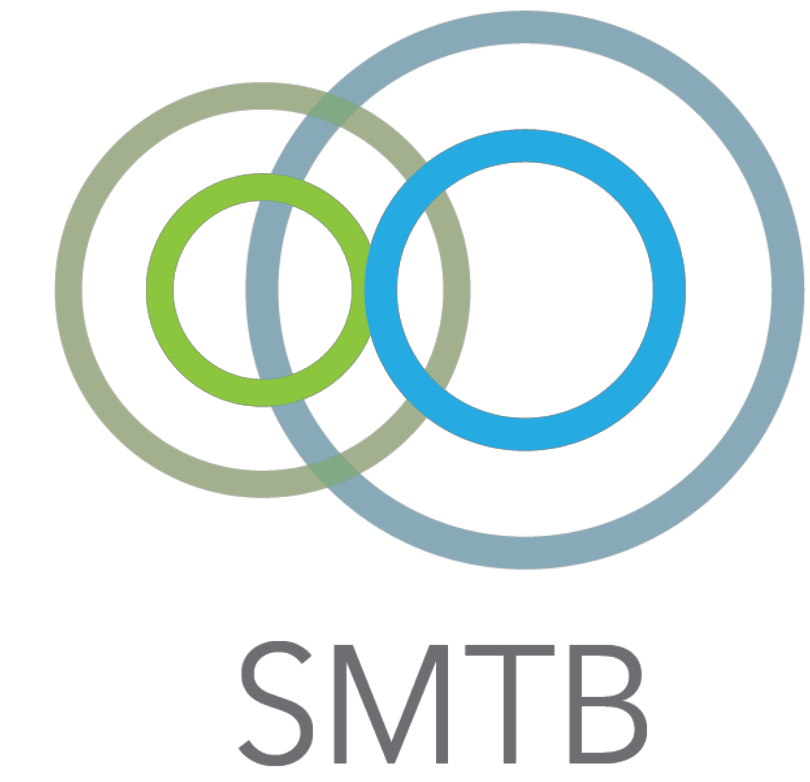




Validating α ORF1p antibodies for use in immunoprecipitation Изучение применимости антител anti-ORFp в иммунопреципитации

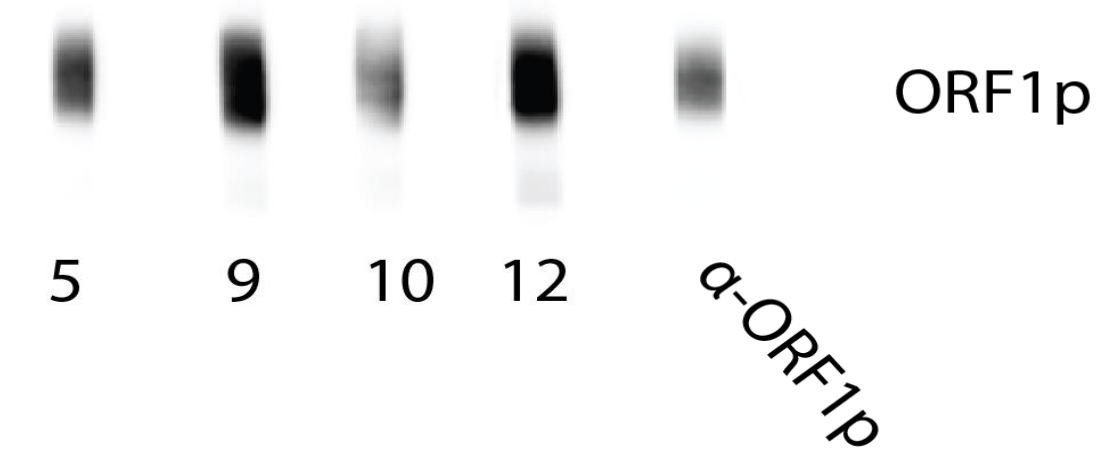
M. Masramon, K. Meteleva, D. Repkina, A. Zakirov, J. LaCava



