

# TANDEMOVÁ AFINITNÍ PURIFIKACE JAKO METODA STUDIA PROTEIN-PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ

Jana Majerská

Mgr. Petra Procházková Schrumpfová, Ph.D.  
Oddělení funkční genomiky a proteomiky, ÚEB

# Obsah

---

- Tandemová afinitná purifikácia
- Materiál
- Metódy
- Výsledky a diskusia
- Literatúra

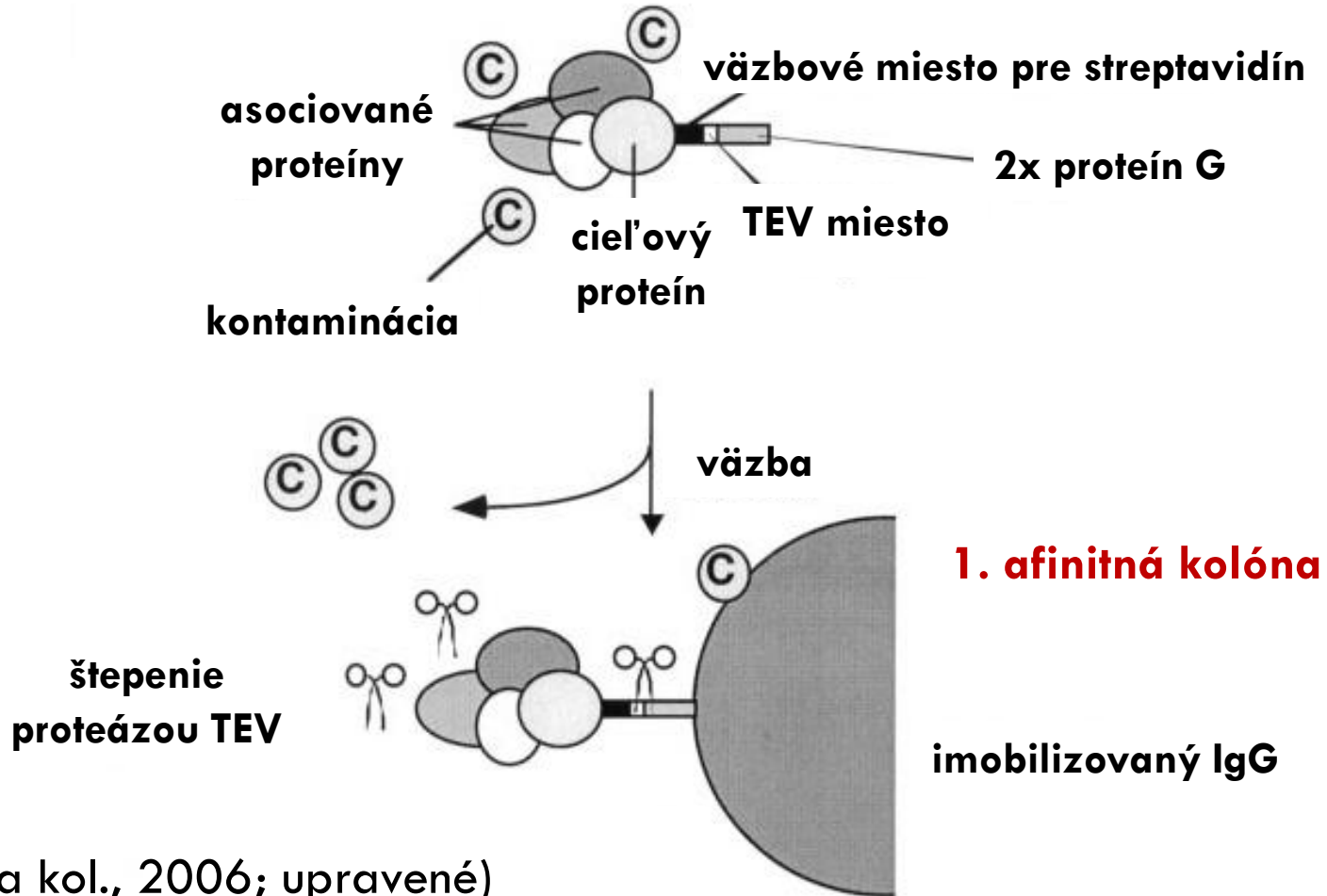
# Tandemová afinitná purifikácia

- univerzálna metóda izolácie proteínových komplexov za natívnych podmienok
- vyvinutá v roku 1999 Rigaut a kol.
- dvojkroková purifikácia na imunoafinitných kolonách
- značenie epitopom – tzv. „TAP-tag“



