

Heidi Mäkkylä

Soluproliferaatiomenetelmien validoiminen virtaussytometriän avulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööriytyö

17.5.2013



Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Heidi Mäkkylä Soluproliferaatiomenetelmien validoiminen virtaussytometrian avulla 39 sivua + 3 liitettä 17.5.2013
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	dosentti Nina Peitsaro päätoiminen tuntiopettaja Titta Pirkola
<p>Insinööriyön tarkoituksena oli testata solujen proliferaation ja solusyklin tutkimiseen tarkoitettuja värjäystapoja ja verrata niiden toimivuutta käyttäen näytteiden analysoimiseen virtaussytometriä.</p> <p>Virtaussytometria on yksittäisiä soluja ja niiden ominaisuuksia tutkiva tieteenala. Näytteen solupopulaatioiden tunnistaminen perustuu nestevirrassa liikkuvien solujen ja virtaussytometrin valonlähteen vuorovaikutuksen mittaamiseen. Useiden erilaisten kaupallisten fluoresoivien väriaineiden avulla voidaan virtaussytomerillä analysoida mm. solun nukleiinihappojen määrää, jolloin saadaan tietoa missä solusyklin vaiheessa solu on.</p> <p>Solusykli on tapahtuma, jonka aikana solun DNA kahdentuu ja jonka päätteeksi solu jakaantuu kahdeksi tytärsoluksi. Solusykli jakaantuu neljään eri vaiheeseen eli G1-, S-, G2- ja M-vaiheisiin. Solusyklin tutkiminen antaa tietoa solun tilasta ja hyvinvoinnista.</p> <p>Värjäyksissä mitattiin solujen DNA-pitoisuutta, jonka avulla saatiin tietää, missä vaiheessa solusykliä solut olivat. Tieto siitä, kuinka iso osa tutkittavista soluista oli kussakin solusyklin vaiheessa, antoi tietoa solujen jakaantumisen tilasta. Työssä käytettiin PI-värjäystä ja kaupallisia EdU- ja BrdU-värjäystekstejä. Tutkittavina soluina työssä käytettiin HeLa- ja HEK 293 -soluja.</p> <p>Tulosten perusteella PI-värjäys on toimiva tapa solusyklin tutkimiseen. Testatuista kaupallisista värjäysteksteistä BrdU-testi osoittautui luotettavammaksi ja paremmin toimivaksi kuin EdU-testi, kun haluttiin tutkia solusykliä ja solujen proliferaatiota yhtä aikaa.</p>	
Avainsanat	virtaussytometria, solusykli, solujen proliferaatio, PI, EdU, BrdU

Author(s) Title	Heidi Mäkkylä Validation of Cell Proliferation Methods Using Flow Cytometry
Number of Pages Date	39 pages + 3 appendices 17 May 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Nina Peitsaro, Docent Titta Pirkola, Lecturer
<p>The aim of this thesis was to test cell proliferation and cell cycle dyes and compare their performance using a flow cytometer.</p> <p>In flow cytometry the attributes of single cells are being researched. The detection of the cell populations of the sample is based on measuring the interactions between the cells moving in a liquid flow and the light source of the flow cytometer. Several commercial fluorescent dyes are available which can be used to analyze i.a. the amount of nucleic acids in the cells. The nucleic acid concentration relates to the phase of cell cycle the cell is currently in.</p> <p>Cell cycle is the series of events during which the DNA of the cell doubles and finally the cell divides into two daughter cells. The cell cycle can be divided into four phases called G1, S, G2 and M. Research of the cell cycle gives information of the state and health of the cell.</p> <p>The DNA concentration was measured by dyeing the nucleic acids and the results gave information of the phase of the cell cycle the cell was in during the process. The knowledge of how many of the cells were in each phase of the cell cycle provided information of the state of the cell proliferation. PI dyeing and commercial EdU and BrdU kits were used to measure the DNA concentration. HeLa and HEK 293 cells were used as the cell samples.</p> <p>According to the results PI dyeing is a functional method to analyze cell cycle. The commercial BrdU kit proved to be more reliable than the EdU kit when both cell cycle and cell proliferation were studied at the same time.</p>	
Keywords	flow cytometry, cell cycle, cell proliferation, PI, EdU, BrdU

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Insinööriyön taustaa	1
3	Virtaussytometria	2
3.1	Virtaussytometrian historiaa	3
3.2	Virtaussytometrian käyttökohteet	4
3.3	Virtaussytometrin perusosat	4
3.3.1	Nestejärjestelmä	5
3.3.2	Optinen järjestelmä	6
3.3.3	Elektroniikka ja informaation käsittely	8
3.4	Solujen lajittelu	9
4	Solusykli	11
4.1	G1-vaihe	12
4.2	S-vaihe	12
4.3	G2-vaihe	14
4.4	M-vaihe	14
4.5	G0-vaihe	15
5	Värjäykset	15
5.1	PI-värjäys	16
5.2	Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit	16
5.3	BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit	17
6	Työssä käytetyt solut	17
6.1	HeLa-solut	17
6.2	HEK 293 -solut	18
7	Materiaalit ja laitteisto	19
7.1	Materiaalit	19
7.2	Laitteisto	19
8	Insinööriyön suoritus	20
8.1	Solujen kasvatusta ja hoitaminen	20

8.2	Värjäykset	20
8.3	HEK 293 -solujen lajittelu	21
9	Tulokset ja tulosten tarkastelu	23
9.1	HeLa-solujen värjäysten tulokset	23
9.1.1	PI-värjäykset	23
9.1.2	Click-iT [®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäykset	25
9.1.3	DB Pharmingen [™] BrdU Flow Kit -värjäykset	28
9.2	HEK 293 -solujen värjäysten tulokset	30
9.2.1	PI-värjäykset	30
9.2.2	Click-iT [®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäykset	31
9.2.3	DB Pharmingen [™] BrdU Flow Kit -värjäykset	33
10	Johtopäätökset	34
	Lähteet	36

Liitteet

Liite 1. PI-värjysprotokolla

Liite 2. Invitrogen[™] Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -protokolla

Liite 3. BD Pharmingen[™] BrdU Flow Kit -protokolla

Lyhenteet

7-AAD	7-aminoaktinomysiini D
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
APC	Allophycocyanin
BD	Becton, Dickinson and Company
BrdU	Bromideoksiuridiini
BSA	Bovine serum albumin
Cdc6	Cell division cycle 6
Cdk	Cyclin-dependent kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dsRNA	Double-stranded RNA
EdU	5-etyynyli-2'-deoksiuridiini
G0	Solusyklin "ulkopuolinen" tila
G1	Solusyklin vaihe
G2	Solusyklin vaihe
GFP	Green fluorescent protein
HeLa	Henrietta Lacksin solu
HEK	Human embryonic kidney
Ki-67	Vasta-aine
M-Cdk	Mitotic cyclin-dependent kinase
Nonidet P-40	Octylphenoxypolyethoxyethanol
ORC	Origin recognition complex

PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium jodidi
RNA	Ribonukleiinihappo
Pre-RC	Pre-replication complex
S	Solusyklin vaihe
S-Cdk	S-phase Cdk

1 Johdanto

Tämä insinööriö on tehty Biomedicum Helsingin virtausytometriän palveluyksikössä 21.1.2013 ja 28.03.2013 välisenä aikana. Insinööriöön aiheena oli testata solusyklin ja solujen proliferaation eli lisääntymisen tarkasteluun tarkoitettuja värjäystapoja ja kaupallisia testejä, ja verrata niiden toimivuutta toisiinsa nähden.

Biomedicum Helsinki on Helsingin Meilahdessa sijaitseva tutkimus- ja opetuskeskus, jossa työskentelee noin 2300 tutkijaa, tutkijankoulutettavaa ja tutkimusta ja opetusta avustavaa henkilöä. (Biomedicum 2013) Virtausytometriän palveluyksikkö FACS Core Facility tarjoaa analysointi ja solujen lajittelupalveluja sekä koulutusta virtausytometri- en käyttöön Biomedicum Helsinki 1:n tiloissa. Virtausytometriän palveluyksikössä on sekä analyysejä että solujen lajittelua suorittava virtausytometri BD FACSAria II. (FACS Core Facility 2012)

Testattavina värjäystapoina olivat PI- (propidium jodidi), EdU- (5-etyynyli-2'- deoksiuridiini) ja BrdU-värjäykset (bromideoksiuridiini). EdU- ja BrdU-värjäyksissä käytettiin kaupallisia testejä, joista EdU-testi oli melko uusi tuote markkinoilla ja jota tämän vuoksi haluttiin testata ja verrata kauemmin markkinoilla olleeseen BrdU-testiin.

Työssä käytettiin HeLa- ja HEK 293 -soluja ja testatut kaupalliset värjäyestetit olivat Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit ja BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit. Värjäykset suoritettiin aloittaen HeLa-soluista. Ensimmäisenä suoritettiin PI-värjäyksiä, seuraavaksi EdU-värjäykset ja viimeisenä BrdU-värjäykset. Kun HeLa-soluille oli suoritettu tarpeellinen määrä värjäyksiä, suoritettiin värjäykset HEK 293 -soluille.

Näytteiden analysoinnit suoritettiin BD Accuri C6 -sytometrillä ja saatu informaatio käsiteltiin tuloksiksi CFlow® Sampler -ohjelmalla. HEK 293 -solujen lajitteluun ennen värjäyksiä käytettiin BD FACSAria II -sytometriä.

2 Insinööriöön taustaa

Solujen proliferaation eli lisääntymisen mittaaminen on perinteinen tapa saada tietoa solujen hyvinvoinnista (Invitrogen 2011: 1). Proliferaation mittaamiseen käytettyjä tutkimusmenetelmiä ovat proliferaatioon liittyvien antigeenien havainnointi immunohistokemiallisesti, DNA:n synteessin määrittäminen käyttämällä apuna 3H-tymidiiniä, solun sisässä tapahtuvien pelkistysreaktioiden määrittäminen ja solusisäisen ATP-konsentraation (adenosiinitrifosfaatti) mittaaminen. (Methods 2012)

Proliferaatiota voidaan tutkia tarkastelemalla antigeenejä, joita esiintyy jakaantuvissa soluissa käyttämällä antigeenin tunnistavia monoklonaalisia vasta-aineita. Esimerkiksi ihmissoluissa Ki-67-niminen vasta-aine tunnistaa samannimisen lähes yksinomaan tumassa esiintyvän proteiinin, jota esiintyy vain solusyklin S-, G2- ja M-vaiheissa. (Cell Proliferation Assays 2013; Verheijen ym. 1986: 531)

Jakaantuvat solut voidaan leimata käyttäen apuna radioaktiivista 3H-tymidiiniä. 3H-tymidiini yhdistyy solujen jakaantuessa kopioituun DNA:han, jonka jälkeen 3H-tymidiinin aiheuttaman radioaktiivisen säteilyn määrä voidaan mitata tuikeilmaisimen avulla. (Cell Proliferation Assays 2013; Methods 2012.)

Solujen aineenvaihduntaa tutkimalla voidaan myös saada tietoa solujen tilasta ja jakaantumisesta. Esimerkiksi tetrazoliumsuolat ovat yhdisteitä, jotka pelkistyvät soluissa, joilla on aktiivinen aineenvaihdunta. Solujen laktaattientsyymi aikaansaa reaktion, jonka seurauksena syntyy väriaineita, jotka muuttavat kasvatusliuoksen väriä. Värimuutosta voidaan mitata spektrofotometrillä. Mitä voimakkaampi värimuutos tapahtuu, sitä aktiivisemmin solut jakaantuvat. (Cell Proliferation Assays 2013; Methods 2012)

Kuolevat ja kuolleet solut sisältävä vain vähän tai eivät ollenkaan ATP:tä. Tämän vuoksi ATP-konsentraation mittaaminen solulysoatista kertoo solujen proliferaation tilasta. ATP:n havaitseminen perustuu bioluminenssireaktioon, joka aikaansaadaan käyttämällä lusiferaasientsyymiä ja sen substraattia lusiferiiniä. ATP:n läsnä ollessa lusiferaasi tuottaa valoa, joka voidaan mitata luminometrin avulla. (Cell Proliferation Assays 2013)

3 Virtausytometria

Sytometria on yksittäisten partikkelien kemiallisia ja fyysisiä ominaisuuksia tutkiva tieteenala. Virtausytometriassa tutkittavat solut kulkevat mittausinstrumentin eli sytometrin (kuva 1) läpi nestevirrassa. Virtausytometrian tärkeimpiä ominaisuuksia on näytepartikkeleiden ominaisuuksien mittaaminen solu kerrallaan eikä vain näytteen ominaisuuksien keskiarvojen mittaaminen. Homogeenisten tai heterogeenisten solupopulaatioiden tunnistaminen perustuu virrassa liikkuvien solujen ja valonlähteen vuorovaikutuksesta syntyvien elektronisten ja optisten parametrien mittaamiseen. Osassa sytometreistä on mahdollisuus tutkittavien solujen lajitteluun valittujen kriteerien mukaan. (Mandy ym. 1995: 304; Ormerod 1990: 1; Shapiro 2003: 1)



Kuva 1. Virtausytometrillä tutkitaan yksittäisiä näytepartikkeleita. Kuvassa BD Accuri C6 -sytometri (BD Accuri C6 2013).