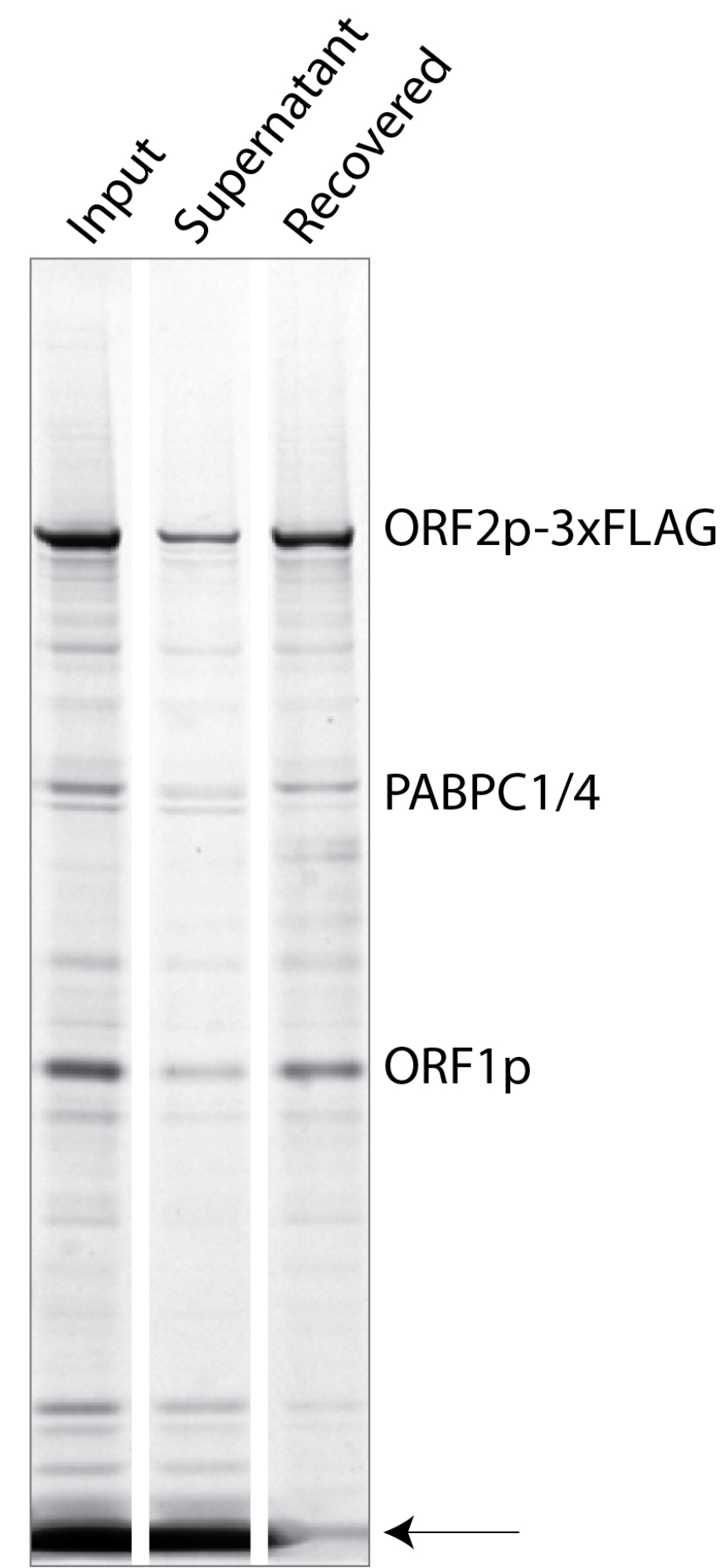
Introduction / Введение

Cellular functionality is chiefly mediated through protein-protein interaction (PPI) networks, the study of which enables understanding of the molecular biology of the cell. In our project we attempted to purify protein complexes associated with LINE-1 retrotransposon using affinity capture.

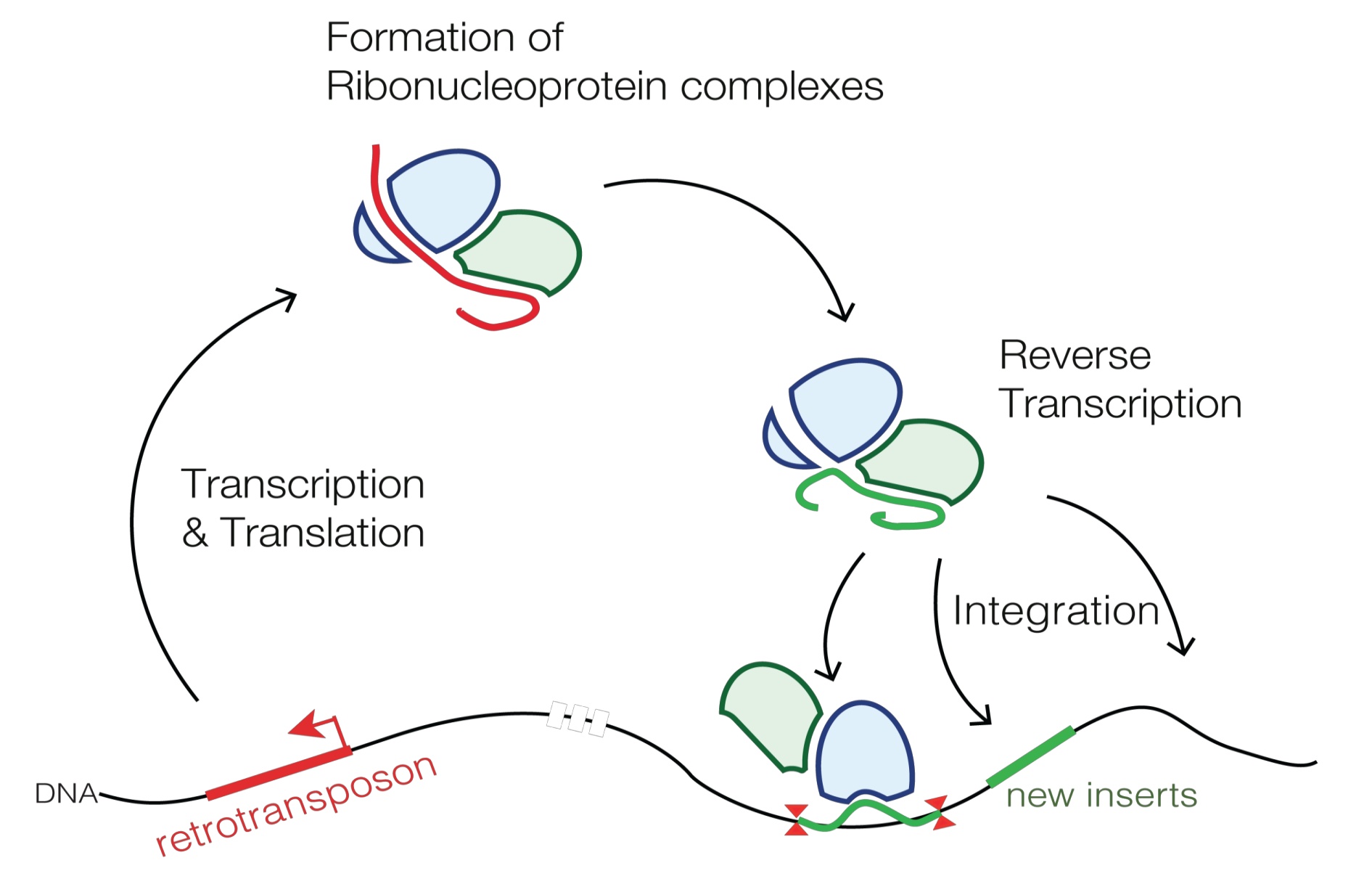
Многие процессы в клетке регулируются через сети белок-белковых взаимодействий (ББВ). В нашей работе мы выделяли белковые комплексы, связанные с ретротранспозоном LINE-1, используя метод иммунопреципитации.



