

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2015

Sauli Lakkisto

RCOR2-VASTA-AINEIDEN TESTAUS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2015 | 28 sivua

Ohjaajat

Kati Tarkkonen, Tutkijatohtori

Kari Haajanen, Päätoiminen tuntiopettaja

Sauli Lakkisto

RCOR2-VASTA-AINEIDEN TESTAUS

RCOR2 on suhteellisen hiljattain havaittu proteiini, jonka kaikkia toimintatapoja ei vielä tiedetä. Samaan perheeseen kuuluvat myös RCOR1 ja -3. Toiselta nimeltään ne ovat CoREST-proteiineja. RCOR1 on näistä eniten tutkittu.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää kaupallisten RCOR2:lle tehtyjen vasta-aineiden toimivuutta. Työ suoritettiin yhteistyössä Riku Kivirannan tutkimusryhmän kanssa, joka toimii Turun yliopistossa.

Työssä kasvatettiin muutamia solulinjoja, tärkeimpänä HEK293T-solut, joista kerättiin näytteet. Niiden analysointiin käytettiin menetelmiä kuten SDS-PAGE, Western blot, immunopresipitaatio ja tulokset kehitettiin röntgenfilmille.

RCOR2-vasta-aineista yksi saatiin toimimaan Western-menetelmässä RCOR2:ta ylituottavissa soluissa, mutta luonnollisesti eli endogeenisesti E1-soluissa esiintyvää RCOR2-proteiinia sillä ei onnistuttu havaitsemaan. Yksikään ei sopinut käytettäväksi immunopresipitaatioissa.

ASIASANAT:

proteiini, SDS-PAGE, Western blot, immunopresipitaatio, vasta-aine, röntgenfilmi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 28 pages

Instructors

Kati Tarkkonen, Postdoctoral Research Fellow

Kari Haajanen, Lecturer

Sauli Lakkisto

RCOR2 ANTIBODY TESTING

RCOR2 is a fairly recently discovered protein whose working mechanisms are not fully understood yet. It is part of a protein family which is also called CoREST and comprises RCOR1, -2, and -3. CoREST1 is the most studied of the three and its mechanisms are best known.

The main focus of this study was to test three commercially available antibodies for the RCOR2 protein. The work was performed in co-operation with Riku Kiviranta's research group in Turku University.

The samples were gathered by cell culturing a few different cell lines, mainly HEK293T cells. The techniques used in analyzing included SDS-PAGE, Western blot, and immunoprecipitation. The end results were developed on x-ray film with enhanced chemiluminescence.

Of the three antibodies one was proven successful in identifying RCOR2 in the Western blot of the total cell lysates. However none could identify the RCOR2 protein formed endogenously in MC3T3-E1 cells. None of the antibodies tested worked correctly with the immunoprecipitation protocol.

KEYWORDS:

protein, antibody, Western blot, immunoprecipitation, SDS-PAGE, x-ray

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT	5
1 JOHDANTO	7
2 TEORIA	9
2.1 Solut	9
2.2 Soluviljely	11
2.3 Western blot	11
2.4 Immunopresipitaatio	12
3 TYÖN SUORITUS	14
3.1 Soluviljely	14
3.1.1 Viljelmän aloitus	14
3.1.2 Solujen jako	14
3.1.3 Näytteen valmistelu	15
3.1.4 Solujen keräys	15
3.2 Proteiinin mittaaminen	15
3.3 Geelien valaminen	16
3.4 Geelin lataus ja ajo	16
3.5 Transferointi eli siirto	18
3.6 Western blottaus	18
3.6.1 Kehitys	19
3.7 Immunopresipitaatio	20
4 TULOKSET	21
5 PÄÄTELMÄT	24
LÄHTEET	25

LIITTEET

- Liite 1. Käytetyt reagenssit
- Liite 2. Bradford-proteiinimääritys

KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT

APS	Ammoniumpersulfaatti
BSA	Naudan seerumin albumiini (engl. Bovine serum albumin)
DMEM	Kasvatusmedium soluille, lyhenne tulee sanoista Dulbecco's modified Eagle's medium
ECL	tehostettu kemiluminesenssi (engl. enhanced chemiluminescence)
FBS	Naudan sikiöseerumi
GMEM	Glasglow's modified MEM
HRP	Piparjuuriperoksidaasi (engl. horseradish peroxidase)
IHC-P	immunohistokemia-parafiini -protokolla
IP	Immunopresipitaatio
NaF	Natriumfluoridi
Na ₃ VO ₄	Natriumortovanadaatti on proteaasi-inhibiittori
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliiini
PMSF	fenyylimetyylisulfonyylifluoridi on proteaasi-inhibiittori
PVDF-kalvo	Polyvinyylifluoridikalvo
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer on solujen hajoituksessa käytettävä puskuri.
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi
TBST	Tris-puskuroitu saliiini + Tween 20

WB

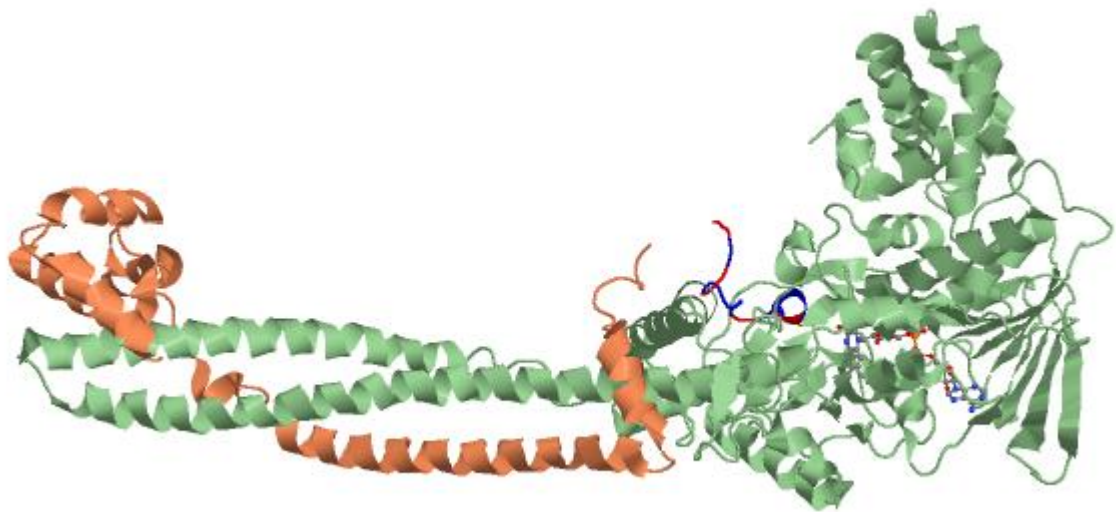
Western Blot

α MEM

Alpha versio Minimum Essential Mediumista, sisältää ei välttämättömiä lisäaineita, kuten aminohappoja

1 JOHDANTO

RCOR2 on verrattain vähän aikaa sitten tunnistettu proteiini, jonka tarkkoja toiminnallisia mekanismeista ei vielä tarkkaan tiedetä. RCOR1, RCOR2 ja RCOR3 kuuluvat samaan perheeseen ja ne tunnetaan myös nimillä CoREST1, -2 ja -3. Se on myös osa isompaa LSD1-CoREST-HDAC-kompleksia (kuva 1), jolla on lukuisia toimia geenien säätelyssä.