3.1 Virtausytometrian historiaa

Virtausytometrian peruseräaatteet juontavat juurensa laminaarivirtaukseen, joka määriteltiin 1800-luvun loppupuolella. Erinäisiä ideoita virtausytometriasta oli jo 1900-luvun alkupuolella, mutta vasta 1900-luvun puolivälissä suunniteltiin instrumentti, joka pystyi identifioimaan yksittäisiä soluja mikroskoopin ja valotunnistimen avulla. Ei kuitenkaan ole varmaa, jäikö instrumentti vain suunnitelman tasolle. Ajan tietokoneiden ja kuvantamisteknologian tasot rajoittivat suurien tietomäärien analysoimista, minkä vuoksi kehityksessä suuntauduttiin yhä enemmän kohti yksittäisten solujen analysoimista. (Robinson 2004: 630)

1960-luvulla IBM:n Watson's Labs:ssa työskentelevä Louis Kamensky aloitti varsinaisten yksittäisiä soluja analysoivien instrumenttien suunnittelun ja rakentamisen. Hän oli kiinnostunut syöpäsolujen tunnistamisesta optisin keinoin, mutta tietokoneiden laskentatehon puute esti suurien tietomäärien käsittelyn, minkä vuoksi Kamensky keskittyi yksittäisiin soluihin. Hän kehitti sytometrin, joka mittasi yksittäisten solujen valoabsorptiota ja sirontaa. Hieman myöhemmin hän lisäsi instrumenttiinsa myös mahdollisuuden lajitella soluja nestevirtojen avulla. (Robinson 2004: 630-631)

1970-luvun loppupuolella kaupalliset monoklonaaliset vasta-aineet, luotettavat laserit ja halvat ja tehokkaammat tietokoneet tekivät kaupallisten sytometriä kehityksestä kannattavaa. Herzenbergin ryhmä Stanfordin yliopistossa kehittivät ensimmäisen soluja lajittelevan sytometrin, jolla oli kaupallista myyntiarvoa. Samaan aikaan alkoivat immunologitit kiinnostua uudesta teknologiasta. (Mandy ym. 1995: 303-304)

Virtausytometrien toimintaperiaate on pysynyt samana laitteiden keksimisestä lähtien, mutta analyysimahdollisuudet ovat monipuolistuneet uusien värjäystapojen ja herkempien antureiden myötä. Analyysien lisäksi virtausytometrin avulla voidaan lajitella ja kerätä tarkasti partikkelit jatkotutkimuksia varten. (Radbruch 1999: 3-4)

3.2 Virtausytometrian käyttökohteet

Virtausytometrian ja solujen lajittelun sovellutuksia on lukuisia. Kaupallisia fluoresenssikoettimia löytyy useita, joiden avulla voidaan analysoida useita solujen ominaisuuksia kuten nukleiinihappojen määrää, entsyymiaktiivisuutta, kalvopotentiaalia ja pH:ta. Fluoresoivien värien konjugoiminen ligandeihin ja polyklonaalisiin ja monoklonaalisiin vasta-aineisiin on mahdollistanut solujen pinnalla esiintyvien reseptoreiden määrän ja jakaantumisen tutkimisen. Monia fluoresoivia värejä ja reagensseja voidaan käyttää yhdessä, jolloin on mahdollista analysoida useaa solun ominaisuutta samanaikaisesti. (Radbruch 1999: 1)

Yksi suurimmista virtausytometrian sovellutuksista on kliinisten tieteiden alalla, jossa käytetään solujen reseptoreihin sitoutuvia vasta-aineita, joihin on konjugoitu fluorokromi. Lähes kaikkia ihmisen soluja voidaan analysoida virtausytometrian avulla. Solubiologiassa virtausytometrian avulla voidaan tunnistaa soluja esimerkiksi niiden koon, rakenteen tai pintareseptoreiden avulla. Mikrobiologian alalla virtausytometriä käytetään mikrobien kasvun, lisääntymisen ja aineenvaihdunnan tarkkailuun. Vaikka tärkeimmät virtausytometrian sovellutuskohteet liittyvät ihmis- ja eläinsolujen tutkimiseen, voidaan myös kasvisoluja analysoida virtausytometrian avulla. Esimerkiksi geeniekspressiota voidaan tutkia virtausytometrisesti geenimuunnelluista kasveista. (Robinson 2004: 636-638)

Virtausytometrialla analysoidaan usein yksittäisiä soluja, mutta myös soluelinten ja pienten kudokset analysointi on mahdollista. Näytettä valmistettaessa on tärkeää saada solut tai muut näytepartikkelit erilleen toisistaan. Näytteen tulisi sisältää mahdollisimman vähän tarpeettomia partikkeleita, kuolleita soluja tai toisiinsa tarttuneiden solujen muodostamia rykelmiä. (Ormerod 1990: 1, 35)

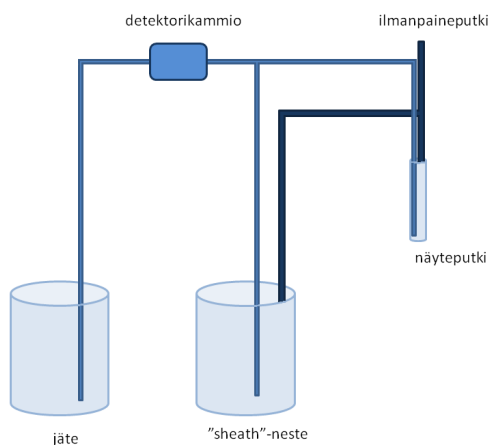
3.3 Virtausytometrin perusosat

Sytometri voidaan jakaa järjestelmien toiminnan mukaan kolmeen järjestelmäosaan: nestejärjestelmään, joka kuljettaa näytettä laitteen sisällä, optiseen järjestelmään, jon-

ka avulla näytteen ominaisuudet identifioidaan; ja elektroniseen järjestelmään, joka muokkaa näytteestä saadut tiedot tietokoneen ymmärtämään muotoon. (Owens & Loken 1995: 33)

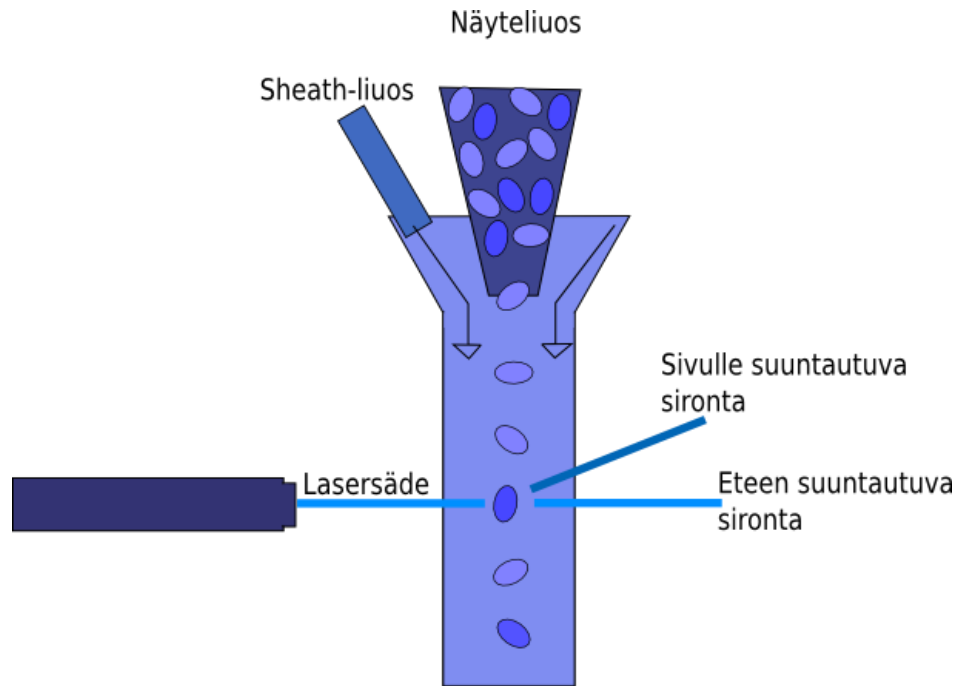
3.3.1 Nestejärjestelmä

Tyypillisesti nestejärjestelmä koostuu kahdesta nestelinjasta, joista toisessa kulkee puhdasta "sheath"-liuosta (suoja-, suojusneste), joka on yleensä puskuroitua suolaliuosta ja nestelinjassa kulkee näyteliuos. Sheath-liuos virtaa jatkuvana virtana, ja sen nopeutta voidaan kontrolloida ilmanpaineen avulla. Näytevirran nopeutta kontrolloidaan toisen ilmanpainesäätimen avulla. Nestevirtauksen tulee olla laminaarinen, jotta sytometrillä voidaan tehdä tarkkoja analyysejä. Laminaarivirtauksen ylläpitämiseen tarvitaan tarkasti suunniteltu nestejärjestelmä. (Ormerod 1990: 4; Robinson 2004: 631) Yksinkertaistettu kaavio nestejärjestelmästä on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Nestejärjestelmän osat yksinkertaistettuna.

Nestejärjestelmän tarkoituksena on kuljettaa näytepartikkelit näyteputkesta valodetektorille yksitellen tasaisin väliajoin. Tämä tapahtuu ajamalla näyteliuosta ja sheath-liuosta eri paineilla, jolloin tapahtuu hydrodynaaminen fokusointi. Näyteliuos injektoidaan sheath-virran keskelle, joten hydrodynaaminen fokusointi tiivistää näytevirran pieneksi ja pakottaa näin näytepartikkelit ohittamaan yksitellen ilmaisinkammion lasersäteeseen (kuva 3). (Bakke 2001: 209; Owens & Loken 1995: 35-36; Radbruch 1999:4-5)



Kuva 3. Näyteliuos injektoidaan sheath-virran keskelle.

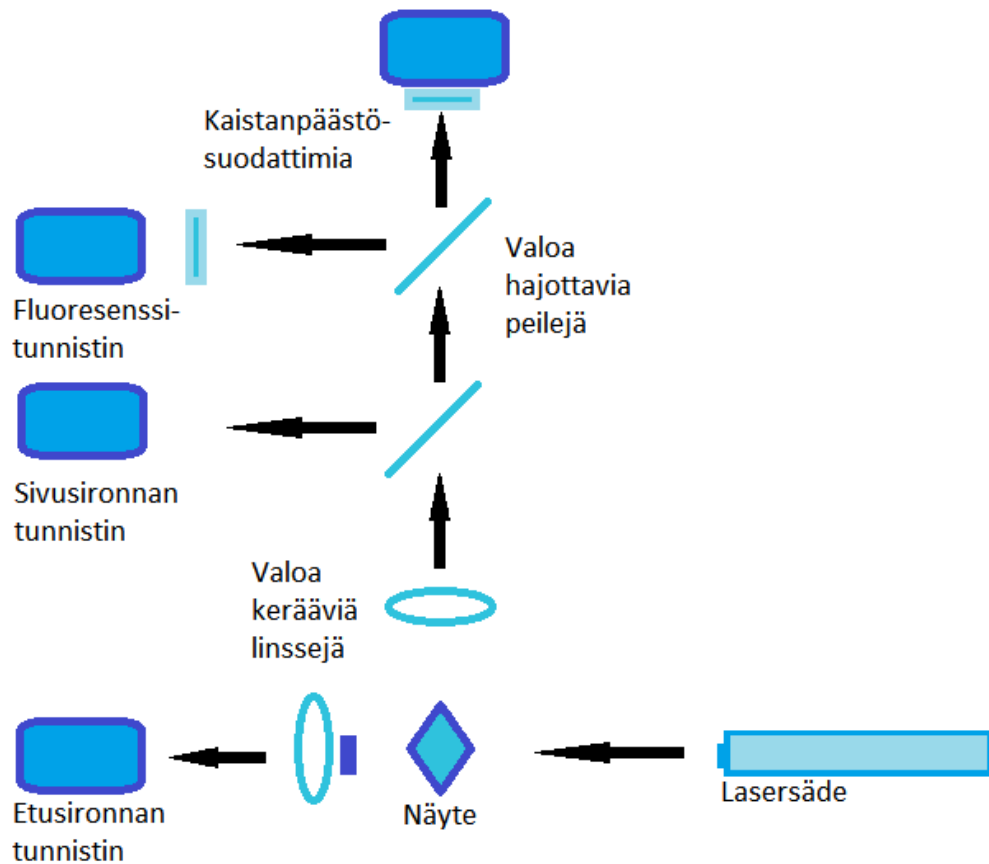
Näyteliuksen paine on aina korkeampi kuin sheath-liuksen. Näyteliuksen nopeutta säädellään muuntamalla näyteliuksen painetta suhteessa sheath-liuksen paineeseen. Näyteliuksen paineen nostaminen nopeuttaa näytevirtaa kaventamalla näytevirran leveyttä sheath-virran keskellä. Leveässä virrassa näytepartikkelit voivat liikkua ja täten ohittaa lasersäteen vähemmän optimaalisesti, joten on suositeltavaa käyttää hitaampaa näyteliuksen nopeutta paremman erotelukykyyn takaamiseksi. (BD Biosciences 2000: 10-11)

3.3.2 Optinen järjestelmä

Optinen järjestelmä koostuu valoa lähettävästä optiikasta eli valonlähteestä ja valoa keräävästä optiikasta eli eteenpäin suuntautuvan sironnan keräävästä optiikasta sekä fluoresenssin ja sivulle suuntautuvan sironnan keräävästä optiikasta. (BD Biosciences 2000: 19; Radbruch 1999: 6)

Valonlähteenä voi olla perinteinen lamppu (esimerkiksi elohopeakaarilamppu), mutta tavallisimmin valonlähteenä on laser. Peilien ja heijastavien prismojen avulla lasersäde ohjataan kohtisuorasti nestevirtaan. Järjestelmään voi kuulua yksi tai useampi lasersäde, jotka solu läpäisee pienen aikaviiveen välein. Mikäli käytetään useaa lasersädettä yhtä aikaa, on järjestelmän tallennettava tarkasti samasta solusta saadut tiedot jokaiselta laseriltä erikseen ottaen huomioon, että lasersäteiden välimatkan aiheuttaman

aikaviiveen vuoksi ensimmäisen säteen läpi saattaa kulkea soluja ennen kuin ensimmäinen solu läpäisee seuraavan lasersäteen. (Radbruch 1999: 6-7; Robinson 2004: 634)



Kuva 4. Lasersädettä ohjataan linssien ja peilien avulla tunnistimille.

Eteenpäin suuntautuvan sironnan keräämistä varten vastapäätä valonlähdettä sijaitsee fotodiodi, joka kerää sironnan, jonka suunta poikkeaa 2-20° lasersäteen suunnasta (kuva 4). Eteenpäin suuntautuva sironta antaa tietoa näytepartikkeleiden koosta, mutta koska näytepartikkelit eivät välttämättä ole säännöllisen muotoisia, saadaan tulokseksi partikkelin suhteellinen koko. (Owens & Loken 1995: 34-35; Radbruch 1999: 7)

Sivulle suuntautuvaa sironnata ja fluoresenssia havainnoidaan valomonistinputkilla, jotka ovat suorassa kulmassa lasersäteeseen nähden (kuva 4). Fluoresenssisignaalit ovat usein heikkoja, joten tietyille fluoresenssiaallonpituudella spesifistä valomonistinputkea vahvistetaan asettamalla sen eteen suodatin, jonka läpäisee valo vain tietyillä aallonpituuksilla. Tällaista suodatinta kutsutaan kaistanpäästösuodattimeksi. Sivulle suuntautuvan sironnan avulla saadaan tietoa näytteen granulariteetistä ja näytepartikkelin sisäisestä rakenteesta. (BD Biosciences 2000: 22; Owens & Loken 1995: 35; Radbruch 1999: 7)

Muita virtausytometriassa käytettyjä suodattimia ovat suodattimet, jotka päästävät lävitseen jotain tiettyä aallonpituutta lyhyemmät tai pidemmät aallonpituudet. Suodattimien lisäksi valon ohjaamisen tarvitaan valoa hajottavia peilejä, jotka heijastavat eri aallonpituuksia eri suuntiin. (BD Biosciences 2000: 22)

