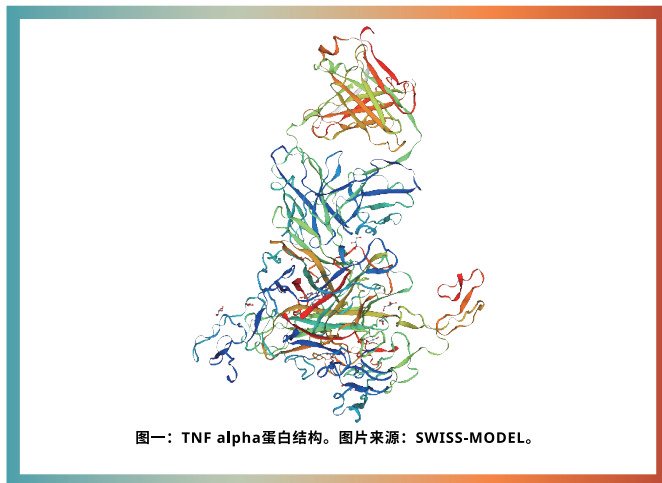


TNF alpha (TNF)



TNF alpha 靶点介绍

蛋白功能

- TNF alpha 是一种炎症细胞因子，在急性免疫反应期间由单核细胞和巨噬细胞产生。
- TNF alpha 与 TNFR-1 和 TNFR-2 相互作用，两者都属于 TNF 受体超家族。
- TNF alpha 可以促进细胞增殖、分化、细胞因子产生、细胞凋亡或坏死。
- TNF alpha 可通过与 IL-1 beta 和 IL6 的协同作用促进血管生成。
- 有证据表明，TNF alpha 的失调与如败血症、银屑病、糖尿病等疾病病理有关。

蛋白特性

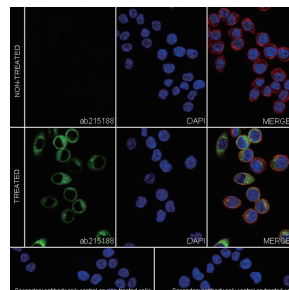
- TNF alpha 有两种活性形式，即可溶形式 [~18kDa] 和膜结合形式 [~25kDa]。
- TNF alpha 是一个低表达蛋白；实验检测表达时可能需要用 LPS（脂多糖）或 BFA（Brefeldin A）刺激处理。

蛋白定位

- 可以是分泌型或细胞膜结合型。

异构体 & 翻译后修饰

- 人 (P01375): 26kDa (预测)
- 小鼠 (P06804): 26kDa (预测)
- 大鼠 (P16599): 26kDa (预测)
- 膜形式在丝氨酸残基上被磷酸化。
- 可溶形式通过蛋白水解处理从膜形式衍生而来。



图二：TNF alpha ICC实验结果图，
Anti-TNF alpha antibody [EPR20972] (ab215188)。
绿色：TNF alpha，红色：Tubulin，蓝色：DAPI。

WB 实验贴士

注意事项

- 为了提高样本中 TNF alpha 的含量，对于免疫细胞，推荐使用 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)/PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate) 进行预处理（图三、五），它们是一类常用的佛波酯，能结合并激活蛋白激酶 C，实现细胞内信号传递，并使多种不同免疫细胞产生细胞因子。
- 作为炎症细胞因子，TNF alpha 在急性免疫反应期间由单核细胞和巨噬细胞产生。需要特别注意的是，样本通常需要刺激（如 LPS）才能产生 TNF alpha（图三、四、五）。抗体产品说明书或者文献提供的诱导条件仅供参考。若需检测不同样本中 TNF alpha，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。未诱导处理的样本可作为阴性对照。
- 由于 TNF alpha 是一类分泌性蛋白，为了提高 WB 实验的成功率，除了对样本进行适当的预处理和诱导处理确保 TNF alpha 有一定量的表达外，还需要使用 BFA(Brefeldin A) 在诱导后对样本进行处理（图三、四、五），阻碍 TNF alpha 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。
- 正常组织表达的 TNF alpha、IL-1 beta 和 IL-6 蛋白达不到 WB 检测水平。IL-1 beta 和 IL-6 的表达情况可以作为验证药物处理后 TNF alpha 表达变化的良好对照。
- 为了保持实验的成功性和可重复性，请注意待检测细胞培养密度的一致性。以 THP-1 来源的巨噬细胞为例，由于群体感应的影响，偏低或过高的细胞密度都会影响包括 TNF alpha 在内的细胞因子分泌。
- WB 实验中可能观察到多条条带现象：~51kDa 多聚体、~33kDa 二聚体中间体、~26kDa 膜结合形式与 ~17kDa 可溶形式的 TNF alpha（图五）。