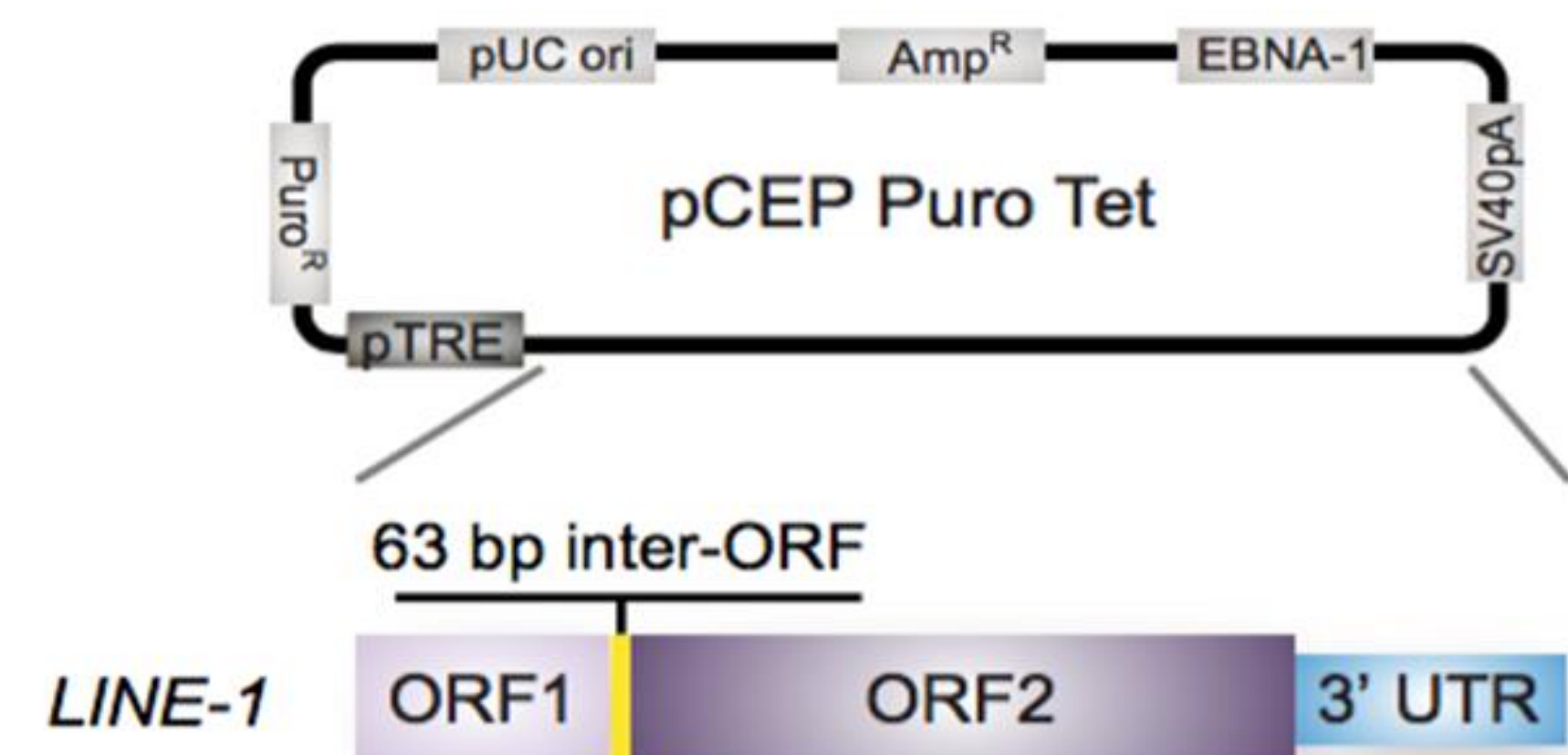
Validating ORF1p antibodies by western blot / Сравнение ORF1p антител с помощью Вестерн-блота