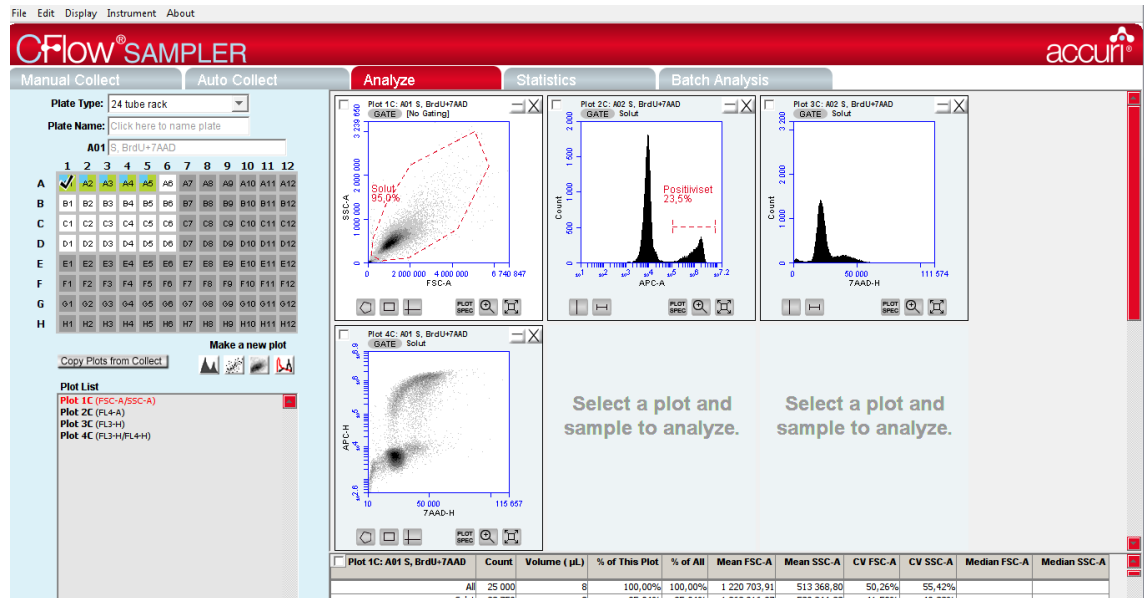
Analyysejä suoritettaessa negatiivisten ja positiivisten signaalin voimakkuudet ovat riippuvaisia vasta-aineeseen konjugoidusta fluorokromista. Mikäli tutkitaan voimakkaasti ekspressoitua antigeeniä, voidaan yleensä valita lähes mikä tahansa fluorokromi. Mikäli antigeenin esiintyminen on vähäisempää, on valittava kirkkaampi fluorokromi, jotta voidaan erottaa positiivisten solujen antama signaali negatiivisesta. (Abcam 2012) Mikäli käytetään useampaa fluorokromia yhtä aikaa, on niitä valittaessa otettava huomioon fluorokromien spektrien mahdollinen osittainen päällekkäisyys eli ylivuoto. Ylivuoto vaikuttaa analyysistä saadun tiedon tarkkuuteen ja laatuun. Ylivuotoa voi kuitenkin kompensoida mittaamalla käytettävien fluorokromien signaalien keskiarvot, joista käytettävä ohjelma laskee tarvittavat kompensatioprosentit. (BD Biosciences 2009: 2)

3.3.3 Elektroniikka ja informaation käsittely

Aina näytepartikkelin kulkiessa lasersäteen läpi syntyy signaaleja, jotka fotodiodit ja valomonistinputket muuntavat elektronisiksi signaaleiksi. Fotodiodi ei ole yhtä herkkä valosignaaleille kuin valomonistinputket, joten fotodiodilla käytetään havaitsemaan voimakas eteenpäin suuntautuva sironna ja herkemmillä valomonistinputkilla havaitaan heikommat sivulle suuntautuvan sironnan ja fluoresenssin signaalit. Kun valoilmaisimeen (fotodiodi tai valomonistinputki) osuu valosignaali eli fotoni, valoilmaisin muuntaa fotonin signaalin elektroneiksi. Elektronien määrä riippuu valosignaalin voimakkuudesta. Elektronit aikaansaavat sähkövirran, joka kulkee vahvistimen läpi ja joka muunnetaan jännitepiikiksi. (BD Biosciences 2000: 24)

Syntynyt jännite kulkee digitaalimuuntimeen, joka muuntaa sen analogisesta digitaalseksi, jolloin jännitepiikkiä voidaan tarkastella tietokoneen näytöltä. Piikin korkeimmasta kohdasta näkee partikkelin sironnan tai fluoresenssin voimakkuuden. Piikin muoto on riippuvainen partikkelin koosta, nopeudesta, jolla se ohitti lasersäteen, lasersäteen leveydestä ja fluoresenssia mitattaessa fluoresoivien partikkeleiden jakautumisesta näytepartikkelissa. (BD Biosciences 2000: 24-25; Ormerod 1990: 15)

Tallennetusta informaatiosta voidaan tietokoneohjelmien avulla tehdä analyyskejä (kuva 5). Usein muodostetaan erilaisia kuvaajia, joiden avulla voidaan tarkastella partikkelipopulaatioiden jakaantumista, kokoa ja niiden lähettämien signaalien voimakkuuksia. Esimerkkejä kuvaajista ovat erilaiset histogrammit ja pistekuvaajat. (BD Biosciences. 2000: 27-28; Owens & Loken 1995: 40-41)



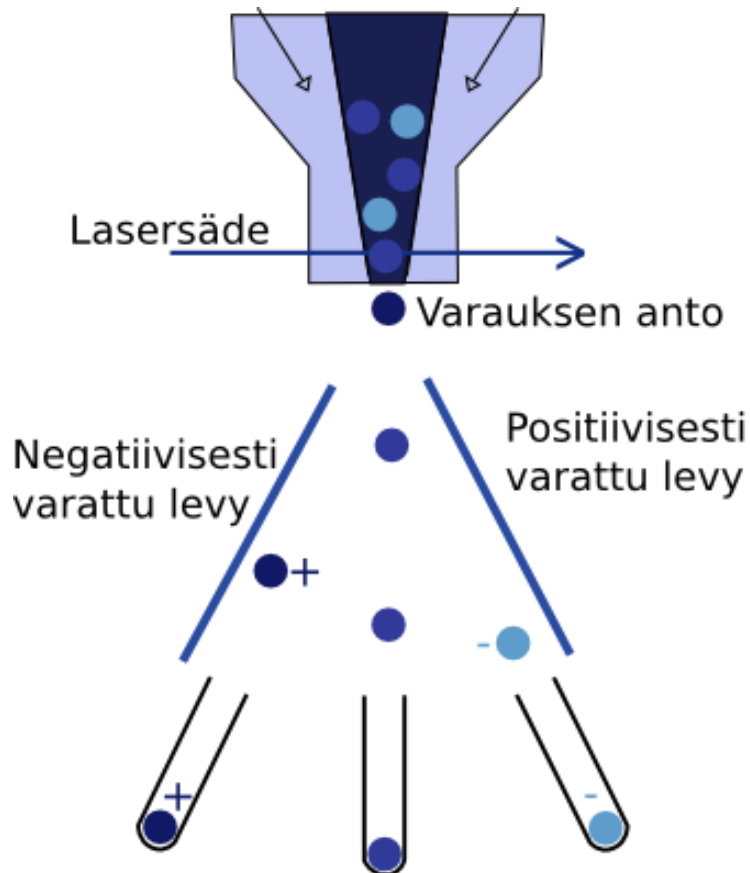
Kuva 5. CFlow[®] Sampler -ohjelmalla voi tuloksia analysoida usealla eri tavalla

3.4 Solujen lajittelu

Ensimmäisen lajitteluun kykenevän kaupallisen sytometrin kehittäjä Herzenbergin ryhmä. Näissä ensimmäisissä lajitteluissa sytometreissä lajittelu tapahtui elektrostaattisesti, ja tätä tekniikkaa käytetään vieläkin useimmissa sytometreissä. Tekniikka perustuu halutun solun ja sen sijainnin tunnistamiseen näytevirrassa, jonka jälkeen solun sisältävä näytepisara voidaan sähkövarauksen avulla erottaa muusta näytevirrasta ja kerätä talteen. (Robinson 2004: 635)

Jotta soluja voitaisiin erottaa elektrostaattisesti, on soluvirta saatava ilmassa yksitellen kulkeviksi pisaroista koostuvaksi virraksi. Tämä tapahtuu useimmiten ajamalla näyte suuttimen läpi, jonka yhteyteen on liitetty pietsosähköinen kristalli. Kristalli värähtelee halutulla taajuudella ja rikkoo solut sisältävän nestevirran pisaroiksi. Säätämällä värähtelyä voidaan muokata syntyvien pisaroiden kokoa ja etäisyyttä näytesoluille sopivaksi. Kun pisarat irtoavat suuttimesta, ne kulkevat yhden tai useamman lasersäteiden läpi, jolloin voidaan laskea solun irtoamisen ja lasersäteiden läpäisemisen välinen aikaviive.

Viiveen avulla voidaan laskea tarkka hetki, koska pisara irtoaa virrasta. (Macey 2007: 259; Ormerod 1990: 49)

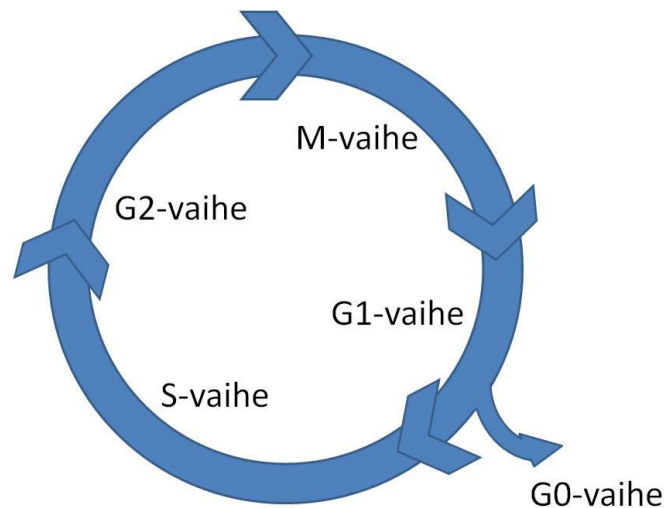


Kuva 6. Solut lajitellaan antamalla niille sähköinen varaus.

Kun viive on määritetty, voidaan solujen lajittelu aloittaa. Yksittäiset pisarat voidaan varata sähköisesti niiden irrotessa nestevirrasta (kuva 6). Pisaralle voidaan antaa joko positiivinen tai negatiivinen varaus, tai ne voidaan jättää varaamatta. Pisaravirta kulkee kahden levyn välitse, jotka muodostava staattisen sähkökentän. Levyjen jännite vaihtelee 2000 ja 6000 voltin välillä sytometristä ja lajiteltavien solupopulaatioiden määrästä riippuen. Levyt vetävät vastakkaisesta varautuneita pisaroita puoleensa, jolloin varautuneet pisarat irtoavat virrasta muodostaen sivuvirtoja, jotka voidaan kerätä erilleen. Alun perin pystyttiin lajittelemaan kahta populaatiota kerrallaan, yksi sivuvirta pisaravirran molemmin puolin. Nykyään voidaan erotella jopa neljä eri populaatiota yhtä aikaa antamalla eri populaatiolle eri vahvuinen varaus. Tällöin muodostuu kaksi sivuvirtausta molemmin puolin jätteenä menevää pisaravirtaa. (Macey 2007: 261; Ormerod 1990: 49)

4 Solusykli

Solusykli eli solukierto koostuu neljästä eri vaiheesta, G1-, S-, G2- ja M-vaihe (kuva 7), joiden aikana solun DNA kahdentuu ja solu kasvattaa kokoa jakaantuen lopulta kahdeksi tytärsoluksi. Solu voi myös asettua solusyklin ulkopuolelle G0-vaiheeksi kutsuttuun tilaan, jonka aikana se ei jakaannu. (Heino & Vuento 2009: 272)



Kuva 7. Solusyklin vaiheet.

Solusykliä säätelevät sykliiniproteiinit, joita on useita kuten A-, B-, D-, E- ja M-sykliini. Sykliineille ominaista on ilmentyminen tarkasti tietyssä solusyklin vaiheessa, jolloin ne aikaansaavat seuraavaan vaiheeseen siirtymiseen tarvittavat muutokset. Samalla aktivoituvat seuraavassa vaiheessa tarvittavat sykliinit ja niiden oma tuhoutuminen. Sykliinit kiinnittyvät Cdk-proteiineihin (cyclin dependant protein kinase) ja säätelevät solun toimintaa. (Heino & Vuento 2009: 273)

Solunjakautumisen vaiheiden välissä on ns. tarkistuspisteitä, joissa solu voi pysäyttää syklin, mikäli olosuhteet eivät ole jakaantumiselle suotuisat. Näissä kohdissa jakaantumisen jatkumiseen tai päättymiseen vaikuttavat mm. viereisiltä soluilta tulevat signaalit. Ensimmäinen tarkistuspiste sijaitsee G1-vaiheessa. Tässä tarkistuspisteessä tarkistetaan, ovatko olosuhteet otolliset solun jakaantumiselle. Seuraava tarkistuspiste sijaitsee G2-vaiheessa, jolloin solu tarkistaa, onko koko DNA replikoitunut ja ovatko replikaation aikana mahdollisesti syntyneet DNA-vauriot korjattu. Kolmas tarkistuspiste sijaitsee M-vaiheessa, jolloin solu tarkistaa, ovatko kromosomit kiinnittyneet mitosisukulaan ja onko solu valmis erottamaan sisarkromatidit toisistaan. (Alberts ym. 2009: 612-613)

Solusyklin tutkiminen antaa tietoa solun tilasta ja voinnista, ja solusyklin tutkiminen on osoittautunut erityisen tärkeäksi erityisesti syöpäsoluja tutkittaessa. Syöpäsoluissa mutaatiot perimässä kasaantuvat ja vaikuttavat solun jakaantumiseen, minkä vuoksi ne jakaantuvat usein nopeasti ja hallitsemattomasti. (Invitrogen 2011: 1; Malumbres & Barbacid. 2009: 153)

4.1 G1-vaihe

Solujen jakaantumista edistävät kasvutekijät aikaansaavat sykliini D -proteiinin ilmenemisen. Sykliini D -proteiini tarttuu Cdk-proteiiniin, mikä aloittaa solusyklin säätelyyn osallistuvan retinoblastoomaproteiinin fosforyloitumisen. Fosforyloitunut retinoblastoomaproteiini vapauttaa E2F-nimisen transkriptiotekijän, joka aktivoi sykliinien A ja E geenit. ((Alberts ym. 2009: 620))

G1-vaiheessa on solusyklin ensimmäinen tarkistuspiste, jossa solu vastaanottaa signaaleja muilta soluilta ja vahvistaa, että olosuhteet ovat suotuisat solunjakautumisen jatkumiselle. Mikäli ensimmäinen tarkistuspiste läpäistään, jatkaa solu S-vaiheeseen ja useimmiten myös käy läpi koko syklin. Jos olosuhteet eivät ole suotuisat solunjakautumisen jatkumiselle, jakaantuminen pysähtyy ja solu siirtyy G0-vaiheeseen. (Alberts ym. 2009: 612-613, 619)

