



Milja Luukela

FAB-VASTA-AINETUOTTOMEDIUMIN DOWNSTREAM-PROSESSIT

FAB-VASTA-AINETUOTTOMEDIUMIN DOWNSTREAM-PROSESSIT

Milja Luukela
Opinnäytetyö
Kevät 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Milja Luukela

Opinnäytetyön nimi: Fab-vasta-ainemediumin downstream-prosessit

Työn ohjaaja: Elsa Kumpulainen ja Johanna Veijola

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2013 Sivumäärä: 42 + 24 liitettä

Opinnäytetyö tehtiin Oulun yliopiston Biolääketieteen laitoksen fysiologian yksikössä. Yksikköön oli hankittu useita kuukausia aiemmin tangentialivirtaus-suodatinlaite, jonka käyttöön ei kukaan ollut ehtinyt perehtyä. Laitteisto oli hankittu Fab-vasta-ainetuottomediumin konsentroitua silmällä pitäen, ja tässä työssä keskityttiin tutkimaan, soveltuuko laite kyseiseen toimintoon.

Fab-vasta-ainefragmentti on geenitekniikan avulla tuotettu vasta-aine. Sen tutkiminen on haastavaa tuottomediumin suuren tilavuuden ja Fab-vasta-aineen pienen pitoisuuden vuoksi. Tässä työssä tutkittiin, saadaanko tangentialivirtaussuodatinlaitteella konsentroitua tuottomediumia ilman, että haluttua vasta-ainetta menetetään. Näytteen rikastumista seurattiin Bradford-proteiinimäärityksen lisäksi ELISA-testillä ja Western blot -menetelmällä. Vasta-ainetta puhdistettiin affiniteettikromatografialla.

ELISA-testien ja Western blotin perusteella pystyttiin päättelemään, että konsentroidi onnistui hyvin ja laite täyttää odotukset.

Asiasanat: Fab-vasta-aine, tangentialivirtaussuodatinlaite

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
1 JOHDANTO	6
2 VASTA-AINE	7
2.1 Vasta-aineen rakenne	7
2.2 Vasta-aineluokat	8
2.3 Vasta-aineen toimintaperiaate	10
2.4 Fab-vasta-ainefragmentti	10
3 VASTA-AINEIDEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ	11
3.1 Bradford-proteiinimääritys	11
3.2 Entsyymi-immunomenetelmät (EIA)	12
3.2.1 Ei-kilpaileva ELISA	13
3.2.2 Kilpaileva ELISA	14
4 VASTA-AINEIDEN JÄLKIKÄSITTELY (DOWNSTREAM)	16
4.1 Konsentroidi ja suodatusprosessit	16
4.2 Vasta-aineiden affiniteettipuhdistus	18
5 VASTA-AINEIDEN TUTKIMUSMENETELMIÄ	21
5.1 SDS-PAGE	21
5.2 Western Blot	23
6 TANGENTIAALIVIRTAUSSUODATINLAITE, MINIMATE™ TFF	25
7 KOKEELLINEN OSUUS	27
7.1 Bradford-proteiinimääritys	27
7.2 Vasta-aineiden ELISA-testaus	27
7.2.1 Strippien kaivojen pinnoittaminen X76-antigeenillä	27
7.2.2 ELISA-testi	28
7.3 SDS-PAGE	28
7.3.1 SDS-PAGE-geelien valaminen	29
7.3.2 SDS-PAGE-ajo	29
7.4 Konsentroidi tangentiaalivirtaussuodatinlaitteella	30
7.5 Affiniteettipuhdistus	31
7.6 Western Blot -analyysi	32

8 TULOKSET	34
8.1 Bradford-proteiinimääritys	34
8.2 UV-mittaus Nanodropilla	35
8.3 Western blot	36
8.4 ELISA-testi	37
9 YHTEENVETO	39
LÄHTEET	41
LIITTEET	43

1 JOHDANTO

Fab-vasta-aine on IgG-molekyylin Y-kirjaimen yksi haara. Geenitekniikan avulla pystytään rakentamaan rekombinantteja Fab-vasta-aineita, jotka sisältävät jopa kolme Y-haaraa ilman vasta-aineen jalkaosaa. Tästä on etua diagnostiikassa, koska tällainen Fab-vasta-aine on kooltaan pienempi molekyylillä ja se on helpompi kiinnittää esim. kuoppalevyn kaivon pohjalle kuin suurempi immunoglobuliini. Geenitekniikan avulla Fab-vasta-aineen sitoutumisominaisuuksia voi parantaa muuttamalla aminohappojärjestystä tai lisäämällä proteiiniolosuhteita.

Mediumiin tuotettua proteiinia ja vasta-aineita voi käsitellä ja tutkia useilla eri menetelmillä. Näitä menetelmiä ovat muun muassa sentrifugointi, mikro- ja ultrasuodatus, konsentrointi, affiniteettikromatografia, SDS-PAGE, Western blot, Bradfordin testi ja erilaiset EIA-määritykset. Laboratoriotyöskentely vaatii hyvin pitkälle ihmisen tekemään työn, mutta joitakin työvaiheita on automatisoitu ja näin on pystytty helpottamaan laboratoriotyöntekijän arkea. Yksi tällainen laite on Minimat tangentialisuodatinlaite.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata laitetta Fab-vasta-ainetuottomediumiin. Fab-vasta-ainefragmentin tutkiminen ja puhdistaminen mediumista on ollut hankalaa, koska medium on tilavuudeltaan suuri ja vasta-aineen pitoisuus pieni. Konsentroidulla mediumin tilavuutta pienennetään menettämättä kuitenkaan haluttua vasta-ainetta. Työssä tutkittiin säilyykö vasta-aine mediumissa, kun tilavuus tiivistetään 10 %:iin alkuperäisestä tilavuudesta. Työn kokeellinen osuus suoritettiin syksyllä 2012 Oulun yliopiston Biolääketieteen fysiologian laitoksella ja ohjaajana toimi erikoistutkija Johanna Veijola.

2 VASTA-AINE

Vasta-aineet ovat veressä ja eritteissä esiintyviä liukoisia proteiineja, joita kutsutaan myös immunoglobuliineiksi eli Ig-molekyyleiksi. Niiden avulla elimistö tunnistaa vieraita organismeja ja niiden osia. Vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti kohdemolekyyleihin eli antigeeneihin. Vasta-aineita valmistavat ja erittävät plasmasoluiksi muuntuneet immuunijärjestelmän B-solut. Vasta-aineiden esiasteet toimivat B-solujen reseptoreina. Jokainen B-soluklioni tuottaa yhdenlaisia vasta-aineita, joilla on spesifinen antigeeniä sitova kohta. B-solun kypsyessä luuytimessä vasta-aineet kiinnittyvät sen solukalvolle, jossa ne toimivat antigeenireseptoreina. B-solun aktivaatio tapahtuu toissijaisissa imukudoselimissä. Aktivaatiossa tarvitaan myös T-auttajasolun stimulaatiota. Aktivoitumisen seurauksena B-solu lisääntyy ja erilaistuu joko vasta-ainetta tuottavaksi efektorisoluksi tai muistisoluksi. (Heino – Vuento 2009, 311; Vasta-aineet. 2006.)

2.1 Vasta-aineen rakenne

Tyypillinen vasta-aine on neljästä polypeptidiketjusta koostuva Y-kirjaimen muotoinen proteiini. Kuvassa 1 näkyy identtiset kevytketjut ja niin ikään identtiset raskasketjut, jotka kiinnittyvät toisiinsa rikkisilloilla. Vasta-aine voi koostua yhdestä tai useammasta immunoglobuliinista. Kärkiosan identtiset antigeenejä sitovat ketjut ovat Fab-alueet. Molekyylin häntäosassa raskaiden ketjujen muodostamalla Fc-alueella on sitoutumiskohtia komplementin proteiineille sekä erilaisille solupintareseptoreille. Tämä alue vaikuttaa vasta-aineen biologisiin ominaisuuksiin. (Vasta-aineet. 2006.)

Sekä raskas- että kevytketjussa on yksi muuttuva domeeni. Kevytketjussa on lisäksi yksi vakiodomeeni ja raskasketjussa vakiodomeeneja on kolme. Muuttuvat domeenit vastaavat antigeenien tunnistuksesta. Niiden monimuotoisuus selittää, miten on mahdollista, että vasta-aineet ovat spesifisiä, mutta elimistö pystyy kuitenkin tunnistamaan lukuisan määrän vieraita organismeja. (Vasta-aine. 2012.)

Kevytketjut koostuvat muuttuvasta domeenista, vakiodomeenista ja J-segmentistä. J-segmentti koodaa kolmentoista aminohapon aluetta kevytketjussa. Raskasketjut muodostuvat pääasiassa muuttuvasta domeenista ja kolmesta vakiodomeenista. Näiden välissä on lisäksi J- ja D-segmentit. (Vasta-aine. 2012.)



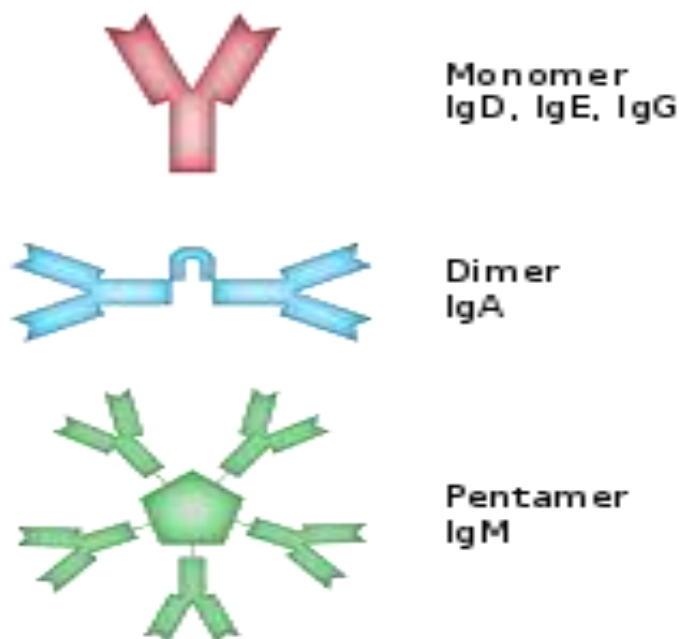
KUVA 1. Immunoglobuliinin rakenne (Vasta-aine 2012)

Antigeenin sitoutumiskohta on stereokemialliselta rakenteeltaan komplementaarinen tietylle antigeenin osalle, jota kutsutaan epitopiksi. Yhteensopivuuden vuoksi vasta-aineet ja antigeenit muodostavat stabiileja komplekseja, vaikka ne liittyvät toisiinsa ei-kovalenttisin sidoksien. Vastaainemolekyylin raskaiden ketjujen joustavat sarana-alueet mahdollistavat sitoutumisen kahteen eri antigeenimolekyylisiin samanaikaisesti tai sitoutumisen yhden antigeenin erillisiin, mutta identtisiin, epitoppeihin. (Vasta-aineet. 2006.)

2.2 Vasta-aineluokat

Immunoglobuliinit jaetaan viiteen eri luokkaan niiden raskasketjujen vakiodomeenien mukaan. Isotyyppejä ovat IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. Runko on immunoglobuliineissa hyvin pitkälti samanlainen, mutta eroja tulee tiettyjen alueiden aminohappojärjestyksissä. Aminohappojärjestyksen erot aiheuttavat tietyn immunoglobuliinin sitoutumisen tiettyyn antigeeniin. (Heino – Vuento 2009, 311.)

Kuvassa 2 on esitetty eri vasta-ainekompleksit. Monomeerisenä esiintyviä immunoglobuliineja ovat IgG, IgD ja IgE. IgG on yleisin immunoglobuliini. Se voi kulkeutua istukan läpi ja suojella sikiötä, kun sen oma immuunijärjestelmä ei vielä ole kehittynyt. IgD toimii pääasiassa antigeenin vastaanottajana B-soluissa. IgD aktivoi basophils- ja syöttösoluja tuottamaan antimikrobiologisia tekijöitä. IgE sitoutuu allergeeniin ja laukaisee histamiinin syöttösolusta ja on mukana allergiassa. IgE suojaa loismadoilta. (Heino – Vuento 2009, 311; Kumpulainen 2010; Vasta-aine. 2012.)



KUVA 2. Vasta-aineen kompleksit (Vasta-aine 2012)

IgA on dimeerinen immunoglobuliini, ja se muodostuu kahdesta perusyksiköstä. IgA:ta tavataan limakalvoilla, kuten suolessa ja hengityselimissä. Myös sylki, kyyneleet ja rintamaito sisältävät IgA:ta. IgA muodostuu pernassa ja imusolmukkeissa sekä limakalvon alla olevassa imukudoksessa. (Heino – Vuento 2009, 311; Kumpulainen 2010; Vasta-aine. 2012.)

IgM on pentameerinen suuri molekyyli, joka ei läpäise verisuonia. Se eliminoi taudinaiheuttajia varhaisessa vaiheessa, ennen kuin IgG:tä on riittävästi. IgM muodostuu imusolmukkeissa ja pernassa, ja sillä on suuri antigeenin sitomiskyky. (Heino – Vuento 2009, 311; Kumpulainen 2010; Vasta-aine. 2012.)

2.3 Vasta-aineen toimintaperiaate

Vasta-aineilla on kolme erilaista tapaa suojella kehoa taudinaiheuttajilta ja vierailta organismeilta. Ne voivat sitoutua taudinaiheuttajien pinta-antigeeneihin ja houkutella näin fagosyytit paikalle. Fagosyytti tunnistaa vasta-aineen vakiodomeenin bakteerin pinnalla ja tämä käynnistää solun tuhoamisen. Vasta-aineet voivat myös sitoutua patogeeneihin tai niiden muodostamiin toksiineihin ja neutraloida niiden haitalliset vaikutukset. Sitoutuminen ei kuitenkaan estä solujen ulkopuolella jakautuvia bakteereita lisääntymästä. Kolmas vaikutusmekanismi on aktivoida plasmasolujen muodostama komplementti, jonka päätehtävänä on pinnoittaa patogeeni fagosyyttien tunnistettavaksi. Vasta-aineet ovat spesifisiä tietyille antigeeneille, mutta usein samankaltainen molekyyli aiheuttaa ristiinreagointia eli vasta-aine tunnistaa myös toisen molekyylin kuin mitä vastaan se on muodostunut. (Vähäkainu 2009, 11.)

2.4 Fab-vasta-ainefragmentti

Kokonaisten IgG-molekyylien valmistus soluviljelyn avulla on kallista muun muassa ravintoaineena käytetyn vasikanseerumin vuoksi. Vasta-aineen osia voidaan kuitenkin tuottaa halvemmalla enemmän geenitekniikan avulla bakteereissa. Koska Fab-vasta-ainetta koodaava DNA-sekvenssi on tiedossa, voidaan aina valmistaa uusi vasta-ainetuottovektori, jos vasta-ainesolulinja tuhoutuu tai DNA hajoaa. (Lahtinen 2012, 10.)

