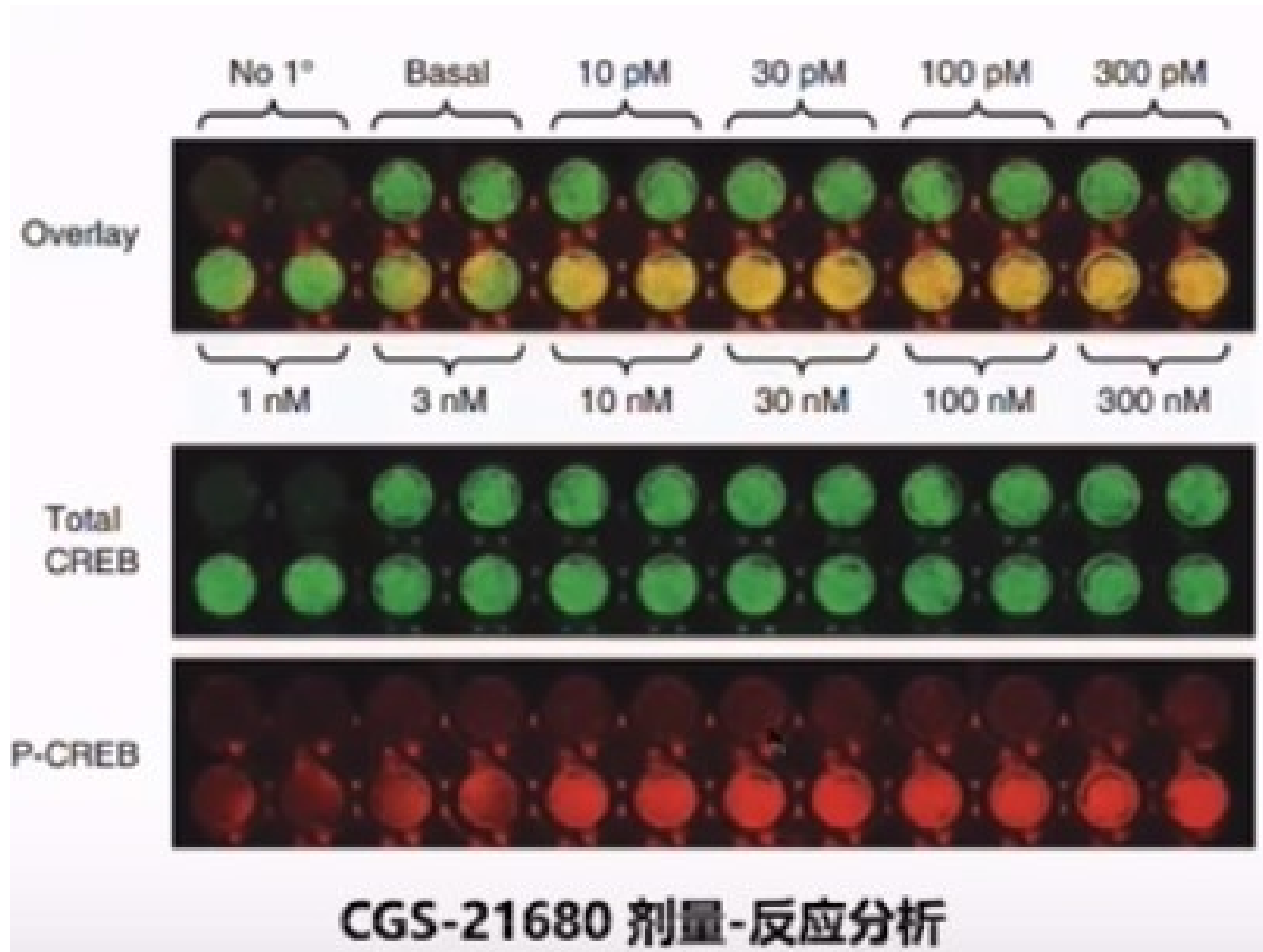
» 原位检测

» 通量高

» 高度可重复

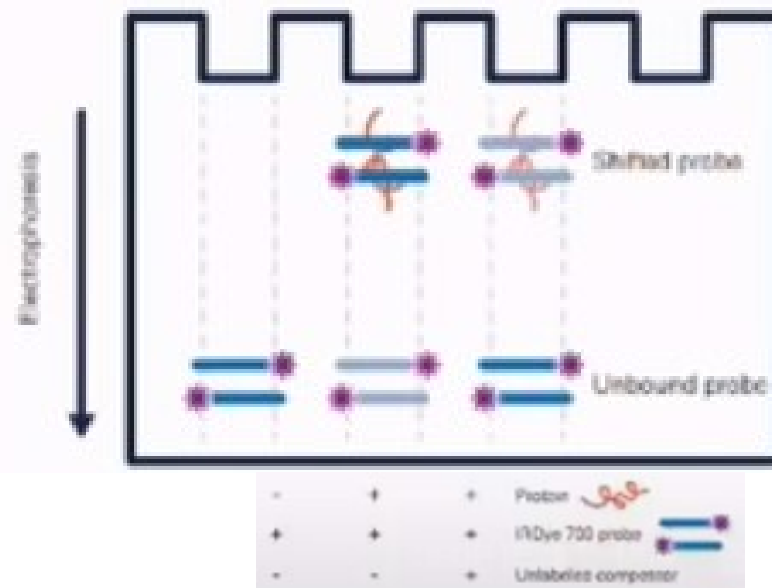
抗原抗体原位结合，无需抽提蛋白，可直接检测细胞内蛋白水平，磷酸化水平，受体活化水平等，可用于药物筛选，RNAi研究等。

