

IP-ABE Palmitoylation Kit For WB(含 HRP)



产品详情

产品货号	产品名称	储存条件	保质期
SK2926	IP-ABE Palmitoylation Kit For WB(含 HRP)	4/-20℃	6 个月

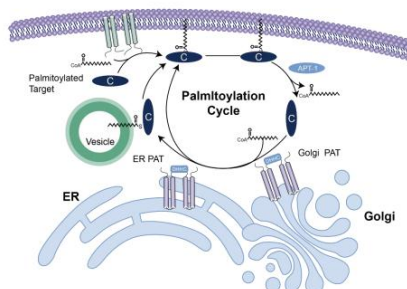
产品组成:

材料	数量	储存	稳定性	另外需配试剂
溶液 1(LB Buffer1)	≥10mL	4℃	保存妥善， 6 个月内稳定	PBS 0.1MPMSF
溶液 2A+2B(还原剂)	≥1000 μ L	-20℃		
溶液 3(LB Buffer2)	≥50mL	4℃		
溶液 4A+4B(封闭液)	≥100mL	-20℃		
溶液 5(+HAM 反应液)	≥2000 μ L	4℃		
溶液 6(-HAM 反应液)	≥2000 μ L	-20℃		
溶液 7(BMCCBuffer)	≥400 μ L	-20℃		
溶液 8(HRP)	≥40 μ L	-20℃		

1. 使用妥当前提下，所提供试剂足够 10 个样本；溶液 2、4 需现配现用，配置后-20℃可保存 2 周。
2. 使用前，请取 1200 μ L 的 2A 溶液加至 2B 粉末中，室温 1000rpm 混匀 5-10min。
3. 使用前，请取 120 μ L 的 4A 溶液加至 4B 粉末中，室温 1000rpm 混匀 5-10min。
4. 本试剂盒滤管只针对琼脂糖珠，如果使用磁珠须用磁力架代替滤管离心步骤

实验背景:

1. 棕榈酸(C16:0)是长链饱和脂肪酸，各种脂类的重要组分在细胞膜形成，信号传导和能量储存中扮演重要角色。然而棕榈酰链可以连接在蛋白上，此称之为蛋白棕榈酰化(S-棕榈酰化)，这种修饰影响蛋白的定位和功能。在人体中棕榈酸是通过脂肪重新合成中产生，此过程主要发生在脂肪细胞，肝脏细胞和乳腺细胞中。棕榈酸被用来磷脂和鞘脂的合成，通常是经过其他脂肪酸(例如，硬脂酸和油酸)的延伸或者脱饱和处理，有些可以通过酯化生成甘油三酯储存脂质。蛋白棕榈酰化在蛋白结构和功能中起重要作用，和其他脂质修饰不同，蛋白棕榈酰化是高度动态的，棕榈酰化和去棕榈酰化循环调控着蛋白的功能和定位。



2. S-棕榈酰化是一种重要的蛋白翻译后修饰，通常棕榈酰通过形成硫酯键链接在蛋白的半胱氨酸残基上，例如下表 1，S-棕榈酰化是一种特殊的蛋白 S-酰基化，并且类似于其他可逆的蛋白翻译后修饰，包括磷酸化和乙酰化，S-棕榈酰化的发生会影响蛋白结构和功能。

3. 除了 S-酰基化，也有少数棕榈酰盐能够连接到其他各种氨基酸的氨基集团上(例如，甘氨酸，半胱氨酸，赖氨酸)形成 N-棕榈酰化或者在丝氨酸和苏氨酸的羟基集团形成 O-棕榈酰化(如下表 1)。伴随着 S-棕榈酰化发生的过程中，也会有其他脂肪酸修饰发生，例如 N-和 O-酰基化。N 端发生酰基化作用的比如说 N-豆蔻酰化(N-myristoylation)，这种修饰经常发生在细胞膜外围锚定的蛋白。S-异戊二烯化(S-prenylation)是另外一种常见的脂化作用，赋予蛋白疏水的性质并使其与细胞膜结合。

实验步骤：

步骤 1: 取不少于 500 μ g 总蛋白进行目标蛋白免疫沉淀，进行至清洗步骤，离心弃废液后，Beads 加入 500 μ L 溶液 1 清洗，上下颠倒混匀 15 次，离心弃滤液。

步骤 2: 滤管内加入 300 μ L 溶液 3，100 μ L 溶液 2，室温翻转 30min。

步骤 3: 离心弃废液后，加入 485 μ L 溶液 3，10 μ L 溶液 4，5 μ L 0.1MPMSF，室温避光翻转 3h 或者 4℃避光翻转过夜。

步骤 4: (过夜后)离心弃废液，加入 400 μ L 溶液 3 清洗 Beads，上下颠倒混匀 15 次离心弃滤液，重复一次(共 2 次)，再加入 400 μ L 溶液 3，吹打混匀，将溶液连同 beads 平分为两份，分别加入到两个滤管中，并分别标记为+HA 和-HA。

步骤 5: 盖紧滤管底部红色塞子，在+HA 管中加入 200 μ L 溶液 5，在-HA 管中加入 200 μ L 溶液 6，室温翻转 1h。

步骤 6: 反应结束后去掉红色塞子，离心弃滤液，盖紧滤管底部红色塞子，在+HA 和-HA 管中各加入 480 μ L 溶液 3，20 μ L 溶液 7，室温翻转 1h，反应结束后去掉红色塞子，离心弃滤液。

步骤 7: 各加入 500 μ L 溶液 3 清洗 Beads，上下颠倒混匀 15 次离心弃滤液，重复一次(共 2 次)。

步骤 8: 盖紧滤管底部红色塞子，洗脱时建议参考不同 beads 的说明书中的洗脱方法(例如：酸洗脱/碱洗脱/竞争洗脱/煮沸洗脱)。

步骤 9: 取等量的+HA 和-HA 的蛋白洗脱液进行后续 WB 实验。

下游 WB 步骤：

步骤 1: 将蛋白液进行 SDS-PAGE 胶分离，并将蛋白转到 PVDF 膜上。

步骤 2: 用 1XTBS-T 清洗膜 2 次，每次 10min。

步骤 3: 用 1XTBS-T 配制工作浓度 3%BSA，室温封闭 PVDF 膜 1h。

步骤 4: 用 1XTBS-T 清洗 PVDF 膜 10min。

步骤 5: 用 1XTBS-T 配制工作浓度 3%BSA，加入 Streptavidin-HRP 抗体(稀释比例 1:5000-1:10000)，4℃孵膜过夜。

步骤 6: 用 1XTBS-T 清洗 PVDF 膜 3 次，每次 10min。

步骤 7: 用化学发光仪曝光检测。

整体实验流程图：



注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 实验结果受多种因素影响, 相关处理仅限于产品本身, 不涉及其他赔偿。

免责声明: 本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

北京伊事达科技有限公司

电话: 13564444959

官网: www.followme-shop.com

地址: 北京市海淀区东北旺西路58号尚科办公社区C区一楼



公众号



客服