

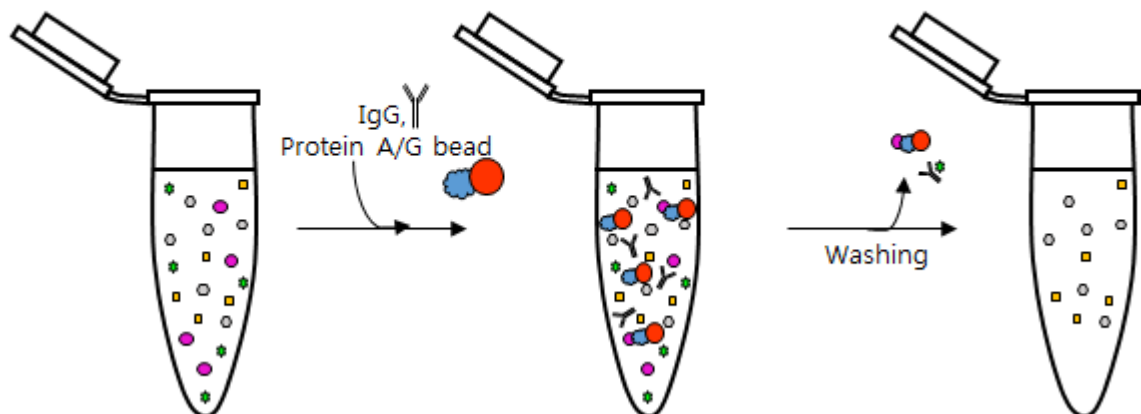
# <Co-Immunoprecipitation>

Immunoprecipitation (IP)는 항원-항체 반응을 이용하는 실험으로 protein-protein 혹은 protein-RNA, protein-DNA 결합을 확인하고자 할때 사용하는 방법으로 목적에 따라 Co-IP (protein-protein), RNA-IP (RNA-protein), ChIP (DNA-protein)으로 불려집니다.

대략적인 과정은 lysate 에 antibody 넣은 후 protein agarose beads 를 넣고 precipitation 한 후 elution 하여 target 단백질을 구하는 것입니다.

단백질 중에서 antibody와, protein beads에 non-specific하게 결합하는 단백질들을 제거하기 위해 (background 감소시키기 위함) preclearing 을 하기도 합니다만. IP의 목적이 MS/LC가 아닌 단순히 western blot 만을 하는 거라면 반드시 필요하지는 않습니다.

## <Preclearing>



## <Protocol>

- lysate + normal IgG + protein beads + lysis buffer to adjust volume
- rotate for 1 h at 4°C
- centrifuge at 1200g, 4°C for 1 min
- take sup (이것이 precleared lysate 가 됩니다)

bhm660@naver.com

\* IP 를 하기 위해 cell lysis 할 때는 lysis buffer 를 NP-40 lysis buffer 같은 mild 한 buffer 쓰는 것을 추천합니다. 혹은 SDS 가 들어가지 않은 RIPA buffer 를 사용해도 됩니다(harsh 한 detergent 를 쓰면 protein-protein interaction 이 끊어질 수 있기 때문)

실제 실험할 때 0.1% SDS 가 포함된 RIPA buffer 를 사용하기도 했으나 문제는 없었습니다.

\* lysate, IgG, protein beads 의 양과 전체 볼륨은 모두 조절 가능합니다. lysate 는 500~700ug 을 사용하고, IgG 는 0.4ug (IgG 는 후에 IP 하기 위한 target antibody 의 host 에 맞춰서 씁니다. target antibody 의 host 가 mouse 이면 mouse normal IgG 사용)

protein beads(Santa cruz, cat.sc-2003)는 20 ul 를 사용했습니다.

volume 은 500~600 ul 정도로 맞추는데 볼륨이 너무 적거나, 많으면 rotation 할 때 용액이 잘 섞이지 않으므로 500~600ul 가 적당합니다.

\* rotation 은 반드시 4°C에서 진행하며, incubation 시간은 조절가능하지만 최소 30 분 이상을 진행하도록 합니다.

\* protein beads 는 protein A agarose beads, protein G agarose beads, protein A/G agarose beads 가 있으니 본인 실험에 맞는 제품을 선택하면 됩니다.

beads 는 사용전 inverting 하여 잘 섞어준 후 사용합니다. Beads 가 금방 가라앉기 때문에 용액을 취하기 전 매번 한번씩 pipetting 후 취하도록 합니다. (절대 vortexing 금지)

IP 를 진행할때 꼭 잊지말아야 하는것이 Input 입니다.