Rekombinantti Fab-vasta-aine on geenitekniikan avulla rakennettu vasta-aine, jonka geenijärjestys tunnetaan. Geenitekniikan avulla Fab-vasta-aineen rakennetta voidaan muokata esimerkiksi parantamalla sen sitoutumisominaisuuksia muuttamalla aminohappojärjestystä tai lisäämällä proteiinosia. Rakenteeltaan Fab-vasta-aine vastaa IgG-molekyylin Y-kirjaimen yhtä haaraa. Geenitekniikan avulla voidaan muodostaa Fab-vasta-aineita, jotka sisältävät jopa kolme Y-haaraa, ilman vasta-aineen jalka-osaa. Fab-vasta-aine on kooltaan pienempi molekyyli, josta diagnostiikassa on hyötyä, sillä pienempi kokoista molekyyliä voidaan kiinnittää kuoppalevyn kaivon pohjalle suhteessa enemmän kuin suurikokoista IgG-molekyyliä. (Lahtinen 2012, 10–11.)

3 VASTA-AINEIDEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ

Immuologisia määrittämenetelmiä käytetään laajasti kliinisissä laboratorioissa, joissa määritetään joko vasta-ainepitoisuuksia tai erilaisia analyyttejä, kuten hormoneja, lääkeaineita tai tuumoriantigeenejä. Menetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon. (Kumpulainen 2010.)

Immunologisia menetelmiä ovat muun muassa RIA (radio immuno assay), IRMA (immune radiometric assay), EIA (enzyme immuno assay), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), FIA (fluoro immuno assay) ja IFMA (immuno fluorometric assay). (Kumpulainen 2010.)

Proteiinipitoisuutta eli konsentraatiota voidaan tutkia myös eri menetelmin. Tunnetuimpia proteiinien epäsuoria kvantitatiivisia menetelmiä ovat biureettitesti, Bradfordin ja Folin-Ciocalteun (Lowryn proteiinimääritys) testit. Biureettitesti perustuu alkaalisen kupariliuoksen kykyyn muodostaa peptidisidosten kanssa tummansininen väri. Myös Folin-Ciocalteun testin perusreaktiona on alkaalisen kupariliuoksen kyky muodostaa peptidisidosten kanssa sininen väri. Määrittästä herkistää Folin-Ciocalteun reagenssi, joka sitoutuu proteiinien sisältämiin tyrosiini- ja tryptofaaniaminohappoihin. (Turpeenoja 2001, 182.)

Näytteen proteiinimäärää voidaan myös arvioida käyttämällä hyväksi proteiinimolekyylien UV-absorptiota aallonpituudella 280 nm. Proteiinimäärä saadaan selville Lambert-Beerin lakiin perustuen käyttämällä hyväksi tietoa, että puhtaan proteiiniliuoksen absorbanssi aallonpituudella 280 nm on 1,0, kun proteiinipitoisuus on 1 mg/ml. (Turpeenoja 2001, 182.)

3.1 Bradford-proteiinimääritys

Bradford-menetelmä perustuu Coomassie® Brilliant Blue -väriaineen sitoutumiseen näytteen proteiineihin. Coomassien sininen väri sitoutuu pääasiassa emäksisiin ja aromaattisiin aminohappotähteisiin. Mitä enemmän on proteiinia, sitä enemmän väriainetta sitoutuu. Analyysi on kolorimetrinen, eli kun

proteiinikonsentraatio kasvaa, näytteen väri tummenee. Bradford-proteiinimittaustulokset sisältävät mitattavan proteiinin lisäksi signaalitaustaa, esimerkiksi kyvettimateriaalin ja itse Bradford-reagenssin aiheuttaman signaalin. Signaalitaustan poistamisesta tuloskuvaajista ja sen tarpeellisuudesta ollaan montaa mieltä. Joidenkin mielestä tausta pitää poistaa, koska vain mitattavan aineen signaalivaikutus on tarpeellista informaatiota, mutta vastaavasti toinen haluaa nähdä kuvaajasta myös signaalitaustasuhteen. Toiminta yksinkertaistuu ja laskuvirheiden mahdollisuus vähenee, kun taustaa ei poisteta. Tausta-signaalisuhte kertoo määritysmenetelmän herkkyyden. Jos tausta poistetaan standardeista, se pitää muistaa vähentää myös näytteistä. Tuloksen käyttötarkoitus vaikuttaa useimmiten tuloksen esitystapaan. (Proteiinimääritys ja lineaarinen mittausalue 2012, 7.)

3.2 Entsyymi-immunomenetelmät (EIA)

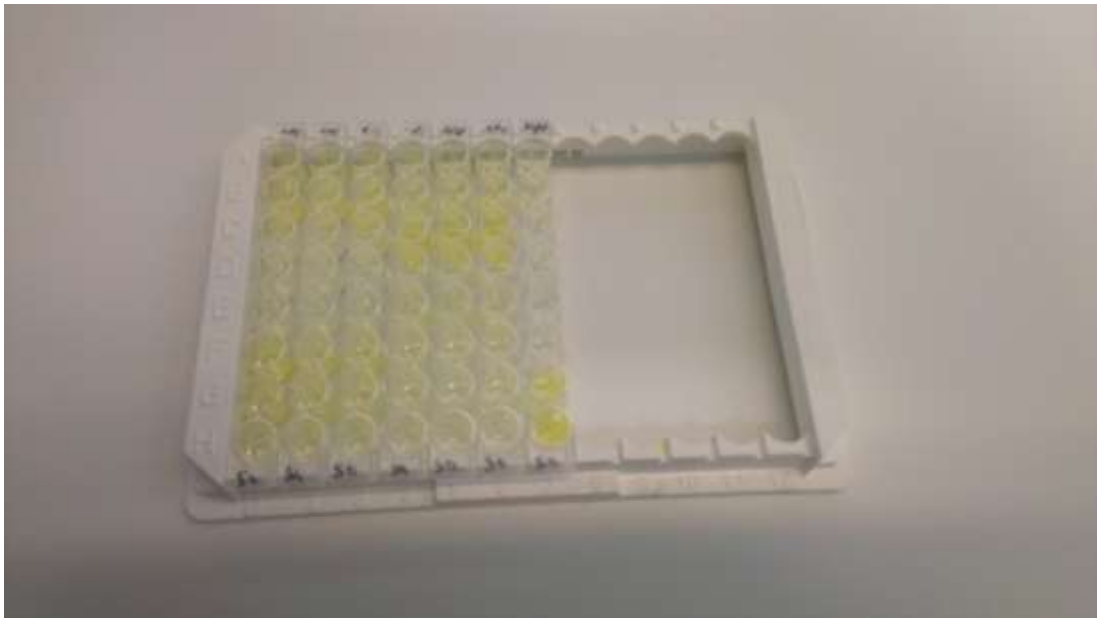
Entsyymi-immunomenetelmät (EIA, Enzyme Immuno Assay) käyttävät spesifistä entsyymileimaa analyysin määrittämiseen. Leima voi olla konjugoitu joko antigeeniin tai vasta-aineeseen. Antigeenin ja vasta-aineen välisen reaktion saavutettua tasapainotilan seokseen lisätään substraattiliuosta. Substraatti tarttuu entsyymiin, joka muuttaa sen värilliseksi, fotometrisesti mitattavaksi lopputuotteeksi. EIA-menetelmiä on sekä suoria että ei-suoria, kilpailevia ja ei-kilpailevia. (Sarpola 2011, 18.)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on suora EIA-menetelmä, jota käytetään yleisesti kliinisessä kemiassa. Kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuvassa suorassa ELISA-menetelmässä reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen näytteestä mitattavaan yhdisteeseen. Menetelmällä voidaan mitata myös vasta-ainepitoisuutta, jolloin menetelmää kutsutaan epäsuoraksi ELISA-menetelmäksi. (Sarpola 2011, 18.)

Epäsuora ELISA on ei-kilpaileva -menetelmä, jolla voidaan määrittää vasta-ainepitoisuutta. Antigeeni kiinnitetään kaivon pohjalle ja kaivon lisätään spesifistä primääristä vasta-ainetta, joka sitoutuu antigeeniin. Ylimääräinen

sitoutumaton vasta-aine pestään pois, minkä jälkeen kaivoon lisätään entsyymileimattu kaksoisvasta-aine, joka sitoutuu primääriseen vasta-aineeseen. Seuraavaksi kaivoon lisätään substraatti, joka reagoi entsyymin kanssa ja lopputuloksena syntyy värillinen yhdiste. Tämä yhdiste mitataan fotometrisesti ja on suoraan verrannollinen tutkittavan analyytin määrään näytteessä. (Sarpola 2011, 20.)

ELISA-menetelmissä detektointireaktiota katalysoiva entsyymi (alkalinen fosfataasi, β -galaktosidaasi, peroksidaasi) on yleensä sidottu vasta-aineeseen. Määritykset ovat suorita, ja niitä voidaan tehdä myös kuoppalevytekniikalla. Kuvassa 3 on kuoppalevy, jolla määrittämiä tehdään. (Sarpola 2011, 18.)



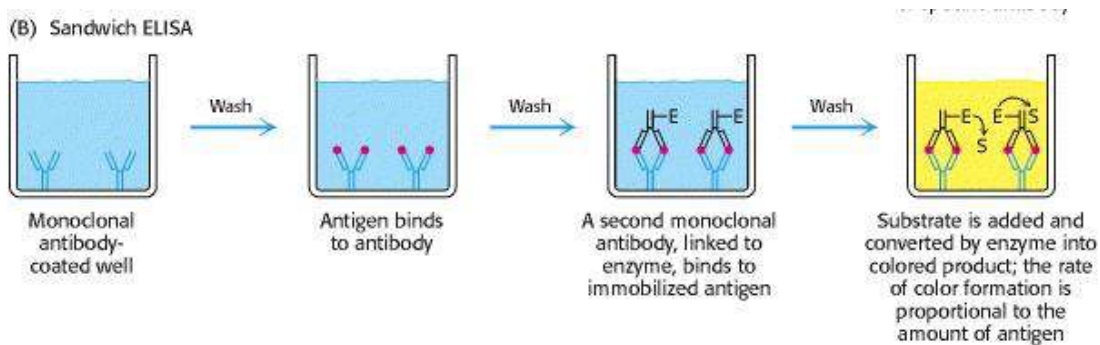
KUVA 3. ELISA-testin kuoppalevyt eli stripit

3.2.1 Ei-kilpaileva ELISA

ELISA-määritykset ovat joko kilpailevia tai ei-kilpailevia. Ei-kilpailevassa ELISA-määrityksessä (sandwich-ELISA) käytetään kaksoisvasta-ainetekniikkaa. Vasta-aineet voivat olla joko monoklonaalisia tai polyklonaalisia. Monoklonaalisen vasta-aineen tunnistettava antigeenissä eri epitootit, ja polyklonaalisten vasta-aineiden tulee olla samaa erää, joka on puhdistettu affiniteetin avulla. Määritys on nopea ja tarkka (10^{-18} mol), ja puhtaan

antigeenistandardin avulla voidaan tuntemattoman näytteen antigeenipitoisuus määrittää absoluuttisesti. (Sarpola 2011, 18.)

Kuvassa 4 esitetään sandwich-ELISAn menetelmä. Vasta-aine kiinnitetään kuoppalevyn pohjan kiinteään faasin pintaan. Lisätään antigeenin sisältävä näyte ja annetaan reagoida vasta-aineen kanssa. Ylimääräiset yhdisteet pestään pois, minkä jälkeen kaivon lisätään toinen, entsyymillä leimattu vasta-aine. Leimattu vasta-aine sitoutuu antigeenin eri epitooppiin kuin kaivon kiinnitetty vasta-aine. Ylimääräiset leima-vasta-aineet pestään pois ja kaivon lisätään substraatti. Substraatti reagoi vasta-aineen leiman kanssa muodostaen värillisen yhdisteen, joka voidaan mitata. (Sarpola 2011, 19.)



KUVA 4. Sandwich-ELISA (Sarpola 2011, 19)

3.2.2 Kilpaileva ELISA

Kilpailevaa ELISA-menetelmää on mahdollista käyttää silloin, kun sopivaa vasta-aineparia ei ole käytössä. Käytettävän primäärisen vasta-aineen ei myöskään tarvitse olla niin puhdas kuin ei-kilpailevassa ELISassa. Kilpailevan ELISAn herkkyys on 10^{-15} mol:n luokkaa ja spesifisyys riippuu käytetystä vasta-aineesta. (Sarpola 2011, 20.)

Kilpailevassa ELISA-menetelmässä entsyymi voidaan liittää joko antigeeniin tai vasta-aineeseen. Menetelmässä tietty määrä leimattua antigeenia ja näytteessä

olevaa leimaamatonta antigeenia kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen, joka on sidottu kiinteään faasiin. Vapaa ja vasta-ainekompleksiin sitoutunut leima erotetaan toisistaan pesuvaiheiden avulla. Substraatti muodostaa entsyymin kanssa värillisen reaktiotuotteen, joka mitataan fotometrisesti. Mitattu reaktiotuote on kääntäen verrannollinen näytteen sisältämän antigeenin pitoisuuteen. (Sarpola 2011, 20.)

4 VASTA-AINEIDEN JÄLKIKÄSITTELY (DOWNSTREAM)

Downstreamilla eli jälkikäsitteilyllä tarkoitetaan erilaisia puhdistus- ja erottelumenetelmiä, joilla tutkittava vasta-aine tai proteiini saadan erotettua kasvatusmediumista. Näitä menetelmiä ovat muun muassa konsentroidi, affiniteettipuhdistus, ultrasuodatus ja SDS-PAGE. Joissain tapauksissa myös mediumin happamuutta eli pH:ta joudutaan säätämään jälkikäsitteilyvaiheessa. Jälkikäsitteilyyn kuuluu myös puhdistetun tuotteen formulointi ja varastointi. (Lahtinen 2012, 34.)

4.1 Konsentroidi ja suodatusprosessit

Konsentroidinnissa kasvatusmediumin tilavuus pyritään pienentämään menettämättä kuitenkaan vasta-ainetta. Bakteerissa tuotetut vasta-aineet tuottuvat kasvatusmediumiin, ja koska vasta-ainetta on pieniä pitoisuuksia tuottomediumissa, sitä yleensä konsentroidaan joko mekaanisesti tai erityisen konsentroidilaitteen avulla. Tällöin tuotteen puhdistaminen on helpompaa. (Lahtinen 2012, 34.)

Dialyysissä kalvo läpäisee pienet molekyylit, mutta ei isoja, jolloin pienet saadaan poistetuksi syötöstä. Tätä käytetään esimerkiksi urean poistamiseksi verestä keuhonmuunaisessa ja veden suolanpoistossa erityisesti elektrodialyysinä. Permeaatin pitoisuus on syöttöä suurempi. Paine-ero kalvon yli on pieni tai olematon. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

Käänteisosmoosissa kalvo läpäisee liuottimen, joka paineen avulla ajetaan liuksesta, jossa on suurempi pitoisuus, liukseen, jonka pitoisuus on pienempi. Tätä käytetään esimerkiksi suolan poistossa vedestä. Permeaatin pitoisuus on syöttöä pienempi ja paine kalvon yli on suuri. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

Pervaporaatiossa erotus perustuu molekyylien erilaiseen diffuusionopeuteen kalvossa. Syöttö on nesteenä, mutta permeaattipuolella on alipaine, joka aikaan saa höyrystymisen. Tätä käytetään esimerkiksi etanoli-vesiseoksen väkevöintiin. Paine kalvon yli on alle 1 bar. (Ultrasuodatin, 2.)

