



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KELIAKIA- JA IHOKELIAKIASPESIFISTEN VASTA-AINEIDEN PUHDISTUKSEN OPTIMOINTI

Laura Ahonen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2018
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka

AHONEN, LAURA:

Keliakia- ja ihokeliakiaspesifisten vasta-aineiden puhdistuksen optimointi

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 7 sivua

Lokakuu 2018

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Keliakiatutkimuskeskukselle. Työn tavoitteena oli optimoida seerumista ja ohutsuolen limakalvon koepalan kasvatusmediumista keliakia- ja ihokeliakiaspesifisten transglutaminaasi (TG) 2- ja 3-vasta-aineiden puhdistus ja tämän jälkeen työn tarkoituksena oli käyttää menetelmää keliakia- ja ihokeliakianäytteiden puhdistukseen.

Vasta-aineita puhdistettiin affiniteettikromatografialla. Alkuun näytteiden TG2- ja TG3-vasta-ainepitoisuudet tarkastettiin ELISA:lla ja valittiin ne näytteet, joissa oli korkeat vasta-ainepitoisuudet. TG2- ja TG3-proteiinit biotinyloitiin puhdistusta varten, jonka jälkeen biotinyloiduille näytteille tehtiin SDS-PAGE ja Western blottaus. Näiden avulla todettiin, oliko biotinylointi onnistunut. Affiniteettikromatografiasta otettiin talteen puhdistuksen eluutiot ja niille tehtiin SDS-PAGE ja Western blottaus, sekä ELISA-menetelmän avulla tarkastettiin puhdistettujen vasta-aineiden spesifisyys.

Kaiken kaikkiaan vasta-aineiden puhdistuksen optimointi onnistui hyvin. Muutamaa yksittäistä menetelmää ei saatu toteutettua suunnitellulla tavalla, mutta kokonaistulokseen se ei vaikuttanut. Proteiinikonsentraatiomäärityksen tilalle otettiin käyttöön IgA- ja IgG-ELISA -menetelmät. Vasta-ainepuhdistukset ohutsuolen limakalvon koepalan kasvatusmediumnäytteistä päätettiin lopettaa muutaman testin jälkeen, sillä niiden tulokset olivat matalia ja suurin osa tuloksista jäi määritysrajan alle.

Optimoiduilla menetelmillä tehtiin vasta-ainepuhdistuksia yhteensä 15 eri keliakia- ja ihokeliakiapotilaan seeruminäytteistä. Näiden tulosten perusteella voitiin todeta, että vasta-ainepuhdistuksissa saatiin onnistuneesti puhdistettua keliakia- ja ihokeliakiaspesifisiä TG2- ja TG3-vasta-aineita. Seeruminäytteiden eluutioille pystytään tekemään lisää jatkotutkimuksia massaspektrometrilla.

Asiasanat: keliakia, ihokeliakia, affiniteettikromatografia, tautispesifiset vasta-aineet

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

AHONEN, LAURA:

Optimizing the Purification of the Antibodies Specific for Celiac Disease and Dermatitis Herpetiformis

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 7 pages

October 2018

This thesis was conducted for the Celiac Disease Research Center of the University of Tampere. The aim of the thesis was to optimize the purification of the celiac disease and dermatitis herpetiformis specific transglutaminase (TG) 2- and 3-antibodies from serum samples and organ cultures of small-intestinal mucosal biopsies. The purpose was to use the method for the samples from celiac disease and dermatitis herpetiformis patients.

The antibodies were purified with affinity chromatography. At first the TG2 and TG3 antibody concentrations of the samples were determined by ELISA method. Then the samples with highest antibody concentrations were chosen. The TG2- and TG3-proteins were biotinylated for the antibody purifications and SDS-PAGE and Western blot were then performed for the biotinylated TG2- and TG3-samples. The results showed that the biotinylation was successful. The elutions from the affinity chromatography purifications were stored and tested with SDS-PAGE and Western blot. The specificity of the purified antibodies was verified by ELISA.

All in all, the optimization of the antibody purification was successful. Some methods did not work as planned but that did not influence the final results. The IgA- and IgG-ELISA methods were used instead of determination of protein concentration. Antibody purifications of the organ culture of small-intestinal mucosal biopsies were discontinued after few experiments because the results were so low.

The antibody purifications were performed using the optimized methods on 15 serum samples from celiac disease and dermatitis herpetiformis patients. Based on the results, it was found that the purification of celiac disease and dermatitis herpetiformis specific TG2- and TG3-antibodies was successful. The purified elutions of serum samples can be further researched with mass spectrometry.

Key words: celiac disease, dermatitis herpetiformis, affinity chromatography, disease-specific antibodies

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEORIA	7
2.1	Keliakia	7
2.2	Ihokeliakia	8
2.3	Vasta-aineet	10
2.4	Biotinylointi	11
2.5	SDS-PAGE, Western blottaus ja immunodetektiio	12
2.6	Vasta-ainepuhdistus ja affiniteetikromatografia	14
2.7	ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys)	15
3	OPTIMOINNIN SUORITUS	16
3.1	Näytteet	17
3.2	Biotinylointi, SDS-PAGE ja Western blottaus	18
3.3	IgA:n SDS-PAGE ja Western blottaus	20
3.4	Vasta-ainepuhdistus affiniteetikromatografialla	23
3.5	Proteiinikonsentraation määrittäminen	25
4	VASTA-AINEPUHDISTUKSEN SUORITUS	26
4.1	Vasta-ainepuhdistus	26
4.2	Eluutioiden analysointi	27
4.2.1	SDS-PAGE ja Western blottaus	27
4.2.2	TG3-vasta-aine-ELISA	27
4.2.3	IgA- ja IgG-ELISA -menetelmät	28
4.3	Puskurinvaihto	30
5	TULOKSET	31
5.1	Biotinyloitujen proteiinien SDS-PAGE:n ja WB:n optimoinnin tulokset	31
5.2	IgA:n SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimoinnin tulokset	33
5.3	Vasta-ainepuhdistuksen optimoinnin tulokset	36
5.4	Proteiinikonsentraatiomäärityksen optimoinnin tulokset	41
5.5	Vasta-ainepuhdistuksen tulokset	42
6	POHDINTA	44
	LÄHTEET	48
	LIITTEET	50
	Liite 1. Taulukko 4. Menetelmissä käytetyt liuokset	50
	Liite 2. Taulukko 5. TG3- ja TG2-vasta-ainepuhdistuksen tulokset	51

LYHENTEET JA TERMIT

BSA	Bovine Serum Albumin, naudan seerumin albumiini
ECL	Tehostettu kemiluminesenssitunnistus
ELISA	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
EmA	Endomysium-vasta-aine
HLA	Human Leukocyte Antigen, ihmisen leukosyyttiantigeeni
HRP	Piparjuuriperoksidaasi
Ig	Immunoglobuliini eli vasta-aine
IgA	Immunoglobuliini A
IgG	Immunoglobuliini G
PBS	Phosphate Buffer Saline, fosfaattipuskuri
TG2	Transglutaminaasi 2
TG3	Transglutaminaasi 3
TBS	Tris Buffered Saline, tris-puskuroitu suolaliuos
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi
WB	Western blottaus

1 JOHDANTO

Keliakia on perinnöllinen autoimmuunisairaus, jonka aiheuttajana on viljojen sisältämä gluteeni. Gluteenin vaikutuksesta ohutsuolen limakalvon suolinukkaan muodostuu tulehdustila. Jatkuvan gluteenialtistuksen seurauksena ohutsuolen limakalvon suolinukka tuhoutuu. Tästä oireina voivat olla esimerkiksi vatsavaivat ja ravintoaineiden imeytymishäiriöt. Ihokeliakia on myös perinnöllinen sairaus, jonka aiheuttajana on gluteeni. Oireina ihokeliakiassa on rakkulainen ja voimakkaasti kutiava ihottuma. (Mäki, Arffman & Keliakialiitto 2006, 18-21.)

Tautien toteamiseen tarvitaan keliakiassa verinäyte ja ohutsuolen limakalvosta koepala. Ihokeliakiassa verinäytteen lisäksi tutkitaan ihokoepala. Verinäytteestä tutkitaan taudeille tyypilliset vasta-aineet eli transglutaminaasivasta-aineet. (Mäki ym. 2006, 50-53; Salmi 2017.)

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Keliakiatutkimuskeskukseen kesällä 2018. Opinnäytetyön tavoitteena oli keliakia- ja ihokeliakiaspesifisten vasta-aineiden puhdistuksen optimointi seerumista ja ohutsuolen limakalvon koepalan kasvatusmediumista. Tarkoituksena oli puhdistaa keliakialle ja ihokeliakialle spesifisiä transglutaminaasi (TG) 2- ja 3-vasta-aineita.

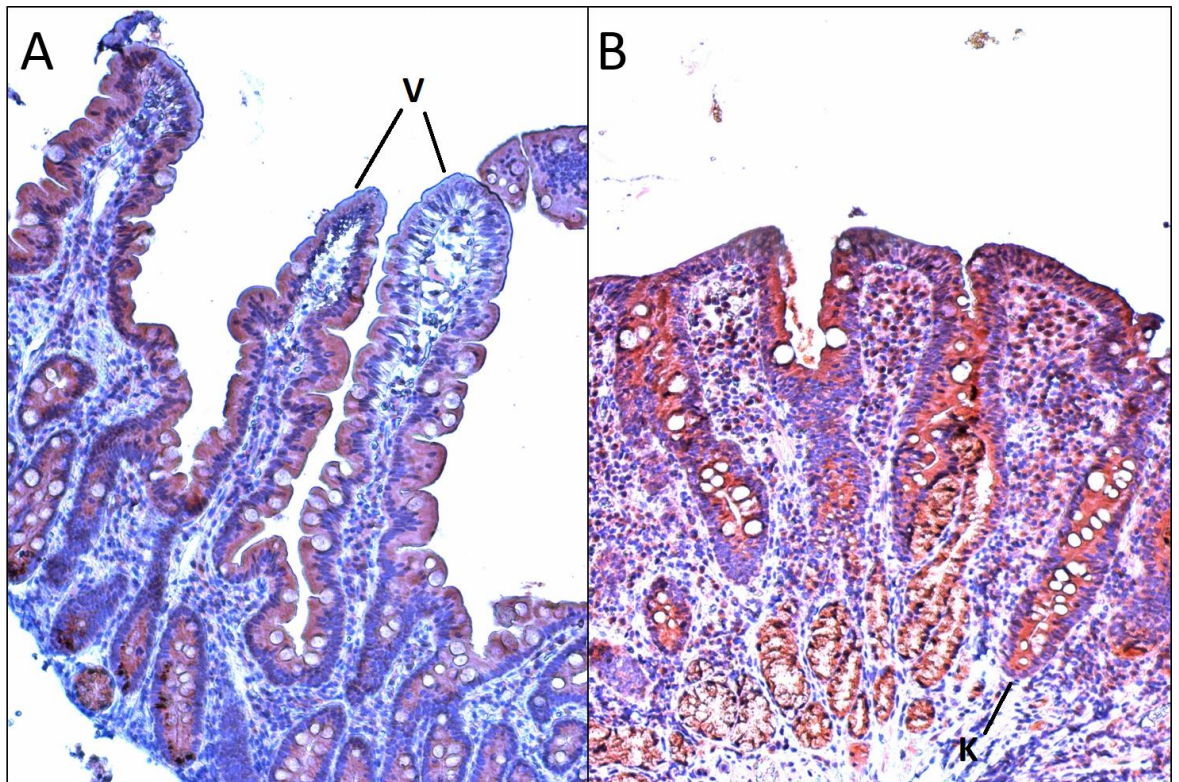
Vasta-aineet puhdistettiin affiniteetikromatografian avulla pylväässä seerumi- ja ohutsuolen koepalan kasvatusmediumnäytteistä. Vasta-ainepuhdistuksesta kerätyille eluutioille tehtiin SDS-PAGE ja Western blottaus, sekä muutamalla eri entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä eli ELISA-menetelmällä tarkastettiin vasta-aineiden spesifisyys. Ennen vasta-ainepuhdistusta TG2- ja TG3-proteiinit biotinyloitiin ja varmistettiin niiden onnistuminen SDS-PAGE:n ja Western blottausten avulla.

Vasta-ainepuhdistuksia tehtiin, koska Keliakiatutkimuskeskuksessa haluttiin saada lisätietoa TG2- ja TG3-vasta-aineista. Vasta-ainepuhdistusten eluutioista selvitetään tulevaisuudessa massaspektrometrin avulla muun muassa, onko TG2- ja TG3-vasta-aineilla mahdollisesti rakenteellisia eroja sekä ovatko ihokeliakikon ja keliakikon vasta-aineet rakenteellisesti samanlaisia.

2 TEORIA

2.1 Keliakia

Keliakia on perinnöllinen autoimmuunitauti, jonka aiheuttajana on vehnän, ohran ja ruukiin sisältämä gluteeni. Gluteenin vaikutuksesta ohutsuolen limakalvolle syntyy immuunireaktio eli tulehdustila, jolloin ohutsuolessa oleva suolinukka tulehtuu. Gluteenin jatkuva saanti vaikuttaa ohutsuolen limakalvoon ja lopulta suolinukka tuhoutuu. (Mäki ym. 2006, 18-21; Salmi, Lindfors, Kurppa & Kaukinen 2017.)



KUVA 1. Terveen ihmisen (A) ja keliakikon (B) ohutsuolen limakalvot. Villukset (V) on näkyvissä terveän ihmisen limakalvolla ja keliakikon kuvasta huomaa syventyneet kryptat (K). (Keliakiatutkimuskeskus, Tampere 2018.)

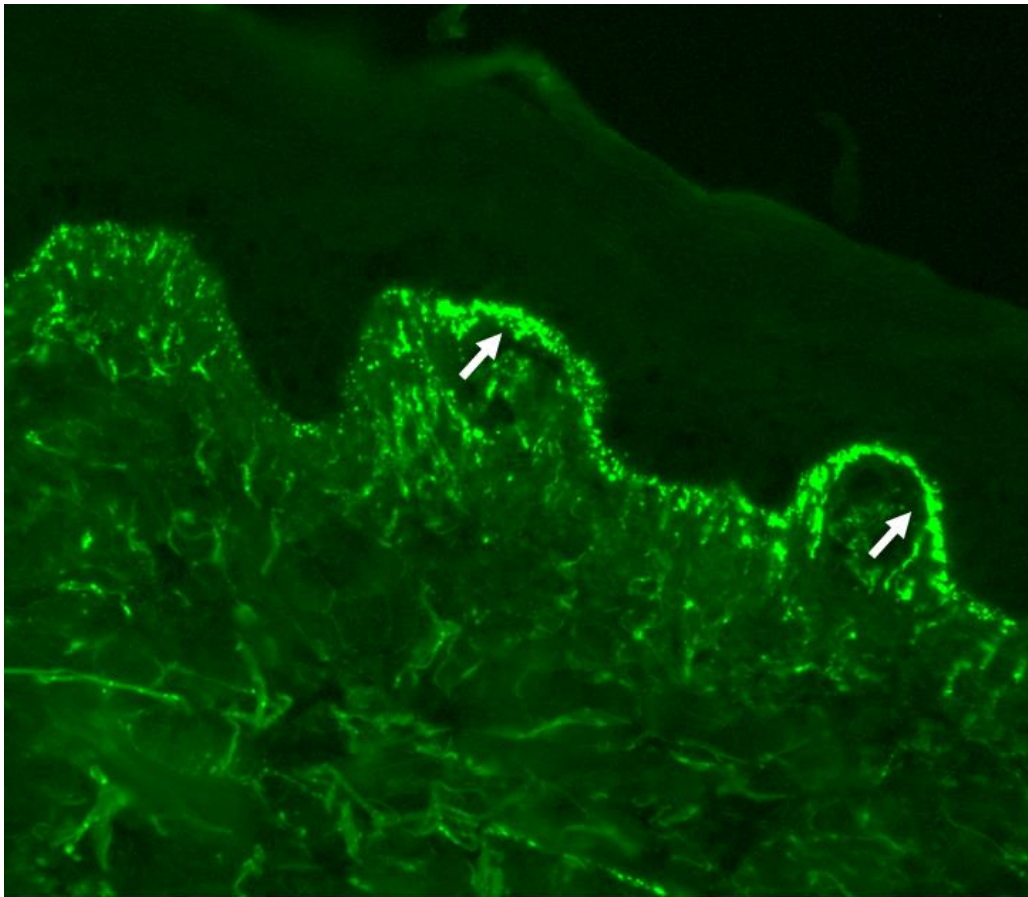
Terveellä ihmisellä suolinukkalisäkkeet eli villukset ovat sormimaisia ja korkeita (kuva 1a), kun taas keliakikon suolinukkalisäkkeet (kuva 1b) ovat lyhentyneet tai kadonneet täysin (villusatrofia) ja kuopakkeet eli kryptat ovat syventyneet (kryptahyperplasia). Näin ollen, keliakikon limakalvoa voidaan kutsua litteäksi limakalvoksi. Limakalvon tuhoutuminen ei kuitenkaan tapahdu hetkessä, limakalvovaurio syntyy asteittain useiden vuosien kuluessa. (Mäki ym. 2006, 26-27; Salmi ym. 2017.)

Keliakian tyypillisiä oireita ovat vatsavaivat ja ripuli sekä ravintoaineiden imeytymishäiriöt ja puutostilat, kuten esimerkiksi anemia tai laihtuminen. Ohutsuolen limakalvovaurion vuoksi useimmilla keliakiaa sairastavilla henkilöillä on ravintoaineiden imeytymishäiriöitä ja puutostiloja. Suolinukkakato vaikeuttaa ravintoaineiden imeytymistä kehoon, sillä imeytymispinta-ala pienenee huomattavasti ja se myös vaurioittaa ohutsuoletta imeytymiseen vaikuttavia entsyymejä. Anemia on yleisin puutostila, siinä rauta ja foolihappo eivät imeydy kunnolla. Suolisto-oireita ovat tyypillisesti vatsan turvotus ja kipu, ripuli, löysät ulosteet, ilmavaivat ja pahoinvointi sekä ruokahaluttomuus. Toisaalta osalla keliakia voi olla lähes oireeton tai oireet voivat olla jaksottaisia. Keliakiassa voi esiintyä myös suoliston ulkopuolisia oireita, kuten esimerkiksi niveltulehduksia, maksasairauksia sekä osteoporoosia. Nämä oireet voivat johtua keliakiaan liittyvästä imeytymishäiriöstä. Kyseessä voi olla myös samanaikainen toinen tauti, sillä keliakikoilla esiintyy erilaisia liitännäissairauksia. (Mäki ym. 2006, 27-37; Salmi ym. 2017.)

Jotta keliakia pystytään toteamaan, tarvitaan ohutsuolen limakalvosta koepala sekä verestä keliakiavasta-aineet eli kudostransglutaminaasi- ja endomysiumvasta-aineet, jotka tunnistavat TG2 antigeenia. Endomysiumvasta-aineet (EmA) tutkitaan epäsuoralla immunofluoresenssitestillä, kun taas TG2- ja TG3-vasta-aineet testataan ELISA:lla. Ohutsuolen limakalvon koepalasta tutkitaan muutoksia limakalvolla mikroskoopin avulla. (Mäki ym. 2006, 56-65; Salmi ym. 2017.)

