



Gene Company Limited
基因有限公司

Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统 培训手册



基因有限公司生命科学组

二〇一二年二月

目 录

- 一、Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统技术特点
- 二、系统安装条件
- 三、培训所需试剂设备及样品
- 四、培训
- 五、仪器及试剂系统介绍
- 六、实验操作流程
- 七、软件使用培训
- 八、常见问题处理
- 九、注意事项

一. Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统技术特点

一般的荧光染料的激发和检测波长都位于可见光谱区，因此易产生高背景的荧光干扰，从而不能有效用于膜上蛋白或者核酸的直接荧光成像。红外荧光染料在长波下它的背景荧光很低，具有很好的信噪比，这一特点使得核酸和蛋白的膜上荧光检测成为可能。LI-COR 根据红外荧光的这一特点发展出了 Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统，该系统是独特的采用 2 个红外激光作为激发光源的成像系统，以扫描成像方式对样品进行检测。样品载体可以是膜，凝胶和微孔板。该系统配置 2 个红外激光激发光源，波长分别为 680nm 和 780nm，2 个高灵敏度光敏二极管分别检测 720nm 和 820nm 的发射荧光，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 CLx 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 Odyssey CLx 可以给出最大的灵敏度和最小的信号交叉。同时由于采用二极管激光器和固态检测器，Odyssey CLx 具有很长的使用寿命（激光器使用寿命约 4 万小时），而系统维护的要求却很低。该系统可广泛应用于信号传导，蛋白磷酸化分析，In-Cell-Western 分析等蛋白领域研究。增加活体成像分析系统 MousePOD 之后，用户可将标记有红外荧光染料 IRDye800 的蛋白或抗体注入动物体内，待其结合到目标部位后进行扫描，即可实现小动物活体成像。

主要特点

1. 高灵敏度, 效果同于或者好于化学发光法，但不需信号放大步骤，信噪比高。
2. 直接检测，无需曝光和显色底物，不需要 X 光片，不需要暗房，没有放射性废料产生。
3. 双色检测，可以在一次杂交中同时检测两种目的分子，直观，省时。
4. 宽广的线性范围，可用于高准确性定量。
5. 背景低，图像清晰，激光强度可调，不会丢失弱的信号
6. 强有力的软件支持，结果分析如确定分子量和定量及图象处理编辑很容易
7. 系统操作和维护简单

Odyssey CLx 的应用

应用领域：蛋白质研究

具体包括：双色磷酸化分析，In-Cell-Western 分析，In-Gel Western 分析，考马司亮兰胶的扫描等。加装活体成像分析模块 MousePOD 之后，可进行小动物活体成像扫描。

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）：37 h x 53 w x 62 d cm (14.5 x 21 x 24.4 inches)
操作平台载重：33 kg (72 lbs)
3. 温度湿度要求：露点温度不超过 20℃。
露点温度和湿度以及温度相关，具体换算请见<http://www.decatour.de/javascript/dew/>
4. 电源：90-250V AC, 47-63Hz
5. 其它：通用插头接线板（至少 3 个插孔）

三. 实验所需试剂设备及耗材

实验所需试剂耗材：

蛋白样品
SDS-PAGE 胶
电泳缓冲液
硝酸纤维素膜（推荐）或者 PVDF 膜
转移缓冲液
PBS 或 TBS
封闭液
Tween-20
一抗
荧光标记的二抗（IRDye700 和/或 IRDye800）
铝箔纸
Kimwipes®无尘纸(Kimberly-Clark 公司出品)
ddH₂O
（试剂详细配方可参考《分子克隆实验指南》）

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，Tip 头，量筒，离心管，离心机等。

如用户需要培训时检测自己样品，请在培训前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 实验步骤由用户自行完成。

四、培训程序

为保证培训效果，请安排 2-4 名实验室长期工作人员参加培训，并指定一名仪器负责人，以后如有人员变动由用户自行负责内部培训。

具体培训内容如下：

1. 仪器使用培训
2. 软件基本功能综述及操作培训

一般情况下，在 western 培训中我们将使用标准的测试 western 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 各实验步骤由用户自行完成。

