

重组Anti-Occludin抗体 [EPR20992] (ab216327)

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	ICC/IF ^②	Flow Cyt(Intra)	IP
Human	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/200)	✓✓ (1/100)	✓✓ (1/60)	✓✓ (1/40)
Mouse	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/200)	✗	✓	✓
Rat	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/200)	✗	✓	✓
Dog	✓✓ (1/1000)	✓	✓✓ (1/100)	✓	✓
Recombinant full length protein - 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。②ICC/IF是指免疫细胞化学/荧光, 仅支持细胞样本的免疫荧光检测。

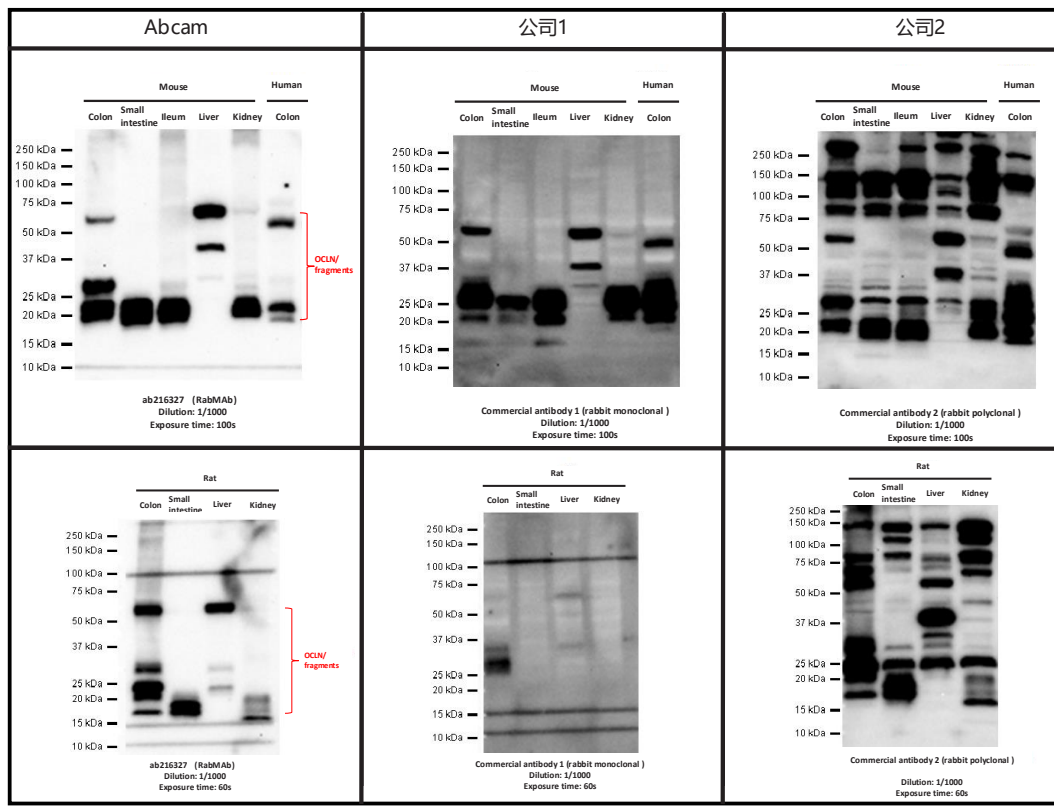
免疫印迹(WB)实验指南

- Occludin 是一种膜整合蛋白, 在上皮细胞和内皮细胞的紧密连接处表达。主要定位于**细胞膜、细胞连接或紧密连接处**。在**肾脏, 肠道等组织**中高度表达。
- Occludin 在**不同组织细胞中的表达水平不同**, 有些样本可能会出现**弱表达或无表达**的情况。请选择合适的实验样本, 推荐使用阳性对照, 比如图 1 所示的样本, 以确认实验体系没有问题。
- Occludin 含有**多个异构体**, 不同异构体分子量范围变化较大 (8kDa~59kDa); 还存在多种翻译后修饰如**泛素化修饰和蛋白水解**等。因此不同样本检测到的条带数量和分子量可能不同 (PMID: 18647175, PMID: 19821483, PMID: 19457074, PMID: 11782481, PMID: 22083955)。
- Occludin 是**多次跨膜蛋白**, 具有多个疏水跨膜区, 高温煮沸时, **极易形成聚体**, 无法在胶中正常迁移, 可能会导致 WB 结果中条带出现在加样口附近, 目的分子量处无条带或条带信号弱, 建议**制备好裂解液后不加热**, 样本裂解液与 loading buffer 混匀并室温孵育 10 分钟后, 直接上样电泳。
- ab216327 在检测 **bEnd.3** 细胞裂解液时信号弱, 可能是由于靶蛋白表达水平低, 推荐提高上样量和增加抗体浓度。

