



**Western blot –menetelmän optimointi kantasoluista tuotetuille verkko-
kalvon soluille**

Jaana Huuki

Opinnäytetyö
Tammikuu 2010
Laboratorioalan koulutusohjelma
Pirkanmaan ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

HUUKI, JAANA:

Western blot –menetelmän optimointi kantasoluista tuotetuille verkkokalvon soluille

Opinnäytetyö 43 s., liitteet 6 s.
Tammikuu 2010

Ihmiskation kantasolut voivat erilaistua silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelin soluiksi. Kantasoluterapiasta toivotaan tulevaisuudessa uutta hoitomuotoa ikääntyvän silmän sairauksien hoidossa. Kantasolujen erilaistumista pigmenttiepiteelisoluiksi voidaan tarkastella sekä DNA- että proteiinitasolla. Western blot –menetelmän avulla solujen erilaistumista voidaan tutkia proteiinitasolla. Opinnäytetyön tarkoitus oli optimoida western blot –menetelmä silmän pigmenttiepiteelin tuottamille MITF-, RPE65- ja CRALBP-proteiineille. Tavoitteena oli optimoida sopiva kokonaisproteiinipitoisuus, löytää sopiva blokkauksliuos ja etsiä toimivat primaari- ja sekundaarivasta-ainelaimennokset.

Ihmiskation kantasoluja erilaistettiin aluksi 3-5 päivää ihmisen esinahan feeder-solujen päällä pigmenttiepiteeli-solujen kasvatusmediumissa. Tämän jälkeen solut irrotettiin mekaanisesti leikkaamalla maljalta ja siirrettiin kuoppalevyille. Solut eivät tartu kuoppalevyn pintaan, vaan kasvavat vapaana liuoksessa. Erilaistuneet solurykelmät kerättiin soluviljelmästä, ja proteiinit eristettiin soluista. Eristetyn proteiiniliuoksen pitoisuus mitattiin BCA-menetelmällä spektrofotometrisesti. Proteiinit eroteltiin toisistaan kokonsa mukaan SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Proteiinit siirrettiin geeliltä membraanille ja visualisoitiin vasta-aineiden avulla. Myös HeLa-syöpäsolulinjan soluja käytettiin vasta-aineiden testaamiseen, koska erilaistuneista RPE-soluista oli puutetta.

Käytetyistä vasta-aineista CRALBP saatiin toimimaan parhaiten RPE-soluilla. Tätä menetelmää voidaan käyttää jatkossa CRALBP-proteiinin tunnistamiseen soluista. RPE65-vasta-aine saatiin toimivaksi HeLa-soluilla, mutta ei RPE-soluilla. Ongelmana oli luultavasti RPE-solujen nuori ikä, jonka vuoksi tätä menetelmää tulee testata vielä kauemmin erilaisuuksessa olleilla RPE-soluilla. MITF-vasta-ainetta ei saatu optimoitua, sillä ongelmaksi muodostui häiritsevä tausta. Tämän vasta-aineen optimointia tulee jatkaa tulevaisuudessa. MITF vasta-aineen optimoinnissa voidaan jatkossa testata erilaisia vasta-ainelaimennoksia sekä pyrkiä tehostamaan blokkauks-vaihetta.

Asiasanat: Western blot, vasta-aine, kantasolu, verkkokalvo, RPE-solu, proteiini.

ABSTRACT

Pirkanmaa University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

HUUKI, JAANA:

Optimization of western blot method for stem cell derived retinal cells

Bachelor's thesis 43 pages, appendices 6 pages
January 2010

Human embryonic stem cells can differentiate into retinal pigment epithelial (RPE) cells. Embryonic stem cells research holds significant potential for the treatment of disorders of ageing retina. Differentiation of retinal pigment epithelium from stem cells can be studied at both DNA and protein level. Cell differentiation can be examined at the level of protein with western blot method. The aim of this study was to optimize the western blot method for MITF, RPE65 and CRALBP proteins which are produced by eye pigment epithelium cells. The goal was to optimize the appropriate total protein content to find the right blocking buffer and determine good primary and secondary antibody dilutions.

Human embryonic stem cells were differentiated first 3-5 days over human foreskin feeder cells in the pigment cells culture medium. Next the cells were mechanically cut off from cell culture dish and transferred to the cell culture plate. Cells did not adhere on cell culture plate; instead they grew free in solution. The differentiated cells in cell culture were collected, and proteins were extracted from the cells. The protein concentration was measured spectrophotometrically using the BCA method. Proteins were separated from each other according to their size using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to membrane and visualized using antibodies. Also cells from cancer-derived HeLa cell line were used for testing antibodies, because of the lack of differentiated RPE cells.

According to the result, CRALBP antibody worked best with RPE cells. This method can further be used in detecting CRALBP protein in cells. RPE65 antibody was functional with HeLa cells, but not with RPE cells. The problem was probably caused by the unmaturing stage of RPE cells. Therefore this method should be tested with even further differentiated RPE cells. Because of the high background staining, MITF antibodies could not be optimized. This antibody optimization should be continued in the future. MITF antibody optimization could be continued by testing different antibody solutions and trying to make the blocking step more efficient.

Keywords: western blot, RPE-cell, antibody, retina, stem cell

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 TEORIATAUSTA	7
2.1 Kantasolut ja kantasolututkimus	7
2.2 Verkkokalvo	7
2.2.1 Pigmenttiepiteeli	8
2.2.2 Ikärappeuma	9
2.3 Pigmenttiepiteelin solut	10
2.3.1 Kantasoluista RPE-soluiksi	10
2.3.2 RPE-solut ja niiden ilmentämät proteiinit	10
2.4 Proteiinit	12
2.4.1 Proteiinien eristäminen ja konsentraation mittaus	12
2.5 Western blot	14
2.5.1 Proteiinien geielektroforeesi	14
2.5.2 Proteiinien siirto membraanille ja detektointi	15
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE	17
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	18
4.1 Kantasoluviljely	18
4.2 Proteiinien eristys	20
4.3 Proteiinien konsentraation mittaus	21
4.4 SDS-PAGE	22
4.4.1 Näytteiden valmistus ja geelin ajo	23
4.5 Western blot	24
4.6 Primaari- ja sekundaarivasta-aineinkubaatiot	24
4.6.1 MITF	25
4.6.2 RPE 65	26
4.6.3 CRALBP	27
4.7 Detektio	28
5 TYÖN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	29
5.1 Menetelmän testaus	29
5.2 MITF	30
5.3 RPE65	31
5.4 CRALBP	32
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	34
LÄHTEET	36
LIITTEET	38

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Solu- ja kudosteknologiakeskus Regeassa kesän ja syksyn 2009 aikana. Regea on Tampereen yliopiston hallinnoima erillislaitos, jonka perustajajäseniä ovat Tampereen yliopisto, Tampereen teknillinen yliopisto, Pirkanmaan sairaanhoitopiiri, Pirkanmaan ammattikorkeakoulu Oy ja Tekonivelsairaala Coxa Oy. Regeassa tehdään kliinisiin sovelluksiin tähtäävää solu- ja kudosteknologia-alan tutkimusta. Pääasiassa tutkimus painottuu kantasolututkimukseen sekä kantasoluja ja biomateriaaleja yhdistävään tutkimukseen. Lisäksi Regeassa toimii Suomen lainsäädännön ja EU-direktiivien vaatimukset täyttävä kudospankki, jossa käsitellään ja välitetään kudoksia kliiniseen käyttöön.

Regeassa toimii neljä eri tutkimusryhmää: neuroryhmä, sydänryhmä, aikuisen kantasolujen ryhmä ja silmäryhmä. Opinnäytetyö tehtiin silmäryhmässä, jonka vetäjänä toimii FT, Suomen Akatemian tutkija Heli Skottman. Ryhmän tavoitteena on kehittää kantasoluista kudosteknologisia hoitomuotoja silmän verkkokalvon sairauksien hoitoon. Ryhmä kehittää myös keinoja sarveiskalvon vaurioituneiden pintarakenteiden hoitoon suun limakalvon soluista. Vakavat verkkokalvon sairaudet, esimerkiksi ikärappeuma, aiheuttavat ongelmia sairastuneille sekä koko ikääntyvälle yhteiskunnalle. Verkkokalvon sairauksiin ei ole tehokasta hoitokeinoa, sairauksia voidaan ainoastaan hidastaa. Kantasolut tarjoavat mahdollisuuden soluterapialle, jossa kantasoluista erilaistetaan uusia verkkokalvon soluja vaurioituneiden solujen tilalle.

Lisäksi silmäryhmä kehittää GMP (Good Manufacturing Practice) –kasvatusolosuhteita kantasoluille. Ihmisen alkioperäiset kantasolut (hESC) ja ehkä myös indusoidut pluripotentit kantasolut (iPSC) ovat lupaava solulähde kudosteknologiin hoitoihin. Erilaisten patogeenisten kontaminaatioiden riski ja kantasolujen hyljintä elimistössä on suuri, jos käytetään eläinperäisiä materiaaleja solujen tuotannossa. Lääketieteellisiä sovelluksia varten solut täytyykin viljellä GMP-olosuhteiden mukaisesti, ilman eläinperäisiä komponentteja. Ryhmä tutkiikin yhteensopivia eläinperäisiä aineita sisältämättömiä tuotanto-olosuhteita soluille.

Silmäryhmässä kantasoluista erilaistetaan silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluja (RPE-soluja). Pigmenttiepiteeli on verkkokalvon ulko-osassa sijaitseva kerros, jonka tarkoituksena on huolehtia valoastinsolujen ravintoaineiden saannista ja kuona-aineiden poistosta. RPE- ja kantasolujen kasvatuksesta ja niiden siirtämisestä hermosolukerroksen alle toivotaan tulevaisuudessa uutta hoitomuotoa silmän verkkokalvonsairauksien hoitoon.

Kantasolut erilaistettiin kasvatusmediumissa joka sisältää komponentteja, jotka indusoivat alkion kantasolujen erilaistumista silmän pigmenttiepiteelisoluiksi. Tavoitteena pitkällä tähtäimellä on viljellä solut GMP-olosuhteissa ja ilman eläinperäisiä aineita. Alkion kantasolujen erilaistumista silmän pigmenttiepiteelisoluiksi voidaan tutkia monin eri tavoin, sitä voidaan seurata DNA tai proteiinitasolla. Solut ilmentävät eri proteiineja riippuen kantasolujen kehitysasteesta, ja solujen ilmentämiä proteiineja voidaan tutkia esimerkiksi western blot -menetelmän avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida western blot –menetelmä kolmelle RPE-solujen ilmentämälle proteiinille; MITF, RPE65 ja CRALBP. Tutkittavat proteiinit ovat tärkeitä RPE-solujen erilaistumisessa. Tarkoituksena oli saada olosuhteet optimoitua niin, että proteiini voidaan luotettavasti tunnistaa solunäytteestä. Menetelmällä on tarkoitus tutkia jatkossa solujen erilaistumista.