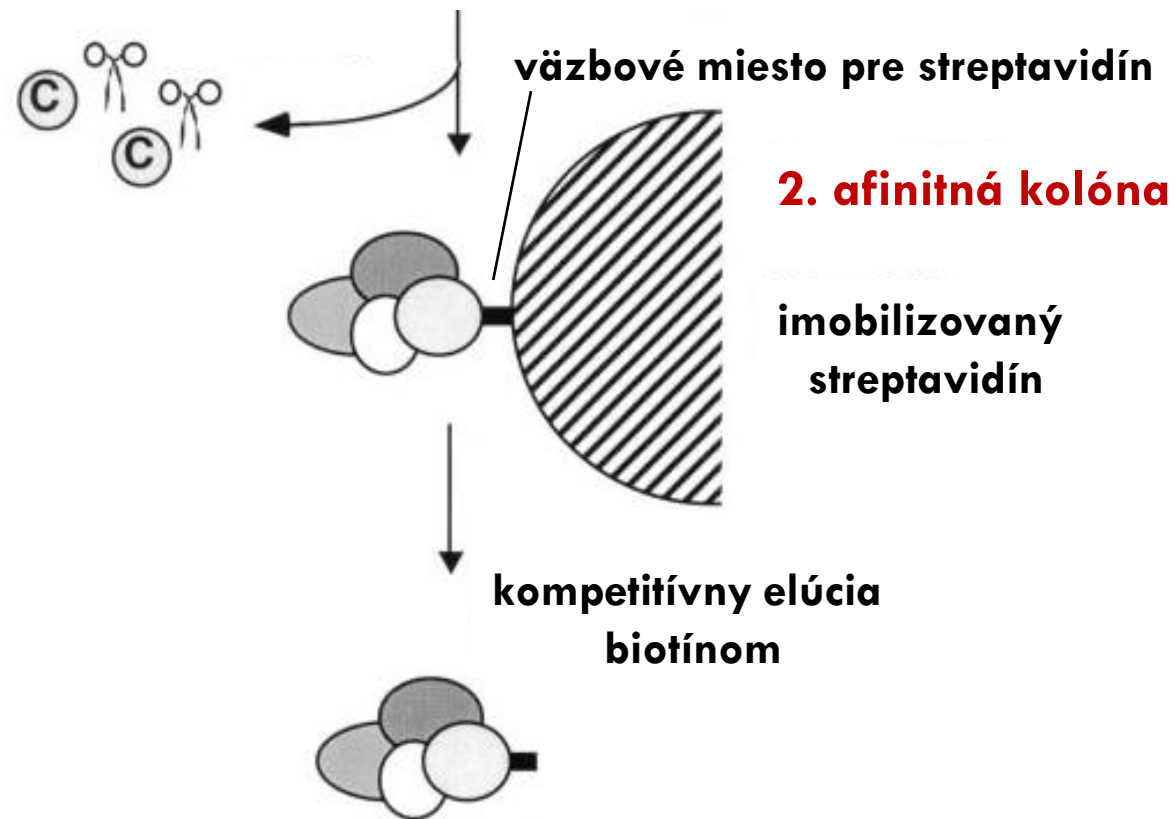
(Burckstummer a kol., 2006)

# Tandemová afinitná purifikácia



(Puig a kol., 2006; upravené)