图 1. ab216327 检测 Occludin 蛋白

Western blot 结果分析:

ab216327 检测到不同形式不同分子量的 Occludin, 不同组织中 Occludin 的存在形式不同, 该结果与文献报道及其他同靶点的市售抗体相符, 且 ab216327 在特异性方面更为卓越。



更多疑难解答详见
www.abcam.cn或微信
扫描下方二维码



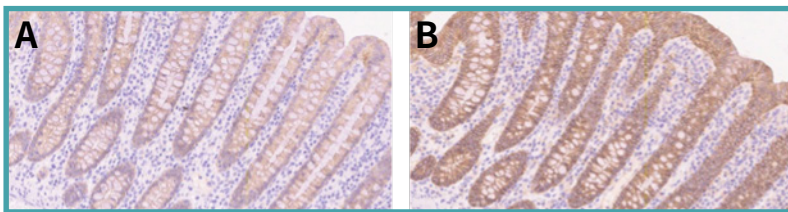
见证您的每一次突破
abcam

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>确认待检样本中Occludin的蛋白表达丰度,或设置已知高表达样本作为阳性对照,如肾脏,肠道等组织。</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。请根据实验室仪器条件调整设置。</p> <p>适当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。</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> <p>如检测到的条带出现在加样孔附近,电泳前不煮裂解液直接上样。</p>

免疫组织化学 (IHC-P) 实验指南

- 有些样本可能会出现弱表达或无表达的情况,推荐使用偶联 HRP 的 Polymer 二抗进行实验以获得更强的实验信号,如 ab209101,见图 2 所示;推荐使用**阳性对照**如胃肠道组织和肾脏组织等,以确认实验体系没有问。Occludin 在不同组织中的表达有差异,如表 1 所示。
- 抗体支持**偶联 HRP 和荧光基团的二抗进行 IHC-P 检测**,荧光检测信号弱时,推荐使用特异性更高的预吸附荧光二抗,如 ab150081。



普通 HRP 二抗

偶联 HRP 的 Polymer 二抗 (ab209101)

图 2. ab216327 检测 Occludin 在人结肠组织中的表达。A 和 B 图使用的一抗浓度和孵育时间完全相同,使用 ab216327 搭配 polymer 二抗 (B) 检测人结肠中 Occludin 特异性信号明显增强。

表1. ab216327组织芯片检测结果

正常人组织样本				正常小鼠组织样本			
心肌组织	×	胎盘	✓	脾脏	×	心肌	×
大脑	×(内皮细胞 ✓)	骨骼肌	×	肝脏	×(内皮细胞 ✓)	肺	✓(低表达)
结肠	✓	皮肤	✓	肾脏	✓	大脑	×(内皮细胞 ✓)
子宫内膜	✓	脾脏	×(内皮细胞 ✓)	睾丸	✓		
肾脏	✓	胃	✓	胃	✓		
肝脏	×	睾丸	✓	结肠	✓		
肺	✓	甲状腺	✓	胰腺	✓		
乳腺	✓	扁桃体	×(内皮细胞 ✓)	皮肤	✓(低表达)		
胰腺	✓			骨骼肌	×		

表 1 IHC-P 实验使用 ab216327 检测组织芯片中 Occludin 的蛋白表达情况。一抗 4°C 孵育过夜。二抗:兔 specific IHC polymer detection 试剂盒 HRP/DAB (ab209101)。热抗原修复试剂: Tris/EDTA buffer, pH 9.0(ab93684)。

✓ 检测到阳性信号 × 未检测到阳性信号

免疫组织化学 (IHC-P) 实验疑难解答

常见问题	原因及优化方案
无信号	<p>确认待检样本中Occludin的蛋白表达丰度和定位,或设置已知高表达样本作为阳性对照。</p> <p>过度固定。样本固定时间取决于组织块大小与组织类型,但对于大多数样本,例如使用4%PFA固定,室温固定18-24小时较为合适。</p> <p>抗原修复不成功。醛类固定的组织样本,我们建议使用高压锅进行热诱导抗原修复,可以尝试110°C修复切片15分钟。</p> <p>二抗的选择。DAB检测体系推荐使用偶联HRP的Polymer二抗进行实验以获得更强的实验信号,如ab209101。荧光检测体系推荐使用特异性更高的预吸附荧光二抗,如ab150081。</p>