2.2 Ihokeliakia

Ihokeliakia eli dermatitis herpetiformis on perinnöllinen sairaus, joka ilmenee pienirakulaisena ja voimakkaasti kutisevana ihottumana erityisesti kyynärpäissä, polvissa ja pakarissa. Oireet alkavat yleensä äkillisesti. Vaikka ihokeliakikolla on harvoin suolisto-oireita, ihokeliakia on sama tauti kuin keliakia, sillä lähes kaikilta ihokeliakikoilta löytyy keliakikoille tyypilliset muutokset ohutsuoletta sekä seerumista on havaittavissa TG2-vasta-ainetta. Taudinaiheuttaja on sama eli ravinnon sisältämä gluteeni. (Mäki ym. 2006, 50-53; Salmi 2017.)



KUVA 2. Ihokeliakikon ihon koepalasta värjättyä IgA:ta, IgA-vasta-ainekasaumat näkyvät nuolilla merkittynä. (Keliakiatutkimuskeskus, Tampere 2018.)

Erona keliakiaan ihokeliakiassa on ihottuma ja ihon papillaariseen verinahkaan saostumaksi kertyvät IgA-vasta-aineet sekä harvemmin esiintyvät suolisto-oireet. Ihokeliakia todetaan ihokoepalan avulla, joka otetaan ihottuman vierestä terveeltä iholta. Ihokoepala tutkitaan suoralla immunofluoresenssitekniikalla, josta positiivinen tulos on nähtävissä mikroskoopilla IgA-vasta-aineen kasaumina. Kasaumat näkyvät värjäyksen ansiosta vaaleina rakeisina alueina (kuva 2). Ihokeliakikoiden seerumista on löydetty tutkimuksissa TG3-vasta-aineita, mutta taudin diagnoosissa käytetään TG2-vasta-aineiden tutkimista. (Mäki ym. 2006, 52-53, 66; Salmi 2017.)

Molemmissa sairauksissa hoitokeinona on elinikäinen gluteeniton ruokavalio, jossa vältetään syömästä ruista, ohraa ja vehnää. Korvaavina tuotteina voidaan käyttää muun muassa maissia, kauraa ja riisiä. (Mäki ym. 2006, 82-83.) Ruokavalion tarkoituksena on ehkäistä oireita ja parantaa limakalvovauriot. Ihokeliakiassa ruokavalion tueksi voidaan aloittaa myös dapsonilääkitys, jolla saadaan ihottuma paranemaan. (Salmi 2017.)

2.3 Vasta-aineet

Immunoglobuliinit ovat vasta-aineina toimivia proteiineja, jotka tunnistavat ja reagoivat elimistölle vieraiden molekyylien eli antigeenien kanssa, jotta ne menettävät toimintakykynsä. Immunoglobuliinia valmistuu valkosoluissa. Autoimmuunisairaudessa, kuten keliakiassa, vasta-aineita voi muodostua myös elimistön omia rakenteita vastaan. (Turpeenoja 2005, 98-99.) Immunoglobuliini A:ta (IgA) tuotetaan pääasiassa limakalvojen pinnalla ruuansulatuskanavassa. Limakalvoilla olevat solut tuottavat dimeeristä IgA:ta, jossa on kaksi IgA-monomeeriä liitetty kovalenttisesti J-ketjulla. Veren seerumissa IgA esiintyy monomeerisenä. Western blottauksessa dimeerisen IgA:n molekyylipaino on yli 250 kDa ja monomeerisen IgA:n on noin 175 kDa. (Iversen, Snir, Stensland, Lundin, de Souza & Sollid 2017.)

Lymfosyytit eli imusolut tunnistavat antigeenejä pinnallaan olevien antigeenireseptorien avulla. Antigeenin tarttuminen antigeenireseptoriin aktivoi vasta-aineen tuoton. Vasta-aineet tarttuvat antigeeniin, jolloin se menettää toimintakykynsä. Vasta-aineita käytetään esimerkiksi tutkimuksissa, kun halutaan tunnistaa tai mitata vasta-aineantigeenireaktioita. (Turpeenoja 2005, 98-99.)

Keliakian autoantigeeni on TG2-proteiini. Keliakiassa IgA kertyy kasaumiksi ohutsuolen pinnalle, kun se tarttuu siellä olevaan TG2:een. (Reunala, Salmi & Hervonen 2015.) TG2 esiintyy myöskin kaikkialla kehossa, esimerkiksi maksassa ja sydämessä. TG2 löydettiin vuonna 1997, kun se tunnistettiin EmA:n autoantigeeniksi. TG2-autovasta-aineita voidaan mitata ELISA -menetelmällä keliakiapotilaiden seerumeista. Keliakiapotilailla voi esiintyä erilaisia vasta-aineita seerumissa. Seerumista voidaan havaita muun muassa IgA- ja IgG-vasta-aineita, mutta TG2-autovasta-aineet ovat pääasiassa kuitenkin IgA:ta. Osalla keliakiapotilaista voi olla selektiivinen humoraalinen IgA puutos, jolloin he tuottavat IgG-luokan TG2-autovasta-aineita. Tämä IgA puutos on yleisempää keliakiapotilailla kuin terveillä ihmisillä. (Kalliokoski 2017.) TG2:n molekyylipaino on noin 78 kDa.

TG3-proteiinin on havaittu olevan autoantigeeni ihokeliakiassa. TG3 esiintyy IgA-saostumissa ihokeliakikokon iholla, se on entsyymaattisesti aktiivinen ja voi sitoa liukoista fibrinogeenia. Tutkimuksissa on myös huomattu, että molempien sairauksien potilailla ohutsuolen limakalvoilla esiintyy IgA:n kasaumia TG2:een tarttuneena. TG2- ja TG3-proteiinit ovat hyvin samankaltaisia, tämän takia niihin kohdistuvien vasta-aineiden välillä

esiintyy ristireaktiivisuutta. (Reunala ym. 2015.) TG3:n molekyylipaino on noin 78 kDa. Myös TG3-vasta-aineet ihokeliakiapotilailla ovat pääasiassa IgA:ta. (Sardy, Karpati, Merkl, Paulsson & Smyth 2002.)

Molemmilta sairauksilta on havaittu löytyvän sama vahva yhteys ihmisen leukosyyttiantigeeniin (HLA) DQ2, jota kantaa suurin osa ihokeliakiapotilaista (Reunala ym. 2015). Keliakian diagnosoinnissa HLA-alleelien avulla pystytään selvittämään mahdollista taudin olemassaoloa, sillä (HLA) DQ2 ja DQ8 geenimuutokset ennakoivat keliakiaan sairastumista (Keliakian HLA-tautiassosiaatiotutkimus). Gliadiinin eli erään vehnän glutteenin valkuaisaineen on huomattu kiinnittyvän parhaiten DQ2 ja DQ8 geenien koodaamien antigeenien reseptoreihin. Geenien olemassaolo ei kuitenkaan pelkästään riitä taudin toteutumiseen, sillä terveillä ihmisillä voi esiintyä niitä myös. (Mäki ym. 2006, 19; Keliakian HLA-tautiassosiaatiotutkimus.)

2.4 Biotinylointi

Biotiinin ja streptavidinin välillä on korkea affiniteetti, jota voidaan käyttää hyödyksi immunokemiallisissa tekniikoissa. Biotiini (B7-vitamiini) on hyvin pieni vitamiini (244 Da), joten se voi konjugoitua moniin proteiineihin ilman, että se muuttaa niiden biologista aktiivisuutta. Biotinyloinnissa proteiini konjugoidaan biotiinilla käyttäen apuna N-hydroksisukkinimidia, joka reagoi primääristen aminoryhmien kanssa. Biotinylointimenetelmä mahdollistaa proteiinien yksinkertaisen ja tehokkaan merkitsemisen. (EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin Instructions; Wilson, K & Walker, J. 2005. 328.)

Biotiinin määrä riippuu aminoryhmien jakautumisesta proteiinissa, proteiinkonsentraatiosta ja käytetyn reagenssin määrästä. Biotiinileimatut reaktiot, jotka ovat laimennettuja liuoksia, tarvitsevat suuremman määrän molaarista ylimääräistä biotiinireagenssia verrattuna konsentroituihin proteiiniliuoksiin. 20-kertainen biotiinireagenssin mooliylimäärä 1-10 mg vasta-aineelle antaa noin 4-6 biotiiniryhmää jokaiselle vasta-ainemolekyylille. Biotinylointia varten lasketaan biotiinireagenssin määrä millimooleina lisäämään reaktioon 20-kertainen molaarinen ylimäärä biotiinia, josta lasketaan, kuinka paljon biotiinia lisätään proteiiniliuokseen. (EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin Instructions.)

Biotinyloinnin jälkeen proteiineille suoritetaan geelisuodatus reagoimattoman biotiinin ja reaktion sivutuotteiden poistamiseksi. Geelisuodatus tehdään suolanpoistopylväillä, jotka

perustuvat kokoerottelukromatografiaan. Pylväässä olevat matriisihelmet sisältävät huokosia. Näytteessä olevat pienimmät molekyylit tai yhdisteet pääsevät kokonsa perusteella huokosten sisään ja suuremmat molekyylit eivät. Suuret molekyylit, jotka eivät huokosiin mahdu, liikkuvat liikkuvan faasin kanssa pylvään läpi. Pienimpien molekyylien, jotka pääsevät huokosten sisään, matka pylväässä hidastuu ja ne eluoituvat vasta suurempien molekyylien jälkeen. (Desalting column 2018.)

Geelisuodatuksessa näytteen kohdemolekyylien ja ei-toivottujen suolojen välillä on suuri kokoero. Pylväissä on erikokoisia huokosrajoja, jolloin näytteen kohdemolekyylien koon mukaan valitaan pylvään huokoskoko. Tällöin kohdemolekyylien pitää olla liian suuria helmien huokosiin. Tällä tavalla suolat saadaan erotettua kohdemolekyylistä, kun ne pääsevät huokosiin ja ne kulkeutuvat pylvään läpi hitaammin. Näytteen kohdemolekyylit pysyvät koko ajan liikkuvassa vaiheessa. Geelisuodatuksessa pylväs on tavallisesti lyhyt ja leveä, jotta näyte saadaan eluotua ennen ei-toivottuja suoloja. (Desalting column 2018.)

2.5 SDS-PAGE, Western blottaus ja immunodetektiio

Jokaisella proteiinilla on oma spesifinen elektroforeesinen liikkuvuus, joka määrittää sen kulkeutumisen nopeuden sähkökentässä ja ratkaisee erottumisen. Elektroforeesinen liikkuvuus määräytyy molekyylin varauksen, muodon ja koon mukaan. Käytössä olevan polyakryyliamidigeelin konsentraatiota ja ristisidosten määrää muuttamalla saadaan eri huokosia geelejä, joita voidaan käyttää eri tarkoituksiin. (Janson 2011, 365-366.)

SDS-PAGE:ssa eli natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesissa proteiinit liikkuvat sähkökentässä kohti vastakkaista varausta. Pienemmät proteiinit liikkuvat nopeammin kuin suuremmat. Näytteen käsittelyssä käytetään Laemmli-puskuria, joka sisältää muun muassa natriumdodekyylisulfaattia (SDS). SDS denaturoi voimakkaasti proteiineja avaamalla vetysidokset ja rikkomalla proteiinin rakenteet sekä sitoutuu proteiiniin, jolloin proteiinikompleksi saa negatiivisen varauksen. Näytepuskurin joukkoon voidaan laittaa myös β -merkaptotetanolia, joka rikkoo rikkisillat. Tavallisesti näytteen käsittelyn lopuksi näytteet kuumennetaan noin 95 °C asteessa 5-10 minuuttia. (Janson 2011, 367-375; Wilson & Walker 2005, 457-459.)

Erotetut proteiinit saadaan näkyviksi erilaisten detektiomenetelmien avulla, joista yleisimpiä ovat värjäysmenetelmät. Värjäysmenetelmään kuuluu proteiinin kiinnitys, värjäysaineen kiinnittyminen ja pesu ylimääräisen väriaineen poistamiseksi. Yleisin käytetty väriaine on sulfaattinen trimetyyliamiini, Coomassie Brilliant Blue R-250. Värjäyksessä voidaan käyttää myös fluoresenssi- tai hopeavärjäystä. (Wilson & Walker 2005, 467-468; Electrophoresis.) On myös olemassa Stain-Free -geelejä, joita ei tarvitse värjätä. Näiden geelien käyttö mahdollistaa suoran visualisoinnin ja analysoinnin proteiininäytteille. Stain-free -geelit sisältävät trihaloyhdisteitä, joiden ansioista proteiinit on nopea havaita fluoresenssin avulla. Trihaloyhdisteet reagoivat tryptofaanitähteiden kanssa UV-indusoidussa reaktiossa, jossa tuotetaan fluoresenssia, jonka kuvantamislaitte havaitsee. (Electrophoresis.)

SDS-PAGE:lla erotetut proteiinit siirretään geeliltä huokoiselle kalvolle sandwich -menetelmän avulla, jota kutsutaan Western blottaukseksi. Kalvolla proteiineja pystytään tutkimaan paremmin. (Wilson & Walker 2005, 328-330.) Proteiinien siirto suoritetaan geeliltä kalvolle sähkövirran avulla. Huokoinen kalvo voi olla nitroselluloosa- tai polyvinyylideenifluoridikalvo (PVDF). Sandwich -menetelmässä geeli ja kalvo asetetaan pinon kasettien väliin, jolloin siirto tapahtuu sähkövirran avulla katodilta anodille. Anodikasetti on pinon alimmaisena ja sen päälle asetetaan sienityyny ja suodatinpaperia, jotka on kostutettu käytettävällä siirtoliuoksella. Tämän jälkeen tulee kalvo, jonka päälle laitetaan geeli. Geelin päälle asetetaan kostutetut suodatinpaperit ja sienityyny. Pinon päällimmäiseksi tulee katodikasetti. Kalvon tulee sijaita geelin ja anodin välillä, sillä sähkövirta ja näytteet liikkuvat tässä suunnassa. (Wilson & Walker 2005, 469-470; Trans-Blot Turbo Blotting System 2010.)

Siirron jälkeen kalvoa inkuboidaan proteiiniliuoksessa (blokkauksliuos), joka sulkee inkuboinnin aikana kalvolta kaikki jäljelle jääneet hydrofobiset sitoutumiskohdat. Jokaisen inkubaation jälkeen kalvolle tehdään pesut, jotta kalvo on puhtaana seuraavaan inkubointiin. (Wilson & Walker 2005, 469)

Primäärinen vasta-aineinkubointi tehdään laimennetulla antiseerumilla, joka sopii tutkitavalle kalvolla olevalle proteiinille. Vasta-aine sitoutuu kalvolla olevaan proteiiniin, jos se havaitsee oman antigeeninsä. Jotta tämä vuorovaikutus pystytään havaitsemaan, tehdään sekundäärinen vasta-aineinkubointi. Tämän vasta-aineen pitää havaita ensimmäinen vasta-aine. Esimerkiksi, jos ensimmäinen vasta-aine on kasvatettu kanissa, sekundäärisen

vasta-aineen tulee olla vasta-ainetta kanille. Tällöin vuorovaikutus syntyy ensimmäisen ja sekundäärisen vasta-aineen välillä. (Wilson & Walker. 2005, 469-470.)

Näiden käsittelyiden jälkeen blotti eli membraani on valmiina detektioon, esimerkiksi fluoresenssikuvaukseen vasta-aineiden ollessa fluoresoivia. Jos kuvaukseen käytetään kemiluminesenssia, proteiinien havaitsemiseen kalvolla käytetään usein tehostettua kemiluminesenssitunnistusta (ECL). Menetelmä havaitsee spesifiset antigeenit piparjuuri-peroksidaasilla (HRP) leimattujen vasta-aineiden avulla. (Wilson & Walker 2005, 470-471; ECL Western blotting detection reagents and analysis system.)

2.6 Vasta-ainepuhdistus ja affiniteettikromatografia

Affiniteettikromatografiassa erottuminen tapahtuu biologisen affiniteetin perusteella. Haluttu proteiini puhdistetaan sen spesifisten sitoutumiskohtien perusteella niin sanotulla avain lukko -menetelmällä. Affiniteettikromatografiassa tapahtuu esimerkiksi antigeeni-vasta-ainereaktio. (Wilson & Walker 2005, 310-311.) Immunosäostus on antigeenien pienimuotoinen affiniteettipuhdistusmenetelmä, joka käyttää hyväksi sitovaa proteiinia immobilisoituna kiinteään faasiin eli resiiniin, esimerkiksi agarosiin. (Immunoprecipitation technical guide and protocols 2009.)

Pull down -menetelmä on affiniteettipuhdistuksen yksi muoto ja on samankaltainen menetelmä kuin immunosäostus, mutta vasta-aineen sijasta käytetään pylvääseen kiinnitettävää niin kutsuttua syöttiproteiinia. Tässä työssä käytetyssä menetelmässä syöttiproteiini toimii biotinyloitu TG2- tai TG3-proteiini. Menetelmässä puhdistettava proteiini sitoutuu tunnettuun syöttiproteiiniin. Syöttiproteiini kiinnitetään biotiinin avulla kiinteään aineeseen eli resiiniin, jossa se sitoutuu streptavidiniin. Biotinyloidun syöttiproteiinin kiinnittämisen jälkeen lisätään puhdistettavaa proteiinia sisältävää näytettä ja tehdään sen kanssa toinen inkubointi. Inkuboinnin aikana puhdistettava proteiini sitoutuu pylväässä olevaan syöttiproteiiniin ja sen jälkeen resiini pestään hyvin, jotta muut sitoutumattomat molekyylit saadaan pois pylväästä. Puhdistettu proteiini eluoidaan irti kiinnitetystä syöttiproteiinista käyttäen sopivaa eluutiopuskuria. Sopiva eluutiopuskuri häiritsee niiden sitoutumisvuorovaikutusta. (Immunoprecipitation technical guide and protocols 2009; Pull-Down Assays.)