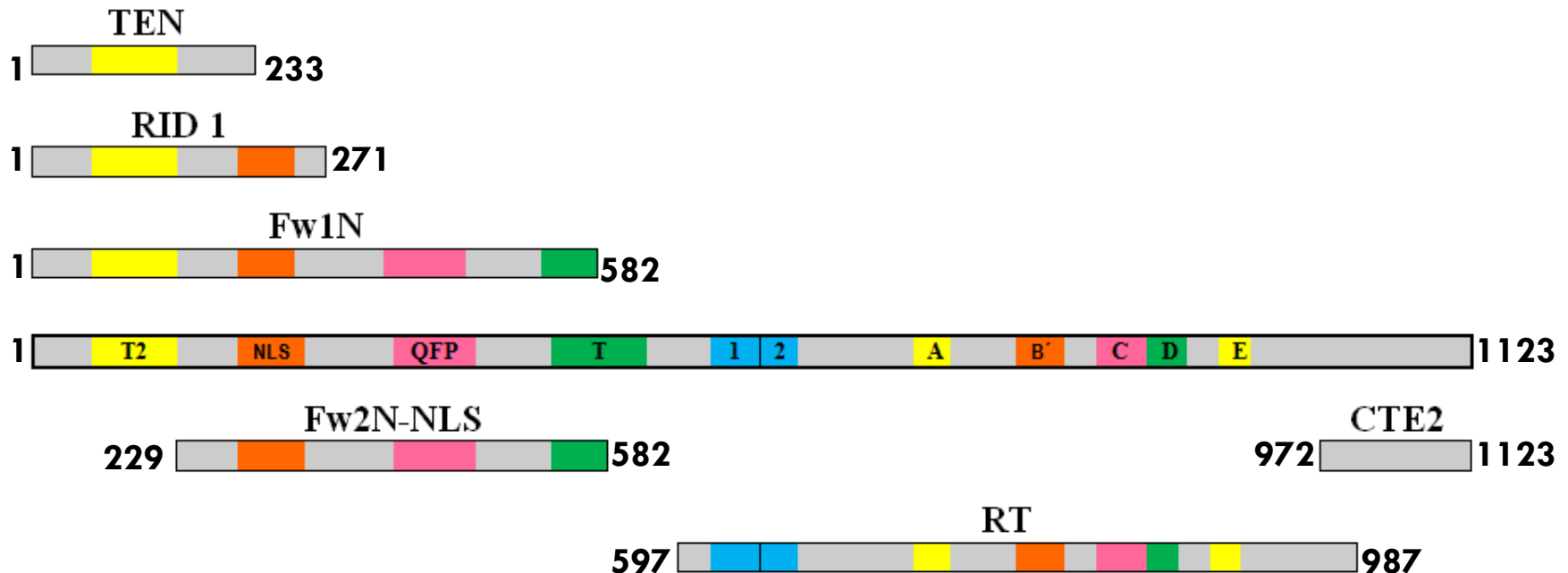
# Tandemová afinitná purifikácia



(Puig a kol., 2006; upravené)

# Materiál

- cDNA kódujúca katalytickú podjednotku telomerázy húsenička roľného (*Arabidopsis thaliana*) a jej fragmenty