五、仪器及试剂系统介绍

1. Odyssey CLx 红外成像系统技术特点讲解
2. 仪器系统组成和工作原理讲解
3. 配套试剂介绍

六. 实验操作流程

Western 操作参考流程（以硝酸纤维素膜为例）：

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 20 min
3. 用细胞刮刮下细胞，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. 硝酸纤维素膜（NC 膜）于转移缓冲液中平衡 20min。
6. 电泳胶置转移缓冲液中平衡 20 min。
7. 裁两张与胶同样大小的滤纸，置转移缓冲液中平衡。
8. 转膜顺序：负极—专用滤纸—电泳胶—NC 膜—专用滤纸—正极。150V，电转 30min。
9. 电转后，封闭液中封闭 1h。封闭液可以用 5%的进口脱脂奶粉（用 PBS 溶解），因为 Tween-20 和 BSA 会对 Odyssey CLx 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（根据实际调整稀释比例），膜在一抗中室温至少 1 hour 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，同时，有些抗体可能需要在抗体稀释液中添加 0.1- 0.2%的 Tween-20 来降低背景，您可以根据您要检测的蛋白以及平时操作经验来选择需否在一抗稀释液中添加 0.1-0.2%的 Tween-20。
11. 用 PBST 于摇床洗膜 4×5min。
12. 封闭液稀释二抗（根据实际调整稀释比），膜在二抗中室温于摇床 30 -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。如果使用 Tween-20 的同时添加 0.01-0.02%的 SDS 于二抗稀释液中可以比较好的降低背景。
13. 用 PBST 于摇床洗膜 4×5min。
14. 用 PBS 洗一次，去除膜上残留的 Tween-20，接下来可直接进行扫描。

七. 软件使用培训

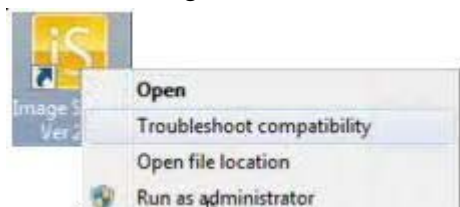
以下是关于 Odyssey CLx 配套软件的简要操作说明，便于初次操作的研究者能快速掌握如何使用软件进行扫描。关于进一步的如何使用软件对实验结果进行分析，请参见随机所带的英文原版使用手册。

一、开主机和软件

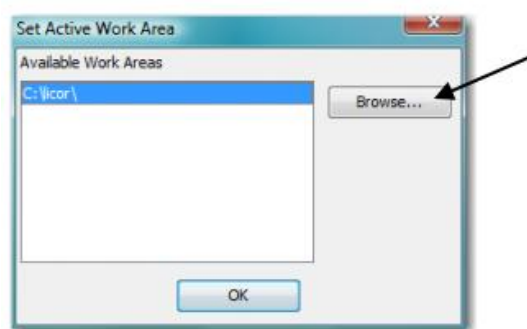
按住 Power 按钮至少 5sec，打开机器，双击电脑上的软件图标

二、设置工作区域

1. 双击 Image Studio 软件图标  或点鼠标右键后选 Run as administrator 项



2. 在 Set Active Work Area 对话框中选择或新建一个存放图片和分析信息的工作区，点 OK。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 Browse 按钮，选择一个目录作为工作区域，然后点 OK 确认。



3. 在弹出的 Scanner login 对话框中输入用户名和密码，点 OK。

三、获取图像

1. 放置样品：

- 1) 将大小不超过 10 x 12 cm 的膜或板正面朝下放置到玻璃扫描面板上。

2. 获取图像



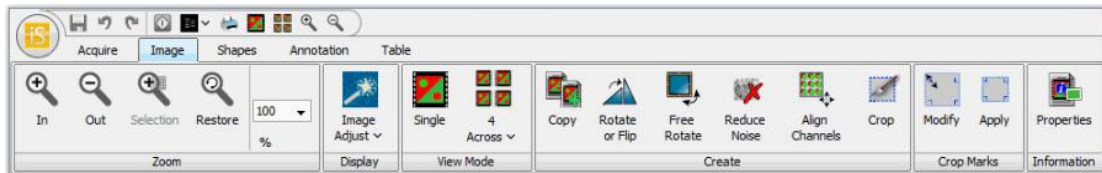
1. 点击 Acquire 标签。确认状态栏显示“Ready”，表示机器和软件是连通的。
2. 在 Setup 栏，左侧下拉菜单用于选择模板以自动设置 scan controls。若 scan controls 被改