Antigens Injected into Mice (SDS-PAGE Gel) / Антигены, введенные в мышей

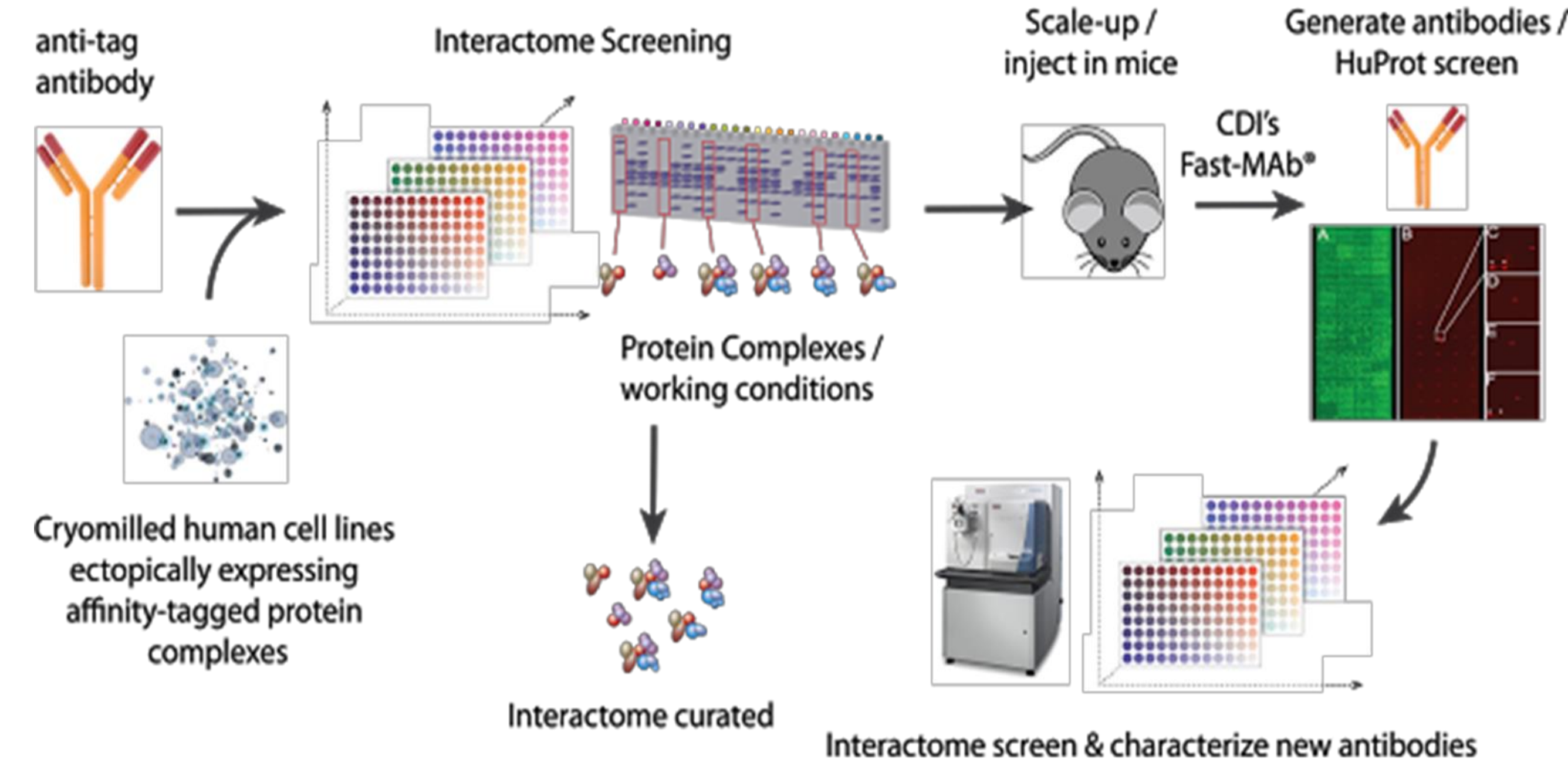


Life Cycle of Retrotransposons / Жизненный цикл ретротранспозона

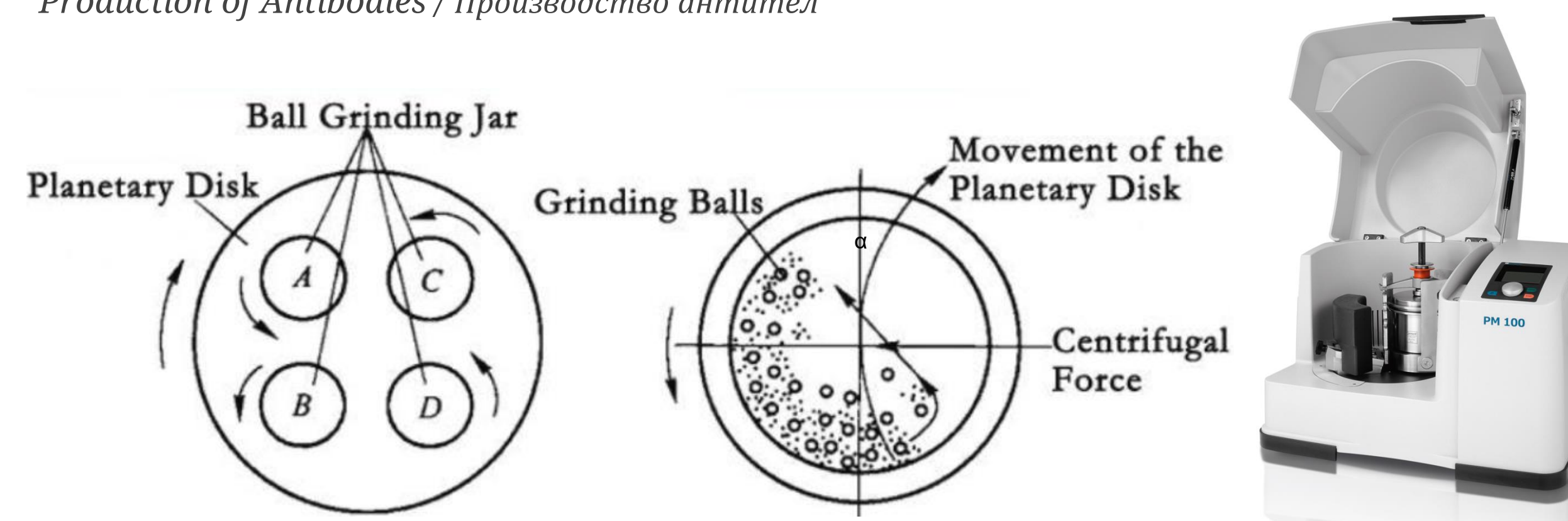


LINE-1 vector and ORF genes / Вектор с LINE-1 и генами ORF
We have 2 versions of the vector: LD288 with a FLAG tag on ORF1 and LD401 with a 3xFLAG tag on ORF2 / Два варианта данного вектора: LD288 с FLAG-меткой после ORF1 и LD401 с 3xFLAG-меткой после ORF2