Input 은 IP 산물이 어느 정도의 비율로 나온건지 가능하기 위한 척도로 넣어줍니다. 또한 실험이 제대로 진행됐는지를 가능할 수 있는 척도로도 사용합니다. 예를 들어 IP sample 에서는 아무런 signal 이 관찰되지 않았으나 input 에서는 signal 이 관찰되면 이는 IP 가 되지 않은 것으로 보면 되고. input, IP product 모두에서 signal 이 관찰되지 않으면 IP 가 잘됐다는 가정하에서 IP 이후 과정에 문제가 있는 것으로 추정할 수 있습니다.

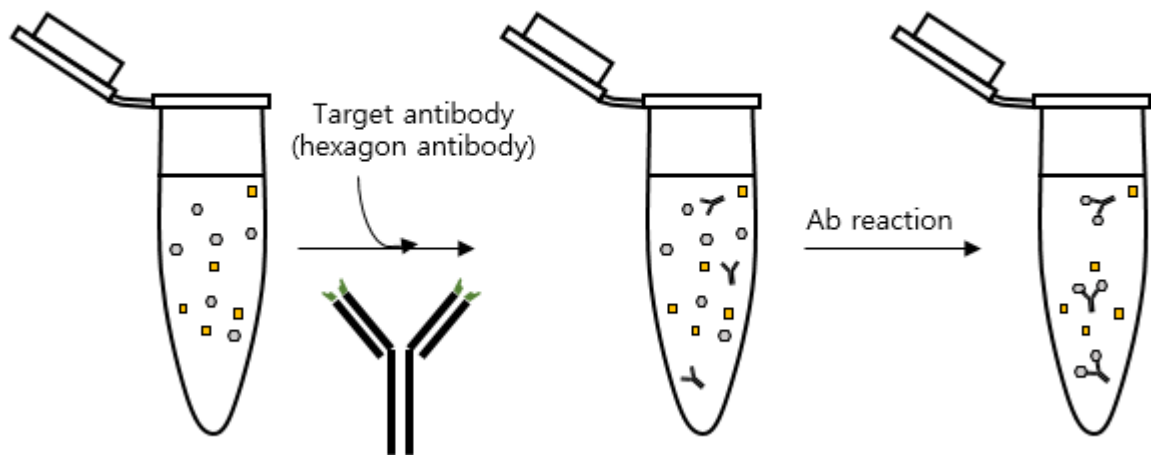
ChIP, RNA-IP 를 할 때는 IP sample 의 1% 이하를 취하여 input 으로 사용하고,

co-IP 를 할때는 30~60 ug 정도의 양을 준비하여 input 으로 사용합니다.

Input 의 양은 IP sample 의 결과를 보면서 조절하면 됩니다.

실험과정은 다음과 같습니다.