2 TEORIATAUSTA

2.1 Kantasolut ja kantasolututkimus

Kantasolut ovat monikykyisiä soluja, jotka pystyvät erilaistumaan erilaisiksi elimistön solutyypeiksi tai uusiintumaan kantasoluina. Esimerkiksi alkiosta, luuytimeistä, ja eri elinten omista kantasolupopulaatioista voidaan saada kantasoluja. Kantasolujen erilaistumiskyky vaihtelee. Hedelmöityksestä muutaman päivän ikäisiksi ne ovat kaikkikykyisiä, jolloin kukin solu pystyy periaatteessa tuottamaan alkion ja täten uuden yksilön. Noin viidenpäivän ikäisestä alkion sisäsolumassasta voidaan eristää soluja, jotka kykenevät muodostumaan kaikiksi aikuisen ihmisen eri solutyypeiksi, mutta eivät uudeksi yksilöksi. (Tekes 2009).

Alkion kantasolulinjat perustetaan 5-6 päivän ikäisestä alkiosta. Fibroblastit estävät kantasolujen erilaistumisen, joten alkion sisäsolumassan kantasoluja kasvatetaan näiden tukisolujen päällä. Tällä tavoin soluja saadaan tuotettua lisää ja solut pysyvät kaikkikykyisinä. (Solu- ja kudosteknologiakeskus Regea 2009).

2.2 Verkkokalvo

Aikuisen silmä on pyöreä elin, joka on läpimitaltaan noin 2,4cm. Silmän seinämä on kolmikerroksinen, uloimpana silmässä on läpinäkyvä sarveiskalvo ja kovakalvo. Keskimmäinen kerros on silmää ravitseva kerros eli suonikalvosto, johon kuuluu värikalvo, sädekehä ja suonikalvo. Silmän sisin kerros on näkevä ja kammioveittä eristävä kerros, ja se muodostuu värikalvon ja sädekehän neuroepiteelistä sekä verkkokalvosta. (Kivelä 2001.) Silmän täyttää sisältä väritön massa eli lasiainen. Lasiainen on kiinni näkemisen kannalta keskeisessä osassa eli verkkokalvossa. Verkkokalvoa ympäröi tiheä verisuoniverkosto eli suonikalvo. (Näkövammaisten keskusliitto Ry 2009.)

Verkkokalvo eli retina on silmän takaosan sisäpintaa peittävä, hauras, läpinäkyvä ja ohut hermokudoskerros. Verkkokalvo on silmän näkevä kudos ja sen tehtävänä on muuttaa valoenergia hermoimpulsseiksi, muokata niitä ja välittää tieto aivoihin. Aivot muokkaavat verkkokalvolta saamansa tiedon tarkaksi näöksi, värinäöksi, näkökentäksi, syvyysnäöksi ja muiksi normaalin näkökyvyn osatekijöiksi. (Kivelä 2001.) Verkkokalvon voidaan jakaa sisempään sensoriseen retinaan ja sen ulkopuolella olevaan yksikerroksiseen pigmenttiepiteeliin (retinal pigment epithelium, RPE) (Saari, K.M. 2001).

Tarkan näkemisen alue on verkkokalvon keskuskuopassa foveassa, jossa tapahtuu tarkka kuvanmuodostus. Fovean ympärillä, verkkokalvon temporaalisten verisuonten välissä, on kehä, jota kutsutaan makulaksi. Syvyyssuunnassa verkkokalvon uloimmat hermosolut ovat tappi- ja sauvasoluja. Verkkokalvolla tappisolujen välityksellä aistitaan kirkas valo ja värit ja sauvasolujen välityksellä himmeä valo. Tappisolujen suhteellinen osuus on suurin foveassa, mutta niiden määrä on pienempi ääreisalueella. Sauvasolujen määrä taas on suurempi ääreisalueella. (Kaarniranta ym. 2003.)

2.2.1 Pigmenttiepiteeli

Valoaistinsolut tuottavat ympärilleen hiilihydraatteja, proteiineja ja rasvoja, joista muodostuu verkkokalvon hermokerroksen ulkoinen segmentti. Tämän materiaalin täyttäessä ulkoisen segmentin sisäpuolen osa segmentin ulkoreunasta hajoaa verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluihin. (Kaarniranta ym. 2003.) Aikuisen ihmisen silmässä on 4-6 miljoonaa RPE-solua. Pigmenttiepiteeli on neuroepiteeli, joka koostuu säännöllisen kuusikulmaisista soluista, jotka ovat kooltaan noin 8µm korkeita ja halkaisijaltaan 16µm. Solut ovat kiinni toisissaan useilla tiivisliitoksilla. Pigmenttiepiteelin ja valoaistinsolujen välissä on soluväliainetta, joka mahdollistaa aineenvaihduntatuotteiden vaihtumisen. (Kivelä 2001; Smith. 2000.)

RPE-solut sijaitsevat verkkokalvon uloimmassa osassa ja ylläpitävät valoaistinsolujen ympärillä oikeaa ionitasapainoa. Ne tuottavat ja hajottavat A-vitamiinijohdoksia, joita valoais-

tinsolut tarvitsevat valon tunnistamiseen. Lisäksi ne kuljettavat ja suodattavat RPE-kerroksen takana olevasta, suonikalvosta peräisin olevia ravintotekijöitä. RPE-solut ovat hyvin pigmentoituneita, ja niiden sisältämät melaniinijyvät suodattavat hermosolukerroksen läpi kulkeutunutta valoa. RPE-solut hajottavat jopa 10% ulkosegmentistä päivittäin, niiden tehtävänä on fagosytoida valoastinsolujen jatkuvasti uusiutuvia kärkiosia ja kalvopusseja. Kalvopussien mukana saamansa pigmentit pigmenttiepiteeli palauttaa takaisin valoastinsoluihin osallistuen näköpigmenttien aineenvaihduntaan. RPE-solut eivät uusiudu, jokainen niistä huolehtii noin 50 valoastinsolun homeostaasista. RPE-solut ovat hyvin erilaisia soluja fagosytoosiominaisuutensa takia, niiden biomateriaalia hajottava aktiivisuus on makrofageihin verrattuna moninkertainen. (Kaarniranta ym. 2003; Kivelä 2001.)

2.2.2 Ikärappeuma

RPE-solujen ikääntyessä niihin kertyy solunsisäistä materiaalia lipofuskiinia, joka on autofluoresoivaa monimuotoista rasvavalkuaisaineaggregaattia. Lisäksi RPE-solujen ympärille kertyy drunseneiksi kutsuttuja kasaumia. Nämä lipofuskiinit ja drunsenit ovat luultavasti ainakin osittain hajoamattomia hermokerroksen ulkoisen segmentin osia. Drunsenit on jaettu koviin ja pehmeisiin kertymiin, niiden suuri koko ja määrä korreloivat ikärappeuman synnyn kanssa. (Kaarniranta ym. 2003.)

Pigmentin epätasaisuus ja drunsenit ovat ensimmäisiä merkkejä ikärappeumasta. Pigmentin epätasaisuus lisääntyy sairauden edetessä, mikä johtuu RPE-solujen kuolemisen, rappeutumisesta, kasvusta tai kasaantumisesta tietyille alueelle. Lisäksi drunsenit saattavat irrottaa RPE-kerroksen tyvikalvostaan. Ikärappeuma voi aiheuttaa RPE- ja hermosolukerroksen tuhoutumisen sekä keskeisen näön menetyksen. RPE-solujen ja suonikerroksen toiminnan vajeus on luultavasti ikärappeuman taustalla. (Kaarniranta ym. 2003.) Ikärappeuma on johtavin syy sokeutumiseen teollisuusmaissa (Vugler ym. 2007).

Ikärappeuman hoitoon ei ole parantavaa hoitoa, hoitojen avulla voidaan ainoastaan hidastaa ikärappeuman syntyä. RPE- ja kantasolujen kasvatuksesta ja niiden siirtämisestä hermosolukerroksen alle toivotaankin tulevaisuudessa uutta hoitomuotoa. (Kaarniranta ym. 2003.)

2.3 Pigmenttiepiteelin solut

2.3.1 Kantasoluista RPE-soluiksi

Kun ihmisen kantasoluja kasvatetaan kliiniseen käyttöön, tulee kaikkien eläinpitoisten komponenttien käyttöä välttää soluviljelyssä. Ihmisen kantasolulinjat (hESC) täytyy perustaa ja kasvattaa GMP (Good manufacturing practice)-olosuhteissa, jotta soluja voidaan käyttää terapeuttisiin tarkoituksiin. Viljelyolosuhteiden kehittämistä, kohti paremmin määriteltyjä olosuhteita (GMP), on myös hyötyä tutkimustyössä. (Skottman ym. 2007.)

Ihmisen kantasolulinjoja saadaan alkioista, jotka on lahjoitettu tutkimuskäyttöön, ja jotka muuten hävitettäisiin. Eläinsolujen käyttö syöttösoluina on korvattu ihmisen esinahan fibroblastisoluilla. Kantasoluja on yleisesti viljelty seerumeissa, mutta niitä on pystytty viljelemään myös täysin ilman seerumia. Seerumin tilalla käytetään seerumin korvaajaa (KnockOut serum replacement, KO-SR) yhdessä fibroblastien kasvutekijän (bFGF) kanssa. KO-SR sisältää naudan seerumin albumia eli siinä on eläinperäisiä ainesosia. (Skottman ym. 2007.)

