

重组Anti-IL-6抗体[EPR23819-11] (ab259341)

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	IP	Flow Cyt (Intra)	IHC-Fr
Mouse	✓✓ (1/1000)	✗	✗	✓✓ (1/30)	✗	✗
Rat	✓✓ (1/1000)	✗	✗	✓✓ (1/30)	✗	✗

✓✓^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仅指细胞样本的免疫荧光/免疫化学检测。

免疫印迹(WB)实验指南

- IL-6 是急性期反应的有效诱导因子。在感染和组织损伤期间, IL-6 的快速生成有助于宿主防御, 但过量的 IL-6 合成与疾病病理有关。
- 正常组织中 IL-6 基本不表达, 因此 IL-6 蛋白在**正常组织中检测不到**。若需检测不同样本中的 IL-6, 请先进行诱导试剂浓度和诱导时长的摸索优化, 获得最适诱导条件的情况下再进行正式检测。建议检测信号通路中**其它指标如 IL-1 beta 和 TNF alpha**, 确认诱导是否成功。
- IL-6 属于**分泌型**蛋白。为了提高 WB 实验的成功率, 除了对样本进行适当的诱导处理确保 IL-6 有一定的表达外, 还需要使用蛋白转运抑制剂 **BFA(Brefeldin A)** 在诱导后期对样本进行处理, 抑制 IL-6 分泌至胞外, 保证细胞裂解液中有充足的靶标蛋白可以被检测到; 具体诱导试剂处理细节请参考图 1。
- 靶标蛋白在不同样本中的翻译后修饰存在区别, 所以实际检测到的条带大小在 **21 - 28 kDa** 之间, 可能与预测值 **24 kDa** 不符。

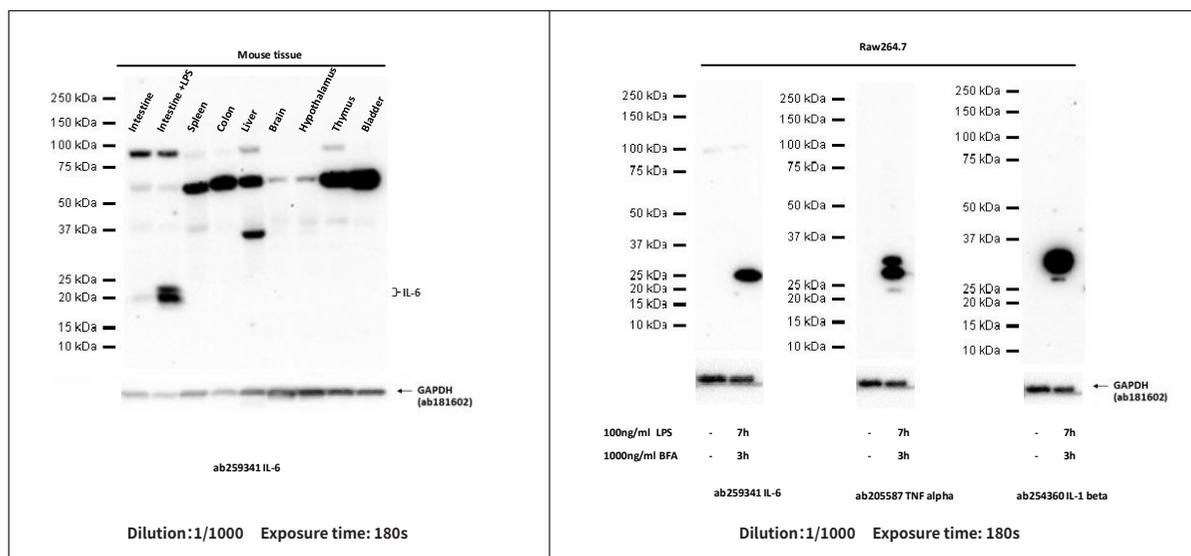
图 1: ab259341 检测组织和细胞中 IL-6 蛋白的表达

Western blot 结果分析:

IL-6 蛋白在正常组织和细胞中表达极低。炎症诱导 (如 LPS 诱导) 的小鼠肠道组织及 Raw264.7 细胞中 IL-6 蛋白表达水平上升。炎症诱导往往也伴随其他细胞因子水平的上升, 如 LPS 诱导后的 Raw264.7 中, IL-6, TNF alpha, IL-1 beta 蛋白表达水平同时出现升高。

实验室诱导条件参考如下:

细胞培养至融合度达到 90% 左右时, 弃去培养基, 加入含 100ng/ml LPS 的新培养基培养 4 小时, 然后再加入蛋白转运抑制剂 BFA(Brefeldin A) 至浓度为 1000ng/ml, 继续培养 3 小时后收集细胞。IL-6 为分泌蛋白, 1000ng/ml BFA (蛋白转运抑制剂) 处理细胞 3 小时, 可抑制 IL-6 分泌到胞外, 有助于提高细胞裂解液中的 IL-6 蛋白信号强度。诱导效果可通过检测 TNF- alpha, IL-1 beta 等其它细胞因子的表达或者通过 qPCR 检测 IL-6 的 mRNA 水平进行判断。



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	确认样本中IL-6蛋白表达水平,正常组织中IL-6基本不表达,样本需经有效炎症诱导处理。
	添加复合蛋白酶抑制剂,以避免靶标蛋白降解。
	增加样本裂解液上样量,例如上样50 μ g/泳道总蛋白。
	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;超声破碎时需将样本裂解液置于冰上操作。请根据实验室仪器条件调整设置。
	增加一抗使用量,可尝试降低一抗稀释度至1/500。
	增加二抗使用量,推荐使用ab97051 或ab205718 (二抗稀释度1/2000-1/20000)。
	强烈建议转膜完成后使用丽春红染色,确定转膜是否成功。
	增加曝光时间,可适当延长曝光时间至3分钟或更长时间。
	选择敏感度为飞克级别的ECL底物。
高背景	请使用新鲜制备的抗体工作液,不推荐抗体重复利用。
	尝试更换封闭液,例如可选择5%脱脂奶粉或5%BSA。
条带问题	靶标蛋白在不同样本中的翻译后修饰存在区别,所以实际检测到的条带大小在21 - 28 kDa之间。
	组织样本相较细胞样本更加复杂,WB检测可能会有多带现象。

更多疑难解答详见
www.abcam.cn或微信
扫描下方二维码