动后，模板则改成 Custom。右侧下拉菜单用于选取分析类型

3. 在 Channels 栏，通过复选框打勾方式选取成像通道：700 或 800。点击打开 Auto 按钮可自动设置通道强度。
4. 在 Scan Controls 栏，依次设置分辨率、图片质量和聚焦偏移。Flip Image 可对图片进行自动的翻转。
5. 在 Scan Area 栏，最左侧下拉菜单可指定图片显示在扫描网格中，有三种选项：No Image（无图片）、Current Image（当前图片）或 Last Acquired（最近获取的图片）。点击 Draw New 按钮，在扫描区用鼠标拖出一个扫描边界框。点击 Split（对选定的扫描区域进行分割）、Add（增加新的扫描区域）、Copy（复制选定的扫描区域）可对扫描边界框作进一步操作。最右侧 X（X 轴）、Y（Y 轴）、W（宽度）、H（高度）显示扫描区域位置。
6. 在 Scanner 栏，点击 Preview 对图片进行预览，点击 Start 开始扫描，点击 Stop 中止扫描，点击 Cancel 取消扫描。

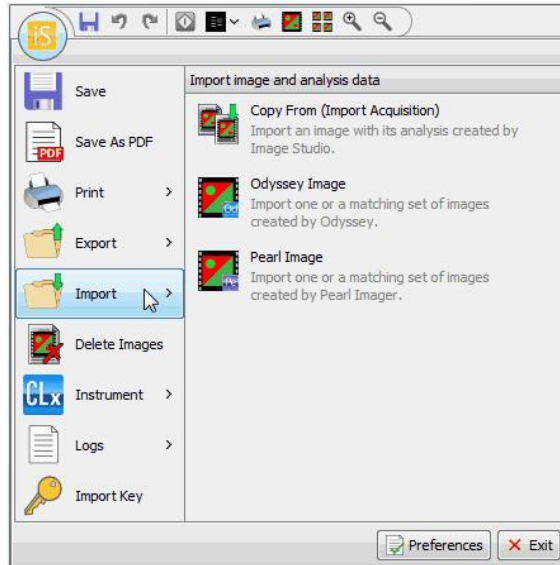
3. 查看图片

图像获取完毕，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，可修改图片的名字。



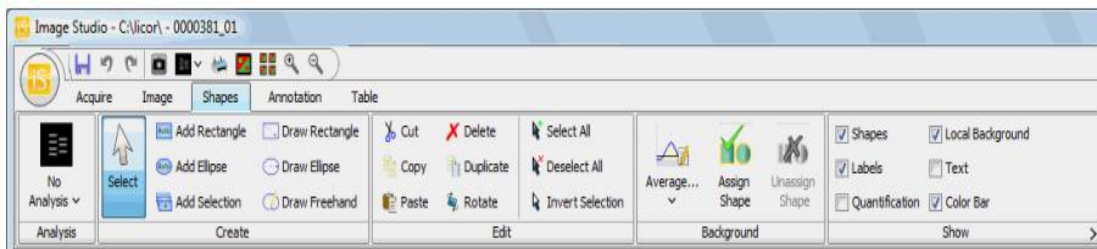
- 1) 点击 Image 标签
- 2) 在 zoom 栏，点 In/Out 可放大/缩小图片，Selection 可设置缩放的比例。点 Restore 根据窗口大小自动调整图片。
- 3) 在 Display 栏，可对图像效果作进一步调整。
- 4) 在 View Mode 栏，选择 Single 单图模式查看，或 Multi-image 多图模式查看。
- 5) 在 Create 栏，通过 Copy（复制）、Rotate or Flip（旋转或颠倒）、Free Rotate（旋转）、Reduce Noise（降低噪音）、Align Channels（根据参考通道来调整通道）或 Crop（裁剪）等操作来产生一个新图片。

四、导入图片



1. 点击 Application 下拉菜单
2. 将鼠标移动到 Import，选择 Copy From (Import Acquisition)。
3. 到目录下选择文件，点击 Open。

