

Imunoprecipitace - problematika

Problém	Příčina	Řešení
Nedochází k vazbě.	Protilátka není schopna imuno - precipitace.	Zkuste jinou protilátku. Polyklonální protilátky jsou obecně účinnější než monoklonální
	Nedostatečné množství primární protilátky.	Stanovte optimální množství protilátky titrací.
	Příliš mnoho konkurenčních proteinů ve vzorku.	Odstředte lyzát při 100, 000 x g po dobu 30 min. před přidáním protilátky - odstranění membránových fragmentů, nerozpuštěných proteinů atd.
	Zkoumaný antigen není obsažen.	Zkontrolujte vhodnost vzorku.
	Zkoumaný antigen ve vzorku se přípravou ztratil nebo se rozložil.	Připravte čerstvé lyzáty. Vyhněte se zmrazeným lyzátům. Použijte vhodné inhibitory proteolytických enzymů.
	Přílišné, intenzivní promývání.	Snižte počet promývání. Snižte koncentraci solí a detergentu nebo použijte jiný detergent.
	Neodpovídá čas inkubace.	Inkubační čas by měl být vhodný pro daný systém. Obecně platí pro primární protilátku/antigen inkubační doba od 1 hodiny až přes noc při 2-8 °C.
	Protein A,G, nebo L neváže daný živočišný druh nebo podtřídy prim. protilátky.	Zkontrolujte pro Protein A/G/L informace o selektivitě.
	Rušící látky obsažené ve vzorku.	Nepoužívejte lyzáty obsahující redukční látky jako dithiotreitol, 2 - merkaptoetanol atd. které způsobují destrukci protilátkové aktivity. Krajní pH a přebytek detergentu může také negativně ovlivnit reakci antigen-protilátka.
Vysoké pozadí nebo nespecifická precipitace bílkovin.	Látky ve vzorku se nespecificky váží na agarózu nebo protilátky.	Inkubujte lyzát s Proteinem A/G/L - agarózou bez protilátky. Např. při použití produktu A2220 (myší monokl. anti-Flag M2 - agaróza) se vzorek nejdříve pre-inkubuje s myší IgG (A0919). Tyto kroky by měly odstranit nespecifické vazby na agarózu nebo myší IgG.
	Nespecifická vazba na agarózu Proteinu A, G nebo L.	Přidejte saturující množství konkurenční bílkoviny - např. 2% roztok BSA k Protein A - agaróze.
	Koncentrace protilátky je příliš vysoká.	Stanovte optimální koncentraci protilátky titrací.
	Nedostačující promývání.	Použijte intenzivnější promývání. Zkuste 1,0 M NaCl, 0,5 M LiCl, 1 M KSCN, 0,2% SDS nebo 1% Tween20. Promyjte jedenkrát destilovanou vodou. Zvyšte počet promývání. Přeneste peletu do nové zkumavky před posledním promýváním.