磷酸化实验 (ICW)



EMSA

EMSA: 凝胶迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay) , 研究 DNA与蛋白相互作用的一种方法。DNA-蛋白质复合物和未结合的DNA, 在电泳过程中具有不同的迁移率, 因此, 可以使用标记的DNA, 通过凝胶电泳观察DNA和DNA-蛋白质结合复合物。

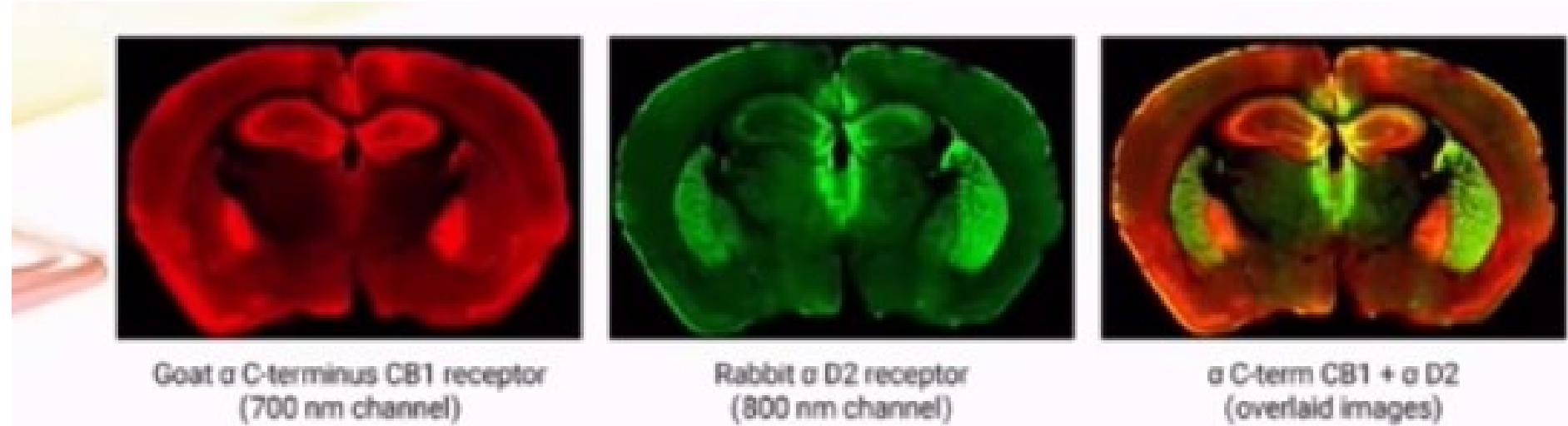


EMSA标记方法

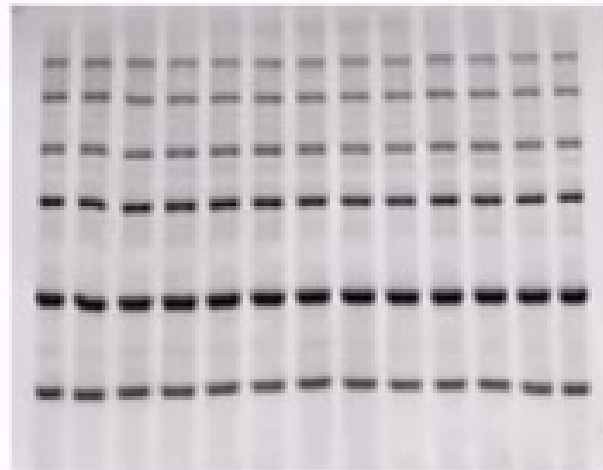
近红外荧光优势

近红外荧光染料	放射性同位素	生物素/链霉素
总时间：1.5h	总时间：4.5h-24h	总时间：4.5h-5h
荧光寡核苷酸具稳定性	有半衰期	化学发光信号不稳定
无危险	危险	联系制造商以获取详细信息
湿凝胶成像，无需移除凝胶板	需凝胶干燥、胶片曝光	需转膜
快速，便捷，直接检测	费时，不方便	间接检测。需封闭，孵育，洗膜
不到2小时即可获得结果	常第二天才能获得结果	检测步骤增加几个小时

