

免疫沈降プロトコール

アプリケーションノート

免疫沈降法は、抗体と特異的に反応するタンパク質あるいはペプチドが溶液から精製され、量や物理的な特性を調査するための方法です。免疫沈降もまた、ウェスタンブロットングに先だって、タンパク質集団を“豊か”にすることができる。例えば、目的タンパク質に対するパン特異的抗体の免疫沈降は、(リン酸化部位特異的抗体もしくはアセチル化特異抗体のような)修飾された特異的抗体によるウェスタンブロットングに後続します。

サンプル調整

1. 細胞をマイクロ遠心チューブに回収し、4°C、3000rpmで5分間遠心します。
2. 上清を捨てた後、ペレットを-80°Cで保存するか、もしくは下記のように直ちに処理してください。

免疫沈降

1. -80°Cの冷凍庫からサンプルを取り出し、氷上においてください。
2. その後すぐに、サンプルに800ulの氷冷溶解バッファーを加え、ボルテックスし、氷上で30分間静置します。
3. あらかじめ冷やされた遠心分離機の中で、14,000rpmで10分間、可溶化液を遠心します。
4. 新たに、洗浄済みのプロテインAアガロースビーズもしくはプロテインGアガロースビーズ(30ulビーズを充填)の入ったマイクロ遠心チューブを、あらかじめ冷やして準備しておきます。そして、冷やしたマイクロ遠心チューブに上清720ulを移し、その混合物を4°Cで30分間揺すってください。マイクロ遠心機(5秒、14,000rpm、4°C)内のパルスによって、アガロースビーズは回収されます。
5. 新たにあらかじめ冷やしたマイクロ遠心チューブを準備し、4ug以下の特異抗体を入れておきます。そのマイクロ遠心チューブに上清を移し、4°Cで2時間、穏やかに揺らします。洗浄済みのプロテインAもしくはGのアガロースビーズ懸濁液(30ulビーズを充填)100ul加えることによって免疫複合体を捉え、4°Cで1時間混合物を揺らします。
6. マイクロ遠心機(5秒、14,000rpm、4°C)のパルスによって、アガロースビーズをチューブの底に集めます。そして、上清を吸引し、除去します。残ったビーズを、事前に冷やしておいた細胞溶解バッファーで3回ほど洗浄します。
7. 最後の洗浄後、上清を取り除き、2×SDSサンプルバッファーを40ul加えます。95°Cで5分間ボイルし、室温で5分間、最大スピードでマイクロ遠心機を用いてビーズをスピンドウンします。その後、注意深く、上澄みをピペットで取り除きます。
8. 1.5mmの厚いゲルのウェルごとに、サンプルを30ul入れます。製造者の勧めに従ってゲルを流し、BioLegendのウェスタンブロットングプロトコール(p.31)を用いて免疫ブロットを続けてください。(代わりに、目的細胞から調整され、放射標識されたタンパク質は、免疫沈降されたタンパク質の直接的な可視化に使うことができます。)

Tips:

1. 可溶化バッファーの選択は、タンパク質の存在する部位(膜、細胞質ゾル、核)に依存します。
2. 一晚インキュベートをした免疫沈降物は、継時的な凝集もしくは細胞タンパク質の変性によって短期間に一度の工程をしたときよりも高いバックグラウンドを示す可能性があります。
3. 常に、細胞可溶化液の中で結合した特異的抗体を取り除くために、アイソタイプが一致した無関係なコントロール抗体(モノクローナル)、もしくは非特異性動物の同じ種の血清使ってください。

Solutions and Reagents:**1X Cell Lysis Buffer:**

20 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 µg/ml aprotinin
150 mM NaCl 1 mM Na₃PO₄
1% NP-40 1 mM PMSF
2 mM EDTA 5 mM NaF
1 µg/ml leupeptin 3 mM Na₄P₂O₄

Protein A/G sepharose:

マイクロ遠心チューブの中で、1サンプルごとにプロテインAセファロースもしくはプロテインGセファロース30ulを移し、防腐剤の除去のために細胞可溶化液で2回洗浄します。洗浄は、細胞可溶化液を800ul加え、ベンチトップ遠心分離機でスピンドウンします。サンプルあたり100ulの可溶化液に、プロテインAもしくはプロテインGセファロースを再懸濁します。

5X SDS sample Buffer:

312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
10% SDS (w/v)
250 mM DTT
50% Glycerol
0.05% Bromophenol Blue (w/v)
Use at 1X

10X SDS Running Buffer:

Dissolve 144 g of Glycine, 30 g of Tris base and 10 g SDS in 800 ml of distilled H₂O.
Add distilled H₂O to 1 liter
Use at 1X

Transfer Buffer:

2.25 g Tris base
10.5 g Glycine
1 g SDS
200 ml Methanol
Add distilled water to 1.0 L

トミーデジタルバイオロジー株式会社
カスタマーサポート
〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1
TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813
mail : Biolegend@digital-biology.co.jp