Kuva 1 Rakennekuva LSD1-CoREST. Kuvassa LSD1 näkyy vihreänä ja CoREST1 on oranssin värinen. (PDB koodi 2V1D)

LSD1 demetyloi histoni H3-Lys4:n, mutta osallistuu myös muuten kromatiinin sääntelyyn (Forneris ym. 2008, 182). LSD1 myös säännöstelee alkioasteella olevien solujen transkriptiota (Foster ym. 2010, 4857-4859). CoREST1 repressoii hermoston geenien ilmentymistä hermoston erilaistumisen yhteydessä (Sáez ym. 2015, 1). RCOR2 on yhden tutkimuksen mukaan tarpeellinen normaalissa kantasolujen kasvamisessa, sekä se voi toimia korvikkeena transkriptiofaktori Sox2:lle kun hiiren tai ihmisen somaattisia soluja muunnettiin pluoripotentiksi (Yang ym. 2011, 800).

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Riku Kivirannan tutkimusryhmän kanssa Turun yliopistolla. Tutkimusryhmän tuloksissa RCOR2:n ilmentyminen kasvoi osteoblastien erilaistumisen yhteydessä. Koska vielä ei ole tieteellisiä julkaisuja, mitkä olisivat tutkineet RCOR2:n vaikutusta luun muodostumiseen, on se mielenkiintoinen aihe tutkimusryhmälle. Tavoitteenani olikin testata toimintatapojen ja eri menetelmien toimivuutta, joilla tätä tutkimusta voisi viedä eteenpäin.

Työn tarkoituksena on optimoida RCOR2-proteiinin tunnistaminen totaalisolulysaateista Western blot-menetelmällä. Työssä käytetään RCOR2:lle saatavilla olevia kaupallisia vasta-aineita. Vasta-aineiden toimivuutta testataan myös immunopresipitaatiolla. Abcamin valmistama RCOR2 vasta-aine ab37113 on testattu valmistajan toimesta Western blotilla ja IHC-P:llä ihmisestä peräisin olevilla proteiineilla. Abcamin toinen RCOR2 vasta-aine ab113826 on testattu Western blotilla hiirestä lähtöisin olevilla proteiineilla. Sigman RCOR2 vasta-aine on testattu Western blotilla ihmisestä peräisin olevilla proteiineilla.

Testimateriaalina toimii neljä eri solulinjaa. Pääasiallisina solulinjoina toimivat HEK293T-solut. Kahteen niistä on virusten välityksellä suoritettavalla geeninsiirrolla (transduktiolla) liitetty plasmidit, joista toisessa on RCOR2-ekspressiovektori. Neljäs on MC3T3-E1 hiiren osteoblastisolulinja, joissa RCOR2-proteiinia esiintyy luonnostaan.

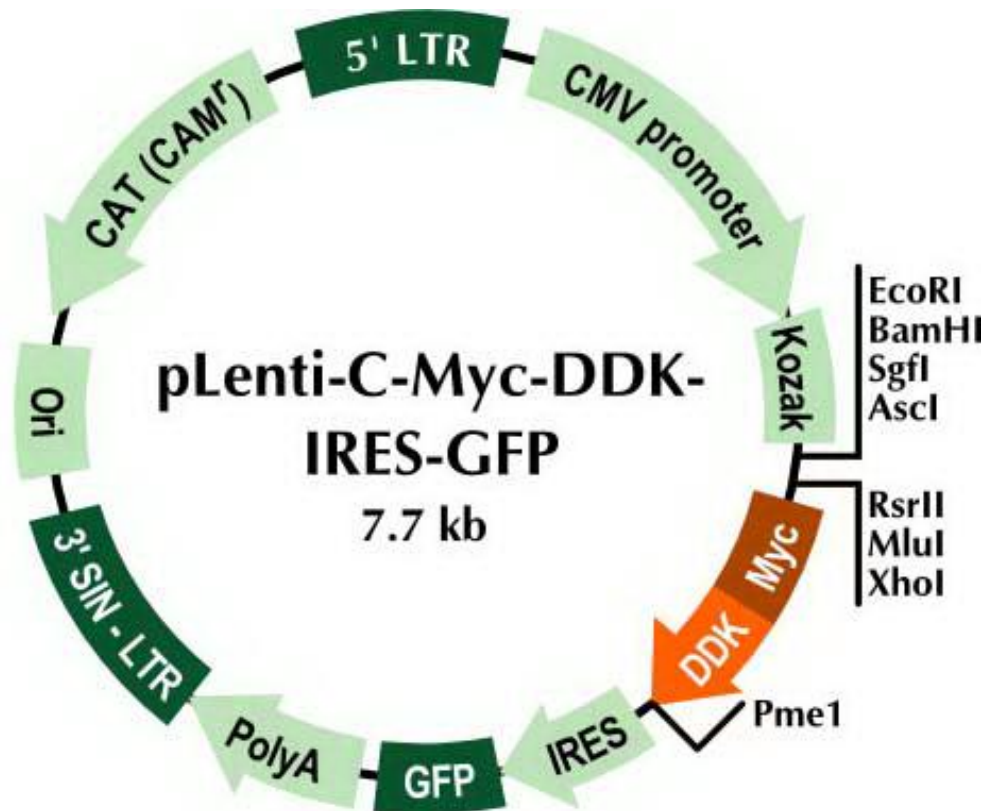
2 TEORIA

Tässä osiossa käydään lyhyesti läpi työhön liittyvien menetelmien perusteita.

2.1 Solut

Kokeissa käytettiin lähinnä HEK293T-soluja. HEK tulee sanoista human embryonic kidney eli kyseiset solut ovat ihmisen alkioasteella olevia munuaissoluja. HEK293T on HEK293-soluista johdettu versio mihin on lisätty SV40 large T-antigeeni, jonka on havaittu auttavan vektorien tuotannossa joillain virusvektoreilla (NGVB 2015). Vektorilla tarkoitetaan DNA-molekyyliä, joka monistuu solussa itsenäisesti muusta geenimateriaalista riippumatta (Pärssinen ym. 2012, 174). Myös tässä kokeessa on kahteen solulinjaan viety lentiviruksella tietyt plasmidit. Virustransduktiot oli suoritettu Turun Yliopistolla tutkimusryhmän toimesta, ennen kuin aloitin opinnäytetyöni tekemisen.

Hyvä keino tutkia uusia proteiineja on tehdä niitä ylituottava solulinja. Soluihin HEK-pRCOR2 on viety pLenti-RCOR2 plasmidi lentiviruksen avulla. Tuloksissa esiintyvät solulinjat HEK-pRCOR2 high ja HEK-pRCOR2 medium eroavat toisistaan vain siinä, että high tuottaa enemmän RCOR2-proteiinia. HEK293T pLenti on solulinja, johon on lentiviruksella siirretty pLenti-Empty plasmidi.



Kuva 2 Lentivirustransduktioissa käytetty Origenen toimittama plasmidi. (Origene 2015)

Kuvassa 2 näkyvä plasmidi vastaa HEK293T pLenti:ssä olevaa plasmidia. RCOR2-versioissa kuvassa näkyvien SgfI- ja MluI-restriktiokohtien väliin on liitetty RCOR2:n cDNA. Vektorissa oleva Myc-DDK merkki liittyy suoraan cDNA:n perään, joten sekä Myc:lle, että DDK:lle tehtyjä vasta-aineita voidaan käyttää konstruktion havaitsemiseen. DDK ja FLAG ovat saman peptidin kaupallisia nimiä, siksi tuloksissa esiintyy FLAG-vasta-aineella suoritettuja testejä. Tällaiset merkkiaineet ovat erityisen tärkeitä etenkin uusia ja tuntemattomia proteiineja tutkittaessa, sillä niille ei välttämättä ole olemassa spesifisiä kaupallisia vasta-aineita tai ne eivät toimi kaikissa sovelluksissa.