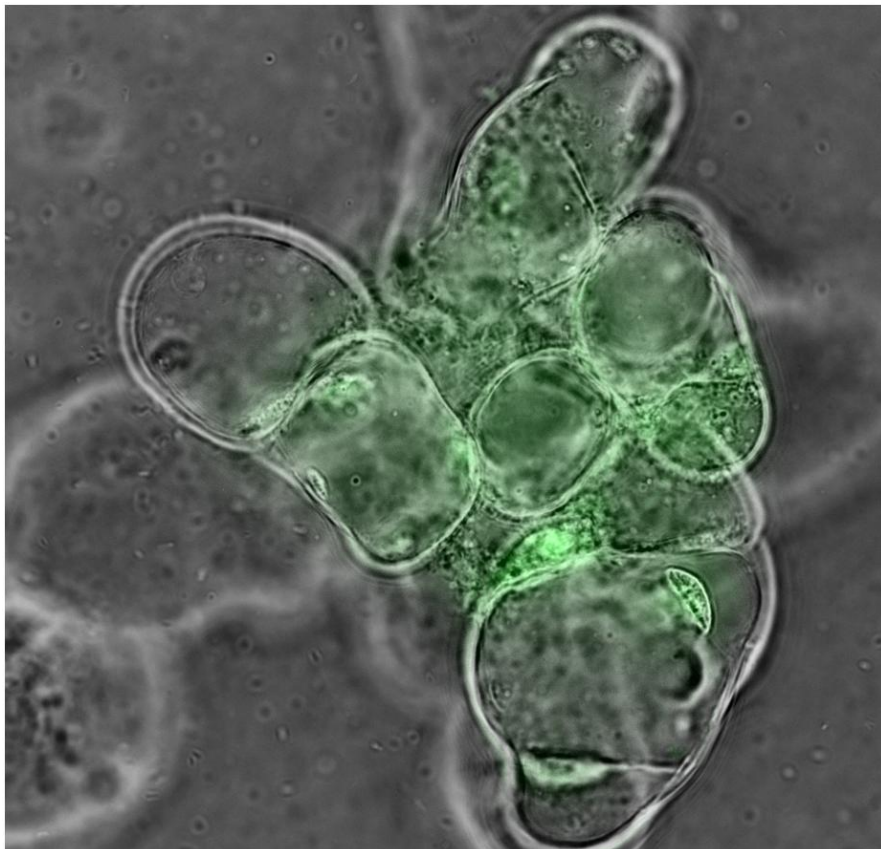
# Metódy

- príprava expresných klonov
  - Gateway cloning technology
  - obsahujú: promotor 35S, ORF, TAP-tag, GFP, AtbR
- transformácia baktérie *Agrobacterium tumefaciens*
- transfekcia suspenzných kultúr *Arabidopsis thaliana*
  - usmrtenie *A. tumefaciens* a selekcia transfektantov
  - pomnoženie transfekovaných buniek

