

重组Anti-Iba1抗体[EPR16589]-小鼠IgG1 (Chimeric) (ab283319)

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 ^③	ICC/IF ^②	Flow Cyt(Intra)	IP
Human	✓✓ (1/1000)	✓✓ (1/10000)	✓✓ (1/100)	✓✓ (1/10000)	✓✓ (1/30)
Mouse	✗	✓✓ (1/10000)	✓	✓	✓
Rat	✗	✓✓ (1/10000)	✓	✓	✓

✓✓^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 ICC/IF仅指细胞样本的免疫荧光/免疫化学检测。③ IHC-P仅支持HRP-DAB显色体系, 不支持荧光体系检测。

免疫组织化学 (IHC-P) 实验指南

- 该抗体不支持用偶联荧光基团的二抗进行检测, 内部验证结果如图 1 所示。



图 1. 二抗偶联 HRP(A) 和荧光基团 (B) 检测小鼠大脑染色示例

一抗:

ab283319

二抗:

A: 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP polymer)。

B: 山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 预吸附二抗。

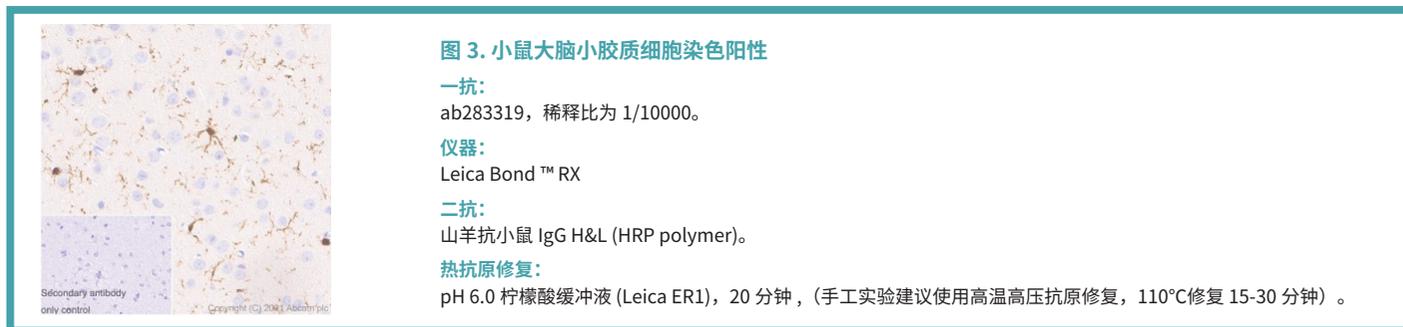
- 该小鼠单克隆嵌合抗体由 RabMab 亲本抗体 (ab178847) 工程化而成, 检测时请使用抗小鼠二抗, 例如 ab214879。当用小鼠抗体检测小鼠组织时 (即 mouse on mouse), 由于抗小鼠二抗可能会与组织内源性 IgG 和 Fc 受体结合, 因此易产生高背景, 尤其是在血浆或免疫细胞比较丰富的组织, 如脾脏、肝脏和肾脏等。针对 ab283319 检测小鼠易产生高背景的问题, 我们建议尝试以下三种建议方案来消除高背景情况。第一种, 孵育一抗后, 采用未偶联的特异性抗小鼠 IgG1 的抗体 (ab283319 的同种型是 IgG1) 进行孵育, 如 ab125913 (重组兔单克隆抗体 [M1gG51-4] 抗小鼠 IgG1 H&L), 再进行再进行 HRP 偶联二抗 (抗兔二抗, 如 ab214880) 孵育, 如图 2A 和 2B 所示, 可以减少如图 2C 和 2D 所示的背景染色; 第二种, 在一抗孵育之前, 加入 anti-mouse IgG 的抗体进一步封闭, 如 ab6668, 阻断二抗与内源性小鼠 IgG 结合产生的高背景, 然后按正常操作继续孵育一抗和二抗 (抗鼠二抗, 如 ab214879)。第三种, 采用 4%PFA 灌流固定的方式减少组织中血浆的残留从而降低高背景。第三种方式可以结合第一种或第二种方式同时使用。

图 2 ab283319 检测小鼠肝脏和肾脏组织的 IHC 结果示意图

Mouse liver	Mouse kidney	一抗和二抗抗体搭配细节	IHC-P 结果分析: 图 A、B 为检测 Iba1 蛋白的阳性样本小鼠肝脏和肾脏组织, 通过增加和一抗同种型抗小鼠 IgG1 H&L (ab125913) 的兔单抗, 联合山羊抗兔 IgG H&L (HRP polymer) 二抗, 可降低小鼠一抗检测小鼠样本时发生的非特异染色现象。图 C、D 为在孵育一抗后, 使用山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP polymer) (ab214879) 的二抗, 可以看到部分区域有非特异染色 (箭头所示)。
		图 A 和 B: 一抗: Anti-Iba1 (ab283319, 小鼠单抗)。 二抗: Anti-mouse IgG1 (ab125913) + 山羊抗兔 IgG H&L (HRP polymer)。 注: 在使用 ab283319 检测易产生高背景的背景的样本时, 强烈推荐此一抗和二抗搭配, 可避免产生高背景。	
		图 C 和 D: 一抗: Anti-Iba1 (ab283319, 小鼠单抗)。 二抗: 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP polymer) (ab214879)。 注: 在使用 ab283319 检测易产生高背景的背景的样本时, 不推荐此一抗和二抗搭配, 容易产生高背景。箭头所示的位置为非特异性的染色。	

免疫组织化学 (IHC-P) 实验指南

- Iba1 是一种小胶质细胞或巨噬细胞特异的钙结合蛋白，在激活的小胶质细胞中，它会与细胞骨架蛋白共同参与细胞运动。Iba1 在小胶质细胞、T 淋巴细胞及外周血单核细胞中表达。Iba1 主要定位于细胞膜和细胞骨架。
- 内源性 Iba1 表达水平较高的组织为脑，如不确定待检测组织中 Iba1 表达水平，建议用脑作为阳性对照。
- 推荐使用 DAB 作显色底物。信号弱或无信号时，可通过使用偶联 HRP 的 Polymer 二抗，例如 ab214879，来放大信号。具体 IHC-P 染色结果和实验信息图 3。



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>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。建议尝试更换抗原修复液,比如更换为pH6.0的柠檬酸钠酸性修复液或者pH9.0的Tris-EDTA碱性修复液。</p> <p>二抗的选择。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。不支持用偶联荧光基团的二抗进行检测。</p>
高背景	<p>如后续使用HRP结合物进行检测,请使用3%过氧化氢处理切片10分钟以封闭内源性过氧化物酶。</p> <p>建议使用灌流组织以尽量减少血浆带来的非特异染色。</p> <p>封闭不充分有时会产生高背景,建议更换封闭液为10%二抗宿主来源的正常血清+1%BSA,室温封闭1-2h。</p> <p>一抗浓度过高与孵育温度过高可能会导致高背景,低温长时间孵育更有利于抗原抗体的结合,建议适当降低一抗浓度,并4°C过夜孵育。</p> <p>检测小鼠组织时,建议参考免疫组织化学 (IHC-P) 实验指南部分第二条建议。</p>

更多疑难解答详见
www.abcam.cn或微信
扫描下方二维码