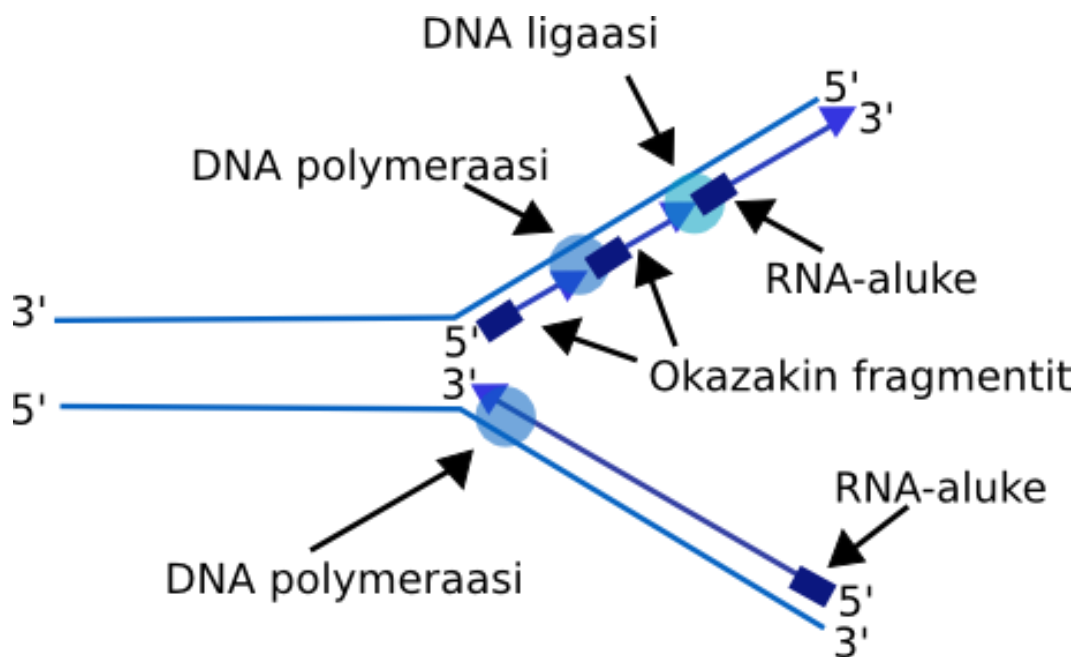
4.2 S-vaihe

DNA:n replikoituminen eli kahdentuminen tapahtuu solusyklin S-vaiheessa (Heino & Vuento 2009: 274). DNA:n kahdentuminen alkaa replikaation aloituskohdasta, joita on useita jokaisessa kromosomissa. Aloituskohdassa on tietynlainen nukleotidijärjestys, johon tarttuvat replikaation aloittamisesta ja päättämisestä vastaavat proteiinit. Useasta proteiinista koostuva ORC-proteiinikompleksi (origin recognition complex) pysyy sitoutuneena replikaation aloituskohtaan koko solusyklin ajan, ja sen tehtävänä on auttaa muita säätelyproteiineja sitoutumaan ennen S-vaiheen alkamista. (Alberts ym. 2009: 620)

Säätelyproteiini Cdc6:n pitoisuus kasvaa G1-vaiheen alussa, ja sen vaikutuksesta muodostuu pre-RC-proteiinikompleksi (pre-replicative complex, kahdentumista edeltävä proteiinikompleksi), jonka jälkeen S-Cdk:n aktivoituminen aloittaa DNA:n kahdentumisen. Replikaation aloittamisen jälkeen S-Cdk:n tehtävänä on estää DNA:n uudelleen kahdentuminen saman solusyklin aikana fosforyloimalla Cdc6-proteiineja, jolloin pre-RC-kompleksi hajoaa eikä replikaatio tapahdu kuin kerran S-vaiheen aikana. Kahdentumisen aikana helikaasit avaavat DNA:n kaksoiskierteen, josta replikaatio etenee mo-

lempiin suuntiin DNA-juosteita pitkin. Syntyvissä DNA-kaksoiskierteissä on yksi vanha ja yksi uusi juoste, minkä vuoksi replikaatiota voidaan kutsua semikonservatiiviseksi. (Alberts ym. 2009: 620; Heino & Vuento 2009: 274)

Replikaatio etenee aloituskohdasta molemmissa juosteissa 5'-3' -suunnassa, jolloin toisen juosteen synteesi on epäjatkuvaa eli toinen juoste rakennetaan osissa, joita kutsutaan Okazakin fragmenteiksi (kuva 8). DNA-polymeraasi rakentaa uuden juosteen käyttäen vanhaa juostetta templaattina. Syntetisoitavaa DNA:ta rakennetaan liittämällä nukleotidejä peräkkäin toisiinsa aloittaen lyhyestä RNA-alukkeesta, joka toimii aloituskohtana replikaatiolle. Liitettävät nukleotidit ovat trifosfaatteina ja DNA:ssa nukleotidit ovat monofosfaatteina. Liittämisen aikana yksi nukleotidin fosfodiesterisidos katkeaa ja samalla muodostuu toinen fosfodiesterisidos edellisen ja liitettävän nukleotidin välille. (DNA:n replikaatio 2013)



Kuva 8. Replikaatio etenee molemmissa juosteissa 5'-3' -suunnassa

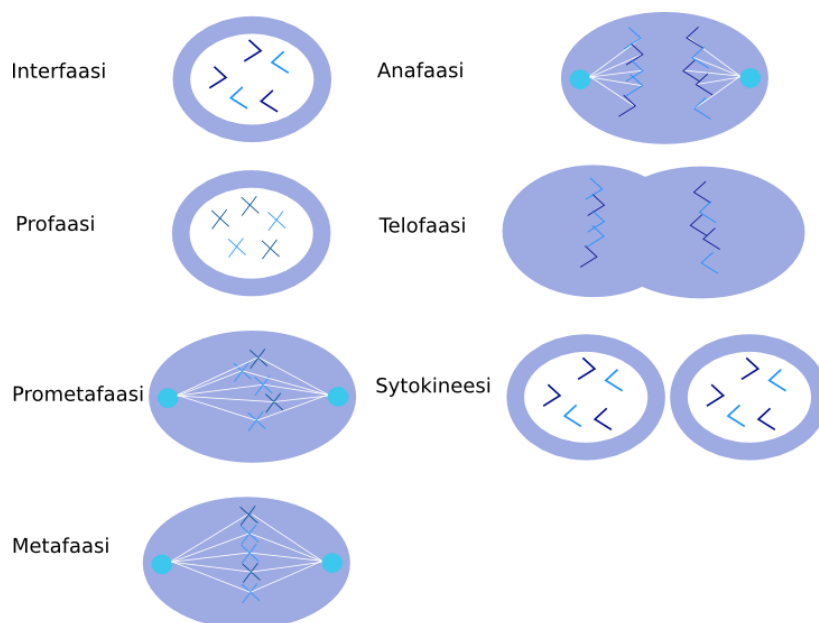
Koska replikaatio onnistuu vain 5'-3' -suuntaan, on toinen juoste syntetisoitava Okazakin fragmentteina. Vanha juoste toimii tällöin templaattina lyhyelle komplementaariselle RNA-alukkeelle, jonka jatkoksi DNA-polymeraasi voi alkaa rakentaa uutta DNA-juostetta. RNA-aluke poistetaan tämän jälkeen ja DNA-polymeraasi rakentaa juostetta aiemmin tehdyn fragmentin kohdalle asti ja irtoaa. DNA-ligaasi liittää fragmentit toisiinsa muodostaen yhtenäisen DNA-juosteen. (Okazakin fragmentit 2013)

4.3 G2-vaihe

G2-vaiheen aikana solu tuottaa mitoosissa tarvittavia proteiineja ja valmistautuu jakaantumiseen. G2-vaiheessa olevassa tarkistuspisteessä varmistetaan, että kahdentunut DNA ei ole vioittunut, mahdollinen viallinen DNA on korjattu ja replikaatio on päätynyt. Mikäli tarkistuspiste läpäistään, voi solu siirtyä solusyklin M-vaiheeseen. Jos vioittuneen DNA:n korjaaminen ei onnistu, solu ei läpäise tarkistuspistettä. Tällöin solu aloittaa ohjatun solukuoleman eli apoptoosin. Joissain tapauksissa solu voi kuitenkin jatkaa jakaantumistaan vioittuneesta DNA:sta huolimatta. Tällainen hallitsematon jakaantuminen johtaa usein mutaatioiden kasaantumiseen DNA:ssa, jolloin solut saattavat muuttua syöpäsoluiksi. (Alberts ym. 2009: 612, 621; Heino & Vuento 2009: 272)

4.4 M-vaihe

M-vaihe eli mitoosi voidaan jakaa kuuteen eri vaiheeseen: profaasi, prometafaasi, metafaasi, anafaasi, telofaasi ja sytokineesi (kuva 9). Näiden vaiheiden aikana solu järjestää uudelleen lähes kaikki soluelimensä ja jakaa ne tasaisesti syntyville tytär soluille. Edellisten vaiheiden aikana soluun kerääntynyt M-sykliini aktivoi M-Cdk-proteiinikompleksin, joka aikaansaa lähes kaikki soluelinten jakaantumiseen ja järjestelyyn liittyvät reaktiot. (Alberts ym. 2009: 622; Heino & Vuento 2009: 275)



Kuva 9. M-vaihe jakaantuu useaan eri vaiheeseen.

Mitoosi alkaa profaasilla, jonka aikana kromosomit tiivistyvät DNA-rihman kiertyessä moninkertaisesti itsensä ympärille. Pakkautumista avustavat histoniproteiinit, jotka fosforyloitessaan säätelevät kromosomien tiivistymistä. Sentriolit eli mikrotubulusten or-

ganisaatiokeskukset siirtyvät tumen vastakkaisille puolille profaasin aikana. Profaasivaihe päättyy tumakotelon kadotessa. (Alberts ym. 2009: 628; Heino & Vuento 2009: 275-276)

Seuraavaa vaihetta kutsutaan prometafaasiksi. Sen aikana muodostuu mitosisukkula mikrotubuluksista, joka kiinnittää kromosomit itseensä. Kohesiini-proteiinit pitävät sisarkromatidit toisissaan kiinni ja sentromeerin kohdalle syntyy mikrotubulusten muodostama kinetokori-proteiinikompleksi, johon mitosisukkula kiinnittyy. (Alberts ym. 2009: 628-629; Heino & Vuento 2009: 276)

Solu siirtyy metafaasivaiheeseen, kun mitosisukkula on vetänyt kromosomit jakotasoon. Tässä vaiheessa solu käy läpi kolmannen tarkistuspisteen, jonka aikana tarkistetaan, ovatko kaikki kromosomit kiinnittyneet mitosisukkulaan. Solu ei voi siirtyä anafaasivaiheeseen, ennen kuin kaikki kromosomit ovat kiinnittyneet. Anafaasivaiheessa sisarkromosomit irtoavat toisistaan sentromeerin kohdalta ja mitosisukkula vetää ne vastakkaisille puolille solua. Mitoosi päättyy telofaasivaiheeseen, jonka aikana tytärsoluihin syntyy tytärtumat tumakoteloiden muodostuessa ja solu käy läpi sytokineesin eli tytärsolut erkanevat toisistaan. (Alberts ym. 2009: 630-631, 633; Heino & Vuento 2009: 276)

4.5 G0-vaihe

Jakaantumisen jälkeen solun on mahdollista asettua ikään kuin solusyklin ulkopuoliseen tilaan, jolloin se ei jakaannu. Tätä tilaa kutsutaan G0-vaiheeksi. G0-vaiheessa solut odottavat, että ulkoiset olosuhteet tulevat suotuisiksi solunjakaantumiselle. (Alberts ym. 2009: 612; Heino & Vuento 2009: 272)

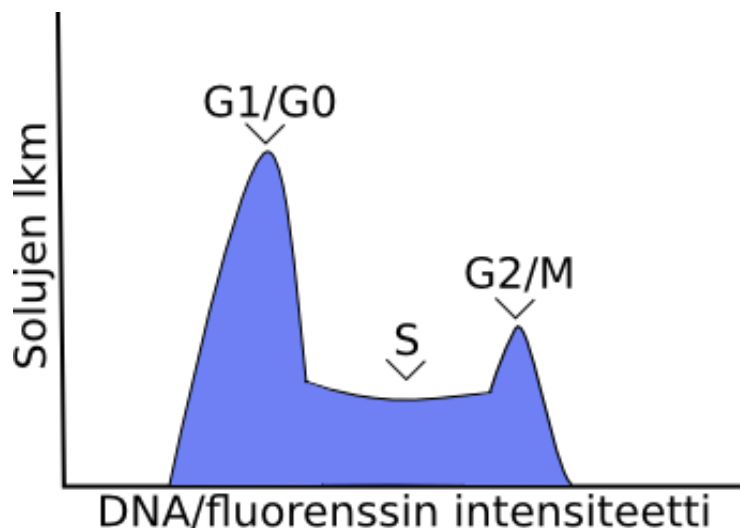
5 Värjäykset

DNA-pitoisuus on solun eniten mitattu ominaisuus. DNA-pitoisuuden avulla voidaan päätellä solun kromosomien määrä, tarkastella, missä vaiheessa solusykliä solu on ja saada tietoa solun mahdollisesta apoptoottisuudesta. Päätös siitä, jatkaako solu solusykliä, tapahtuu G1-vaiheessa ennen DNA-synteesin ja aloittamista, joten tässä vaiheessa tapahtuvan DNA-synteesin analysoiminen antaa tietoa tutkittavien solujen kasvun säätelyn tilasta. Tieto siitä, paljonko tutkittavista soluista on kussakin solusyklin vaiheessa, antaa tietoa solun jakaantumisen säätelystä. Näistä tiedoista on hyötyä erityisesti esimerkiksi syöpäsoluja tutkittaessa. (Cecchini ym. 2012: 1; Darzynkiewicz ym. 2010: 137)

5.1 PI-värijäys

PI (propidium jodidi) on laajasti käytetty DNA:ta värjäävä fluoresoiva molekyyli. PI kiinnittyy DNA:n kaksoiskierteeseen ja pystyy myös tarttumaan kaksijuosteiseen RNA:han (dsRNA), minkä vuoksi PI-värijäystä suoritettaessa tulisi RNA hajottaa RNAasi-entsyymillä. PI ei pysty läpäisemään elävien solujen solukalvoa, vaan ennen värijäystä solut tulisi kiinnittää. Parhaimman tuloksen saa 70-prosenttisella etanolilla kiinnitetyillä soluilla. (Techniques for Immune Function Analysis. 2009: 172) BD Biosciencesin ohjeisiin perustuva ja insinööriyössä käytetty PI-värijäysprotokolla löytyy liitteestä 1.

Tulokset voidaan lukea histogrammista, josta näkee G0/G1-, S- ja G2/M-vaiheessa olevat solut omia alueinaan (kuva 10). Solut, jotka ovat G0/G1-vaiheessa, sisältävät tietyn määrän eli 1x DNA:ta ja muodostavat kuvion ensimmäisen piikin. Toinen piikki muodostuu G2/M-vaiheessa olevista soluista, joissa on 2x määrä DNA:ta. Piikkien väliin jäävät S-vaiheessa olevat solut, joissa DNA:n määrä on 1x ja 2x välillä. (Techniques for Immune Function Analysis. 2009: 171-172)



Kuva 10. Solusyklin histogrammista näkee solusyklin vaiheet.

5.2 Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit

EdU (5-etynnyli-2'-deoksiuridiini) on vastine tymidiinille, ja se liittyy DNA:han DNA-synteesin aikana. Tunnistus perustuu reaktioon, jossa kupari katalysoi kovalenttisen sidoksen muodostumista atsidin ja alkyynin välille. Tässä testissä EdU:n etynnyli-ryhmä sisältää alkyynin ja atsiidi on liittyneenä käytettyyn väriin (Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 647). Proliferaatiovärijäyksen kanssa voidaan suorittaa myös värijäys solusykliväreillä (PI, Click-iT™ EdU CellCycle 633-red, Click-iT™ EdU CellCycle 488-red, SYTOX®

AADvanced™ Dead Cell Stain). (Invitrogen 2011: 1, 7; Invitrogen 2009: 9) Työssä käytetty Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -ohjeeseen perustuva värjäysprotokolla löytyy liitteestä 2.

5.3 BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit

BrdU (bromideoksiuridiini) on tymidiinin vastine, joka sitoutuu uuteen DNA:han tunkeutumalla soluun S-vaiheen aikana. Sitoutunut BrdU värjätään BrdU-spesifisillä vastaineella, johon on lisätty fluoresoiva molekyyli (APC, allophycocyanin). Proliferaation lisäksi voidaan tehdä soluille värjäys solusyklivärillä (7-AAD, 7-aminoaktinomysiini D). (BD Biosciences. 2011: 6) BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit -ohjeisiin perustuva värjäysprotokolla löytyy liitteestä 3.

