INMUNOPRECIPITACIÓN

A. Extracción de proteína total

1. Cultivar células en P60 o P100.
2. 2x lavados con PBS frío cuando alcancen una confluencia mayor del 70%. Aspirar bien el PBS en el último lavado.
3. 500μL de IP lysis buffer[[1]](#footnote-1) por placa de P100, 200μL por placa de P60, en hielo. Rascar bien y recoger todo el volumen en un eppendorf de 1.5mL.
4. Sonicar durante 2 minutos (modo *sweep*) añadiendo hielo al baño y rotar en la noria a 4ºC durante 30 minutos.
5. Centrifugar a 11000 rpm durante 10 minutos a 4ºC para precipitar el extracto celular.
6. Guardar el sobrenadante (proteína total, *whole cell extract* o WCE) y cuantificarlo para determinar la concentración de proteína total, [ ]prot total  ideal = 0.5mg/0.5mL o 500μg de proteína por 500μL de volumen.
7. Si la concentración es superior a 4μg/μL, diluir el extracto.
8. Se separa el volumen de extracto que se vaya a usar, que puede contener 500μg o 1mg de proteína total.

B. *Preclearing* del extracto total

1. El *preclearing* sirve para eliminar uniones específicas de proteínas del extracto a las Dynabeads (DB) o a la proteína G.
2. --> 16µL
3. Aquí hay dos opciones a la hora de añadir las DB al extracto:

OPCIÓN 1

-Poner DB en imán, retirar volumen --> 2x lavados con PBS-Tween 0.1%[[2]](#footnote-2) (200-100μL)--> resuspender en 10-20µL de IP lysis buffer

-Añadir las DB al extracto que se vaya a inmunoprecipitar

OPCIÓN 2

-Pasar las DB a un tubo limpio, se ponen en imán, retirar volumen --> 2x lavados con PBS-Tween 0.1% (200-100µL) --> se dejan las DB secas

-Añadir el extracto a las DB secas

1. Se incuba 30 min a 4ºC en rotación.
2. Se pone en el imán y se cambia de tubo el extracto prelavado. Se lavan las bolitas con PBS-T a volúmenes decrecientes (200-100-50μL) y se almacenan para usar nuevamente.

C. Unión del anticuerpo (Ab) al extracto

1. Calcular volumen Ab:
2. Ej: mouse monoclonal hnRNPK. Datasheet: 1-2μg Ab para 100-500μg WCE
   1. Cantidad de Ab = 12μg
   2. Concentración stock = 200μg/mL
   3. = 60 μL de Ab
3. Se añade el anticuerpo en el tubo con el extracto prelavado y se incuba durante toda la noche (*overnight)* a 4ºC en rotación.

D. Unión del complejo Ab≡proteína a las DB

1. Calcular la cantidad de DB necesarias en función de la cantidad de Ab usado.
   1. Concentración DB: 30mg de Dynabeads en 1mL
   2. *Binding capacity:* 1mg Dynabeads≡8μg de IgG (Ab)
   3. Cantidad de Ab = 12μg
2. Coger el volumen necesario y lavarlo con PBS-T a volúmenes decrecientes (200-100-50μL). Resuspender en 10-20μL de IP lysis buffer y añadirlo al extracto (proteína≡Ab).
3. Incubar en la cámara fría (4ºC) durante 2 horas en rotación.
4. Poner en el imán, recoger el sobrenadante (SN), cuantificarlo y almacenarlo (será necesario cargarlo más delante en el gel).
5. Lavar las bolitas con volúmenes decrecientes de PBS-T (200-100-50μL).
6. Eluir el complejo proteína≡Ab añadiendo 50µL de buffer de elución de IP[[3]](#footnote-3).
7. Hervir a 95ºC durante 5min --> poner en el imán y recoger el volumen en un nuevo tubo (IP) --> analizar en Western Blot (WB)
   1. Gel de acrilamida al 8%
   2. Peines de 10 pocillos
   3. Electroforesis en hielo a 90V
   4. Transferencia *overnight* a 4ºC (cámara fría) a 70mAm
8. En el WB cargaremos input (WCE), SN (25μg de proteína en ambos) e IP (todo el volumen).
   1. De input y SN preparemos un stock con 50µL de muestra + 10µL de azul de bromofenol 6X
   2. Herviremos la muestra antes de cargarla (la IP ya está hervida como parte del proceso de elución)

**Buffer de inmunoprecipitación o IP LYSIS BUFFER**

\*Vf = 200mL a pH 7.5 usando como disolvente H2O milliQ\*

Reactivos

1. Tris HCl 50mM pH 7.5 --> 1.21g
2. NaCl 125mM --> 1.46g
3. NaF --> 45mg
4. NaP (pyro) --> 125.2mg
5. NaVO4 (ortovanadato, del stock 200mM) --> 1mL
   1. Stock 200mL
      1. Mw: 183.908g/mol
      2. 368mg en 10mL
      3. Almacenado a -20ºC
6. Glicerol 10% --> 20mL
7. NP-40 1% --> 2mL
8. H2O milliQ --> 177mL --> 150mL para disolver, enrasar hasta 177mL

\*Añadir a una alícuota de 10mL antes de usar\*

1. Inhibidor de proteasas (Complete, Roche) --> 1mg/mL --> 10mg
2. Pefabloc --> 2.7mg en 10mL

1. El IP lysis buffer puede llevar dos detergentes, RIPA si se desea obtener la proteína totalmente aislada (ionizante) o NP-40 si se deben mantener las interacciones proteína-proteína, como en coinmunoprecipitaciones (no ionizante). [↑](#footnote-ref-1)
2. 10mL de PBS 1X + 10μL de Tween 20 [↑](#footnote-ref-2)
3. El stock del buffer de elución de IP se hace con 500µL de buffer de lisis de WB o Vjs y 100µL de azul de bromofenol 6X --> 1X [↑](#footnote-ref-3)