Neste-neste-uutossa erotus ei perustu kalvon ominaisuuksiin vaan kuten uutossa yleensä, komponenttien erisuuruisiin aktiivisuuksiin faaseissa. Kalvo vain pitää faasit sekoittumattomina, mikä tuo etua prosessin toiminnassa. Paine-ero kalvon yli on pieni tai olematon. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

Ultrasuodatus on kalvoprosessi, jossa molekyylit erotellaan toisistaan koon mukaan. Ultrasuodatuksessa kalvo on huokoinen ja toimii normaalin suodatinväliaineen tavoin ts. suodatettavat hiukkaset tai molekyylit ovat liian suuria mahtuakseen läpi kalvon huokosista. Paine-ero kalvon yli on 1–5 bar. Suodatuksessa hiukkasen koko on 10^{-3} – $0,1\mu\text{m}$. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

Mikro- ja ultrasuodatuksessa kalvo on huokoinen ja toimii normaalin suodatinväliaineen tavoin eli suodatettavat hiukkaset tai molekyylit ovat liian suuria mahtuakseen läpi kalvon huokosista. Paine-ero kalvon yli on 1–5 bar. Suodatusten erona on suodatettavan hiukkasen koko, joka on mikro-suodatuksessa $0,1$ – $5\mu\text{m}$ ja ultrasuodatuksessa $0,001$ – $0,1\mu\text{m}$. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

Ultrasuodatuksella liuoksesta voidaan poistaa, korvata tai vähentää suolaa tai liuottimen määrää. Liuos voi sisältää proteiineja, peptidejä, nukleinihappoja tai muita biomolekyylejä. Menetelmä hyödyntää selektiivisesti läpäisevää, huokoista membraanisuodatinta erotellakseen komponentit liuoksista ja suspensioista. Erottelu perustuu molekyylikokoon. Ultrasuodatusmembraani säilyttää molekyylit, jotka ovat isompia kuin membraanin (kalvon) huokoset, kun taas pienemmät molekyylit, kuten suolat, liuokset ja vesi, kulkevat vapaasti kalvon läpi. Kalvon läpäisemätön liuos väkevöityy, joten se on konsentraatti. Tämä ei kuitenkaan päde kaikissa kalvoprosesseissa. Esimerkiksi dialyysissa kalvo läpäisee vain liuenneet pienet molekyylit, jolloin kalvoa läpäisemätön osa laimenee. Tätä osaa kutsutaan väkevyyden suhteen neutraalilla nimellä retentaatti tai rejekti. Ultrasuodatuksessa kalvon läpäissyt liuos on filtraatti tai permeaatti. (Ultrasuodatin 2004, 2.)

4.2 Vasta-aineiden affiniteettipuhdistus

Affiniteettikromatografian avulla molekyylit voidaan puhdistaa monimutkaisista biologisista seoksista. Natiivit muodot voidaan erottaa saman aineen denaturoituneista muodoista ja suuresta määrästä kontaminoivia aineita voidaan puhdistaa pieni määrä biologista materiaalia. Menetelmää voidaan käyttää myös spesifisen kontaminantin poistoon. (Kumpulainen 2010.)

Affiniteettikromatografian mediumin komponentit ovat matriksi, käsivarsi ja ligandi (kuva 5). Toimiakseen affiniteetti tarvitsee biospesifisen ligandin, joka liitetään kovalenttisesti kromatografiseen matriksiin. Proteiinit erotellaan proteiinin ja ligandin välillä tapahtuvan palautuvan vuorovaikutuksen perusteella. Menetelmä perustuu vasta-ainemolekyylin spesifiseen tunnistukseen tai Fab-vasta-ainemolekyylin sisältämän histidiini-aminohappohännän sitoutumiseen ligandiin: antigeeniin tai kaksiarvoiseen nikkeli- tai kobolttikelaattiin. (Lahtinen 2012, 34; Kumpulainen 2010.)



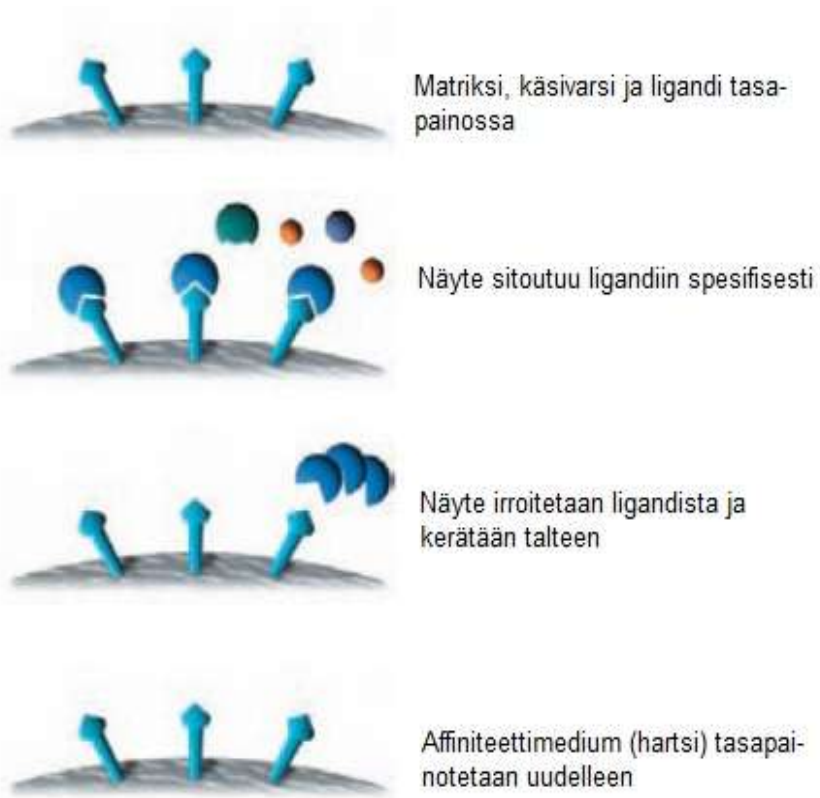
KUVA 5. Affiniteettimediumin komponentit (GE Healthcare Life Sciences 2012)

Ligandin ja kohdeproteiinin biologiset vuorovaikutukset perustuvat sähköstaattisiin tai hydrofobisiin vuorovaikutuksiin tai van der Waalsin voimaan ja/tai vetysidoksiin. Kohdemolekyylin ja affiniteettimediumin vuorovaikutukset

voidaan kumota kilpailevaa ligandia käyttämällä tai muuttamalla pH:ta, ionivahvuutta tai polaarisuutta. (Lahtinen 2012, 34; Kumpulainen 2010.)

Matriksi on inertti tuki, johon ligandi voidaan liittää suoraan tai epäsuorasti. Matriksin erittäin vähäinen epäspesifinen adsorptio on oleellista, sillä affiniteetikromatografia perustuu spesifisiin vuorovaikutuksiin. Matriksilla tulee olla hyvät virtausominaisuudet, sen pitää olla harvarakenteinen, jotta isotkin molekyylit pääsevät kulkemaan läpi, ja sen tulee sisältää runsaasti ligandin sitomiskohtia. Ligandilla tulee olla spesifisiä ja palautuvia sitomiskohtia puhdistettavan proteiinin kanssa. Hyvä ligandi sisältää kemiallisesti muunneltavia ryhmiä, joiden avulla se voi tarttua matriksiin tuhoamatta ligandin sitomisaktiivisuutta. Ligandin tulee säilyttää spesifinen sitomisaffiniteettinsä, ja tutkittavan aineen on myös säilytettävä spesifinen aktiivisuutensa sen jälkeen, kun se on vapautettu ligandista. (Kumpulainen 2010.)

Vasta-ainepuhdistus (kuva 6) aloitetaan kiinnittämällä ligandi hartsiin, joka pakataan pylvääseen. Kun puhdistettavan vasta-aineen raakaseos siirretään pylvääseen, se sitoutuu spesifisesti ligandiin. Epäpuhtaudet huuhdotaan pesupuskurin avulla pois. Vasta-aine irrotetaan pylväästä eluoinnin avulla. Eluutio perustuu happamuuteen, ionivahvuuteen tai puskurikoostumuksen muuttumiseen, eli olosuhteet pylväässä muuttuvat epäedullisiksi spesifisen sitoutumisen kannalta. Affiniteetikromatografian reagenssit ovat vähintään ”pro analyse” -laatua. (Lahtinen 2012, 34.)



KUVA 6. Affiniteettipuhdistuksen periaate (GE Healthcare Life Sciences 2012)

5 VASTA-AINEIDEN TUTKIMUSMENETELMIÄ

Vasta-aineiden tutkimusmenetelmät perustuvat joko niiden kykyyn muodostaa spesifinen niin sanotulla avain-lukko-periaatteella toimiva sidos vasta-aineen ja antigeenin välille tai kokoon. SDS-PAGE on menetelmä, jossa proteiinit erotellaan koon perusteella. Western blotin toiminta perustuu edellä mainittuun avain-lukko-periaatteeseen ja on spesifinen määrittämenetelmä.

5.1 SDS-PAGE

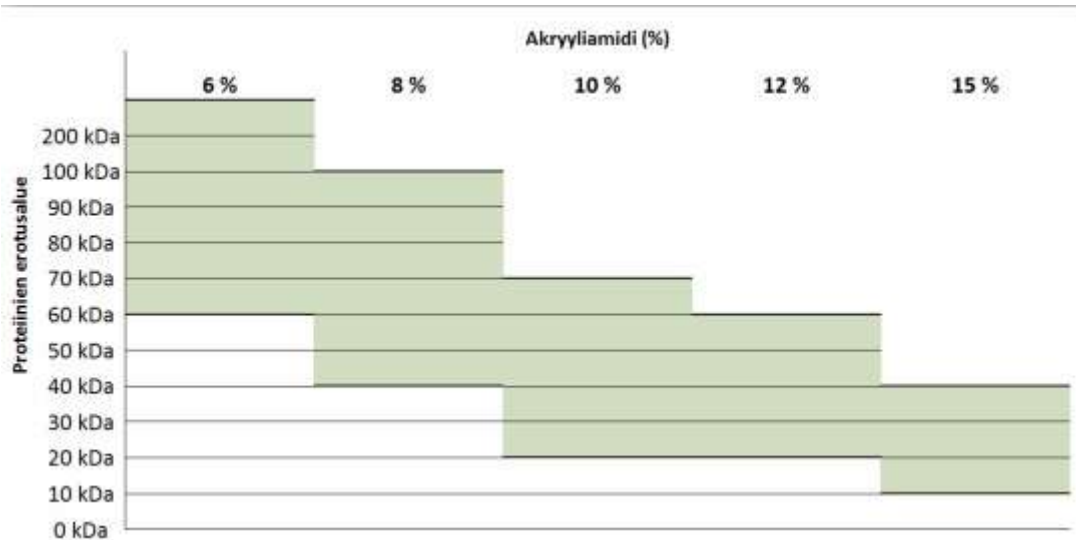
Proteiinianalytiikassa paljon käytetty erottelu- ja analyysimenetelmä on natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (engl. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), joka erottelee proteiinit niiden koon perusteella ja jonka avulla saadaan selville proteiinien molekyylipaino ja puhtaus. Erotteluajo suoritetaan vertikaalisessa kaksiosaisessa polyakryyliamidi-geelissä. (Proteiinien SDS-PAGE.. 2006.)

Ennen ajoa proteiinien konformaatio hajotetaan lisäämällä näytteeseen pelkistävää merkaptoetanolia (hajottaa proteiinien rikkisillat) sekä anionista detergenttiä, natriumdodekyylisulfaattia (SDS). SDS-molekyylien aiheuttama suuri negatiivinen varaus peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, jolloin ne liikkuvat geelissä molekyylipainonsa mukaisesti. (Proteiinien SDS-PAGE. 2006.)

Ajon jälkeen syntyneet vyöhykkeet paikannetaan värjäämällä geelit proteiinia sitovilla väriaineilla, kuten Coomassie blue tai hopeavärillä. Vyöhykkeet voidaan myös siirtää nitroselluloosapaperille (Western blot) mikäli vyöhykkeiden paikantamisessa halutaan käyttää vasta-aineita. Tuntemattoman proteiinin molekyylipaino saadaan selville vertaamalla sen liikkuvuutta tunnettujen proteiinien niin sanottujen molekyylipainostandardien liikkuvuuteen samassa ajossa. (Proteiinien SDS-PAGE. 2006.)

SDS-PAGE-ajo koostuu useasta työvaiheesta. Aluksi valetaan geeli kahden lasilevyn väliin. Lasien väliin alas valetaan erotusgeeli ja ylempi on

konsentrintigeeli. Ajolaite kootaan ja geelien kammioihin pipetoidaan näytteet. Geelin akryyliamidiprosentti valitaan tutkittavan proteiinin koon mukaan kuvan 7 taulukon mukaisesti. (SDS-PAGE. 2006.)



KUVA 7. SDS-PAGE:n työskentelyalueet eri akryyliamidipitoisuuksilla (Opetushallitus)

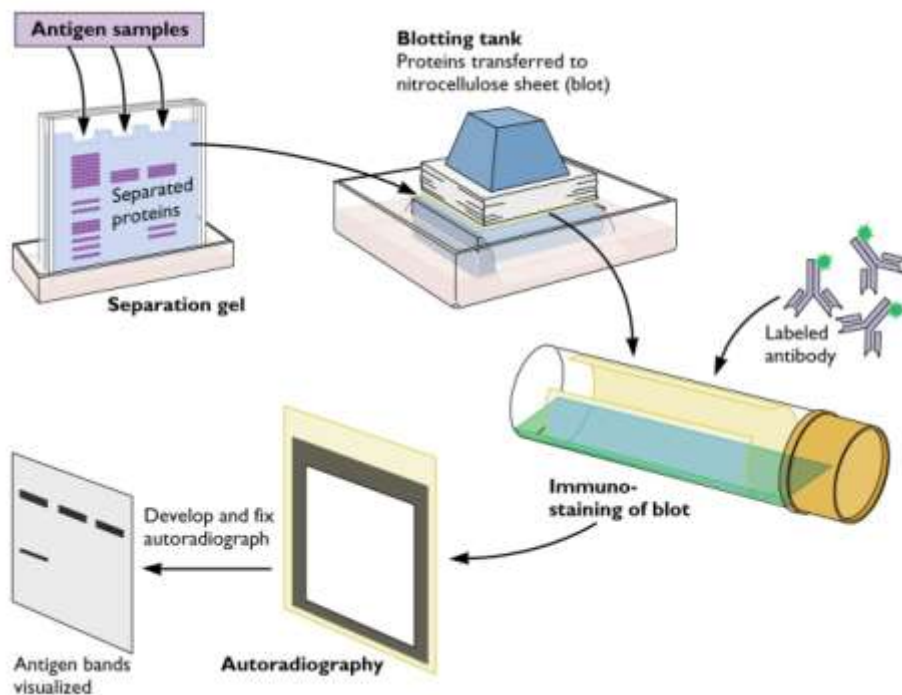
Ennen ajoa proteiinit denaturoidaan ja niille annetaan negatiivinen varaus. Näytteitä keitetään puskurissa, joka sisältää β -merkaptoetanolia ja SDS-liuosta. Merkaptoetanolii rikkoo tertiäärirakenteen rikkisillat, ja SDS tarttuu proteiineihin denaturoiden ne. Lisäksi SDS antaa proteiineille negatiivisen 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. 2001.)

