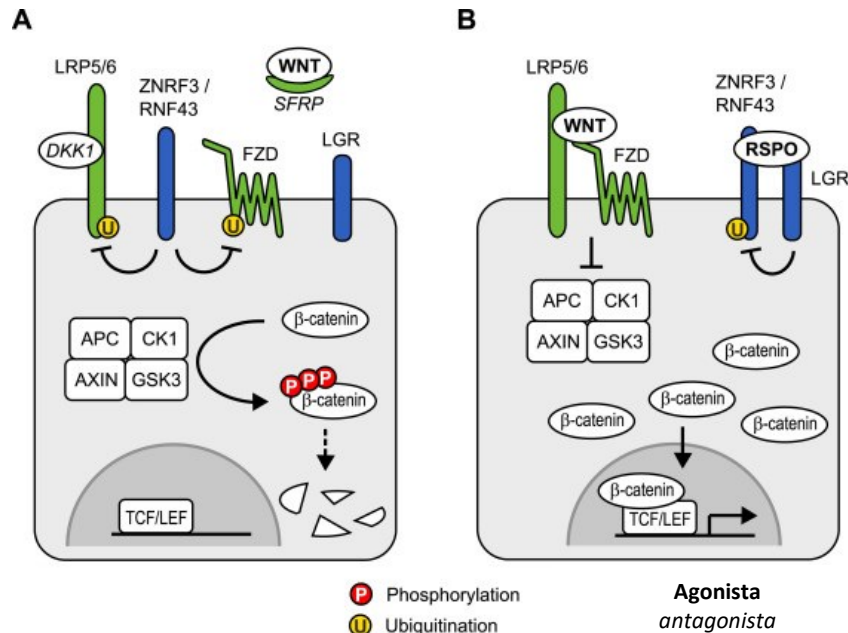


Jméno:

Modelový systém:

HEK 293 – Human Embryonal Kidney – epiteliální charakter

https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo_country=cz

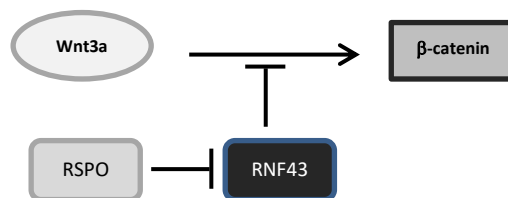


<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468117300774>

A) V nepřítomnosti Wnt ligandů, nebo v případě zablokování dráhy (DKK1, SFRP) je cytosolický β-catenin konstitutivně fosforylován v destrukčním komplexu (APC, CK1, AXIN, GSK3), následně ubiquitován a degradován v proteasomu. ZNRF3 a RNF43 (E3 ubiquitin ligázy) ubiquitínují a tak destabilizují receptory Frizzled a LRP a tak inhibují Wnt signalizaci.

B) Vazba Wnt ligandů (Wnt3a) na jejich receptor inhibuje destrukční komplex, β-catenin se akumuluje, translokuje do jádra a umožňuje přepis genů, které mají v promotoru vazné místo pro TCF/LEF transkripční faktor, na který se β-catenin váže. R-spondin (RSPO) posiluje Wnt signalizaci, protože vytváří ternární komplex LGR proteinů s ZNRF3/RNF43, který indukuje autoubiquitinaci ZNRF3/RNF43, což vede k jeho degradaci v proteasomu.

Ve zkratce:



Vzorky:

1. CTR = catenin kontrolní hladina (450 ul DMEM)
2. WNT3a = catenin ↑ (300 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a)
3. RSPO = catenin ↑↑ (300 ul DMEM + 150 ul CM RSPO)
4. WNT+ RSPO+ = catenin ↑↑↑ (150 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a + 150 ul CM RSPO)

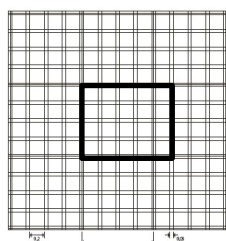
PROTOKOLY

Kultivace buněk

Pasážování a vysévání buněk

HEK 293 buňky (HEK) se kultivují na polystyrenových miskách firmy TPP v inkubátoru Heraeus (teplota 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkost) v kultivačním mediu DMEM (Dulbecovo modifikované Eaglovo médium, High glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) s přidavkem 10 % FBS (fetální hovězí sérum, Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1,2 mM L-glutaminu (Gibco, Thermo Fisher Scientific), a 100 U/ml Penicilinu/Streptomycinu (HyClone, Thermo Fisher Scientific). V dalším textu bude tato směs označována jako DMEM médium, pokud nebude specifikováno jinak.

