

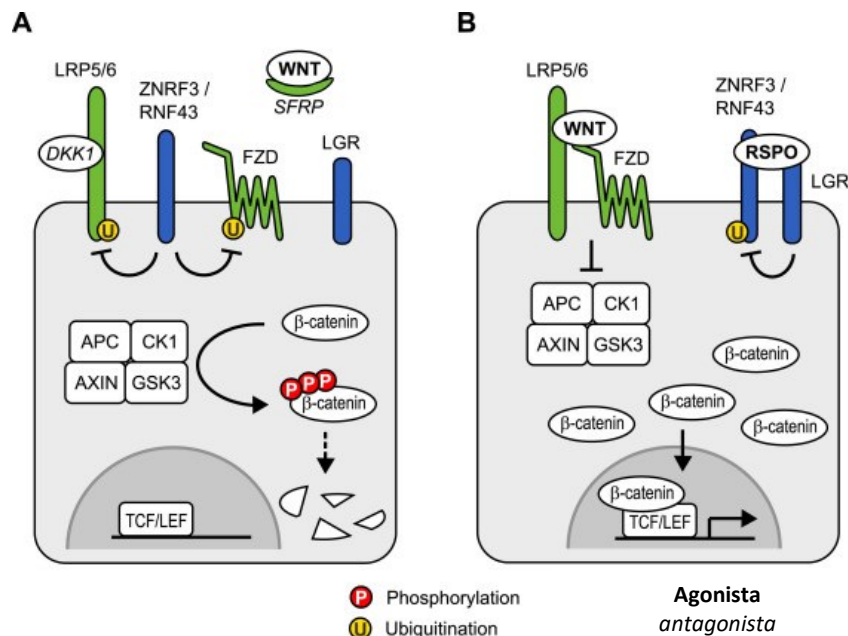
Blokové cvičení z Metod aplikované biochemie a buněčné biologie 2019

Jméno:

Modelový systém:

HEK 293 – Human Embryonal Kidney – epiteliální charakter

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

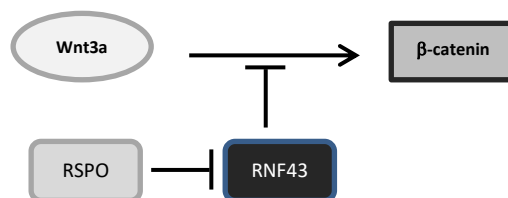


<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468117300774>

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

B) Vazba Wnt ligandů (Wnt3a) na jejich receptor inhibuje destruční 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)

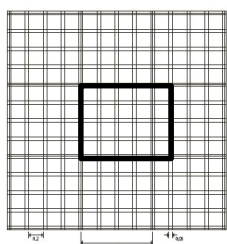
PROTOKOLY

Kultivace buněk

Pasážování a vysévání buněk

HEK 293 buněk (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 opláchnout **2 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 - 3 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 **1 ml média DMEM**. Suspenzi buněk (1,5 ml) přeneseme do 15 ml zkumavky. Cca 20 ul suspenze kápneme do Burkerovy komůrky.



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

$$\text{Množství buněk v 1 ml suspenze} = \frac{p \cdot \check{c} \cdot h}{y} \cdot 10^3 = \frac{p \cdot 250}{20} \cdot 10^3 = p \cdot 25 \cdot 10^3$$

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

Pro transfekci vysejeme 50 000 buněk na jednu 24W jamku (0,5 ml) (celkem 5+1 jamky = 300 000 buněk = 0,3 x10⁶)

Výpočet: $M \quad x 10^6 \dots 1 \text{ ml}$
 $0,3 \quad x 10^6 \dots X \text{ ml}$

Ze suspenze odebereme X ml a přidáme DMEM tak, aby celkový objem byl 6 x 0,5 ml = 3 ml (tj. 3 – X ml)

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

Pro ATP assay vysejeme:

1. 25 000 = ml
2. 50 000 = ml
3. 100 000 = ml
4. 200 000 = ml,
5. 400 000 = ml buněk do 2 ml misek.

Doplníme do 2 ml DMEM, vložíme do inkubátoru.

Stanovení počtu buněk ATP assay

Metoda stanovení relativního množství ATP je založena na chemiluminiscenci zprostředkované ATP z lyzátu buněk. Buňky opláchneme **2 ml PBS** a přidáme do misky **200 μl lyzačního** pufru Somatic cell ATP releasing reagent (Sigma Aldrich) a celá směs se inkubuje 10 minut na třepačce v RT. Lyzát pak v poměru 1:1 (**po 20 ul**) smícháme s roztokem ATP mix (191013 Cot, BioThema, Handen, Švédsko), jehož obsahem je směs luciferázy s luciferinem. ATP z lyzátu umožní luciferáze štěpit luciferin, který pak emituje chemiluminiscenci. V co nejkratším čase pak tyto směsi lyzátů s ATP mixem měříme na luminometru Hidex.