2.3.2 RPE-solut ja niiden ilmentämät proteiinit

Silmän kehityksessä keskuskuoppa kehittyy ensimmäisenä, ja keskuskuopan neuroektotermaalaisesta kudoksesta muodostuu neuraalinen verkkokalvo, pigmenttiepiteeli ja iiriksen sekä sädekehän epiteeli. Ihmisen silmän kehityksessä pigmentaatio on ensimmäisenä ha-

vaittava kehitysaskel silmän uloimmassa kerroksessa. Muodostuuko neuroretinasta ei-pigmentoituneita verkkokalvon soluja vai RPE-soluja riippuu pitkälti MITF ja Chx10 geenien ilmentymisestä ja niiden välisestä vuorovaikutuksesta. MITF-proteiinilla on merkittävä rooli pigmentaation ja RPE-solujen syntyyn, kun taas Chx10-proteiini vaikuttaa ei-pigmentoituneitten verkkokalvon solujen lisääntymiseen positiivisesti. On myös muita genejä, jotka vaikuttavat merkittävästi RPE-solujen erilaistumiseen ja saantoon. hESC-solujen erilaistuksessa hyviä markkereita toiminnallisesti kypsistä RPE-soluista ovat RPE65 ja CRALBP. (Vugler ym. 2007.)

Pigmenttiepiteelissä esiintyy RPE65-proteiinia. RPE65 on retinaalisen pigmenttiepiteelin spesifinen proteiini, jonka koko on 65kDa. Proteiinilla on tärkeä rooli verkkokalvon visuaalisessa syklissä, sillä se osallistuu 11-cis-retinaalin tuotantoon ja näköpigmentin uudistamiseen. RPE65-proteiinista esiintyy kahta eri muotoa, sekä liukoista sPRE65-proteiinia että mRPE65 kalvoproteiinia. Molemmat muodot toimivat säätelyproteiineina, ja näiden molekyylien välinen suhde ja konsentraatio säätelevät 11-cis-retinaalin synteesiä. Kalvoproteiini mRPE65 vaikuttaa lisäksi A-vitamiinin toimintaan (Entrez gene 2009a.)

CRALBP (Cellular retinaldehyde binding protein) on verkkokalvon pigmenttiepiteelin proteiini. Proteiini on vesiliukoinen ja kooltaan 36kDa. Proteiinissa on 11-cis-retinaali tai 11-cis-retinaali fysiologisina ligandeina. CRALBP on luultavasti toiminnallinen komponentti visuaalisessa syklissä. (Abcam 2009.)

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) on transkriptiotekijä, joka sisältää sekä perus helix-loop-helix-rakenteen sekä leusiini-vetoketju rakenteen. MITF-proteiini on kooltaan 52 tai 56kDa. MITF-proteiini auttaa kontrolloimaan pigmenttiä tuottavien melanosyyttisolujen kehitystä, ja on vastuussa pigmenttisoluspesifisten entsyymigeenien transkriptiosta. Lisäksi tämä transkriptiotekijä säätelee verkkokalvon pigmenttiepiteeli solujen erilaistumista ja kehittymistä, ja sillä onkin tärkeä rooli verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen kehitysbiologiassa. (Entrez gene 2009b ; Genetics Home References. 2009.)

2.4 Proteiinit

Proteiinit ovat elintoiminnoille välttämättömiä tyypipitoisia, orgaanisia yhdisteitä. Proteiineilla on useita tehtäviä soluissa, ja niiden kemialliset ominaisuudet ovat hyvin monimutkaisia. Proteiinimolekyylit osallistuvat biologisiin katalyyseihin, vasta-aineiden muodostumiseen, lihasten supistumiseen, solujen liikkumiseen sekä molekyylien kuljetukseen ja varastointiin. Proteiinit ovat makromolekyylejä, ja ovat molekyylipainoltaan 30 000-500 000 daltonia (Da). Proteiinien muoto ja rakenne ovat hyvin monimutkaisia. (Solunetti 2006; Boyer 2006.)

Proteiinit koostuvat peptidi-sidoksilla toisissaan kiinni olevista aminohapoista. Polypeptidiketjuissa on 20-200 aminohappoa, yleensä proteiinit koostuvat useista sadoista aminohapoista. Primaarirakenne määrittää aminohappojen järjestyksen polypeptidiketjussa. Sekundaarirakenne määrittää polypeptidiketjun muodostamat vetysidokset, yleisimmät rakenteet ovat α -heliksi ja β -laskos. Tertiäärirakenne määrittää proteiinin lopullisen muodon. (Walker 2005b, 353-355.)

2.4.1 Proteiinien eristäminen ja konsentraation mittaaminen

Proteiinit tulee eristää lähtömateriaaleista tutkimuksia varten. Soluja tai kudosta käsitellään siten, että proteiinit vapautuvat solujen sisältä ja solunsisäisistä organelleista. Proteiinit eristetään sopivan puskuriliuoksen avulla, johon proteiinit vapautuvat käsittelyn aikana. Normaalisti puskuriliuoksen ionivahvuus (0,1-0,2M) ja pH (7,0-8,0) ovat samoja kuin solun sisällä olevat arvot. Tris (trishydroksymetyyliaminometaani)- ja fosfaattipuskureita käytetään yleisesti. Puskuriliuokseen voidaan lisätä tarvittaessa entsyymi-inhibiittoreita ja erilaisia käsittelyä tehostavia detergentejä. Entsyymi-inhibiittorit estävät proteiineja hajottavien proteaasi-entsyymien toimintaan, jolloin proteiinit säilyvät ehjinä paremmin. (Walker 2005b, 360-365.)

Proteiinin eristysmenetelmiä on monenlaisia ja käytettävään menetelmään vaikuttaa solutyypin. Nisäkässoluja suojaava solukalvo ja niitä tukeva heikko tukiranka on suhteellisen helppo hajottaa. Nisäkässolut voidaan hajottaa mekaanisesti esimerkiksi tehosekoittimen avulla, joka rikkoo solukon. Solut voidaan hajottaa myös kemiallisilla tai entsyymaattisilla menetelmillä. (Walker 2005b, 360-365.)

Biokemialliset tutkimukset vaativat usein proteiinipitoisuuden määrittämistä liuoksesta. Proteiinipitoisuuden määrittämiseen on kehitetty useita menetelmiä. Vanhempia yhä yleisesti käytössä olevia menetelmiä ovat biuret-, Lowry- ja Bradford-menetelmät. Uudempia tunnetuimpia menetelmiä ovat BCA (bisinkoniinihappo, bicinchoninic acid)-menetelmä ja suora spektrofotometrinen määrittäminen. Menetelmä valitaan tarpeen mukaan, ja huomioon on otettava sekä haluttu tarkkuus että herkkyys, reaktiota häiritsevät aineet ja määrittämiseen käytettävä aika. (Boyer 2006, 69-74.)

Biuret-, Lowry-, Bradford- ja BCA-menetelmät toimivat samalla pääperiaatteella, mutta reagenssit vaihtelevat. Menetelmissä proteiiniliuokseen lisättävä kemiallinen reagenssi saa aikaan värillisen yhdisteen, jonka intensiteetti voidaan mitata spektrofotometrisesti. Jotta tuntemattoman näytteen pitoisuus saadaan selville, on valmistettava standardisuora. Standardisuora valmistetaan proteiiniliuoksista, joiden pitoisuus tiedetään. Yleensä standardisuoran valmistukseen käytetään naudan seerumin albumia (BSA). (Boyer 2006, 69-74.)

Suorassa spektrofotometrisessä määrittämisessä proteiiniliuokseen ei lisätä mitään reagenssia. Menetelmä perustuu useimpien proteiinien kykyyn absorboida ultraviolettivaloa 280nm:n aallonpituudella. Tämä ominaisuus johtuu proteiineissa olevista tyrosiini- ja tryptofaaniaminohapoista. Absorbanssi aallonpituudella 280nm on suoraan verrannollinen proteiinkonsentraatioon. Menetelmä ei ole kovin tarkka, sillä aminohappojen koostumus vaihtelee proteiinien välillä, ja lisäksi esimerkiksi nukleiinihapot kontaminoivat proteiininäytettä absorboiden valoa samalla aallonpituudella. Proteiinipitoisuuden määrittäminen tällä menetelmällä on nopeaa ja yksinkertaista, mutta antaa vain arvion näytteen proteiinipitoisuudesta. (Boyer 2006, 69-74.)

2.5 Western blot

Western blot on useimmiten käytetty menetelmä proteiinien tunnistamiseen vasta-aineiden avulla. Western blot-menetelmässä proteiinit erotellaan toisistaan kokonsa mukaisesti ja siirretään huokoiselle membraanille, josta haluttu proteiini tunnistetaan sen vasta-aineella. Tämä vasta-aineantigeenikompleksi tunnistetaan leimatun anti-vasta-aineen avulla tai primaarivasta-aine voidaan leimata suoraan radioisotoopilla tai entsyymillä. Hyvä herkkyys saadaan, kun detektoimiseen käytetään tehostettua kemiluminesenssi (enhanced chemiluminescence, ECL)-menetelmää. (Thorpe 2005, 328-331.)

2.5.1 Proteiinien geielektroforeesi

Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeielektroforeesi (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) on yleisimmin käytetty menetelmä proteiinien laadullisessa tutkimuksessa. Menetelmän avulla proteiinit saadaan eroteltua toisistaan niiden koon mukaan. (Walker, J. 2001, 588-606.)

Proteiinit täytyy denaturoida ja niille pitää antaa negatiivinen varaus ennen SDS-PAGE ajoa. Näytteet käsitellään keittämällä niitä näytepuskurissa, joka sisältää β -merkaptotetanolia ja SDS-liuosta. Merkaptotetanoli rikkoo tertiäärirakenteen rikkisillat ja SDS tarttuu proteiineihin denaturoiden ne. Lisäksi SDS antaa kaikille proteiineille negatiivisen varauksen, joka on kaikilla yhtä suuri suhteessa massaansa. Näytepuskuri sisältää yleensä myös väriainetta, esimerkiksi bromofenolisinistä, jolloin näytteiden kulkeutumista geelillä voidaan seurata. Näytepuskurin sisältämän sukroosin tai glyserolin seurauksena näytteet painuvat kuopan pohjalle geelille injektoidaessa. (Walker, J. 2001, 588-606.)

Näytteet injektoidaan konsentrintigeelille, joka on valettu erotusgeelin päälle. Konsentrintigeelin tarkoitus on konsentroida näytteet teräviksi vyöhykkeiksi eli bändeiksi. Konsentrintigeelin huokoskoko on suuri, joten proteiinit voivat liikkua siinä hyvin ja konsentroitua ennen erotusgeeliä. Näytteet liikkuvat geelillä negatiivisen varauksen ansiosta kohti

positiivista napaa eli anodia. Erotusgeelin huokoskoko on konsentroitigeeliä huomattavasti pienempi, jolloin pienemmät proteiinit pääsevät liikkumaan geelillä helpommin kuin isommat proteiinit. Koska proteiinit on denaturoitu ja kaikilla on suhteessa sama varaus, pienet proteiinit kulkeutuvat nopeammin ja isot hitaammin geelillä. (Walker, J. 2001, 588-606.)