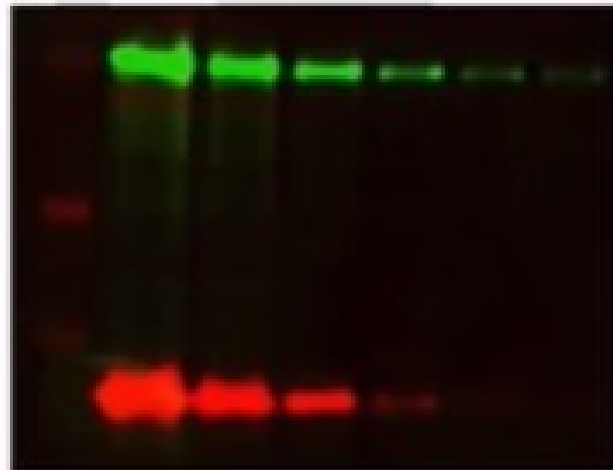
其他应用



Tissue Section



Coomassie Protein Gel



In-Gel Westerns



Protein Array

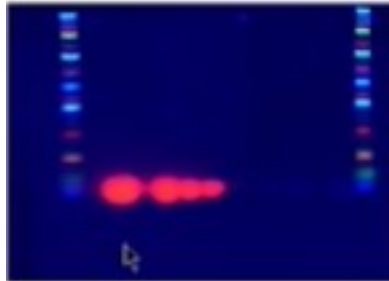
Western Blot Protocol



蛋白电泳

Sample Loading Buffer

- Run dye front off or cut off
- LI-COR 4X Protein Sample Loading Buffer



Signal in the 700nm channel



P/N 928-40004

转膜

PVDF



- Binding capacity~150-160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- Physical strength, chemical resistance
- Requires wetting with methanol

Nitrocellulose (NC)

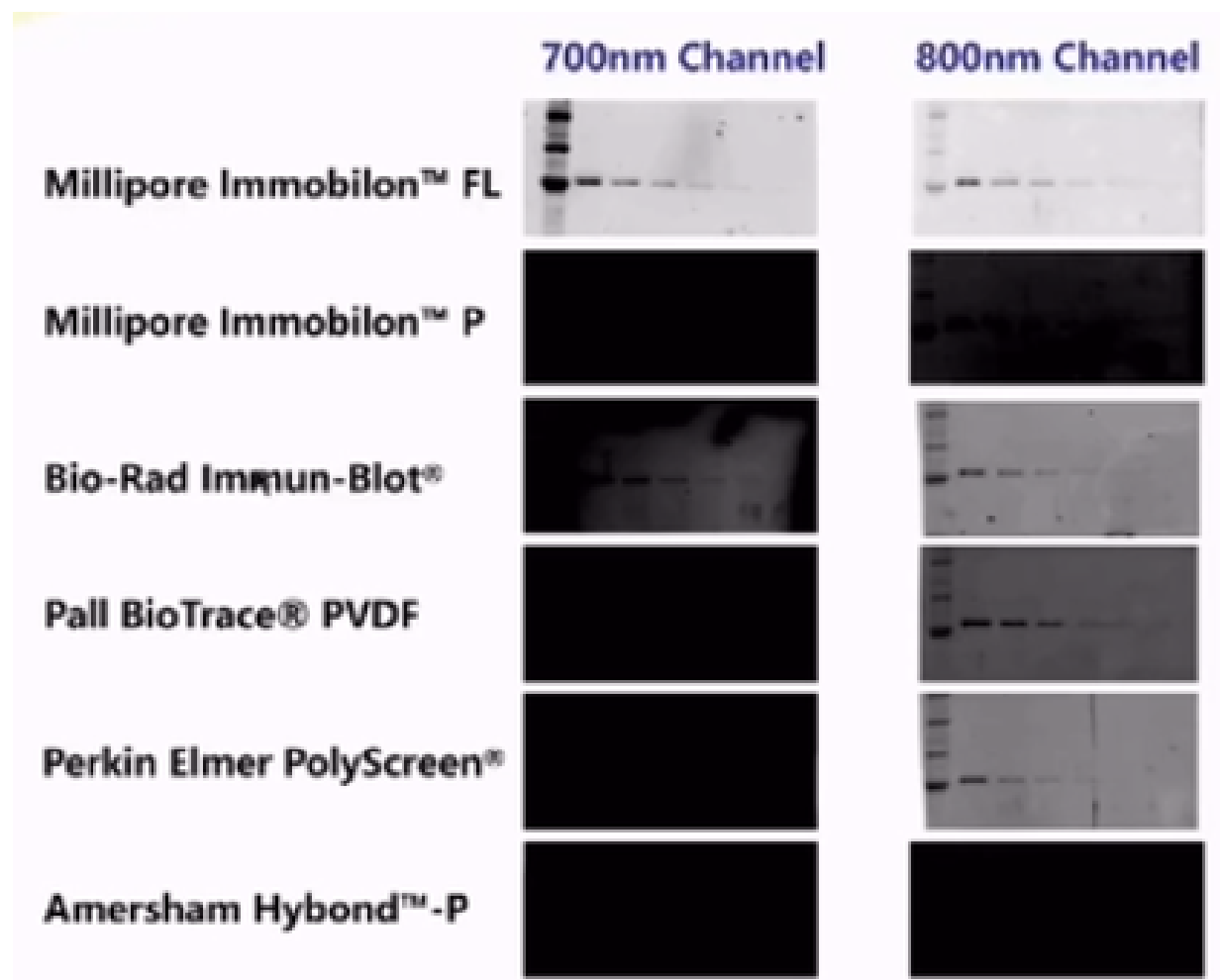


- Binding capacity~80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- Near instantaneous binding
- Supported is less brittle