Výsledek:

Transfekce buněk

Buňky vysejeme den předem (150x10³ b na jamku v 24W desce - do 0,5 ml DMEM)

Zkontrolujeme, jestli je konfluence 70 – 80 %

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:	DMEM pure	pRLtkLuc	Super8X TOP Flash	pmax GFP	PEI
1 jamka	100 ul	345	368	pmax	1,8 ul
6 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 210 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

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, 6 jamek 300 ul, tj. 240 ul MQ H₂O + 60 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. 150 ul)

Výpočet: ul Stop & glow buffer + ul Stop & glow reagent = 150 ul

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 roztok 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:

-K (buňky bez plazmidu)

K

WNT3

RSPO

Wnt3a+RSPO

Stanovení účinnosti transfekce fluorimetricky

Lyzáty z TopFlash metody napipetujeme do stripu pro fluorescenční měření a změříme při excitaci 480 nm a emisi 510 nm. Spočítáme poměr fluorescence vzorku ku netransfekované 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 μ l lyzačního pufru RLT s 1 % merkaptoethanolem (Sigma Aldrich)

Výpočet: 6 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 uchovááme 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 μ g (výpočet), který doplníme RNase free H₂O do objemu 11,5 ul.

Přidáme 1 μ l 0,5 μ g/ul M Oligo(dT), inkubace vzorků 5 minut při 65 °C (PCR cykler).

Přidáme 4 μ l 5x RT reakčního pufru, 2 μ l 10 mM směsi nukleotidů dNTP, 0,5 μ l (20 U) RNázového inhibitoru RiboLock a 1 μ l (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 denaturaci enzymu, čímž ukončíme reakci. Vzorky cDNA jsou skladovány při -20 °C.

Výpočet:

Vzorek	koncentrace RNA	1 μ g 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, Axin2, cyklin D1

	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

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

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

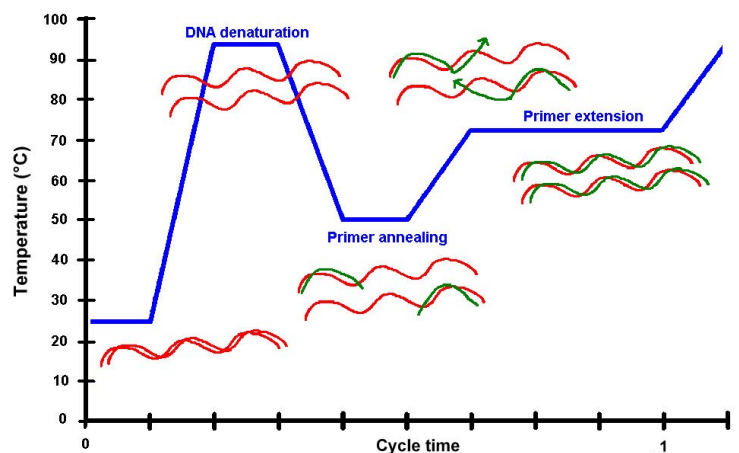
	HPRT		cMyc		Axin2		CD1				
A K	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B W											
C R											
D WR											
E K											
F											
G											
H											

Dopiš do obrázku teploty a dobu

pro jednotlivé fáze cyklu

40 cyklů

Vyhodnocení podle maxima 2. derivace křivky



Výsledek:

Western blotting

Příprava SDS lyzátů

Den předem 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 laemli lyzačního pufru (sodium dodecyl sulfate, 2 % SDS, 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8, 0,05 % bromfenolová modř, 25% merkaptotetanol).

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.

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

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

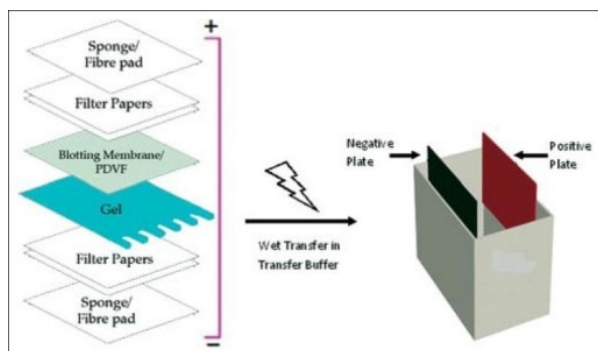
Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

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 (PagerRuler 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:

	Dest. H ₂ O	Glycin	TRIS
10x elektroforetický/transferový pufr	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 (doplněn 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 pufr.

Blokujeme nespecifické vazby protilátek pomocí inkubace 20 minut v blokačním pufru (5 % roztok netučného sušeného mléka rozpuštěného v promývacím pufru).

Imunodetekce

Nařezeme 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 pufru s příslušnými specifickými I. Ab protilátkami v příslušné koncentraci (viz obrázek).

Inkubujeme přes noc 4 °C, na rolleru

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

Membrány druhý den přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker). Připravíme nové falconky s 3 ml blokačního pufru 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