2.5.2 Proteiinien siirto membraanille ja detektointi

SDS-PAGE:n avulla erotellut proteiinit siirretään sähkövirran avulla nitroselluloosa- tai PVDF-membraanille. Tätä tekniikkaa kutsutaan elektroblottaukseksi. SDS-PAGE-geelistä, membraanista ja suodatinpapereista rakennetaan sandwich, joka laitetaan kahden samansuuntaisen elektrodin väliin. Sähkövirran vaikutuksesta geelillä olevat proteiinit siirtyvät membraanille, jolloin proteiinien tarkemmat tutkimukset ovat mahdollisia. (Walker 2005a, 469.)

Membraani blokataan inkuboimalla sitä naudan seerumin albumiinista (BSA, Bovine Serum Albumin) tai rasvattomasta maitojauheesta tehdyssä liuoksessa, jolloin kaikki membraanin vapaat hydrofobiset sitoutumiskohdat peittyvät. Seuraavaksi membraani käsitellään tutkittavan proteiinin antiseerumilla eli primaarivasta-aineella. Tämä IgG-vastaainemolekyylillä sitoutuu membraanilla olevaan antigeeniin eli haluttuun proteiiniin. Membraani käsitellään vielä primaarivasta-aineen tunnistavalla sekundaarivasta-aineella, joka sitoutuu primaarivasta-aineeseen. Tämä sekundaarivasta-aine on leimattu tarkoituksenmukaisella leimalla, jolloin primaarivasta-aineeseen kiinnittynyt sekundaarivasta-aine voidaan detektoida. (Walker 2005a, 470-471.)

Sekundaarivasta-aine voi olla leimattu eri tavoin. Jos sekundaarivasta-aineessa on entsyymileima, membraanille kiinnittyneet tutkittavat proteiinit detektoidaan inkuboimalla membraania entsyymin substraattiliuoksessa. Substraatti sitoutuu entsyymiin ja entsyymi muuttaa sen liukenemattomaksi värilliseksi yhdisteeksi membraanilla. Tämä värillinen bändi ilmoittaa tutkittavan proteiinin läsnäolon ja paikan membraanilla. Toinen vaihtoehtoinen detektointitapa on käyttää piparjuuriperoksidaasia ja kemiluminesenssia (ECL). Vetyperoksi-

daasin ja kemiluminesenssisubstraatti luminolin läsnä ollessa piparjuuriperoksidaasi hapettaa luminolin. Hapetusreaktion lopputuotteena syntyy valoa. Valon emissio voidaan detektoida käyttäen kemiluminesenssiä kuvaavaa kameraa. (Walker 2005a, 470-472.)

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

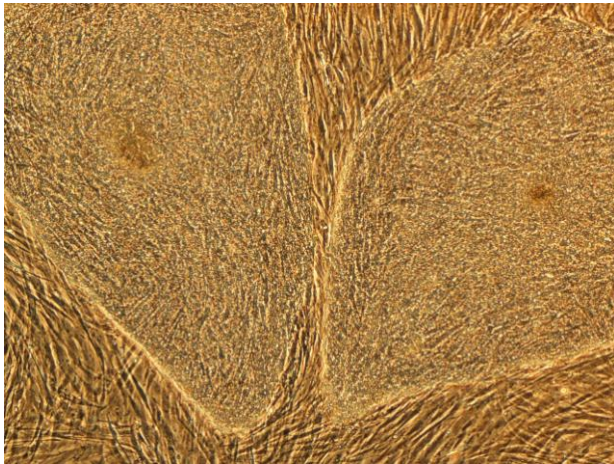
Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida western blot -menetelmä alkion kantasoluista tuotetuille verkkokalvon soluille. Menetelmä optimoitiin MITF-, RPE65- ja CRALBP- proteiineille, jotka ovat tärkeitä tekijöitä kantasolujen erilaistumisessa silmän pigmenttiepiteelisoluiksi.

Tavoitteena oli, että Solu- ja kudosteknologiakeskus Regean silmäryhmässä voidaan tässä työssä optimoidun menetelmän avulla seurata ihmisen alkion kantasoluista tuotettavien verkkokalvon solujen erilaistumista proteiinitasolla.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Kantasoluviljely

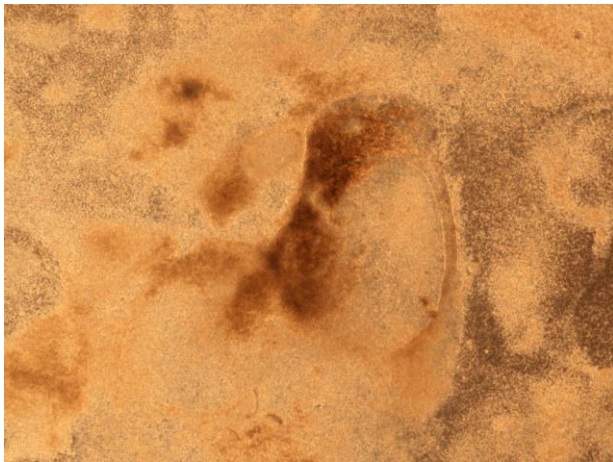
Regeassa kantasolulinjat viljellään ihmisten esinahan fibroblastien eli syöttösolujen päällä solulle sopivassa mediumissa. Jos kantasolulinjat halutaan ylläpitää erilaistumattomina, tulee niitä jakaa säännöllisin väliajoin uusille maljoille. Tutkimuksessa käytettiin kantasolulinjaa 08/017 sekä ryhmän aikaisemmin pakastamia solunäytteitä. Kantasolujen lisäksi työssä käytettiin HeLa-syöpäsolulinjan soluja. Kuviossa 1 on kuvattu 35mm:n maljalla kasvavia kantasolukolonioita, kuviossa on nähtävillä kaksi erilaistumatonta kantasolukoloniaa.



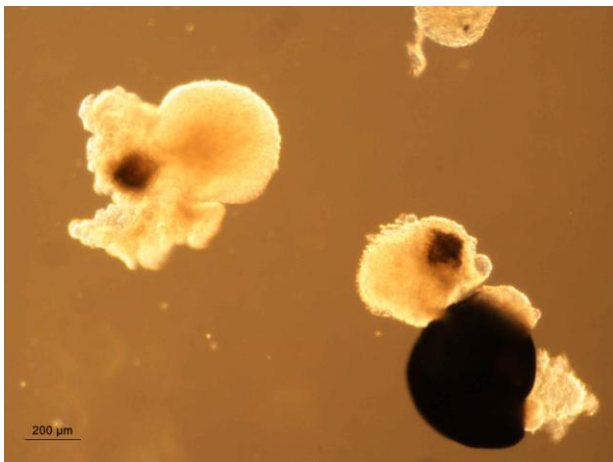
KUVIO 1 Erilaistumattomia kantasolukolonnioita.

RPE-soluiksi erilaistuksen alussa kantasoluja kasvatettiin 35mm:n soluviljelymaljoilla RPE-solujen kasvatusmediumissa fibroblastien päällä 3-5 päivää. Kantasolujen kasvaessa maljalla medium vaihdettiin päivittäin ravinteiden ylläpitämiseksi ja kuona-aineiden poistamiseksi. Kuviossa 2 on nähtävillä osittain erilaistuneita kantasolukolonioita, jossa tummat kohdat ovat erilaistuneita RPE-soluja. 3-5 päivän jälkeen kantasolukoloniat irrotettiin mekaanisesti maljalta ja siirrettiin kasvamaan kaupalliselle low attachment 6-kuoppalevyille. Kuoppalevyn pinta on käsitelty niin, etteivät solut tartu siihen vaan kasvavat irrallaan liu-

oksessa. Kantasolukoloniat irrotettiin mekaanisesti leikkaamalla skalpellilla koloniat suhteellisen isoihin paloihin, ja irrottamalla ne sitten neulalla maljan pohjasta. Irrottamisen jälkeen erilaistuksessa olevat kantasolut siirrettiin kuoppalevyille. Kuviossa 3 on nähtävillä 6-kuoppalevyllä liuoksessa vapaana kasvavia solurykelmiä. Tummat kohdat ovat erilaistuneita RPE-soluja.



KUVIO 2 Erilaistuneita RPE-soluja feeder-soluilla.



KUVIO 3 Erilaistuneita RPE-soluja 6-kuoppalevyllä.

6-kuoppalevyillä olevat solut ruokittiin samalla RPE-solujen kasvatusmediumilla kolme kertaa viikossa. Solut kasvavat liuoksessa solurykelminä, jotka ovat silmin helposti havaittavia solupalloja. Solurykelmien kasvaessa liian suuriksi niitä täytyi leikata pienemmiksi. Ruokinnan yhteydessä seurattiin solujen kehittymistä ja tarkasteltiin milloin niissä alkaa

näkyä pigmenttiä. Soluihin muodostuvan pigmentin voi nähdä joko silmin tai alkuvaiheessa mikroskoopilla. Proteiinin eristystä varten näytteet kerättiin liuoksessa kasvavista soluviljelmistä. Kasvatusmediumissa vapaana kasvavista solurykelmistä valittiin pigmentoituneet kohdat, jotka kerättiin ja pakastettiin kuivasolupellettinä proteiinin eristystä varten.

4.2 Proteiinien eristys

Proteiinit eristettiin M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent -kitin (Pierce) avulla. Kitin avulla voidaan eristää sekä sytoplasmassa että tumassa sijaitsevat proteiinit viljellyistä nisäkäsoluista. M-PER kitti sisältää 25mM bisiinipuskurin, joka aktivoi soluhajotuksen. Reagenssi ei sisällä proteaasi-inhibiittoreita, joten niitä lisättiin reagenssin joukkoon ennen proteiinien eristystä. (Pierce Biotechnology 2009b.) Proteaasi-inhibiittorina käytettiin Complete Mini proteaasi-inhibiittoricocktailtableteista (Roche) valmistettua liuosta. Liuos sisältää seriini- kysteini- ja metalloproteaasien toimintaa estäviä proteaasi-inhibiittoreita. (Roche Applied Science.)