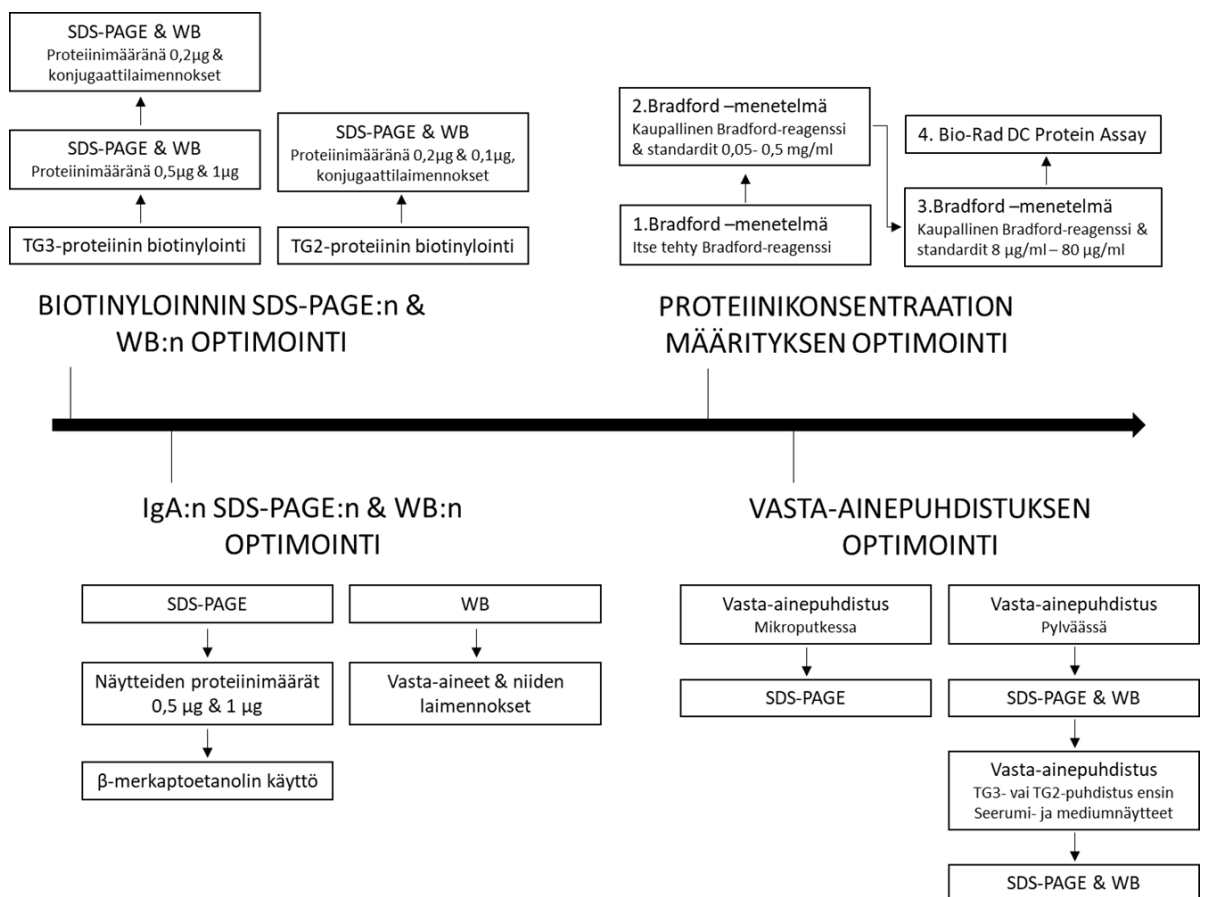
2.7 ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys)

Epäsuorassa ELISA -menetelmässä näytteen vasta-aineet sitoutuvat niille spesifiseen antigeeniin, joka on sidottu mikrotiitterilevyn pohjaan. Levylle suoritetaan pesuja, jotta sitoutumattomat molekyylit saadaan poistettua. Primäärinen vasta-aine tai konjugaatti lisätään näytteen jälkeen, joka sitoutuu kuoppaan näytteen vasta-aineisiin. (Glick, Patten & Delovitch 2013.) Konjugaatiksi kutsutaan vasta-ainetta, joka on leimattu entsyymillä tai fluorokromien kanssa (Wilson & Walker 2005, 321). Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen sitoutumaton primäärivasta-aine pestään pois. Sekundäärinen vasta-aine on suunnattu primääristä vasta-ainetta vastaan. Siihen on kiinnitetty kovalenttisesti entsyymi, joka muuntaa värittömän substraatin värilliseksi tuotteeksi. (Glick ym. 2013.) Pysäytysliuos lopettaa entsyymireaktion ja liuoksen väri vaihtuu käytettävän substraatin mukaan. Värin intensiteetti on suoraan verrannollinen pitoisuuteen. (Anti-heTG IgA ELISA manual, 2012.)

Värjäytymisen jälkeen näytteen vasta-ainepitoisuus määritetään spektrofotometrillä. Kaikissa immunometrisissä määrityksissä käytetään standardia, josta tehdään laimentamalla eri vahvuisia liuoksia. Näiden avulla tehdään tunnettujen pitoisuuksien ja niiden absorbanssien mukaan standardisuora. Standardisuoran ja näytteen absorbanssiarvojen avulla saadaan laskettua tulokset. (Wilson & Walker 2005, 336-337.)

3 OPTIMOINNIN SUORITUS

Optimointi suoritettiin vaiheittain ja saatujen tulosten perusteella tehtiin muutoksia menetelmiin. Kuviossa 1 on esitetty kaavio siitä, miten optimoinnissa edettiin ja millaisia muutoksia menetelmiin tehtiin. Optimointi sisälsi neljä eri menetelmää, joita testattiin useaan kertaan. Optimointi aloitettiin TG3-proteiinin biotinyloinnista ja sen testaamisesta SDS-PAGE:ssa ja Western blottauksessa. Optimoinnin aikana SDS-PAGE:ssa ja Western blottauksessa muutettiin geelille laitettavien näytteiden proteiinimääriä ja käytettiin eri konjugaattilaimennoksia. Seuraavaksi biotinyloitiin TG2-proteiini ja testattiin sille SDS-PAGE:a ja Western blottausta. Siinä testattiin myös näytteiden eri proteiinimääriä.



KUVIO 1. Optimoinnin suorituksen eri vaiheet.

Tämän jälkeen aloitettiin testaamaan IgA:n SDS-PAGE:a ja Western blottausta aiemmin seerumista puhdistettujen IgA-näytteiden avulla. Yhteensä testejä tehtiin kolme ja niissä tutkittiin lähinnä erilaisia vasta-aineita ja niiden laimennoksia. Sitten testattiin proteiinikonsentraation määrittystä Bradford -menetelmällä, näitä määrittäksiä tehtiin neljään

kertaan muutamalla eri reagenssilla. Tämän jälkeen testattiin ensimmäistä vasta-ainepuhdistusta, joka tehtiin pelkästään mikroputkessa. Eluutioille tehtiin SDS-PAGE ja sen tulosten perusteella menetelmää päätettiin muuttaa. Seuraava vasta-ainepuhdistus tehtiin aluksi mikroputkessa, josta resiini siirrettiin pylvääseen ennen näytteen inkubointia. Vasta-ainepuhdistuksia tehtiin muutamia kertoja testimielessä samalle näytteelle, kunnes päädyttiin tekemään ratkaisu, että ensin puhdistetaan näytteestä TG3-vasta-aineet ja sitten TG2-vasta-aineet.

3.1 Näytteet

Optimoinnissa käytettiin keliakia- ja ihokeliakiatutkimuksiin osallistuneiden potilaiden seeruminäytteitä sekä ohutsuolen koepalojen kasvatusmedium- eli organ culture medium -näytteitä. Biopsiat eli koepalat on otettu gastroskopiatuskymyksessä potilaiden ohutsuolen limakalvolta, ja niistä osa käytettiin kasvatusmediumnäytteiden kasvatustutkimuksiin.

Seuraavat käsittelyt koepalanäytteille oli tehty jo aiemmin, näytteinä olevat kasvatusmediumnäytteet olivat siis valmiina käytettäväksi pakkasessa. Koepaloja on viljelty RPMI-1640 -kasvatusmediumissa, johon oli lisätty 15 % naudan sikiön seerumia, 100 U/ml penisilliiniä, 50 µg/ml insuliinia, 2 mg/ml glukoosia ja 10 mM HEPES-puskuria. Näytteitä kasvatettiin 24 tai 48 tuntia 37 °C lämpötilassa. Potilaan osa koepaloista on viljelty pelkästään aiemmalla kasvatusmediumilla ja osaa on altistettu gliadiinille. Tämän jälkeen viljelmän pinnalla olleet supernatantit kerättiin näytteiksi. (Hietikko ym. 2018.)

Seeruminäytteiden TG2- ja TG3-vasta-ainepitoisuudet on määritetty jo aiemmin. Ennen vasta-ainepuhdistuksien alkua määritettiin kasvatusmediumnäytteiden TG2- ja TG3-vasta-ainepitoisuudet. TG2-vasta-ainepitoisuudet määrittivät laboratorion muu henkilökunta ja TG3-vasta-ainepitoisuudet määritettiin TG3-ab-ELISA -menetelmällä, jonka suoritus on kuvattu tarkemmin kappaleessa 4.2. Määritykset tehtiin laimentamattomista näytteistä.

3.2 Biotinylointi, SDS-PAGE ja Western blottaus

Biotinylointi tehtiin ensin TG3-proteiinille. Biotinyloinnin aluksi laskettiin, kuinka paljon biotiinia tarvitaan biotinylointiin. Biotiini (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) otettiin pakastimesta ja joukkoon lisättiin vettä. Liuosta sekoitettiin pipetillä, että pelletti liukeni kokonaan. Biotiinia lisättiin TG3-putkeen ja inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. Tästä vaiheesta otettiin talteen näyte, jota käytettiin SDS-PAGE:ssa.

Inkuboinnin jälkeen biotinyloitu TG3 geelisuodatettiin Zepa Spin -suolanpoistopylväällä. Pylväs laitettiin mikroputkeen ja sentrifugoitiin 1500 g:n voimalla minuutin ajan, jolloin varastoliuos saatiin pylvästä pois. Tämän jälkeen pylväs laitettiin uuteen mikroputkeen ja pylväaseen pipetoitiin biotinyloitu TG3-liuos. Suoritettiin sentrifugointi 1500 g:n voimalla kahden minuutin ajan, jolloin kerättiin mikroputkeen puhdistettu biotinyloitu TG3.

Biotinyloinnin onnistuminen varmistettiin SDS-PAGE:n ja Western blottausten avulla. Näytteiksi otettiin biotinyloitu TG3, jota ei oltu puhdistettu geelisuodatuksella, biotinyloitu TG3, joka oli geelisuodatettu ja biotinyloimaton TG3 sekä positiiviseksi kontrolliksi biotinyloitu vasta-aine. Näytemääränä kokeiltiin 0,5 µg ja 1 µg näytettä. Näytteet valmistettiin laimentamalla vedellä ja laimennettuun näytteeseen lisättiin 1x Laemmli-puskuria. Näytteitä inkuboitiin 10 minuutin ajan + 96 °C:n lämpötilassa.

Näytteet pipetoitiin valmiille Mini-Protean TGX Stain-free Precast 10 % geelille. Molekyyli-markkereina käytettiin PageRuler Plus esivärjättyä proteiinimarkkeria ja PageRuler Broad Range värjäämätöntä proteiinimarkkeria. Värjäämättömän molekyyli-markkerin vyöhykkeet näkyvät ChemiDoc XRS+ -laitteella kuvatessa heti SDS-PAGE:n jälkeen, toisin kuin esivärjätyn molekyyli-markkerin vyöhykkeet, jota hyödynnetään Western blottauksessa. Ajopuskurina käytettiin 1x ajopuskuria, jonka valmistusohje on liitteessä 1.

SDS-PAGE -ajossa käytettiin jännitteenä 200 voltia (V) ja ajon kesto oli noin 30 minuuttia. Tämän jälkeen geeliltä kuvattiin ajautuneet proteiinit ja molekyyli-markkerit ChemiDoc XRS+ -laitteella (kuva 3), jotta nähtiin, oliko SDS-PAGE onnistunut. Proteiinit siirrettiin geeliltä Biorad Trans-Blot Turbo Transfer System -laitteen (kuva 3) avulla Transblot Turbo Mini PVDF -membraanikalvolle Mixed MW -ohjelmalla, joka kesti 7 minuuttia. Mixed MW -ohjelma on tarkoitettu molekyyli-ille, joiden molekyyli-paino on noin 5-150 kDa. Tämän jälkeen kalvo laitettiin blokkaukseen, sekoittajalle yön yli +4 °C:seen.

Blokkauksioksiä käytettiin 3 % BSA-TBST -liuosta, jonka valmistusohje on liitteessä 1.



KUVA 3. Vasemmalla ChemiDoc XRS+ -kuvauslaite ja oikealla Trans-Blot Turbo Transfer System. (Laura Ahonen, 2018)

Blokkauksen jälkeen kalvo pestiin TBST-liuoksella (liite 1) 5 minuutin ajan käyttäen tasekoittajaa. Tämä toistettiin kolme kertaa. Pesujen jälkeen tehtiin konjugaatti-inkubointi, jonka kesto oli tunti. Konjugaattina käytettiin streptavidini-HRP:tä, josta tehtiin 1:3000 laimennos 3 % BSA-TBST -liuokseen. Konjugaatti-inkuboinnin jälkeen tehtiin pesut, kuten edellä.

Kalvo kuvattiin luminesenssitekniikalla käyttäen ChemiDoc XRS+ laitetta. Kuvauksessa käytettiin ECL-liuoksia, jotka laimennettiin 1:1 millilitran tilavuuteen. Membraani laitettiin läpinäkyvän kalvon päälle ja siihen päälle pipetoitiin valmistettu ECL-liuos. Tämän annettiin vaikuttaa pimeässä 2 minuuttia. Kuvaus suoritettiin heti vaikutusajan jälkeen. Membraanikalvolta ravisteltiin ylimääräiset nesteet pois ja laitettiin se läpinäkyvien kalvojen väliin.

Biotinyloidun TG3-proteiinin SDS-PAGE ja Western blottaus optimoinnissa testattiin seuraavaksi eri proteiinimäärää näytteessä. Geelille pipetoitavan proteiinin määrä oli 0,2

μg . Muuten näytteenkäsittely ja SDS-PAGE sekä proteiinien siirto kalvolle suoritettiin samalla tavalla.

Proteiinien kalvolle siirron jälkeen kalvo laitettiin kahteen osaan, jolloin molemmilla puolilla oli samat näytteet ja kalvot laitettiin blokkaukseen yön yli. Blokkauksliuksena oli 3 % BSA-TBST -liuos. Molemmille kalvoille tehtiin eri konjugaattilaimennokset blokkauksliukseen, toiselle (1.kalvo) 1:10000 ja toiselle (2.kalvo) 1:6000. Kalvojen kuvaus suoritettiin samalla laitteella, mutta nyt ECL-liuoksen annettiin vaikuttaa 1. kalvolla 1,5 minuuttia ja 2. kalvolla 2 minuuttia. Taulukkoon 1 on kirjattu tiivistettynä biotinyloinnin optimoinnissa tehtyjä kokeiluja ja muutoksia, kaikissa kokeiluissa käytettiin streptaviidiini-HRP-konjugaattia.

TAULUKKO 1. Biotinyloinnin SDS-PAGE:n ja WB:n optimointivaiheen muutokset.

Näyte	Proteiinin määrä geelillä (μg)	Konjugaattilaimennos Western blottaussessa	Konjugaatin pipetointimäärä (μl) /10 ml 3% BSA-TBST	ECL-liuoksen vaikutus (min)
TG3	1	1:3000	3,3	2
TG3	0,5	1:3000	3,3	2
TG3	0,2	1:10000	1	1,5
TG3	0,2	1:6000	1,7	2
TG2	0,2	1:10000	1	1,5
TG2	0,1	1:10000	1	1,5

Biotinylointi TG2-proteiinille suoritettiin samalla tavalla kuin TG3:lle. Biotinyloinnin jälkeen tehtiin SDS-PAGE ja Western blottaus. Näytemäärinä käytettiin 0,2 μg ja 0,1 μg . Työ suoritettiin kuten yllä on kuvattu ja konjugaattilaimennoksena käytettiin 1:10000 (taulukko 1).

3.3 IgA:n SDS-PAGE ja Western blottaus

SDS-PAGE:n optimoinnissa testattiin näytteiden proteiinimääriä, pipetointimääriä geelille sekä käytetäänkö Laemmli-puskurin kanssa β -merkaptotetanolia. Western blottaus-

sen optimoinnissa testattiin eri vasta-aineita ja niiden laimennoksia sekä eri blokkauksliuoksia. IgA:n optimoinnissa käytettiin näytteinä kaupallista IgA:ta ja keliakiapotilaiden seeruminäytteitä.

Ensimmäisessä IgA:n SDS-PAGE:ssa IgA:n proteiinimääräksi valittiin 0,5 µg ja 1 µg. Näytteiksi otettiin kaupallinen IgA (positiivinen kontrolli) ja kaksi aiemmin seerumista puhdistettua IgA-näytettä. Molekyylimarkkereina käytössä oli PageRuler Plus esivärjätty proteiinimarkkeri ja PageRuler Broad Range värjäämätön proteiinimarkkeri. Näytteenkäsittely tehtiin kahdella eri tavalla. Puolet näytteistä laimennettiin ja laitettiin näytteen joukkoon pelkästään Laemmli-puskuria. Toiset näytteet laimennettiin ja tehtiin normaali näytteenkäsittely eli Laemmli-puskurin joukkoon laitettiin β-merkaptotoetanolia. Suhde Laemmli-puskuria ja β-merkaptotoetanolia oli 1:16. Näytteet, joihin lisättiin β-merkaptotoetanolia, pitäisi hajota geelillä pienemmiksi osiksi, kun taas pelkistämättömien näytteiden pitäisi olla yhtenäisiä. Lopuksi näytteet inkuboitiin +96 °C:n lämpötilassa, 10 minuuttia.

SDS-PAGE:ssa käytettiin 4 – 20 % valmista Mini-Protean TGX Stain-free Precast -geeliä. Näytteet pipetoitiin geelille ja suoritettiin ajo 200 voltilla, jonka kesto oli noin 35 minuuttia. Tämän jälkeen geeli kuvattiin ChemiDoc XRS+ -laitteella. Kuvauksen jälkeen suoritettiin proteiinien siirto Trans-blot Turbo Mini PVDF -membraanikalvolle BioRad:n Trans-Blot Turbo Transfer System -laitteen avulla. Ohjelmana oli High MW, jonka kesto oli 10 minuuttia. High MW -ohjelma oli tarkoitettu molekyyleille, joiden paino on yli 150 kDa. Ennen blokkauksia esivärjätyn molekyylimarkkerin vyöhykkeet merkattiin kalvolle WesternSure -kynällä, jotta ne saatiin näkyviksi Western blottausten jälkeen fluoresenssilaitteella kuvattaessa.

Siirron jälkeen suoritettiin blokkauks Odyssey-puskurilla. Blokkauks tehtiin huoneenlämmössä sekoittajalla ja kesto oli tunti. Tämän jälkeen tehtiin kalvon pesu kolmesti viiden minuutin ajan TBST-liuoksella. Primäärivasta-aineinkubointi tehtiin kanissa tuotetulla ihmisen IgA:han kohdistuvalla -vasta-aineella (anti-IgA-vasta-aine), joka laimennettiin 1:2000 suhteessa 3 % BSA-TBST -liuokseen. Inkubointi kesti yön yli +4 °C:n lämpötilassa sekoittajalla. Inkuboinnin jälkeen kalvo taas pestiin kolmesti TBST-liuoksella viiden minuutin ajan. Sitten suoritettiin sekundäärinen vasta-aineinkubointi. Vasta-aineena oli fluoresoivasti leimattu vuoheessa tuotettu kaniin kohdistuva IRDye 680RD-konjugoitu

vasta-aine (IRDye 680RD-vasta-aine), josta tehtiin 1:5000 laimennos. Inkuboinnin jälkeen kalvo pestiin ja lopuksi laitettiin TBS-liuokseen. Tämän jälkeen kalvo kuvattiin Odyssey CLx –fluoresenssikuvauslaitteella.

