

# Immunoprecipitation (IP) Protocol

2013.4 ver.1

※ 操作は、全て氷上あるいは冷却下にて行う。

1. 細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1% Triton X-100 Lysis Buffer を添加して、氷上にて 15~30 分間溶解させる。セルスクレーパーにてチューブに細胞を回収した場合には、チューブ内に 1% Triton X-100 Lysis Buffer を添加した後、ピペットマンにて細胞を懸濁する。

☞ Lysis buffer が均一に行き渡るよう 5~10 分置きに軽く攪拌するとよい。

☞ Lysis buffer 添加量の目安 : 1 ml / 90 mm dish、600  $\mu$ l / 35 mm dish

1% Triton X-100 Lysis Buffer (final)		(stock)
Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM	1 M
NaCl	150 mM	5 M
EGTA	5 mM	0.1 M
Triton X-100	1%	20%

☞ 必要に応じて阻害剤を添加する。

2. 15,000 rpm  $\times$  15~30 分間遠心分離した後に、細胞抽出液（上清）を新しい 1.5 ml チューブに移す。
3. 0.5 ml チューブ内に、下記の量を目安にして細胞抽出液と抗体を添加し、1 階低温室にある ROTATOR (RT-50) で穏やかに攪拌する。

細胞抽出液	450 $\mu$ l
抗体	1~3 $\mu$ g

☞ 使用する抗体に応じて反応時間を調整する（15 分~over night）。

☞ Anti DYKDDDDK (FLAG) tag Antibody Beads (Wako #012-22783) を用いる際は、15~30 分で良い。

☞ 必要に応じて Normal mouse IgG (Santa Cruz #sc-2025)、Normal rabbit IgG (Santa Cruz #sc-2027) を用いる。

☞ サンプルはバランスをそろえるために ROTATOR に対角にセットする。

☞ このとき input 用のサンプルを調整する。

（下記の量は一つの目安です。免疫沈降に用いた細胞抽出液の何%にあたるかを把握しておくこと。）

細胞抽出液	45 $\mu$ l	（この場合は 10% input となる）
4 $\times$ SDS Sample Buffer	15 $\mu$ l	

4. 0.5 ml チューブをスピンドウンした後、Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz #sc-2003) を 20  $\mu$ l 入れた後、低温室の ROTATOR で 30~60 分間穏やかに攪拌する。

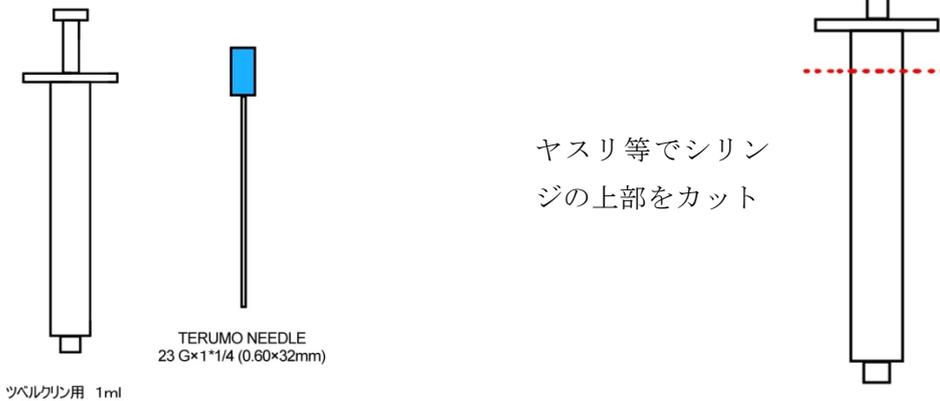
（ラビット抗体の場合はできるだけ Protein A sepharose を使用してください。）

☞ ビーズは沈降しやすいため各サンプルに添加する直前に転倒混和する。

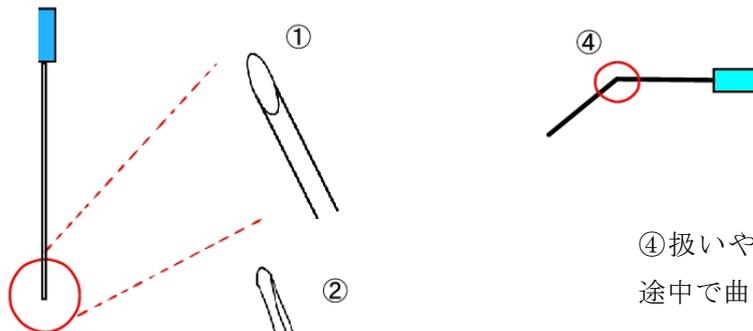
☞ 抗体種とのアフィニティーは 3 ページ目の表を参考にしてください。

5. 1% Triton X-100 Lysis Buffer (Triton X-100 の濃度は必要に応じて変更する) で以下のように 3 回洗う。  
 ↓ 7,500 rpm × 30 秒  
 ↓ 上清を除く (ビーズを吸引しないようある程度上清を残す)  
 ↓ 1% Triton X-100 Lysis Buffer を 500 μl 添加した後、静かに転倒混和する。
6. 3 回目の洗浄後に、シリンジ<sup>\*1</sup> を使って上清を完全に取り除き、2×SDS Sample Buffer を 20~40 μl (チューブの大きさに合わせて調整) 添加する。(この後状態で冷凍保存可)
7. アプライする直前に 100°C で 5 分間程度加熱する。
8. アプライする前に必ずスピンドウンし、ビーズを沈降させる。
9. 50 μl マイクロシリンジを用いて、上清全量をアプライする。

\*1 ツベルクリン用 1ml シリンジ  
 23G 針を加工したものを使用



針の加工



②ペンチを用いてビーズが通らない程度まで針の先端を狭める。

③ペンチで先端を反り返し、チューブ内での滑りをよくする。

④扱いやすいように針の途中で曲げる。

PRODUCT	SPECIFICITY	CAT. #	AMOUNT
Protein A-Agarose	mouse IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub> and IgA rabbit polyclonal Abs human IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> and IgG <sub>4</sub>	sc-2001	2.0 ml
Protein G PLUS-Agarose	mouse IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub> and IgG <sub>3</sub> rat IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub> and IgG <sub>2c</sub> rabbit and goat polyclonal Abs human IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> and IgG <sub>4</sub>	sc-2002	2.0 ml
Protein A/G PLUS-Agarose	all of the above Abs	sc-2003	2.0 ml
Protein L-Agarose	mouse, rat, human IgG, scFv and Fab fragments, mouse and human IgM, IgE and IgA	sc-2336	2.0 ml