

Anti - BAX

Kráľičia klonálna protilátka

KAT. ČÍSLO

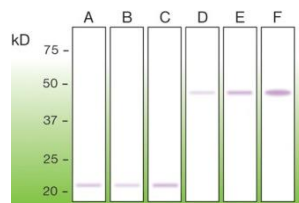
DB 123-0.05 (50 µl)
DB 123-0.1 (100 µl)

WESTERN BLOT (WB) PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

Roztoky pre Western blotting:

- Premývací pufo: 1x Tris Buffered Saline (TBS); 0,2% Tween 20
- Blokovač pufo: 1x TBS; 0,2% Tween 20; 5% sušené mlieko

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



Anti - bax (DB 123)

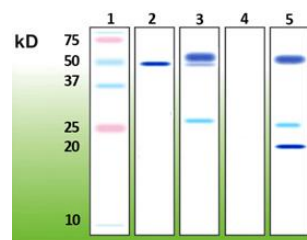
Western blot analýza BAX proteínu v extrakte myšacieho mozgu (A), extrakte potkanieho mozgu (B), HEK 293 bunkách (C) – koncentrácia vzorky 200 µg/jamka. GST-fuzovaný rekombinantný ľudský bax proteín testovaný pri koncentráciách 100 ng (D), 200 ng (E) a 500 ng (F).

INFORMÁCIE O PRODUKTE

Klon:	G26-R
Uniprot číslo:	Human: Q07812; Mouse: Q07813; Rat: Q63690
Popis produktu:	Kráľičie anti-BAX klonálne IgG
Informácie o produkte:	Klon kráľičích imunoglobulínov odpovedajúcich majoritnému epitopu imunogénemu peptidu Peptid derivovaný z N-koncovkej sekvencie ľudského BAX. Protilátka rozoznáva epitop medzi Pro13 - Gly36.
Imunogén:	Ľudský antigén, myšací antigén, potkaní antigén
Špecifita:	Ľudský antigén, myšací antigén, potkaní antigén
Pufo:	20 mM Tris-HCl, pH 8.0
Stabilizátor:	10 mg/ml BSA
Konzervačná látka:	0.05% Na ₂ S ₂ O ₃
Skladovanie:	10 µl produktu pri -20 °C
Manipulácia:	Vyhňte sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu
Expirácia:	24 mesiacov odo dňa odoslania
Aplikácia:	Western blot, Imunoprecipitácia (IP), ELISA, Imunocytochémia (ICC)
Riedenie:	Western blotting – 1:2 000; ELISA – 1:30 000 – 1:50 000; Imunoprecipitácia, ICC – 1:200 – 1:600

IMUNOPRECIPITÁCIA (IP) PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

1. Dilute sample (200 - 500 µg of total protein) with Correction Pufo (2.5% v/v Nonidet P-40, 5% w/v sodium deoxycholate, 0.5% w/v SDS in ddH₂O) in ratio 4:1 (v/v).
2. Add 5 µl of DB123 (anti-bax, clone G26-R) rabbit clonal monospecific antibody, mix gently and incubate for 1 hour on ice.
3. Mix with 50 µl of ProteinG-Sepharose (washed with 10mM Tris-HCl, pH7.5*) and incubate for 30 minutes at 4°C with gentle shaking.
*NOTE: Washing of ProteinG-Sepharose with 10mM Tris-HCl, pH7.5: Resuspend 50 µl of ProteinG-Sepharose in 1 ml of 10mM Tris-HCl, pH7.5 by precise inverting of the tube several times. Centrifuge for 1 min, 900xg at 4°C and discard supernatant. Avoid of wasting ProteinG-Sepharose agarose gel beads during discarding. Repeat this procedure for 3 times.
4. Centrifuge ProteinG-Sepharose immunocomplex for 2 min, 900xg at 4°C and discard supernatant. Wash the pellet 3 times with 1 ml of RIPA Pufo (10mM TRIS-HCl, pH7.5, 140mM NaCl, 1% v/v Nonidet P-40, 1% w/v sodium deoxycholate, 0.5% w/v SDS in ddH₂O).
- IMPORTANT: Avoid of wasting/discarding ProteinG-Sepharose immunocomplex.
5. Wash sediment with 1 ml of 10mM TRIS-HCl, pH7.5, centrifuge sample (agarose gel beads) for 1 min, 900xg at 4°C and discard the supernatant.
6. Dissociate immunocomplex from ProteinG-Sepharose with the help of Reduction Pufo (125mM TRIS-HCl, pH6.8, 3.3% SDS, 5% β-mercaptoethanol). Mix the sample with 30 µl of Reduction Pufo, shake gently and incubate for 5 minutes at 65°C.
7. Centrifuge at 3000xg for 5 minutes and transfer the supernatant (immunoprecipitated proteins) to new tube.
8. Separate the immunoprecipitated protein by 1D SDS-PAGE.

