**Blokové cvičení z Metod aplikované biochemie a buněčné biologie 2019**

 Jméno:



**Stanovení aktivity -cateninu**

**Modelový systém:**

HEK 293 – Human Embryonal Kidney – epiteliální charakter

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



**Agonista**

*antagonista*

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

A) V nepřítomnosti Wnt ligandů, nebo v případě zablokování dráhy (DKK1, SFRP) je cytosolický -catenin konstitutivně fosforylován v destrukčním 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 destrukční komplex, -catenin se akumuluje, translokuje do jádra a umožňuje přepis genů, které mají v promotoru vazné místo pro TCF/LEF transkripční faktor, na který se -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:

**-catenin**

RNF43

RSPO

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)

CM … kondiciované médium – buňky produkující příslušný protein jej sekretují do média

**PROTOKOLY**

**Transfekce buněk**

Buňky vysejeme den předem (50x10\*3 b na jamku v 24W desce - do 0,5 ml DMEM)

Zkontrolovat, 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

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

 pRLtkLuc Super8X TOP Flash pmax GFP

**Výpočet:** DMEM pure 345 368 251 PEI

1 jamka 100 ul 1,8 ul

5 jamek

Připravené transfekční směsi důkladně zvortexujeme, krátce stočíme a necháme 10 minut inkubovat při RT.

Obě zkumavky smícháme, důkladně promícháme a opět 10 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 %.

***Pomocí ELISA readeru*** – lyzát vytvoření pro metodu TopFlash změříme na fluorimetru Hidex Sense při excitační vlnové délce 480 nm a emisi 535 nm. Srovnáme s netransfekovanou kontrolou.

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/ 5-10 min

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 H20 + 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 x 6 vzorků, tj. 150 ul)

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

Nachystáme si luminometr Hidex Sense 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

**qRT-PCR**

***Izolace mRNA***

Ve dni 0 vysejeme 2x10\*5 buněk a přidáme CM dle rozpisu.

Vzorky opatrně opláchneme PBS a poté přidáme 0,25 ml Trypsin/EDTA, 5 min inkubace v 37°C. Buňky přeneseme do eppendorfky, stočíme (200g/5 min), odstraníme supernatant. K peletu přidáme 350 μl lyzačního pufru RLT s 1 % merkaptoethanolem (Sigma Aldrich), důkladně zvortexujeme, rychle stočíme a necháme inkubovat v RT 5 min.

**Výpočet:** 5 vzorků = ul RLT + ul merkaptoetanolu

K izolaci mRNA použijeme návod z komerčního kitu CatchGene - Cell and tissue kit.

Přidáme 350 ul pufru RB, důkladně zvortexujeme, rychle stočíme.

Vzorky přeneseme do kolonky vložené do 2 ml sběrné zkumavky.

Centrifugace 11000 g/1 min, vyměníme sběrnou zkumavku (RNA navázána na kolonku).

Přidáme 700 ul pufru RW1, centrifugace na max/1 min, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)

Přidáme 700 ul pufru RW1, centrifugace na max /1 min, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)

Přidáme 700 ul pufru RW2, centrifugace na max /1 min, vyměníme sběrací zkumavku.

Centrifugujeme na max /3 min

Vyměníme 2 ml zkumavku za 1,5 ml zkumavku, přidáme 30 ul RNase-free H20, inkubace 2 min v RT

Centrifugujeme na max /1 min (eluce)

Eluát ještě jednou naneseme do kolonky a znovu zcentrifugujeme na max /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 uchováváme 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 0,5 ug/ulM Oligo(dT),** inkubace vzorků 5 minut při 65 ˚C (PCR cykler).

Přidáme **4 μl 5x RT** reakčního pufru, **2 μl** 10 mM 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 denaturaci enzymu, čímž ukončíme reakci. Vzorky cDNA jsou skladovány při -20 ˚C.

**Výpočet:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Vzorek** | **koncentrace RNA** | **1 ug RNA (ul)** | **H2O (do 11,5 ul)** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**Reakční mix pro RT:**

**1 vzorek 6 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, ZNRF3, Axin2, cyklin D1**

**Sybr green 1. primer 2. primer MgCl2 H2O**

**1 vzorek 3 0,375 0,375 1,7 13,05 ul**

**10 vzorků 30 3,75 3,75 17 130,5 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 ZNRF3 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% merkaptoetanol).**

**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 1,5 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:**

****

**Transferujeme proteiny na PVDF 100 V/70 minut, membránu vyjmeme, opláchneme promývacím pufrem.**

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

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

**Inkubujeme přes noc 4 °C, na rolleru**

kDa

250

130

100

72

55

35

Total LRP6 150-250 kDa (1:1000)

DVL 3 90-95 kDa (SC8027, 1:1000) M

Tubulin alfa 55 kDa (cs-5335S, 1:1 000) R

kDa

250

130

100

72

55

35

pS1490-LRP6 150-250 kDa (cs-2568, 1:1 000) R

Aktivní  catenin (ABC), 92 kDa (Millipore5665, 1:1000) M

Tubulin alfa 55 kDa (cs-5335S, 1:1 000) R

**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.**

****

**Závěr: Napište, jak odpovídají naše výsledky předpokladům**