阳性对照

- 人：TPA 预处理后使用 LPS 和 BFA 处理的 THP-1 全细胞裂解液；PMA 预处理后使用 LPS 和 BFA 处理的 U937 全细胞裂解液。
- 小鼠：TPA 预处理后使用 LPS 和 BFA 处理的 Raw264.7 全细胞裂解液。

阴性对照

- 人：未诱导处理的 THP-1 全细胞裂解液；未诱导处理的 U937 全细胞裂解液。
- 小鼠：未诱导处理的 RAW264.7 全细胞裂解液。

结果示例

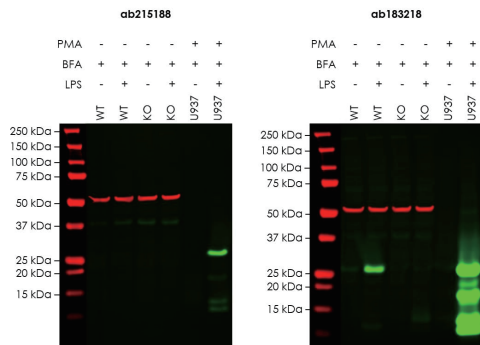


图 三: WB- Anti-TNF alpha 抗体 [EPR20972] (ab215188) vs. Anti-TNF alpha 抗体 [EPR19147] (ab183218)

泳道 1: 30μg 野生型对照组 -BFA (5μg/mL, 4h) 处理的 THP-1 细胞裂解液

泳道 2: 30μg 野生型处理组 -LPS (100ng/mL, 16h) 和 BFA (5μg/mL, 最后 4h) 处理的 THP-1 细胞裂解液

泳道 3: 30μg TNF alpha 敲除型对照组 -BFA (5μg/mL, 4h) 处理的 THP-1 细胞裂解液

泳道 4: 30μg TNF alpha 敲除型处理组 -LPS (100ng/mL, 16h) 和 BFA (0.1 μg/mL, 4h) 和 BFA (5μg/mL, 最后 4h) 处理的 THP-1 细胞裂解液

泳道 5: 30μg 对照组 -PMA (10 mM, 2days) 和 BFA (5μg/mL, 最后 4h) 处理的 U937 细胞裂解液

泳道 6: 30μg 处理组 -PMA (10 mM, 2days) 和 LPS (1μg/mL, 接着 16h) 和 BFA (5μg/mL, 最后 4h) 处理的 U937 细胞裂解液

一 抗: Anti-TNF alpha 抗体 [EPR20972](ab215188), 浓度 1/1000 稀释; Anti-TNF alpha 抗体 [EPR19147] (ab183218), 浓度 1/1000 稀释; Mouse anti-Alpha Tubulin 抗体 [DM1A] (ab7291), 浓度 1/20000 稀释。

二 抗: Goat anti-Rabbit IgG H&L (IRDyeA® 800CW) preabsorbed, 浓度 1/20000 稀释; Goat anti-Mouse IgG H&L (IRDyeA® 680RD) preabsorbed, 浓度 1/20000 稀释。

预测条带大小: 26kDa

检测条带大小: 27kDa

结果描述: WB 实验中, ab215188 能够特异性结合 TNF alpha, 但 ab183218 的检测灵敏度更高, 因此更推荐使用 ab183218。

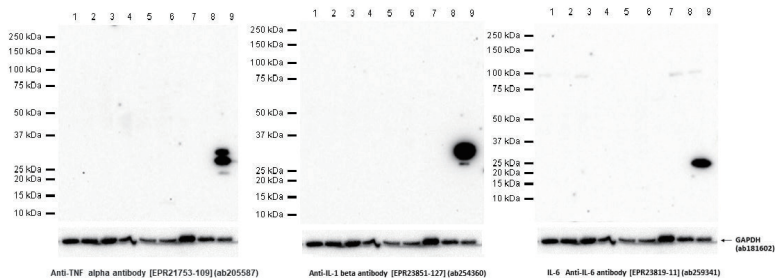


图 四: WB- Anti-TNF alpha 抗体 [EPR21753-109] (ab205587)