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 konsentrintigeeliä 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. 2001.)

5.2 Western Blot

Western blot -menetelmässä (kuva 8) proteiinit tunnistetaan vasta-aineiden avulla. Proteiinit erotellaan ensin SDS-PAGElla ja siirretään erityisen blottauslaitteen avulla sähkövirtaa käyttäen nitroselluloosa- tai PVDF-kalvolle. Tämä on niin kutsuttu elektroblottaus. SDS-PAGE-geelistä, kalvosta ja suodatinpaperista kasataan sandwich, joka laitetaan kahden samansuuntaisen elektrodin väliin. Sähkövirran avulla geelillä olevat proteiinit siirtyvät kalvolle ja näin proteiinien tarkemmat tutkimukset ovat mahdollisia. (Huuki 2010, 15.)



KUVA 8. Western blot (Virology blog 2010)

Kalvo blokataan inkuboimalla sitä BSA:sta (naudan seerumin albumiini) tai rasvattomasta maitojauheesta tehdyssä liuoksessa, jolloin kalvon vapaat hydrofobiset sitoutumiskohdat peittyvät. Seuraavaksi kalvo käsitellään proteiinin

antiseerumilla eli primäärivasta-aineella. Tämä molekyyli sitoutuu kalvolla olevaan antigeeniin eli haluttuun proteiiniin. Kalvo käsitellään vielä primäärivasta-aineen tunnistavalla sekundäärivasta-aineella, joka sitoutuu primäärivasta-aineeseen. Sekundäärivasta-aine on leimattu tarkoituksenmukaisella leimalla, jolloin primäärivasta-aineeseen kiinnittynyt sekundäärivasta-aine voidaan detektoida. (Huuki 2010, 15.)

Sekundäärivasta-aine voi olla leimattu eri tavoin. Jos sekundäärivasta-aineessa on entsyymileima, kalvolle kiinnittyneet tutkittavat proteiinit detektoidaan inkuboimalla kalvoa entsyymin substraattiliuoksessa. Substraatti sitoutuu entsyymiin, ja entsyymi muuttaa sen liukenemattomaksi värilliseksi yhdisteeksi kalvolla. Tämä värillinen brändi ilmoittaa tutkittavan proteiinin läsnäolon ja paikan kalvolla. Toinen vaihtoehtoinen detektointitapa on käyttää piparjuuriproksidaasia ja kemiluminesenssia. Vetyperoksidaasin ja kemiluminesenssisubstraatti luminolin läsnäollessa piparjuuriperoksidaasi hapettaa luminolin. Hapetusreaktion lopputuotteena syntyy valoa. Valon emissio voidaan detektoida käyttäen kemiluminesenssiä kuvaavaa kameraa. (Huuki 2010, 16.)

6 TANGENTIAALIVIRTAUSSUODATINLAITE, MINIMATE™ TFF

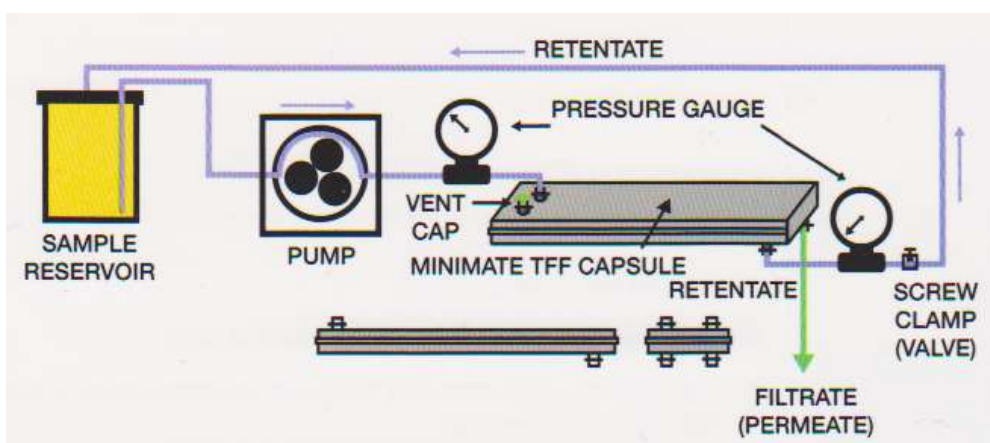
Tangentiaalivirtaussuodatinlaitetta käytetään laboratorioissa proteiinien, peptidien ja nukleiinihappojen (DNA, RNA, oligonukleotidit) konsentroidi-, suolanpoisto- ja puskurinvaihtoprosesseihin. Laitteen käyttökohteet ovat monipuoliset: vasta-aineiden tai rekombinanttiproteiinien talteenotto soluviljelyaineesta, metallille herkkien entsyymien ja molekyylien käsittely, suurten biomolekyylien fraktiointi pienistä, virusten tai geeniterapiavektoreiden konsentroidi, näytteiden valmistelu ennen pylväskromatografiaa, näytteiden konsentroidi ennen geelisuodatusta ja veden, puskureiden ja elatusaineliuosten depyrogenointi. (VWR 2013.)

Kuvassa 9 on Minimate-tangentiaalivirtaussuodatinlaitteisto. Laitteisto koostuu pumpusta, Minimate™ TFF -suodatinkasetista ja näyteastiasta. Laitteisto kierrättää paineen avulla näytettä näyteastiasta suodatinkasetin kautta takaisin näyteastiaan (permeaatti poistuu omaan jäteastiaansa).



KUVA 9. Tangentiaalivirtaussuodatinlaite

Tangentiaalivirtaussuodatinlaitteen toimintaperiaate on hyvin yksinkertainen. Kuvassa 10 esitetään, kuinka näyte siirretään näyteastiasta pumpun avulla (paine 1–5 bar) kasettiin. Kalvo on kasetin sisällä. Näytteen pienemmät molekyylit suodattuvat kalvon läpi ja palautuvat takaisin näyteastiaan. Suuremmat molekyylit poistuvat kasetista erilliseen jäteastiaan. Näyteastian alla on magneettisekoittaja, joka varmistaa sen, että näyte pysyy koko ajan liikkeellä. (Pall Life Sciences 2007.)



KUVA 10. Tangentiaalivirtaussuodatinlaitteen toimintaperiaate (Pall Life Sciences)

Kasetteja on eri kokoisia eri käyttötarkoituksiin. Kalvojen suodatuskoko on 650 daltonista aina 1000 kilodaltoniin asti. Ennen varsinaista käyttöä kasetti pestään puhtaaksi varastointiliuoksista (glyseriini ja biosidejä). Kasetti pestään ultrasuodatetulla vedellä. Perusteellisempi pesu tehdään 0,1–0,5M NaOH:lla, 0,1–0,5M NaOH + 200 ppm NaOCl:lla ja lopuksi 200–400 ppm NaOCl:lla. Tämä pesu on erityisen tärkeä, jos kasettia on aiemmin käytetty, se on pesty ja varastoitu. Käytön jälkeen kasetti pestään ultrasuodatetulla vedellä ja täytetään varastointiliuoksella. Jos kasettia on tarkoitus säilyttää alle kolme vuorokautta, riittää varastointiliuokseksi steriili vesi tai keittosuolaliuos. Alle kuuden kuukauden varastointiin käytetään 0,05M–0,1M NaOH:ia ja yli kuuden kuukauden varastointiin 15 % glyseriini + 0.05 % natriumatsidi (NaN_3). (Pall Life Sciences 2003, 5–6.)

7 KOKEELLINEN OSUUS

Opinnäytetyön tarkoituksena oli konsentroida näytettä 10 %:iin alkuperäisestä tilavuudesta ja testata sekä ELISA- että Bradford-testeillä, säilyikö vasta-aine mediumissa. Proteiinia tutkittiin SDS-PAGElla ja puhdistettiin affiniteettikromatografialla sekä spesifisyys todettiin Western blot -menetelmällä.

7.1 Bradford-proteiinimääritys

Standardilaimennokset ja kantaliuos BSA:sta valmistettiin liitteen 2 mukaisesti.

Kaivoihin pipetoitiin 160 µl standardi-laimennosta, tislattua vettä (nolla) tai näytelaimennosta. Joka kaivoon lisättiin 40 µl värireagenssia (BioRad nro 210006402, Bradford). Kaivot suljettiin tarralevyllä. Inkuboitiin 30 minuuttia sekoittaen samalla tasosekoittajalla. Värireaktio mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm.

7.2 Vasta-aineiden ELISA-testaus

ELISA-testillä seurattiin mediumin rikastumista konsentroidin ja muiden jälkikäsittelyvaiheiden jälkeen.

7.2.1 Strippien kaivojen pinnoittaminen X76-antigeenillä

Kaivoihin koutattiin X76-antigeenia 100 ng/kaivo. Kuoppelevy muodostuu stripeistä ja jokaisessa stripissä on 8 kaivoa. Yhteen kaivoon pipetoidaan 100 µl antigeenilaimennosta eli stripiä kohden laimennosta tarvittiin 800 µl. Laimennosta tehtiin 1 ml per stripi. Kun strippejä tehtiin aluksi 10, tarvittiin laimennosta 10 ml.

Laimennos tehtiin koplauspuskuriin (0,1 M natriumbikarbonaattipuskuri, pH 9,6). X76-kantaliuoksen pitoisuus oli 2 mg/ml eli 2000 ng/µl. X76-kantaliuosta otettiin 5 µl ja se laimennettiin 10 ml:ksi koplauspuskurilla. Kaivoihin pipetoitiin

100 µl X76-laimennosta ja inkuboitii ensin huoneenlämmössä 10 minuuttia, minkä jälkeen stripit siirrettiin kylmähuoneeseen yön yli inkuboitumaan. Koutatut stripit pakastettiin aamulla odottamaan jatkokäyttöä.

7.2.2 ELISA-testi

Kaivojen blokkaukseen eli epäspesifisten sitoutumispaikkojen täyttäminen aloitettiin poistamalla antigeeni (X76) sulatetuista stripeista. Kaivoihin lisättiin 200 µl PBST-pesupuskuria. Stripit pestiin käsin 3x250 µl 1xPBST-puskurilla. Lisättiin 200 µl 1%BSA-0,2%gelatiini-PBS-blokkauksepuskuria ja inkuboitii sekoituksessa 20 minuuttia. Poistettiin blokkauksepuskuri ja pestiin 250 µl:lla 1xPBST-puskuria. Näytteet ja kontrollivasta-aineet fuugattiin 13 000 RPM:ssa 5 minuuttia. Positiivisesta kontrollista (15C4) tehtiin 1:100 000 -laimennos ja medium-näytteestä tehtiin laimennokset 1:10, 1:100 ja 1:1000.

Kutakin laimennosta pipetoitiin 100 µl kaivoihin ja inkuboitii 1 tunti ravistellen. Kuopat tyhjennettiin ja pestiin 3x250 µl 1xPBST:llä. Pestiin vielä kaksi kertaa 3x250 µl. Lopuksi lisättiin 50 µl blokkauksepuskuria. Kakkosvasta-aine (α -mouse AFOS) laimennettiin 1:5000. Kaivoista poistettiin puskuri ja lisättiin 100 µl kakkosvasta-ainetta. Inkuboitii tunti ravistellen. Kaivot tyhjennettiin ja pestiin 3x250 µl PBST:llä. Pestiin vielä 2x6 kertaa.

P-nitrofenyyylifostaatti (Sigma Fast pNPP) liuotettiin 20 ml:aan tislattua vettä. Suodatettiin 0,2 µm -ruiskusuodattimella ja suojattiin Falcon-putki valolta folio-kääreellä. Pipetoitiin pipetointikaavion mukaan 100 µl kaivoihin ja inkuboitii 30 minuuttia. Mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 405.

7.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE-ajo tehtiin Western blot-määrityksen vuoksi. SDS-PAGElla pystyttiin myös tutkimaan sisältääkö näytteet haluttua proteiinia.

7.3.1 SDS-PAGE-geelien valaminen

15-prosenttisia SDS-PAGE-geelejä valettiin neljä kappaletta. Geelit valettiin liitteessä 1 olevan työohjeen mukaan.

Lasti koottiin valukehikkoon siten, että korkeampi lasi tuli muovia vasten, lasien väliin laitettiin spacerit ja etummaiseksi asetettiin matalampi lasi. Valukehikot asetettiin telineeseen niin, että matalampi lasi oli valajaan päin. Kamman avulla merkittiin alageelin ylärajan paikka.

Alageeliseokseen (10 ml) lisättiin 6,5 µl TEMEDIä ja 50 µl 10%APSia. Sekoitettiin hyvin ja pipetoitiin lasien väliin valukehikossa. Päälle laitettiin noin 0,5 ml 0,1%SDS-liuosta, jotta geelin pinnasta tulee tasainen. Geelin annettiin hyytyä 15 minuuttia, jonka jälkeen poistettiin neste alageelin pinnalta suodatinpaperilla.

Seuraavaksi otettiin ylägeeliseosta 6 ml, ja siihen lisättiin 5 µl TEMEDIä ja 50 µl 10%APSia. Seos kaadettiin lasien väliin, alageelin päälle. Kampa asetettiin paikalleen, kulma edellä varoen ilmakuplien muodostumista. Lasia kopsuteltiin hieman ulkopuolelta, jotta myös pienet ilmakuplat nousivat pintaan. Geelin annettiin hyytyä 15 minuuttia.

Ensimmäiset neljä geeliä osoittautuivat harjoituskappaleiksi ja valettiin uudet geelit. Geelit säilöttiin kylmähuoneeseen. Geeleistä poistettiin kammat ja ne käärittiin tislattuun veteen kostutettuihin papereihin ja pakattiin muovipusseihin.

7.3.2 SDS-PAGE-ajo

SDS-PAGE-geelejä ajettiin kaksi identtistä. Ajoon otettiin näytteet fuugatusta ja suodatetusta raakamediumista (R), konsentroidusta mediumista (KM), ei-sitoutuneesta aineksesta affiniteettikromatografiasta (S) ja affiniteettifraktioista 1–6 (Fr1–6).

Otettiin 20 µl näytettä ja 8 µl 4xred. SDS-PAGE-näytepuskuria. Kuumennettiin eppendorf-putkissa 95°C:ssa 3 minuuttia. Putken kanteen tehtiin reikiä, jotta kansi ei aukea kuumennuksen yhteydessä. Näytteet fuugattiin putken pohjaan.

Ajokammion pohjalle kaadettiin 1xSDS-ajopuskuria. Geeleistä irrotettiin kammat ja lasin reunat puhdistettiin tislattu vedellä ja paperilla. Geeliteline asetettiin ajotelineeseen piikki puoli ja kaivopuoli ylöspäin. Sisempään kammioon kaadettiin nestettä niin, että sitä oli 10 mm kaivojen yläpuolella. Geelin kaivoihin pipetoitiin 10 µl näytettä ja yhteen kaivoon 4 µl MW-standardia.