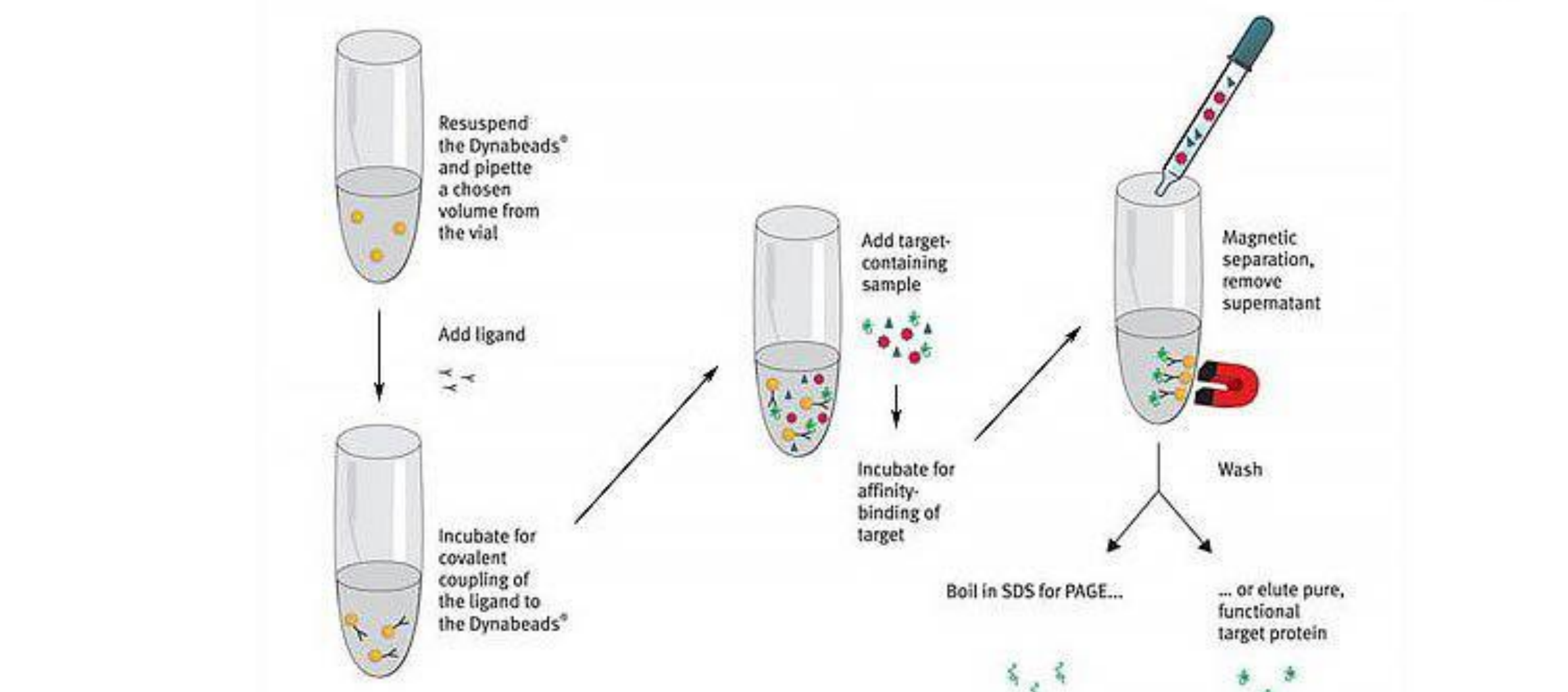
Methodology / Методы



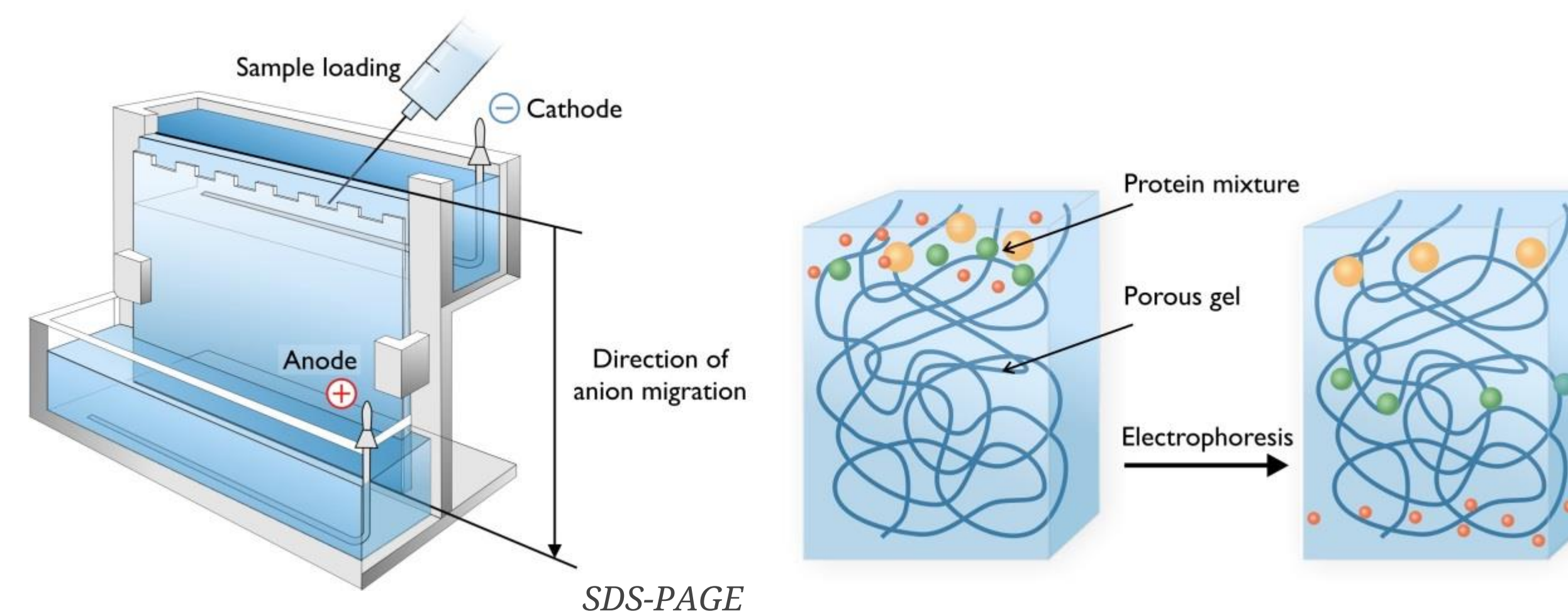
Production of Antibodies / Производство антител



