

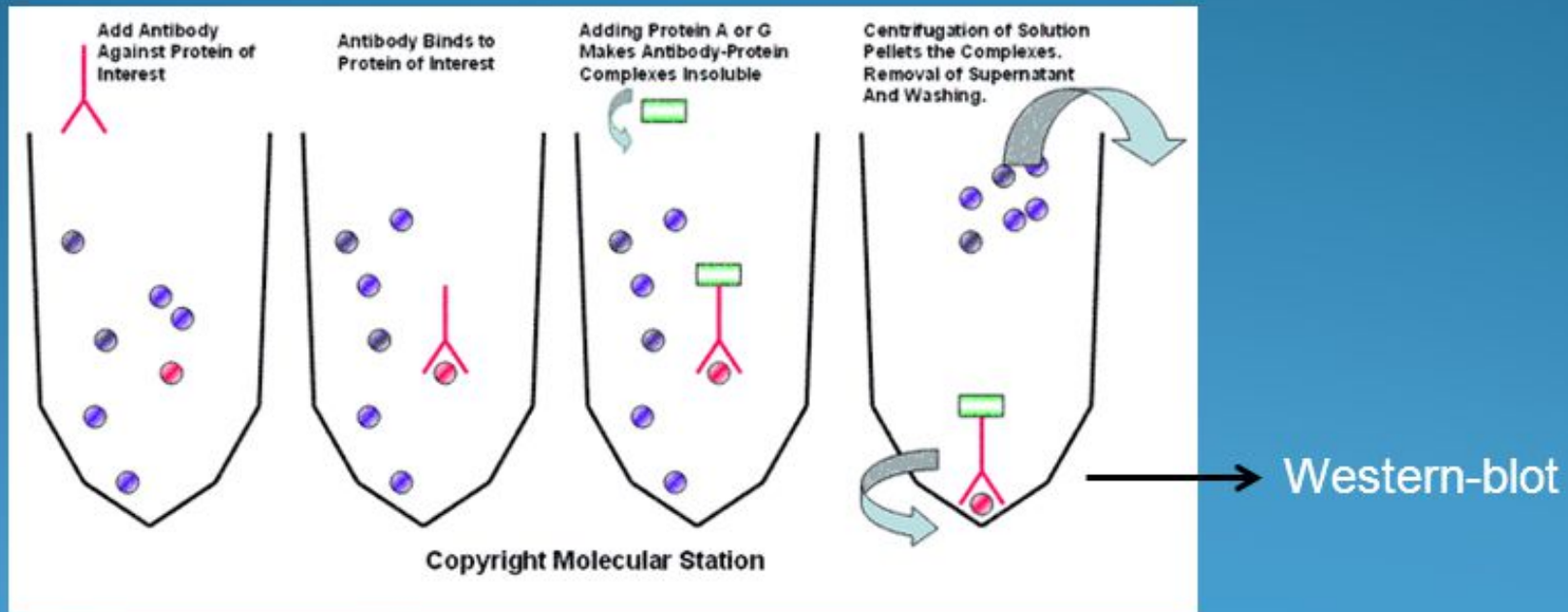
**Co-IP**



**Immuno-précipitation (IP)**

# Immunoprécipitation

- Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire
- Utiliser un Ac spécifique de la protéine d'intérêt
- Précipiter le complexe Protéine-Ac avec une forme insoluble de protéines se liant à les anticorps (ex: Protein G)
- Centrifuger la suspension: la protéine d'intérêt est séparée



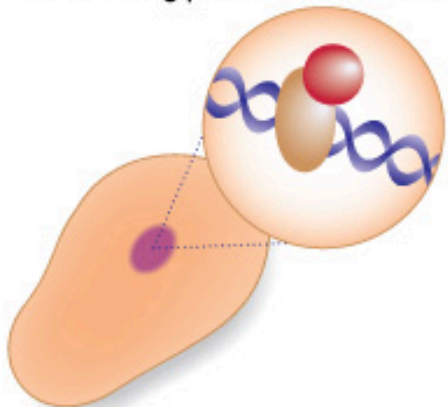
- Interactions protéines-protéines, protéine-médicament
- Concentration d'une protéines présente en faible quantité

1- Diluer 100 µg de protéines totales dans un volume final de 500 µl de tampon d'IP

2- Ajouter 2 µg de l'anticorps de la protéine à immunoprécipiter et mettre sous agitation toute la nuit à 4°C.