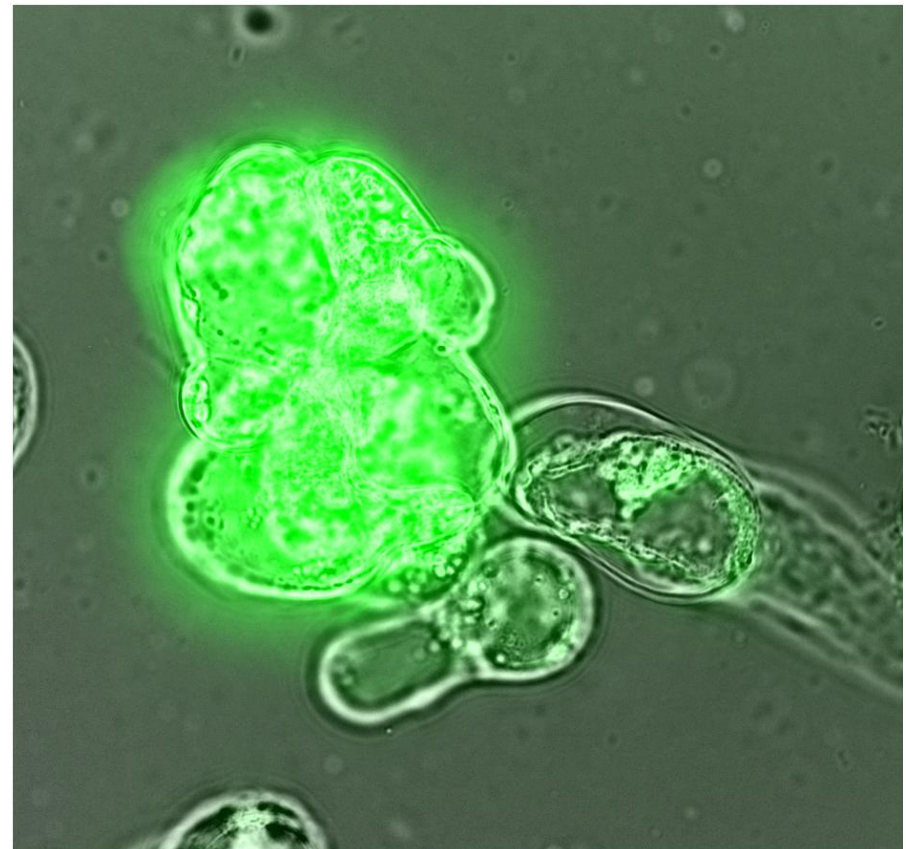
# Metódy

## □ fluorescenčná mikroskopia

**Bunky *A.thaliana* divokého typu**



**Transfekované bunky *A.thaliana***

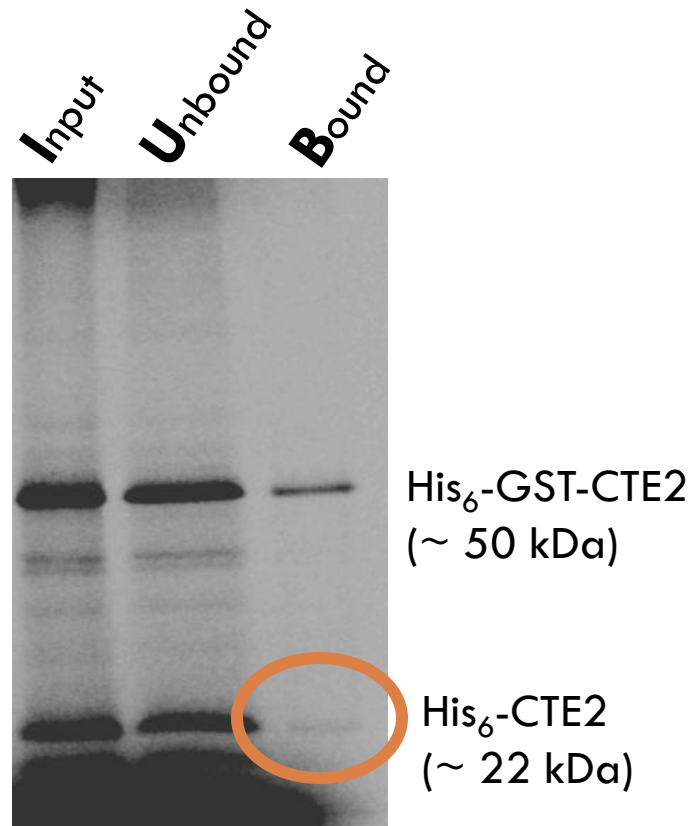




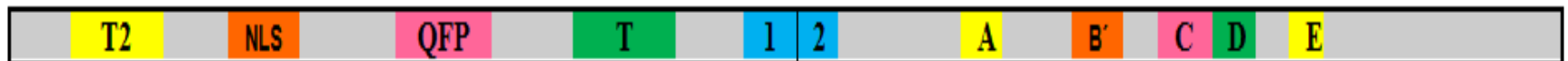
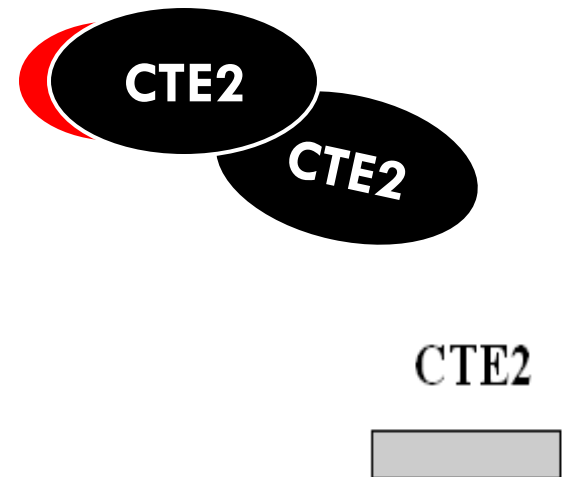
# Výsledky a diskusia

- suspenzné kultúry exprimujú fragmenty:
  - ▣ RID1 s N- aj C- terminálnym tagom
  - ▣ Fw2N\_NLS s C-terminálnym tagom
- po pomnožení bude vykonaná prvá purifikácia
- v prípade úspechu budú napestované kultúry exprimujúce aj zvyšné fragmenty

# Výsledky – „GST PULL-DOWN ASSAY“



Slabá interakcia medzi dvomi rôzne značenými C-koncovými fragmentami CTE2 (aa 972-1123)



# Literatúra

- **Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B.** 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17(10): 1030-1032.
- **Burckstummer, T., Bennett, K. L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G. and Bauch, A.** 2006. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3(12): 1013-1019.
- **Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado- Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B.** 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24(3): 218-229.