

# 重组Anti-MLKL (phospho S345)抗体[EPR9515(2)] (ab196436)

## 种属、应用和参考稀释度

(更多信息请参考Abcam官网, 并以Abcam官网为准)

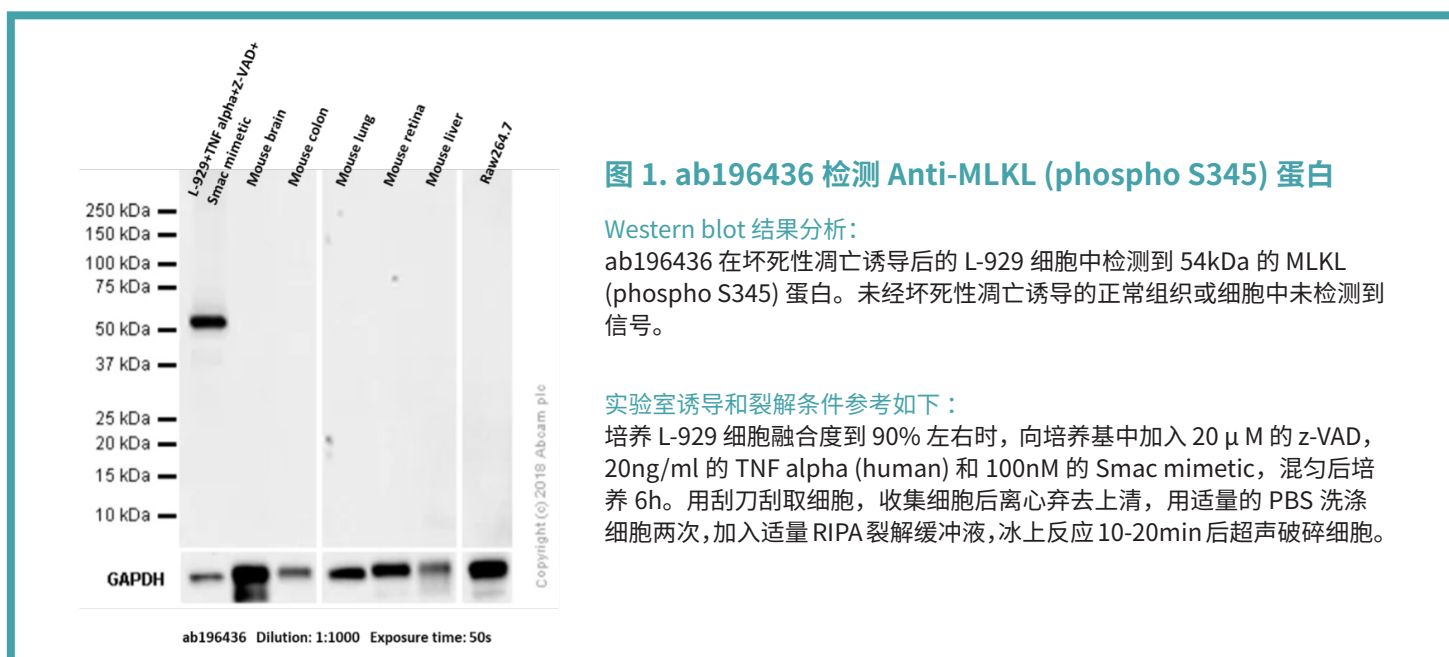
	WB	IP	Dot
Mouse	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/150)	✓
Synthetic peptide - Human	✗	✗	✓✓ (1/1000)

✓✓<sup>①</sup>已验证    ✓<sup>①</sup>预期可反应    ●预测可反应    ✗不推荐

注: ①产品质保范围包括已验证和预期可反应。

## 免疫印迹 (WB) 实验指南

- MLKL 在被 RIPK3 磷酸化后激活, 定位于质膜并执行以钙流入和质膜损伤为特征的坏死性凋亡。**磷酸化修饰的 MLKL (p-MLKL) 是坏死性凋亡的触发因素。它不存在于正常组织中** (图 1), 只能在感染、细胞受损或老化组织中检测到。
- p-MLKL 的信号**需要对细胞进行坏死性凋亡诱导刺激之后才能检测得到**, 如图 2 中, TNF a+Smac mimetic+z-VAD 药物组合可有效诱导 L-929 细胞坏死, 上调 p-MLKL 的表达。长时间的坏死诱导会导致 p-MLKL 信号降低, 这可能是由于部分 p-MLKL 蛋白易位到不溶性沉淀部分所致 (PMID: 31914150)。建议检测 MLKL 信号通路中**上下游指标 (如 p-RIPK) 或者镜下观察细胞形态 (如是否肿胀变圆)**, 确认诱导是否成功, 如图 3 所示。
- MLKL 定位于**细胞质**, 在发生坏死性凋亡时异位至质膜。当响应外界刺激 (如病毒感染) 时定位于**细胞核**。
- 进行磷酸化修饰检测时, 请先确认细胞内 **MLKL 总蛋白及上游 RIPK 蛋白** 的含量。**缺乏 RIPK 蛋白的细胞可能对 TNF a+ SM-164+z-VAD 等坏死性凋亡诱导条件不敏感 (PMID: 31914150)**。
- 使用**新鲜制备的样本**, 防止冻存样本导致磷酸化修饰减弱, 并添加合适的**磷酸酶抑制剂**。