Punainen napa asetettiin punaiselle puolelle ja ajon säädöiksi laitettiin 200V, 400 mA ja 40 minuuttia. Ajettiin, kunnes sininen väri oli lasin alareunassa. Geeliä värjättiin CBB-värjäysliuoksella 20 minuuttia.

Värjäyksen jälkeen ylimääräinen väri pestiin pois 10-prosenttisella etikkahapolla. Geeliä pestiin useita kertoja eli etikkahappo vaihdettiin usein. Geelin annettiin puhdistua myös yön yli liuottamalla sitä etikkahapossa.

7.4 Konsentroidi tangentialivirtaussuodatinlaitteella

Minimate-konsentroidinlaitetta testattiin ensin pelkän veden avulla. Laitteisto kasattiin laitteen mukana tulleen ohjeen mukaan. Ajettiin laitteiston läpi steriloitua vettä ja varmistettiin, ettei ohivuotoja tule, sekä pestiin suodatinkasetti säilytysliuoksista.

Sulatetut mediumit fuugattiin kolme kertaa ja suodatettiin pullosuodattimella. Mediumit suodattuivat todella hitaasti huolimatta alipaineesta. Suodattimet tukkiutuivat herkästi, ja niitä jouduttiin vaihtamaan vähän väliä. Kaksi ensimmäistä fuugausta olivat 5000 RPM, 10 minuuttia ja kolmas kerta 9000 RPM, 15 minuuttia. Kolmannellakaan fuugauksella ei ollut vaikutusta suodattumiseen. Pullosuodattimena oli Nalgene Supor machV 0,2 µm -suodatin.

Sentrifugoitu ja suodatettu medium laitettiin konsentroitumaan. Aloitettiin 200 ml:lla, josta oli jäljellä puolet reilun kahden tunnin kuluttua. Paine oli 20 psi eli 1,4 bar. Lisättiin mediumia 400 ml. Mediumia lisättiin vielä iltapäivällä n. 100 ml ja medium jätettiin konsentroitumaan yön yli noin 1 barin paineeseen.

Aamulla mediumia lisättiin 350 ml. Mediumin suodattamista jatkettiin. Mediumia sentrifugoitiin vielä neljännekin kerran, minkä jälkeen todettiin, ettei siitä ole

mitään hyötyä suodattumisen kannalta. Pullo-suodatinta vaihdettiin muutaman desilitran mediumin suodattamisen jälkeen.

Konsentroitua jatkettiin ja lisättiin 300 ml konsentroitavaksi. Iltapäivällä otettiin näytteet ja konsentroidu lopetettiin. Kaikkiaan konsentroidu noin 2 litraa mediumia 300 ml:n tilavuuteen. Kasetti pestiin steriilillä vedellä niin sanotulla ohijuoksutuksella eli kaikki hanat auki eikä vettä suodatettu, vaan huuhdeltiin membraanin molemmat puolet erikseen). Näytteet otettiin raakamediumista eli sentrifugoidusta ja suodatetusta mediumista (R), konsentroidujätteistä alussa, välissä ja lopussa (KJ1-3), konsentroidusta mediumista (KM) sekä kasetin puhdistusvedestä (KP).

Kasetin puhdistusvedestä otettiin näyte, jotta nähdään, kuinka paljon proteiinia jää vielä membraanin pintaan. Standardit ja laimennokset tehtiin valmiiksi proteiinimääritystä varten. Konsentroiduun lisättiin 90 ml 10xPBS-puskuria pH:n säilyttämiseksi.

7.5 Affiniteettipuhdistus

Co²⁺-hartsin (HisPur Cobalt Resin –hartsin, Thermo Scientific) puhdistettiin ja tasapainotettiin. Hartsia huuhdeltiin kolme kertaa 1xPBS -puskurilla ja jätettiin jääkaappiin odottamaan käyttöä.

Konsentroidu Fab-raakanäyte sekoitettiin hartsin kanssa ja annettiin sitoutua yön yli kylmähuoneessa sekoituksessa. Ei-sitoutunut aines erotettiin dekantoinnalla ja otettiin talteen. Valmistettiin PBS-0,1% BRIJ-35-pesupuskuri. Lisättiin 100 ml:aa 1xPBS-liuosta kohti 10 µl BRIJ-35-detergenttiä. Pesupuskuria valmistettiin 500 ml.

Hartsin esipestiin dekantoinnalla sitä pesupuskurin kanssa kolme kertaa. Sentrifugoitiin 50 ml:n sentrifuugiputkessa kierrosluvulla 2000 RPM 5 minuuttia. Esipesty hartsin siirrettiin kertakäyttöpölväeseen ja laskettiin pesupuskuria läpi, kunnes tulevan puskurin A280 oli alle 0,03. Mittaus suoritettiin Nanodropilla, joka nollattiin puhtaalla pesupuskurilla.

Sitoutuneet Fab-proteiinit eluoiitiin 0,5 M imidazolilla. Puskurin annettiin inkuboitua pylväässä kolme minuuttia ennen eluointia. Pylväästä eluoiitiin fraktiot 1–6. Kutakin fraktiota otettiin 1,5 ml.

Fraktiot 3 ja 4 konsentroidtiin vielä mikroultrasuodattimilla. Kalvot kostutettiin ensin 400 µl:lla vettä ja fuugattiin 5 minuuttia. Vesisuodot poistettiin putken alaosasta, lisättiin näyte yläosaan ja sentrifugoitiin 5 minuuttia kerrallaan kylmäsentrifuugissa.

7.6 Western Blot -analyysi

Toinen SDS-PAGE -geeleistä otettiin jatkotutkimuksiin Western Blot-analyysiin. PVDF-kalvo kasteltiin I-propanolissa molemmin puolin ja sen jälkeen kalvo laitettiin hetkeksi deionisoituun veteen ja huuhdeltiin kolme kertaa. Tämän jälkeen kalvoa, SDS-PAGE -geeliä ja suodatinpapereita tasapainotettiin siirtopuskurissa 15 minuuttia.

Laitteeseen koottiin ensin suodatinpaperi, sitten kalvo, geeli ja lopuksi vielä päälle suodatinpaperi rullaten, jotta saatiin ilmakuplat joka kerroksen välistä pois. Ajo-ominaisuuksina oli 20 V, 380 mA, 50 minuuttia.

Ajon jälkeen geeli nostettiin CBB-väriliuokseen, jotta saatiin tarkistettua, ovatko proteiinit siirtyneet. Kalvoa huuhdeltiin muutaman kerran deionisoidussa vedessä ja jätettiin kuivumaan suodatinpapereiden väliin yön yli blokkauspuskuriin kylmiöön (+4 °C).

Seuraavana aamuna tehtiin kakkosvasta-aine eli leima-vasta-ainekäsittely. Leima-vasta-aine (anti-mouse-HRP) laimennettiin 30 ml:aan blokkauspuskuriä 1:50 000. Kalvon annettiin olla laimennetussa leima-vasta-aineessa kaksi tuntia, minkä jälkeen kalvo pestiin 1xPBST-puskurilla. Kalvon annettiin olla ensin kolme kertaa viisi minuuttia 30 ml:ssa puskuria ravistelussa, sen jälkeen viisi kertaa kymmenen minuuttia 200 ml:ssa. Kalvo laitettiin rasiaan, jossa oli 1xPBS-puskuria ja siirrettiin siinä kuvauspaikalle.

ECL-kemiluminesenssisubstraatti (Western Blotting Substrate, Pierce® ECL Plus Solution A ja Pierce® ECL Plus Solution B) sekoitettiin juuri ennen käyttöä

ja pipetoitiin rasian kannen päällä olevan kalvon päälle. Kantta ja nestettä kallisteltiin noin 30 sekunnin ajan, minkä jälkeen kalvosta valutettiin liika neste pois. Kalvo nostettiin piirtoheitinkalvon päälle ja siirrettiin laitteeseen kuvattavaksi.

8 TULOKSET

Tuloksissa esitellään taulukot ja kuvat Bradford-proteiinimääritystestiä, ELISA-testeistä, UV-mittauksesta ja Western blotista.

8.1 Bradford-proteiinimääritys

Bradford-proteiinitestillä testattiin lähinnä sitä, millaisia laimennoksia ELISA-testeihin olisi hyvä ottaa. Bradfordilla pystyttiin myös toteamaan konsentroidun mediumin väkevöityminen. Taulukossa 1 on näytteiden konsentraatiot.

TAULUKKO 1. Näytteiden pitoisuudet

Näyte	µg/ml
R	2645
KJ1	72
KJ2	73
KJ3	91
KM	8300
KP	117
S	2518
P1	1871
P2	910
P3	470
Fr1	0
Fr2	0
Fr3	473
Fr4	0
Fr5	0
Fr6	0
KF3	890
KF4	909

Konsentroitunut medium sisälsi oletusten mukaisesti eniten proteiinia. Myös kasetin pesuvesi sisälsi näytettä eli kasettia huuhdottaessa tämä tulee ottaa huomioon. Affiniteettipuhdistuksen eri vaiheiden näytteet olivat odotusten kaltaiset. Tarkemmat taulukot ja standardikuvaajat löytyvät liitteestä 2.

8.2 UV-mittaus Nanodropilla

Nanodrop-spectrofotometrillä tarkistettiin affiniteettipuhdistuksen yhteydessä fraktioiden absorbanssit ja proteiinipitoisuudet, jotta tiedettiin, milloin näyte on eluoitu pylväästä ulos. Taulukkoon 2 on merkitty absorbanssit ja konsentraatiot. 1 absorbanssi on 1 mg/ml

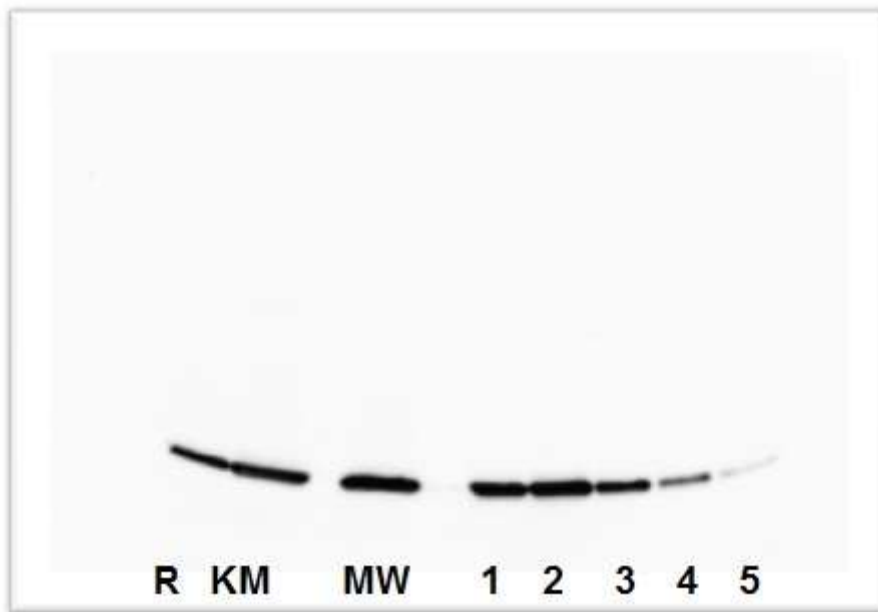
TAULUKKO 2. Absorbanssin tarkistus Nanodropilla

Näyte	Abs.	Conc. Mg/ml
Fr1	0,011	0,011
Fr2	0,119	0,119
Fr3	0,561	0,561
Fr4	0,440	0,440
Fr5	0,408	0,408
Fr6	0,385	0,385
Fr7	0,372	0,372
Fr8	0,390	0,390
Fr9	0,381	0,381
Fr10	0,373	0,373
Imidazoli	0,350	0,350
Vesi	0,002	0,002

Fraktioiden 3 ja 4 pitoisuudet olivat odotusten mukaisesti suurimmat.

8.3 Western blot

Western blot-analyysissä tutkittiin sisälsikö konsentroitua medium haluttua vasta-ainetta ja onnistuttiinko affiniteettikromatografialla puhdistamaan proteiinia. Kemiluminesenssikuvassa (kuva 11) näkyy selkeästi näytteiden linja.



KUVA 11. Kemiluminesenssikuva

Kemiluminesenssikuvasta nähdään, kuinka sekä raakanäyte, konsentroitua medium että affiniteettikromatografiapuhdistuksen fraktiot sisälsivät vasta-ainetta.

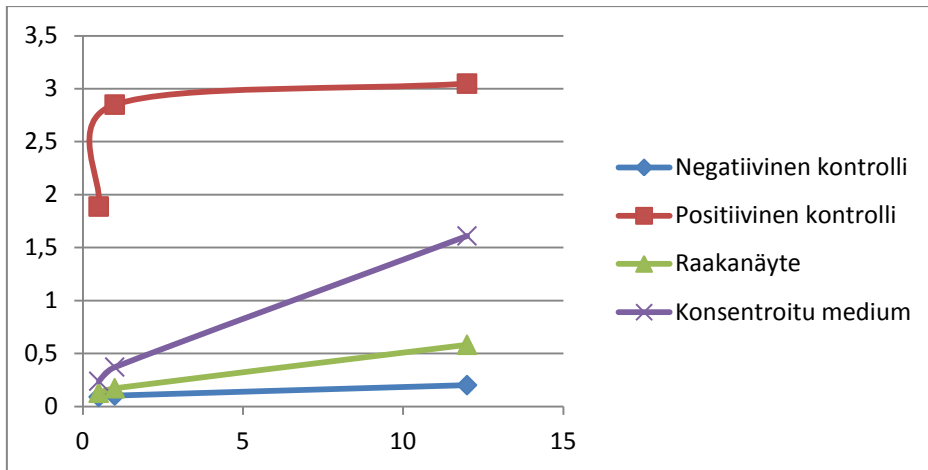
8.4 ELISA-testi

ELISA-testillä seurattiin näytteen rikastumista konsentroinnin aikana. Taulukkoon 3 on laskettu keskiarvot kaikista ELISA-testien absorbansseista.

TAULUKKO 3. ELISA-testin absorbanssien keskiarvot

	1:100	1:1000	1:8000		
	30 min	30 min	30 min	60 min	y/y
	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
Neg. Ctrl	0,1453	0,090	0,091	0,104	0,202
Pos. ctrl	2,468	1,038	1,888	2,850	3,048
R	2,922	0,122	0,130	0,173	0,583
KJ1	0,182	0,093	0,099	0,121	0,322
KJ2	0,162	0,091	0,099	0,116	0,264
KJ3	0,162	0,092	-	-	-
S	3,075	0,202	0,268	0,367	1,580
P1	3,124	0,122	0,164	0,238	0,937
P2	2,923	0,100	0,076	0,134	0,339
P3	1,951	0,089	0,097	0,115	0,235
Fr1	1,910	0,106	0,101	0,121	0,304
Fr2	2,938	0,489	0,160	0,230	0,912
Fr3	2,305	0,089	1,288	1,926	2,999
Fr4	2,187	0,100	0,103	0,128	0,365
Fr5	2,280	0,103	0,133	0,181	0,614
Fr6	2,004	0,095	0,110	0,138	0,445
KF3	3,067	0,102	0,115	0,145	0,391
KF4	1,702	0,089	0,094	0,113	0,309
KP	2,796	0,096	0,102	0,125	0,332
KM	2,926	0,185	0,239	0,373	1,611

Taulukosta 3 nähdään, että konsentroitijätteisiin meni todella pieni määrä proteiinia. Ei-sitoutunut aines affiniteettikromatografiassa sisälsi tutkittavaa vasta-ainetta hyvinkin paljon, ja myös pesuedet sisälsivät vasta-ainetta. Haluttu proteiini saatiin eluoitua pylväästä odotetunlaisesti. Konsentroituu medium rikastui jonkin verran. Absorbanssit kaikista ajoista löytyvät liitteestä 3.