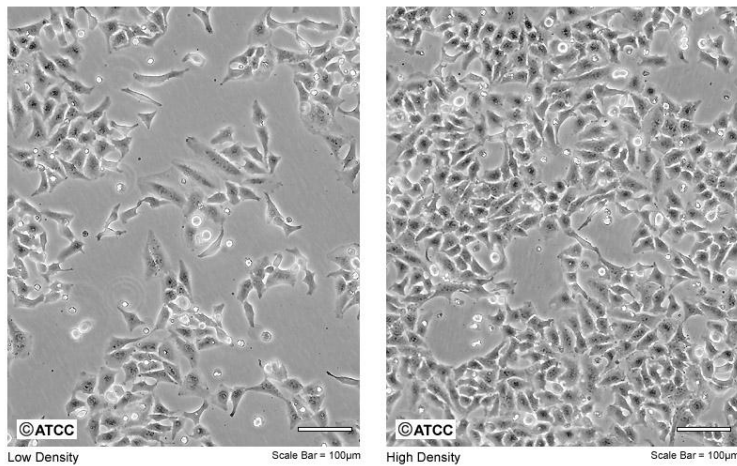
6 Työssä käytetyt solut

Tässä insinööriyössä käytettiin kahta erilaista solutyyppeä: HeLa- ja HEK 293 -soluja. HeLa-solut ovat paljon käytettyjä ja tutkittuja, joten ne sopivat hyvin testauksiin, koska niiden kasvu- ja muut ominaisuudet olivat tiedossa. Lisäksi niiden kasvattaminen ja hoitaminen oli helppoa. HEK 293 -solut valittiin, koska niiden kasvuominaisuuksia haluttiin tutkia värjäysten ohessa.

6.1 HeLa-solut

Alkuperäiset solut (kuva 11) kerättiin 31-vuotiaan afrikanamerikkalaisen naisen, Henrietta Lacksin, pahanlaatuisesta kohdunkaulan kasvaimesta vuonna 1951. Solulinjaa kutsutaan kuolemattomaksi, sillä solut voivat viljeltyinä jakaantua loputtomasti. HeLa-solut ovat aneuploidisia ja kromosomeja on yleensä 82; kromosomista 12 on neljä kopiota ja kromosomeista 6, 8 ja 17 kolme. Kromosomien määrä voi kuitenkin vaihdella 70:n ja 164:n välillä. (HeLa Cell Line 2013)

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**

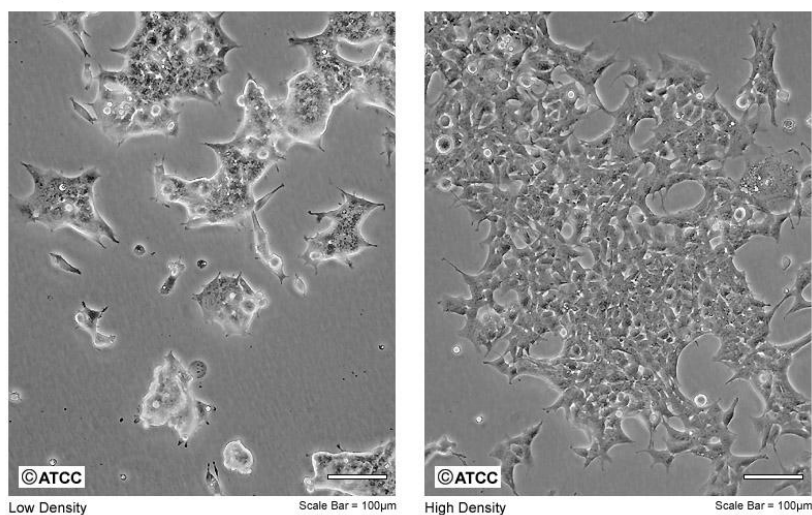


Kuva 11. HeLa-soluja kasvamassa (HeLa 2013).

6.2 HEK 293 -solut

HEK 293 -solulinja (human embryonic kidney) luotiin siirtämällä adenovirus 5 -viruksen DNA:ta ihmisalkion munuaissoluihin 1970-luvun alkupuolella (Graham ym. 1977: 59). Transformaatioissa siirrettiin 4500 emäsparia virusgenomia munuaissolujen kromosomiin 19. Koska kyseessä oli koe numero 293, annettiin solulinjalle nimeksi HEK 293 (kuva 12). (HEK293 Cell Line 2013)

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**



Kuva 12. HEK 293 -soluja kasvamassa (HEK 293)

Ei ole varmuutta, minkä tyyppisiä munuaissoluja HEK 293-linjan solut ovat, sillä transformaatio on voinut muuttaa solujen alkuperäistä morfologiaa ja ilmentymistä. Alkion

munuaisista löytyy lähes kaikkia kehon eri solutyyppejä, mutta on kuitenkin arveltu, että solut olisivat hermostollista alkuperää, minkä puolesta puhuu soluista löytyvä mRNA ja tietyt proteiinit, jotka ovat hermosoluille tyypillisiä. (HEK293 Cell Line 2013)

7 Materiaalit ja laitteisto

7.1 Materiaalit

Työssä käytettiin seuraavia materiaaleja:

BSA (Sigma-Aldrich)

DMEM (Lonza)

DNaasi (Promega)

FBS (Lonza)

L-glutamiini (Lonza)

Milli-Q-vesi

Natriumsitraatti (Sigma-Aldrich)

Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich)

PBS (Sigma-Aldrich)

Penisilliini-streptomysiini (Lonza)

PI-väri (Invitrogen)

RNAasi (Machery-Nagel)

Trypsiini-EDTA (Lonza)

7.2 Laitteisto

Työssä olivat käytössä seuraavat laitteet:

Sytometrit (BD, Accuri C6 ja BD FACSAria II)

Inkubaatiokaappi (Thermo, Hepa Class 100)

Koeputkisekoittaja (Scientific Industries, Vortex Genie 2)

Sentrifuugit (Beckman, Allegra X-30 ja Sigma-Aldrich, 1-14)

Solulaskuri (Nexcelom Bioscience, Cellometer Vision)

8 Insinööriyön suoritus

8.1 Solujen kasvatus ja hoitaminen

Insinööriyön suoritukseen kuului työssä käytettyjen solujeviljelmien hoitaminen. Molempia solutyyppejä kasvatettiin kaupallisessa DMEM-kasvatusliuoksessa (Dulbecco's Modified Eagle Medium), johon lisättiin penisilliini-streptomysiiniliuosta, glutamiinia ja FBS:ää (fetal bovine serum). Solujen kasvun hidastamiseksi käytettiin myös kasvatusliuosta ilman FBS:ää. Soluja kasvatettiin kasvatuspulloissa ja testejä varten kuusikuoppalevyillä inkubaattori-kaapissa 37°C:ssa. Kahdesti viikossa solut irrotettiin pulloista ja jaettiin kasvamaan uusiin pulloihin. Aluksi kasvatettiin vain HeLa-soluja. Kun HeLa-soluille oli tehty tarpeeksi värjäyksiä, aloitettiin HEK 293 -solujen kasvattaminen ja värjäminen.

Soluja irrotettaessa imettiin ensin pois vanha kasvatusliuos ja pestiin solut 5 ml:lla PBS:ää, joka imettiin pois. Varsinainen irrotus tapahtui lisäämällä pulloihin 2,5 ml trypsiiniä ja inkuboimalla soluja 2-5 minuuttia inkubaattori-kaapissa 37 °C:ssa. Inkubaation jälkeen solut irtosivat pulloa kevyesti taputtamalla. Irronneet solut huuhdeltiin pullon pohjalle 5 ml:lla PBS:ää ja siirrettiin koeputkeen. Putki sentrifugoitiin (1000 x g, 5 min), minkä jälkeen neste poistettiin solupellettiä varoen ja pelletti hajotettiin kasvatusliuokseen. Syntynyttä solususpensiota lisättiin 1 ml halutulla suhteella (esim. 1:5) kasvamaan uuteen kasvatuspulloon, jossa oli 19 ml kasvatusliuosta. Kuusikuoppalevyjä varten solut laskettiin solulaskurilla, minkä jälkeen valmistettiin liuos tarvittavalla solukonsentraatiolla ja lisättiin 1 ml soluliuosta kuoppiin, joissa oli 4 ml kasvatusliuosta.

8.2 Värjäykset

Värjäykset suoritettiin aluksi HeLa-soluille. Värjäyksistä ensimmäiseksi valittiin PI, koska protokolla on yksinkertainen (liite 1) ja paljon käytetty. PI-värjäyksien tuloksista saatiin vertailukohta kaupallisille testeille.

Seuraavaksi testattiin ensimmäistä kaupallista värjäykestä eli Invitrogenin™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -testiä (liite 2). Proliferaatiovärinä testeissä käytettiin Alexa Fluor® 488 -väriä. Testiä kokeiltiin yhdessä eri solusyklivärien kanssa. Aluksi solusyklivärinä oli PI, sitten testattiin Click-iT™ EdU CellCycle 633-red ja Click-iT™ EdU

CellCycle 488-red -solusykli-värejä. Viimeisenä värjäyksenä HeLa-soluille tehtiin BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit -värjäys (liite 3), jossa proliferaatioväriinä oli APC ja solusykli-väriinä 7-AAD.

Osa HEK 293 soluista sisälsi GFP-proteiinin (green fluorescent protein), ja haluttiin tutkia, onko proteiinilla vaikutusta solun kasvuun, joten solut eroteltiin GFP-positiivisiin ja GFP-negatiivisiin populaatioihin BD FACSAria II -sytometrillä ja laitettiin kasvamaan erikseen ennen värjäysten aloittamista. Värjäykset HEK 293 -soluille suoritettiin samassa järjestyksessä kuin HeLa-soluille, mutta GFP-proteiinin takia Invitrogenin™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -testin proliferaatioväriksi oli vaihdettava Alexa Fluor® 647. Vaihdon syynä oli GFP:n ja Alexa Fluor® 488:n näkyminen samalla tunnistimella BD Accuri C6 -sytometrissä.

HEK 293 -solujen kanssa testattiin insinööri-työn loppuvaiheessa myös SYTOX® AADvanced™ Dead Cell Stain -väriä yhdessä Invitrogenin™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -testin kanssa. SYTOX® AADvanced™ Dead Cell Stain -väriä testattiin HEK 293 -soluilla sekä liitteessä 2 olevan protokollan mukaan että hajottamalla solut ja värjäämällä vain tumat. Solujen hajotuksessa jätettiin pois työvaiheet 6-8 (liite 2.) ja korvattiin ne minuutin käsittelyllä 0,1 % natriumsitraatissa, jossa oli 0,03 % Nonidet P-40:tä. Solujen hajottamista ja tumien värjäämistä päätettiin kokeilla, koska löydettiin tutkimusartikkeli, jossa oli havaittu värjäystulosten olevan paremmat vain tumia värjätessä. (Hamelik & Krishan 2009).

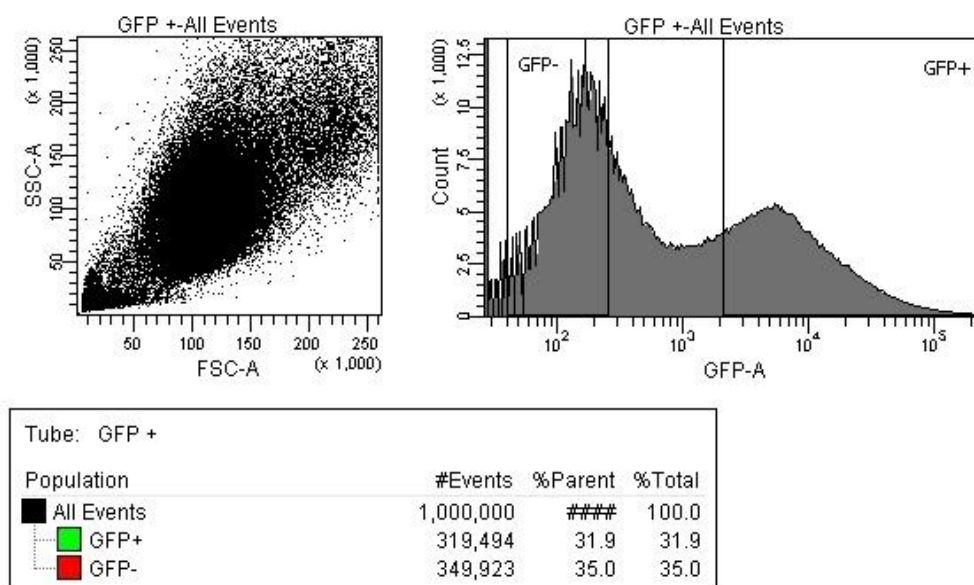
Värjäyksissä testattiin myös miten FBS:n puuttuminen kasvatusliuoksesta vaikutti solujen kasvuun vaihtamalla HeLa-soluille FBS-vapaa kasvatusliuos testiä edeltävänä päivänä ja HEK 293 -soluille neljää tuntia ennen testiä. HEK 293 -solut vaikuttavat olevan herkempiä seerumin puutokselle, mikä oli syynä lyhyempään aikaan seerumittomassa kasvatusliuoksessa.

8.3 HEK 293 -solujen lajittelu

Koska osassa HEK 293 -soluista oli GFP-proteiini, lajiteltiin ne GFP-positiivisiin ja GFP-negatiivisiin populaatioihin, jotta niitä oli mahdollista kasvattaa erikseen ja tutkia värjäysten avulla, onko GFP-proteiinilla vaikutusta solujen kasvuun.

Jotta solut olivat mahdollisimman hyvässä kunnossa, ei kasvatuspullon pohjan ollut annettu kasvaa täyteen soluja vaan, pulloissa oli vielä hieman tyhjää tilaa. Lajittelemattomat solut irrotettiin kasvatuspulloista trypsiinikäsittelyllä. Irrotetut solut siirrettiin koeputkiin ja sentrifugoitiin. Neste poistettiin ja solupelletti hajotettiin noin millilitraan kasvatusliuosta.

Analysointi ja lajittelu tapahtuivat BD FACSAria II -sytometrillä. Ennen varsinaista lajittelua analysoitiin pieni määrä solususpensiota, jotta saatiin selville solujen sisältämän GFP-proteiinin antama spektri (kuva 13). Spektrissä oli selkeästi erotettavissa negatiivinen ja positiivinen piikki. Spektristä rajattiin omiksi alueikseen kerättävien positiivisten ja negatiivisten solujen intensiteetit. Rajauksia ei tehty toisiinsa kiinni, koska vain vähän GFP-proteiinia sisältäviä soluja ei haluttu lajitella mukaan. Näin varmistettiin, että positiiviset solut sisälsivät runsaasti GFP-proteiinia ja negatiivisissa sitä ei ollut lainkaan.



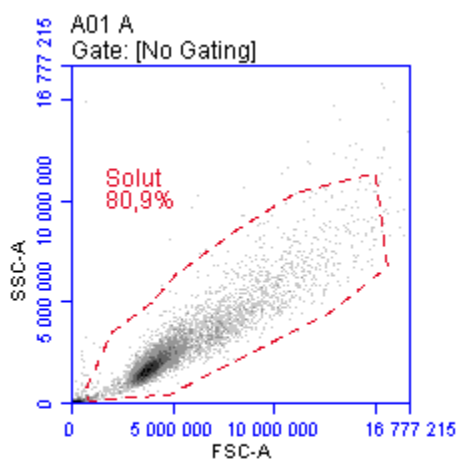
Kuva 13. Ylhäällä vasemmalla näkyy solujen muodostama populaatio ja oikealla on GFP:n antama spektri. Alhaalla näkyy, paljonko soluista oli GFP-positiivisia ja -negatiivisia.