Lentivirustransduktiossa virus siirtää plasmidin kohteeseen, eli tässä tapauksessa HEK293T-soluun, ja se integroituu osaksi solun genomia eli sitä voidaan nimittää stabiiliksi yliekspressioksi. Geenיאaines siirtyy aina solunjakaantumisessa mukana.

2.2 Soluviljely

Soluviljelytekniikat mahdollistavat solujen tutkimisen *in vitro*. Tärkeimmät seikat soluviljelyssä on steriili ympäristö, riittävästi ravinteita, tasainen pH ja oikea lämpötila.

Kasvatusmediumeissa on hyvin paljon valinnanvaraa. Paljon käytettyjä ovat eri versiot MEM:stä kuten DMEM, α MEM ja GMEM. Sitten löytyy myös mediuumeita olosuhteisiin, joissa ei ole CO₂:ta tai ei haluta seerumia kasvatusliuokseen sekä paljon muuta. (Sigma-Aldrich 2015)

HEK293T-soluille on kasvatuslämpötilana 37 °C ja CO₂-pitoisuus inkubaattorissa on 5 %. (Dharmacon™ 2015)

2.3 Western blot

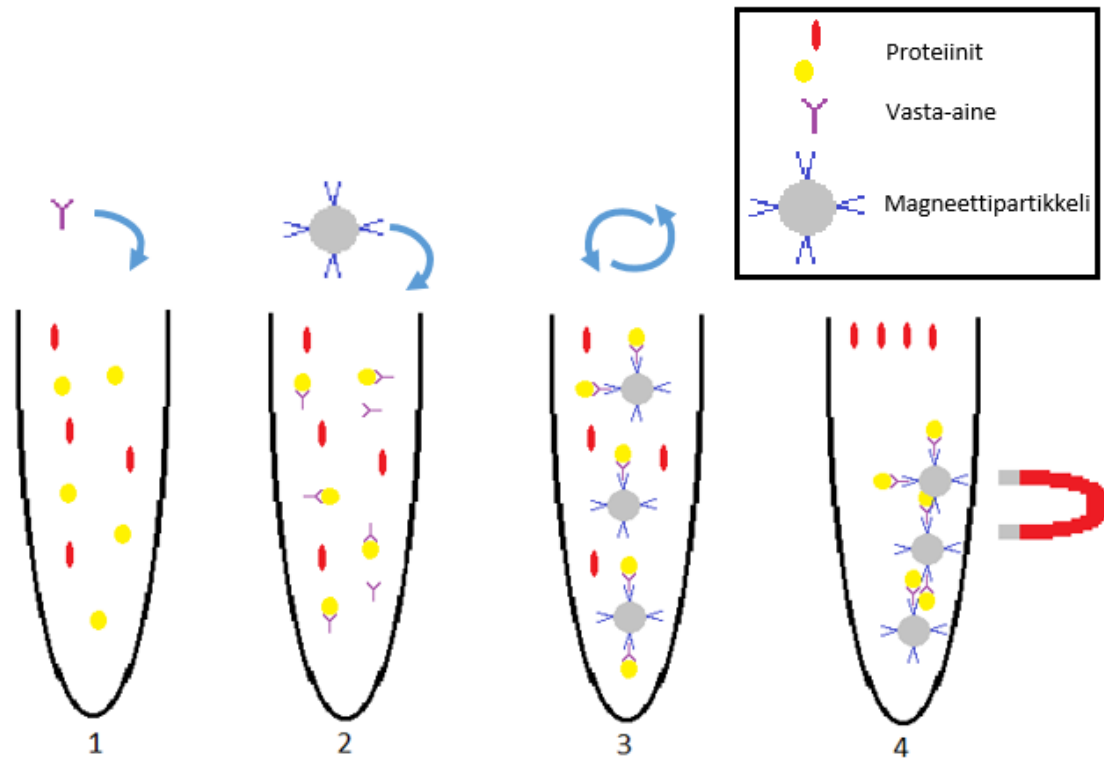
Western-tekniikalla voidaan tutkia ja tunnistaa proteiineja. Tunnistamiseen käytetään tutkittavaan proteiiniin spesifisesti kiinnittyviä vasta-aineita. Ennen varsinaista vasta-aineiden käyttöä täytyy proteiinit erotella toisistaan ja tähän käytetään yleisesti SDS-PAGE-menetelmää. Proteiinien erottelu tapahtuu koon mukaan kun ne kulkeutuvat polyakryyliamidigeelin läpi sähköjännitekentässä. Ennen geeliajoa proteiinit denaturoidaan, mikä hajottaa niiden kolmiulotteisen rakenteen (Ninfa ym. 2010, 165). Proteiinit siirrostetaan geeliltä kalvolle eli membraanille, joka on usein valmistettu joko nitroselluloosasta tai PVDF:stä, kuten tässä työssä.

Kalvoja uitetaan liuoksessa, joka koostuu TBST:stä ja sisältää 5 % rasvatonta maitojauhetta, toimenpidettä kutsutaan blokkaukseksi. Siinä membraanin käyttämättömät kuopat täytetään proteiineilla, jotka eivät häiritse määritysmenetelmää. Blokkauksen jälkeen lisätään ensin primäärinen vasta-aine, joka ollessaan monoklonaalinen tarttuu vain tiettyyn kohtaan antigeenissä, jota kutsutaan epi-toopiksi, membraanin pinnassa. Membraani huuhdellaan ja tehdään samanlainen TBST:n ja maitojauheen seos ja tällä kertaa pipetoidaan sekundäärinen vasta-aine, joka kiinnittyy primäärivasta-ainemolekyyleihin. Sekundääriset vasta-aineet tehdään usein polyklonaalisiksi, joten ne tarttuvat mihin tahansa tietyissä

lajissa valmistettuihin vasta-aineisiin. Oletetaan vaikka, että primäärinen vasta-aine on valmistettu hiiressä, joten siihen voidaan käyttää esimerkiksi kanissa valmistettuja anti-hiirivasta-aineita. Nämä polyklonaaliset sekundääriset vasta-aineet myös leimataan käyttämällä esimerkiksi entsyymileimaa. Yleisesti käytettävät entsyymit ovat piparjuuriperoksidaasi ja alkaalinen fosfataasi. Näille entsyymeille on kehitetty substraattiyhdisteitä, joilla saadaan aikaiseksi esimerkiksi värin vaihtumista, valoa tai fluoresenssia (Pärssinen ym. 2012, 106-109). Hyödyntämällä ECL-tekniikkaa saadaan tulokset kehitettyä röntgenfilmille.

2.4 Immunopresipitaatio

Immunopresipitaatio on menetelmä, jolla voidaan eristää proteiineja tai proteiini-komplekseja näytteistä. Menetelmässä on muutama eri vaihe (kuva 3), joista ensimmäisessä näytteeseen laitetaan vasta-ainetta, joka sitoutuu kohdeproteiiniin. Sitten tämä kompleksi saadaan kiinnittymään tietyllä proteiinilla (yleensä proteiini A tai G) päällystettyyn partikkeliin. Partikkeli eristetään ja siihen kiinnittyneet proteiinit voidaan analysoida (Abcam 2015).



Kuva 3 Immunopresipitaation prosessikaavio. 1) Vasta-aine lisätään koeputkeen, jossa näytettä. 2) Vasta-aine on kiinnittynyt tiettyyn proteiiniin, lisätään proteiini G:llä päällystetyt magneettipartikkelit. 3) Sekoitetaan putkea +4 °C:ssa, jotta vasta-aineproteiinikompleksit kiinnittyvät partikkeleihin. 4) Magneetilla saadaan magneettipartikkelit eroteltua ja supernatantin poistamalla päästään ylimääräisistä proteiineista eroon.

Immunopresipitaation lopputulos analysoidaan SDS-PAGE:lla ja Western blot-menetelmällä.