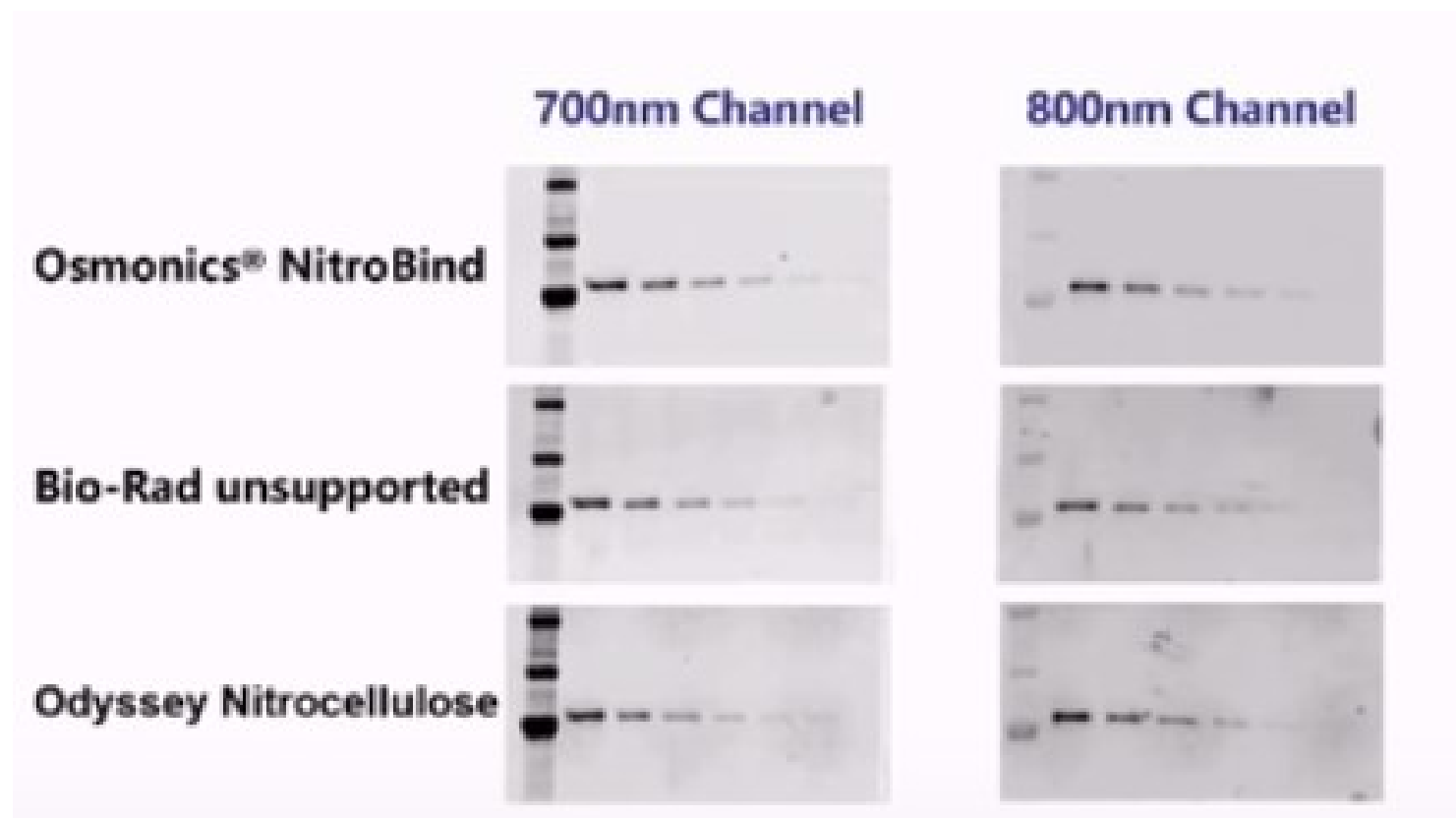
0.45 μm for proteins >20kDa

0.2 μm for proteins <15kDa

转膜-PVDF膜



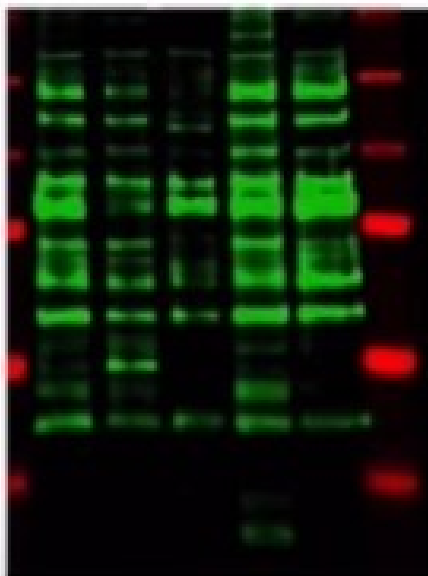
转膜-NC膜



