

重组Anti-Collagen I抗体[EPR24331-53] (ab270993)

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	IHC-Fr
Human	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Mouse	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/500)	✓✓ (1/2000)	✓✓ (1/500)	✓✓ (1/30)	✓✓ (1/100)
Rat	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/500)	✓	✓	✓	✓✓ (1/100)

✓✓^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。② 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

- Collagen I 具有表达特异性, 在大多数结缔组织中表达, 而在正常的心脏、肾脏、肺组织中的检测信号相对较弱 (PMID: 31106200; PMID: 28835616; PMID: 27441395), 若不确定样本中靶标蛋白的表达水平, 建议选择皮肤组织作为阳性对照。同时, 可通过优化实验条件, 例如提高抗体使用浓度、增加上样量、延长曝光时间等方法增强检测信号。
- 在检测时 Collagen I 可能会观察到多条条带现象, 如图 1 中 220 kDa 的 collagen I 前体蛋白, 60-75 kDa 的剪切片段, 35 kDa 的 C-前肽剪切体, 请注意在检测不同类型样本时, 这些观察到的条带可能会存在区别。
- Collagen I 本身在样本中存在很多的剪切位点, 所以如果样本处理不当, 很容易发生降解或是剪切, 因此建议使用新鲜培养收集的细胞制备样本。
- 在整个胶原蛋白提取过程中保持低温有助于避免蛋白降解和变性。
- 为防止胶原蛋白聚集, 请注意实验试剂 pH 值、温度以及胶原蛋白浓度 (PMID: 30880060; PMID: 34381990; PMID: 32569971)。酸处理 / 胃蛋白酶处理能更好地分离胶原蛋白 (PMID: 22549937; PMID: 29426422)。

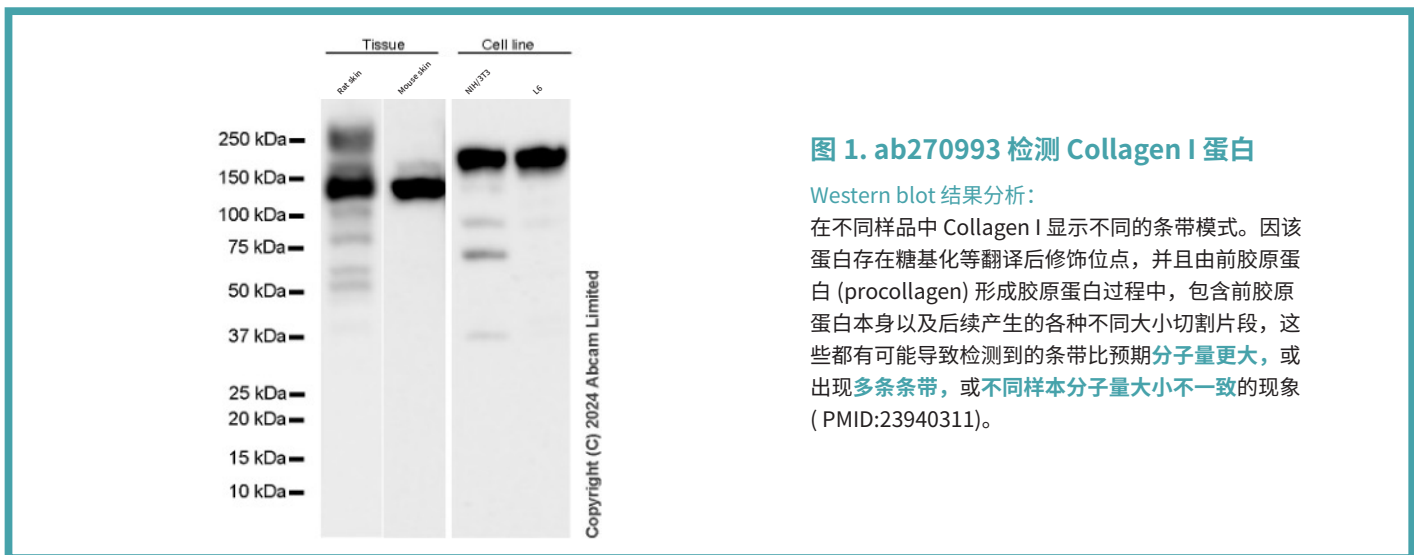


图 1. ab270993 检测 Collagen I 蛋白

Western blot 结果分析:

在不同样品中 Collagen I 显示不同的条带模式。因该蛋白存在糖基化等翻译后修饰位点, 并且由前胶原蛋白 (procollagen) 形成胶原蛋白过程中, 包含前胶原蛋白本身以及后续产生的各种不同大小切割片段, 这些都有可能检测到的条带比预期分子量更大, 或出现多条条带, 或不同样本分子量大小不一致的现象 (PMID:23940311)。