32 % solususpensiosta oli kerättäviä GFP-positiivisia soluja ja kerättäviä GFP-negatiivisia soluja oli 35 %, loput näytteen soluista menivät jätteeksi. Solut lajiteltiin kasvatusliuosta sisältäviin koeputkiin. Lajitellut solut sentrifugoitiin putkien pohjille, poistettiin neste ja hajotettiin solupelletti viiteen millilitraan kasvatusliuosta, minkä jälkeen solususpensio siirrettiin kasvatuspulloon, jossa oli 15 ml kasvatusliuosta ja annettiin kasvaa, kunnes kasvatuspullo oli lähes täysi. Tämän jälkeen soluja hoidettiin kahdesti

viikossa varoen sekoittamasta GFP-positiivisia ja GFP-negatiivisia solulinjoja keskenään.

9 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tulosten analysointi aloitettiin rajaamalla haluttu solupopulaatio analysoitavaksi sivulle ja eteen suuntautuvien sirontojen kuvaajasta (kuva 14) . Tässä työssä analysoitavana oli kerrallaan vain yhtä solutyyppeä, joten kuvaajassa näkyi aina vain yksi solupopulaatio, joka tuli rajata analyysijä varten. Rajauksen sisään jäävä osuus sytometrin havaitsemista tapahtumista ei ole 100 %, koska osa havaituista tapahtumista johtui roskasta, jota syntyi mm. solujen hajotessa värjäysten aikana.



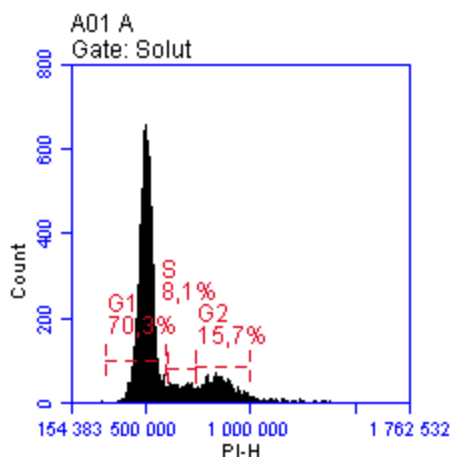
Kuva 14. Kuvaajasta näkee solupopulaation. Pystyakselilla on sivulle suuntautuva sironta ja vaakakselilla eteenpäin suuntautuva sironta.

9.1 HeLa-solujen värjäysten tulokset

9.1.1 PI-värjäykset

HeLa-solujen PI-värjäykset eivät aluksi onnistuneet, vaan analyysivaiheessa todettiin ison osan soluista hajooneen värjäysprosessin aikana. Värjäyksiä toistettiin useaan otteeseen ja huomattiin, että tulokset paranivat, kun työvaiheiden välisissä sentrifugoinneissa laskettiin voimakkuus 1000 x g:stä puoleen. Tällöin tulokset olivat huomattavasti paremmat, ja soluja säilyi ehjänä analyysivaiheeseen tarpeeksi.

HeLa-solujen PI-värjäysten analysointi tapahtui rajaamalla kuvaajasta kutakin solusyklin vaihetta vastaavat kohdat (kuva 15). Ensimmäinen piikki vastaa G1-vaiheessa olevia soluja ja toinen G2-vaiheessa olevia soluja ja väliin jäävä osuus koostuu S-vaiheessa olevista soluista.



Kuva 15. HeLa-solujen analyysi PI-värjäyksen jälkeen.

Analyysikuvat käytiin läpi yksitellen ja rajauksia siirreltiin tarpeen mukaan. Näytteistä saadut HeLa-solujen PI-värjäysten tulokset taulukoitiin (taulukko 1). Koska PI-värjäyksissä oli ongelmia solujen hajoamisen kanssa, jouduttiin useita näytteitä hylkäämään liian vähäisen solumäärän takia.

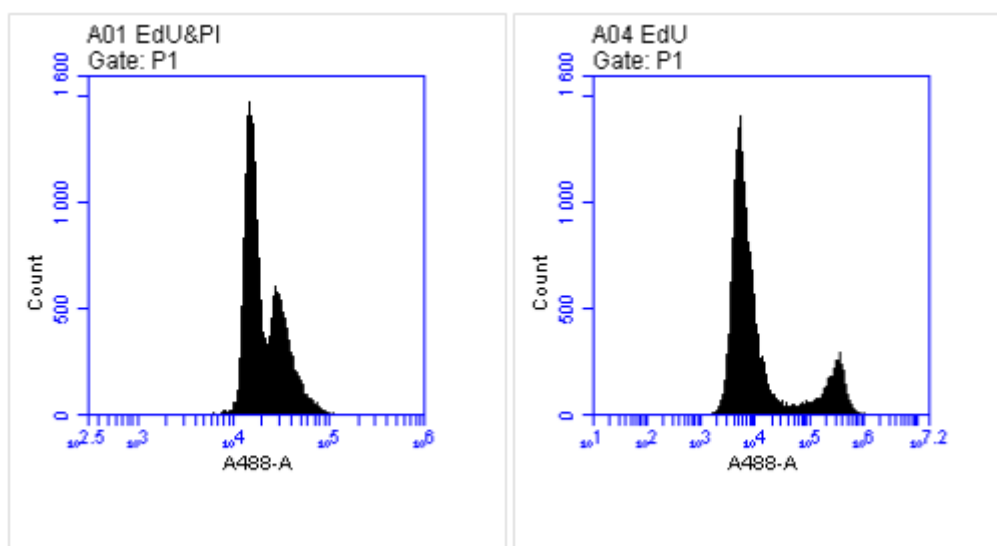
Taulukko 1. HeLa-solujen PI-värjäysten tulokset

HeLa PI			
Näyte	% G1	% S	% G2
A	70,3	8,1	15,7
B	74,9	5,5	14,4
C	72,9	7,1	15,9
D	72,4	7	17,8
E	74,4	5,9	15,5
0	0	0	0
Keski-arvo	72,98	6,72	15,9

9.1.2 Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjykset

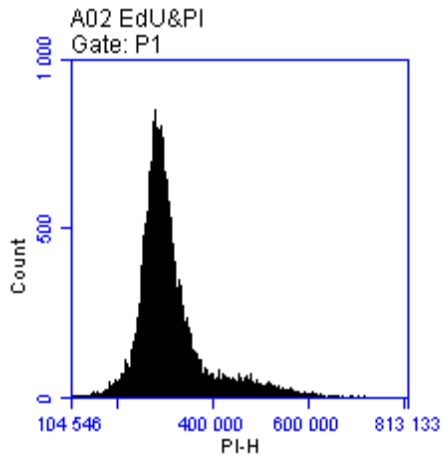
Tehtäessä HeLa-soluille Invitrogenin[™] Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäksiä oli ongelmia solusykliärien kanssa. Mikään käytetyistä solusykliäreistä (PI, Click-iT[™] EdU CellCycle 633-red ja Click-iT[™] EdU CellCycle 488-red) ei tulosten perusteella näyttänyt toimivan yhdessä EdU:n kanssa. Yhteensopivuusongelmien vuoksi jouduttiin hylkäämään epäkelvoja näytteitä.

Kun solusykliärinä EdU-värjyksessä oli PI, näytti Alexa Fluor[®] 488 -värin signaali menevän kasaan (kuva 16). Oikeanlaisen signaalin sai vain näytteistä, joille tehtiin pelkästään EdU-värjäys.



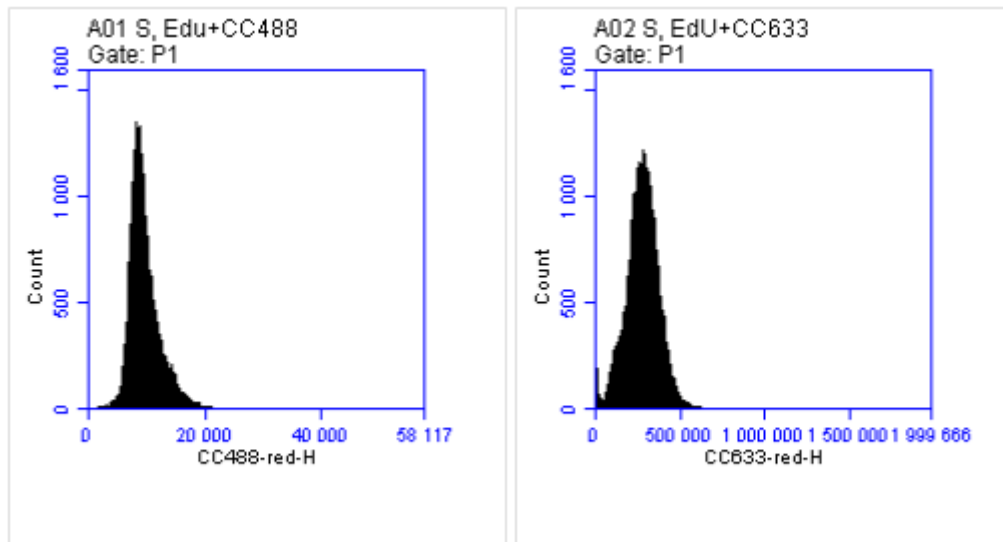
Kuva 16 Proliferaatiövärin signaali meni kasaan PI-värin ollessa mukana (vasen kuvaaja), mutta toimi yksinään oikein (oikea kuvaaja).

Myöskään PI-väri ei toiminut odotetusti yhdessä EdU-värjäysten kanssa. PI-värin kuvaajista ei voitu nähdä eri vaiheiden piikkejä, kuten kuului, vaan tuloksena oli vain yksi piikki (kuva 17).



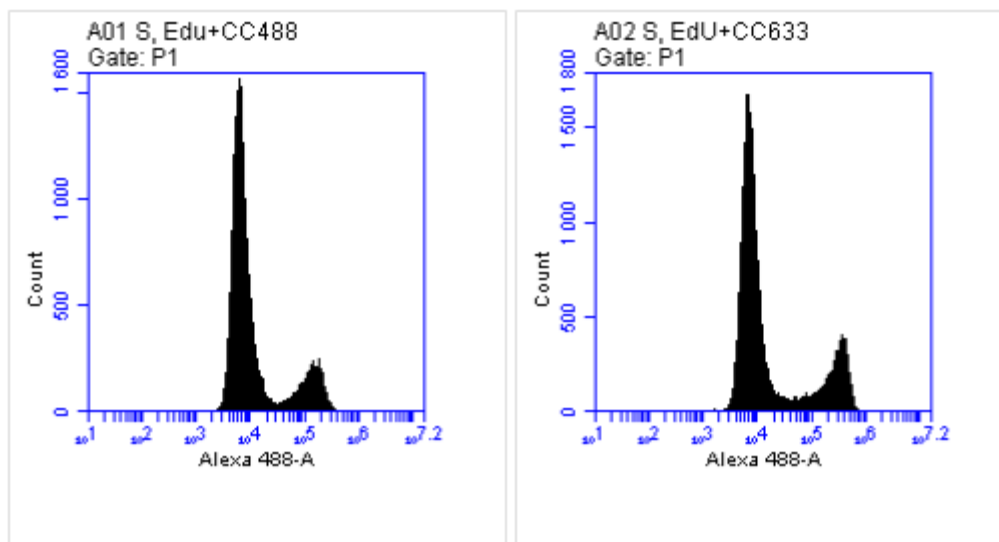
Kuva 17. PI-väri ei antanut odotetun muotoista signaalia yhdessä EdU-väriin kanssa.

Click-iT™ EdU CellCycle 633-red ja Click-iT™ EdU CellCycle 488-red -solusyklivärerien kanssa ilmeni samanlaisia ongelmia kuin PI-väriin kanssa. Kumpikaan väreistä ei toiminnut yhdessä EdU-väriin kanssa, vaan molemmista saatiin tulokseksi vain yksittäiset piikit kuvaajiin eikä odotettua solusyklin kuvaajaa (kuva 18).



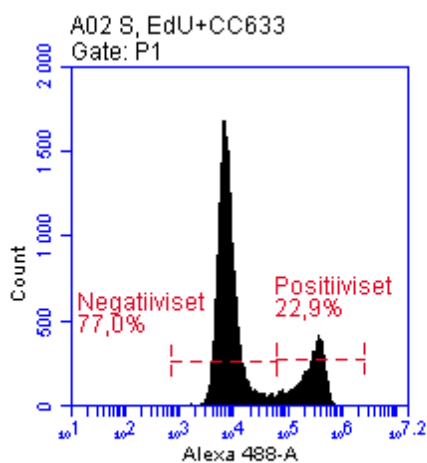
Kuva 18. Click-iT™ EdU CellCycle 488-red (vasen kuvaaja) ja Click-iT™ EdU CellCycle 633-red (oikea kuvaaja) yhdessä EdU-väriin kanssa.

Toisin kuin PI-väriin kanssa, EdU-väri toimi molempien Click-iT™ EdU CellCycle -värerien kanssa halutulla tavalla muodostaen sekä negatiivisen että positiivisen piikin (kuva 19).



Kuva 19. Alexa Fluor® 488 yhdessä Click-iT™ EdU CellCycle 488-red (vasen kuvaaja) ja Click-iT™ EdU CellCycle 633-red (oikea kuvaaja) -värien kanssa.

Koska solusyklivärejä ei toistoista huolimatta saatu toimimaan, voitiin Invitrogenin™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäyksistä tarkastella vain proliferaatiovärin antamia tuloksia. Tulokset luettiin rajaamalla kuvaajista positiivinen piikki, jonka muodistivat inkubaation aikana S-vaiheen läpikäyneet solut (kuva 20).



Kuva 20. Proliferaatiovärin tulokset luettiin rajaamalla positiiviset erilleen negatiivisista.

Molemmista väriyhdistelmistä saadut proliferaatiovärin tulokset taulukoitiin (taulukko 2 ja taulukko 3). Ongelmana värjäyksissä oli värjäysprosessin pesujen aikana hävinneet

solut, joten osa näytteistä, joissa käytettiin Click-iT™ EdU CellCycle 633-red -väriä, sisälsi liian vähän soluja tulosten lukemiseksi.

Taulukko 2. EdU ja Click-iT™ EdU CellCycle 488-red yhdessä. Taulukosta näkee kuinka moni solu jakaantui kahden tunnin inkubaation aikana.

HeLa EdU + CellCycle 488-red Seerumilla HeLa EdU + CellCycle 488-red Ilman seerumia

Näyte	% Jakaant.
A	19,2
B	19,8
C	19,2
D	18
E	18,8
F	17,8
G	17,7
H	31,4
I	18,8
Keskiarvo	20,1

Näyte	% Jakaant.
A	14,5
B	14
C	16,6
D	15,1
E	16,4
F	15,4
G	22,9
H	15,7
Keskiarvo	16,3

Taulukko 3. EdU ja Click-iT™ EdU CellCycle 633-red yhdessä. Taulukosta näkee, kuinka moni solu jakaantui kahden tunnin inkubaation aikana.