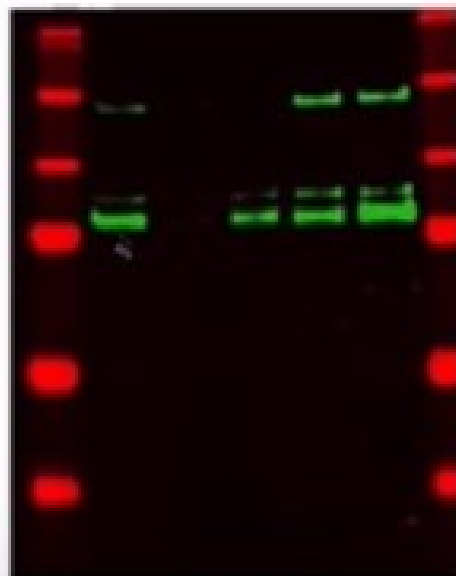
封闭

封闭液的选择

5% BSA Blocker



5% Milk Blocker

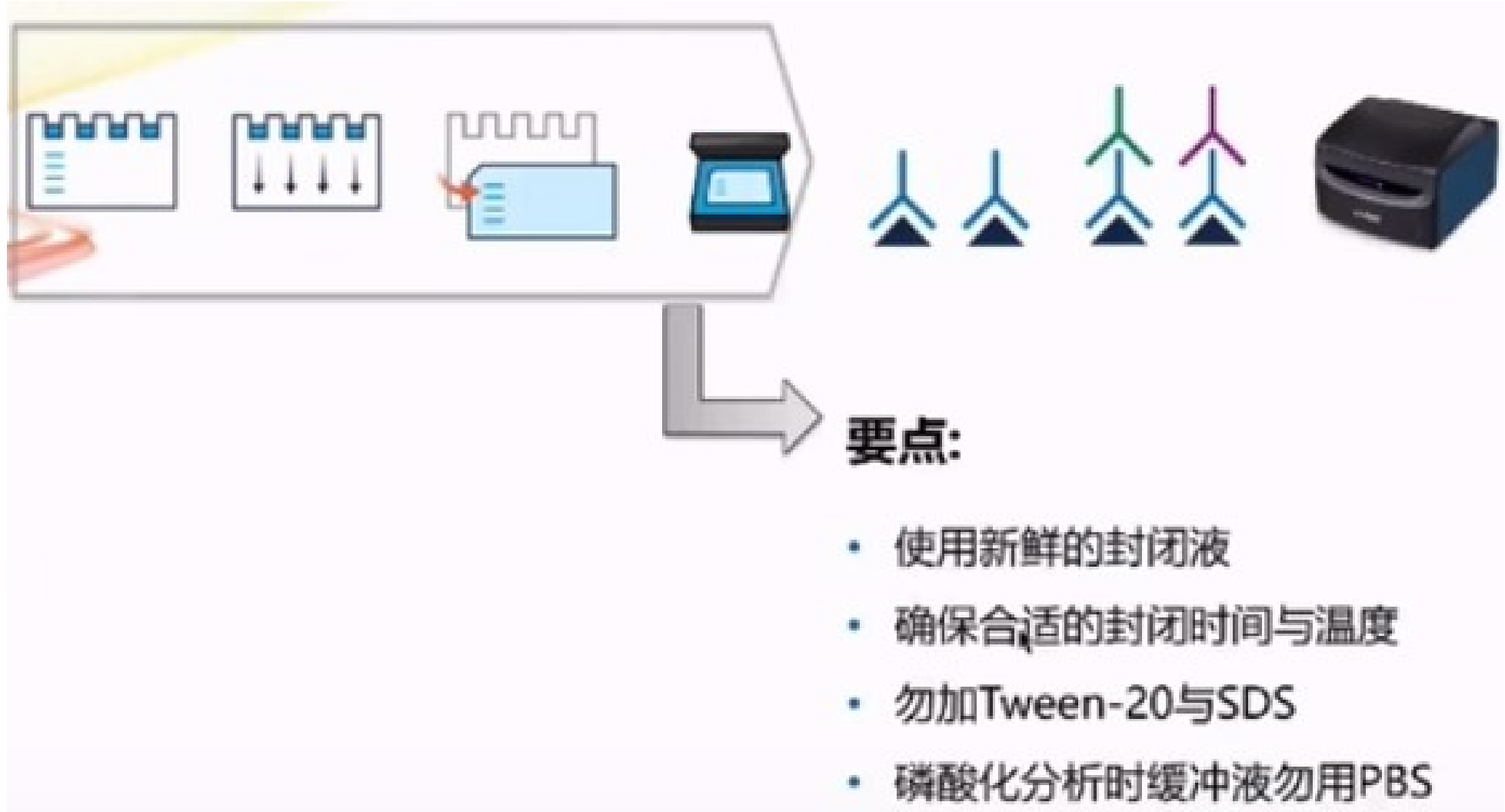


Odyssey Blocking Buffer



← PKC- α

封闭

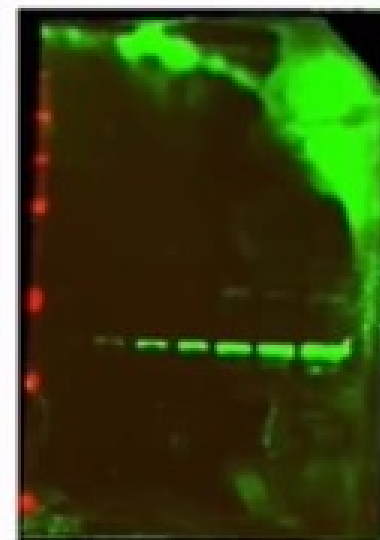