TAULUKKO 2. IgA:n Western blottausten optimoinnissa tehdyt muutokset

Kokeilu	Blokkausliuos	Primäärinen vasta-aine	Sekundäärinen vasta-aine
1.	Odyssey-puskuri	1:2000 Kanissa tuotettu ihmisen IgA:han kohdistuva vasta-aine (DAKO) (Rabbit anti-human IgA) /3 % BSA-TBST	1:5000 Vuohessa tuotettu kaniin kohdistuva IRDye 680 RD -konjugoitu vasta-aine (Li-Cor) (Goat anti-rabbit IR-Dye 680RD) /TBST
2.	1. kalvo: Odyssey-puskuri 2. kalvo: 3 % BSA-TBST	1. & 2. kalvot: 1:1000 Anti-IgA-vasta-aine /3 % BSA-TBST	1. kalvo: 1:5000 IRDye 680 RD-vasta-aine / TBST 2. kalvo: 1:2000 Siassa tuotettu kaniin kohdistuva HRP-konjugoitu vasta-aine (DAKO) (HRP-konjugoitu swine anti-rabbit) / 5 % maito-TBST
3.	Odyssey-puskuri	1. & 3. kalvot: 1:2000 Anti-IgA-vasta-aine /1 % BSA-TBST 2. kalvo: 1:1000 Anti-IgA-vasta-aine /1 % BSA-TBST	1. kalvo: 1:5000 IRDye 680 RD-vasta-aine /TBST 2. & 3. kalvot: 1:10000 IRDye 680 RD-vasta-aine /TBST

Kahdessa seuraavassa SDS-PAGE testeissä proteiinimääräksi geelille valikoitui 1 µg ja näytteenkäsittelyssä ei käytetty enää β-merkaptotetanolia, muuten geelija ja kuvaus suoritettiin kuten aikaisemmin. Western blottauksissa testailtiin membraanikalvoille eri blokkaus- ja vasta-aineliuoksia, nämä on kirjattu taulukkoon 2. Mikäli käytettiin HRP-konjugoitua sekundääristä vasta-ainetta, kalvon kuvaus suoritettiin ChemiDoc XRS+ -kemiluminesenssikuvauslaitteella.

3.4 Vasta-ainepuhdistus affiniteetikromatografialla

Vasta-ainepuhdistus suoritettiin laminaarivirtauskaapissa. Vasta-ainepuhdistuksessa ensimmäisenä testattiin TG3-vasta-ainepuhdistusta kasvatusmediumnäytteestä. Mikroputkeen pipetoitiin streptavidini-agarooosi-liuosta, jota sentrifugoitiin 1000 g 2 minuuttia. Pinnalle jäävä supernatanttiliuos pipetoitiin pois, jonka jälkeen resiini eli agarooosi putken pohjalla pestiin 500 µl TBS-liuoksella viisi kertaa. Jokaisen pipetoinnin jälkeen tehtiin sentrifugointi ja edellinen pesuneste poistettiin putkesta. Tämän jälkeen biotinyloitu TG3 yhdistettiin resiiniin. Biotinyloitua TG3-proteiinia laitettiin yhteen resiiniin noin 90 – 100 µg. Lisäksi joukkoon laitettiin 200 µl TBS-liuosta, jolloin liuoksen yhteismäärä oli noin 0,5 ml. Tämän jälkeen inkuboitiin resiiniä pyörittäjällä huoneenlämmössä tunnin ajan.

Inkuboinnin jälkeen resiini sentrifugoitiin putken pohjalle ja otettiin supernatantti (sitoutumaton TG3) talteen. Seuraavaksi resiiniä pestiin useita kertoja 500 µl TBS-liuosta, joka sentrifugoitiin ja otettiin supernatantti pois. Pesujen jälkeen supernatantista mitattiin kyvetissä spektrofotometrillä absorbanssi 280 nm aallonpituudella, jotta nähtiin, kuinka pesu on onnistunut. Pesun jälkeen absorbanssiarvon tuli olla lähellä nollaa. Seuraavaksi kasvatusmediumnäyte laimennettiin 1:1 TBS-liuoksella ja laitettiin resiiniä sisältävään putkeen. Näyteinkubointi suoritettiin pyörittäjällä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen resiini sentrifugoitiin putken pohjalle ja otettiin supernatantti (resiiniin sitoutumaton osa) talteen. Sitten suoritettiin pesut putkessa 3x 1 ml TBS-liuosta ja 3x 1 ml vettä ja mitattiin absorbanssi kyvetissä spektrofotometrillä 280 nm aallonpituudella.

Eluutiot otettiin talteen neljään eri mikroputkeen. Putken pohjalle laitettiin valmiiksi 5 µl 1 M Tris-HCl -liuosta, pH:ta tasapainottamaan. Eluutiot suoritettiin lisäämällä resiiniä sisältävään putkeen 200 µl 20 mM HCl -liuosta. Eluutioista mitattiin absorbanssit. Seuraavaksi eluutiot ajettiin geelille SDS-PAGE:lla. Western blottaus jätettiin tekemättä, sillä geelillä ei näkynyt eluutioiden vyöhykkeitä. Tulosten perusteella tehtiin muutoksia seuraavaan vasta-ainepuhdistukseen.

Seuraava vasta-ainepuhdistus tehtiin seeruminäytteelle ja siinä puhdistettiin TG2-vasta-aineita. Alku suoritettiin samalla tavalla kuin edellisessä puhdistuksessa, mutta resiiniin yhdistettiin tällä kertaa biotinyloitua TG2 ja ennen näyteinkubointia resiini siirrettiin pylväaseen TBS-liuoksen avulla. Seeruminäytteelle tehtiin 1:10 laimennos TBS-liuoksella.

Seerumia oli käytettävissä noin 1 ml. Pylväinä käytettiin Poly-Prep -kromatografiapylväitä (Bio-Rad). Näytelaimennospylvästä inkuboitiin kahden tunnin ajan huoneenlämmössä pyörittäjällä (kuva 4).



KUVA 4. Pylväs näyteinkuboinnissa pyörittäjällä. (Laura Ahonen, 2018)

Inkuboinnin jälkeen pylvään läpi tullut seeruminäytelaimennos otettiin talteen ja tehtiin resiinille pesut. Pesut tehtiin kolmeen kertaan 1 ml TBS-liuosta ja tämän jälkeen vielä kolme kertaa 1 ml vettä. Vesipesun jälkeen tarkastettiin absorbanssi, jotta saatiin selville resiinin puhdistuminen. Absorbanssin arvon ollessa lähellä nollaa resiini oli riittävän puhdas. Eluutioputkiin laitettiin jokaiseen 7 μ l 1 M Tris-HCl -liuosta. Tämän jälkeen kerättiin eluutiot. Pylvääseen pipetoitiin 200 μ l 20 mM HCl -liuosta ja kerättiin se eluutioputkeen. Tämä toistettiin noin viisi kertaa. Lopuksi mitattiin eluutioiden absorbanssit.

Samalla menetelmällä testattiin vielä seeruminäytteillä TG2- ja TG3-vasta-ainepuhdistusta. Menetelmään ei näissä vaiheissa tehty enää muutoksia. Lopuksi testattiin vielä, saiko pylvään läpi tulleesta seeruminäytteestä puhdistettua lisää vasta-aineita käyttämällä samaa pylvästä uudestaan. Työssä resiini oli jo pylväässä, joten aloitettiin laittamalla näytelaimennos uudelleen pylvääseen ja inkuboimalla sitä. Tästä vaiheesta menetelmä suoritettiin yllä mainitulla tavalla loppuun.

3.5 Proteiinikonsentraation määrittäminen

Vasta-ainepuhdistuksen eluutioiden proteiinikonsentraatiota mitattiin ensin Bradford -menetelmällä. Menetelmässä käytettiin ensin itse tehtyä Bradfordin reagenssia. Tämän jälkeen testattiin vielä kaupallista Bradfordin reagenssia. Bradford -testien jälkeen yritettiin määrittää proteiinikonsentraatiota valmiilla Biorad DC protein -kitillä.

Bradford -menetelmää varten valmistettiin Bradfordin reagenssi, jonka ohje löytyy liitteestä 1. Lopuksi reagenssi suodatettiin suodatinpaperilla. Standardina käytettiin 1 mg/ml BSA-liuosta, josta tehtiin 5 standardia. Pitoisuudet olivat 0,0125 mg/ml – 0,1 mg/ml. Näytteet ja standardit pipetoitiin 96-kuoppalevyille. Näytteet laimennettiin 1:20 suhteen. Standardien ja näytteiden päälle pipetoitiin Bradford -reagenssia. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaismäärittäminen. Mittaus suoritettiin Multiskan EX -laitteella ja aallonpituutena oli 595 nm.

Bradford -menetelmää testattiin vielä kaupallisella Bradfordin reagenssilla ja kahdella eri standardisuoralla. Ensimmäisellä standardisuoralla, 0,05 mg/ml – 0,5 mg/ml, käytettiin laimennettua Bradfordin reagenssia. Standardeista ja näytteistä tehtiin rinnakkaismäärittäykset. Toisella standardisuoralla, 8 µg/ml – 80 µg/ml, Bradfordin reagenssia lisättiin kuoppiin laimentamattomana. Mittaus suoritettiin samalla laitteella ja aallonpituudella kuin yllä.

Seuraavaksi testattiin proteiinikonsentraation määrittäminen Bio-Rad:n DC Protein Assayn avulla. Paketissa oli kaikki tarvittavat liuokset valmiina, työliuos A' piti valmistaa itse S- ja A-reagenssista. Standardit olivat 0,005 mg/ml – 0,125 mg/ml välillä. Standardit valmistettiin valmiista BSA-varastoliuoksesta. Näytteinä oli vasta-ainepuhdistuksesta eluutioita. Menetelmää testattiin kahdella eri tavalla, joissa käytettiin eri näytemääriä. Kuoppalevyä inkuboitiin 15 minuuttia ja sen jälkeen tulokset mitattiin Multiskan FC -laitteella 750 nm aallonpituudella.

4 VASTA-AINEPUHDISTUKSEN SUORITUS

4.1 Vasta-ainepuhdistus

Vasta-ainepuhdistuksia tehtiin optimoiduilla menetelmillä keliaakikoiden ja ihokeliaakikoiden seeruminäytteille ja muutamalle kasvatusmediumnäytteelle. Aluksi TG2- ja TG3-proteiineja piti biotinyloidaa lisää. Biotinyloinnin jälkeen tuotteille tehtiin geelisuodatus valmiilla Zepa Spin Desalting -pylväillä. Biotinyloidut ja geelisuodatetut TG2- ja TG3-proteiinit ajettiin geelille ja tehtiin SDS-PAGE ja Western blottaus. Muina näytteinä oli biotinyloidut TG2 ja TG3, joita ei oltu geelisuodatettu ja puhtaat biotinyloimattomat TG2 ja TG3 sekä positiivisena kontrollina biotinyloitu vasta-aine.

SDS-PAGE suoritettiin optimoinnin tapaan, molekyylipainomarkkereina käytettiin PageRuler Plus esivärjättyä molekyyli-markkeria ja PageRuler Broad Range värjäämätöntä molekyyli-markkeria. Näytteille tehtiin näytteenkäsittely samalla tavalla kuin optimoinnissa. Proteiinimääränä geelille käytettiin 0,2 µg näytettä. SDS-PAGE -ajossa käytettiin optimoinnin tapaan 200 V:a ja kesto oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen geeli kuvattiin ja proteiinit siirrettiin Trans-blot Turbo Mini PVDF -membraanikalvolle Turbo-blot -laitteella, käyttäen Mixed MW -ohjelmaa. Kalvon blokkauksen ja konjugaatti-inkubointi suoritettiin optimoinnin tavoin käyttäen 1:10000 konjugaattilaimennosta. Lopuksi kalvo kuvattiin ECL-käsittelyn jälkeen ChemiDoc XRS+ -laitteella.

Kun oltiin saatu testattua, että TG2- ja TG3-proteiinit olivat biotinyloituneet, voitiin aloittaa vasta-ainepuhdistukset. Ensin valmistettiin TG3-pylväs ja näytteelle suoritettiin TG3-vasta-ainepuhdistus. Puhdistus suoritettiin optimoinnissa esitetyllä tavalla pylväessä. TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen pylvään läpi tulleelle näytteelle tehtiin TG2-vasta-ainepuhdistus.

4.2 Eluutioiden analysointi

4.2.1 SDS-PAGE ja Western blottaus

Puhdistuksen jälkeen valituille eluutioille tehtiin SDS-PAGE ja IgA-Western blottaus. Näytteiksi Western blottaukseen valittiin pääsääntöisesti 3-5 eluutiota jokaisesta puhdistuksesta. Yhdelle geelille näytteiksi tuli molekyyli­markkerit, kaupallinen IgA -kontrolli ja samasta seerumista tehdyt TG2- ja TG3-vasta-ainepuhdistuksien eluutiot. Näytteitä ei laimennettu, joukkoon laitettiin pelkästään Laemmli-puskuria, jonka jälkeen näytteitä inkuboi­tiin lämpöhauteessa + 96 °C:n lämpötilassa kymmenen minuutin ajan.

Näytteet, kontrolli ja molekyyli­markkerit pipetoitiin 4 – 20 % Mini-Protean TGX Stain-free Precast -geelille. SDS-PAGE-ajo suoritettiin optimoidulla tavalla. Geeli kuvattiin ja proteiinit siirrettiin Trans-blot Turbo Mini PVDF -kalvolle. Western blottaus suoritettiin loppuun optimoidulla tavalla, joka on kuvattu yllä. Lopuksi kalvo kuvattiin fluoresenssi­kuvauslaitteella.

4.2.2 TG3-vasta-aine-ELISA

Absorbanssin ja IgA-Western blottauksen tulosten perusteella valittiin eluutioita, joille tehtiin TG3-vasta-aine (ab)-ELISA. Anti-heTG IgA ELISA -menetelmällä (Immuno­diagnostik) mitattiin vasta-ainepuhdistuksissa saatujen eluutioiden TG3-vasta-ainepitoi­suuksia. Työ suoritettiin anti-heTG IgA-ELISA -ohjeen mukaan käyttäen pesuihin Ther­moFisher Wellwash -laitetta (kuva 5), jonka pesuohjelma oli 3 x 400 µl. Paketti sisälsi kaiken tarvittavan, mutta standardit, kontrollit ja pesuliuokset laimennettiin itse. Seeru­mieluutioille käytettiin 1:250 laimennosta ja pylvään läpi tulleille seerumilaimennoksille käytettiin 1:25 laimennosta, sillä ne oli jo valmiiksi laimennettu 1:10 pylvääseen laitetta­essa.



KUVA 5. ELISA-levyn pesuissa käytetty ThermoFisher Wellwash- laite. (Laura Ahonen, 2018)

Ennen pipetoiteja kuoppalevy pestiin pesulaitteella. Sitten kuoppiin pipetoitiin standardeja ja kontroleja rinnakkaisina sekä laimennettuja näytteitä. Tämän jälkeen suoritettiin inkubointi tasosekoittajalla tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen tehtiin levyille pesu ja sen jälkeen kuoppiin lisättiin laimennettua konjugaattia, jonka jälkeen oli tunnin inkubointi. Inkuboinnin jälkeen tehtiin taas pesu ja kuoppiin pipetoitiin substraattia. Substraatti-inkubointi tehtiin pimeässä folion alla 15 minuuttia, jonka jälkeen lisättiin pysäytysliuosta. Absorbanssit mitattiin Multiskan FC -laitteella 450 nm aallonpituudella. Laboratorion muu henkilökunta teki valituille eluutioille TG2-ab-ELISA:n, jossa mitattiin eluutioiden TG2-vasta-ainepitoisuuksia.

4.2.3 IgA- ja IgG-ELISA -menetelmät

Eluutioille tehtiin lopuksi vielä IgA ja IgG -testit, jotta saatiin varmistus, onko puhdistetut eluutiot IgA- vai IgG-luokkaa. Nämä testit tehtiin ELISA-menetelmällä. IgA-ELISA:ssa käytössä oli Human IgA Platinum ELISA -testikitti (Invitrogen). Aluksi 20x pesuliuoksen varastoliuoksesta ja 20x määritysliuoksen varastoliuoksesta tehtiin yksinkertaiset laimennokset. HRP-konjugaatti piti myös laimentaa 1:100 1x määritysliuoksella. Standardit val-

mistettiin IgA:n standardiliuoksesta, jonka konsentraatio oli 200 ng/ml. Standardeja valmistettiin seitsemän eri vahvuutta (1,6 – 100 ng/ml). Nollanäytteenä käytettiin 1x määrittelyliuosta. Näytteille tehtiin 1:10000, 1:5000, 1:2000, 1:500 ja 1:50 laimennoksia, riippuen niiden vasta-ainepitoisuuksista. Laimennokset tehtiin 1x määrittelyliuoksella.

Kuoppalevy pestiin aluksi 1x pesuliuoksella käyttäen ThermoFisher Wellwash -laitetta, jonka pesuohjelma oli 3x 400 µl. Sitten nollanäytettä ja standardeja pipetoitiin kuoppalevyille. Kaikista standardeista tehtiin rinnakkaismääritys. Kaikkiin näytekuoppiin lisättiin määrittelyliuosta ja sen jälkeen pipetoitiin laimennettua näytettä kuoppaan. Näytteiden jälkeen kaikkiin kuoppiin pipetoitiin HRP-konjugaattia. Tämän jälkeen levyä inkuboitiin tunti sekoittajalla.

Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin samalla pesuohjelmalla kuin alussa. Pesun jälkeen kuoppiin lisättiin substraattia, tämän annettiin vaikuttaa pimeässä puoli tuntia. Inkuboinnin jälkeen kuoppiin lisättiin lopetusliuosta ja näytteiden absorbanssit mitattiin Multiskan FC -laitteella 450 nm aallonpituudella. Standardien absorbanssien ja tunnettujen pitoisuuksien perusteella piirrettiin standardisuora, josta saatiin laskettua näytteille pitoisuudet.

IgG-ELISA mitattiin Human total IgG Platinum ELISA -testikitillä (Invitrogen). Kuten IgA -testikitillä, myös tässä pesuliuos ja määrittelyliuos laimennettiin 20x liuoksesta yksinkertaiseksi liuokseksi. Laimennos tehtiin samalla tavalla kuin IgA -ELISA:ssa. HRP-konjugaatista tehtiin myös 1:100 laimennos. Standardit (0,002 µg/ml – 0,1 µg/ml) valmistettiin samaan tapaan kuin edellä IgA-ELISA:ssa. Näytteille tehtiin 1:50 ja 1:10 laimennokset, laimennokset tehtiin 1x määrittelyliuokseen.

Kuoppalevy pestiin taas ennen käyttöä ThermoFisher Wellwash -laitetta, jonka pesuohjelma oli 3x 400 µl. Standardit ja nollaliuos ja laimennetut näytteet pipetoitiin kuoppiin. Tämän jälkeen kaikkiin kuoppiin pipetoitiin HRP-konjugaattia. Levyä inkuboitiin sekoittajalla tunnin ajan, jonka jälkeen se pestiin taas samalla pesuohjelmalla. Pesun jälkeen lisättiin jokaiseen kuoppaan substraattia. Suoritettiin inkubointi pimeässä puolen tunnin ajan. Lopuksi lisättiin lopetusliuosta. Absorbanssit luettiin Multiskan FC -spektrofotometrillä, jonka aallonpituus oli 450 nm. Standardien absorbanssien ja tunnettujen pitoisuuksien avulla piirrettiin standardisuora ja siitä laskettiin pitoisuudet eluutioille.

