

Anti - Akt1

Králičia klonálna protilátka

KAT. ČÍSLO

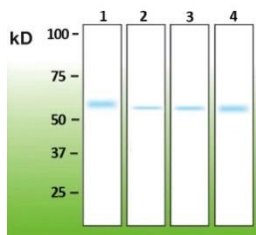
DB 126-0.05 (50 µl)
DB 126-0.1 (100 µl)

WESTERN BLOT (WB) PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

Roztoky pre Western blotting:

- Premývaci pufo: 1x Tris Bufferd Saline (TBS); 0,1% Triton X-100
- Blokovací pufo: 1xTBS; 0,1% Triton X-100; 8% skim milk

Pre Western blot: inkubácia membrány 2 hodiny pri izbovej teplote s protilátkou rozpustenou v blokovacom pufrí.



Anti - Akt1 (DB 126)

Western blot analýza Akt1 proteínu v proteínovom extrakte myšacieho mozgu: dráha 2 – 20 µg; dráha 3 -100 µg; dráha 4 - 200 µg naneseného proteínu. Dráha 1 reprezentuje 100 ng ľudského rekombinantu Akt1 (His-Akt1, Sino Biological Inc., kat. číslo: 10763-H08B).

INFORMÁCIE O PRODUKTE

Klon: C20-A
Uniprot číslo: Human: P31749; Mouse: P31750; Rat: P47196
Popis produktu: Králičie anti-Akt1 (PKB) klonálne IgG
Informácie o produkte: Klon IgG získaný zo surového králičieho antiséra in vitro technológiou, detekujúci Akt1 proteín
Imunogén: Peptid derivovaný z C-koncovkej sekvencie ľudského AKT1 proteínu. Protilátka rozoznáva epitop medzi Asp462 - Gly478.

Špecificita: Ľudský antigén, myšací antigén, potkaní antigén

Pufo: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Stabilizátor: 10 mg/ml BSA

Konzervačná látka: 0.05% Na₂S₂O₃

Skladovanie: 10 µl produktu pri -20 °C

Manipulácia: Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu

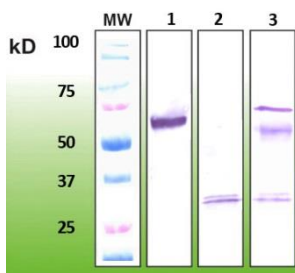
Expirácia: 24 mesiacov odo dňa odoslania

Aplikácia: Western blot, Imunoprecipitácia (IP), ELISA, Imunocytochémi (ICC)

Riedenie: Western blotting – 1:5 000;
ELISA – 1:100 000 – 1:200 000

IMUNOPRECIPITÁCIA (IP) PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

- 200 µg (57 µl) of protein sample from mouse crude brain extract (cell line protein crude extract or sample of biological fluid can be used alternatively) was centrifuged at 13,000xg, at 4°C, for 10 min.
- The supernatant was carefully removed, and transferred to an Eppendorf tube.
- For a lysate pre-clearing, 50 µl of Protein G-Sepharose beads were added, and incubated at 4°C, for 30 min.
- After the separation of beads (700xg, 4°C, 2 min), the correction mix (20% of sample volume of 2.5% v/v Nonidet P-40, 5% w/v sodium deoxycholate, 0.5% w/v SDS) was added and gently mixed.
- Monospecific clonal anti-Akt1 antibody (DB 126, clone C20-A; 5 µl) was added to the sample, mixed, and incubated on ice for 1 hour.
- During this time, the appropriate volume of Protein G-Sepharose (~50 µl of beads in 20% ethanol) was washed with 2x50 volumes of 20mM Tris,HCl, pH 7.5, and centrifuged at 700xg, 4°C, 2 min.
- After 1 hour of incubation, the sample was added to the washed Protein G-sepharose beads, and the mixture was incubated at 4°C, for 1 hour.
- The beads were consequently washed 3x with washing Pufo (RIPA: 10mM Tris,HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1% v/v Nonidet P-40, 1% w/v sodium deoxycholate, 0.1% w/v SDS), and 1x with 10mM Tris,HCl, pH 7.5 (this wash removes the detergents, deoxycholate in particular, because its presence in sample may reduce the quality of SDS PAGE protein separation).
- The beads were resuspended in the small volume of sample Pufo (30-50 µl of 125mM Tris,HCl, pH 6.8; 3.3% SDS, 5% β-mercaptoethanol), and the immune complex was dissociated at 60°C for 5 min.
- To the resulting supernatant (after centrifugation at 10,000xg for 2min), 10% v/v of glycerol containing 0.1% w/v of bromphenol blue was added, and the sample was boiled for 3 min.
- Sample was applied to the SDS-PAGE and western blot performed with DB 126, anti-Akt1 primary antibody.