KUVA 12. ELISA-testin näytteiden R ja KM absorbanssit

Kuvasta 12 näkee selkeästi eron raakanäytteen ja konsentroidun mediumin välillä. Laimennokset olivat hyvät, koska negatiivinen kontrolli on pienempi ja positiivinen kontrolli vastaavasti suurempi kuin näytteiden absorbanssit.

9 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli koekäyttää tangentiaalivirtaussuodatinlaite eli konsentrintilaite, joka oli hankittu Biolääketieteen fysiologian laitokselle useita kuukausia aiemmin. Fab-vasta-aineen puhdistus on ollut hankalaa suurten tilavuuksien ja pienten pitoisuuksien vuoksi. Kiireiden vuoksi laitteen käyttöönotto oli kuitenkin jäänyt tekemättä ja laitteen monipuoliset ominaisuudet eivät olleet hyötykäytössä.

Laitteen käyttö oli loppujen lopuksi hyvinkin yksinkertaista, ja tuloksista on nähtävissä, että näytteenä olleen Fab-vasta-aineen konsentrinti onnistui hyvin. Tuotetta konsentroititiin 10 %:iin alkuperäisestä tilavuudesta ja konsentroituu medium sisälsi Bradfordin testin mukaan yli 300 % enemmän vasta-ainetta kuin alkuperäinen raakamedium. Konsentrintijäte sisälsi pieniä määriä vasta-ainetta, mutta ei niin paljon, että sen perusteella voitaisiin sanoa näytettä menevän hukkaan.

Kasetin pesuvesi sisälsi myös vasta-ainetta, mutta kun miettii laitteen toimintaperiaatetta, se on ymmärrettävää. Näyte suodattuu kalvon läpi, ja kun konsentrinti lopetetaan, kalvon pinnalla on edelleen näytettä. Tämä näyte huuhdotaan pesun yhteydessä pois. Myös näyteastiasta kasettiin kulkevassa letkussa on näytettä, joka lähtee pois pesun yhteydessä.

Western blotissa saatiin varmistettua, että näytteet sisälsivät haluttua, tutkittavaa vasta-ainetta. Kaivon pohjat ”hymyilevät”, mikä kertoo siitä, että geelin valussa linja jäänyt epätasaiseksi. SDS-PAGE-ajoa olisi pitänyt jatkaa vielä tovi.

Myös ELISA-testin absorbanssien perusteella voidaan todeta konsentroidun onnistuneen. Konsentroidun mediumin absorbanssi oli suurempi kuin alkuperäisen näytteen absorbanssi. Kuvaajalle piirrettynä eron näkee selvästi. Kuvaajalla on esitetty vain raakanäyte ja konsentroituu medium, koska vaikka muutkin näytteet olivat mielenkiintoisia tutkittavia, ovat nämä kaksi työn

kannalta oleelliset näytteet. Näiden kahden näytteen asettuminen kuvaajalle kertoo parhaiten sen, kuinka työ onnistui.

Vaikka projekti tuntui alussa suppealta, oli sen tekemisellä kuitenkin suuri merkitys yliopiston tutkimusryhmälle. Laite oli ollut useita kuukausia käyttämättömänä, koska kenelläkään ei ollut ollut aikaa sitä testata ja koekäyttää. Tutkittavaa materiaalia ja työvaiheita saatiin hyvin ja laitteen testaus onnistui.

LÄHTEET

Affinity Chromatography. 2012. GE Healthcare Life Sciences. Saatavissa: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/fi/GELifeSciences-FI/products/affinity-chromatography-ac/>. Hakupäivä 14.2.2013.

Affinity Chromatography. 2012. Principles & Methods. GE Healthcare Life Sciences. Saatavissa: http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334615650802/litdoc18102229AE_20121107154820.pdf. Hakupäivä 7.3.2013.

Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2009. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WSOYpro Oy.

Halonen, Toivo 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, I. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Huuki, Jaana 2010. Western blot -menetelmän optimointi kantasoluista tuotetuille verkkokalvon soluille. Tampere: Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Lahtinen, Ulla 2012. 1B10-G3-Vasta-aineen elinkaari laadunvalvonnan näkökulmasta. Oulu: Oulunseudun ammattikorkeakoulu.

Pall Life Sciences. 2003. Care and Use Procedures. Minimate™ TFF Capsules. USA. TFF-kasetin käyttöohje.

Proteiinien SDS-PAGE. 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/ Hakupäivä 15.1.2013.

Proteiinimääritys ja lineaarinen mittausalue. 2012. Opetushallitus, Biogeeni. 2012. Saatavissa:

http://www.edu.fi/download/143325_Proteiinimaaritys_ja_lineaarinen_mittausalue.pdf. Hakupäivä 15.3.2013.

Sarpola, Anna 2011. Immunologisen vasta-ainetestin validointi. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö. Opinnäytetyö.

Tangentiaalivirtaussuodatinlaite. 2013. VWR. Saatavissa: https://fi.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=516-0186. Hakupäivä 14.5.2013.

Turpeenoja, Leena 2001. Biokemiaa, 4. tarkistettu painos. Vantaa: Tummavuoren kirjapaino Oy.

Ultrasuodatin. 2004. Teknillinen korkeakoulu, Kemian laitetekniikan laboratorio. Saatavissa: https://noppa.aalto.fi/noppa/.../KE-42_3000_7._ultrasuodatin.pdf. Hakupäivä 15.2.2013.

Vasta-aine. 2012. Wikipedia. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/Vasta-aine>. Hakupäivä 11.2.2013. Hakupäivä 13.3.2013.

Vasta-aineet. 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>. Hakupäivä 13.3.2013.

Veijola, Johanna. 2008. SDS-proteiinigeelit. Oulu. Oulun Yliopisto. Työohje.

Virology toolbox: western blot. 2010. Virology blog. Saatavissa: <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>. Hakupäivä 2.5.2013.

LIITTEET

Liite 1. SDS-PAGE-työohjeet

Liite 2. Bradford-proteiinimääritys (näytelaimennokset, standardisuora ja pipetointikaaviot)

Liite 3. ELISA-testit (näytelaimennokset ja pipetointikaaviot)

Liite 4. Liuosten ohjeita

Liite 5. Käytetyt laitteet ja reagenssit

Tarvikkeet

- Suojakäsineet
- Työskentelysuojapaperi
- Puhtaita isoja takalaseja
- Puhtaita matalampia etulaseja
- Teflon spacerit 2 kpl per geeli
- Teflon kampa 1 kpl per geeli
- Valukehikot 1 kpl per geeli
- Valuteline sekä siihen harmaat kumityyny
- Tussi kaivon ja kamman paikkojen merkitsemiseen
- 2 kpl 50 ml putkia tai 100 ml pulloja (puhdas, epästeriili käy)
- 2 kpl 14 ml putkia (puhdas, epästeriili käy)
- 10 ml ja 25 ml kertakäyttöpipettejä
- 1000 µl, 200 µl, 40 µl ja 10 µl pipettejä ja niihin kärjet
- Whatman-suodatinpaperiliuskoja
- Lämpöblokki (95°C tai 56°C)
- Labrakello
- Virtalähde, jolla saa 200V-400mA
- Kannellisia astioita geelin värjäykseen ja värinpoistoon

Reagenssit geelinvaluun

- 30% AA-BIS-liuos (37.1:1), säilytä 4°C. Laita kylmään käytön jälkeen.
HUOM! Myrkyllistä liuoksena!
Hyydytä aina jäte APSilla ja TEMEDillä ennen roskeen laittoa. Kerää geelit omaan geeliroskeen vetokaapissa.
- 1,5 M TRIS-HCl, pH 8.8
- 0,5 M TRIS-HCl, pH 6.8

- 20 % SDS
HUOM! Hyvin hienojakoista pölyä → punnitse suusuojausten kanssa!
Kiteytyy jo noin 20°C. Lämmitä tarvittaessa.
- Tislattua vettä
- TEMED
Lisää tätä ainoastaan valettavaa geeliä varten, ei koko seokseen! Esim. lisää 6,5 µl 10 ml:n geeliannokseen, josta tulee kaksi minigeeliä.
- 10 % APS (ammoniumpersulfaatti)
Lisää ainoastaan valettavaan geeliannokseen, ei koko seokseen! Esim. lisää 50 µl 10 ml:n geeliannokseen. Säilytä 10% APS 100 – 500 µl annoksina -20°C. Vie putki takaisin pakkaseen käytön jälkeen.
- 0,1 % SDS
Liuosta voi lisätä varovasti (noin 1 ml) alageelin pinnalle heti geelivalun jälkeen. Liuos imetään imupaperilla pois ennen ylägeelin valua.

Erotusgeeli eli alageeli

30 % AA/BIS –seos	25,0 ml
1,5M TRIS/HCL, pH 8,8	12,5 ml
20 % SDS	0,5 ml
<u>Tislattu vesi</u>	<u>12,0 ml</u>
	50,0 ml

Konsentroitigeeli eli ylägeeli

30 % AA/BIS –seos	8,25 ml
0,5M TRIS/HCL, pH 6,8	12,5 ml
20 % SDS	0,5 ml
<u>De. ion vesi</u>	<u>28,8 ml</u>
	50,0 ml

Kokoa lasti valukehikkoon, korkeampi lasi muovia vasten, väliin spacerit ja etummaisiksi matalampi lasi. Ruuvaa 4 ruuvia tasaisesti. Tarkista spacerit ja lasien reunat, että ne ovat tasan pöytäpinnan kanssa. Käännä lasit niin, että mahdolliset lohkeamat ja kuprut tulevat yläosaan, missä ne eivät vaikuta lasien painumista tiiviisti kumialustaan. Napsauta lasi-valukehikko valutelineeseen matalampi lasi itseesi päin. Merkitse kamman avulla kaivojen ja kamman paikat tussilla.

Kahta minigeeliä varten riittää noin 10 ml molempia geeliseoksia. Ota tarvittava määrä fuugiputkeen ja laita loput seokset takaisin kylmään.

Lisää ensin alageeliseokseen (10 ml) 6,5 µl TEMEDIä ja 50 µl 10% APSia. Sekoita hyvin ja kaada tai pipetoi puhtaiden lasien väliin valukehikossa. Alageelin valussa mahdollinen liika neste imetään vähemmäksi suodatinpaperilla. Lisää pinnalle lopuksi noin 0,5 ml 0,1% SDS-liuosta. Geeli hyytyy noin 15 minuutissa. Poista neste hyytyneen alageelin pinnalta suodatinpaperilla.

Ota ylägeeliseosta noin 6 ml ja lisää siihen 5 µl TEMEDIä ja 50 µl 10% APSia. Kaada seos lasien väliin ja aseta kampa paikalleen kulma edellä varoen ilmakuplien muodostumista. Voit kopsutella lasia ulkopuolelta, jotta mahdolliset pienet kuplat nousevat pintaan. Älä liikuttele kampa pitkään, muuten kaivot menevät huonoiksi. Jos asetat kamman suorassa lasien väliin, kuplia tulee enemmän. Geeli hyytyy noin 15 minuutissa.

Valmiit geelit voi varastoida kylmähuoneeseen käärimällä ne tilattuun veteen kostutettuihin papereihin ja pakkaamalla muovipussiin. Poista kammat, jotta muut voivat tarvittaessa valaa geelejä. Puhdista lasin yläreuna kaivojen yläpuolelta mahdollinen geelijäte vedellä ja paperilla. Merkitse päivämäärä ja nimikirjaimet pakettiin.

Liuosmainen jäte pitää aina hyydyttää ennen roskeen laittoon. Lisää nesteeseen jonkin verran TEMEDIä ja 10% APSia. Hyytynyt geeli ei ole myrkyllinen, mutta se kerätään kuitenkin omaan jäteastiaan.

Reagenssit geelinajoon ja näytteiden käsittelyyn

- 2xLaemmlä SDS-PAGE –näytepuskuri (4% SDS – 20% glyseroli – 0,125M TRIS-HCl pH 6.8)

0,5M TRIS-HCl pH 6.8	2,5 ml
20% SDS	2,0 ml
50% glyseroli	4,0 ml
Tislattu vesi	0,5 ml
<u>Bromphenol blue</u>	<u>riipaus</u>
Yhteensä	9,0 ml

(jaa 20 kpl 450 µl annoksiin pakkaseen)

Lisää yhteen putkeen kerrallaan 50 µl beta-merkaptoetanolä vetokaapissa. Valmis 2x red.SDS-näytepuskuri varastoidaan -20°C. Merkitse B-ME:n lisäys.

Lisää puskuria näytteeseen 1 vol eli saman verran kuin näytettäkin on (usein 10 µl). Kuumenna proteiininäyte heti SDS-näytepuskurin lisäyksen jälkeen 95°C:ssa 3 – 5 minuuttia. Tee eppendorf-putken kanteen reikä neulalla, jotta kansi ei poksahda kuumennuksen aikana auki. Fuugaa neste pohjalle. Voit pakastaa näytteet jos et heti aja niitä geelillä. Pakastetut näytteet lämmitetään 56°C:ssa 20 minuuttia ennen geeläjoa SDS-proteiini-misellien liuottamiseksi.

- 10x PAGE –ajopuskurin kantaliuos (1,92M glysiini – 0,25M TRIS)
- 1x SDS-PAGE –ajopuskuri (192mM glysiini – 25mM TRIS – 0,1% SDS)
Valmista 10x–kantaliuoksesta ja 20% SDS:stä laimentamalla vedellä 2 – 5 litraa. Esim. 2 litraan otetaan 200 ml 10x-kantaliuosta ja 10 ml 20% SDS.

Kaada ajokammion pohjalle 1xSDS-ajopuskuria. Irrota geeleistä kammat ja puhdista lasin reuna (kaivojen yläpuoli) tislattulla vedellä ja paperilla. Napsauta geeliteline ajotelineeseen piikkipuoli ja kaivopuoli ylöspäin. Laita molemmille puolille geeliteline. Jos ajat vain yhden geelin, toiseen geelitelineeseen pitää ruuvata muovilevy tiukkaan. Muuten ajoastiaan ei muodostu kahta elektrodikammiota eikä virta kulje.

Kaada sisempään kammioon nestettä niin, että sitä on noin 5–10 mm kaivojen yläpuolella. Jos sisäkammio tyhjenee, kaada nestettä tankkiin sisä- ja ulkopuolen kammioihin yhtä paljon eli kaivojen yläpuolelle, mutta ei yli telineen.