HeLa EdU + CellCycle 633-red Seerumilla HeLa EdU + CellCycle 633-red Ilman seerumia

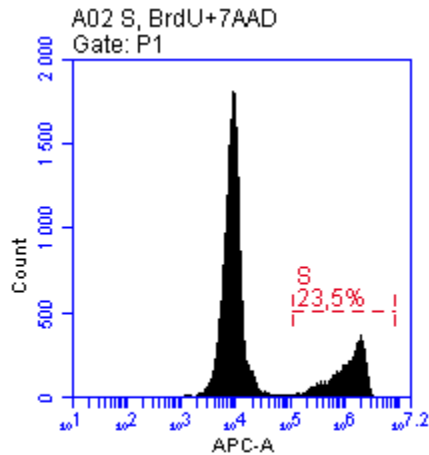
Näyte	% Jakaant.
A	23
B	24,1
C	26
Keski-arvo	24,4

Näyte	% Jakaant.
A	18,7
B	17,1
C	24,1
Keski-arvo	20,0

Tuloksista voitiin huomata solujen kasvun hidastuneen soluissa, jotka olivat vuorokauden ilman FBS:ää, sillä S-vaiheessa olevien solujen määrä on pienempi. Jos väriyhdistelmiä verrattiin toisiinsa, huomattiin Click-iT™ EdU CellCycle 488-red -värin heikentävän hieman EdU-värin signaalia värjäysten tuloksia verrattaessa.

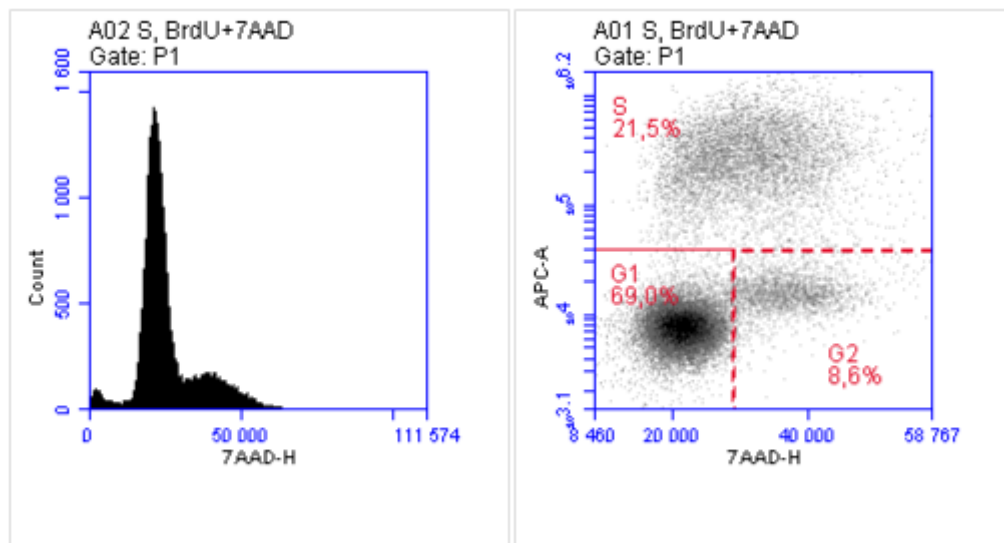
9.1.3 DB Pharmingen™ BrdU Flow Kit -värjäykset

BrdU-värjäyksissä proliferaativärin tulokset luettiin rajaamalla positiiviset eli S-vaiheessa olevat solut, jotka muodostavat kuvaajan toisen piikin (kuva 21).



Kuva 21. BrdU-värjäyksen proliferaatioväri muodosti negatiivisen ja positiivisen piikin.

Värjäyksissä käytetty solusykliväri muodosti kuvaajan, josta oli vaikeaa rajata kussakin solusyklin vaiheessa olevat solut (kuva 20). Tämän vuoksi kuvaajaan pistettiin vastakkain solusykliväri proliferaatiovärin kanssa, jolloin muodostui eri solusyklin vaiheissa olevista soluista kuvaajaan omat selkeästi erottuvat populaationsa, jotka oli helppo rajata (kuva 22).



Kuva 22. Solusyklivärin kuvaaja oli vaikeasti analysoitavissa (oikea kuvaaja), joten populaatiot eroteltiin kuvaajasta, jossa vastakkain olivat solusykliväri ja proliferaatioväri (oikea kuvaaja).

Värjäysten tulokset käytiin läpi ja taulukoitiin (taulukko 4 ja taulukko 5). Koska värjäyksissä oli yhä ongelmana solujen katoaminen värjäysten aikana, oli osa näytteistä hylättävä liian vähäisen solumäärän vuoksi.

Taulukko 4. Proliferaatiövärin tulokset kahden tunnin inkubaation jälkeen.BrdU + 7-AAD
Seerumilla

Näyte	% Jakaant.
A	21
B	20,6
C	24,7
D	15,7
Keski-arvo	20,3

BrdU + 7-AAD
Ilman seerimumia

Näyte	% Jakaant.
A	19,9
B	18,1
C	23,5
D	19,1
Keski-arvo	20,2

Taulukko 5. Solusykli värin tulokset kahden tunnin inkubaation jälkeen.BrdU + 7-AAD
Seerumilla

Näyte	% G1	% S	% G2
A	68,5	22	7,7
B	67,4	23,6	8,1
C	70	25,1	4,2
D	71	23,9	4
E	70,8	16,3	12,9
Keski-arvo	69,54	22,2	7,4

BrdU + 7-AAD
Ilman seerimumia

Näyte	% G1	% S	% G2
A	68,8	21,4	8,1
B	70,5	18,5	9,7
C	71,8	19,5	7,9
Keski-arvo	70,4	19,8	8,6

Tuloksia tarkastellessa voidaan huomata, että FBS:n puuttuminen näkyy solusykli värin tuloksissa, mutta proliferaatiövärin tuloksissa näytteiden keskiarvot ovat lähes samat.

9.2 HEK 293 -solujen värjäysten tulokset

HEK 293 -solut vaikuttivat reagoivan voimakkaammin seerumin puutokseen, minkä vuoksi ne irtosivat kuoppalevyjen pohjasta itsekseen ollessaan vuorokauden seerumittomassa kasvatusliuoksessa. Tämän vuoksi seerumitonta aikaa lyhennettiin neljään tuntiin ennen värjäysten aloittamista.

9.2.1 PI-värjäykset

HEK 293 -solujen värjäyksissä oli ongelmana yhä värjäysprosessin aikana hajoavat solut. Soluja värjättiin ennen erottelua ja erottelun jälkeen, jolloin voitiin vertailla, oliko GFP-positiivisilla ja -negatiivisilla soluilla eroa kasvussa.

Verrattaessa erottelemattomiin soluihin huomattiin pieni ero solujen kasvussa, mistä voitiin olettaa solujen hieman kärsineen erottelussa, ja siksi jakaantuminen väheni hieman (taulukko 6 ja taulukko 7). GFP-positiivisilla ja -negatiivisilla ei näyttänyt olevan eroja kasvussa (taulukko 7).

Taulukko 6. HEK 293 -solujen PI-värjäys ennen erottelua.

PI HEK (erottelemattomat) Seerumi

Näyte	% G1	% S	% G2
A	44,8	22,2	25,7
B	47,4	21,4	26,1
C	46,4	21,8	24,4
D	45	24,8	25
E	43,3	24,4	26,3
F	56,6	20,4	21,3
G	56,9	19,2	21,6
H	51,5	17,3	27,8
I	49,3	17,4	29,2
K	52,36	18,8	26,1
Keski-arvo	49,0	21,0	25,3

Taulukko 7. HEK 293 -solujen PI värjäykset erottelun jälkeen.

PI HEK (GFP+/GFP-) Seerumi

Näyte	% G1	% S	% G2
A, GFP+	44,7	17,4	25,9
B, GFP+	42,1	17,1	22,1
C, GFP+	46,3	15,9	25,4
D, GFP+	49	14,1	19,2
E, GFP+	54,3	15,2	20,1
F, GFP+	57,1	15	14,5
G, GFP+	49,1	14,4	23
H, GFP+	52,7	13,2	30,9
I, GFP+	51	14,4	31,5
J, GFP+	51,9	12,6	32,3
K, GFP-	54	10,2	14,3
L, GFP-	54,7	8,6	10,1
M, GFP-	61,7	11,9	16,3
N, GFP-	65,7	12,6	14,3
O, GFP-	51,8	12,3	31,7
P, GFP-	52,9	14,1	29,36
Q, GFP-	48,4	15,2	32,4
GFP+, Ka.	49,8	14,9	24,5
GFP-, Ka.	55,6	12,1	21,2

PI HEK (GFP+/GFP-) Ilman seerumia

Näyte	% G1	% S	% G2
A, GFP+	50,7	14,1	29,8
B, GFP+	44,7	13,1	31,1
C, GFP+	54,5	12,4	25,5
D, GFP+	50,7	18,5	26,4
E, GFP+	53	16,2	26,9
F, GFP+	52,8	19,6	24,6
G, GFP-	48,2	14,1	22,8
H, GFP-	56,7	12,8	27
I, GFP-	52,4	13,1	27,3
J, GFP-	62,1	17	18,4
K, GFP-	49,9	19,4	27,5
L, GFP-	47,7	16,9	31,9
GFP+, Ka.	51,1	15,7	27,4
GFP-, Ka.	52,8	15,6	25,8

9.2.2 Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäykset

Solusyklivärit eivät edelleenkään toimineet yhdessä EdU-väriin kanssa, joten värjäyksestä voitiin lukea tulokset vain proliferaatioväriin osalta. Hajonneet ja kadonneet solut

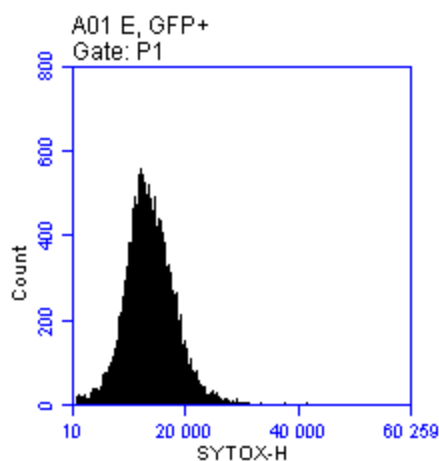
laskivat jälleen onnistuneiden näytteiden määrää. Tulokset käytiin samalla lailla läpi kuva kerrallaan kuin HeLa-solujen tulokset ja taulukoitiin.

Taulukko 8. Proliferaatiovärjäysten tulokset kahden tunnin inkubaation jälkeen.

EdU HEK (GFP+/GFP-) Seerumi		EdU HEK (GFP+/GFP-) Ilman seerumia	
Näyte	% Jakaant.	Näyte	% Jakaant.
A, GFP+	44,8	A, GFP+	45,2
B, GFP+	45,5	B, GFP+	45,8
C, GFP+	45,9	C, GFP+	45,7
D, GFP-	44,8	D, GFP-	44,7
E, GFP-	41,7	E, GFP-	45,6
F, GFP-	43,3	O, GFP-	0
O, GFP-	0	GFP+, Ka.	45,6
GFP+, Ka.	45,4	GFP-, Ka.	45,2
GFP-, Ka.	43,3		

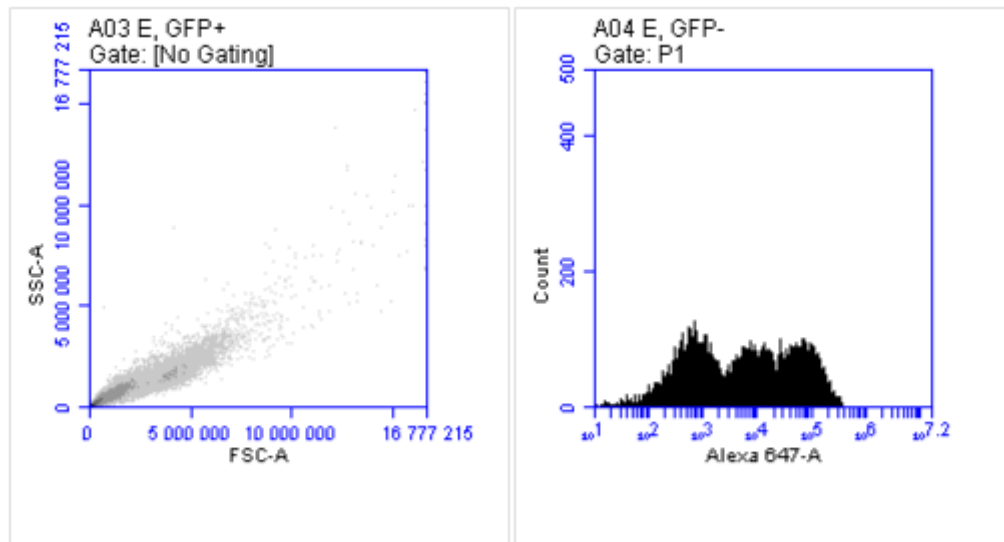
Koska seerumillisten ja seerumittomien solujen kasvussa ei havaittu merkittäviä eroja, voitiin päätellä, ettei neljä tuntia ilman seerumia ollut tarpeeksi pitkä aika, jotta se olisi näkynyt tuloksissa (taulukko 8).

HEK 293 -soluilla testattiin myös uutta SYTOX[®] AADvanced[™] Dead Cell Stain -väriä solusyklin tutkimiseen, mutta kuten muutkin testatut solusykliärit, ei sitäkään saatu toimimaan yhdessä proliferaatiovärin kanssa (kuva 23).



Kuva 23. SYTOX[®] AADvanced[™] Dead Cell Stain -väri ei toiminut yhdessä proliferaatiovärin kanssa.

SYTOX[®] AADvanced[™] Dead Cell Stain -värin toimivuutta kokeiltiin myös hajottamalla solut ja värjäämällä vain tumat löydetyn artikkelin (Hamelik & Krishan 2009) ohjeiden mukaan, mutta väriä ei saatu tälläkään metodilla toimimaan toivotulla tavalla. Hajotetuista soluista oli vaikea erottaa tumia hajonneista soluista syntyneestä roskasta rajattaviksi (kuva 24). Proliferaatiovärin kuvaajakaan ei näyttänyt oikeanlaiselta.



Kuva 24. Tumapopulaatiota ei voinut erottaa roskien seasta (vasen kuvaaja), eivätkä tuloksetkaan näyttäneet onnistuneilta (oikea kuvaaja).

9.2.3 DB Pharmingen[™] BrdU Flow Kit -värjäykset

BrdU:lla vaikutti olevan haitallinen vaikutus HEK 293 -soluihin, sillä ne irtosivat kuopista itsekseen. Varsinkin seerumittomassa kasvatusliuoksessa olevat solut kärsivät BrdU-inkubaatiosta. Solujen huono tila näkyi solujen hajoamisena, minkä vuoksi oli jälleen jätettävä osa näytteistä huomiotta liian vähäisen solumäärän vuoksi. Koska solusyklivärin kuvaajat olivat samalla lailla vaikeasti luettavat, myös HEK 293 -solujen kohdalla solupopulaatiot eroteltiin kuvaajasta, jossa oli solusykliväri ja proliferaatioväri vastakkain.

Taulukko 9. Proliferaatiövärin tulokset kahden tunnin inkubaation jälkeen.