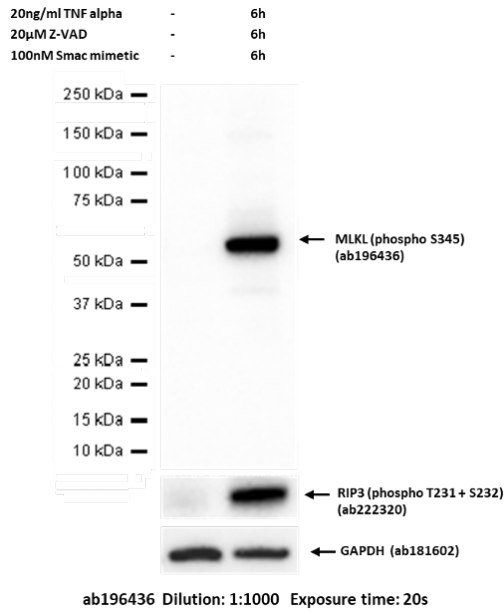


图 2. ab196436 检测 Anti-MLKL (phospho S345) 蛋白

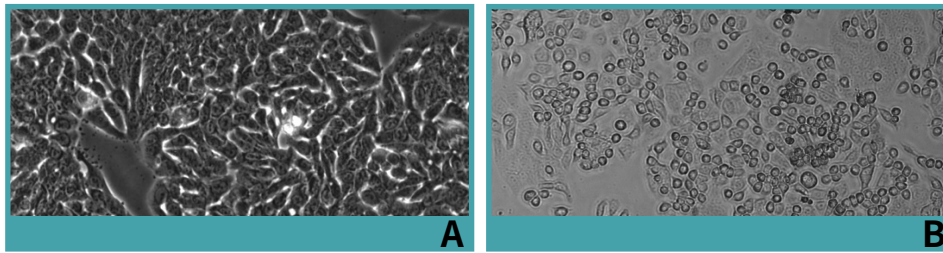
Western blot 结果分析:

ab196436 检测到 54kDa 的细胞坏死性凋亡诱导后表达的 MLKL (phospho S345) 蛋白。ab222320 检测到 MLKL 上游蛋白 RIP3 受到坏死性凋亡诱导后表达的 p-RIP3 蛋白。通过检测 p-RIP3 的蛋白表达是否上调可用于判断坏死性凋亡诱导是否成功。

实验室诱导和裂解条件参考如下:

培养 L-929 细胞密度到 90% 左右时, 向培养基中加入 20 μM 的 z-VAD, 20ng/ml 的 TNF alpha (human) 和 100nM 的 Smac mimetic, 混匀后培养 6h。用刮刀刮取细胞, 收集细胞后离心弃去上清, 用适量的 PBS 洗涤细胞两次, 加入适量 RIPA 裂解缓冲液, 冰上反应 10-20min 后超声破碎细胞。

图 3. 镜下观察坏死性凋亡诱导前后的细胞状态



- A: 坏死性凋亡诱导前的细胞, 可见细胞饱满, 细胞连接紧密
- B: 坏死性凋亡诱导 6.5h 后的细胞, 可见细胞变圆, 体积缩小, 连接消失, 与周围的细胞脱离

## 免疫印迹 (WB) 实验疑难解答

常见问题	原因及优化方案
无信号	<p>添加复合蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂, 以避免靶标蛋白降解。</p> <p>对孵育 RIPA 以后的样本裂解液进行超声破碎处理, 以富集更多蛋白。按照超声破碎仪厂商的推荐设置超声功率、时间和次数, 例如 Abcam 常用设置为: 超声 10-15 次, 功率 40KW, 每次超声 3 秒, 间隔 10 秒。</p> <p>建议使用新鲜制备的裂解液, 并且增加样本裂解液上样量, 例如上样总蛋白 50μg/泳道。</p> <p>增加一抗使用量, 可尝试降低一抗稀释度至 1/500。</p> <p>增加二抗使用量, 推荐使用 ab97051 或 ab205718 (二抗稀释度 1/2000-1/20000)。</p> <p>不要裁膜, 请尽量保留全膜进行实验。</p> <p>强烈建议转膜完成后使用丽春红染色, 确定转膜是否成功。</p> <p>增加曝光时间, 可适当延长曝光时间至 3 分钟或更长时间。</p> <p>选择敏感度为飞克级别的 ECL 底物。</p>
高背景	<p>请使用新鲜制备的抗体工作液, 不推荐抗体重复利用。</p> <p>尝试更换封闭液, 例如可选择 5% 脱脂奶粉或 5% BSA。</p>
条带问题	<p>组织样本相较细胞样本更加复杂, WB 检测可能会有多条带现象。</p> <p>磷酸化会使 MLKL 激活后形成同源三聚体, 因此可能会检测到 150kDa 左右的条带。(PMID: 24316671)</p>

更多疑难解答详见  
[www.abcam.cn](http://www.abcam.cn) 或微信  
 扫描下方二维码

