<Immunoprecipitation 免疫沈降法>

1. Lysis buffer

1% NP-40 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl

使用直前にtrasylol (apolotinin)を加える

Lysis bufferの組成は目的に応じて工夫の余地あり（特にdetergent）

2. Procedure

Cells on ice（6 well plate)

↓ PBS wash x 1 (293, 293Tでは省略;はがれやすいため。ただし培地は良く吸う)

↓ add 600 μl of Lysis buffer

↓ on ice 20 min（ローテーター上で）

↓ to microtube

↓ 15000 rpm, 10 min, 4ºC

sup（for total cell lysate : 30 μl of sample / 30 μl of 2 x SDS sample buffer & 98ºC, 5 min）

↓ add 20 μl of protein A or G-agarose (pre-clear)

↓ end-over-end for 1 h, 4ºC (cold room)

↓ 15000 rpm, 1 min, 4ºC

Sup

↓ add 0.5~1 μg (/ sample) of Ab ( )

↓ end-over-end for 1h - O/N, 4ºC (cold room) (1 h ~ O/N)

↓ add 25 μl of protein A or G

↓ end-over-end for 30 ~ 60 min, 4ºC (cold room)

↓ wash with Lysis buffer x 3 (1 ml / tube)

beads

↓ add 2 x SDS sample buffer (15 ~ 30 μl)
(wellのvolumeに応じて変える)

↓ 98ºC, 5 min

SDS-PAGE

2 x SDS sample buffer
1 ml of 2 xSDS buffer (Blue) + 20 μl of 1M DTT

<Protein A / Gの選び方>

抗体の種	クラス	Protein A	Protein G
Mouse	IgG1		+
	IgG2a	+	
	IgG2b	+	
	IgG3		+
Rabbit	IgG	+	+
Goat	IgG		+
Rat	IgG1	両方とも弱い	
	IgG2a		+
	IgG2b		+
	IgG2c		+