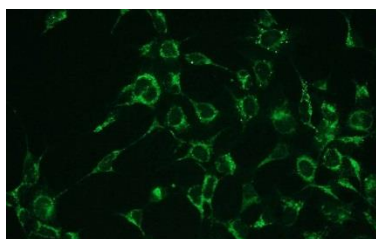


Representative picture of Bax immunoprecipitated from HEK 293 cells, visualized with clonal rabbit anti-Bax monospecific antibody(DB123) in Western blot. Primary antibody dilution - 1:2,000.

lane 1 – molecular weight marker, lane 2 – positive control with recombinant GST tagged BAX (200 ng), lane 3 – positive control of Immunoprecipitácia with recombinant GST tagged BAX (200 ng), lane 4 – negative control, Immunoprecipitácia without primary antibody, lane 5 – immunoprecipitated BAX (~20 kDa) from HEK 293 cells (500 µg of crude protein extract)

PROTOKOL PRE IMUNOCYTOCHÉMIU (ICC) - NÁVOD NA POUŽITIE

1. 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).
2. Bunky fixujte 4% roztokom paraformaldehydu (v PBS, pH 7.2) po dobu 15 min pri izbovej teplote.
3. Opláchnite sklíčko PBS pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
4. Permeabilizujte bunky roztokom 0.1% Triton X-100 (v PBS, pH 7.2) po dobu 5 min. na ľade.
5. Opláchnite sklíčko PBS pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
6. Inkubujte bunky v blokovačom pufo (0.3M glycine v PBS pH 7.2; 2% BSA) po dobu 30 min. pri izbovej teplote.
7. Inkubujte bunky s primárnou protilátkou: **Anti-Bax** nariedenou **1:100 - 1:200** v nariedovacom pufo (PBS pH 7.2; 1% BSA) po dobu 1 hodiny, pri izbovej teplote, vo vlhkej komôrke.
8. Opláchnite sklíčko PBS pufo (pH 7.2) 2 x 3 min.
9. Aplikujte sekundárnu protilátku (v tomto prípade bola použitá "Goat anti-rabbit IgG-FITC" od Jackson Immunoresearch, cat. # 111-095-003, nariedená 1:300 v nariedovacom pufo (PBS pH 7.2, 1% BSA), a inkubovaná po dobu 1 hodiny pri izbovej teplote v tme).
10. Opláchnite sklíčko PBS pufo (pH 7.2) 3 x 3 min.
11. Rýchlo opláchnite destilovanou vodou.
12. Pre pozorovanie aplikujte 1 kvapku vhodného montovacieho média (v tomto prípade použité "Fluoroshield™" od Sigma; cat. # F6182).



Reprezentatívny obrázok expresie Bax v bunkách HEK293, vizualizovanej kráľičou klonálnou monospecifickou protilátkou Anti-Bax. Riedenie primárnej protilátky - 1:100.

UPOZORNENIA

1. Reagencia je určená pre profesionálnu in vitro diagnostiku v laboratóriách.
2. Nepoužívajte reagentiu 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 (Na₃), 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.