Planetary Ball Milling Process / Кривоизмельчение клеток



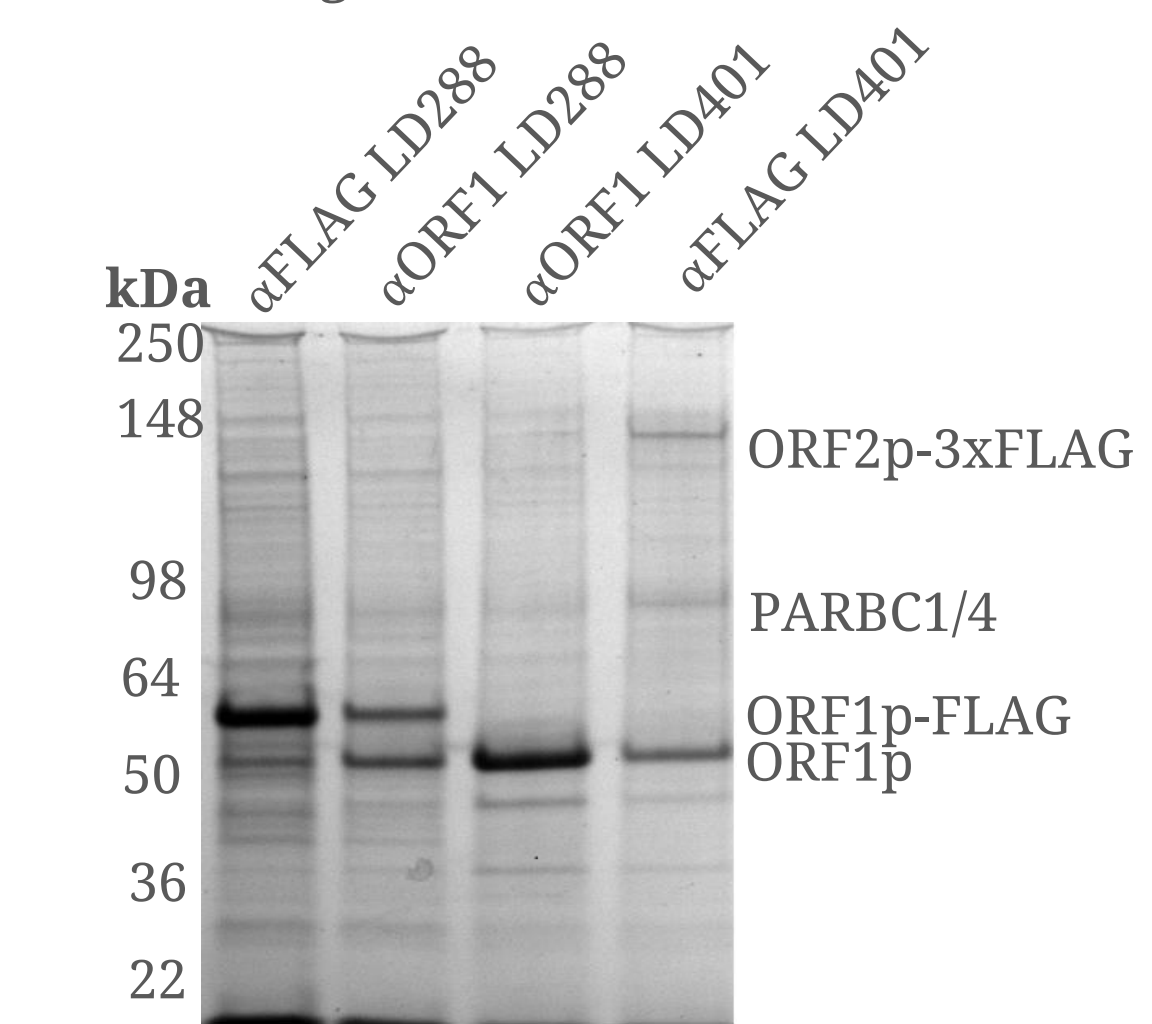
Affinity Capture Process / Процесс иммунопреципитации



