

重组Anti-cleaved N-terminal GSDMD 抗体[EPR20829-408] (ab215203)

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	IHC-P
Human	✓✓ (1/1000)	✗

✓✓^①已验证 ✓^①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

- N-GSDMD 的剪切依赖炎症胱天蛋白酶 caspase 的激活。因此需对检测样本进行炎症刺激 (如脂多糖 LPS 刺激), 诱导 caspase 蛋白激活, 继而将全长 GSDMD 剪切为 31kDa GSDMD-N 片段和 23kDa GSDMD-C 片段。可通过检测 N-GSDMD 上游蛋白 caspase 蛋白剪切体 (如 caspase-1 p20) 的表达量来判断炎症诱导是否成功 (PMID:32371889, 31548300, 27418190, 26375259)。
- 建议设置不同的诱导时间梯度及药物浓度梯度以获得最佳实验条件, 诱导时间过长会引起细胞膜破裂, 从而胞内蛋白随细胞碎片进入培养上清中, 导致全长 GSDMD 蛋白及其剪切片段在细胞裂解液中的检测水平降低。建议可同时检测细胞裂解液和细胞培养上清 (上清需浓缩) 中的 N-GSDMD 水平。

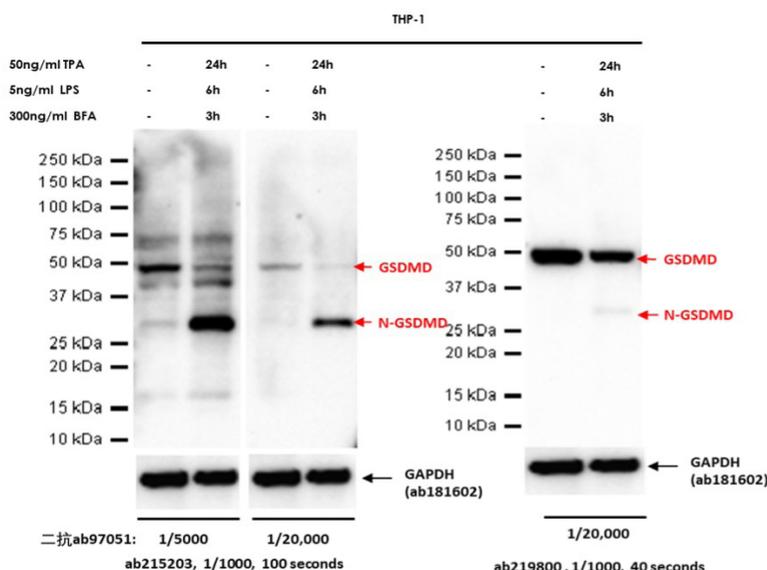
图 1. ab215203 检测 Cleaved N-terminal GSDMD 蛋白

Western blot 结果分析:

ab215203 (Anti-cleaved N-terminal GSDMD antibody) 主要识别 N 端 GSDMD, ab219800 (Anti-GSDMD antibody) 主要识别全长 GSDMD。THP-1 细胞经 TPA, LPS 及 BSA 处理后, 全长 GSDMD 蛋白发生剪切, 剪切体含量增加。降低二抗 ab97051 的稀释度可增强信号强度。

实验室诱导条件参考如下:

THP-1 细胞培养到约 90% 密度, 换为含 50ng/ml TPA 的培养基继续培养 24 小时, 之后再次换为含有 5ng/ml LPS 的培养基, 培养 3 小时后加入 300ng/ml BFA (Brefeldin A) 继续培养 3 小时, 收集诱导后的细胞用于 GSDMD 蛋白的检测。



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>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。按照超声破碎仪仪器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。超声时将样品置于冰上。</p> <p>请确认样本中靶标蛋白的表达情况。一般未经焦亡诱导处理的样本,是不存在GSDMD的N端剪切形式的;如果已经进行相应的诱导处理,请进一步确认是否诱导成功,例如细胞是否出现典型的焦亡小泡、是否检测到上游分子发生了激活等。</p> <p>增加样本裂解液上样量,例如上样50μg/泳道总蛋白。</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。或者至少保留20-75 kDa范围的膜。</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>
条带问题	<p>ab215203会检测到很弱的50kDa全长GSDMD蛋白。</p>

更多疑难解答详见
www.abcam.cn或微信
扫描下方二维码