3 TYÖN SUORITUS

3.1 Soluviljely

Soluviljely tapahtui sille varatussa omassa tilassa, missä jokaisella on omat työtakkinsa ja missä käytetään kenkäsuojia. Inkubaattorin olosuhteet oli säädetty niin, että lämpötila oli 37 °C ja hiilidioksidipitoisuus oli 5 %. Inkubaattorina käytössä oli Sanyo MCO-20AIC ja laminaarivirtauskaapit olivat Kojair Tech Oy:n BLOWIZARD-malleja.

3.1.1 Viljelmän aloitus

Solut oli ennen viljelyn aloitusta nestetyypeen säilötyinä noin 2 ml:n pakastusampulleissa. Soluampullia lämmitettiin sisällön sulamispisteeseen 37 °C:een lämpöhauteessa ja sulamisen jälkeen sisältö pipetoitiin solukasvatuspulloon. Kasvatusmediumina toimi DMEM (+ antibiootti (penisilliini 10000 U/ml & streptomysiini 10000 U/ml, Lonza DE17-602E) + 10 % FBS). Soluja viljeltiin ja ylläpidettiin 75 cm² solukasvatuspulloissa (Thermo Scientific Biolite 75 cm² Flask Vented).

3.1.2 Solujen jako

Kun solut olivat kasvaneet noin 80 % konfluenteiksi, ne jaettiin. Vanha medium kaadettiin pois, minkä jälkeen solut varovasti huuhdeltiin PBS:llä (natriumkloridi 139 mM, dinatriumvetyfosfaattidihydraatti 8 mM, natriumdivetyfosfaattihydraatti 2 mM). Seuraavaksi pipetoitiin 2,5 ml trypsiiniä (TRYPSIN 0,02 % K-EDTA) ja annettiin vaikuttaa noin kymmenen minuuttia 37 °C:n inkubaattorissa. Solujen irrottua pipetoitiin sama määrä mediumia kuin trypsiiniä ja kerättiin solut 15 ml:n Falcon-putkeen. Putkea sentrifugoitiin 4 min 300 x g. Suspensoitiin pelletti mediumiin. Lopuksi solut laskettiin automaattisella solulaskurilla (BIO-RAD TC10™ Automated Cell Counteri), jotta saatiin haluttu jakosykli luotua.

3.1.3 Näytteen valmistelu

Näytteiden keräämistä varten soluista tehtiin viljelmät 10 cm:n petrimaljoille. Pipetoitiin 9 ml 37 °C:een esilämmitettyä kasvatusmediumia maljalle. Seuraavaksi pipetoitiin haluttu määrä soluja maljalle. Määrä vaihteli 300 000:sta kahteen miljoonaan soluun maljalla.

3.1.4 Solujen keräys

Kun 10 cm:n maljat olivat lähes konfluentteja, aloitettiin solujen talteen otto. Solumaljoja pidettiin jäällä koko operaation ajan. Ensin maljoilta poistettiin kasvatusmedium. Solut pestiin pipetoimalla kaksi kertaa kylmää PBS:ää maljalle varoen irrottamasta soluja. Seuraavaksi pipetoitiin haluttu määrä hajotuspuskuria (ks. Liite 1). Solut kaavittiin maljalta ja siirrettiin Eppendorf-putkiin. Putkia sentrifugoitii täydellä nopeudella (noin 16100 g) ja supernatantit siirrettiin uusiin putkiin ja pakastettiin.

3.2 Proteiinin mitta

Proteiinipitoisuudet näytteiden välillä tulee tasata jotta saadaan vertailukelpoisia tuloksia. Mittaamiseen käytettiin BIO-RAD Protein Assay -reagenssia (BIO-RAD Protein Assay Dye Reagent Concentrate). Se laimennetaan 1:5 suhteella ennen käyttöä. Eppendorf-putkiin pipetoitiin 1 ml laimennettua reagenssia ja 2 µl näytettä. Putkia sekoitettiin vortex-laitteella ja 5 minuutin jälkeen sisällöt siirrettiin kyvetteihin. Tehtiin myös yksi taustakyvetti (blank), jossa pelkkää laimennettua reagenssia.

Mittaus suoritettiin Beckman DU-640 fotometrillä aallonpituudella 595 nm. Tausta poistettiin taustakyvetillä ja mitattiin näytteet. Menetelmä perustuu siihen, että tehdään Bradford-proteiinimääritys (Liite 2) ja standardisuoraan (kuva 9) verrataan tuloksia. En kuitenkaan itse tehnyt standardisuoraa sillä se on tehty niin useasti Turun yliopistolla tutkimusryhmän ja muiden toimesta, että sen on todettu olevan lineaarinen 0,5 absorbanssiin asti. Tästä on tehty johtopäätös, että jos

tulokset ovat lineaarisella alueella, niin tulos voidaan lukea suoraan absorbanssista, tosin pilkkua joutuu siirtämään yhden oikealle, jotta päästään $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -yksikköön. Tarkasti tehtynä absorbanssia pitäisi verrata lineaarisen alueen suoran kaavaan eli tässä tapauksessa $y = 0,0997x - 0,024$ (kuva 10). Proteiinipitoisuudet eivät siis menetelmän johdosta ole täsmällisen tarkkoja, mutta tarkan pitoisuuden tietäminen ei ole välttämätöntä kun tarkoitus on tasata eri näytteiden proteiini-määrät keskenään.

3.3 Geelien valaminen

Valoin omat geelini eri testejä varten 1-2 päivää aikaisemmin kuin itse geeliajo. Se helpottaa valmistautumista ja pitää työn aikataulussa sillä geelivalun yhteydessä voi esiintyä ongelmia kuten alageeli onkin vuotanut lasien välistä sillä aikaa kun se on jätetty jähmettymään. Kaupallisia valmiita geelejä käytettäessä ongelmia ei pitäisi esiintyä. Geelit valetaan kahden lasin väliin, jotka asetetaan tarkoitusta varten olevaan telineeseen. Käyttämäni geelit olivat 1,5 mm paksut ja kymmenelle näytteelle sopivat.

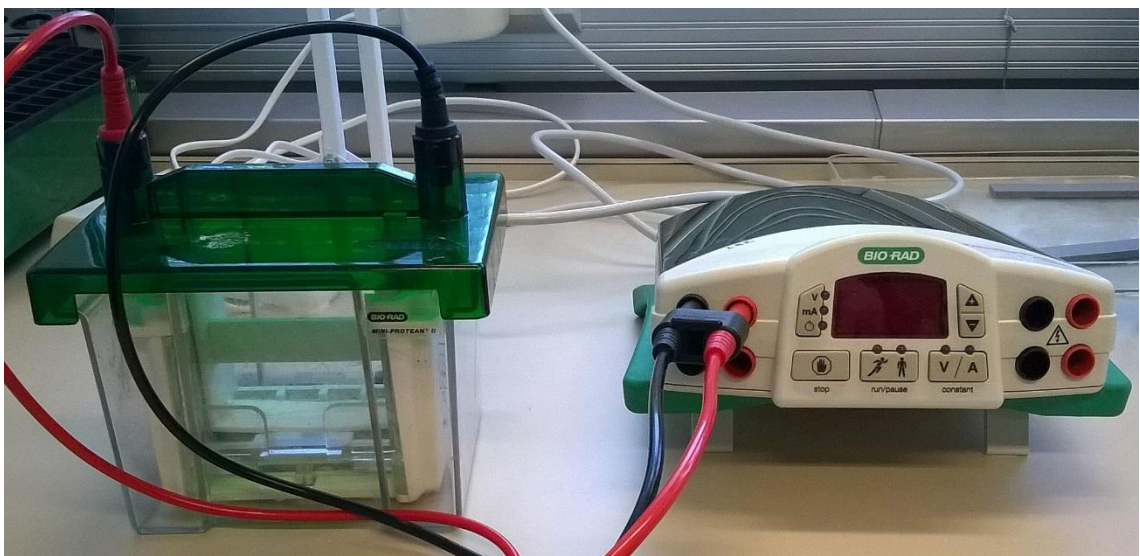
Geeli valettiin kahdessa osassa: ensin alageeli-liuos kaadettiin muottiin, suihkuttettiin pinnalle 70 % etanolia, joka painaa geelin tasaiseksi sekä poistaa mahdolliset ilmakuplat ja odotettiin geelin jähmettymistä. Geelin jähmetyttyä alkoholi kaadettiin pois ja pinta kuivattiin imupaperilla. Seuraavaksi kaadettiin ylägeeli ja asetettiin kampa paikalleen, mikä loi kaivot näytteitä varten. Jähmettymisen jälkeen käärin geelit käänteisosmoosiveteen kastettuun paperiin ja laitoin paketin minigrip-pussiin jääkaappiin odottamaan käyttöä. Tarkempia geelin koostumuksia varten katso Liite 1.