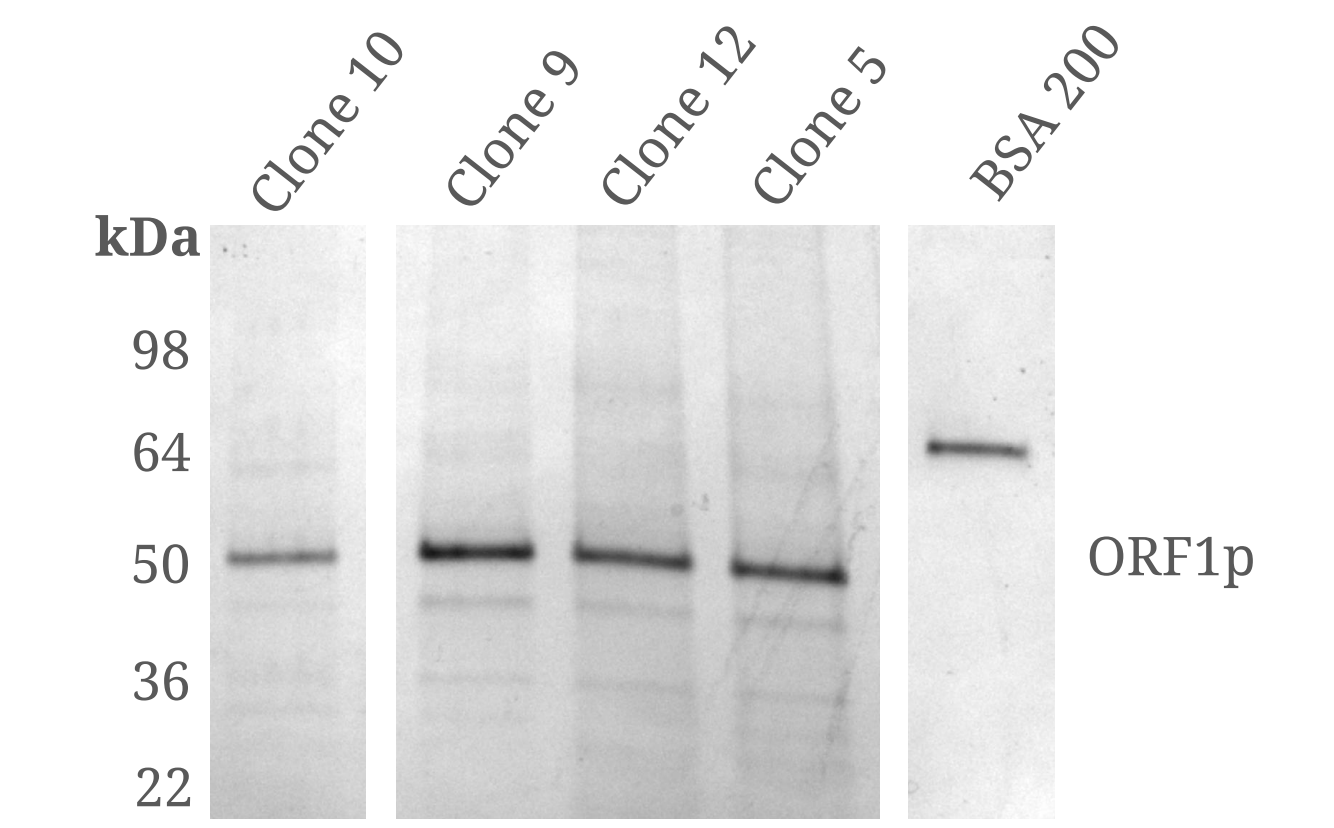
Results and Conclusions / Результаты и выводы

- (1) Antibodies that we investigated exhibited a decrease in yield of the target when exposed to formaldehyde (FAI).
- (2) Clone 10 may have performed better than other new α ORF1p antibodies.
- (3) All new clones worked approximately as well as our "gold-standard" published α ORF1 clone 4H1 (Taylor et al. Cell. 2013).
- (4) An additional side-by-side comparison of the antibodies will be carried out to confirm results and interpretations. We note that, as a result of their ability to IP proteins after FAI treatment, any of them may be useful for chromatin immunoprecipitation (ChIP), which aims to determine which genomic DNA sequences are bound by proteins under investigations.