一抗孵育与洗涤

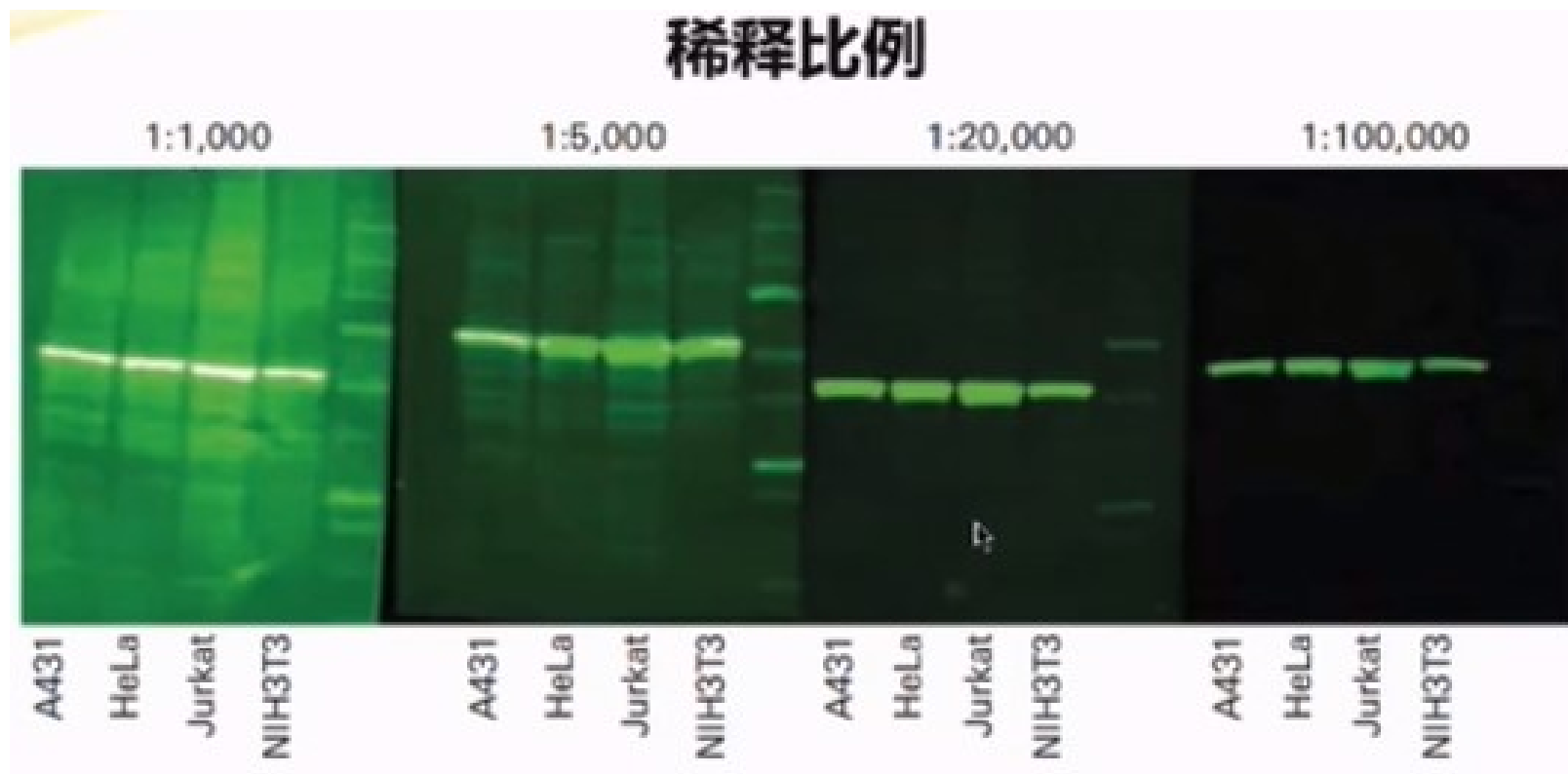


要点:

- 高特异性
- 现用现配
- 确保最佳孵育时间、温度以及抗体稀释倍数
- PBST/TBST (PBS/TBS+0.1% Tween-20) 洗膜
- 洗4次, 每次5分钟, 勿洗膜过度!



