

Odyssey Western Blot Analysis 中文簡易操作流程

Pre-stained Marker 約平常用量之 1/3 ~ 1/5 即可於 700 Channel 掃描所得

依照實驗室標準操作流程進行 western blotting 步驟至 transfer 完成

***請使用平口鑷子拿取 membrane, 僅可使用鉛筆標示**



Transfer 完成後, 先於 1X PBS 潤洗將可能殘留的 gel 洗去

先將 blot 浸於 1X PBS 中 2 分鐘



加入 Odyssey blocking buffer 反應 1 小時, membrane 需完全浸潤於溶液中

Blocking buffer 之建議用量為 $\geq 0.4\text{ml/cm}^2$

- | |
|--|
| <p>(1) Blocking buffer 不能含有 Tween-20 或 SDS</p> <p>(2) 可使用含 Nonfat dry milk 或 casein 的 blocking buffer; casein 的建議含量為 0.1% in 0.2X PBS buffer</p> <p>(3) 不建議使用含 BSA 之 blocking buffer</p> |
|--|



primary antibody 以含有 0.2% Tween-20 的 blocking buffer 稀釋, 稀釋倍數依製造廠商建議為基準



加入稀釋後的 primary antibody, 於室溫反應 1-4 小時, 或於 4°C 反應 overnight



倒去抗體溶液後用 1X PBS-T(0.1% Tween-20) 潤洗一次, 再以 1X PBS-T(0.1% Tween-20) 搖洗 membrane 5 分鐘, 共 4 次



Secondary antibody 稀釋倍數為 1:10,000*, 依下列 buffer 稀釋:

1.使用 PVDF membrane:含 0.2% Tween-20 及 0.01% SDS 的 blocking buffer

2.使用 Nitrocellulose membrane:含 0.2% Tween-20 的 blocking buffer

(* Secondary antibody 稀釋度可為 1:5,000 ~ 1: 25,000, 視各 blot 狀況而定)



加入稀釋後的 secondary antibody, 室溫下反應 30 ~ 60 分鐘

(反應時間過長反而造成高背景值, 注意需避光)



倒去抗體溶液後用 1X PBS-T(0.1% Tween-20) 潤洗一次, 再以 1X PBS-T(0.1% Tween-20) 搖洗 membrane 5 分鐘, 共 4 次 (注意避光)



用 1X PBS 潤洗 membrane 去除多餘之 Tween-20 後即可掃描, wet 或 dry 狀態均可
選取 membrane 預設條件掃描



membrane 浸泡於 1X PBS 置 4°C 可短期保存, 乾燥後避光保存則可達數月之久