## <Antibody reaction>



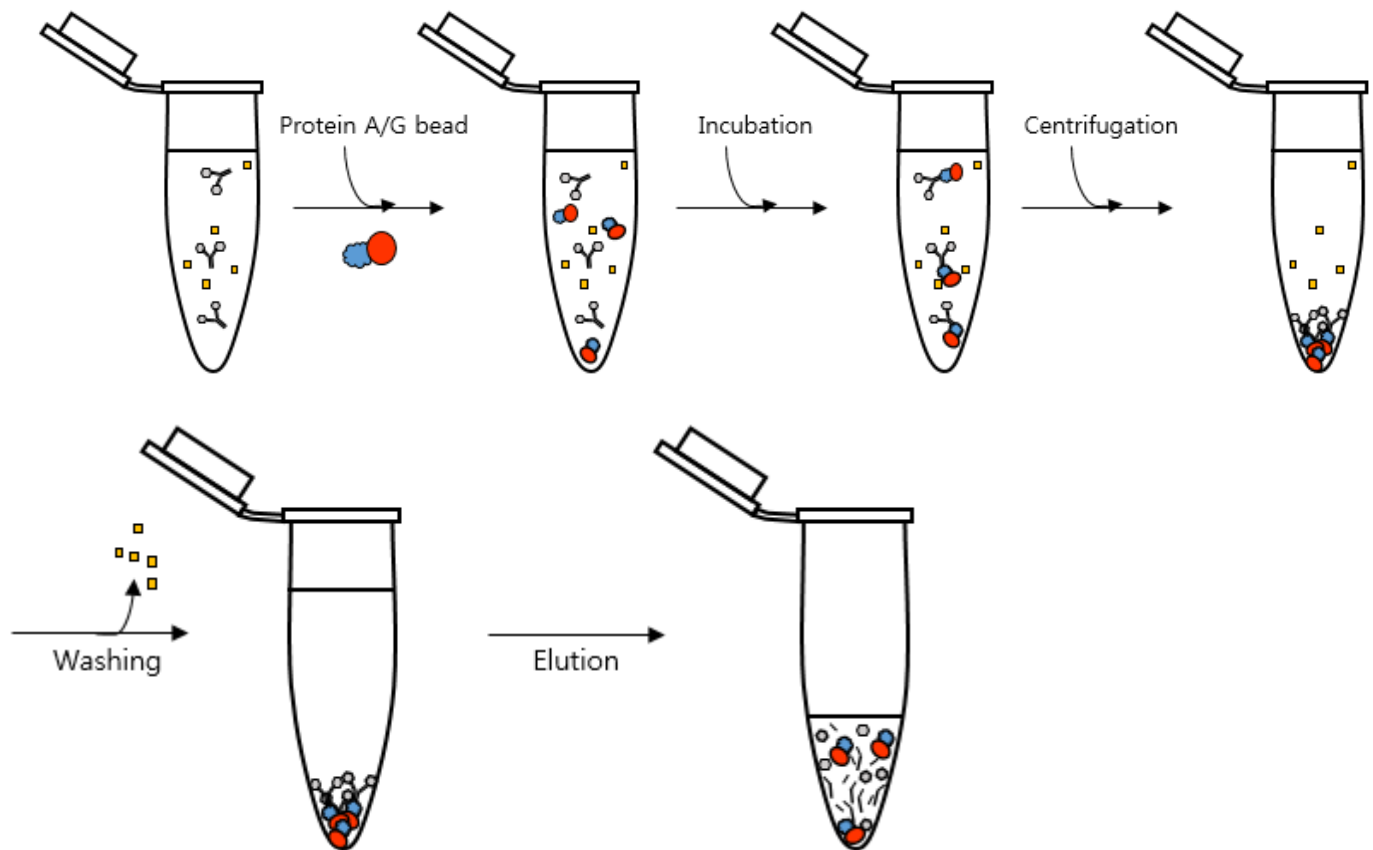
### <Protocol>

- (precleared) control lysate + 2~5 ug target antibody
- (precleared) sample lysate + 2~5 ug target antibody
- rotate tubes at 4°C, overnight

\* lysate 와 antibody 의 양은 실험을 하면서 각자의 컨디션에 맞게 조절하면 됩니다.

\* sample 의 volume 은 500~600 ul 면 적당합니다.

## <Immunoprecipitation>



## <Protocol>

- add 50 ul protein bead (Santacruz, cat. sc-2003 기준)
- rotate at 4°C for 1~4 h
- centrifuge at 1200g for 2 min at 4°C
- add 1 ml lysis buffer and rotate for 5 min
- repeat washing step 4 times
- remove sup after last centrifugation
- add 20 ul 2X SDS sample buffer
- boil at 95°C for 5 min

bhm660@naver.com

## - western blot

\* western blot 을 할 때는 input 도 샘플 준비 후 loading 합니다.