泳道 1: 20μg 大鼠大脑皮质组织裂解液。泳道 2: 20μg 大鼠小脑组织裂解液。

泳道 3: 20μg 大鼠海马体组织裂解液。

泳道 4: 20μg 大鼠脊髓组织裂解液。

泳道 5: 20μg 大鼠小肠组织裂解液。

泳道 6: 20μg 大鼠肾脏组织裂解液。

泳道 7: 20μg 大鼠皮肤组织裂解液。

泳道 8: 20μg 对照组 - 小鼠 RAW264.7 全细胞裂解液。

泳道 9: 20μg 处理组 -LPS (100ng/mL, 4h) 和 BFA (1000ng/mL, 最后 3h) 处理的小鼠 RAW264.7 全细胞裂解液。

一 抗: Anti-TNF alpha 抗体 [EPR21753-109] (ab205587), 浓度 1/1000 稀释; Anti-IL-1 beta 抗体 [EPR23851-127](ab254360), 浓度 1/1000 稀释; Anti-IL-6 抗体 [EPR23819-11] (ab259341), 浓度 1/1000 稀释。

二 抗: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97051), 浓度 1/20000 稀释。

预测条带大小: 26kDa

检测条带大小: 23, 26kDa

曝光时间: 180s

结果描述: 正常组织表达的 TNF alpha、IL-1 beta 和 IL-6 蛋白达不到 WB 检测水平。IL-1 beta 和 IL-6 的表达情况可以做为验证药物处理后 TNF alpha 表达变化的良好对照。

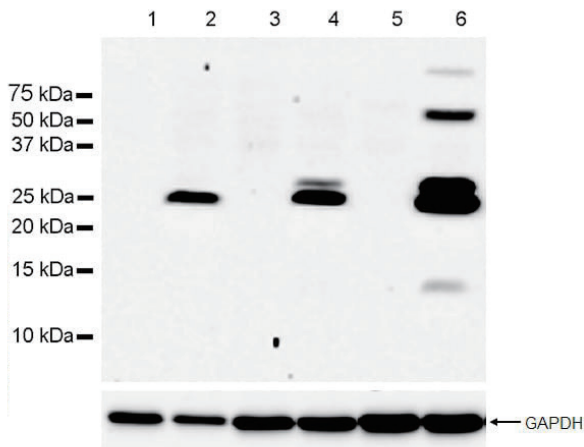


图 五：WB- Anti-TNF alpha 抗体 [RM1005] (ab307164)

泳道 1：20μg 未诱导处理的 THP-1 全细胞裂解液。

泳道 2：20μg 80nM TPA 预处理过夜，再使用 100ng/mL LPS 刺激处理 3h，最后使用 300ng/ml BFA 处理 3h 的 THP-1 全细胞裂解液。

泳道 3：20μg 未诱导处理的 RAW264.7 全细胞裂解液。

泳道 4：20μg 100ng/mL LPS 刺激处理 3h，最后使用 300ng/ml BFA 处理 3h 的 RAW264.7 全细胞裂解液。

泳道 5：20μg 未处理的 NR8383 全细胞裂解液。

泳道 6：20μg 100ng/mL LPS 刺激处理 3h，最后使用 300ng/ml BFA 处理 3h 的 NR8383 全细胞裂解液。

一抗：Anti-TNF alpha antibody [RM1005] (ab307164)，浓度 1/1000 稀释。

二抗：泳道 1：Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab97051)，浓度 1/100000 稀释；
泳道 2-6：Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase conjugated (ab97051)，浓度 1/100000 稀释。

预测条带大小：26kDa **检测条带大小：**17, 26, 33, 51kDa **曝光时间：**180s

结果描述：除观察到膜结合形式 (~25kDa) 的 TNF alpha，还检测到可溶形式 (~17kDa) 与多聚体形式 (~51kDa、~33kDa) 的 TNF alpha，这与文献报导一致 (PMID: 18523283, PMID: 28426652)。

关键控制点

- 在实验中除了需要注意常规问题外，还要特别关注以下关键控制点：
- 样本制备：» 添加足够量的蛋白酶抑制剂以避免靶标蛋白降解。
 - » 超声破碎处理样本以富集更多 TNF alpha 靶标蛋白。
 - » 通过 Bradford 分析、Lowry 分析或 BCA 分析测定样本总蛋白浓度。
 - 转 膜：» 强烈建议转膜完成后使用丽春红染色，确定转膜是否成功。

参考文献

PMID: 10891884, 20194223, 21133840, 12794819, 36969194.