Pipetoi geelille 10 µl näytteitä sekä 5 µl standardia (MW, GST, tms). Punainen napa punaiselle puolelle. Säädot: 200 V – 400 mA – 40 min. Aja kunnes sininen väri menee lasin alareunaan.

Ennen kuin purat geelin mieti miten päin geeli on eli missä reunassa on ensimmäiset ja missä viimeiset näytekäivot. Kun avaat geelilasin, leikkaa geelin yläreunasta kulmapala pois joko ensimmäisen tai viimeisen näytteen puolelta. Tärkeintä on, että pystyt sanomaan kumpi reuna on kumpi, kun geeli sitten värjäysastiassa pyörii.

Geelin voi fiks 10 % etikkahapolla. 10 minuutin inkubointi kiinnittää proteiinin akryyliamidin, joten sen jälkeen ne eivät diffuntoidu tai uutu pois geeliltä.

- CBB-värjäysliuos (40% etanoli – 8% etikkahappo – 0,05% Coomassie brilliant blue)
500 ml tislattua vettä, 400 ml etanolia, 80 ml väkevää etikkahappoa ja 0,5 g CBB → täytä tilavuus vedellä litraksi. Lisää CBB-väri ja sekoita magneetin kanssa yön yli. Suodata väriliuos suodatinpaperin läpi, jotta liukenematon jauhe saadaan pois. Väriä voidaan käyttää useita kertoja.

Geeliä pestään 8% tai 10% etikkahappoliuoksella. Pese pienillä määrillä useita kertoja. Geelin voi jättää kannelliseen astiaan yön yli värinpoistoon. Värinpoistoliuosta voi käyttää useita kertoja. Pidä puhdas ja käytetty liuos omissa astioissaan. Käytetyn liuoksen astiaan voi laittaa vaahtokumin palasia tai se suodatetaan aktiivihiihen läpi. Puhdasta etikkahappoa käytetään lähinnä viimeisiin pesuihin.

BSA-laimennosten valmistus

Kantaliuos 10 mg/ml BSA 1xPBS:ssa

Punnittiin 350 mg BSA:ta, liuotettiin loppupitoisuuteen 10 mg/ml eli 350 mg liuotettiin 35 ml:aan 1xPBS:aa.

Annosteltiin 1 ml:n eriin pakkaseen (-20°C).

Kantaliuksesta valmistettiin välilaimennos, josta edelleen työlaimennos.

Välilaimennos 1 mg/ml BSA 1xPBS:ssa

Laimennettiin 1 ml kantaliuosta 10 ml:ksi 1xPBS:lla.

Annosteltiin 1 ml:n eriin pakkaseen (-20°C).

Työlaimennos 128 µg/ml BSA tislatussa vedessä

640 µl 1mg/ml BSA + 4360 µl tislattua vettä

TAULUKKO 1. Standardilaimennokset

Laimennos (µg/ml)	Lähtöliuos	Tislattu H ₂ O	Lopputilavuus
128	5 ml työläimennos	–	5 ml
64	2,5 ml 128 µg/ml	2,5 ml	5 ml
32	2,5 ml 64 µg/ml	2,5 ml	5 ml
16	2,5 ml 32 µg/ml	2,5 ml	5 ml
8	2,5 ml 16 µg/ml	2,5 ml	5 ml
4	2,5 ml 8 µg/ml	2,5 ml	5 ml
0	–	5 ml	5 ml
80	80 µl välilaimennosta	920 µl	1 ml

TAULUKKO 2. Näytteet ja laimennokset Bradford-proteiinimääritykseen

Näyte	Lyhenne	Laimennos 1	Laimennos 2	Laimennos 3
Fuugattu ja suodatettu medium	R	1:10	1:100	1:1000
Konsentroitijäte 1 (alussa)	KJ1		1:100	
Konsentroitijäte 2 (välissä)	KJ2		1:100	
Konsentroitijäte 3 (lopussa)	KJ3		1:100	
Konsentroidu medium	KM		1:100	1:1000
Kasetin puhdistusvesi	KP			
Sitoutumaton (affiniteettipuhdistus)	S	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 1	P1	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 2	P2	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 3	P3	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 1	Fr1	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 2	Fr2	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 3	Fr3	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 4	Fr4	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 5	Fr5	1:10		
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 6	Fr6	1:10		
Konsentroidu fraktio 3	KF3	1:10		
Konsentroidu fraktio 4	KF4	1:10		

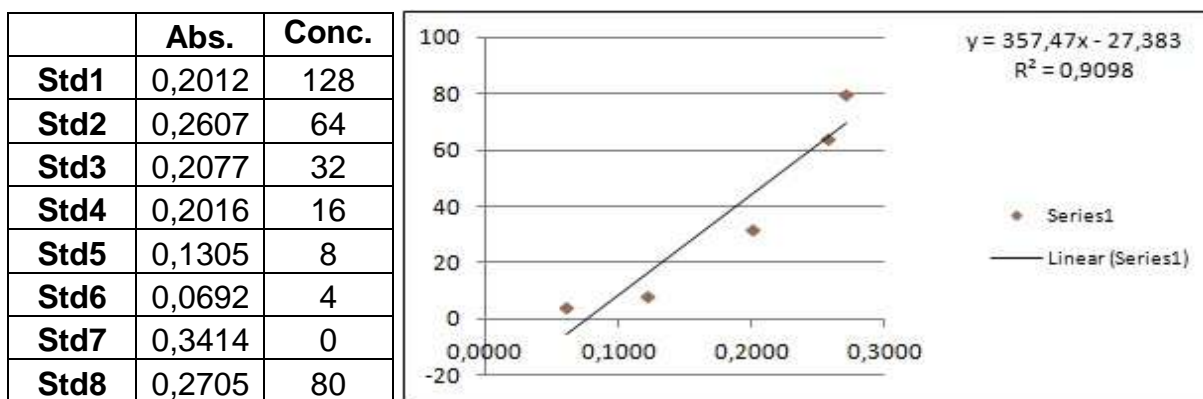
TAULUKKO 3. Pipetointikaavio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Std1	Std1	Std1	Std1	R1	R1	R1	KM3	KJ1x
B	Std2	Std2	Std2	Std2	R2	R2	R2	KM3	KJ1x
C	Std3	Std3	Std3	Std3	R3	R3	R3	KM3	KJ1x
D	Std4	Std4	Std4	Std4	KJ1	KJ1	KJ1	KP	KJ2x
E	Std5	Std5	Std5	Std5	KJ2	KJ2	KJ2	KP	KJ2x
F	Std6	Std6	Std6	Std6	KJ3	KJ3	KJ3	KP	KJ2x
G	Std7	Std7	Std7	Std7	KM1	KM1	KM1	KJ3x	KJ3x
H	Std8	Std8	Std8	Std8	KM2	KM2	KM2	KJ3x	

TAULUKKO 4. Absorbanssit 6 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,531	0,557	0,525	0,557	0,571	0,563	0,735	0,357	0,421
B	0,64	0,563	0,611	0,595	0,536	0,573	0,555	0,371	0,406
C	0,607	0,408	0,595	0,586	0,386	0,411	0,339	0,334	0,409
D	0,493	0,584	0,552	0,054	0,547	0,55	0,58	0,686	0,339
E	0,47	0,458	0,48	0,479	0,573	0,546	0,559	0,516	0,413
F	0,392	0,396	0,383	0,472	0,612	0,536	0,718	0,795	0,391
G	0,379	0,341	0,308	0,338	0,633	0,694	0,695	0,39	0,337
H	0,555	0,716	0,631	0,546	0,431	0,466	0,481	0,372	0,182

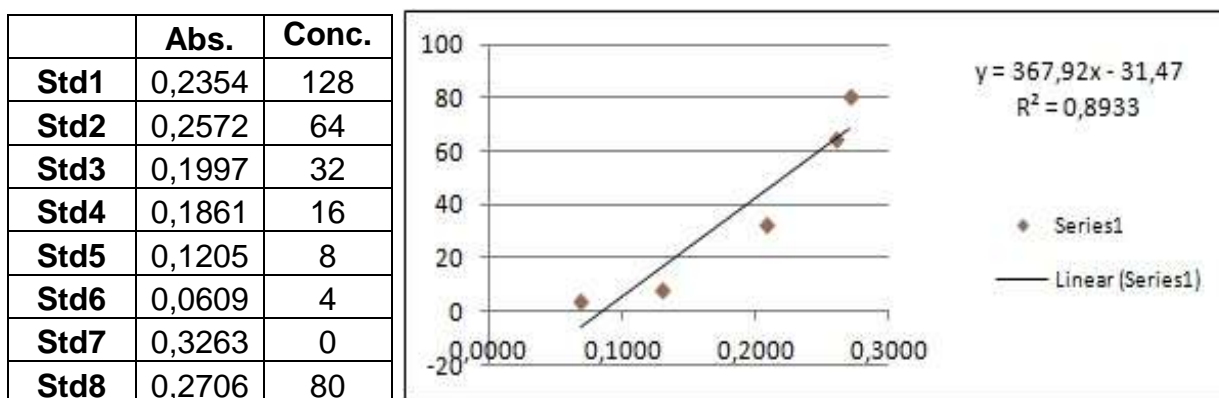
TAULUKKO 5. Standardisuoran kuvaaja 6 minuutin inkuboinnin jälkeen



TAULUKKO 6. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,557	0,573	0,549	0,567	0,638	0,596	0,764	0,339	0,378
B	0,613	0,553	0,585	0,583	0,500	0,529	0,513	0,348	0,365
C	0,571	0,420	0,561	0,551	0,361	0,434	0,322	0,322	0,368
D	0,470	0,551	0,516	0,054	0,628	0,625	0,658	0,754	0,310
E	0,449	0,439	0,450	0,449	0,659	0,622	0,638	0,605	0,366
F	0,373	0,376	0,366	0,433	0,684	0,619	0,772	0,883	0,351
G	0,358	0,326	0,299	0,322	0,619	0,668	0,673	0,356	0,318
H	0,554	0,679	0,613	0,542	0,405	0,437	0,443	0,340	

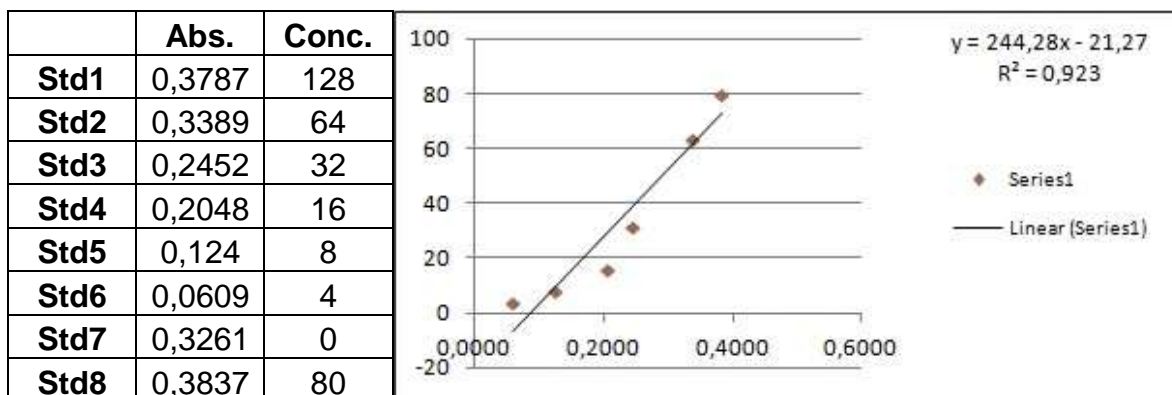
TAULUKKO 7. Standardisuoran kuvaaja 30 minuutin inkuboinnin jälkeen



TAULUKKO 8. Absorbanssit 60 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,715	0,718	0,708	0,679	0,849	0,732	0,909	0,342	0,36
B	0,686	0,636	0,656	0,682	0,506	0,533	0,518	0,345	0,35
C	0,609	0,475	0,601	0,6	0,354	0,43	0,327	0,324	0,349
D	0,494	0,568	0,53	0,053	0,75	0,741	0,766	1,001	0,306
E	0,454	0,444	0,452	0,45	0,792	0,743	0,766	0,849	0,346
F	0,377	0,381	0,369	0,421	0,806	0,735	0,893	1,124	0,337
G	0,351	0,326	0,308	0,32	0,717	0,739	0,751	0,342	0,317
H	0,669	0,782	0,726	0,662	0,41	0,432	0,437	0,331	0,171

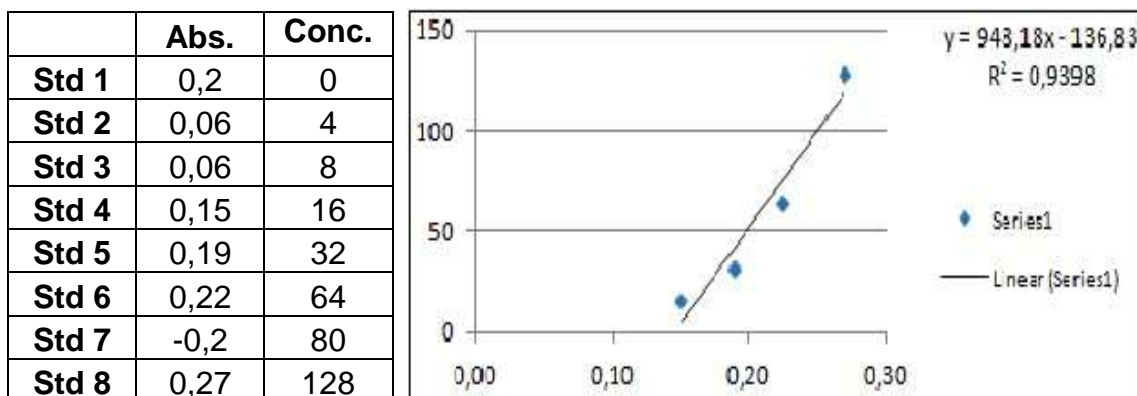
TAULUKKO 9. Standardisuoran kuvaaja 60 minuutin inkuboinnin jälkeen



TAULUKKO 10. Absorbanssit 40 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7
A	0,684	0,728	1,099	0,726	1,025	0,357	0,375
B	0,166	0,182	0,863	0,79	0,943	0,396	0,349
C	0,674	0,603	0,556	0,552	0,611	0,351	0,377
D	0,585	0,586	0,421	0,475	0,422	0,522	0,617
E	0,549	0,506	0,291	0,302	0,303	0,561	0,155
F	0,397	0,386	0,356	0,321	0,353	0,535	0,611
G	0,378	0,394	0,461	0,429	0,431		
H	0,297	0,308	0,374	0,371	0,386		