3- la Protéine G sepharose ou éventuellement Protéine A sepharose selon la nature de l'anticorps

Cell nucleus containing the two interacting proteins of interest



Nuclear extraction



1

Add antibody directed against one of the proteins of interest

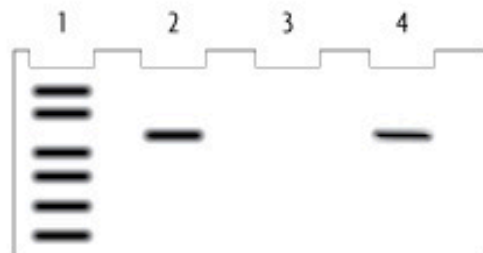


2

Add antibody binding beads



3



Lane 1. Mol. Weight Marker  
Lane 2. Extract  
Lane 3. -ve IP (no ab)  
Lane 4. Co-IP

6

Western blot analysis of immunoprecipitated proteins using an antibody directed against the second protein of interest

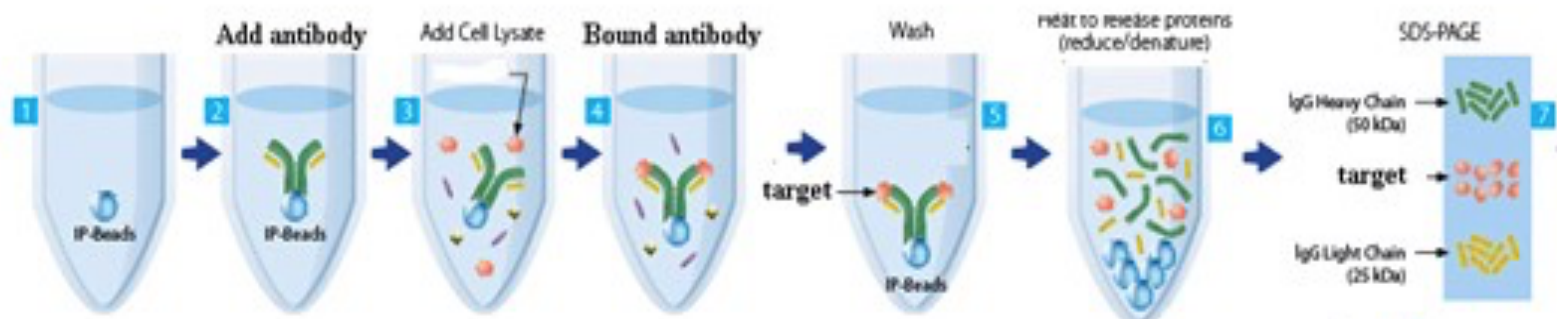
5 Wash & collect the immunoprecipitated proteins

4 Immunoprecipitate the proteins of interest

6- Western-Blot.

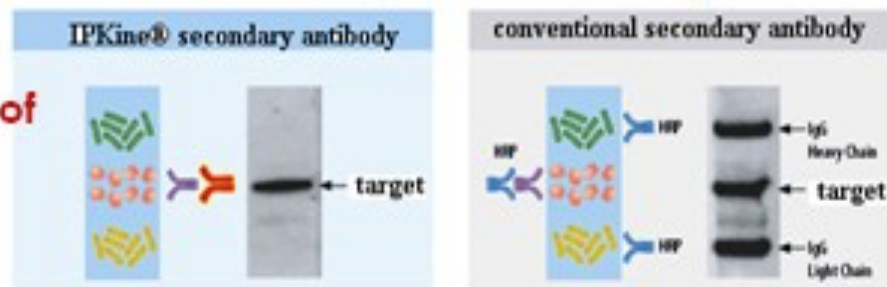
5- Centrifuger 1 min à 5 000 g, ôter délicatement le surnageant et reprendre dans 500 µl de tampon IP.

4- Incuber 2 h sous agitation à 4°C.



**IPKine secondary antibody**

--Excellent to avoid interference of antibody heavy chain



# IMMUNO-PRÉCIPITATION (IP)

Le tampon utilisé est identique à celui de l'extraction pour western blot.

- Diluer 100  $\mu\text{g}$  de protéines totales dans un volume final de 500  $\mu\text{l}$  de tampon d'IP. Ajouter 2  $\mu\text{g}$  de l'anticorps de la protéine à immunoprécipiter et mettre sous agitation toute la nuit à 4°C.
- Le lendemain matin, préparer la solution avec la Protéine G sepharose ou éventuellement Protéine A sepharose selon la nature de l'anticorps.
- Ajouter 50  $\mu\text{l}$  (jusqu'à 100  $\mu\text{l}$ ) de Protéine G sepharose par IP pour avoir un culot d'une taille suffisante à manipuler (entre 25 et 50  $\mu\text{l}$ ). Incuber 2 h sous agitation à 4°C.
- Centrifuger 1 min à 5 000 g, ôter délicatement le surnageant et reprendre dans 500  $\mu\text{l}$  de tampon IP.
- Prélever le surnageant et congeler ou faire migrer directement dans un gel SDS PAGE.

- Révéler avec un anticorps dirigé contre la protéine co-immunoprécipitée.
- Eventuellement faire un second western blot avec la protéine immunoprécipitée : cela permet de s'assurer que les variations de la protéine co-immunoprécipitée ne sont pas dues à des variations quantitatives de la protéine qui sert à l'IP.

# Converging pathways involving microRNA-206 and the RNA-binding protein KSRP control post-transcriptionally utrophin A expression in skeletal muscle

Adel Amirouche<sup>1,2</sup>, Helina Tadesse<sup>1,2</sup>, Pedro Miura<sup>1,2</sup>, Guy Bélanger<sup>1,2</sup>, John A. Lunde<sup>1,2</sup>, Jocelyn Côté<sup>1,2</sup> and Bernard J. Jasmin<sup>1,2,\*</sup>