4.3 Puskurinvaihto

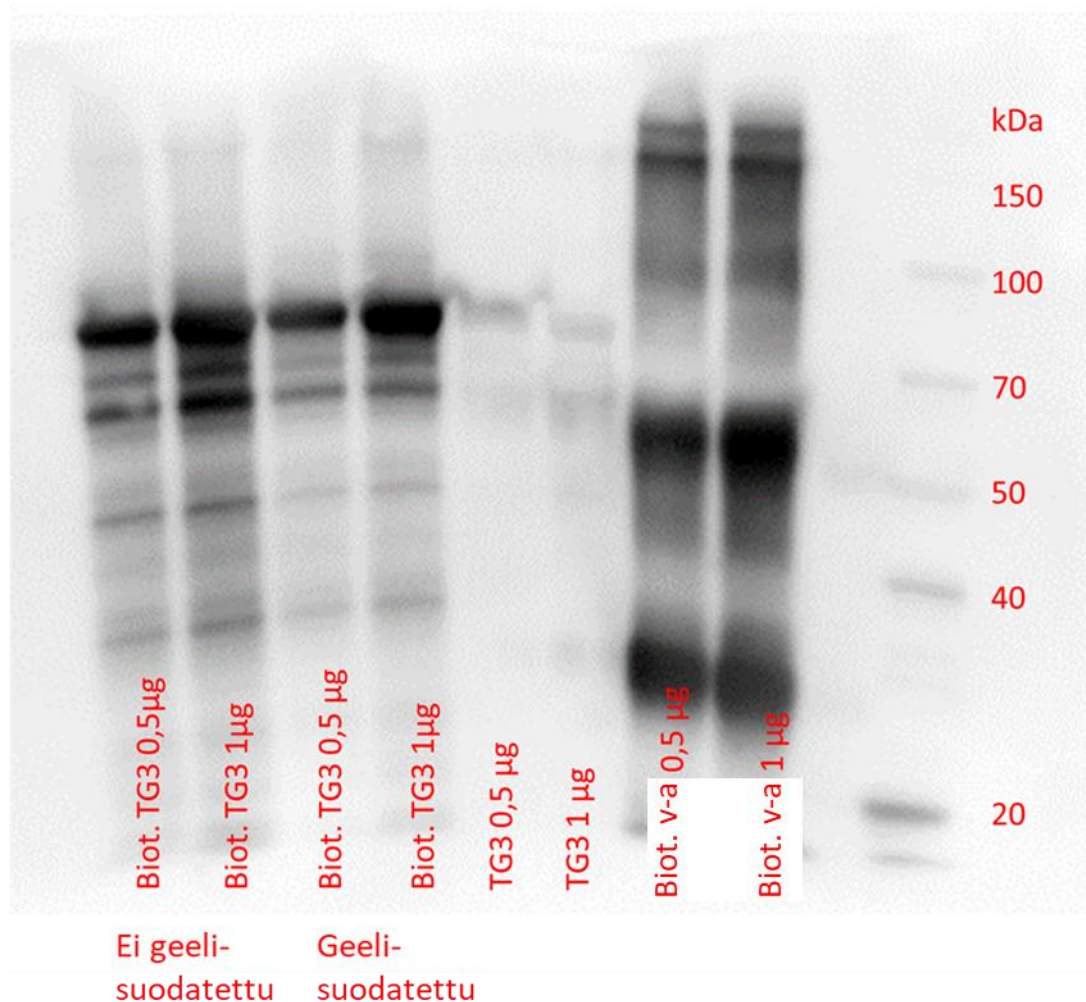
Lopuksi eluutioille tehtiin puskurinvaihto kromatografiolla jatkotutkimuksia, muun muassa massaspektrometriaa varten. Eluutioiden puskuriksi haluttiin vaihtaa PBS-liuos (liite 1) eluutioliuksen (20 mM HCl/1 M Tris-HCl) tilalle. Puskurinvaihto suoritettiin 2 ml tai 5 ml Zepa Spin Desalting -pylväillä.

Puskurinvaihtopylväs laitettiin putkeen ja sitä sentrifugoitiin 1000 g:n voimalla kaksi minuuttia, jolloin varastoliuos lähti pylväästä pois. Sitten pylvääseen lisättiin puskuria. Suoritettiin sentrifugointi 1000 g:n voimalla kahden minuutin ajan. Läpi tullut neste kaadettiin pois ja puskurin lisäysvaihe toistettiin kolmeen kertaan. Puskurin lisäyksen jälkeen pylvääseen pipetoitiin näyte. Pienempään (2 ml) pylvääseen näytemääräksi sopi 200 – 700 µl ja isomman (5 ml) näytemäärä oli 500 – 2000 µl. Jos näytettä oli vähemmän kuin 350 µl, 2 ml:n pylvääseen piti lisätä vielä 40 µl lisää nestettä. Viiden millilitran pylvääseen lisättiin nestettä 100 µl, jos näytettä oli vähemmän kuin 750 µl. Pylvästä sentrifugoitiin kahden minuutin ajan 1000 g:n voimalla, jolloin tapahtui puskurin vaihto. Tämän jälkeen eluutiot pipetoitiin takaisin mikroputkiin ja pakastettiin.

5 TULOKSET

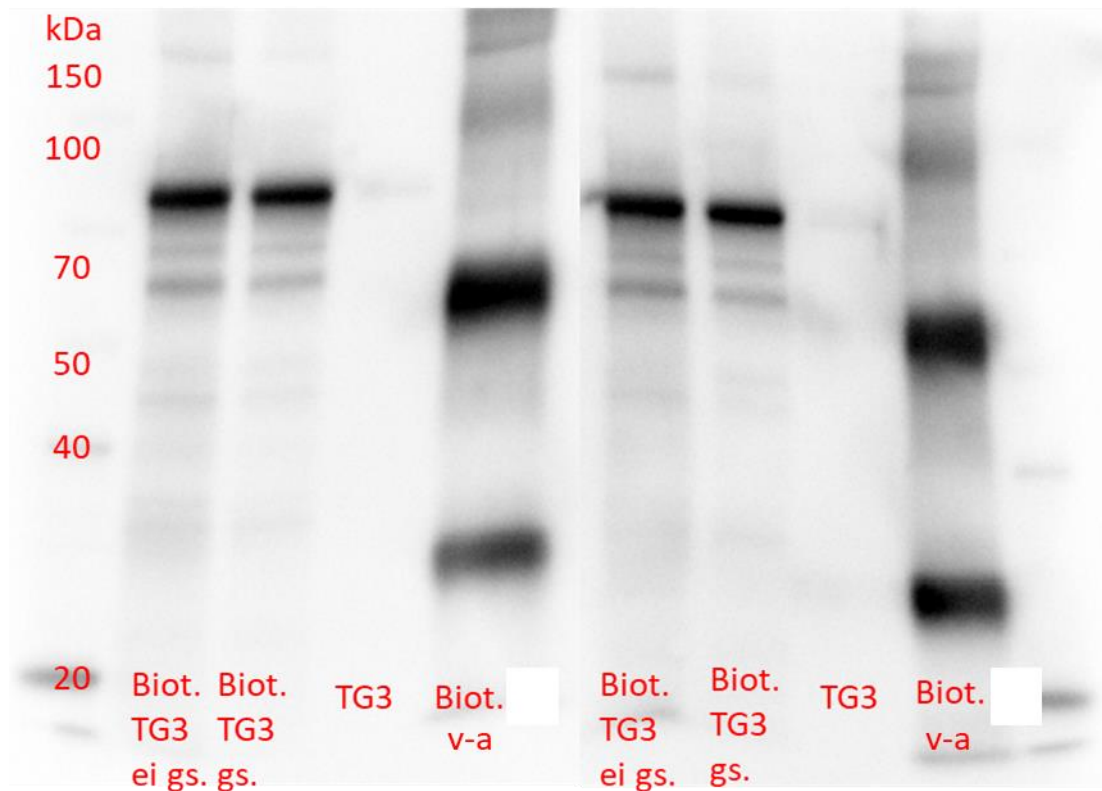
5.1 Biotinyloitujen proteiinien SDS-PAGE:n ja WB:n optimoinnin tulokset

Geelille pipetoidut proteiinimäärät olivat liian suuria ensimmäisessä biotinyloitujen proteiinien SDS-PAGE:ssa. Tämä huomattiin kuvasta 6, missä oli ensimmäisen biotinyloinnin Western blottaus. Proteiinien värjäytyneet vyöhykkeet olivat epäselviä ja suttuisia. Geelisuodatettujen ja biotinyloitujen TG3-proteiinien kohdat olivat kuitenkin selvempiä kuin ei geelisuodatettujen. Näytemääränä 1 µg oli aivan liikaa, sillä vyöhykkeet olivat paisuneet suuriksi. Kalvolta kuitenkin huomattiin, että biotinylointi oli onnistunut, sillä biotinyloitujen TG3-proteiinien vyöhykkeet näkyivät selkeästi, noin 78 kDa kohdalla, verrattuna ei-biotinyloituihin TG3-proteiineihin.



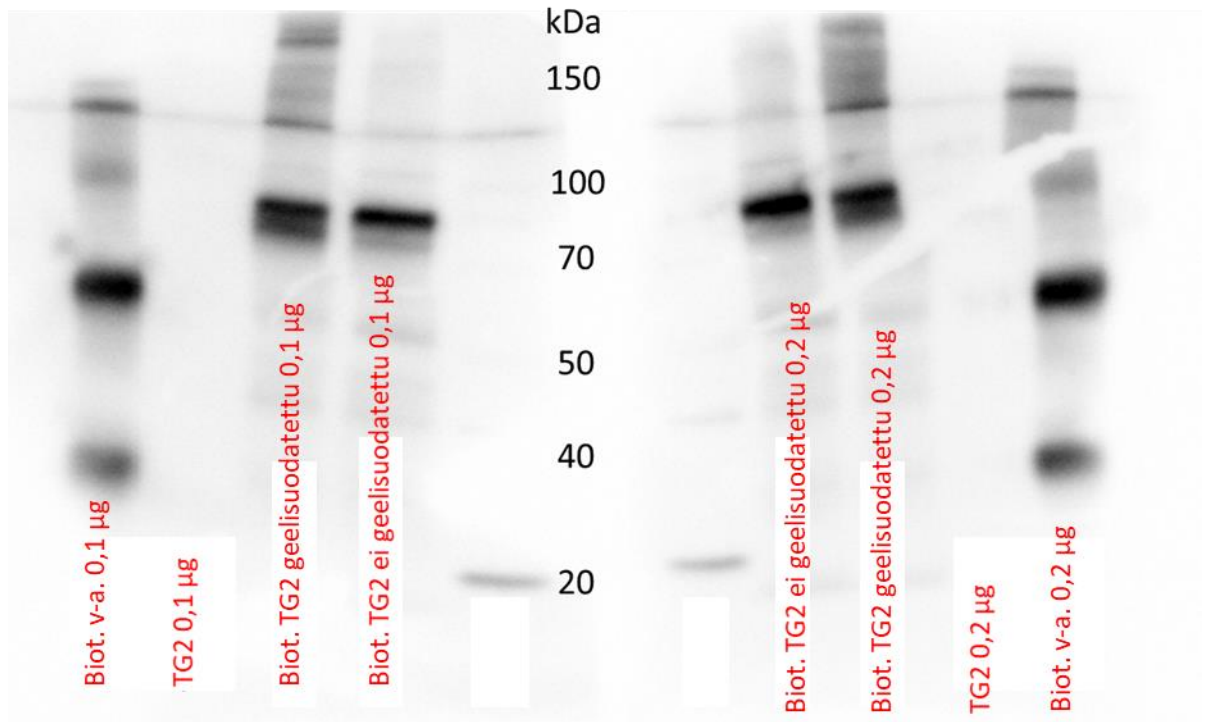
KUVA 6. Ensimmäinen WB-kuva biotinyloinnin optimoinnista. Geelille testattiin proteiinien eri määriä. Positiivisena kontrollina käytettiin biotinyloitua vasta-ainetta (biot. v-a).

Seuraavaan biotinyloitujen tuotteiden SDS-PAGE:en pipetoitujen näytteiden proteiinin määrän muutos oli huomattavasti sopivampi kuin aiemmin. Proteiinin määränä oli käytössä nyt 0,2 μg . Kuvasta 7 huomattiin, kuinka proteiinien (Biot. TG3 ei. gs. ja Biot. TG3 gs.) vyöhykkeet olivat selkeämpiä ja tarkempia kuin edellisessä kuvassa 6. Konjugaattilaimennoksista huomattiin 1:10000 (vasen puoli kuvassa) olevan hiukan tarkempi ja taustaa ei ollut niin paljoa kuin 1:6000 (oikea puoli kuvassa) laimennoskuvassa.



KUVA 7. Proteiinin määrä geelille oli 0,2 μg ja konjugaattilaimennokset vasemmalle puolelle oli 1:10000 ja oikealle puolelle 1:6000. Ei gs; ei geelisuodatettu, gs; geelisuodatettu ja v-a; vasta-aine

Seuraavaksi samaa testattiin vielä biotinyloituille TG2-proteiineille. Kuvassa 8 käytettiin proteiinin määrinä 0,1 μg ja 0,2 μg , niissä ei ollut huomattavaa eroa. Kuvasta 8 huomattiin, että biotinylointi TG2-proteiinille oli myös onnistunut, sillä biotinyloitujen proteiinien (Biot. TG2 -vyöhykkeet) vyöhykkeet näkyivät selkeästi verrattuna ei biotinyloitujen proteiinien vyöhykkeisiin (TG2).



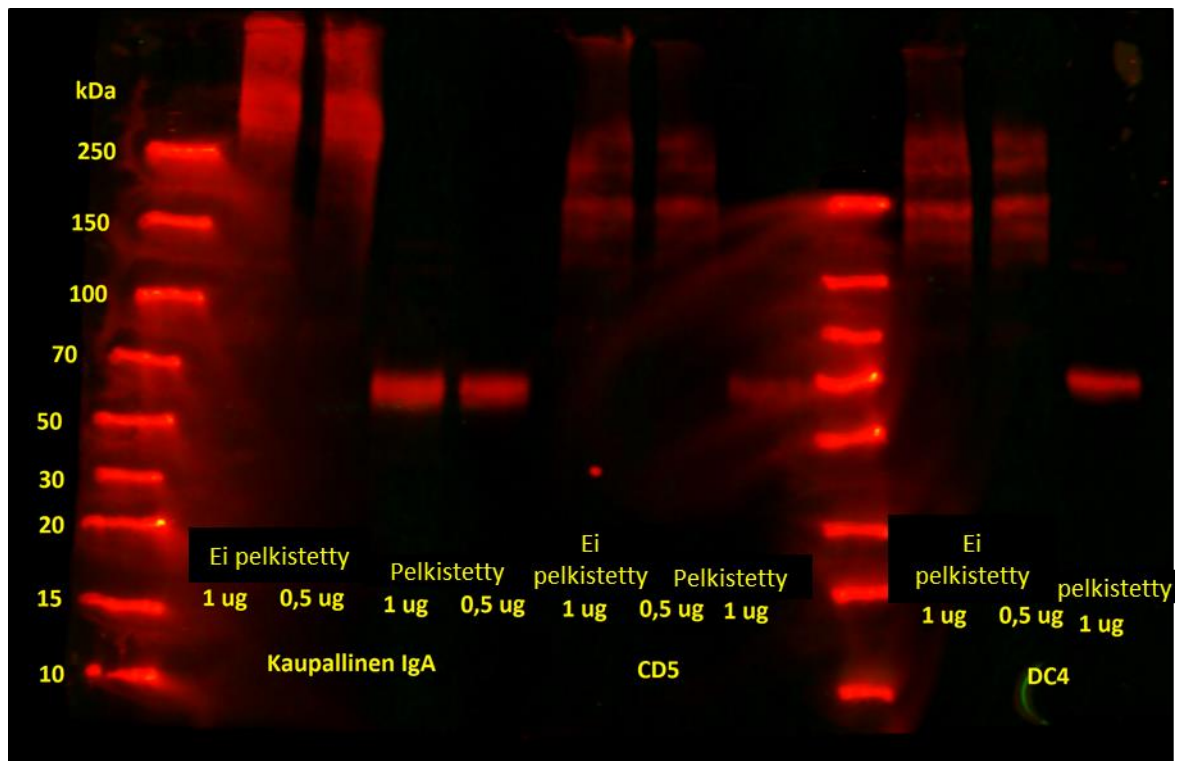
KUVA 8. Biotinyloidun TG2 -proteiinin SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimointia. TG2 molekyylipaino on noin 78 kDa ja v-a; vasta-aine.

Konjugaattilaimennos 1:10000 todettiin parhaimmaksi näissä testeissä ja SDS-PAGE:en pipetoitavien näytteiden proteiinimääränä käytettiin jatkossa 0,1 µg. Biotinylointi saatiin onnistumaan sekä TG3- että TG2-proteiineille. Biotinyloitujen tuotteiden SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimointi näin ollen siis onnistui.

5.2 IgA:n SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimoinnin tulokset

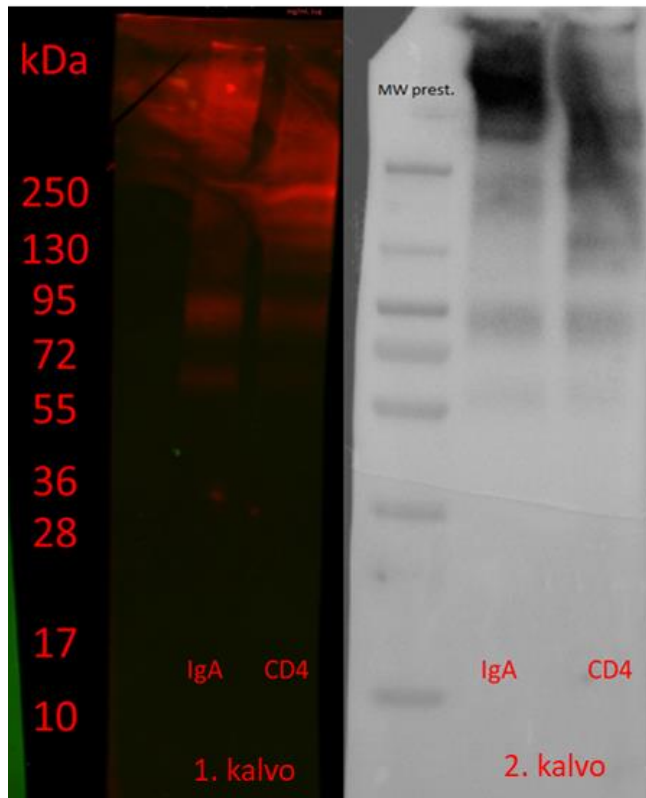
Ensimmäisessä testissä huomattiin, että pelkistettyjen (käytettiin β -merkaptotetanolia) ja pelkistämättömien (ei käytetty β -merkaptotetanolia) näytteiden SDS-PAGE toimi. Jatkossa kuitenkin haluttiin käyttää pelkistämättömiä näytteitä, koska haluttiin nähdä erikseen dimeerinen ja monomeerinen IgA. Proteiinimääränä 1 µg oli parempi kuin 0,5 µg, sillä sen vyöhykkeet näkyivät voimakkaammin kuvassa 9. Kuvassa 9 proteiinivyöhykkeet olivat selkeästi näkyvissä, mutta molekyyli-markkerit olivat hieman levinneet ja sotkuiset. Testissä käytettiin positiivisena kontrollina kaupallista IgA:ta ja näytteinä seerumista aiemmin puhdistettuja IgA-näytteitä. CD5 tarkoittaa keliakiapotilaan puhdistettua IgA-näytettä ja DC4 on tautikontrolli. Kuvassa 9 näiden vyöhykkeiden huomattiin toimivan

samalla tavalla kaupallisten IgA-vyöhykkeiden kanssa eli positiivisena kontrollina käytetyn kaupallisen IgA:n ja näytteiden IgA-vyöhykkeet näkyvät samalla kohdalla. Pelkistämättömien näytteiden IgA-vyöhykkeet näkyvät noin 150-250 kDa kohdalla ja pelkistettyjen näytteiden IgA-vyöhykkeet näkyvät noin 70 kDa kohdalla.