Kantasoluista erilaistuneet silmän RPE-solut saatiin soluviljelystä keräämällä suspensiossa kasvaneita solurykelmiä. HeLa-solut taas irrotettiin trypsiinin avulla pohjasta ja kerättiin putkeen. Kerätyt solut sentrifugoitiin putken pohjalle, jonka jälkeen supernantti poistettiin. Solut pestiin kaksi kertaa fosfaattisuolapuskurilla (PBS, Phosphate buffered saline) mediumjäämien poistamiseksi.

Pelletoitujen solujen joukkoon lisättiin M-PER-reagenssia, johon on lisätty proteiini-inhibiittoria, ja solut suspensioitiin reagenssin joukkoon. Suspensiota sekoitettiin varovasti 10 minuuttia, jonka jälkeen solukalvojätteet sentrifugoitiin pohjaan. Supernatantti otettiin talteen ja jaettiin alieriin pakastusta varten.

4.3 Proteiinien konsentraation mittaaminen

Näytteiden proteiinikonsentraatio mitattiin kaupallisen BCA-proteiinimäärityskitin (Pierce) avulla. Menetelmä perustuu kolorimetrisen reaktion bisinkoniinihapon (BCA) ja kokonaisproteiinienmäärän välillä. Proteiinikonsentraation mittaauksessa tapahtuu kaksi eri reaktiota. Proteiinien vaikutuksesta Cu^{2+} -ionit pelkistyvät Cu^{1+} -ioneiksi emäksisessä liuoksessa ja bisinkoniinihappo-molekyylin muodostama kelaatti reagoi Cu^{1+} -ionin kanssa. Nämä reaktiot saavat aikaan purppuran värisen reaktiotuotteen ja tämä vesiliukoinen kompleksi aiheuttaa voimakkaan absorbanssin aallonpituudella 562nm. Absorbanssin voimakkuus kasvaa lähes lineaarisesti proteiinikonsentraation kasvaessa työskentelyalueella 20-2000 $\mu\text{g/ml}$. (Pierce Biotechnology 2009a.)

BCA protein assay –kitti sisältää tarvittavat reagenssit. Näytteiden absorbanssit mitattiin 96-kuoppalevyllä Victor² multilabel plate reader –laitteella (Perkin Elmer) spektrofotometrisesti. Kitti sisältää standardisuoran tekoa varten naudan seerumin albumiinia (BSA). Ampulli sisältää albumiiniliuosta, joka on pitoisuudeltaan 2,0mg/ml. BSA-ampullista eli stokki-liuoksesta valmistettiin tarvittavat standardit taulukon 1 mukaisesti.

TAULUKKO 1 Standardien valmistus.

Putki	milli-Q-vettä	Standardin määrä	BSA-pitoisuus
A	0 μl	300 μl stokki	2000 $\mu\text{g/ml}$
B	125 μl	375 μl stokki	1500 $\mu\text{g/ml}$
C	325 μl	325 μl stokki	1000 $\mu\text{g/ml}$
D	175 μl	175 μl laimennosta B	750 $\mu\text{g/ml}$
E	325 μl	325 μl laimennosta C	500 $\mu\text{g/ml}$
F	325 μl	325 μl laimennosta E	250 $\mu\text{g/ml}$
G	325 μl	325 μl laimennosta F	125 $\mu\text{g/ml}$
H	400 μl	100 μl laimennosta G	25 $\mu\text{g/ml}$
I	400 μl	0 μl	0 $\mu\text{g/ml}$

Standardit ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyn kuoppiin. Standardeista tehtiin kaksi rinnakkaista määrittystä ja näytteiden pitoisuus mitattiin sekä laimentamattomasta että 1:10 laimennetusta näytteestä. Näytteistä ei tehty rinnakkaisia määrittymiä. Aluksi kuoppalevylle pipetoitiin standardit ja näytteet, kutakin 25 µl kuoppaa kohden. Kaivoihin lisättiin 200 µl työskentelyliuosta, joka on saatu sekoittamalla kitin sisältämiä reagensseja A ja B toisiinsa suhteessa 50:1. Kuoppalevyä sekoitettiin varovasti 30 sekuntia, jonka jälkeen levyä inkuboitiin 30 minuuttia +37 asteessa peitettynä. Kuoppalevy jäähdytettiin huoneenlämpöön ja absorbanssit mitattiin aallonpituudella 544 nm. Mittauksen aallonpituus valittiin laitteen filttereiden mukaan, ja käytetty aallonpituus oli lähimpänä kitin suositteluun.

Mitattujen näytteiden konsentraatio selvitettiin standardisuoran avulla. Standardien konsentraatioista ja spektrofotometrin antamista absorbansseista piirretty standardisuora on esitetty liitteessä 3. Suoran yhtälön avulla laskettiin eristettyjen proteiininäytteiden pitoisuudet. Jokaisen mittauksen yhteydessä laadittiin uusi standardisuora.

4.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE-geelin valmistukseen käytettiin Bio-Radin geelivalulaitteistoa. Työssä käytettiin sekä 12% että 10% erotusgeeliä. Erotusgeeli valmistettiin taulukon 2 ohjeen mukaan (valmistettavat liuokset liitteessä 2) ja pipetoitiin lasilevyjen väliin jättäen yläreunaan tilaa konsentrintigeelille noin 3 cm. Erotusgeelin päälle pipetoitiin hieman tislattua vettä, jotta geeli suoristuu eikä pääse kuivumaan. Geelin annettiin polymerisoitua 45-60 minuuttia, jonka jälkeen vesi imettiin ruiskulla pois ja juuri valmistettu konsentrintigeeli pipetoitiin päälle. Kampa asetettiin paikoilleen ja geelin annettiin polymerisoitua 45-60 minuuttia.

TAULUKKO 2 Geelin valmistus.

	12% Erotusgeeli	10% Erotusgeeli	4% Konsentroidutigeeli
40% Bis-akryyliamidi	1,8ml	1,5ml	300µl
0,5M Tris-HCl pH 6,8	-	-	755µl
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,5ml	1,5ml	-
10% SDS	60µl	60µl	30µl
H ₂ O	2,61ml	2,91ml	1,91ml
TEMED	3µl	3µl	3µl
10% APS	30µl	30µl	30µl
kokonaistilavuus	6ml	6ml	3ml

4.4.1 Näytteiden valmistus ja geelin ajo

Proteiininäytteitä valmistettiin 15µl, niin että kunkin näytteen proteiinipitoisuus on 3µg, 5µg, 8µg, 10µg, 15µg tai 20µg/kaivo. Näytteisiin pipetoitiin proteiininäytettä, 5x latauspuskuria (Fermentas), vettä ja 20x reducing agent -liuosta (Fermentas). Näytteet sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin +95 asteessa 5 minuuttia. Standardina käytettiin PageRuler -proteiinistandardia (Fermentas). Proteiinistandardia ei tarvitse käsitellä ennen geelille injektointia. Joillekin geeleille valmistettiin näyte myös pelkästä RPE-solujen kasvatusmediu-
mista, koska epäiltiin, että medium aiheuttaa taustabändin.

Geelin ajolaite koottiin, ja täytettiin 1x ajopuskurilla (kuvattu liitteessä 2). Näytteet ja standardit pipetoitiin geelille siten, että näytteitä pipetoitiin koko valmistettu määrä kaivoon ja standardia pipetoidaan kaivoon 5µl. Geeli laitettiin ajoon consort-virtalähteeseen, aluksi ajettiin 150V 10 minuuttia, ja sitten 10% geelillä 180V 50 minuuttia ja 12% geelillä 180V 55 minuuttia.

4.5 Western blot

Western blot -siirrossa käytettiin PVDF-membraania (Hybond-P). Ennen siirtoa membraani kostutettiin metanolissa, pestiin vedellä ja tasapainotettiin 10-15 minuuttia towbin-puskurissa (kuvattu liitteessä 2). SDS-PAGE-geeli otettiin ajolaitteesta ja konsentroitigeeli leikattiin pois. Lisäksi geeliä pidettiin towbin-puskurissa tasapainottumassa.

Siirrossa käytettiin TE70-siirtolaitetta (GE Healthcare). Anodi ja katodi huuhdottiin tislattulla vedellä. Laitteeseen kasattiin alhaaltapäin seuraavassa järjestyksessä paksu suodatinpaperi, PVDF-membraani, SDS-PAGE-geeli ja paksu suodatinpaperi. Siirtolaitteen kokoamisen jälkeen ilmakuplat poistettiin. Päälle pipetoitiin towbin-puskuria, suljettiin siirtolaite ja aloitettiin ajo. Ajo suoritettiin 80mA virralla ja ajoaika oli yksi tunti.

Siirron jälkeen membraani laitettiin blokkaukseen yön yli 2 tai 3% BSA-liuokseen +4 asteeseen. Joissakin testeissä membraanille tehtiin seuraavana päivänä lisäksi toinen blokkaukset 5%:ssa rasvattomassa maitojauheessa. Blokkauksen jälkeen kalvo huuhdottiin 1xTBS-Tween-liuoksella (kuvattu liitteessä 2).

4.6 Primaari- ja sekundaarivasta-aineinkubaatiot

Primaarivasta-aineet laimennettiin 1% BSA:han, joka tehtiin TBS-Tween-liuokseen. Primaari-inkubaatio tehtiin 50ml falcon-putkessa ja primaarivasta-ainelaimennosta tehtiin 5ml. Putkea inkuboitettiin huoneenlämmössä 1-2 tuntia sekoittajassa. Primaarivasta-aine inkubaation jälkeen membraania pestiin TBS-Tween-liuoksella.

Sekundaarivasta-aine laimennettiin TBS-Tween-liuokseen ja inkuboitettiin tunti huoneenlämmössä sekoittajassa valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen membraania pestiin kaksi kertaa noin 15 ml:lla TBS-Tween-liuosta ja kaksi kertaa 15 millilitralla 1x TBS:a. Yksi pesu kesti kymmenen minuuttia. Voimakkaan taustan takia tehtiin myös muutama testaus pelkällä sekundaarivasta-aineella. Blokkauksen jälkeen membraani pestiin ja inkuboitettiin

suoraan sekundaarivasta-ainelaimennoksessa. Tällä testauksella saadaan selville johtuuko voimakas tausta ja ylimääräiset bändit sekundaari- vai primaarivasta-aineen epäspesifisestä sitoutumisesta.

4.6.1 MITF

MITF-vasta-aineen optimoinnissa käytettiin kahta eri primaarivasta-ainetta. Ensimmäinen oli MITF kanin polyklonaalinen IgG-vasta-aine (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz biotechnology). Toinen käytetty vasta-aine oli MITF hiiren IgG-vasta-aine (mouse IgG, Abcam). Taulukossa 3 on ilmoitettu eri vasta-ainelaimennokset.

