

IP한 시료가 PTM 분석에 적당한가?

특정 단백질의 PTM 분석이 필요한 경우, 일반적으로 다음과 같은 전략을 구사할 수 있다.

- 1) 그 단백질의 항체로 IP한 후, SDS-PAGE 거친 다음 단백질 밴드를 내려내서 질량분석
- 2) 그 단백질을 특정 tag (예, FLAG)를 붙여 클로닝하여 transfection하고, tag를 이용하여 IP한 후 단백질을 분석
- 3) 그 단백질을 expression vector에 클로닝하여 대장균에서 발현하고 purify한 단백질을 in vitro에서 reaction 시킨 다음 PTM 분석

1),2)의 경우 IP한 시료의 quality는 Western blot만으로는 확인할 수 없다. 반드시 Western blot과 protein staining을 비교하여 IP한 시료가 PTM분석에 적당한지 확인해야 한다.

가령,

IP한 시료를 하나의 SDS-PAGE gel의 다른 두 레인에 WB용 10%, PTM분석용 90%씩 나누어 로딩한다.



젤을 걸고 난 후, 가운데로 자르고, 10%짜리는 WB, 90%짜리는 Coomassie staining 한다.



두 이미지를 비교하여, WB자리에 protein band가 보이는지 확인한다.

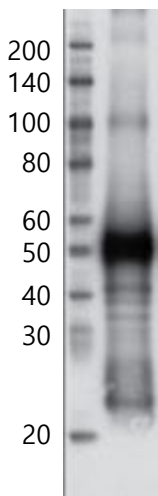


있으면 그 band를 잘라서 진행, 없으면 IP조건 다시 세워야한다.

WB



Protein staining



실험 예)

1)번 방법으로 실험했는데, 옆과 같은 결과를 얻었다.
이 경우, WB 이미지는 아주 깨끗하고 좋지만, protein staining을 했더니 항체의 heavy, light chain이 major로 나오고 기타 다른 nonspecific band가 많지만, 정작 본인의 단백질 (단백질 서열분석으로 30kDa로 추정)은 보이지 않는다.

** IP조건을 다시 optimization하든지 아니면 위의 2)번으로 방법을 바꾸든지 해야한다.