Pasážování zásobních HEK buněk je nutné provést každé cca tři dny nebo po dosažení 80 % konfluence. Buňkám se **odsaje médium**, opatrně se opláchnou **5 ml PBS** (fosfátový pufr; phosphate buffered saline, pH 7,4) a pro enzymatické uvolnění buněk od povrchu misky se používá **0,5 ml Trypsin-EDTA** (kyselina ethylendiamintetraoctová; Biotech, LM-T1706/100, Onsala, Švédsko). Po 2 minutách inkubace HEK s Trypsin-EDTA v inkubátoru by mělo dojít k uvolnění buněk, pro vizuální kontrolu buněk použijeme inverzní mikroskop CKX 41 (Olympus, Tokio, Japonsko). Následně zneutralizujeme Trypsin přidavkem **2 ml média DMEM**. Suspenzi buněk (2 ml) přeneseme do 15 ml zkumavky. Cca 20 ul suspenze kápneme do Burkerovy komůrky. Zbytek buněk stočíme (200 g/RT/5 min), resuspendujeme v 1 ml **média DMEM**.



Spočítáme buňky ve 20 středních čtvercích, výsledná suma je označena jako **p**

$$\text{Množství buněk v 2 ml suspenze} = 2 \cdot \frac{p \cdot \check{c} \cdot h}{y} \cdot 10^3 = \frac{p \cdot 500}{20} \cdot 10^3 = p \cdot 25 \cdot 10^3$$

\check{c} ... reciproká hodnota plochy políčka (25)
 h ... reciproká hodnota výšky komůrky (10)
 y ... počet políček y (20)

Vysejeme 50 000 buněk na jednu 24W jamku (0,5 ml) (celkem 4+1 jamky = 250 000 buněk = 0,25 x 10⁶)

Výpočet: M x 10⁶ 1 ml
0,25 x 10⁶ X ml

Ze suspenze odebereme X ml a přidáme DMEM tak, aby celkový objem byl 5 x 0,5 ml = 2,5 ml (tj. 2,5 – X ml)

Důkladně promícháme a do každé 24W jamky vysejeme 0,5 ml výsledné suspenze, zamícháme S-J+V-Z.
Vložíme do inkubátoru

Transfekce buněk

Příprava transfekčních směsí – na 1 jamku:

SS plazmidu 500ng/ul

1. 100 ul DMEM pure + 150 ng každého plazmidu (celkem 0,45 ug DNA) **výpočet:** 500 ng.... 1 ul
150 ng.... x ul

2. 100 ul DMEM pure + 1,8 ul PEI (poměr DNA : PEI = 1:4, tj. 0,45x4 = 1,8)

Výpočet:		pRLtkLuc	Super8X TOP Flash	pmax GFP	PEI
1 jamka	DMEM pure	345	368	pmax	1,8 ul
5 jamek					

Připravené transfekční směsi důkladně zvortexujeme, krátce stočíme a necháme 15 minut inkubovat při RT.

Obě zkumavky smícháme, důkladně promícháme a opět 15 minut inkubujeme při RT.

Do každé jamky přidáme 205 ul výsledné transfekční směsi.

Po 3 hodinách odsajeme vše z jamek, přidáme DMEM a 150 ul kondiciovaného média (CM) s WNT3a (W+) nebo Respondinem (R+) (dle rozpisu vzorků).

Vše inkubujeme přes noc v inkubátoru.

Stanovení účinnosti transfekce

1. Mikroskopicky - Fluorescenci vzorků způsobenou expresí plazmidu pMAX s GFP nafotíme na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Leica kombinací zeleného filtru a průchozího světla, abychom byli schopni určit jak množství svítících buněk, tak počet všech buněk v zorném poli. Výsledek je poměr pozitivních buněk ku všem buňkám.

Výsledek: Účinnost transfekce PEI je přibližně %.