Sekundaarivasta-aineita oli kolmea erilaista, vuohen anti-kani IgG (H+L)-vasta-aine (goat anti-rabbit IgG, Invitrogen), vuohen anti-hiiri IgG+A+M-vasta-ainetta (goat anti-mouse IgG+A+M, Invitrogen) ja vuohen anti-hiiri IgG-vasta-ainetta (goat anti-mouse IgG, Santa Cruz). Taulukossa 3 on esitetty käytetyt sekundaarivasta-ainelaimennokset.

TAULUKKO 3 MITF.

Blokkaus	Primaari vasta-aine	Laimennos	Sekundaari vasta-aine	Laimennos
2% BSA	MITF rabbit polyclonal IgG	1:200	Goat anti-rabbit IgG	1:2000
3% BSA	MITF rabbit polyclonal IgG	1:400	Goat anti-rabbit IgG	1:2000
3% BSA	MITF mouse IgG	1:1000	goat anti-mouse IgG+A+M	1:2000
3% BSA+ 10% maitojauhe	MITF mouse IgG	1:1000	goat anti-mouse IgG+A+M	1:2000
3% BSA+ 10% maitojauhe	MITF mouse IgG	1:1000	goat anti-mouse IgG+A+M	1:5000
3% BSA	MITF mouse IgG	1:2000	goat anti-mouse IgG	1:3500
3% BSA+ 10% maitojauhe	MITF mouse IgG	1:1000	goat anti-mouse IgG	1:2000
3% BSA+ 10% maitojauhe	MITF mouse IgG	1:1000	goat anti-mouse IgG	1:5000

4.6.2 RPE 65

RPE65 optimoinnissa käytettiin yhtä primaarivasta-ainetta, RPE65 vuohen polyklonaalista IgG-vasta-ainetta (goat polyclonal IgG ,Santa Cruz). Sekundaarivasta-aineena käytettiin kanin anti-vuohi IgG(H+L)-vasta-ainetta (rabbit anti-goat IgG (H+L) Santa Cruz). Toisena vasta-aineena oli kanin anti-vuohi IgG-vasta-aine (rabbit anti-goat IgG, Zymed). Taulukossa 4 on esitetty käytetyt vasta-aineet ja laimennokset.

TAULUKKO 4 RPE65.

Blokkaus	Primaarivasta-aine	Laimennos	Sekundaarivasta-aine	Laimennos
2% BSA	RPE65 goat polyclonal IgG	1:200	Rabbit anti-goat IgG (Zymed)	1:4000
3% BSA + 5% maitojauhe	RPE65 goat polyclonal IgG	1:200	Rabbit anti-goat IgG (Santa cruz)	1:5000

4.6.3 CRALBP

CRALBP optimoinnissa käytettiin primaarivasta-aineena CRALBP hiiren monoklonaalista IgG-vasta-ainetta (mouse monoclonal IgG:tä, Abcam). Testissä käytettiin kahta eri sekundaarivasta-ainetta vuohen anti-hiiri IgG+A+M-vasta-ainetta (goat anti-mouse IgG+A+M, Invitrogen) ja vuohen anti-hiiri IgG(H+L)-vasta-ainetta (goat anti-mouse IgG (H+L), Santa Cruz). CRALBP vasta-aine näytteet ajettiin 12% geelillä. Taulukossa 5 on esitetty käytetyt vasta-aineet ja laimennokset.

TAULUKKO 5 CRALBP.

Blokkaus	Primaari vasta-aine	Laimennos	Sekundaari vasta-aine	Laimennos
10% maitojauhe	CRALBP mouse monoclonal IgG	1:20 000	goat anti-mouse IgG+A+M	1:20 000
3% BSA+ 10% maitojauhe	CRALBP mouse monoclonal IgG	1:20 000	goat anti-mouse IgG	1:20 000

4.7 Detektio

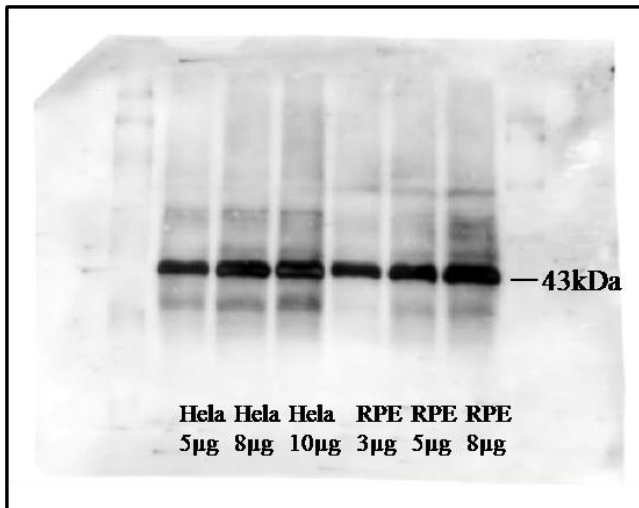
Piparjuuriperoksidaasilla leimattu sekundaarivasta-aine saatiin näkyviin ECL plus western blotting detection system -kitin (GE Healthcare) avulla. Kitti sisältää reagenssit A ja B, joita sekoitettiin keskenään suhteessa 40:1. Liuos pipetoitiin membraanin päälle tasaisesti ja inkuboitiin 5 minuuttia. Membraanilla olevat vasta-aineet detektoitiin kemiluminesenssiä kuvaavalla CCD-kameralla (Bio-Rad).

PageRuler-proteiinistandardi ei näy kuvattaessa kemiluminesenssiä. PageRuler-proteiinistandardista otettiin kuva samalla kameralla, mutta kuvaamiseen ei käytetty kemiluminesenssiä vaan *epi white light* -valotusta.

5 TYÖN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

5.1 Menetelmän testaus

Aluksi testattiin yleisesti menetelmän toimivuutta valmiiksi optimoidulla β -aktiinivasta-aineella. Lisäksi testattiin, mikä olisi sopiva proteiinimäärä kaivoa kohden, jotta proteiinibändi olisi tarpeeksi vahva ja selkeä. RPE-soluista valmistetuilla proteiininäytteillä proteiinia pipetoitiin kaivoihin 3 μ g, 5 μ , ja 8 μ g/kaivo. Hela-soluilla proteiinia pipetoitiin 5 μ g, 8 μ g ja 15 μ g/kaivo. Membraani blokattiin 2%:lla BSA-liuoksella, jonka jälkeen suoritettiin primaari-inkubaatio β -aktiinivasta-aineella, joka on hiiren monoklonaalinen IgG-vasta-aine (mouse monoclonal IgG, Santa Cruz). β -aktiinivasta-aine laimennettiin suhteessa 1:2000. Sekundaarivasta-aineena käytettiin HRP kanin anti-hiiri IgG:tä (HRP rabbit anti-mouse, Invitrogen) ja laimennos oli suhteessa 1:2000. Alla olevassa kuviossa (KUVIO 4) on nähtävillä voimakas bändi noin 43kDa:n kohdalla kaikilla näytteillä. Tämä bändi vastaa β -aktiinia.



KUVIO 4 β -aktiini.

β -aktiini on solujen yksi perusproteiini, joten sitä tuotetaan soluissa paljon. Tutkittaessa muita proteiineja, joiden tuotto on solussa huomattavasti pienempi, joudutaan proteiininäy-

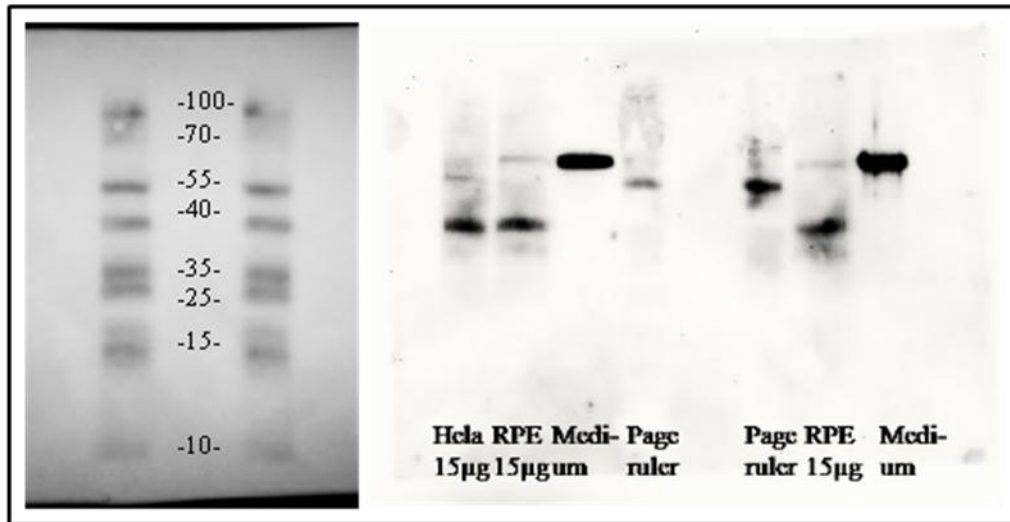
tettä pipetoimaan kaivoon enemmän. Tällä vasta-aineella myös pienemmät proteiinipitoisuudet antavat vahvan bändin, mutta muilla vasta-aineilla nostetaan silti proteiinipitoisuutta kaivoa kohden. Jatkossa kaivoihin pipetoitiin Hela-proteiininäytettä 10 μ g tai 15 μ g ja RPE-proteiininäytettä 15 μ g.

5.2 MITF

MITF-vasta-aineen optimoinnissa käytettiin kahta eri primaarivasta-ainetta ja kolmea erilaista sekundaarivasta-ainetta. Kaikissa olosuhteissa ongelmaksi muodostui tausta. Joillakin olosuhteilla oikea bändi saatiin näkyviin, mutta tausta proteiinien kulkemalta matkalta oli voimakas. Ensimmäisenä testattua vasta-ainetta MITF rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) yritettiin optimoida kaksilla eri olosuhteilla (olosuhteet esitetty taulukossa 3), mutta tämän vasta-aineen optimoinnista luovuttiin. Seuraavaksi yritettiin optimoida MITF mouse IgG (Abcam) vasta-ainetta. Tämän vasta-aineen optimointia yritettiin useammilla olosuhteilla. Jatkon kannalta olisi toivottavaa, että jälkimmäinen vasta-aine saataisiin toimimaan, koska tätä vasta-ainetta käytetään tutkimusryhmässä tehtävissä immunovärjäyksissä.