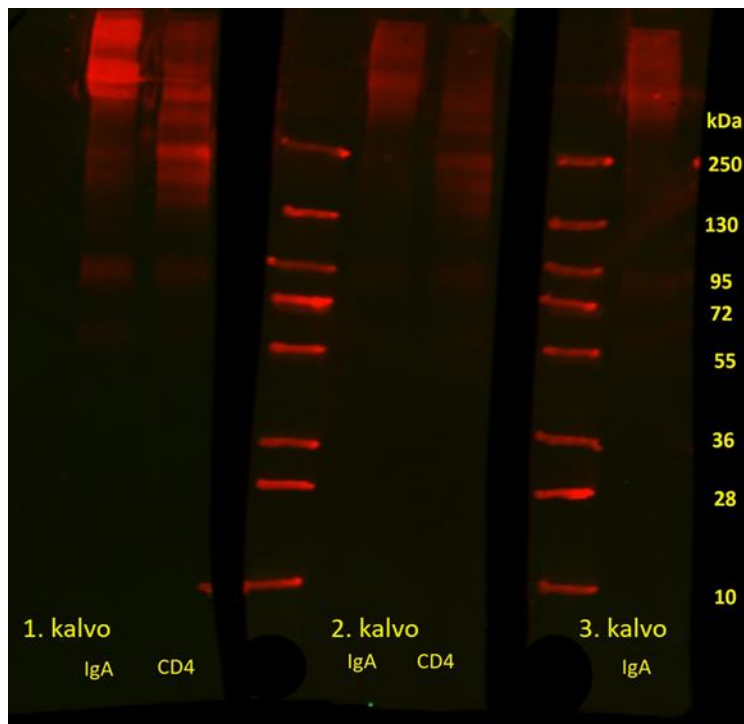
KUVA 9. Ensimmäisen Western blottauksen fluoresenssikuva. Näytteinä käytettiin aiemmin seerumista puhdistettuja IgA-näytteitä, CD5; keliakiapotilas ja DC4; tautikontrolli. Kaupallinen IgA toimi positiivisena kontrollina.

Toisessa testissä testattiin eri vasta-aineita ja niiden laimennoksia sekä sitä, kumpi toimi paremmin, fluoresenssi- vai kemiluminesenssi-menetelmä. Kuvassa 10 kerrotaan vastaaineet ja niiden laimennokset. 1. kalvo kuvattiin fluoresenssilaitteella ja 2. kalvon kuvauksessa käytettiin tehostettua kemiluminesenssitunnistusta. Kuvassa molempien kalvojen vyöhykkeet näyttävät sotkuisilta ja epäselviltä.



KUVA 10. 1. kalvolla käytettiin blokkauksessa Odyssey-puskuria ja 2 kalvolla 3 % BSA-TBST-liuosta. Primäärinenä vasta-aineena kalvoilla käytettiin 1:1000 anti-IgA-vasta-ainetta. Sekundäärisinä vasta-aineina käytettiin 1. kalvolle 1:5000 IRDye 680RD-vasta-ainetta ja 2. kalvolle 1:2000 siassa tuotettua kaniin kohdistuvaa HRP-konjugoitua vasta-ainetta (HRP-vasta-aine). CD4; keliakiapotilas.

Kolmannessa Western blottauksessa testattiin fluoresenssimenetelmällä vasta-ainelaimennoksia lisää (kuva 11). 1. kalvolla näytteiden vyöhykkeet näkyivät selkeästi ja kirkkaana. 2. ja 3. kalvolla näytteiden vyöhykkeet näkyivät heikosti ja kalvo oli vähän sumea.



KUVA 11. Kaikilla kalvoilla käytettiin blokkaukseen Odyssey-puskuria. Primäärisenä vasta-aineina 1. ja 3. kalvolla käytettiin 1:2000 anti-IgA-vasta-ainetta ja 2. kalvolla 1:1000 anti-IgA-vasta-ainetta. Sekundäärisenä vasta-aineena oli 1. kalvolla 1:5000 IR-Dye 680RD-vasta-aine, 2. ja 3. kalvoilla 1:10000 IRDye 680RD-vasta-aine. CD4; ke-liakiapotilas, kaupallista IgA:ta käytettiin positiivisena kontrollina.

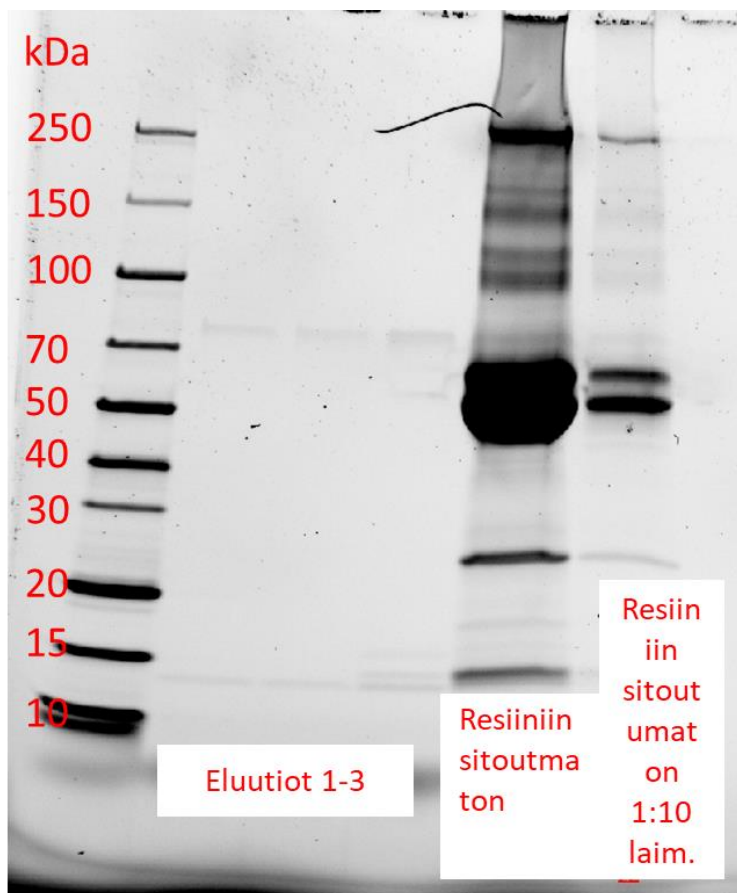
SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimointi onnistui. Näillä optimoinnin tuloksilla suoritettiin jatkossa puhdistetuille eluutioille SDS-PAGE ja Western blottaus. SDS-PAGE:ssa käytettiin näytteenkäsittelyssä pelkkää Laemmli-puskuria, ilman β -merkaptoetanolia. Western blottauksessa päädyttiin käyttämään fluoresenssimenetelmää ja otettiin näin ollen käyttöön blokkauksliuokseksi Odyssey-puskuri. Parhaimmaksi vasta-aineyhdistelmäksi IgA:n tutkimiseen havaittiin primäärisenä vasta-ainelaimennoksena 1:2000 anti-IgA-vasta-aine (Rabbit anti-human IgA (DAKO)) ja sekundäärisenä vasta-ainelaimennoksena 1:5000 IRDye 680 RD-vasta-aine (Goat anti-rabbit IRDye 680 RD (Li-Cor)).

5.3 Vasta-ainepuhdistuksen optimoinnin tulokset

Kuvassa 12 on ensimmäisen kasvatusmediumin vasta-ainepuhdistuksen jälkeen eluutioille tehty SDS-PAGE:n geelikuva. Vasta-ainepuhdistus tehtiin kokonaisuudessaan mikroputkessa. Kuvasta huomattiin, että puhdistus oli epäonnistunut. Eluutioiden vyöhykkeet

eivät näkyneet geelillä ollenkaan, mikä tarkoittaa sitä, että puhdistuksessa ei eluoinut vasta-ainetta mukaan. Vasta-ainepuhdistuksen eluutioiden vyöhykkeiden tulisi näkyä pääosin > 100 kDa pelkistämättömillä näytteillä (Iversen ym. 2017). Eluutioiden kohdalla oli pienet vyöhykkeet < 100 kDa kohdalla, jotka olivat mahdollisesti TG3-proteiinia (78 kDa).

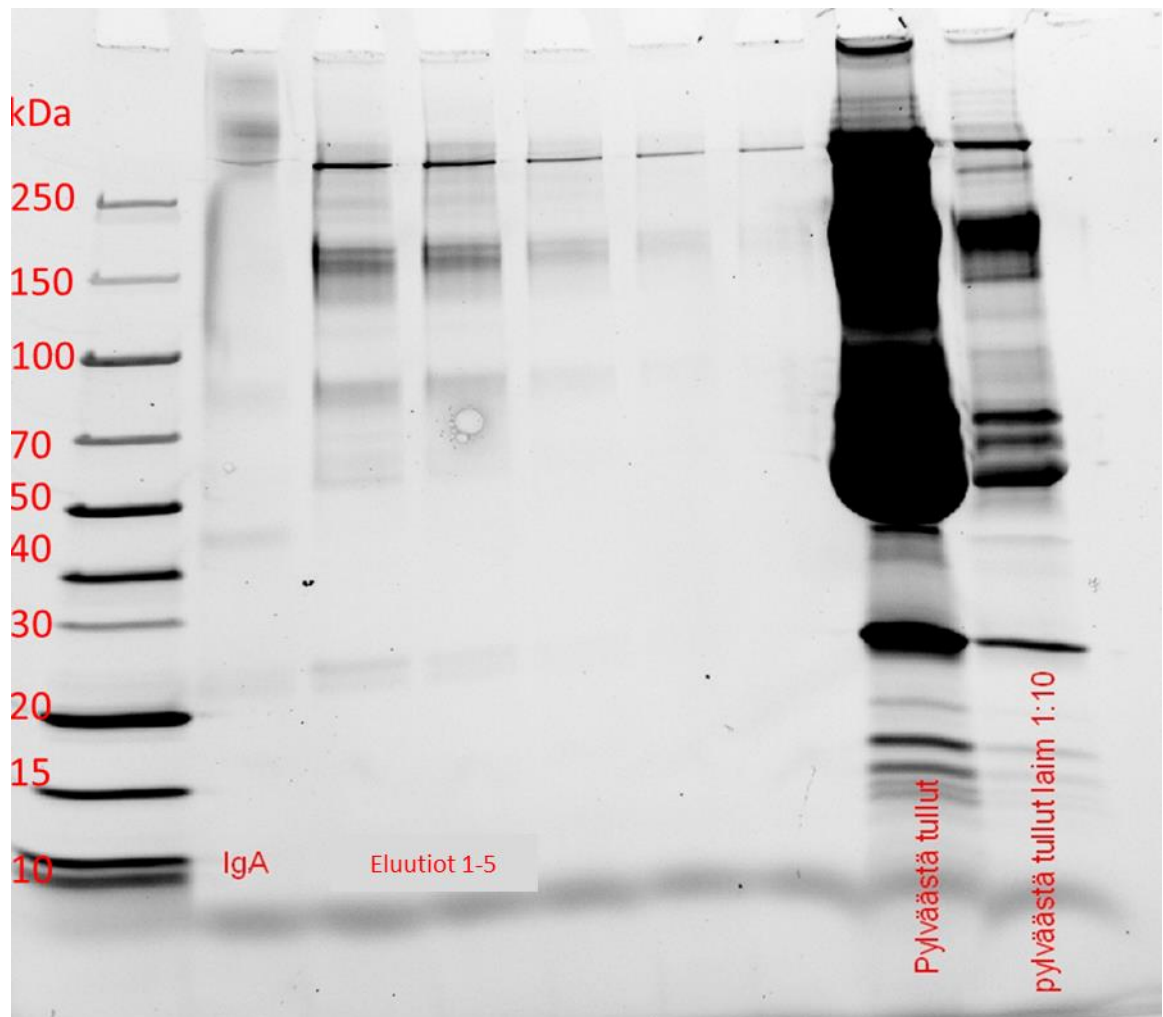
Resiiniin sitoutumattoman kasvatusmediumin vyöhykkeet vaikuttivat siltä, että niiden joukossa oli edelleen runsaasti vasta-ainetta. 50 kDa kohdalla olleen ison vyöhykkeen kohdalla voi olla kaikenlaisia proteiineja, jotka ovat mukana ohutsuolen koepalan kasvatusmediumissa, mutta > 100 kDa kohdalla olevat vyöhykkeet voivat olla vasta-ainetta. Seuraavaan puhdistukseen muutettiin vasta-ainepuhdistuksen tekotapaa.



KUVA 12. Ensimmäisen vasta-ainepuhdistuksen eluutioiden SDS-PAGE, kasvatusmedium näytteenä.

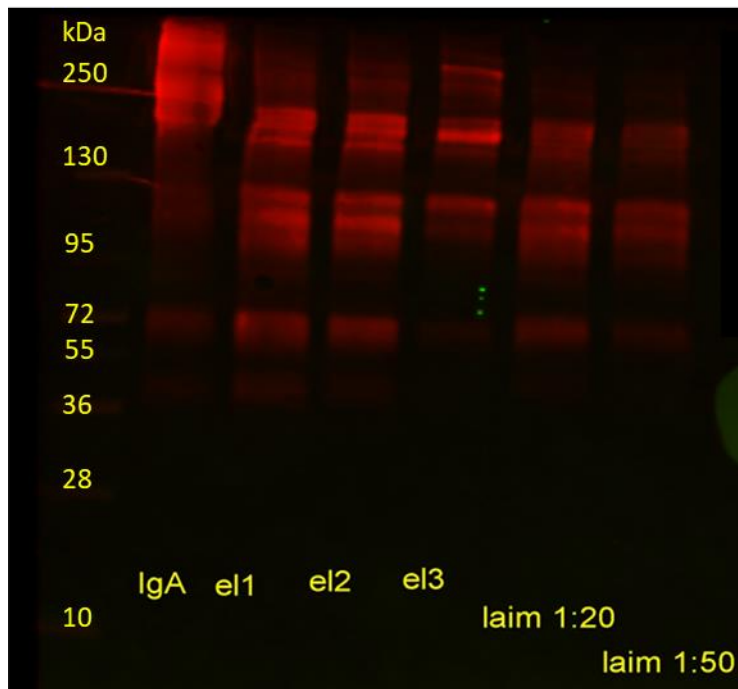
Seuraavaan vasta-ainepuhdistukseen puhdistustekniikkaa vaihdettiin niin, että resiini siirrettiin kromatografiapylvääseen ennen näyteinkubointia. Lisäksi näytteenä oli seerumi. Kuvasta 13 huomattiin, että nyt eluutioiden mukana oli vasta-ainetta, sillä eluutioiden vyö-

hykkeet (kuvassa eluutiot 1-5) näkyivät selkeästi etenkin > 100 kDa:n alueella. Kontrollina SDS-PAGE:ssa käytettiin kaupallista IgA:ta, jonka vyöhyke geelillä näkyi osittain samassa kohdassa kuin eluutiot. Voitiin siis todeta, että tällä menetelmällä vasta-ainepuhdistus toimi seeruminäytteelle. Läpi tullessa seerumilaimennoksessa oli kuvan mukaan vielä runsaasti puhdistettavaa vasta-ainetta, mutta koska kyseessä oli seerumi, mukana oli paljon muita proteiineja, sekä mahdollisesti pylvästä irronnutta TG2-proteiinia.



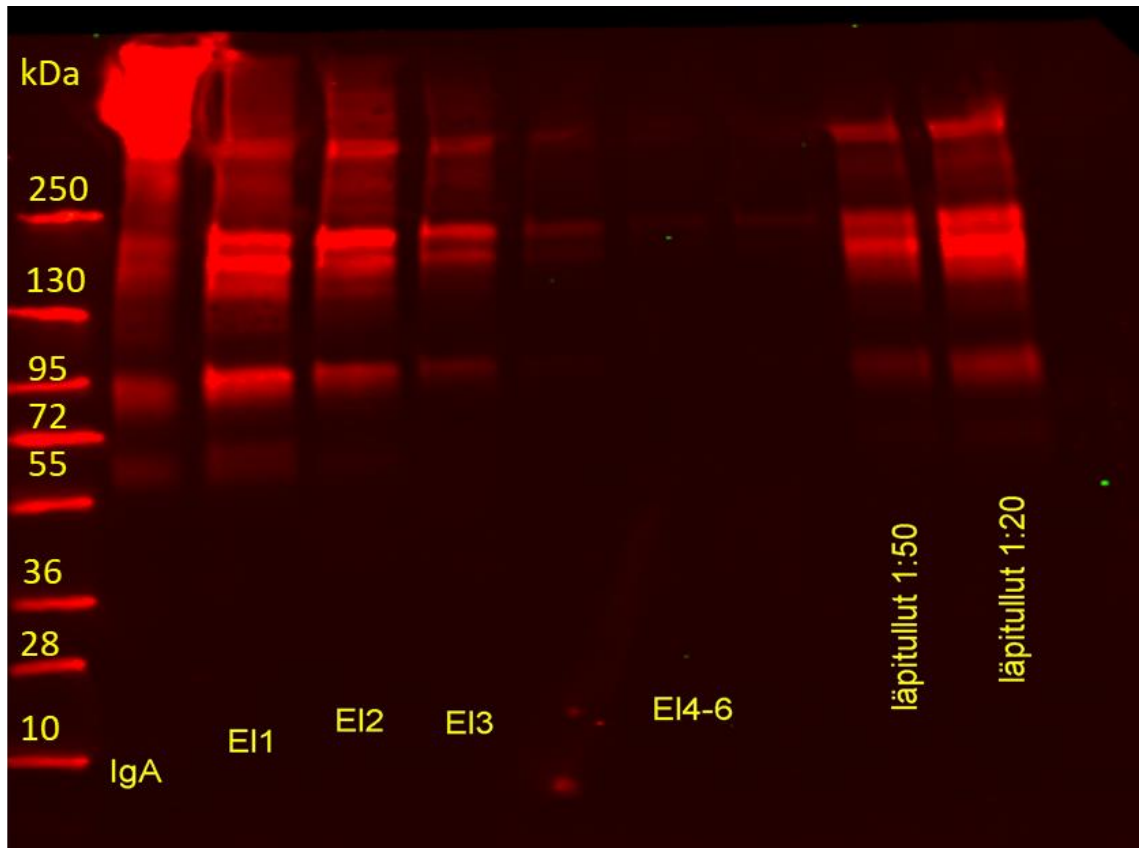
KUVA 13. TG2-vasta-ainepuhdistuksen SDS-PAGE:n geelikuva, näytteenä käytettiin seerumia.