3.4 Geelin lataus ja ajo

Otettiin tarvittava määrä solu-uutetta (lysaattia) uusiin Eppendorf-putkiin. Yleensä 30 μl laimeinta solu-uutetta ja sen pitoisuuden mukaan laskettuna muita näytteitä sama μg määrä ja tilavuus tasattiin 30 μl :aan lisäämällä mRIPA-puskuria (Tris pH 7,4 50 mM, NP-40 0,5 %, natriumdeoksikolaatti 6 mM, natriumkloridi 150 mM).

Tämän lisäksi putkiin pipetoitiin 10 µl 6 x SDS-näytepuskuria (Liite 1). Korkkeihin tehtiin neulalla reiät, jotta lämpö ei avaisi niitä kun putkia lämmitettiin 105 °C:een säädetyssä lämpöblokissa 5 minuuttia.

Geelilaitteistona toimi BIO-RAD PowerPac™ Basic (Kuva 4). Geelit asetetaan telineeseen joko kaksi kerrallaan tai käytetään muovista vastinkappaletta yhtä geeliä ajettaessa. Nämä muodostavat veden pitävän kammion keskelle, neste peittää johdinlangan eikä ajopuskuria (Tris 25 mM, glysiini 192 mM, SDS 3,5 mM) kulu niin paljon koska koko ajoallasta ei tarvitse täyttää.



Kuva 4 BIO-RAD PowerPac™ Basic koottuna ilman geelejä

Geelit ladataan pitkillä geelikärjillä, joiden päät ovat hyvin ohuet ja mahdollistavat sen, että kärjen saa mahtumaan lasien väliin geelin kaivoihin. Reunimmaiseen käytettyyn kaivoon ladattiin aina 5 µl standardia (BIO-RAD Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) ja sen viereen näytteet halutussa järjestyksessä. Näytteet ajettiin geeliin käyttämällä 100 V 15 minuutin ajan ja sen jälkeen jännite nostettiin 150 V:iin. Näytteitä ajettiin kunnes sininen väriaine oli edennyt geelin alareunaan asti.

3.5 Transferointi eli siirto

Transferoinnissa proteiinit siirretään geeliltä membraanille (PVDF). PVDF:n hydrofobisuudesta johtuen se pitää kastaa ensin metanoliin, sitten veteen ja lopuksi siirtopuskuriin (ks. Liuokset).

Ajon jälkeen purettiin geeli, irrotettiin toinen lasi ja leikattiin ylägeeli irti. Kasetti koottiin seuraavassa järjestyksessä.

- Kasetin musta puoli (astian pohjalla missä siirtopuskuria)
- Karhunkieli
- Imupaperi
- Geeli
- PVDF-membraani
- Imupaperi
- Karhunkieli
- Kasetin vaalea puoli

Lopuksi kasetti suljettiin ja siirrettiin ajoaltaaseen. Ajoaltaan pohjalle tuli magneettisauva ja ajoallas siirrettiin kylmähuoneeseen magneettisekoittajan päälle sekä täytettiin siirtopuskurilla (Tris 25 mM, glysiini 192 mM, metanoli 20 %). Sekoitusta käyttäen siirtäminen suoritettiin 110 V:n jännitteellä, jolla siirtymiseen meni noin 1h 15 min. Siirron jälkeen kasetti purettiin ja membraani siirrettiin 50 ml:n Falcon-putkiin missä oli 1xTBST:tä (natriumkloridi 150 mM, Tween 20 (0,05 %), Tris 10 mM pH 7,5) ja laitettiin se jääkaappiin odottamaan jatkotoimenpiteitä.

3.6 Western blottaus

Membraani, jolle oli ajettu näytteet standardi, HEK293T, HEK293T pLenti, HEK293T-pRCOR2 medium, HEK293T-pRCOR2 high ja MC3T3-E1 suoritettiin aluksi blokkauksella lisäämällä 5 ml blokkia. (5 % maitojauhe 1 x TBST:ssä). Membraani oli 50 ml:n Falcon-putkessa proteiinipuoli keskelle päin ja sitä pidettiin rullilla pyörimässä huoneen lämmössä yksi tunti. Tämän jälkeen blokkia poistettiin 2 ml ja pipetoitiin 3 µl primäärivasta-ainetta eli sitä tuli 1:1000 blokkiin. Vastainta pidettiin yön yli pyörityksessä kylmähuoneessa.

Seuraavana päivänä primäärinen vasta-aineliuos poistettiin ja membraani huuhdeltiin 3 x 10 min 1 x TBST-liuoksella pitämällä putkea rullilla huoneen lämmössä. Membraani blokattiin uudelleen, sekundääristä vasta-ainetta suhteessa 1:5000 (anti-rabbit IgG HRP-linked). Sekundäärisen vasta-aineen annettiin vaikuttaa noin 45 minuuttia huoneen lämmössä Falcon-putkessa ollessa rullilla pyörimässä. Lopuksi pesut 3 x 10 min 1 x TBST:llä.

Taulukko 1 Käytetyt primääriset- ja sekundääriset vasta-aineet

Käytetty primäärinen vasta-aine Westernissä	Käytetty primäärinen vasta-aine IP:ssä	Käytetty sekundäärinen vasta-aine
RCOR2 (Sigma)	RCOR2 (Sigma)	anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)
RCOR2 ab37113 (abcam)	RCOR2 ab37113 (abcam)	anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)
RCOR2 ab113826 (abcam)	RCOR2 ab113826 (abcam)	anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)
Monoclonal ANTI-FLAG® M2-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich)	Monoclonal ANTI-FLAG® M2 (Sigma-Aldrich)	
	Myc-Tag Antibody	anti-rabbit IgG HRP-linked
β-aktiini		anti-mouse IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)
	normal mouse IgG (Santa Cruz)	anti-mouse IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)
	normal rabbit IgG (Santa Cruz)	anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell Signaling Technology)

3.6.1 Kehitys

Kehitysluoksina toimivat Supersignal™ West Pico- ja Supersignal™ West Femto-kitit, joista jälkimmäinen on paljon herkempi ja sen liuoksia laimennettiin Pico-kitin liuoksiin suhteessa 1:4. Kitit sisältävät kahta eri liuosta, jotka sekoitetaan yhteen ennen käyttöä. Työssä käytettiin 2 ml sekoitusta membraania kohden. Liuokset ovat Luminol/Enhancer ja Stable Peroxide Buffer.