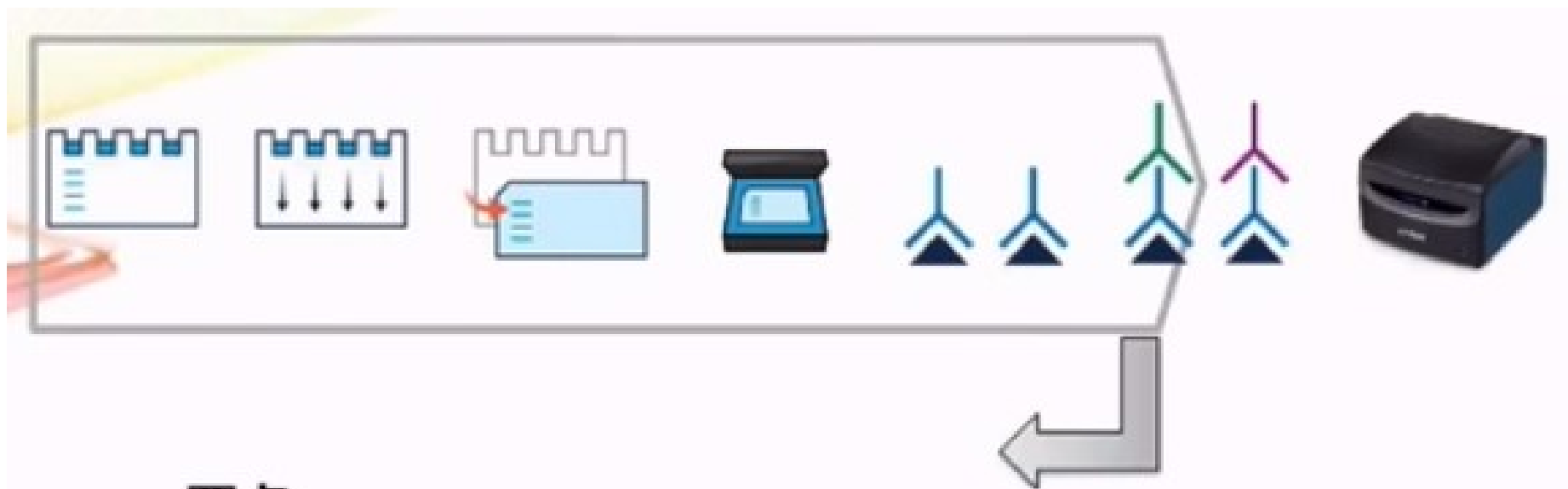
二抗孵育与洗涤



可从1:20,000开始稀释

稀释比例范围1:10,000 – 1:40,000

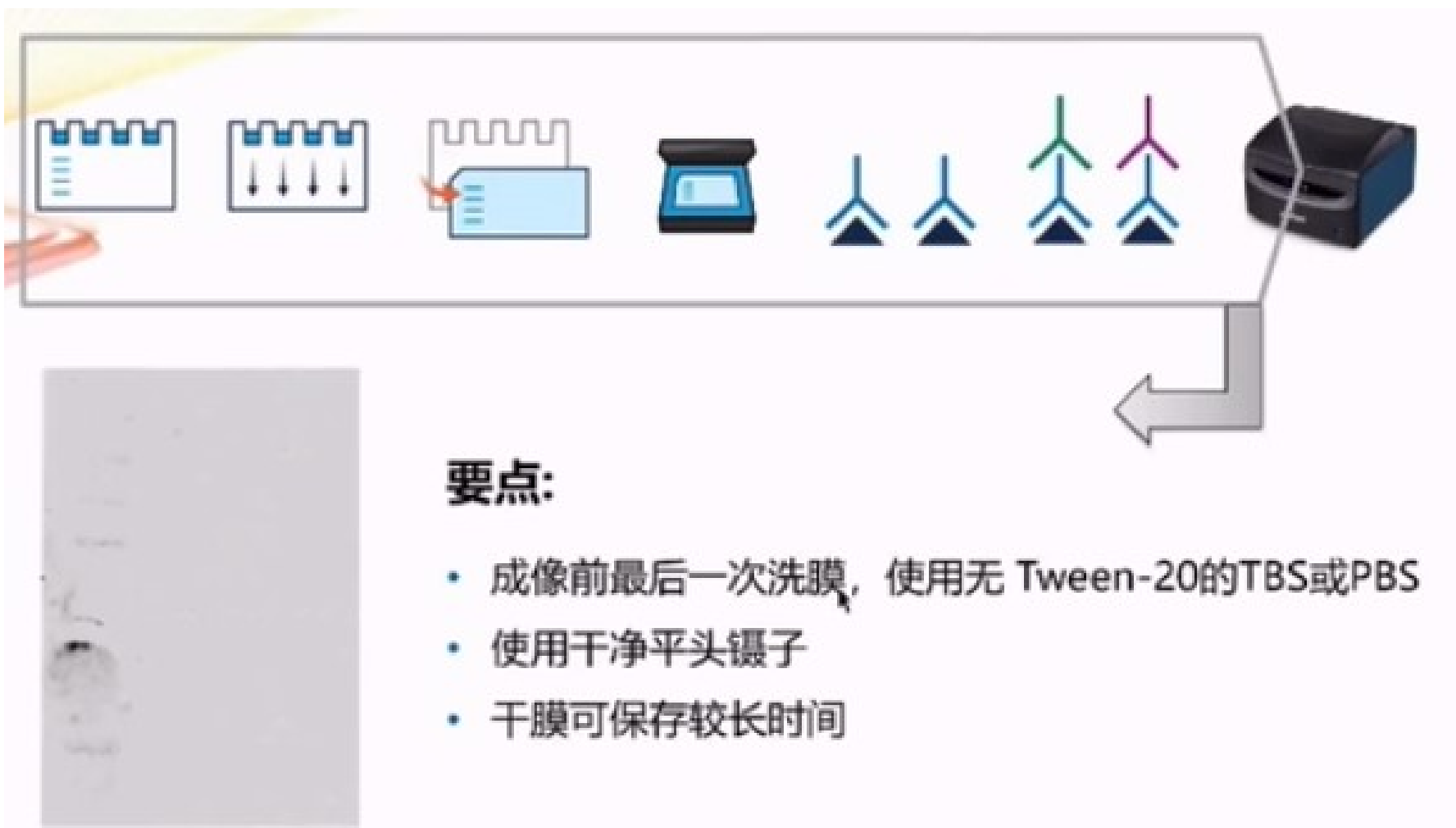
二抗孵育与洗涤



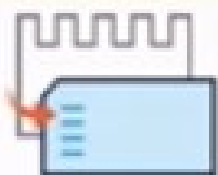
要点:

- 低丰度蛋白时，优选 IRDye 800CW 二抗，可获得最高灵敏度
- 二抗室温孵育1小时通常可获得最佳成像
- PBST/TBST (PBS/TBS+0.1% Tween-20) 洗膜
- 洗4次，每次5分钟，最后一次洗涤时使用未加Tween-20的PBS/TBS

Odyssey成像



WB要点总结



转膜

- 推荐使用 Immobilon®-FL PVDF 膜或 NC 膜，确保膜的自带背景不影响实验



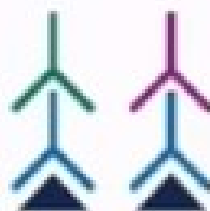
洗膜

- 洗膜前需确认孵育盒是否干净，可用100%甲醇清洗



封闭

- 推荐选择合适的封闭液，用BSA做封闭液容易导致较高背景
- 封闭过程中不宜加入tween 20



二抗孵育洗膜

- 将二抗离心后加入无菌蒸馏水稀释至1mg/mL，充分混匀后静置30min
- 若长时间不使用，**可放置于-20℃避光保存**
- 使用时应避免反复冻溶，建议将二抗每份10μl 分装保存
- 实验前，需确认二抗的最佳稀释浓度，二抗浓度过高/低均会对结果有较大影响（推荐1:20000）



一抗孵育

- 实验前，需确认一抗的最佳稀释浓度，浓度过高/低均会影响成像结果
- 一抗孵育的过程中不宜加入SDS



成像

- 上机之前需洗掉Tween-20，去除多余液体