Kuviossa 5 on yhden MITF-vasta-aineen optimointikokeen tulos. Tässä kokeessa membraani on blokattu 3% BSA-liuoksella. Primaarivasta-aineena on käytetty MITF mouse IgG-vasta-ainetta (Abcam) suhteessa 1:2000 ja sekundaarivasta-aineena goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz) suhteessa 1:3500. MITF-proteiini on kooltaan 52 tai 56kDa. Membraanilla ei näy selkeää bändiä MITF proteiinin kohdalla. HeLa-soluilla on luultavasti näkyvissä haalea bändi. Kasvatusmediumin jokin komponentti aiheuttaa voimakkaan bändin noin 60kDa:n kohdalle, joka näkyy haaleana myös RPE-proteiininäytteissä. Noin 40kDa:n kohdalla tai hieman sen alapuolella on nähtävillä voimakas tuntematon bändi.

MITF-proteiinin tunnistamiseen ei saatu optimoitua western blot -menetelmää. Ongelmana monissa olosuhteissa oli taustan voimakkuus. Kuviossa 5 ei ole voimakasta taustaa kokonaisuudessaan, mutta siinä on nähtävillä voimakkaita ylimääräisiä bändejä, eikä MITF bändi näy lainkaan.

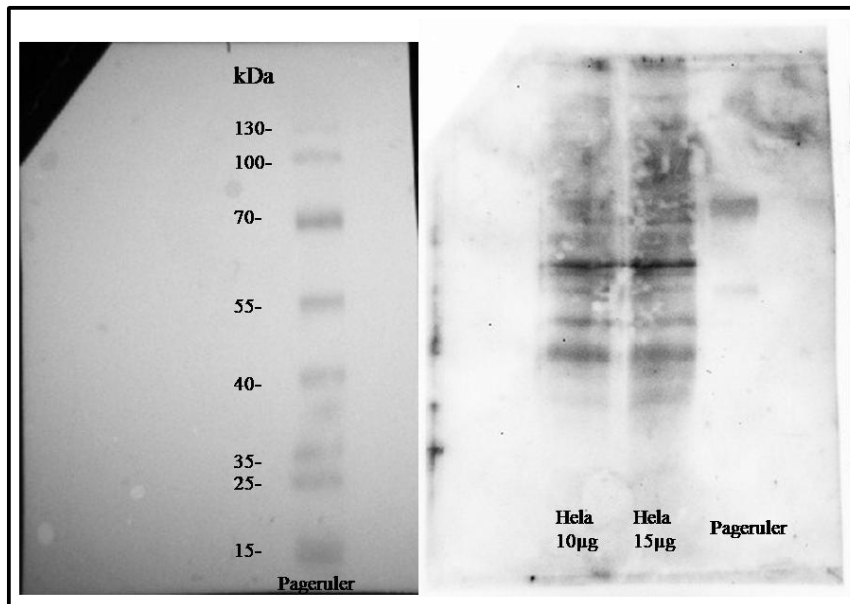


KUVIO 5 MITF-proteiinin detektio.

5.3 RPE65

RPE65-vasta-aineoptimoinnissa käytettiin yhtä primaarivasta-ainetta ja kahta eri sekundaarivasta-ainetta. Rabbit anti-goat (Zymed) sekundaarivasta-aineen kanssa taustaa havaittiin melko paljon ja lisäksi näkyvillä oli useampia eri bändejä. RPE65-vasta-aineen määrittämissä käytettiin näytteinä sekä HeLa- että RPE-soluja.

Rabbit anti-goat-vasta-aine (Santa cruz) toimi toista testattua vasta-ainetta huomattavasti paremmin, vaikka havaittiin heikkoa taustavärjäytymistä. HeLa-soluilla menetelmä saatiin toimimaan melko hyvin. Bändit saatiin näkyville oikeaan kohtaan, mutta tausta värjäytyi haaleasti kokonaan proteiinien kulkemalta matkalta. Kuviossa (KUVIO 6) on nähtävillä HeLa-soluilla tehty RPE65-detektio. Bändi on nähtävillä noin 65kDa:n kohdalla, joka on RPE65-proteiinin koko. RPE-soluilla menetelmää ei saatu toimimaan. Tämä johtuu luultavasti siitä, että solut eivät olleet tarpeeksi vanhoja, eivätkä täten ilmentäneet vielä RPE65-proteiinia.

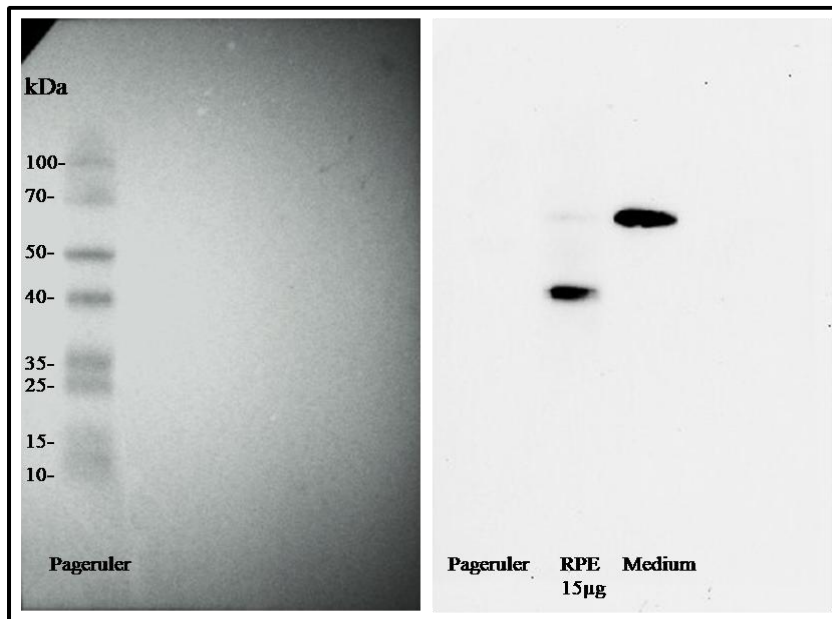


KUVIO 6 RPE65-proteiinin detektio.

5.4 CRALBP

CRALBP-vasta-aineen optimoinnissa käytettiin yhtä primaarivasta-ainetta ja kahta eri sekundaarivasta-ainetta. Goat anti-mouse IgG+A+M (Invitrogen) vasta-aine aiheutti jonkin verran taustaa ja membraanilla on nähtävissä useampi bändi. Tällä sekundaarivasta-aineella ei saatu CRALBP-proteiinibändiä selkeästi näkyville.

Toinen käytetty sekundaarivasta-aine oli goat anti-mouse IgG (H+L) (Santa Cruz). Tällä sekundaarivasta-aineella CRALBP-proteiinin tunnistusmenetelmä saatiin optimoitua. Kuviossa (KUVIO 7) on näkyvillä selkeä bändi RPE-soluilla kohdassa 37kDa, joka on CRALBP-proteiinin koko. Ajossa on myös ollut näytteenä pelkkä RPE-solujen kasvatusmedium, joka aiheuttaa voimakkaan bändin noin 60kDAn kohdalle. Tämä mediumin aiheuttama bändi on tosin RPE-proteiini näytteessä todella haalea, eikä häiritse RPE-proteiinibändin tulkintaa. Solunäytteiden pesussa tulee olla huolellinen, muuten bändi voi tulla häiritsevänä esille.



KUVIO 7 CRALBP-proteiinin detektio.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Western blot -menetelmän optimoinnissa ensimmäisenä tavoitteena oli löytää näytteille sopiva proteiinikonsentraatio. Sopiva proteiinikonsentraatio löydettiin sekä HeLa- että RPE-soluille. HeLa-solujen proteiininäytettä pipetoidaan 10µg tai 15µg yhteen kaivoon, ja RPE-solujen proteiininäytettä 15µg:aa kaivoon. Pipetoitaessa proteiinia 15µg/kaivo on todennäköistä, että sellaisetkin proteiinit, joita solu tuottaa vain vähän, ovat havaittavissa.

Kaikkia tutkittavia vasta-aineita ei saatu toimimaan halutulla tavalla. RPE65-vasta-aine saatiin optimoitua HeLa-soluilla, mutta ei RPE-soluilla. Tämä johtuu todennäköisesti kokeissa käytettyjen RPE-solujen nuoresta iästä, sillä RPE-solut eivät ilmennä RPE65-proteiini varhaisessa vaiheessa. Geeni-tasolla samanikäisillä soluilla RPE65-geeni on havaittavissa, mutta RPE65-proteiinia ei olla saatu detektoitua näin nuorilla soluilla muissakaan tutkimusryhmissä. Geeni-tasolla RPE65-geeni on todettu RT-PCR -menetelmän avulla. RT-PCR ja western blot -menetelmän välillä on herkkyys ero, sillä RT-PCR-menetelmässä positiivinen tulos voidaan saada yhden ainoan positiivisen solun vaikutuksesta. Western blot -menetelmä vaatii paljon positiivisia soluja ennen tulosten näkymistä proteiinitasolla. Vaikka soluja erilaistettiin pitkään ja ainoastaan pigmentoituneet kohdat kerättiin proteiinineristykseen, oli näytteessä mukana aina myös paljon muitakin soluja. Tämän menetelmän toimivuutta tulisi testata kauemmin erilaistuksessa olleilla RPE-soluilla.