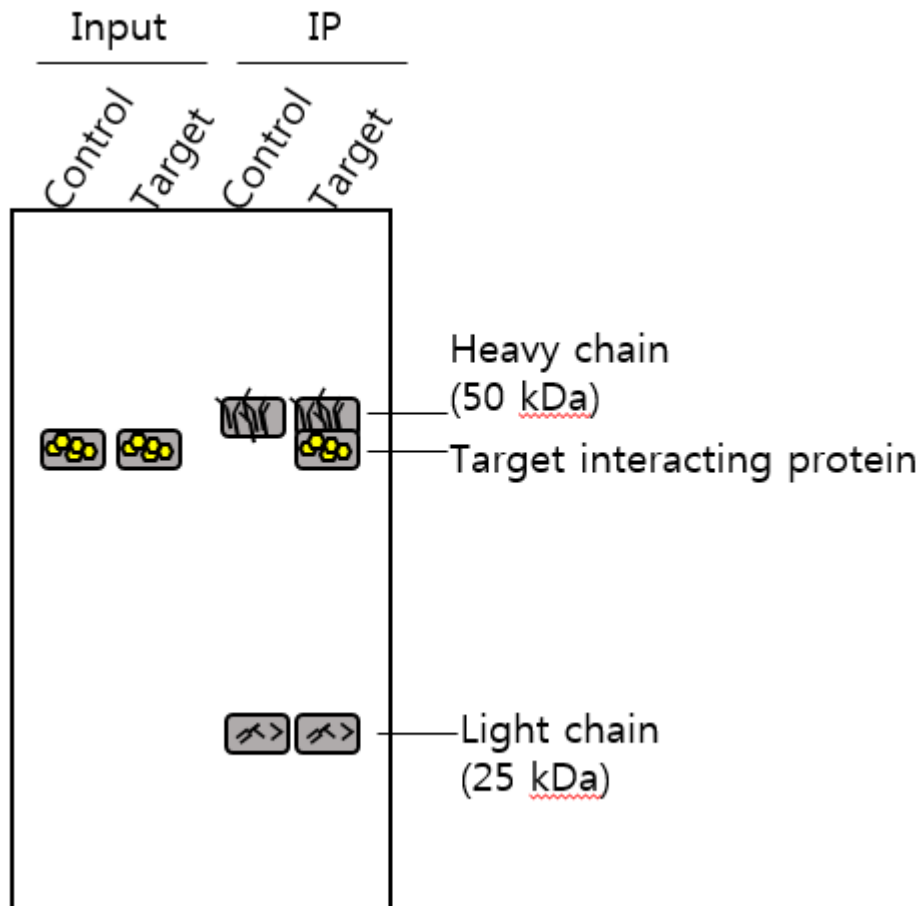
\* protein beads 의 양은 실험 컨디션에 따라 증감가능합니다.

\* 경우에 따라 lysate+antibody complex 에 beads 를 넣기도 하고 혹은 antibody+beads complex 를 만든 후 lysate 를 넣어 IP 하는 방법도 있습니다.

\* rotation 시간은 1~2 시간이면 충분하나 간혹 4 시간까지도 반응시킵니다. 오래 반응시킬 수록 background 가 증가할 수 있으니 주의하셔야합니다.

\* washing 을 함으로써 beads-protein complex 를 제외한 나머지 물질들을 제거해주는데 centrifuge 후 sup 제거할때 sup 을 20ul 정도는 남기고 제거하세요. 최대한 sup 을 제거하려하면 beads-protein complex 도 같이 소실되기 때문입니다. pellet 이 pipetting 할 때 잘 빨려들어가기 때문에 주의하셔야합니다.

\*마지막 centrifugation 에서는 sup 을 최대한 제거하고 beads 가 있는 상태에서 elution buffer 를 넣으면 됩니다. beads 가 있어도 western blot loading tip 을 쓰면 후에 loading 할 때 beads 가 걸러지기 때문에 괜찮습니다.



\* 만약 target protein 과 interaction 하고 있는 protein 이 있었다면 IP product 로 western blot 후 target interacting protein 의 antibody 로 detection 했을 때 위와 같은 그림이 나올 것입니다.

\* Input 의 경우 밴드 사이즈가 IP product 의 밴드 사이즈와 비슷하게 나오도록 양을 조절해야 합니다.

\* IP 에서 가장 큰 문제점이 있는데 elution 을 할 때 antibody 또한 denaturation 된다는 것입니다. antibody 는 heavy chain, light chain 를 가지고 있는데 elution 을 함으로써 이 구조가 denaturation 되는데 이 chain 들을 2nd antibody 가 detection 을 하기 때문에 위의 그림과 같이 IP product 에서는 heavy chain, light chain 이 밴드로 검출됩니다. 만약 보고자하는 밴드의 위치가 heavy chain, light chain 과 겹치지 않으면 문제가 없지만 heavy chain, light chain 과 겹친다면 실험분석을 할 수가 없는 문제점이 생깁니다.

이를 극복하기 위해서 IP 전용 secondary antibody 를 쓸 수 있습니다. 이 antibody 는 native antibody 만 detection 하기 때문에 heavy chain, light chain 을 검출하지 않는다는 장점이 있습니다.