免疫印迹(WB)实验疑难解答

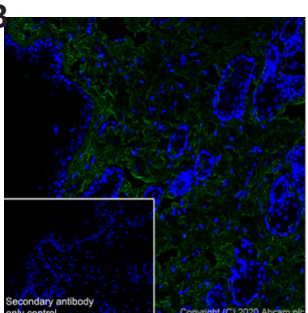
常见问题	原因及优化方案
无信号	添加复合蛋白酶抑制剂, 以避免靶蛋白降解。 建议使用新鲜收集细胞, 制备裂解液并立即检测, 并且增加样本裂解液上样量, 例如上样50μg/泳道总蛋白。 由于Collagen I分子量较大, 为了更好的观察条带, 可以使用8%或8%以下浓度的SDS-PAGE分离胶或4%-20%的梯度胶。 增加一抗使用量, 可尝试降低一抗稀释度至1/500。 使用高品质的二抗或增加二抗使用量, 推荐使用ab97051 或ab205718 (二抗稀释度1/2000-1/20000)。 对于分子量较大的靶标蛋白, 建议转膜时在转膜缓冲液中SDS终浓度为0.1%, 转膜缓冲液中甲醇终浓度降低至10%, 并推荐使用0.45μm的PVDF膜。 对于分子量较大的蛋白, 根据转膜仪器厂商建议设置电压电流和转膜时间, Abcam设置参考为: 320mA或者75V, 转膜2-3h。 不要裁膜, 请尽量保留全膜进行实验。 强烈建议转膜完成后使用丽春红染色, 确定转膜是否成功。

无信号	增加曝光时间,可适当延长曝光时间至3分钟或更长时间。 对于表达丰度较低的样本,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

免疫组织化学 (IHC) 实验指南

- Collagen I 在几乎所有的**结缔组织**中都有表达。其是骨骼、皮肤、肌腱、韧带、巩膜、角膜和血管中的主要蛋白。其定位于**细胞外基质**。若不确定样本中靶标蛋白的表达水平,建议选择**皮肤组织**作为**阳性对照**。
- 对于石蜡包埋的免疫组织化学 (IHC-P), 醛类固定的样本, 建议使用 **Tris/EDTA (pH 9.0)** 热抗原修复液。
- 对于冷冻切片的免疫组织化学 (IHC-Fr), 若为醛类较长时间固定如固定过夜的样本, 建议使用 **10mM citrate (pH 6.0) + 0.05% Tween-20** 作为热抗原修复液。具体 IHC-P 和 IHC-Fr 染色结果和实验信息如图 2 所示。
- 对于石蜡包埋的免疫组织化学 (IHC-P), 信号弱或无信号时, 可通过使用**偶联 HRP polymer 的二抗**, 例如 ab209101、ab214880 等, 来放大信号。

图 2. 使用 ab270993 进行 IHC-P 和 IHC-Fr 实验的结果示意图

示意图	实验细节
<p>A</p> 	<p>A 图: IHC-P 检测小鼠胃中 Collagen I 蛋白</p> <p>一抗: 稀释比为 1/500, 室温孵育 30 分钟。</p> <p>二抗: Leica DS9800 (Bond™ Polymer Refine Detection)。</p> <p>抗原修复: Tris/EDTA (pH 9.0) 缓冲液 (Leica ER2), 20 分钟, (手工实验建议使用高压热修复, 110°C 修复 15 分钟)。</p>
<p>B</p> 	<p>B 图: IHC-Fr 检测小鼠皮肤中 Collagen I 蛋白</p> <p>一抗: 稀释比为 1/100, 室温孵育 1 小时。</p> <p>二抗: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077)。</p> <p>抗原修复: 热诱导抗原修复, 柠檬酸缓冲液 (10mM citrate pH 6.0 + 0.05% Tween-20), 100°C 修复 10 分钟 (Leica Biosystems BOND® RX)。</p>

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	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。 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。 增加一抗工作浓度, 建议 4 度湿盒中, 一抗孵育过夜。 二抗的选择。对于 IHC-P, 推荐使用偶联 HRP polymer 的二抗如 ab209101、ab214880 进行实验以获得更强的实验信号。
高背景	对于 IHC-P, 如后续使用 HRP 结合物进行检测, 请在一抗孵育前使用 3% 过氧化氢处理切片 10 分钟以封闭内源性过氧化物酶。 对于 IHC-Fr, 如使用荧光基团偶联的二抗进行实验, 推荐使用封闭液为 10% 二抗宿主来源的正常血清 + 1% BSA + 0.3M (22.52 mg/mL) 甘氨酸, 室温封闭 1-2h, 以淬灭醛基引起的自发荧光。

更多疑难解答详见
www.abcam.cn 或微信
 扫描下方二维码