Metoda TopFlash = Dual Luciferase Assay (kit Promega)

Odsajeme médium

Přidáme opatrně 1 ml PBS, odsajeme, na sucho inkubujeme v -80 °C

Rozmrazíme pufr LAR II a Stop & glow buffer

Naředíme si 5x lyzační pufr – 1 jamka 50 ul, 5 jamek 250 ul, tj. 200 ul MQ H₂O + 50 ul 5x lysis buffer

Přidáme 50 ul 1x lyzačního pufru do každé jamky a inkubujeme 15 min/RT na třepačce

Naředíme si 100x Stop & glow reagent v Stop & glow buffer (25 ul na jamku, tj. 125 ul)

Výpočet: ul Stop & glow buffer + ul Stop & glow reagent

Nachystáme si luminometr a stripy na měření

Do stripu nakapeme 20 ul lyzátu z každého vzorku (důkladně zhomogenizovaného)

U luminometru velmi rychle přikápneme 25 ul LARII substrátu pro firefly (FF) luciferázu

Změříme chemiluminiscenci

Přidáme Stop & glow substrát pro renilla (R) luciferázu (inhibice aktivity FF luciferázy, substrát pro R luciferázu)

Změříme chemiluminiscenci

Výslednou hodnotu spočítáme jako podíl FF luciferázy a R luciferázy

Výsledek:

Stanovení účinnosti transfekce fluorimetricky

Lyzát z TopFlash metody napipetujeme do stripu pro fluorescenční měření a změříme při excitaci 480 nm a emisi 510 nm. Spočítáme poměr fluorescence vzorku ku nenatransfekované kontrole.

Výsledek:

-K (buňky bez plazmidu)

K

Wnt3a

RSPO

Wnt3a+RSPO

qRT-PCR

Izolace mRNA

Ve dni 0 bylo k 70 % konfluentním buňkám přidáno CM dle rozpisu.

Vzorky opatrně opláchneme PBS a poté přidáme 350 µl lyzačního pufru RLT s 1 % merkaptoethanolem (Sigma Aldrich)

Výpočet: 5 vzorků = ul RLT + ul merkaptoetanolu

K izolaci mRNA použijeme návod z komerčního kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo)

Vzorky přeneseme do 1,5 ml zkumavky, přidáme 350 ul 70 % etanolu, pipetou důkladně zamícháme (precipitace)

Přeneseme do kolonky vložené do 2 ml sběrné zkumavky

Centrifugace 10000 RPM/30 s, vylejeme proteklou tekutinu (RNA navázána na kolonku)

Přidáme 700 ul pufru RW1, centrifugace 10 000 RPM/30 s, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)
 Přidáme 500 ul pufru RPE, centrifugace 10 000 RPM/30 s, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)
 Přidáme 500 ul pufru RPE, centrifugace 10 000 RPM/2 min, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)
 Vyměníme 2 ml sběrací zkumavku a centrifugujeme 13 000 RPM/1 min
 Vyměníme 2 ml zkumavku za 1,5 ml zkumavku, přidáme 30 ul RNase-free H₂O, centrifugace 10 000 RPM/1 min (eluce)
 Eluát ještě jednou nanese do kolonky a znovu zcentrifugujeme 10 000 RPM/1 min
 Naředíme si 1 ul vzorku + 9 ul RNase free H₂O a změříme koncentraci vyizolované mRNA na spektrometru NanoDrop® ND-1000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Izolovanou celkovou RNA uchováme v -80 °C.

Přepis mRNA do cDNA = reverzní transkripce

Reverzní transkripce slouží k vytvoření templátu DNA (cDNA = complementary DNA), který bude vstupovat do polymerázové řetězové reakce (PCR). Celý proces je založen na použití reverzní transkriptázy, což je RNA dependentní DNA-polymeráza. Po celou dobu práce je nutné vzorky uchovávat na ledu kvůli jejich nestabilitě.

PRÁCE NA LEDU!

Z celkové RNA odebereme 1 ug (výpočet), který doplníme RNase free H₂O do objemu 11,5 ul.
 Přidáme 1 µl 20 mM Oligo(dT), inkubace vzorků 5 minut při 65 °C (PCR cyklus).
 Přidáme 4 µl 5x RT reakčního pufru, 2 µl 10 uM směsi nukleotidů dNTP, 0,5 µl (20 U) RNázového inhibitoru RiboLock a 1 µl (200 U) RevertAid reverzní transkriptázy (vše Thermo Fisher Scientific).
 Zamícháme a krátce centrifugujeme, inkubace hodinu při 42 °C a dalších 10 minut při 70 °C pro denuraci enzymu, čímž ukončíme reakci. Vzorky cDNA jsou skladovány při -20 °C.