ICW Protocol

1) 细胞培养 in 96-well (Nunc) or 384-well (Falcon) plates;



2) 处理细胞 (inhibitor, stimulator, etc....);



3) 细胞固定 (甲醛);



4) 细胞透化 (Triton-X 100);



5) 室温1h或4°C过夜封闭;



6) 一抗孵育洗脱 (10-fold increase);

红外标记的二抗孵育洗脱 (1:200 – 1:2000; 700 and 800 nm);



7) 孔板直接放在 DLx 上成像; 软件分析。

ICW实验前准备

孔板的选择

- 96/384孔板的深度、自发荧光和孔之间信号交叉会影响实验结果;
- 不推荐白色孔板, 自发荧光过高;
- 灭菌;
- 为增加板底粘性, 可用Poly-D-lysine包被 (Sigma pn. Z38294-3) 。

- ✓ 1×PBS洗脱液
- ✓ 细胞培养基
- ✓ 20% Tween-20
- ✓ 37%甲醛
- ✓ 10% TritonX-100
- ✓ 高特异性一抗

封闭液

Intercept Blocking Buffer



二抗

Application	IRDye 800CW	IRDye 680RD	IRDye 680LT
In-Cell Western Assay	✓	✓	Not Recommended
On-Cell Western Assay	✓	✓	Not Recommended

一抗 - 特异性

- 选择

- ✓ 经过IF验证
- ✓ 亲和纯化
- ✓ 单抗效果优于多抗
- ✓ ICW只能定量, 不能检测出易位

- 验证

- ✓ 预实验
- ✓ 若有非特异条带, 则需更换一抗或优化封闭、孵育条件等