五、膜或胶的分析



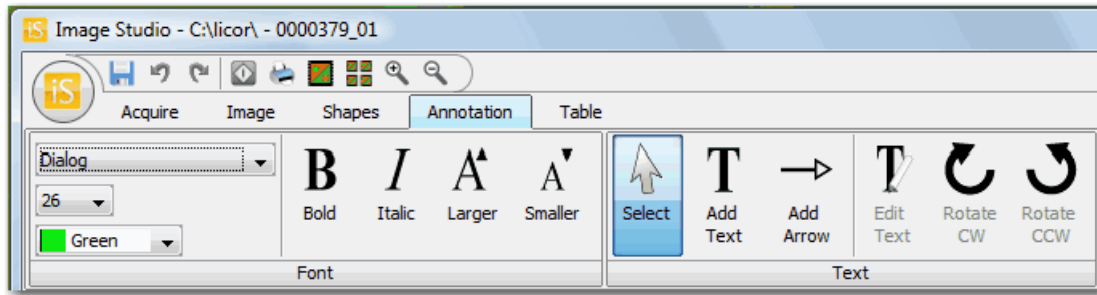
1. 手动添加图形

- 1) 点击 Shapes 标签
- 2) 在 Create 栏点击 Add Rectangle 添加矩形或 Ellipse 添加椭圆形。选 Draw Rectangle, Draw Ellipse, 或 Draw Freehand 可在图上手动画矩形、椭圆形或任意图形。
- 3) 在 Create 栏点击 Select 按钮可选中并拖动图形
- 4) 在 Edit 栏对选定的添加图形进行 Cut (剪切)、Copy (复制)、Paste (粘贴)、Delete (删除)、Duplicate (复制到另一通道)、Rotate (旋转) 等操作。点击 Select All (全选)、Deselect All (全不选)、Invert Selection (反选) 可对图形进行选定操作。

2. 扣除背景

- 1) 在 Background 栏，点 Set Back ground Type 下拉菜单中选择背景处理方法：None (不扣背景)、Average (扣除选定背景区的像素平均值)、Median (背景像素不均一时扣除选定背景区的像素中间值)、User-Defined (扣除用户定义背景)。
- 2) 当选择 Average 或 Median 方法扣除背景时，弹出的对话框中 Border Width 设定像素背景边界的宽度，选 All, Right/Left, Top/Bottom 等设定扣背景区段，点 Save 确认

3. 图像添加注释



- 1) 点击 Annotation 标签, 选择 Add Text, 在图上需添注释处双击, 输入添加的文本。选 Text with border 可在文本外加框, 选 Add Arrow 在图上加箭头。
- 2) 点 Select 对选定注释进行拖动; 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。

六、输出数据、打印图片和产生报告

1. 输出数据和图片

- 1) 在图片列表中, 点击选定图片。
- 2) 点击 Image Studio Application 按钮在下拉菜单选 Export

2. 打印图片或表格

选 Print 快捷图标, 或点 Image Studio Application 按钮选 Print。可打印 Single Image Per Page (单图)、Multiple Images Per Page (多图) 或 Table (表格)。

七、关闭机器

关闭软件, 短按电源开关, 关闭主机, 关闭电脑。

八. 常见问题处理

Western blot

| 问题：高背景，但是是均匀分布的 | |
|-------------------|--|
| 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。 |
| 问题: 背景上有不均匀的斑点分布 | |
| 可能原因 | 建议 |
| 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 |
| 问题: 信号微弱或者没有信号 | |
| 可能原因 | 建议 |
| 蛋白没有成功从胶中转移出来 | 检查转移液是否正常, 检查转膜过程的各个步骤是否正确 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 |
| 检测过程中蛋白从膜上丢失 | 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 |
| 使用的抗原量不足 | 增大跑胶时的上样量; 使点样孔尽可能的小从而浓缩抗原。 |
| 使用了错误的封闭液 | 为了提高灵敏度和结合得牢固度, 使用 Odyssey 封闭液。 |
| 转移过程中蛋白没有保留在膜上 | 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。 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。 尝试其他牌子或者类型的膜 (不同的抗原同 |

| | |
|---------------------------|--|
| | <p>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, 特别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。使用孔径小一些的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, 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 | <p>尝试另一种膜。硝酸纤维素膜要比 PVDF 膜灵敏度更高。</p> |
| 问题: 出现非特异性或者非预期的条带 | |
| 可能原因 | 建议 |
| 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。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> |

九. 注意事项

- 1, 操作环境的温度应保持在 15—25℃之间, 以保证激光头的正常工作。
- 2, 操作环境的露点温度应保持在 20 度以下, 否则可能造成激光头的损坏。露点温度的查询, 可以访问下面的网址: <http://www.decatour.de/javascript/dew/>。
注意: 如果由于露点温度过高造成的仪器损坏, 厂家不负责保修。
- 3, 仪器开机后, 有 5 分钟左右的初始化时间, 此时请不要进行其它操作。当环境温度过低时, 初始化时间会增加。
- 4, 将湿膜放在扫描平面上之前, 请先用吸水纸将大部分液体吸去, 以避免扫描时液体从扫描平面与机器之间的缝隙流入机器内部。
- 5, 扫描时, 请不要打开仪器的上盖。
- 6, 扫描完成以后, 请在扫描平面上与膜接触的位置滴上一些 ddH₂O, 用无尘纸 (Kimberly—Clark 公司的 Kimwipes) 擦拭干净。
- 7, 请避免频繁的开关机。
- 8, 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。