TAULUKKO 11. Standardisuoran kuvaaja 40 minuutin inkuboinnin jälkeen



TAULUKKO 12. ELISAn näytteet ja laimennokset

Näyte	Lyhenne	Laimennos 1	Laimennos 2	Laimennos 3
Fuugattu ja suodatettu medium	R	1:10	1:100	1:8000
Konsentroitijäte 1 (alussa)	KJ1		1:100	1:8000
Konsentroitijäte 2 (välissä)	KJ2		1:100	1:8000
Konsentroitijäte 3 (lopussa)	KJ3		1:100	1:8000
Konsentroitunut medium	KM		1:100	1:8000
Kasetin puhdistusvesi	KP		1:100	1:8000
Sitoutumaton (affiniteettipuhdistus)	S		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 1	P1		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 2	P2		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen pesuvesi 3	P3		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 1	Fr1		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 2	Fr2		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 3	Fr3		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 4	Fr4		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 5	Fr5		1:100	1:8000
Affiniteettipuhdistuksen fraktio 6	Fr6		1:100	1:8000
Konsentroitunut fraktio 3	KF3		1:100	1:8000
Konsentroitunut fraktio 4	KF4		1:100	1:8000

TAULUKKO 13. Pipetointikaavio

EI KOUTATTU X76:lla				
	1	2	3	4
A	BF	BF	BF	-
B	BF	BF	BF	-
C	15C4	15C4	BF	m10000
D	m1000	m4000	15C4	m10000
E	m1000	m4000	15C4	m10000
F	m1000	m4000	m4000	m1000
G	m10000	m10000	m4000	m1000
H	m10000	m10000	m4000	m1000

TAULUKKO 14. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	EI KOUTATTU X76:lla			
	1	2	3	4
A	0,090	0,093	0,096	0,113
B	0,092	0,093	0,099	0,149
C	1,407	1,266	0,098	0,122
D	2,898	2,462	0,093	0,099
E	2,905	2,018	0,091	0,089
F	2,895	2,209	0,084	0,096
G	1,867	2,530	0,106	0,092
H	2,556	2,236	0,091	0,089

TAULUKKO 15. Absorbanssit yön yli inkuboinnin jälkeen

	EI KOUTATTU X76:lla			
	1	2	3	4
A	0,096	0,101	0,087	0,088
B	0,101	0,115	0,084	0,088
C	2,919	2,932	0,083	0,114
D	2,912	2,913	0,091	0,107
E	2,916	2,920	0,089	0,101
F	2,921	2,933	0,084	0,090
G	2,952	2,965	0,090	0,095
H	3,015	2,993	0,091	0,088

TAULUKKO 16. Pipetointikaavio

	1	2	3	4	5	6	7
A	Neg.Ctrl	Neg.Ctrl	Neg.Ctrl	P2	P2	P2	KF3
B	Pos.Ctrl	Pos.Ctrl	Pos.Ctrl	P3	P3	P3	KF3
C	R	R	R	F1	F1	F1	KF3
D	KJ1	KJ1	KJ1	F2	F2	F2	KF4
E	KJ2	KJ2	KJ2	F3	F3	F3	KF4
F	KJ3	KJ3	KJ3	F4	F4	F4	KF4
G	S	S	S	F5	F5	F5	
H	P1	P1	P1	F6	F6	F6	

TAULUKKO 17. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7
A	0,125	0,155	0,156	2,864	2,949	2,955	3,086
B	2,794	2,279	2,078	1,532	2,171	2,150	3,082
C	3,099	3,054	2,991	1,813	2,088	1,830	3,034
D	0,188	0,184	0,175	2,925	2,924	2,964	1,721
E	0,164	0,162	0,159	2,114	2,580	2,220	1,630
F	0,161	0,163	0,161	2,101	2,452	2,008	1,754
G	3,105	3,084	3,036	2,234	2,286	2,320	
H	3,140	3,127	3,106	1,889	2,180	1,944	

TAULUKKO 18. Pipetointikaavio

	1	2
A	Pos.Ctrl	Pos.Ctrl
B	Pos.Ctrl	Neg.Ctrl
C	Neg.Ctrl	Neg.Ctrl
D	KP	KP
E	KP	R
F	R	R
G	KM	KM
H	KM	KM

TAULUKKO 19. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2
A	2,533	2,834
B	2,698	0,085
C	0,078	0,079
D	2,770	2,888
E	2,729	2,955
F	2,832	2,979
G	2,823	2,969
H	2,904	3,006

TAULUKKO 20. Pipetointikaavio

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	R	R	R	P ₂	P ₂	P ₂	KF ₃	KF ₃
B	KM	KM	KM	P ₃	P ₃	P ₃	KF ₃	KF ₄
C	KJ ₁	KJ ₁	KJ ₁	Fr ₁	Fr ₁	Fr ₁	KF ₄	KF ₄
D	KJ ₂	KJ ₂	KJ ₂	Fr ₂	Fr ₂	Fr ₂	Neg.Ctrl	Neg.Ctrl
E	KJ ₃	KJ ₃	KJ ₃	Fr ₃	Fr ₃	Fr ₃	Neg.Ctrl	
F	KP	KP	KP	Fr ₄	Fr ₄	Fr ₄	Pos.Ctrl	Pos.Ctrl
G	S	S	S	Fr ₅	Fr ₅	Fr ₅	Pos.Ctrl	
H	P ₁	P ₁	P ₁	Fr ₆	Fr ₆	Fr ₆		

TAULUKKO 21. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,250	0,121	0,122	0,097	0,114	0,088	0,093	0,086
B	0,220	0,172	0,163	0,089	0,096	0,083	0,126	0,097
C	0,095	0,090	0,093	0,113	0,107	0,099	0,090	0,079
D	0,093	0,089	0,092	0,542	0,570	0,355	0,090	0,105
E	0,092	0,091	0,092	0,093	0,092	0,081	0,105	0,104
F	0,103	0,097	0,088	0,107	0,104	0,090	0,107	0,082
G	0,185	0,174	0,247	0,108	0,106	0,096	1,038	0,941
H	0,126	0,120	0,119	0,095	0,105	0,084	0,974	0,304

TAULUKKO 22. Pipetointikaavio

	1	2	3	4	5	6	7
A	R 1:8000	R 1:8000	R 1:8000	Fr1 1:1000	Fr1 1:1000	Fr1 1:1000	KF4 1:8000
B	KM 1:8000	KM 1:8000	KM 1:8000	Fr2 1:1000	Fr2 1:1000	Fr2 1:1000	KF4 1:8000
C	KJ1 1:100	KJ1 1:100	KJ1 1:100	Fr3 1:1000	Fr3 1:1000	Fr3 1:1000	KF4 1:8000
D	KJ2 1:100	KJ2 1:100	KJ2 1:100	Fr4 1:1000	Fr4 1:1000	Fr4 1:1000	Neg.Ctrl
E	KP 1:8000	KP 1:8000	KP 1:8000	Fr5 1:1000	Fr5 1:1000	Fr5 1:1000	Neg.Ctrl
F	S 1:8000	S 1:8000	S 1:8000	Fr6 1:1000	Fr6 1:1000	Fr6 1:1000	Neg.Ctrl
G	P1 1:8000	P1 1:8000	P1 1:8000	KF3 1:8000	KF3 1:8000	KF3 1:8000	Pos.Ctrl
H	P2 1:8000	P2 1:8000	P2 1:8000	P3 1:8000	P3 1:8000	P3 1:8000	Pos.Ctrl

TAULUKKO 23. Absorbanssit 30 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7
A	0,136	0,126	0,127	0,103	0,098	0,102	0,098
B	0,192	0,224	0,300	0,142	0,148	0,189	0,098
C	0,095	0,093	0,110	0,799	1,147	1,429	0,086
D	0,094	0,111	0,093	0,102	0,102	0,105	0,093
E	0,100	0,104	0,102	0,127	0,135	0,136	0,087
F	0,337	0,219	0,247	0,120	0,100	0,109	0,093
G	0,178	0,155	0,159	0,113	0,119	0,114	0,686
H	0,104	0,104	0,123	0,099	0,097	0,096	1,888

TAULUKKO 24. Absorbanssit 60 minuutin inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7
A	0,179	0,169	0,171	0,123	0,117	0,124	0,119
B	0,282	0,350	0,486	0,199	0,206	0,284	0,123
C	0,110	0,111	0,141	1,378	2,005	2,394	0,097
D	0,109	0,132	0,108	0,125	0,126	0,133	0,105
E	0,123	0,127	0,126	0,172	0,185	0,186	0,097
F	0,557	0,343	0,391	0,156	0,119	0,139	0,109
G	0,265	0,221	0,227	0,148	0,142	0,145	1,194
H	0,128	0,129	0,144	0,118	0,114	0,112	2,850

TAULUKKO 25. Absorbanssit yön yli inkuboinnin jälkeen

	1	2	3	4	5	6	7
A	0,581	0,596	0,573	0,309	0,280	0,323	0,290
B	1,166	1,497	2,169	0,721	0,820	1,195	0,327
C	0,246	0,274	0,446	3,015	2,981	3,000	0,186
D	0,237	0,322	0,234	0,328	0,354	0,412	0,222
E	0,352	0,315	0,330	0,568	0,635	0,638	0,168
F	2,467	1,462	1,697	0,486	0,290	0,403	0,216
G	1,097	0,854	0,861	0,423	0,339	0,412	3,046
H	0,334	0,349	0,333	0,265	0,212	0,229	3,049

PBS–0,1%BRIJ35 (pesupuskuri)

Lisää 100 ml:aa 1xPBS-puskuria kohti 100 µl BRIJ 35 –detergenttiä.

0,5 M imidazoli

Tarvitset 0,5 M imidazolia 30 ml. Imidazolin moolimassa on 68,08 g/mol, joten 0.5 molaariseen liuokseen tarvitset 34,04 mg/ml. Liuota 1,021 g imidazolia 30 ml:aan pesupuskuria.

1%BSA–0,2%gelatiini–0,05%Tween20–1xPBS (blokkauuspuskuri)

2 g gelatiini + 100 ml 10xPBS

Täytetään tilavuus litraksi vedellä. Autoklavoidaan. Lisätään 10 g BSA:ta. Steriilisuodatetaan 0,22 µm suodattimella. Lisää Tween20.

1xPBS- 0,05 % Tween (PBST = pesupuskuri)

Otetaan 500 ml 10xPBS-puskuria ja laimennetaan litraksi. Lisätään 2,5 ml Tween20.

PNPP-substraattiliuos

TRIS-puskuritabletti (kultainen käärepaperi) liuotetaan 20 ml:aan steriiliä vettä. Sitten liuotetaan pNPP-tabletti (hopeinen käärepaperi) TRIS-puskuriin. Steriilisuodatetaan 0,22 µm suodattimen läpi. Säilytetään valolta suojattuna viileässä.

15C4 –laimennos 1:100 000

Laimennetaan ensin 1:1000 → 1 µl laimennetaan 1 ml:ksi blokkauspuskurilla

Sitten laimennetaan 1:100 → 10 µl:aan lisätään 990 µl blokkauspuskuria

Anti-mouse-Fab AFOS –laimennos 1:5000

Kun tarvitaan 2 ml laimennetaan ensin 1:50 → 20 µl laimennetaan 1 ml:ksi.

Sitten laimennetaan 1:100 → 20 µl laimennetaan 2 ml:ksi.

Anti-mouse-Fab HRP –laimennos 1:50 000

Tehdään ensin välilaimennos 1:100 → 10 µl laimennetaan 1 ml:ksi blokkauspuskurilla

Sitten laimennetaan 1:500 → 60 µl laimennetaan 30 ml:ksi blokkauspuskurilla

0,1M Natriumbikarbonaatti, pH 9,6 (koplauspuskuri)

4,24 g Na₂CO₃

5,04 g NaHCO₃

Täytetään tilavuus litraksi vedellä.

X76-antigeeni-laimennos 100 ng/kaivo

10 ml:aan otetaan 5,5 µl kantaliuosta ja laimennetaan koplauspuskurilla.

SDS-PAGE-liuosten ohjeet löytyvät työohjeesta.

KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSIT

LIITE 5/1

TAULUKKO 26. Käytetyt laitteet

Laite	Merkki ja malli	Valmistaja	Sarjanumero
Analyysivaaka	Sartorius handy H51		133233
Analyysivaaka	Sartorius 121		2705013
Blottauslaite, Western blot	Trans-Blot SD, Semidry transfer cell	Biorad	221BR
Jääpalakone	Simag SPR 165	Solotop	OB 2103 4
Kuoppalevypesuri	Biotek ELx50		217661
Lämpöravistelijä	IKA RS 4000	IKA	07.139533
Monikanavamäntäpipetti	Finnpipette 5-50 µl	Thermo Scientific	
Monikanavamäntäpipetti	Finnpipette 30-300 µl	Thermo Scientific	
Mäntäpipetti	Biohit Proline 1-5 ml		6040485
Mäntäpipetti	Biohit Proline 0,5-10 µl		AM36253
Mäntäpipetti	Biohit Proline 5-50 µl		AM36692
Mäntäpipetti	Biohit Proline 1-5 ml		AM39242
Mäntäpipetti	Biohit Proline 50-200 µl		AM55495
Mäntäpipetti	Biohit Proline 200-1000 µl		AQ35330
Mäntäpipetti	Finnpipette 5-50 µl	Thermo Scientific	
Mäntäpipetti	Finnpipette 30-300 µl	Thermo Scientific	
Mäntäpipetti	Finnpipette 0,5-10 µl	Thermo Scientific	
Mäntäpipetti	Finnpipette 100-1000 µl	Thermo Scientific	
pH/mV/°C –mittari	Consort P600		

TAULUKKO 27. Käytetyt laitteet

Laite	Merkki ja malli	Valmistaja	Sarjanumero
Puhdasvesijärjestelmä	Ultra clear TWF UV Plus TM	Hyxo Oy	095485-01
Ravistelijä	Heildolph Titramax 1000	VWR	110711788
SDS-ajolaite	Biorad	36E/0004	711BR04154
Sentrifugi	Sorvall Super Speed RC 2-B		72235
Sentrifugi	Thermo Scientific SL 40 R	Thermo Fisher Scientific Oy	40969119
Sentrifugi, eppendorf	Galaxy 16 DH	VWR	R612275
Sentrifugi, eppendorf	Galaxy 16 DH		R905087
Spektrofotometri	Nanodrop 2000	Finzymes	2543
Spektrofotometri	Victor 3, 1420 multilabel counter	Perkin Elmer	427055
Suodatinkasetti	Minimate™ TFF Capsule whit Omega™ 10kD Membrane	Pall Life Sciences	
Tangentiaalivirtauslaite	Minimate™ TFF	VWR	
Virtalähde	Biorad Power Pac 300		311BR3583
Virtalähde	Biorad Power Pac Basic		

TAULUKKO 28. Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja
2-merkaptotetanol	MP Biomedicals
30%-akryyliamidi/Bis-akryyliamidi	Bio-Rad Laboratories Inc.
Anti-Mouse-Fab AFOS	Sigma-Adrich
Anti-Mouse-Fab HRP	Sigma-Adrich
BSA (albumin bovine) 96%	Sigma-Adrich
Coomassie brilliant blue	
PBS, phosphate buffered saline, 1x ja 10X	Sigma-Adrich
Pierce®ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
pNPP	Sigma-Adrich
Protein Assay (Bradford reagenssi)	Bio-Rad Laboratories Inc.
SDS (natriumdodekyylisulfaatti)	Merck
TEMED (tetrametyyliamiini)	Sigma-Adrich
TRIS (hydroksimetyyli)aminometaani	Merck
Tween 20	Merck