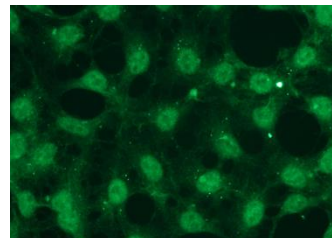
Imunoprecipitácia*-western blot analysis of Akt1 from mouse brain tissue

1. Recombinant Akt1 (50ng; positive control).
2. 200 µg of mouse brain protein extract, immunoprecipitation protocol followed without the primary antibody (negative control).
3. Akt1 kinase Imunoprecipitácia from 200 µg of mouse brain protein extract with Akt1 antibody.

* Dobransky T et al (2003) Phosphorylation of 69 kDa choline acetyltransferase at threonine-456 in response to short-term exposure to amyloid-β peptide 1-42. J Biol Chem 278, 5883-5893.

PROTOKOL PRE IMUNOCYTOCHÉMIU (ICC) - NÁVOD NA POUŽITIE

- Naneste na sklíčko roztok 1% želatíny a nechajte pôsobiť po dobu 2 hodín pri izbovej teplote. Dobre opláchnite destilovanou vodou, a nechajte zaschnúť cez noc pri izbovej teplote (alebo použite sklíčka už potiahnuté želatínou). Pred aplikovaním buniek sklíčko opláchnite roztokom PBS (pH 7.2).
- Bunky fixujte 4% roztokom paraformaldehydu (v PBS, pH 7.2) po dobu 15 min pri izbovej teplote.
- Opláchnite sklíčko pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
- Permeabilizujte bunky roztokom 0.1% Triton X-100 (v PBS, pH 7.2) po dobu 5 min. na ľade.
- Opláchnite sklíčko pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
- Inkubujte bunky v blokovacom pufrí (0.3M glycine v PBS pH 7.2; 2% BSA) po dobu 30 min. pri izbovej teplote.
- Inkubujte bunky s primárnou protilátkou: **Anti-Akt1** nariadenou **1:300 - 1:500** v nariadenovacom pufrí (PBS pH 7.2; 1% BSA) po dobu 1 hodiny, pri izbovej teplote, vo vlhkej komôrke.
- Opláchnite sklíčko pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
- Aplikujte sekundárnu protilátku (v tomto prípade bola použitá "Goat anti-rabbit IgG-FITC" od Jackson ImmunoResearch, cat. # 111-095-003, nariadená 1:300 v nariadenovacom pufrí (PBS pH 7.2, 1% BSA), a inkubovaná po dobu 1 hodiny pri izbovej teplote v tme).
- Opláchnite sklíčko pufo (pH 7.2) 3 x 3 min.
- Rýchlo opláchnite destilovanou vodou.
- Pre pozorovanie aplikujte 1 kvapku vhodného montovacieho média (v tomto prípade použité "Fluoroshield™" od Sigma; cat. # F6182).



Reprezentatívny obrázok exprese Akt1v bunkách HEK293, vizualizovanej králičou klonálnou monošpecifickou protilátkou Anti-Akt1. Riedenie primárnej protilátky - 1:300.

UPOZORNENIA

1. Reagencia je určená pre profesionálnu in vitro diagnostiku v laboratóriách.
2. Nepoužívajte reaguicu po uplynutí doby použiteľnosti.
3. Chráňte obsah fľaštičky pred kontamináciou.
4. Akákoľvek odchýlka od odporúčaných postupov uvedených v pracovnom protokole môže mať vplyv na konečné výsledky.
5. Reagencia obsahuje azid sodný (NaN₃), ktorý je toxický pri vyšších koncentráciách, avšak koncentrácia prítomná v tejto reagencii (0,05%) nie je považovaná za nebezpečnú.
6. Likvidácia odpadového materiálu sa musí vykonať podľa platných miestnych predpisov.
7. Používajte pri práci ochranné prostriedky a vyvarujte sa kontaktu s očami a pokožkou.