INMUNOPRECIPITACIÓN

A. Extracción de proteína total

1. Cultivar células en P60 o P100. Tratarlas si es necesario.
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 500 μL 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 o prelavado 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. Lavar las DB con volúmenes decrecientes de IP lysis buffer o PBS-Tween 0.1%[[2]](#footnote-2) --> poner en imán, retirar volumen, añadir IP lysis buffer --> 2X lavados (200-100μL)--> dejar secas
3. Se añade el extracto que se desee inmunoprecipitar a las DB y se incuba 30 min a 4ºC en rotación.
4. Se pone en el imán y se cambia de tubo el extracto prelavado. Se lavan las bolitas con PBS-T o IP lysis buffer 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 = 3μg
   2. Concentración stock = 200μg/mL
   3. Queremos usar 3μg de Ab
   4. = 15 μL de Ab
3. Se añade el anticuerpo en el tubo con el extracto prelavado y se incuba 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 = 3μg
2. Coger el volumen necesario y lavarlo con IP lysis buffer o PBS-T a volúmenes decrecientes (200-100-50μL). Resuspender en 10-20μL y añadirlo al extracto prelavado (proteína≡Ab).
3. Incubar a temperatura ambiente (RT) durante 2 horas en rotación.
4. Recoger el sobrenadante (SN), cuantificarlo y almacenarlo (será necesario cargarlo más delante en el gel) poniendo la mezcla en el imán.
5. Lavar las bolitas con volúmenes decrecientes de PBS-T (200-100-50μL).
6. Eluir el complejo proteína≡Ab añadiendo buffer de lisis Vjs (buffer de WB con azul de bromofenol) 6X hasta que quede 1X (si el volumen son 50μL, 8.3μL de buffer Vjs).
7. Hervir a 95ºC durante 5min --> poner en el imán y recoger el volumen en un nuevo tubo (IP) --> analizar en Western Blot (WB).
8. En el WB cargaremos input (WCE), SN (100μg de proteína en ambos) e IP para ver, de la cantidad total de proteína introducida en un principio, cuánta ha quedado en el SN y cuánta ha inmunoprecipitado. También se puede analizar la presencia de otras proteínas para ver si han precipitado junto a nuestra proteína problema (ej: hnRNPK e INSR).

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)