BrdU + 7-AAD
Seerumilla

Näyte	% Jakaant.
A, GFP+	45,7
B, GFP+	47,6
C, GFP+	52,2
D, GFP+	50
E, GFP+	47,9
F, GFP+	45,2
G, GFP-	41,4
H, GFP-	43,3
I, GFP-	43,1
J, GFP-	44,1
K, GFP-	51,1
GFP+, Ka.	48,1
GFP-, Ka.	44,6

BrdU + 7-AAD
Ilman seerimumia

Näyte	% Jakaant.
A, GFP+	53,3
B, GFP+	52,2
C, GFP+	47,9
D, GFP-	55,9
E, GFP-	53,4
F, GFP-	54,6
O, GFP-	0
GFP+, Ka.	51,1
GFP-, Ka.	54,6

Taulukko 10. Solusyklivärin tulokset kahden tunnin inkubaation jälkeen.

BrdU + 7-AAD
Seerumilla

Näyte	% G1	% S	% G2
A, GFP+	40,4	46,8	10
B, GFP+	37,1	51,1	10,8
C, GFP+	35,4	54,1	10,2
D, GFP+	39,2	45,9	13
E, GFP+	38,8	47,2	11,5
F, GFP+	41,5	44,6	11,4
G, GFP-	45,8	46	7,4
H, GFP-	43,6	49,4	6,7
I, GFP-	44,3	46,5	7,4
J, GFP-	46,1	41,7	9,3
K, GFP-	36,7	51,2	9,2
GFP+, Ka.	38,7	48,3	11,2
GFP-, Ka.	43,3	47,0	8,0

BrdU + 7-AAD
Ilman seerimumia

Näyte	% G1	% S	% G2
A, GFP+	35,5	54,8	8,8
B, GFP+	39,4	51,5	8,7
C, GFP+	41,4	46,9	10,9
D, GFP-	33,3	56,8	9,4
E, GFP-	31,3	54,3	13,6
F, GFP-	31,1	53,6	14,5
GFP+, Ka.	38,8	51,1	9,5
GFP-, Ka.	31,9	54,9	12,5

Taulukkojen 9 ja 10 tuloksista voitiin huomata jälleen, ettei seerumillisessa ja seerumittomassa kasvatusliuoksessa inkuboitujen solujen välillä ole suurta eroa, kuten ei myöskään GFP-positiivisten ja -negatiivisten solujen välillä.

10 Johtopäätökset

PI-väri yksinään toimii hyvin solusyklin analysoinnissa. Mikäli kuitenkin haluaa tutkia yhdessä solusykliä ja solujen proliferaatiota, vaikuttaisi DB Pharmingen™ BrdU Flow

Kit -värjäys toimivammalta ja luotettavammalta kuin Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäys. DB Pharmingen[™] BrdU Flow Kit oli protokollaltaan hieman työllämpi ja monimutkaisempi kuin Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit, mutta se antoi luotettavampia tuloksia ja sitä käytettäessä solusykliväri ja proliferaatioväri toimivat yhdessä.

Sytä, miksi solusyklivärit ja proliferaatiovärit eivät toimineet yhdessä Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit -värjäystä käytettäessä, ei saatu selville. Asiaa yritettiin tutkia etsimällä julkaisuja, joissa olisi kyseistä testiä käytetty. Julkaisuja ei kuitenkaan monta löytynyt. Kyseinen värjäystesti on aika uusi, mutta julkaisujen vähyys kuitenkin yllätti, mikä sai miettimään, olisivatko muut käyttäjät kohdanneet samoja ongelmia testiä käyttäessä.

Toistoja tarvittaisiin useampia, jotta voitaisiin todeta, kuinka suuri vaikutus solujen jakaantumiseen seerumin puutoksella on. GFP-proteiini ei näyttäisi näiden testien perusteella vaikuttavan solun kasvuun.

Mikäli värjäyksiä haluaisi vertailla laajemmin, tulisi kokeita toistaa eri väriyhdistelmillä useampia kertoja. Lisäksi olisi saatava muodostettua värjäyksistä oikeanlainen rutiini soluhävikin minimoimiseksi. Jos tutkimusta jatkettaisiin HEK 293 -soluilla, tulisi testata, mikä olisi sopiva aika pitää soluja seerumittomassa kasvatusliuoksessa. Ajan tulisi olla niin pitkä, että ero olisi selkeästi huomattavissa, mutta solujen ei saisi alkaa kuolla seerumin puutteen vuoksi.

Lähteet

Abcam 2012 = Abcam Flow cytometry guide. Verkkodokumentti.

<http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry_May_10.pdf>

Luettu 11.5.2013.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2009. Essential Cell Biology. New York: Garland Science.

Bakke, Anthony, C. 2001. The Principles of Flow Cytometry. Lab Medicine. Huhtikuu 2001. s. 207-211.

BD Accuri C6 2013 = BD Accuri C6 flow cytometer. Verkkodokumentti.

<<http://www.bdbiosciences.com/instruments/accuri/>> Luettu 14.4.2013

BD Biosciences. 2000. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. San Jose: Becton, Dickinson and Company.

BD Biosciences. 2009. An Introduction to Compensation for Multicolor Assays on Digital Flow Cytometers. Becton, Dickinson and Company.

BD Biosciences. 2011. DB Pharmingen TM BrdU Flow Kits Instruction Manual. Becton, Dickinson and Company.

Biomedicum 2013 = Biomedicum Helsinki. Verkkodokumentti.

<<http://www.biomedicum.fi/index.php?page=108&lang=1>>. Luettu 28.1.2013.

Cecchini, M. J., Amiri M. & Dick F. A. Analysis of Cell Position in Mammalian Cells. The Journal of Visualized Experiments. Tammikuu 2012.

Cell Proliferation Assays 2013 = Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells. Verkkodokumentti. <<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/>> Luettu 28.4.2013.

Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D. & Zhao, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2010. Vol. 676, s. 137-147.

DNA:n replikaatio 2013 = DNA:n replikaatio. Verkkodokumentti.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/> Luettu 17.4.2013.

FACS Core Facility 2012 = FACS Core Facility Verkkodokumentti.

<<http://research.med.helsinki.fi/corefacilities/facs/default.htm>> Luettu 28.1.2013.

Graham, L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*. Heinäkuu 1977, s.59-72.

Hamelik, R., M. & Krishan A. Click-iT™ Assay with Improved DNA Distribution Histograms. *Cytometry Part A*. Elokuu 2009, s862-856

HeLa 2013 = HeLa (ATCC® CCL-2™). Verkkodokumentti. <<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7>> Luettu 14.4.2013.

HeLa Cell Line 2013 = HeLa Cell Line. Verkkodokumentti. <<http://hela-transfection.com/>> Luettu 8.4.2013.

Heino, Jyrki & Vuento, Matti 2009. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Helsinki: WSOYPro Oy.

HEK 293 2013 = 293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™). Verkkodokumentti.

<<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7>> Luettu 14.4.2013.

HEK 293 Cell line 2013 = HEK293 Cell Line. Verkkodokumentti. <<http://hek293.com/>>. Luettu 8.4.2013.

Invitrogen 2009. Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kits. Life Technologies Corporation.s

Invitrogen 2011. Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kits. Life Technologies Corporation.s

Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A. & Hutchins, G. M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. Syyskuu 2009, s. 1463-1467.

Macey, M., G. 2007. Flow Cytometry: Principles and Applications. New Jersey: Humana Press Inc.

Malumbres, Marcos & Barbacid, Mariano. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews. Maaliskuu 2009, s 153-167.

Mandy, Francis, F., Bergeron, Michele & Minkus, Tracy. Principles of Flow Cytometry. Transfusion Science. Vol. 16 1995, s. 303-314.

Methods 2012 = Methods for Evaluating Cell Proliferation. Verkkodokumentti.
<http://assay.nih.gov/assay/index.php/Section12:Methods_for_Evaluating_Cell_Proliferation> Luettu 28.4.2013.

Okazakin fragmentit 2013 = Okazakin fragmentit. Verkkodokumentti
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/okazakin_fragmentit/2/> Luettu 17.4.2013.

Ormerod, Michael, G. 1990. Flow Cytometry. Bath: Oxford University Press.

Owens, M. A. & Loken, M. R. 1995. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. New York: Wiley-Liss, Inc.

Radbruch, A. 1999. Flow Cytometry and Cell Sorting. Berlin: Springer.

Robinson, J., Paul. 2004. Flow Cytometry. New York: Marcel Dekker, Ink.

Shapiro, Howard M. 2003. Practical Flow Cytometry. New Jersey: Wiley-Liss, Inc.

Techniques for Immune Function Analysis. 2009. Becton, Dickinson and Company.

Verheijen, R., Kuijper H. J., van Driel, R., Beck, J L., van Dierendonck, J. H., Brakenhoff, G. J. & Ramaekers, F. C. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-

related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes.
Journal of Cell Science. Huhtikuu 1989, s. 531-540.

PI-värijäysprotokolla

Työssä käytetty värijäysprotokolla perustuu Techniques for Immune Function Analysis -opaskirjan (Techniques for Immune Function Analysis 2009.) ohjeisiin.

1. Kiinnitetään solut jääkylmällä 70 % etanoliliuoksella vähintään tuntia ennen värijäystä ja säilytä niitä 4 °C:ssa. Solut säilyvät useita kuukausia etanolikäsitteilyn jälkeen.
2. Sentrifugoidaan solut (500 x g, 5 min) ja poista neste solupellettiä varoen.
3. Hajotetaan solupelletti 1 ml:aan PBS-liuosta, toistetaan sentrifugointi (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste pellettiä varoen.
4. Hajotetaan solupelletti 100 µl:aan RNaa-PBS -silaimennosta, jonka RNAasi pitoisuus on 1 mg/ml ja inkuboidaan 30 minuuttia 37 °C:ssa.
5. Lisätään 900 µl:aa PI-PBS -liuosta, jossa on 50 µl:aa 1 mg/ml PI-väriä per näyte ja inkuboidaan valolta suojattuna 30 minuuttia huoneenlämmössä.
6. Sentrifugoidaan solut (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste pellettiä varoen.
7. Hajotetaan solupelletit 250 µl:aan PBS-liuosta ja analysoidaan. Näytteitä voi säilyttää 4 °C:ssa yön yli suojattuna valolta ennen analyysiä.

Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -protokolla

Työssä käytetty värjäysprotokolla perustuu Invitrogen™ Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit -ohjeisiin (Invitrogen 2011).

1. Lisätään 1 µl:aa 10 µM:sta EdU-liuosta per 1 ml kasvatusliuosta ja sekoitetaan hyvin.
2. Lisätään kasvatuskuoppiin 2 ml EdU:a sisältävää kasvatusliuosta ja inkuboidaan kaksi tuntia 37 °C:ssa.
3. Pestään solut 1 ml:lla PBS-liuosta ja irrotetaan solut trypsiinillä.
4. Pestään irtoavat solut 1 ml:lla PBS-liuosta, jossa on 1 % BSA:ta ja siirretään solut eppendorf-putkiin.
5. Sentrifugoidaan putket (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste pellettiä varoen.
6. Hajotetaan pelletit 100µl:aa Click-iT® kiinnitys -liuosta ja sekoitetaan hyvin. Solujen kiinnitykseen voi käyttää myös PBS-liuosta, jossa on 4 %:a paraformaldehydiä. Inkuboidaan putkia 15 minuuttia valolta suojattuna huoneenlämmössä.
7. Pestään solut 1 ml:lla PBS-BSA-liuosta. Sentrifugoidaan (500 x g, 5min) ja poistetaan neste.
8. Hajotetaan solut 100 µl:aan Click-iT® saponiinipohjaista kiinnitys- ja pesuliuosta ja inkuboidaan 15 minuuttia.
9. Valmistetaan värjäysliuos, jossa on 438 µl:aa PBS-liuosta, 10 µl:aa CuSO₄ -liuosta, 2,5 µl:aa azidiväriainetta ja 50 µl:aa reaktiopuskuria per näyte.
10. Lisätään väriäaineliuosta 500 µl:aa ja inkuboidaan putkia 30 minuuttia valolta suojattuna huoneenlämmössä.
11. Pestään solut 500 µl:lla Click-iT® saponiinipohjaisella kiinnitys- ja pesuliuoksella, sentrifugoidaan (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste. Jos solusyklivärjäystä ei tehdä siirrytään kohtaan 15.
12. Hajotetaan solupelletti 100 µl:aan RNaa-PBS -laimennosta, jonka RNaasi pitoisuus on 1 mg/ml ja inkuboidaan 30 minuuttia 37 °C:ssa.

13. Lisätään 900 µl:aa solusykliiväri-liuostaja inkuboidaan valolta suojattuna minuuttia huoneenlämmössä värin tarvitseman ajan.
14. Sentrifugoidaan solut (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste pellettiä varoen.
15. Hajotetaan solupelletit 250 µl:aan PBS-liuosta ja analysoidaan. Näytteitä voi säilyttää 4 °C:ssa yön yli suojattuna valolta ennen analyysiä.

BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit -protokolla

Työssä käytetty värjäysprotokolla perustuu BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit -ohjeisiin (BD Biosciences. 2011).

1. Lisätään 10 µl:aa BrdU-liuosta (1 mM BrdU PBS-liuoksessa, jossa on 1 % BSA-liuosta) per 1 ml kasvatusliuosta.
2. Lisätään kasvatuskuoppiin 2 ml:aa BrdU:ta sisältävää kasvatusliuosta ja inkuboidaan kaksi tuntia 37 °C:ssa.
3. Pestään solut 1 ml:lla PBS-liuosta ja irrotetaan solut trypsiinillä.
4. Pestään irtoavat solut 1 ml:lla PBS-liuosta ja siirretään solut eppendorf-putkiin, sentrifugoidaan (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste pellettiä varoen.
5. Kiinnitetään ja permeabilisoidaan solut hajottamalla pelletti 100 µl:aan DB Cytofix/Cytoberm Buffer -liuosta. Inkuboidaan 15 minuuttia huoneenlämmössä.
6. Pestään solut 1 ml:lla DB Perm/Wash Buffer -liuosta. Sentrifugoidaan (500 x g, 5 min) ja poistetaan neste.
7. Hajotetaan pelletti 100 µl:aan BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus -liuosta. Inkuboidaan 10 minuuttia jäissä ja pestään kuten kohdassa 6.
8. Kiinnitetään ja permeabilisoidaan solut uudelleen hajottamalla pelletti 100 µl:aan DB Cytofix/Cytoberm Buffer -liuosta. Inkuboidaan 15 minuuttia huoneenlämmössä ja pestään kuten kohdassa 6.
9. Tehdään DNAasikäsittely hajottamalla pelletti 100 µl:aan DNAasi-laimennosta (300 µg/ml PBS-BSA-liuoksessa). Inkuboidaan tunti 37 °C:ssa ja pestään kuten kohdassa 6.
10. Värjätään solut lisäämällä 50 µl:aa Perm/Wash Buffer -liuosta, jossa on suhteessa 1:50 anti-BrdU väriainetta (APC). Inkuboidaan 20 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Pestään kuten kohdassa 6. Mikäli solusykli värjäystä ei tehdä, siirrytään kohtaan 12.

11. Hajotetaan solut 20 µl:aan 7-AAD-liuosta ja inkuboidaan 15 minuuttia huoneen lämmössä valolta suojattuna. Pestään kuten kohdassa 6.
12. Hajotetaan solupelletti 250 µl:aan PBS-liuosta ja analysoidaan. Näytteitä voi säilyttää 4 °C:ssa yön yli suojattuna valolta ennen analyysiä.