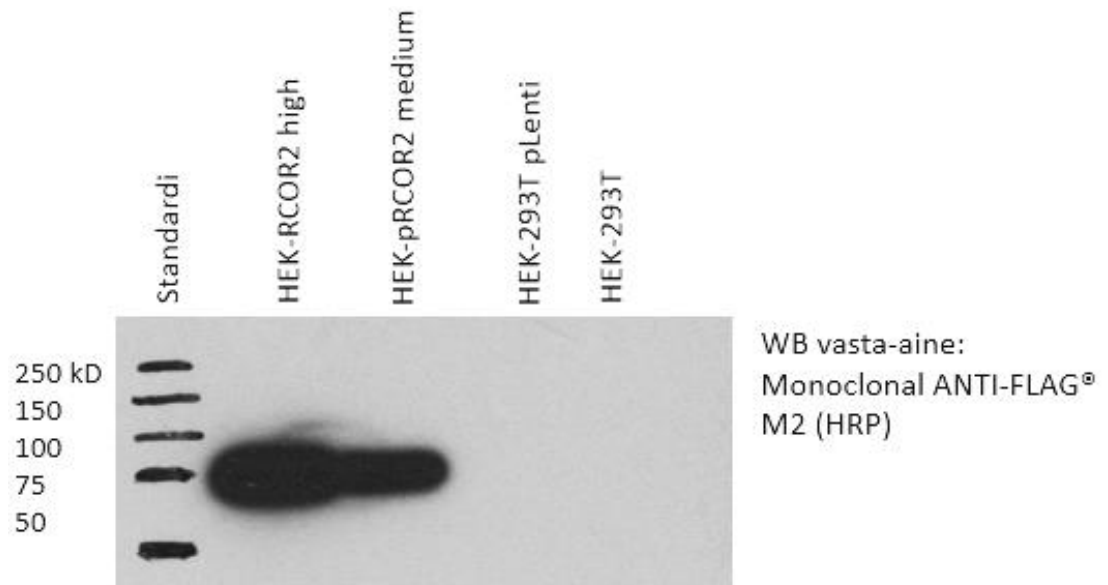
Western blotin membraani inkuboitin kehitysreagenssissa 5 minuuttia. Membraani laitettiin sen jälkeen kahden muovikalvon väliin röntgenfilmejä varten tehtyyn metalliseen kasettiin. Kasetti vietiin pimiöön ja membraani otettiin röntgenfilmille valotuksia eri valotusajoilla, kunnes selkeä kuva saatiin aikaiseksi.

3.7 Immunopresipitaatio

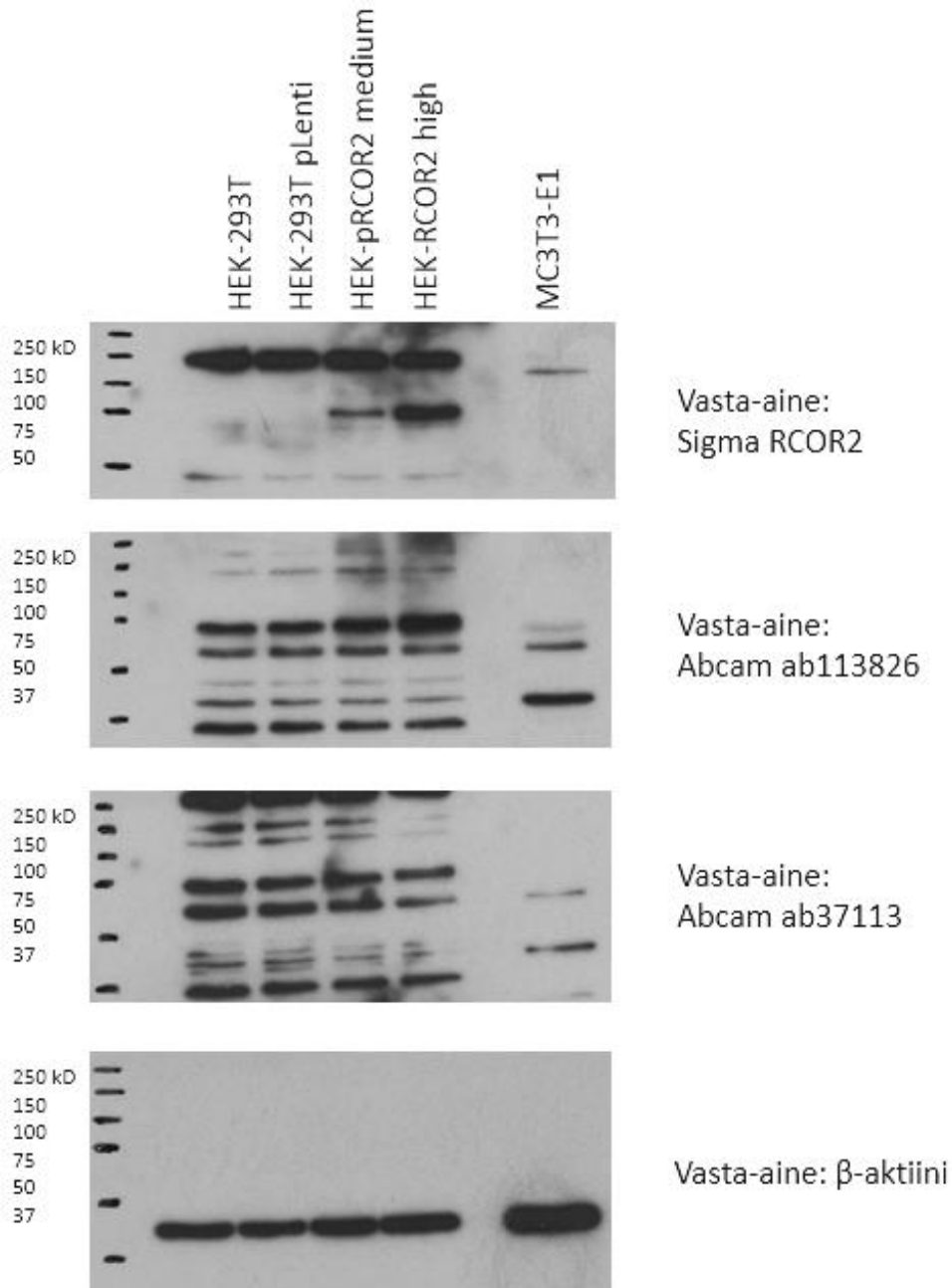
Työssä käytettiin Dynabeads® Protein G (Invitrogen) magneettipartikkeleita. Partikkelit blokattiin BSA-PBS-liuoksella (5 mg/ml BSA). Tehtiin rinnakkaisia Eppendorf-putkia, joihin pipetoitiin testikerrasta riippuen 200 – 600 µg näytettä ja tasattiin tilavuus hajotuspuskurilla (RIPA + leupeptiini 10 µg/µl, pepstatiini 10 µg/µl, aprotiini 1 µg/µl, PMSF 1 mM, natriumortovanadaatti 2 mM) 1 ml:aan. Lisättiin vasta-aineita 3 µg/putki ja inkuboitin yön yli + 4 °C:ssa.

Lisättiin blokattuja Dynabeadeja 20 µl joka putkeen. Inkuboitin tunti + 4 °C:ssa pyörityksessä. Magneettipartikkelit erotettiin sitä varten olevalla telineellä jäällä ja pestiin 5 kertaa hajotuspuskurilla (RIPA + PMSF 1mM, natriumortovanadaatti 2mM). Pesujen jälkeen partikkelit keitettiin yhdessä 25 µl 2 x SDS latauspuskurin kanssa. Keitto irrottaa näyteproteiinit partikkeleista, minkä jälkeen ne poistetaan ja näytteet ajetaan geelille.