Výpočet:

Vzorek	koncentrace RNA	1 ug RNA (ul)	H ₂ O (do 11,5 ul)

Reakční mix pro RT:

	1 vzorek	5 vzorků
5x RT reakční pufr	4 ul	
dNTP	2 ul	
RiboLock	0,5 ul	
RevertAid RT	1 ul	

Real time PCR

1. Do každé jamky (20 ul) patří:

1,5ul cDNA templátu

18,5 ul Master mixu:

3 ul 2xcc Roche - LighCycler 480 SYBR green I master kit (směs nukleotidů, FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR green, MgCl₂)

0,375 ul každého z primerů (SS 20 uM) **vypočítej výslednou koncentraci:**

1,7 ul MgCl₂ (SS 25 mM) **vypočítej výslednou koncentraci:**

Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O

Detekované geny: HPRT, cMyc (míchá skupina A,C), Axin2, cyklin D1 (míchá skupina B, D)

	Sybr green	1. primer	2. primer	MgCl ₂	H ₂ O
1 vzorek	3	0,375	0,375	1,7	13,05 ul
16+4 vzorky	60	7,5	7,5	34	261 ul

Do jamek na dno napipetovat v duplikátu (vedle sebe) master mix pro daný gen

Všechny tři geny vedle sebe (v pořadí uvedeném výše)

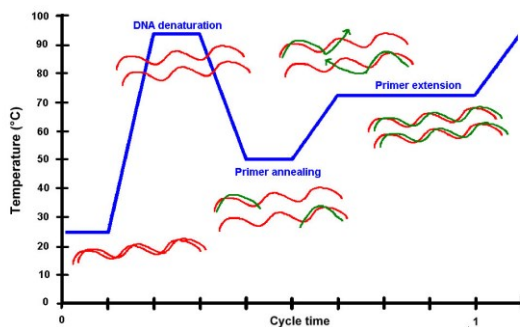
Přidat 1,5 ul cDNA všech vzorků (podle rozpisu) na horní část jamky

Zcentrifugovat 5 min/4 °C, vložit do LC 480 (Roche)

	HPRT		cMyc		Axin2		CD1				
A K	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B W											
C R											
D WR											
E K											
F W											
G R											
H WR											

Skupina A,C

Skupina B,D



Dopiš do obrázku teploty a dobu pro jednotlivé fáze cyklu

40 cyklů

Vyhodnocení podle maxima 2. derivace křivky

Výsledek:

Western blotting

Příprava SDS lyzátů

Ve dni 0 bylo k 70 % konfluentním buňkám přidáno CM dle rozpisu.

Ze vzorků odsajeme médium a opatrně přidáme 1 ml PBS, které také odsajeme

Přidáme 100 ul lyzačního pufru SDS (sodium dodecyl sulfate, 2 % SDS, 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8).

Inkubujeme 10 minut na ledu a následně přeneseme do zkumavek (vzorky je možné uchovávat v -20 °C).

PRÁCE NA LEDU!

Rozbití buněčných struktur a DNA provedeme sonikací a vařením na 95 °C/5 min v bločku.

Kvantifikace proteinů kitem DC protein Assay (Bio Rad, Hercules, USA)

Do 96W panelu nakapeme 5 ul každého lyzátu v duplikátu (v řádku), přidáme také proteinové standardy (0-4 mg/ml).

Nachystáme si směs roztoků A (zásaditý roztok tartátu mědi) a S (SDS) v poměru 50:1, přičemž do jedné jamky budeme kapat 25 ul této směsi.

Výpočet:

$$22+3 \text{ jamky} = 25 \text{ jamek} \times 25 \text{ ul} = 625 \text{ ul}$$

Roztok A ul + Roztok S ul

K 5 ul buněčného lyzátu přikápneme 20 ul směsi A+S a 200 ul roztoku B (Folinovo reagens – poměděný protein redukuje Folinovo reagens, které tak zmodrá)

Inkubujeme 10 min/RT (shaker), měříme absorbanci při 700 nm (ELISA reader)

Výpočet koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích z kalibrační přímky absorbancí standardů.

Naředíme vzorky na nejvyšší společnou koncentraci SDS lyzačním puforem.

Přidáme roztok 10 % merkaptotanolu (Sigma, 63689) s 1 % bromfenolovou modří (Sigma, 114391) v SDS lyzačním pufru, a to vždy 10 % celkového objemu jednotlivého vzorku.