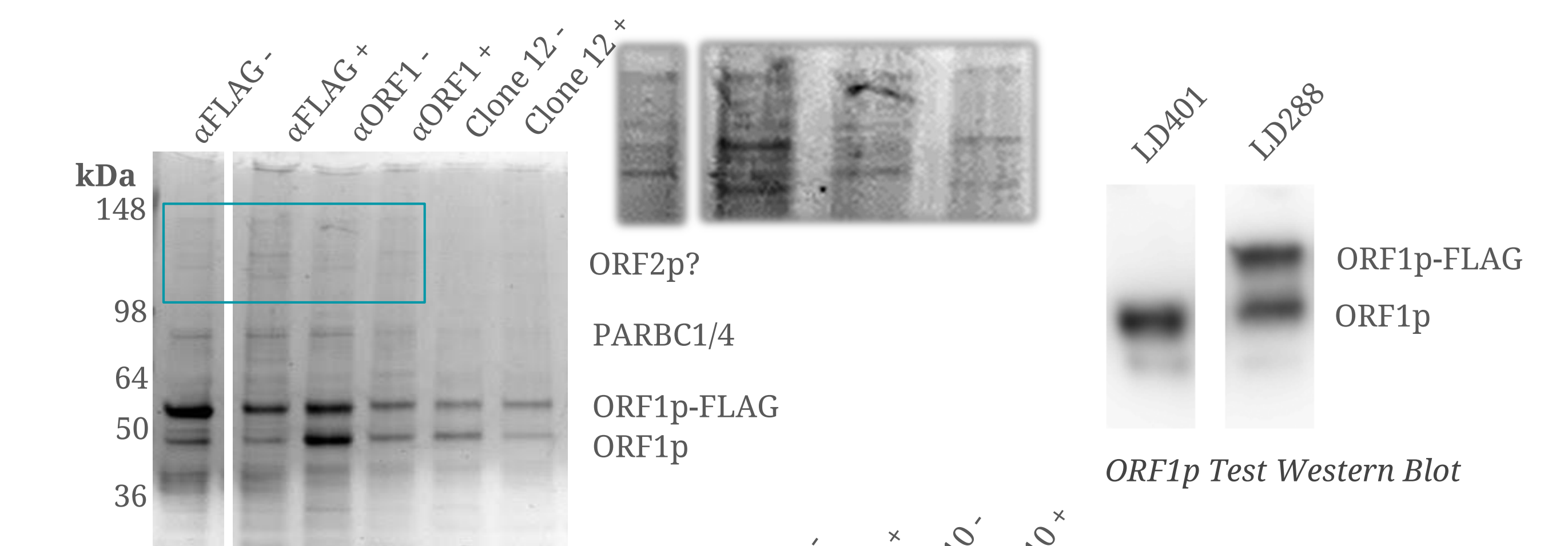
- (1) Все исследованные антитела показали сниженный выход белка-мишени при обработке формальдегидом (FAI).
- (2) Клон 10, возможно, показал больший выход целевого белка по сравнению с другими антителами.
- (3) Все новые клоны связывали белковые комплексы не хуже, чем общепринятый стандарт α ORF1 4H1 (Taylor et al., Cell., 2013).
- (4) Способность исследованных антител связывать антигены в присутствии FAI говорит о возможности их применения в иммунопреципитации хроматина (ChIP), целью которой является определение взаимодействий геномной ДНК и белков.



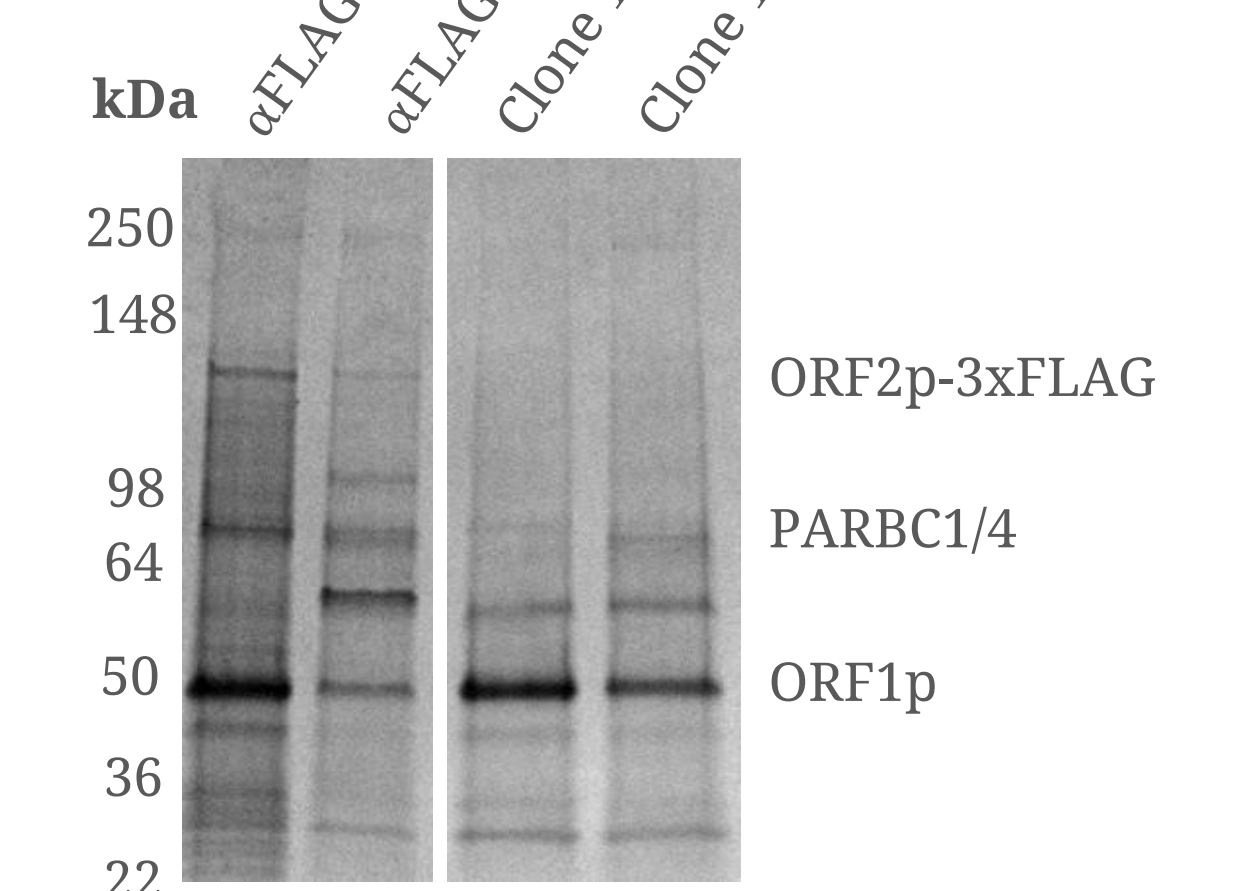
α ORF1 and α FLAG Test Gel



α ORF1 Clones Test Gel LD401



Clone 12 LD288 FAI crosslinking



Clone 10 LD401 FAI crosslinking