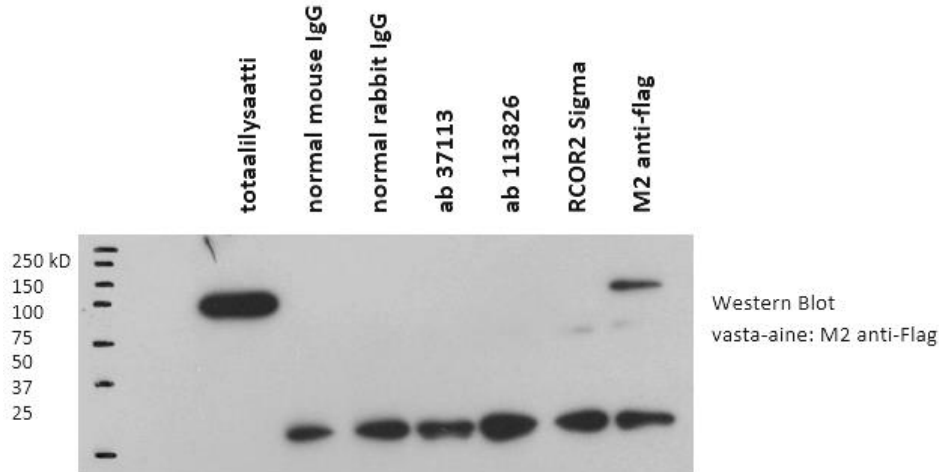
4 TULOKSET



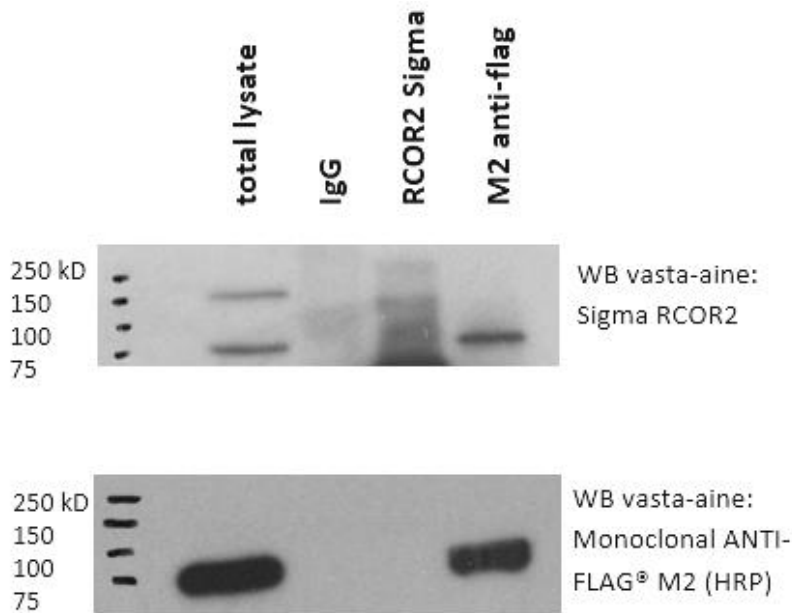
Kuva 5 Kuva western blottauksesta, jossa vasta-aineena käytettiin FLAG (DKK) -merkin tunnistavaa vasta-ainetta. Tällä saatiin selville kohdeproteiinin koko spesifisiä vasta-ainetestejä varten. Proteiinia on 78 μ g näytettä kohden, kehitysaika 5 min.



Kuva 6 Rinnakkaiset tulokset totaalisolulysaateista. Samalle membraanille suoritettiin Western blottaus eri vasta-aineilla. Vain Sigman tuote antoi halutun tuloksen, muilla vasta-aineilla esiintyi epäspesifisiä bändejä 75 kD:n alueella. Kontrollina tehdystä β -aktiinin mittaamisesta nähdään, että ladattuja proteiineja oli suurin piirtein sama määrä. Geelille on ladattu proteiinia 66 μ g näytettä kohden. Valotusajat ylhäältä alaspäin: 5 min, 5 s, 1 min ja 1 min.



Kuva 7 Immunopresipitaatio suoritettuna eri vasta-aineilla. Mukana myös totaali-solulysaattinäyte verrokkina. Vain Flag-tunnisteseen reagoiva vasta-aine toimi tässä IP-kokeessa. Geelille on ladattu totaali-lysaattinäytettä 76 μ g ja IP-reaktioihin käytettiin 395 μ g proteiinia näytettä kohden. Kehitysaika 23 min. Solulinja IP-reaktioissa HEK-pRCOR2 medium.



Kuva 8 Immunopresipitaatio uudelleen suoritettuna, tällä kertaa kiinnittäen vasta-aineet ensin magneettipartikkeleihin. Samalle membraanille tehty rinnakkais-määritys kahdella eri vasta-aineella. Sigman RCOR2-vasta-aine oli ainut, joka toimi totaalisolulysaattien WB:ssä, minkä johdosta sitä testattiin uudestaan IP:ssä. Geelille on ladattu totaali-lysaattinäytettä 89 μ g ja IP-reaktioihin käytettiin 590 μ g proteiinia näytettä kohden. Kehitysaikat 1 s ja 1 min. Käytetty solulinja HEK-pRCOR2 high.

5 PÄÄTELMÄT

Solut tuottivat oletetusti RCOR2-proteiinia, mikä havaittiin tutkimalla näytteitä Myc-DKK tagin tunnistavan vasta-aineen kanssa Western blotissa. Tällä kokeella saatiin myös tietää proteiinin koko, johon muista testeistä saatavia vyöhykkeitä tiesi verrata.

Kolmesta RCOR2-proteiinille tehdystä kaupallisesta vasta-aineesta yksi, Sigman valmistama, osoitti toimivuutta totaalisolulysaattien kanssa. Abcamin vasta-aineista toisessa 113826:ssa näyttää siltä kuin vyöhykkeet olisivat hieman vahvemmat oikeassa kohtaa, mutta koska samassa kokoluokassa näkyy joka näytteessä epäspesifisiä vyöhykkeitä, ei sillä ole mitään merkitystä. Huomioon otettavaa on, ettei yksikään vasta-aine havainnut endogeenistä RCOR2:ta E1-soluista. Endogeenisenä esiintyessään sen koko saattaisi hieman poiketa plasmidilla tuotetuista, koska siitä puuttuisi merkkiaineet, mutta varteenotettavaa vyöhykettä ei tuloksissa havaittu.

Immunopresipitaatiossa yksikään RCOR2-vasta-aine ei toiminut, vaan tulos saatiin vain FLAG:in tunnistavalla vasta-aineella. Lopputulos on silläkin heikko, koska totaalisolulysaatti antaa paljon selkeämmän vyöhykkeen ja IP:n pitäisi niminomaan vahvistaa tulosta. Syynä tähän saattaa olla se, että pelkällä Westernillä testatut totaalisolulysaattinäytteet aina denaturoidaan, mikä purkaa niiden kolmiulotteisen rakenteen. IP:ssä taas vasta-aineet eivät välttämättä pääse käsiiksi haluttuihin antigeeneihin johtuen proteiinin 3D-muodosta.

Jatkotoimenpiteinä, mikäli testejä haluisi tehdä vielä perinpohjaisemmin, voisi olla esimerkiksi proteiinimäärän kasvattaminen näytteissä. Koska, endogeenistä RCOR2:ta ei onnistuttu havaitsemaan, tulisi etenkin siihen panostaa lisää. MC3T3-E1-solut eivät välttämättä ole paras lähde kyseiselle proteiinille, joten solulinjan vaihtaminen toiseen voisi tulla kyseeseen. Koska RCOR2-proteiini oletetavasti esiintyy tumassa, voitaisiin ne eristää soluista ja keskittyä niiden analysointiin.