MITF-vasta-aineoptimoinnin kanssa oli eniten ongelmia. Menetelmässä oli paljon häiritsevää taustavärjäntymistä. Vasta-aine myös sitoutui epäspesifisesti johonkin molekyyliin. Menetelmän olosuhteiden optimointia tulee jatkaa. Tausta johtuu todennäköisesti sekundaarivasta-aineen epäspesifisestä sitoutumisesta. MITF-optimoinnissa testattiin sekundaarivasta-aineen sitoutumista membraaniin, eli membraania ei inkuboitu lainkaan primaarivasta-aineessa vaan ainoastaan sekundaarivasta-aineessa. Pelkän sekundaarivasta-aineen ei tulisi tarttua membraaniin, mutta se aiheutti silti voimakasta taustaa. Sekundaarivasta-aineen aiheuttamaan taustaa voidaan yrittää korjata eri tavoin. Koska blokkauksiliuos voi vaikuttaa taustaan, olisi hyvä testata eri vahvuuksia rasvaton maitojauhe- ja BSA-liuoksista. Myös inkubaatiolämpötila voi vaikuttaa. Tässä työssä sekä primaari- että sekundaari-vasta-aine inkubaatiot tehtiin huoneenlämmössä. Inkubointi +4 asteessa voisi vähentää taustaa. Yli-

määräiset bändit johtuvat yleensä primaari- tai sekundaarivasta-aineen epäspesifisestä sitoutumisesta. Pelkkä sekundaarivasta-aine aiheutti taustaa testauksessa, joten aluksi olisi hyvä kokeilla sekundaarivasta-aineen laimentamista. Myös geelielektroforeesissa käytetty SDS saattaa aiheuttaa epäspesifistä sitoutumista. Tätä ongelmaa ei pitäisi olla, koska geeliä on pidetty towbin-puskurissa ennen membraanille siirtoa. Jos blokkauksliuoksen vahvuuden muuttaminen, inkubaatioiden suorittaminen +4 asteessa ja erilaisten vasta-ainepitoisuuksien testaus eivät tuota haluttua tulosta, voi olla tarpeen koettaa optimoida toisenlaisia vasta-aineita.

CRALBP-vasta-aine saatiin optimoitua käyttökuuntoon. Membraanille saatiin detektoitua yksi selvä CRALBP-proteiinibändi. Membraanilla RPE-solujen kasvatusmedium aiheuttaa haalean bändin, joten solujen pesussa tulee olla huolellinen. Kasvatusmediumin aiheuttama bändi ei häiritse proteiinintunnistamista, koska bändi on todella haalea ja oikea CRALBP-proteiinibändi on selkeästi esillä eri kohdassa. Tätä menetelmää tutkimusryhmä voi jatkossa käyttää CRALBP-proteiinin tunnistamiseen kantasoluista erilaistetuista RPE-soluista.

Vasta-aineiden optimointi western blot –menetelmälle onnistui toisilla vasta-aineilla paremmin kuin toisilla. Vasta-aineiden testausta tulee ryhmässä vielä jatkaa, jos RPE-soluja halutaan tutkia kattavasti proteiinitasolla western blot –menetelmän avulla. Kaikki vasta-aineet toimivat eri tavoin, joten uusien vasta-aineiden käyttöönotto vaatii taas uusia testauksia.

LÄHTEET

Abcam. 2009. CRALBP antibody [B2] (ab15051). Luettu 30.12.2009.

<http://www.abcam.com/CRALBP-antibody-B2-ab15051.html>

Boyer, R.F. 2006. Biochemistry laboratory: Modern theory and techniques. San Francisco. Benjamin Cummings.

Entrez gene. 2009a. Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa [Homo sapiens]. Päivitetty 21.12.2009. Luettu 29.12.2009.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6121?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Entrez gene. 2009b. MITF microphthalmia-associated transcription factor [Homo sapiens]. Päivitetty 21.12.2009. Luettu 29.12.2009.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4286?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Genetics Home References. 2009. MITF. Luettu 29.12.2009.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=MITF>

Kaarniranta, K., Sihvola, R., Salminen, A., Lammi, M., Teräsvirta, M., & Kontkanen, M. 2003. Silmänpohjan ikärappeuma – vaikea ongelma sekä potilaalle että silmälääkärille. Duodecim 119, 935-942.

Näkövammaisten keskusliitto Ry. 2009. Silmän rakenne. Luettu 19.10.2009.

<http://www.nkl.fi/tietoa/rakenne.htm>

Pierce Biotechnology. 2009a. Instructions of Pierce BCA protein assay kit. [pdf-tiedosto]. Tulostettu 20.08.2009.

Pierce Biotechnology. 2009b. Instructions of M-PER mammalian protein extraction reagents. [pdf-tiedosto]. Tulostettu 19.08.2009.

Roche Applied Science. 1999. Roche Molecular Biochemicals' Complete Solution for Protease Inhibition Complete. Biochemica no.1. [pdf-tiedosto]. Biochemica no1. Luettu 20.10.2009.

https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/No1_99/pgs21-22.pdf

Saari, K.M. 2001. Verkkokalvo ja sen sairaudet. Teoksesta Saari, K.M. Silmätautioppi. 5.painos. Helsinki. Kandinaattikustannus.

Skottman, H., Narkilahti, S. Hovatta, O. 2007. Challenges and approaches to the culture of pluripotent human embryonic stem cells. Future Medicine 2(3), 265-273.

Smith, C.U.M. 2000. Biology of sensory system. Birmingham. Aston University. Vision Sciences, 263- 265.

Solu- ja kudosteknologiakeskus Regea. 2009. Tietoa kantasolututkimuksesta. Luettu 15.10.2009. <http://www.regea.fi/stemcell.php?l=fi>.

Solunetti. 2006. Proteiinit. Luettu 02.12.2009.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineet/2/>

Tekes. Bioteknologia info. 2009 Mitä kantasolut ovat. Luettu 20.10.2009.
http://www.bioteknologia.info/etusivu/terveys/Kantasolut/fi_FI/mita_kantasolut_ovat/

Tero Kivelä. 2001. Silmän rakenne ja toiminta. Teoksesta Saari, K.M. Silmätautioppi. 5.painos. Helsinki. Kandinaattikustannus.

Thorpe, R. & Thorpe, S. 2005 Immunochemical techniques. Teoksesta Wilson, K. & Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6.painos. New York. Cambridge University Press, 328-331.

Vugler, A., Lawrence, J., Walsh, J., Carr, A., Gias, C., Semo, M., Ahmado, A., da Gruz, L., Andrews, P. & Coffey, P. 2007. Embryonic stem cells and retinal repair. Mechanisms of development 124, 807-829.

Walker, J.M. 2001. Electrophoretic techniques. Teoksesta Wilson, K. & Walker, J. Principles and techniques of practical biochemistry. 5.painos. New York. Cambridge University Press, 580-617.

Walker, J.M. 2005a. Electrophoretic techniques. Teoksesta Wilson, K. & Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6.painos. New York. Cambridge University Press, 449-484.

Walker, J.M. 2005b. Protein structure, purification, characterisation and function analysis. Teoksesta Wilson, K. & Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6.painos. New York. Cambridge University Press, 349-404.

LIITTEET

LIITE 1: 1 (2)

SANASTO

Antigeeni: Molekyyli, joka aiheuttaa immuunivasteen vasta-aineen tunnistessa sen, esimerkiksi proteiinit voivat olla antigeenejä.

BSA: Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini

Da: Dalton, daltonit ovat molekyyli­massa yksikköjä, proteiinien koko ilmaistaan yleensä kilodaltoneina (kDa).

Denaturaatio: Proteiinien tertiääri- ja sekundaarirakenteen tuhoutuminen, proteiini saadaan primaarimuotoon.

Fibroblasti: Sidekudoksen perussolu

HeLa solut: Syöpäsolulinja, pystyvät jakaantumaan loputtomasti.

Kemiluminesenssi: Valon säteilyä, joka johtuu kemiallisesta reaktiosta.

Medium: Solujen kasvatusliuos.

PBS: phosphate buffered saline

Proteaasi-inhibiittori: Aineita, jotka estävät proteiineja hajottavien proteaasientsyymien toimintaa.

RT-PCR: Monistetaan RNA:ta, reaktion alussa RNA käännetään DNA:ksi käänteiskopioi-
jaentsyymien avulla, tämän jälkeen syntynyttä cDNA:ta monistetaan tavallisen PCR-
reaktion tavoin.

Vasta-aine: Immunoglobuliinit, elimistö tunnistaa vieraita organismeja tai niiden osia vasta-aineiden avulla, jokainen vasta-aine tunnistaa tietyn antigeenin.

Työssä tarvittavat liuokset ja niiden valmistus

1,5M TRIS-HCl (pH 8,8)

54,45g Tris (trishydroksymetyyliaminometaani)

150ml milli-q-vettä

pH:n säätö 8,8:n 5M HCl:lla

laimennetaan 300ml:ksi milli-q-vedellä

0,5M TRIS-HCl (pH 6,8)

6g Tris

60ml milli-q-vettä

pH:n säätö 6,8:n 5M HCl:lla

laimennetaan 100ml:ksi milli-q-vedellä

1,0M TRIS-HCl (pH 6,7)

12,1g Tris

50ml milli-q-vettä

pH:n säätö 6,7:n 5M HCl:lla

laimennetaan 100ml:ksi milli-q-vedellä

10% SDS (Bio Rad)

40% bisakryyliamidiliuos (Bio Rad)

10% APS eli ammoniumpersulfaatti (Bio Rad)

1g ammoniumpersulfaatti

laimennetaan 10ml:ksi milli-q-vedellä

LIITE 2: 2 (3)

10 x SDS-PAGE-ajopuskuriliuos

30g Tris

144g glysiini

10ml 10% SDS

Laimennetaan vedellä litraksi

1 x SDS-PAGE-ajopuskuriliuos

100ml 10 x SDS-PAGE-ajopuskuriliuosta

900ml milli-q-vettä

Towbin-puskuriliuos

3g Tris

14,1g glysiini

1,0g SDS

liuotetaan 600ml:n milli-q-vettä

200ml metanolia

laimennetaan litraksi milli-q-vedellä

1xTBS-TWEEN

100ml 10 x SDS-PAGE-ajopuskuriliuosta

899ml milli-q-vettä

1ml Tween 20

3% BSA-Blokkausliuos

1,5g BSA eli bovine albumin serum

50ml 1xTBS-Tween

5% BSA-Blokkausliuos

2,5g BSA eli bovine albumin serum

50ml 1xTBS-Tween

LIITE 2: 3 (3)

5% Maitojauhe

2,5g rasvaton maitojauhe

50ml 1xTBS-Tween

STANDARDISUORA

Naudan seerumin albumista (BSA) valmistettu standardisuora, joka on mitattu Victor² multi-label plate reader –laitteella (Perkin Elmer). Standardien valmistus on kuvattu sivulla 20. Jokaisesta standardista on tehty rinnakkaiset näytteet ja niiden tuloksista on laskettu keskiarvo.

BSA-konsentraatio µg/ml	Absorbanssien keskiarvo	Absorbanssi 1	Absorbanssi 2
0	0,079	0,078	0,080
25	0,115	0,131	0,099
125	0,261	0,268	0,253
250	0,428	0,444	0,412
500	0,714	0,714	0,714
750	0,974	0,984	0,963
1000	1,196	1,266	1,126
1500	1,695	1,691	1,698
2000	2,116	2,039	2,193

