

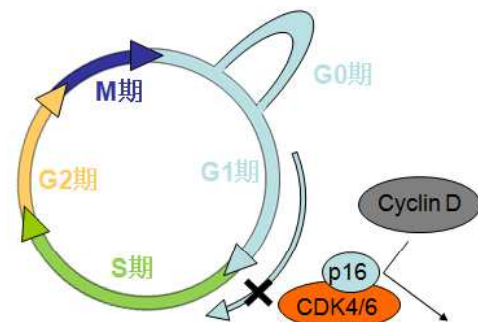
Immunoprecipitation (2)

Summary

細胞に存在する微量な内在タンパク質の検出において、免疫沈降は有効な手法となります。今回はモデル実験として、プロテインGビーズを用いて、HeLa細胞の内在タンパク質であるp16の免疫沈降を実施しました。

p16はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の阻害タンパク質の1つとして知られており、INK4ファミリーに属しているため、p16INK4aとも呼称されます。細胞周期は右図のように構成されており、CDK4/6はCyclin Dと複合体を形成することにより活性化され、標的のタンパク質をリン酸化し、細胞周期のG1期からS期への進行を誘導します。p16は、CDK4/6とCyclin Dの複合体形成を競合的に阻害することにより、細胞周期の進行を停止させる働きがあります。

p16遺伝子はヒトの癌細胞においてほとんどの場合、変異または欠損しており、癌抑制遺伝子として機能していることが知られています。癌化が引き起こされる際のシグナルやストレスを細胞が受け取った場合、p16遺伝子の発現量が増加し、CDK4/6の機能を阻害して細胞周期進行を停止させると考えられており、これは、正常な細胞が癌化を防ぐための自己防御機構と考えられています。

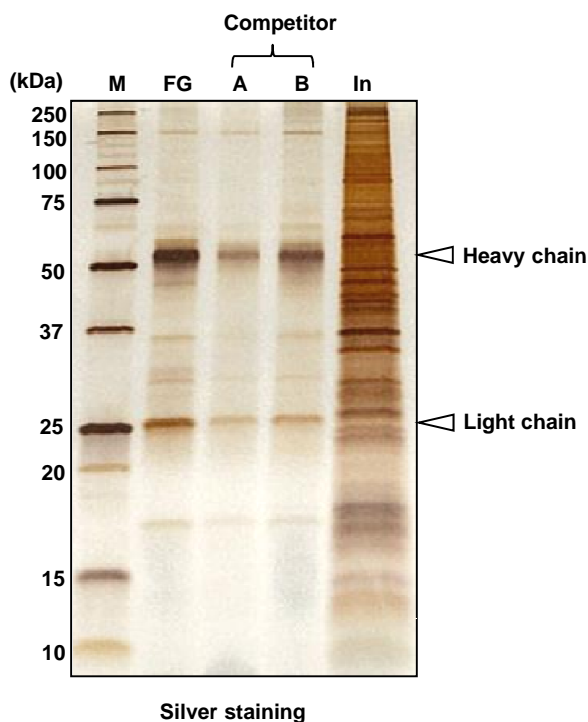


p16による細胞周期進行の阻害様式

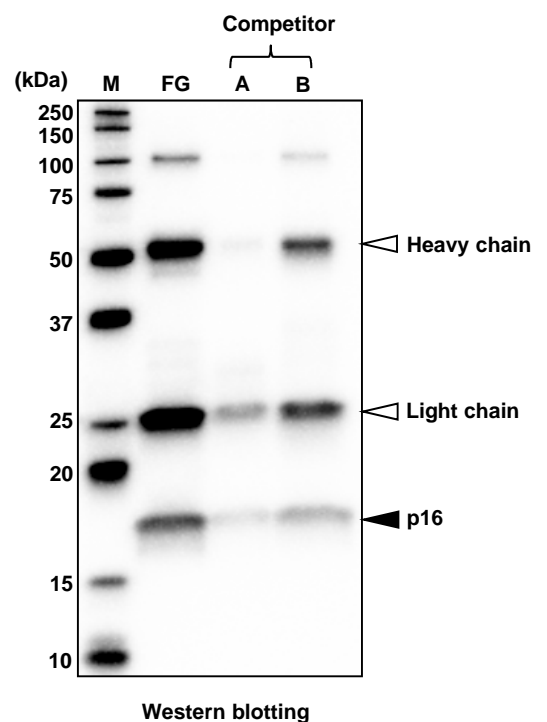
Result

0.1mgの各社プロテインGビーズと5ugの抗p16抗体を用いて、HeLa細胞質画分からp16の免疫沈降を行い、SDS-PAGE後に銀染色とウエスタンブロットングを行いました。

ウエスタンブロットングの結果から、p16が回収できていることが確認され、また、FGビーズ®が最も多く回収できていることも確認されました。銀染色では、複数のはっきりとしたバンドも確認できるため、p16と相互作用しているタンパク質も、共免疫沈降されていることが示唆されました。



Silver staining



Western blotting

Materials and method

Materials

1. Protein G beads
2. HeLa cell extracts (cytosolic fraction) – 3mg/ml
3. PBS(-) (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.5mM KH₂PO₄)
4. Wash Buffer A (10mM HEPES-NaOH(pH7.9), 50mM KCl, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol)
5. Wash Buffer B (20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 150mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 0.2mM PMSF)
6. SDS sample buffer (62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol)
7. Anti-p16 antibody (from Abcam)
8. Anti-mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep(from GE healthcare)
9. Transfer buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 20%(v/v) Methanol)
10. Blocking buffer (from Thermo)
11. TBS-T buffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.1% Tween20)

Method 1 (Binding Antibody)

1. **Wash**
Transfer 0.1mg of beads to a tube.
Wash beads with 200ul PBS(-) 2 times at 4°C.
2. **Bind Antibody**
Add antibody (5ug) diluted in 200ul PBS(-) to beads.
3. **Reaction**
Mix for 30min at room temperature.
4. **Wash**
Wash antibody binding beads with Wash buffer A 2 times at 4°C.

Method 2 (Immunoprecipitation)

1. **Add sample solution**
Add 200ul HeLa cell extracts .
2. **Reaction**
Resuspend beads and incubate with rotation for 120min at 4°C.
3. **Wash**
Separate magnetically and remove supernatant.
Wash beads with Wash buffer B 3 times at 4°C.
Separate magnetically and remove supernatant.
4. **Elution**
Add 40ul SDS sample buffer and resuspend beads.
Boil for 5min and remove the beads.
5. **Analyze the samples by SDS-PAGE and silver staining**

FG beads® information

Product name	Protein G beads
Product number	TAS8848N1173
Storage temperature	2-8°C
Storage buffer	10mM HEPES(pH7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10%glycerol
Size of beads	190nm ± 20 nm
IgG binding capacity	>100ug mouse IgG /mg of beads

Methods 3 (Western blotting)

1. Perform SDS-PAGE, and place the gel in Transfer buffer for about 10min.
2. Transfer the protein from the gel to a PVDF membrane.
3. Block the membrane with the Blocking buffer for 15min at room temperature.
4. Dilute the primary antibody with the Blocking buffer to 1/150.
5. Incubate for 60min at room temperature.
6. Wash the membrane with TBS-T buffer 3 times.
7. Dilute the secondary antibody with the TBS-T buffer to 1/2000.
8. incubate for 60min at room temperature.
9. Wash the membrane with TBS-T buffer 5 times.
10. Detect with a chemiluminescence substrate.