LÄHTEET

RCSB Protein Data Bank 2015. 2V1D (Viitattu 13.11.2015) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2v1d&biomolecule=1&jmolMode=HTML5>

Forneris, F.; Binda, C.; Battaglioli, E.; Mattevi, A. 2008. LSD1: oxidative chemistry for multifaceted functions in chromatin regulation. Trends in Biochemical Sciences Vol. 33, Issue 4, 4/2008, 181-189

Foster, C.T.; Dovey, O.M.; Lezina, L.; Luo, J.L.; Gant, T.W.; Barlev, N.; Bradley, A.; Cowley, S.M. 2010. Lysine-Specific Demethylase 1 Regulates the Embryonic Transcriptome and CoREST Stability. Molecular and Cellular Biology, 8/2010, 4851-4863

Sáez, J.E.; Gómez, A.V.; Barrios, A.P.; Parada, G.E.; González, M.; Andrés, M.E. 2015. Decreased Expression of CoREST1 and CoREST2 Together with LSD1 and HDAC1/2 during Neuronal Differentiation. PLOS ONE, 6/2015

Yang, P.; Wang, Y.; Chen, J.; Li H.; Kang, L.; Zhang, Y.; Chen, S.; Zhu, B.; Gao, S. 2011. RCOR2 Is a Subunit of the LSD1 Complex That Regulates ESC Property and Substitutes for SOX2 in Reprogramming Somatic Cells to Pluripotency. Stem Cells, 5/2011, 29, 791-801

NGVB 2015. HEK293T Reagent Information. (Viitattu 28.9.2015) <https://www.ngvbcc.org/ReagentRepositoryDetailView.action;jsessionid=46901A47B0471367A679BB57CA1F6017?reagentId=7>

Pärssinen, R.; Suominen, I.; Haajanen, K. 2012. Biogeeni Ammatillista biokemiaa ja geeniteknikkaa. Tampere: Juvenes Print

Origene 2015. Lenti vector with bicistronic IRES-GFP. (Viitattu 10.9.2015) http://www.origene.com/destination_vector/PS100070.aspx

Ninfa, A.J.; Ballou, D.P.; Benore, M. 2010. Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Sigma-Aldrich 2015. The Cell Environment (including types of culture medium). (Viitattu 5.10.2015) <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/the-cell-environment.html>

Dharmacon 2015. HEK293T Cell Line Cat. #HCL4517. (Viitattu 26.10.2015) <http://dharmacon.gelifesciences.com/uploadedFiles/Resources/tla-hek293t-cell-line-manual.pdf>

Abcam 2015. An Introduction to Immunoprecipitation with Troubleshooting Tips Webinar. (Viitattu 15.9.2015) <http://www.abcam.com/webinars/introduction-to-immunoprecipitation-and-troubleshooting-webinar>

Käytetyt reagenssit

Alageeli (12 % 1,5-kertainen määrä)

- mQ-H₂O 3,945 ml
- Akryyliamidi 4,5 ml
- 4 x alageelipuskuri 2,82 ml
- 10 % APS 37,5 µl
- Temed 7,5 µl

4 x alageelipuskuri (4 x Tris-HCl/SDS)

- 6,05 g Tris base
- noin 40 ml H₂O
- säädetään pH 6,8 HCl:llä
- ad H₂O 100 ml
- 0,4 g SDS

Ylägeeli (1,5-kertainen määrä)

- mQ-H₂O 2,3 ml
- Akryyliamidi 0,5 ml
- 4 x ylägeelipuskuri 0,95 ml
- 10 % APS 22,5 µl
- Temed 7,5 µl

4 x Ylägeelipuskuri (4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8)

- 91 g Tris base
- noin 300 ml H₂O
- säädetään pH 8,8 HCl:llä
- ad H₂O 500 ml
- 2 g SDS

Hajotuspuskuri 5 ml

- RIPA 5 ml
- PMSF 50 µl
- Na₃VO₄ 50 µl
- Aproitiini 50 µl
- Leupeptiini 5 µl
- Pepstatiini 5 µl
- NaF 10 µl

Siirtopuskuri (3 l)

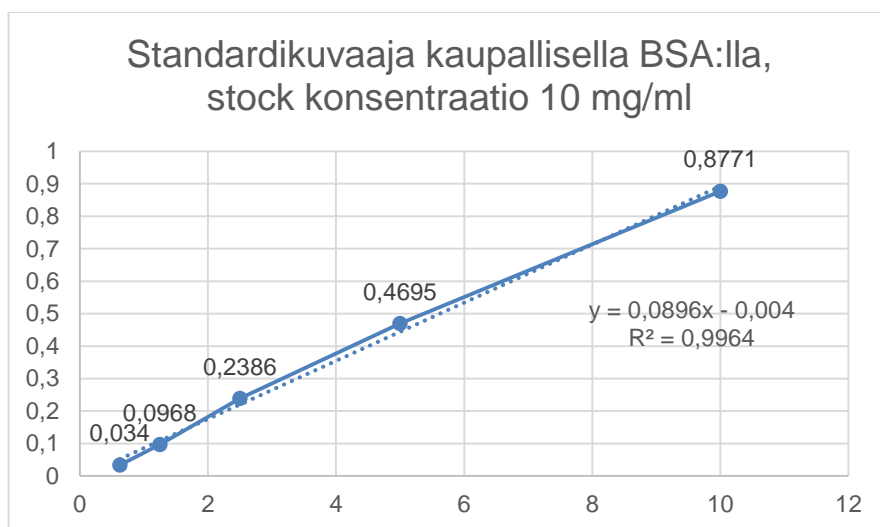
- 9,1 g Tris(hydroksimetyyli)aminometaani
- 43,25 g glysiini
- 600 ml metanolia
- H₂O 3 l asti

6 x SDS-näytepuskuri

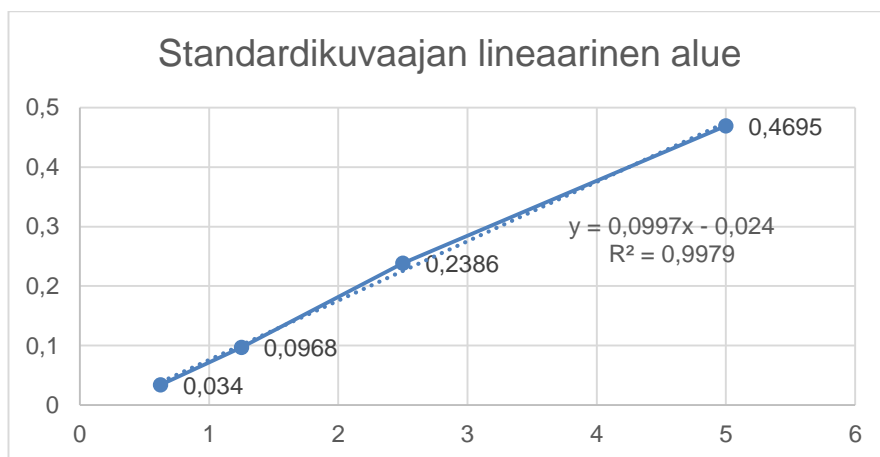
- 7 ml ylägeelipuskuri
- 3 ml glyseroli
- 1 g SDS
- 0,93 g DTT
- 1,2 mg bromphenol blue

Bradford-proteiinimääritys

konsentraatio $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	absorptio
10	0,8771
5	0,4695
2,5	0,2386
1,25	0,0968
0,625	0,034



Kuva 9 Standardisuora. Tekijä Minna Santanen.



Kuva 10 Lineaarinen alue eroteltuna standardisuorasta.