Seuraavaksi puhdistuksen eluutioille testattiin vasta-aineita, joita oltiin jo Western blotauksen optimoinnissa testattu. Kuvassa 14 IgA:n vyöhykkeet olivat selkeitä ja näkyivät hyvin. Kuvasta huomattiin, että pylvästä läpi tulleen seerumilaimennoksen joukossa oli havaittavissa edelleen puhdistettavaa vasta-ainetta (> 100 kDa), mutta huomattavasti vähemmän kuin aiemmin.



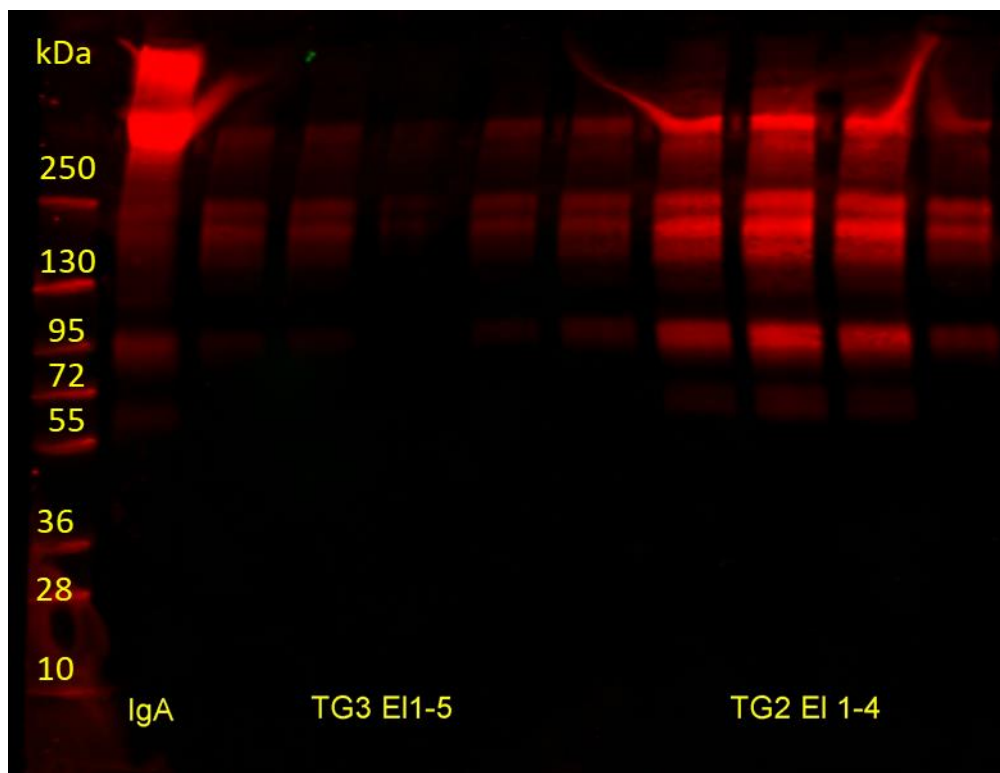
KUVA 14. Vasta-ainepuhdistuksen eluutioiden Western blottauksen optimointia. Primäärisenä vasta-aineena käytettiin 1:2000 anti-IgA-vasta-ainetta ja sekundäärisenä vasta-aineena 1:5000 IRDye 680 RD-vasta-ainetta. Laim. 1:20 ja 1:50 olivat pylvästä läpi tulleen seerumin laimennoksia.

Kolmas seerumin vasta-ainepuhdistus tehtiin TG3-pylväällä (kuva 15), geelille laitettiin kaikki saadut eluutiot. Primäärisenä vasta-aineena käytettiin 1:2000 anti-IgA-vasta-ainetta ja sekundäärisenä vasta-aineena 1:5000 IRDye 680 RD-vasta-ainetta. Kuvan 15 vasta-ainepuhdistuksen Western blottauksessa kaupallisen IgA:n vyöhyke oli värjäytynyt liikaa, mutta eluutioiden vyöhykkeet olivat selkeästi näkyvillä. Eluutioiden vyöhykkeistä huomattiin, että kolmeen ensimmäiseen eluutioon oli tullut vasta-ainetta hyvin, sillä eluutioissa oli näkyvissä selkeitä vyöhykkeitä yli 100 kDa yläpuolella. Loppuihin eluutioihin ei juuri vasta-ainetta ollut enää jäänyt. Pylvään läpi tulleeseen seerumilaimennukseen oli edelleen jäänyt melko paljon vasta-ainetta (läpi tullut 1:20 ja 1:50 -vyöhykkeet, yli 100 kDa yläpuolella).



KUVA 15. Seerumin vasta-ainepuhdistus TG3-pylväällä. IgA:ta käytettiin positiivisena kontrollina, eluutioiden vyöhykkeinä EI 1-6 ja läpituullut 1:50 ja 1:20 olivat pylvään läpi tulleita seerumilaimennoksia. Kuvasta tarkasteltiin näytteiden yli 100 kDa vyöhykkeitä.

Vasta-ainepuhdistuksen optimointi onnistui seeruminäytteille. Vaikka seerumiin jäi edelleen vasta-ainetta, saatiin sitä myös kerättyä eluutioihin. Esimerkiksi tässä TG3-vasta-ainepuhdistuksessa (kuva 15) pylvään läpi tulleeseen seerumiin jäänyt vasta-aine voi myös olla TG2-vasta-ainetta. Jo kerran TG3-vasta-ainepuhdistettua seerumilaimennosta haluttiin kokeilla puhdistaa vielä uudelleen samalla TG3-vasta-ainepylväällä, jotta saatiin selville, voisiko mahdollisesti TG3-pylvään läpi tulleesta näytteestä saada samalla käytetyllä TG3-pylväällä vielä lisää TG3-vasta-aineita. Toisaalta läpi tulleen seerumilaimennoksen vyöhykkeet kuvassa 15 voivat olla mahdollisesti myös muitakin värjäytyneitä vasta-aineita.



KUVA 16. Samalle seeruminäytteelle tehty ensin kaksi kertaa TG3-puhdistus (tässä toisen puhdistuksen TG3-eluutiot) ja sitten uudelleen toisella pylväällä TG2-vasta-ainepuhdistus.

Kuvassa 16 on vielä samasta näytteestä tehty ensin TG3-pylväällä TG3-vasta-ainepuhdistus ja sen jälkeen TG2-pylväällä tehty TG2-vasta-ainepuhdistus. Kuvasta 15 nähtiin, että ensimmäisessä TG3-vasta-ainepuhdistuksessa ei eluutioihin tullut TG3-vasta-ainetta. Kuvasta 16 kuitenkin huomattiin, että samaa pylvästä ei kannattanut käyttää uudestaan, koska tällöin vasta-ainetta saatiin puhdistettua enää niin pieniä määriä (TG3 EI 1-5). Mutta TG2-vasta-ainepuhdistus onnistui vielä samasta näytteestä (TG2 EI 1-4). Vasta-ainepuhdistuksia voisi alkaa tekemään tällä menetelmällä lisää, mutta pylväitä ei kannattanut käyttää uudelleen.

5.4 Proteiinikonsentraatiomäärityksen optimoinnin tulokset

Proteiinikonsentraation määrityksen optimointi epäonnistui. Eluutioiden proteiinikonsentraatioita ei pystytty mittaamaan käytetyillä menetelmillä, sillä eluutioiden konsentraatiot jäivät liian mataliksi. Mahdollisesti myös eluutioiden puskuri saattoi haitata menetelmien toimintaa.

Menetelmät eivät toimineet edes standardiliuoksille, joista kokeiltiin erilaisia pieniä pitoisuuksia, tässä syynä saattoi olla myös väärä standardiliuosten puskuri. Näiden menetelmien tilalla mitattiin jatkossa IgA- ja IgG-tasot ELISA:lla, sillä niillä voi mitata pieniäkin konsentraatioita eikä käytössä olevat liuokset haittaisi menetelmän toimintaa.

5.5 Vasta-ainepuhdistuksen tulokset

Tehtyjen vasta-ainepuhdistusten tulokset on esitetty kokonaisuudessaan liitteessä 2. Taulukossa 3 on esimerkkinä kahden seeruminäytteen TG3- ja TG2-vasta-ainepuhdistuksen tuloksia. Näytteelle (potilas 5) tehtiin ensin TG3-vasta-ainepuhdistus ja sen jälkeen pylväästä läpi tulleelle seerumilaimennokselle tehtiin TG2-vasta-ainepuhdistus. Tuloksista huomattiin, että potilaan 5 seerumin TG3- ja TG2-vasta-ainetasot olivat lähtötilanteessa todella korkeat (> 189 AU/ml ja > 100 U/ml). TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen tehdyt TG3-ab-ELISA tulokset antoivat kolmelle ensimmäiselle eluutiolle hyvät tulokset (> 100 AU/ml). Pylvään läpi tulleessa seerumilaimennoksessa vasta-ainepitoisuudet laskivat huomattavasti lähtötilanteesta (62,9 AU/ml), mikä tarkoitti, että puhdistuksessa onnistuttiin. Kun TG2-vasta-ainepuhdistuksen eluutiolle tehtiin TG3-ab-ELISA, tulokset olivat pieniä (< 10 AU/ml) ja läpi tulleen seerumilaimennoksen tulos oli suunnilleen sama kuin TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen (52,9 AU/ml).

TG2-ab-ELISA:n tulokset näyttävät myös hyvälle (potilas 5). TG3-vasta-ainepuhdistuksen eluutioissa TG2-vasta-ainetasot olivat hyvin pieniä ja läpi tulleessa seerumilaimennoksessa TG2-vasta-ainetaso pysyi korkeana TG3-vasta-ainepuhdistuksen ajan (> 100 U/ml). Tämä vahvisti, että TG3-vasta-ainepuhdistus toimi oikealla tavalla. Kun katsottiin TG2-vasta-ainepuhdistuksen eluutioiden TG2-vasta-ainetasoja, ne olivat todella korkeita (> 100 U/ml) ja pylvään läpi tulleen seerumilaimennoksen TG2-vasta-ainepitoisuudet olivat laskeneet lähtötilanteesta (84,2 U/ml).

TAULUKKO 3. Potilaiden 5 ja 6 vasta-ainepuhdistuksen tulokset. DH; ihokeliakia, em; ei määritetty.

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)
Potilas 5, Seerumi	DH	>189	>100	TG3-ab	1	121	<7	0	0,76
					2	>189	<7	15	0,55
					3	>189	em	4,6	0,51
					4	71,3	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	62,9	>100	em	em
Potilas 5, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	2,82	141	8,1	1,51
					2	9,78	>100	7,3	1,47
					3	3,87	110	em	em
					4	em	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	52,9	84,2	em	em
Potilas 6, Seerumi	DH	31	>100	TG3-ab	1	<2,3	<7	1	0,23
					2	<2,3	<7	0,2	0,3
					3	<2,3	em	0,03	0,24
					4	<2,3	em	0	0
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	27	75,1	em	em
Potilas 6, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	70,3	5,4	1,76
					2	6,17	77,7	7,7	2,6
					3	<2,3	46,3	4	1,21
					4	em	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	17,8	1,3	em	em

Potilaan 6 kohdalla tulokset menivät samaan tapaan, lähtötilanne oli vaan erilainen, sillä seerumin TG3-vasta-ainepitoisuudet olivat matalat (31 AU/ml). Tämän takia TG3-vasta-ainepuhdistuksessa tulokset olivat myös alle määrittäjärajan. TG2-vasta-ainepuhdistus oli myös tälle näytteelle onnistunut hyvin, sillä TG2-vasta-ainepitoisuudet seerumilaimennoksessa olivat TG2-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen tippuneet alle 7 U/ml.

IgA- ja IgG-ELISA tulosten perusteella eluutioiden vasta-aineet olivat pääosin IgA-luokan vasta-aineita, kuten odotettiin. Yleisesti tuloksista huomattiin, että TG3-vasta-ainepuhdistuksien eluutioiden IgA- ja IgG-tasot olivat matalammat kuin TG2-vasta-ainepuhdistuksissa.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite saavutettiin pääosin. Vasta-ainepuhdistusmenetelmä saatiin optimoitua halutulla tavalla, mutta kaikkia haluttuja menetelmiä ei saatu toimimaan puhdistuksesta saaduille eluutioille. Vasta-ainepuhdistuksen optimointi onnistui hyvin seeruminäytteille, mutta mediumnäytteiden pitoisuudet jäivät todella mataliksi. Mediumnäytteiden vasta-ainepuhdistus tehtiin samalla tavalla kuin seeruminäytteille. Lopulta muutaman mediumnäytteen vasta-ainepuhdistuksen kokeilun jälkeen todettiin, että eluutioiden vasta-ainepitoisuudet olivat niin pieniä ja jäivät suurimmaksi osaksi alle määritysrajan, joten vasta-ainepuhdistusta mediumnäytteille ei jatkettu.

Optimointivaiheessa eluutioista yritettiin määrittää proteiinikonsentraatiota, mutta sitä ei saatu toimimaan kokeilluilla menetelmillä. Menetelmät eivät soveltuneet tarvittavan alhaisiin pitoisuuksiin ja mahdollisesti eluutioissa ollut puskuri ei sopinut näihin menetelmiin. Tämä menetelmä jätettiin kokonaan pois vasta-ainepuhdistusten tuloksista, mutta tilalle otettiin IgA- ja IgG-ELISA:t, sillä niillä voi mitata pieniäkin konsentraatioita. Myös tältä osin opinnäytetyön tarkoitus toteutui, sillä menetelmää käytettiin optimoinnin jälkeen keliakia- ja ihokeliakianäytteiden vasta-ainepuhdistukseen onnistuneesti.

Biotinyloitujen tuotteiden SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimointi onnistui. TG2- ja TG3-proteiinit saatiin biotinyloitua ja niiden Western blottauksessa näkyviin tulleet vyöhykkeet näyttivät oikeanlaisilta verrattaessa muihin kontrolleina olleisiin näyttevyöhykkeisiin. Biotinylointia tehtiin vasta-ainepuhdistuksia varten optimoidulla tavalla noin kolme kertaa.

IgA:n SDS-PAGE:n ja Western blottauksen optimointi onnistui. Näytteenkäsittelyssä päädyttiin käyttämään pelkkää Laemmli-puskuria, ilman β -merkaptotetanolia, sillä jatkossa kuitenkin haluttiin käyttää pelkistämättömiä näytteitä, koska haluttiin nähdä erikseen dimeerinen ja monomeerinen IgA. Tämä menetelmä toimi näytteille hyvin ja IgA-vyöhykkeet tulivat Western blottauksessa näkyviin mono- ja dimeerisinä.

Vasta-ainepuhdistuksen optimointi onnistui. Parhaaksi menetelmäksi osoittautui, että ensin resiiniä inkuboitettiin mikroputkessa biotinyloidun transglutaminaasin kanssa, jonka jälkeen resiini siirrettiin vasta-ainepuhdistuksessa käytettävään pylvääseen. Pylväässä oli

huomattavasti helpompi pestä resiini kunnolla, kuin mikroputkessa. Pylväässä ei tullut myöskään vahingossa pipetoitua resiiniä, niin kuin tapahtui putkesta pipetoitaessa esimerkiksi pesujen yhteydessä. Lopulta päädyttiin ottamaan jokaisesta näytteestä viisi eri eluutiota. Tulosten perusteella ensimmäiselle kolmelle eluutiolle tuli kuitenkin useimpien parhaimmat tulokset ja viidennessä ei ollut juuri enää vasta-ainetta. Iversen ym. (2017) artikkelissa käytettiin vain kolmea eluutiota. Tässä työssä Western blottauksessa kahden viimeisen eluution vyöhykkeet saattoivat olla melko heikkoja, mutta silti ELISA-menetelmissä joissakin 4-5 eluutioissa havaittiin korkeitakin vasta-ainepitoisuuksia.

Seeruminäytteestä päädyttiin tekemään ensin vasta-ainepuhdistus TG3-pylväällä ja sitten TG3-pylvään läpi tullee seerumilaimennokselle uusi vasta-ainepuhdistus TG2-pylväällä. Tämä menetelmä toimi hyvin. Seerumilaimennokselle kokeiltiin myös vasta-ainepuhdistusta kaksi kertaa peräkkäin samalla pylväällä (TG3), mutta tästä ei koettu olevan hyötyä, sillä eluutioihin ei juuri eluoitunut vasta-ainetta toisen puhdistuksen jälkeen (kuva 16). Vasta-ainepuhdistuksissa päädyttiin tähän järjestykseen, sillä pääosin keliaakikkojen seerumien TG3-vasta-ainepitoisuudet olivat lähtötilanteessa melko, joten haluttiin varmistaa, että TG3-vasta-aineet eluoituvat varmasti ensimmäisessä puhdistuksessa pois.

Vasta-ainepuhdistuksissa seerumille tehtiin 1:10 laimennos, kokeilematta jäi olisiko mahdollisesti erilainen laimennos vaikuttanut positiivisella tavalla eluutioiden vasta-ainepitoisuuksiin. Kokeilematta jäi myös seerumilaimennoksen puhdistus uudelleen uudella pylväällä, jolloin oltaisiin puhdistettu samaa vasta-ainetta kaksi kertaa peräkkäin. Tämä olisi voinut toimia paremmin kuin vanha pylväs, mutta biotinyloituja tuotteita ei jäänyt tähän tarkoitukseen ylimääräisiä. Mediumnäytteiden puhdistuksissa eluutioiden vasta-ainepitoisuudet jäivät suurimmaksi osaksi alle määritysrajojen. Tämän syynä voi olla se, että Iversen ym. (2017) artikkelissa ohutsuolen koepaloja oli kasvatettu mediumissa ennen supernatantin talteen ottamista huomattavasti pidemmän aikaa eli 2 – 4 viikkoa kuin tässä työssä käytettyjä näytteitä (24 – 48 h). Luultavasti tässä työssä käytettyihin mediumnäytteisiin vasta-aineita ei ehtinyt vielä kehittyä tarpeeksi, jonka takia tässä työssä tehdyistä mediumpuhdistuksissa tulokset jäivät alle määritysrajojen.

TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen tehdyssä TG3-ab-ELISA:ssa eluutioiden TG3-vasta-aineet olivat korkeammat kuin TG2-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen tehdyssä TG3-ab-ELISA:ssa, mikäli lähtöseerumissa oli korkeat TG3-vasta-ainetasot. Ja vastaavasti

TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen TG2-ab-ELISA antoi pienet pitoisuudet puhdistetuille eluutioille, kun taas TG2-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen TG2-ab-ELISA:sta eluutioiden TG2-vasta-ainepitoisuudet olivat korkeat. Sama tapahtui myös läpi tulleen seeruminäytteen kohdalla. TG3-vasta-ainepuhdistuksen jälkeen TG3-vasta-ainepitoisuudet olivat laskeneet lähtötilanteesta seerumilaimennoksessa ja TG2-vasta-ainepitoisuudet olivat edelleen korkeita seerumilaimennoksessa ja päinvastoin. TG3-vasta-aine-ELISA -menetelmässä ylempi määrittäysraja oli > 189 AU/ml ja alempi määrittäysraja $< 2,3$ AU/ml. TG2-vasta-aine-ELISA -menetelmässä ylempi määrittäysraja oli > 100 U/ml ja alempi määrittäysraja < 7 U/ml. Näiden tulosten perusteella pystytään toteamaan, että vasta-ainepuhdistukset toimivat onnistuneesti.

IgA- ja IgG-ELISA tulokset osoittivat, että eluutiot ovat pääosin IgA-luokkaa, sillä suurimmassa osassa eluutioita IgA-pitoisuudet olivat isommat kuin IgG-pitoisuudet (liite 2). IgA-pitoisuudet jäivät suurimmassa osassa eluutiosta alle $10 \mu\text{g/ml}$, vaikka TG3- tai TG2-vasta-ainepitoisuudet olivat niissä eluutioissa korkeita (> 100 AU/ml tai > 70 U/ml). Todellisuudessa IgA-vasta-ainetasot olivat luultavasti lähellä alinta määrittäysrajaa, että ne eivät näkyneet IgA- ja IgG-testeissä. Saattaa olla, että TG3-vasta-aine-testi on herkempi kuin IgA- ja IgG-testit, joten se tunnisti pienemmän vasta-ainepitoisuuden positiiviseksi tulokseksi. Yleisesti huomattiin, että TG2-vasta-ainepuhdistuksien IgA-tasot olivat korkeampia kuin TG3-vasta-ainepuhdistuksien.

Vasta-ainepuhdistusten onnistuttua osalle eluutioista tehtiin puskurinvaihto kromatografiolla, jotta ne voidaan laittaa jatkotutkimuksiin massaspektrometriin. Näistä tuloksista selviää tulevaisuudessa mahdollisesti muun muassa, ovatko ihokeliaakikon TG3-vasta-aineet rakenteellisesti samanlaisia kuin TG2-vasta-aineet. Lisäksi eluutioista halutaan tutkia, ovatko ihokeliaakikon ja keliaakikon vasta-aineet rakenteellisesti samanlaisia. Massaspektrometrillä voidaan myös selvittää jatkossa, jos mediumpuhdistuksia tehdään lisää, ovatko seerumin ja suolen TG2- ja TG3-vasta-aineet samanlaisia.

Vasta-ainepuhdistusten onnistumista tukee myös alustavat tulokset jatkotutkimuksista, sillä osalle puhdistetuista eluutioista ehdittiin saada tuloksia jo massaspektrometriltä. Näytteinä oli sekä seerumipuhdistuksen että mediumpuhdistuksen eluutioita. Massaspektrometrillä oli tunnistettu kaikista eluutioista luotettavasti IgA:ta, vaikka IgA-ELISA:n tulos olisi ollut $0 \mu\text{g/ml}$. Näiden massaspektrometritulosten perusteella voidaan

todeta, että mediumnäytteiden vasta-ainepuhdistukset olivat myös toimineet jollakin tasolla, vaikka eluutioiden TG2- ja TG3-vasta-ainetasot olivat alle määrittämissä rajoissa. Massaspektrometrin tuloksia on kuitenkin analysoitava tarkemmin, ennen kuin kasvatusmediumnäytteiden vasta-ainepuhdistusten tekemistä kannattaa jatkaa.

LÄHTEET

Anti-heTG IgA ELISA manual. 2012. ImmunoDiagnostik. Luettu 03.07.2018. http://www.immudiagnostik.com/fileadmin/pdf/TG_anti%20epi-derm%20IgA_K9396.pdf

Desalting column. 2018. Bio-Rad Laboratories, Inc. Luettu 03.07.2018. <https://www.bio-rad.com/featured/en/desalting-column.html>

ECL Western blotting detection reagents and analysis system. 2009. Product Booklet. GE Healthcare. Luettu 12.07.2018. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11811>

Electrophoresis. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. BIO-RAD. Bulletin 6040. Luettu 27.08.2018. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin Instructions. Thermo Scientific. Luettu 29.06.2018. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016133_2161855_EZLinkSulfoNHS_LC_Biotin_UG.pdf

Glick, B. R., Patten, C. L. & Delovitch T. L. 2013. Medical biotechnology. Washington, DC: ASM Press.

Hietikko, M., Hervonen, K., Ilus, T., Salmi, T., Huhtala, H., Laurila, K., Rauhavirta, T., Reunala, T., Kaukinen, K. & Lindfors, K. 2018. Ex vivo Culture of Duodenal Biopsies from Patients with Dermatitis Herpetiformis Indicates that Transglutaminase 3 Antibody Production Occurs in the Gut. *Acta Derm Venereol* 98, 366-372.

Immunoprecipitation technical guide and protocols. 2009. ThermoFisher Scientific. Tech tip #64. Luettu 06.06.2018. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0064-Immunoprecipitation-guide.pdf>

Iversen, R., Snir, O., Stensland, M., Lundin, K. E. A., de Souza, G. A. & Sollid, L. M. 2017. Strong Clonal Relatedness between Serum and Gut IgA despite Different Plasma Cell Origins. *Cell Press. Cell Reports* 20, 2357-2367.

Janson, J. 2011. Protein purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. *Methods of Biochemical Analysis*. 3rd ed. Hoboken, N.J. John Wiley & Sons.

Kalliokoski, S. 2017. Biological Effects of Coeliac Disease Patient Antibodies in Vivo. Tampereen Yliopisto. Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta. Väitöskirja.

Keliakian HLA-tautiassosiaatiotutkimus. SYNLAB. Luettu 07.08.2018. <https://www.synlab.fi/laboratoriokasikirja/tutkimuskuvaukset/b-keliakian-hla-tautiassosiaatiotutkimus-kl-4640-b-hlakeli/>

Mäki, M., Arffman, S. & Keliakialiitto. 2006. Keliakia. Helsinki: Duodecim. Keliakialiitto.

Pull-Down Assays. ThermoFisher Scientific. Luettu 28.08.2018. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/pull-down-assays.html>

Reunala, T., Salmi, T & Hervonen, K. 2015. Dermatitis Herpetiformis: Pathognomonic Transglutaminase IgA Deposits in the Skin and Excellent Prognosis on a Gluten-free Diet. *Acta Derm Venerol*, 95, 917-922.

Salmi, T. 2017. Dermatitis herpetiformis – keliakian ihoilmentymä. Ihotaudit, lääketieteen asiantuntijoiden ammattilehti. BestPractice.

Salmi, T., Kurppa, K., Hervonen, K., Laurila, K., Collin, P., Huhtala, H., Saavalainen, P., Sievänen, H., Reunala, T. & Kaukinen, K. 2016. Serum transglutaminase 3 antibodies correlate with age at celiac disease diagnosis. *Elsevier. Digestive and Liver Disease* 48, 632-637.

Salmi, T., Lindfors, K., Kurppa, K. & Kaukinen K. 2017. Keliakia. *Duodecim*. Luettu 14.05.2018. <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo13911.pdf>

Sardy, M., Karpati, S., Merkl, B., Paulsson, M. & Smyth, N. 2002. Epidermal Transglutaminase (TGase 3) Is the Autoantigen of Dermatitis Herpetiformis. *Journal of Experimental Medicine*. 18:195(6), 747-57.

Tras-Blot Turbo Blotting System. Instruction Manual. 2010. BIO-RAD. Luettu 28.08.2018. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10020688.pdf>

Turpeenoja, L. 2005. *Biokemiaa*. 4-2. painos. Helsinki. Opetushallitus.

Wilson, K & Walker, J. 2005. *Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology*. 6th ed. New York: Cambridge University press.

LIITTEET

Liite 1. Taulukko 4. Menetelmissä käytetyt liuokset

Liuos	Tarvittavat reagenssit	Reagenssin määrä	Liuoksen tilavuus	Liutin	pH
10x ajopuskuri (SDS-PAGE) (kantaliuos)	SDS Tris Glysiini	10,08 g 30,3 g 144 g	1000 ml	vesi	
1 x ajopuskuri (SDS-PAGE)	10 x ajopuskuri	100 ml	1000 ml	vesi	
10x TBS (kantaliuos)	Natriumkloridi Tris	88 g 24 g	1000 ml	vesi	7,6; säätö HCl
1x TBS	10x TBS	100 ml	1000 ml	vesi	
TBST	1x TBS 0,05 % Tween 20	100 ml 0,5 ml	1000 ml	vesi	
1 % BSA-TBST	BSA	1 g	100 ml	TBST	
3 % BSA-TBST	BSA	3 g	100 ml	TBST	
1 M Tris-HCl	Tris Suolahappo	12,1 g 8,3 ml	100 ml	vesi	
20 mM HCl	Suolahappo	0,3284 ml	200 ml	vesi	
Bradford-reagenssi	Coomassie Brilliant Blue G-250 85 % fosforihappo	10 mg 100 ml	5 ml 100 ml	95 % etanoli vesi	
10x PBS (kantaliuos)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	80 g 2 g 14,4 g 2,4 g	1000ml	vesi	7,5; säätö NaOH
1x PBS	10x PBS	100 ml	1000ml	vesi	

Liite 2. Taulukko 5. TG3- ja TG2-vasta-ainepuhdistuksen tulokset

1 (6)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty. TG3-ab-ELISA:ssa seeruminäytteille käytettiin 1:250 laimennosta ja TG2-ab-ELISA:ssa näytteille käytettiin 1:100 laimennosta. Poikkeukset laimennoksissa on merkitty taulukkoon.

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)
Potilas 1, Seerumi	DH	>189	>100	TG2-ab	1	3,92 (1:50)	18,7 (1:500), 9,2 (1:1000), <7 (1:2000)	em	em
					2	3,42 (1:50)	33,2	em	em
					3	<2,3	<7	em	em
					4	<2,3	<7	em	em
					5	<2,3	<7	em	em
					läpi tullut	>189	>100	em	em
Potilas 2, Seerumi	DH	>189	>100	TG3-ab	1	95,15	<7	em	em
					2	50,95	<7	em	em
					3	<2,3	<7	em	em
					4	<2,3	em	em	em
					5	<2,3	em	em	em
					läpi tullut	13,5	>100	em	em
Potilas 2, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG3-ab	1	<2,3	em	em	em
					2	<2,3	em	em	em
					3	<2,3	em	em	em
					4	<2,3	em	em	em
					5	<2,3	em	em	em
					läpi tullut	em	em	em	em
Potilas 2, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	>100	7,3	2,9
					2	3,16	>100	7,2	2,8
					3	4,78	90,4	em	em
					4	<2,3	<7	em	em
					5	<2,3	<7	em	em
					läpi tullut	13,6	18,1	em	em

(jatkuu)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)	
Potilas 3, Seerumi	DH	>189	>100	TG2-ab	1	3,39	>100, (1:1000) 42,3	30,4	0,92	
					2	11,1	>100, (1:1000) 69,9	40,5	1,96	
					3	<2,3	33,3	2,9	0,56	
					4	em	14,9	2,2	em	
					5	em	em	em	em	
				läpi tullut	em	em	em	em	em	
Potilas 3, TG2-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	<7	0,2	em	
					2	<2,3	<7	0,4	em	
					3	<2,3	<7	0,2	em	
					4	em	em	em	em	
					5	em	em	em	em	
				läpi tullut	>189	51,1	em	em		
Potilas 3, TG2-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG3-ab	1	2,8	<7	em	em	
					2	29,2	<7	0	0	
					3	38,5	<7	0	0	
					4	36,2	em	0	0	
					5	em	em	em	em	
				läpi tullut	18,6	53,3	em	em		
Potilas 4, Organ culture medium	DH			TG2-ab	1	<2,3	14,1	0,9	0	
						2	<2,3	<7	2,3	0
						3	<2,3	<7	0,7	0
						4	em	em	em	em
						5	em	em	em	em
				läpi tullut	4,94	<7	em	em		
Potilas 4, TG2-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG3-ab	1	<2,3	<7	0	0	
					2	<2,3	<7	0	0	
					3	<2,3	<7	0	0	
					4	em	em	em	em	
					5	em	em	em	em	
				läpi tullut	<2,3	<7	em	em		

(jatkuu)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)
Potilas 5, Seerumi	DH	>189	>100	TG3-ab	1	121	<7	0	0,76
					2	>189	<7	15	0,55
					3	>189	em	4,6	0,51
					4	71,3	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	62,9	>100	em	em
Potilas 5, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	2,82	>100	8,1	1,51
					2	9,78	>100	7,3	1,47
					3	3,87	>100	em	em
					4	em	63,1	em	em
					5	em	32,5	em	em
					läpi tullut	52,9	84,2	em	em
Potilas 6, Seerumi	DH	31	>100	TG3-ab	1	<2,3	<7	1	0,23
					2	<2,3	<7	0,2	0,3
					3	<2,3	em	0,03	0,24
					4	<2,3	em	0	0
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	27	75,1	em	em
Potilas 6, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	70,3	5,4	1,76
					2	6,17	77,7	7,7	2,6
					3	<2,3	46,3	4	1,21
					4	em	12,8	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	17,8	<7	em	em
Potilas 7, Seerumi	CD	189	>100	TG3-ab	1	10,8	<7	em	em
					2	49,4	<7	4,43	0,88
					3	88,7	<7	2,1	1,03
					4	150	<7	2,6	1
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	161	>100	em	em
Potilas 7, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	>100	6,8	3,54
					2	5,53	>100	7,2	4,16
					3	12,9	>100	em	em
					4	em	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	121	33,3	em	em

(jatkuu)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)	
Potilas 8, Seerumi	DH	>189	>100	TG3-ab	1	25,1	<7	em	em	
					2	118	<7	5	1,28	
					3	120	em	2,6	0,3	
					4	65,6	em	em	em	
					5	em	em	em	em	
					läpi tullut	61,1	>100	em	em	
Potilas 8, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tulut				TG2-ab	1	3,02	43,7	6,4	0,67	
					2	5,38	35,6	6,2	0,43	
					3	2,46	Eluutiot 1-3: 15,3	2,7	0,3	
					4	em		10,3	em	em
					5	em		em	em	em
					läpi tullut	57,5	<7	em	em	
Potilas 9, Seerumi	DH	>189	>100	TG3-ab	1	33,6	<7	em	em	
					2	>189	<7	4,7	0,54	
					3	>189	<7	1,4	0,42	
					4	77,3	<7	0	0	
					5	em	em	em	em	
					läpi tullut	43,9	>100	em	em	
Potilas 9, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tulut				TG2-ab	1	8,72	89,8	5	2,36	
					2	17,2	82,9	20,4	3,12	
					3	8,77	62,9	3,6	2,05	
					4	em	21,8	em	em	
					5	em	em	em	em	
					läpi tullut	41,5	89,9	em	em	
Potilas 10, Seerumi	CD	44	>100	TG3-ab	1	<2,3	<7	0,05	0,09	
					2	<2,3	<7	0,04	0,37	
					3	<2,3	em	0	0	
					4	<2,3	em	0	0	
					5	em	em	em	em	
					läpi tullut	58,0	>100	em	em	
Potilas 10, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tulut				TG2-ab	1	<2,3	>100	7,6	0,27	
					2	4,96	>100	8	0,62	
					3	4,6	<7	em	em	
					4	em	em	em	em	
					5	em	em	em	em	
					läpi tullut	58,4	>100	em	em	

(jatkuu)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)
Potilas 11, Seerumi	CD	33	64	TG3-ab	1	<2,3	<7	0	0
					2	<2,3	<7	0	0,03
					3	<2,3	em	0	0
					4	2,5	em	0	0
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	24,5	76,8	em	em
Potilas 11, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	Eluutiot 1-4: <7	2,2	0,72
					2	<2,3		2,9	1,62
					3	<2,3		em	em
					4	em	em	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	28,5	8,4	em	em
Potilas 12, Seerumi	CD	30	>100	TG3-ab	1	2,5	<7	0	0,26
					2	4,39	<7	0,6	0,34
					3	5,83	Eluutiot 1-4: <7	0	0
					4	3,44		0	0
					5	em		em	em
					läpi tullut	4,36	>100	em	em
Potilas 12, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	2,61	Eluutiot 1-2: 77,3	6,9	3,02
					2	4,84		7,7	3,56
					3	<2,3		em	1,93
					4	em	49,6	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	4,31	25,1	em	em
Potilas 13, Seerumi	CD	13	98,9	TG3-ab	1	<2,3	Eluutiot 1-4: <7	0,03	1,25
					2	<2,3		0,1	1,95
					3	<2,3		0	1,23
					4	<2,3	em	0	0,41
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	31	>100	em	em
Potilas 13, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1	<2,3	Eluutiot 1-2: >100	6,2	3,65
					2	2,75		7,5	3,79
					3	<2,3		em	3,79
					4	em	85,3	em	em
					5	em	em	em	em
					läpi tullut	20,1	51,4	em	em

(jatkuu)

CD; keliakia, DH; ihokeliakia, ab; vasta-aine, em; ei määritetty

Näyte	Diagnoosi	Lähtöseerumin TG3-IgA (AU/ml)	Lähtöseerumin TG2-IgA (U/ml)	Puhdistus	Eluutio	TG3-ab (AU/ml)	TG2-ab (U/ml)	IgA (µg/ml)	IgG (µg/ml)
Potilas 14, Seerumi	CD	18	56,4	TG3-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	<2,3 <2,3 <2,3 <2,3 em 11,8	Eluutiot 1-5: <7 69,4	0 0 0 0 em em	0,12 0,19 0 0 em em
Potilas 14, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	2,42 2,78 <2,3 em em 11	Eluutiot 1-2: 51,5 35 15,9 em 8,6	4,8 5,8 em em em em	0,58 0,63 em em em em
Potilas 15, Seerumi	CD	<2,3	>100	TG3-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	<2,3 <2,3 <2,3 4,11 em 8,98	Eluutiot 1-5: <7 >100	0 0 0 0 em em	0,44 1,01 0,38 0 em em
Potilas 15, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	<2,3 <2,3 <2,3 em em 12,6	Eluutiot 1-2: >100 >100 96,1 em 67,1	7,1 7,8 em em em em	3,18 3,38 3,05 em em em
Potilas 16, Seerumi	CD	12	>100	TG3-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	3,59 <2,3 <2,3 <2,3 em 39,6	Eluutiot 1-5: <7 11,7	0,6 0,4 0,2 0 em em	1,18 0,9 0,42 0 em em
Potilas 16, TG3-ab-puhdistuksesta läpi tullut				TG2-ab	1 2 3 4 5 läpi tullut	6,59 10,5 <2,3 em em 26,4	Eluutiot 1-5: <7 11,7	1,5 1,5 1 em em em	1,3 0,87 0,13 em em em