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

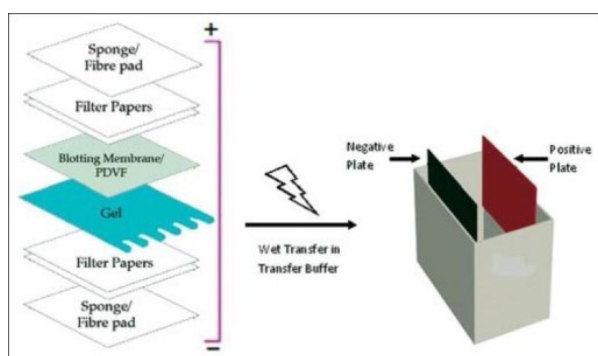
2x polyakrylamidový gel 8 %, tloušťka 1 mm, 10 jamek

Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

Do každé jamky v gelu napipetujeme 20 µl z každého vzorku (1-8) a do krajních jamek napipetujeme 1,5 µl barevně značeného proteinového standardu (PAGERuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific). Elektroforéza 130 V 1 hodinu (proteiny, jež díky SDS získaly záporný náboj, migrují ke kladné elektrodě).

Wet blotting

Přeneseme gely s proteiny rozseparovanými podle MW na metanolem aktivovanou PVDF (Polyvinylidene difluoride) membránu (Immobilon-P membrane, Merck, Kenilworth, USA), vyrobíme tzv. sandwich, důležité je myslet na to, že proteiny migrují ke + elektrodě a musí přitom přejít z gelu na membránu.



Složení použitých roztoků:

10x elektroforetický/transferový pufr	Dest. H ₂ O	Glycin	TRIS
	1 l	144 g	30,3 g
1x elektroforetický pufr	Dest. H ₂ O	10x elektrofor./transfer. pufr	20 % SDS
	9 l	1 l	50 ml
1x transferový pufr	Dest. H ₂ O	10x elektrofor./transfer. Pufr	Metanol
	1400 l	200 ml	400 ml
Promývací pufr (doplňn dest. H ₂ O do 1 l)	NaCl	TRIS pH 7,4	Tween
	SS: 5 M	SS: 2 M	SS: 20%
	WS: 150 mM	WS: 20 mM	WS: 0,06%
	30 ml	10 ml	3 ml

Transferujeme proteiny na PVDF 100 V/70 minut, membránu vyjmeme, opláchneme promývacím pufrem. Blokujeme nespecifické vazby protilátek pomocí inkubace 20 minut v blokačním pufre (5 % roztok netučného sušeného mléka rozpuštěného v promývacím pufre).

Imunodetekce

Nařežeme membránu na proužky, kde předpokládáme výskyt hledaných proteinů podle barevných standardů. Proužky vložíme do 50 ml falcon zkumavky, ve které jsou 3 ml roztoku blokačního pufre s příslušnými specifickými I. Ab protilátkami v příslušné koncentraci (viz obrázek).

Inkubujeme přes noc 4 °C, na rolleru

pS1490-LRP6 150-250 kDa (cs-2568, 1:1 000) R	250
Aktivní β catenin (ABC), 92 kDa (Millipore5665, 1:1000) M	130
	100
	72
Aktin β 42 kDa (sc-1615, 1:1 000) G	55
	35

Membrány druhý den přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker). Připravíme nové falconky s 3 ml blokačního pufre se sekundárními protilátkami (II. Ab), konjugovanými s křenovou peroxidázou, ředěnými 1:5 000.

Do II. Ab vložíme opláchnuté membrány (dle druhové specifity I.Ab) a inkubujeme na rolleru 60 minut/RT.

Membrány přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker).

Nachystáme si substrát pro peroxidázu s obsahem peroxidu vodíku a luminolu (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Merck Millipore) – smícháme obě složky v poměru 1 ml : 1 ml.

Membrány znovu seřadíme a zalijeme substrátem, který špičkou rovnoměrně rozmístíme a překryjeme fólií.

Detekci signálu provedeme pomocí programu FusionSL a zařízení s CCD kamerou (Fusion SL, Vilber), které detekuje chemiluminiscenci vzniklou oxidací luminolu po rozštěpení peroxidu vodíku peroxidázou.

Název sekundární protilátky	Katalogové číslo a výrobce
Anti-Mouse IgG Peroxidase antibody produced in sheep	A6782, Sigma
Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody produced in goat	A6667, Sigma
Anti-Goat IgG Peroxidase antibody produced in rabbit	A4174, Sigma

Závěr: Napište, jak odpovídají naše výsledky předpokladům