

kandidatnummer:

10020

10027

10002

Endring i proteinekspresjon av HSP70 hos CHSE-214 cellelinje, forårsaket av stress ved høy temperatur og videre optimalisering av prosedyre for visualisering på SDS-PAGE.

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2019

kandidatnummer:

10020

10027

10002

Endring i proteinekspresjon av HSP70 hos CHSE-214 cellelinje, forårsaket av stress ved høy temperatur og videre optimalisering av prosedyre for visualisering på SDS-PAGE.

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

Denne bacheloroppgaven er skrevet av en gruppe bestående av tre studenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) og representerer vårt avsluttende arbeid i en bachelor i bioteknologi. Vi har jobbet strategisk og kontinuerlig gjennom hele semesteret, og har lagt ned svært mange timer i arbeidet. Vi håper denne oppgaven kan være med på å vise noe av den kunnskapen vi har tilegnet oss gjennom tre år ved NTNU i Ålesund.

Vi vil gjerne rette en stor takk til NTNU i Ålesund som har bidratt med økonomisk støtte og tilgjengelige laboratorier som førte til at vi kunne utføre forsøket vårt med ønskede reagenser og utstyr. Vi vil også rette en stor takk til vår primære veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy som har vært tilgjengelig for oss gjennom hele prosessen og bidratt med mye kunnskap og støtte.

Sammendrag

For å studere endring i proteinekspressjonen av Heat Shock Protein 70 (HSP70), ble den epitellignende cellelinjen CHSE-214 benyttet. Cellekulturen ble dyrket i Leibovitz's L-15 medium, tilsatt 10% fetal bovine serum (FBS) og gentamicin, ved 20 °C.

I starten av forsøket ble det valgt å stresse cellekulturen ved en temperatur på 26 °C, hvor 9 tidsintervaller ble studert over en periode på 24 timer. Følgende tidsintervaller ble benyttet: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 og 24 timer. Cellekulturene som ble utsatt for stress ble sammenlignet med celler inkubert ved 20 °C. Endringer i proteinekspressjon ble visualisert på SDS-PAGE.

For å sikre at forsøket ga ønskede resultater ble det gjennomført en optimalisering av prosedyren, hvor ulike metoder og reagenser ble testet. En ekstraksjonsmetode med trikloreddiksyre (TCA) ble byttet ut med radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer da denne ga høyere proteinkonsentrasjoner og tydeligere bånd på SDS-PAGE. Det ble testet to ulike SDS-PAGE gel konsentrasjoner, 12% og 16%, for å finne den mest optimale for proteinuttrykk av området rundt 70 kDa. Valget falt på 12% SDS-PAGE da denne ga et klarere skille mellom proteinene i hvert enkelt proteinbånd enn 16% SDS-PAGE.

Resultatene viste et økt proteinuttrykk ved 70 kDa, som anses å være HSP70 (1). Etter 4-6 timer stress var det markant mer protein med størrelse rundt 70 kDa. Etter 12-24 timer var proteinmengden rundt 70 kDa redusert ned til kontrollnivå. Basert på resultatene kan en anta en økning av ekspressjon av HSP70 etter varmesjokk ved 26 °C, samt en reduisering av proteinuttrykk rundt 70 kDa ved langvarig stress, sammenlignet med cellekontrollen inkubert ved 20 °C.

Innholdsfortegnelse

1.0 INNLEDNING	7
1.1 Bakgrunn for valg av tema.....	7
1.2 Problemstilling.....	7
1.3 Leserveileding.....	8
2.0 TEORI	9
2.1 CHSE-214 celler	9
2.1.1 Bakgrunn.....	9
2.1.2 Levevilkår.....	10
2.1.3 Stressrespons og proteinekspresjon av HSP70 i celler	11
2.1.4 HSP og HSP70.....	13
2.1.5 Splitting av celler ved hjelp av Trypsin	13
2.1.6 Tidligere studier	15
2.2 Proteinisolering.....	16
2.2.1 RIPA buffer	17
2.3 Qubit analyse	17
2.4 SDS-PAGE	17
2.4.1 EZ-vision.....	19
2.4.2 Molekylvekter.....	19
2.5 Optimalisering av prosedyrer.....	20
3.0 MATERIALER OG METODER	21
3.1 Dyrking av CHSE-214 celler	21
3.2 Initiering og stress ved temperatur.....	22
3.3 Proteinisolering.....	22
3.4 Qubit 2.0	23
3.5 Visualisering på SDS-PAGE	24
4.0 RESULTAT.....	25

4.1 Dyrking av CHSE-214 celler	25
4.2 12% SDS-PAGE	25
5.0 DISKUSJON	27
5.1 Dyrking av CHSE-214 celler	27
5.2 Stressforsøk og isolering.....	27
5.3 Visualisering på SDS-PAGE 12%	28
5.4 Optimalisering av prosedyre	31
6.0 KONKLUSJON.....	33
7.0 LITTERATURLISTE.....	34
A.0 VEDLEGG	I
A.1 Reagenser	I
A.2 Forsøk.....	II
A.3 Proteinkonsentrasjon med Qubit.....	IV
A.3.1 Proteinkonsentrasjon ved ekstraksjon med TCA	IV
A.3.2 Proteinkonsentrasjon ved sammenligning av celleflasker	IV
A.3.3 Proteinkonsentrasjon for testforsøk.....	V
A.3.4 Proteinkonsentrasjon for første forsøk 1-6 timer stress.....	VI
A.3.5 Proteinkonsentrasjon for andre forsøk 1-6 timer stress	VII
A.3.6 Proteinkonsentrasjon for første forsøk 12-24 timer stress.....	VIII
A.3.7 Proteinkonsentrasjon for andre forsøk 12-24 timer stress	IX
A.4 SDS-PAGE.....	X
A.4.1 Sammenligning av celleflaskestørrelser	X
A.4.2 Første forsøk 1-6 timer stress	XII
A.4.3 Andre forsøk 1-6 timer stress.....	XIV
A.4.4 Andre forsøk 1-6 timer stress på nye geler	XVI
A.4.5 Første forsøk 12-24 timer stress	XVIII
A.4.6 Andre forsøk 12-24 timer stress	XIX
A.4.7 Andre forsøk 12-24 timer stress på nye geler	XX
A.5 CHSE-214 celler	XXII

Tabelliste

- Tabell 1:** Tabellen viser en liste over reagenser brukt i L-15 medium som er tilpasset forsøk med CHSE-214 celler. Venstre kolonne viser hva som er med, og høyre kolonne viser hva som ikke er med. _____ 10
- Tabell 2:** Tabellen viser en oversikt over reagenser og volum brukt for å lage til medium _____ 21
- Tabell 3:** Tabellen viser en oversikt over reagenser og kit som har blitt brukt i prosedyren, samt artikkelnummer. _____ I
- Tabell 4:** Viser en detaljert forklaring av flytskjema, se figur 8 (3.0 MATERIALER OG METODER), for alle forsøkene som ble gjennomført på laboratoriet. I venstre kolonne ser vi hvilken type forsøk som ble utført den spesifikke dagen, og i høyre kolonne kommer en forklaring på hva som ble gjort i dette spesifikke forsøket. ____ II
- Tabell 5:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke om TCA var optimal metode for å isolere ut protein. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c). Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. IV
- Tabell 6:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke forskjellen i konsentrasjonen i medium- og stor celleflaske. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c). Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE i figur 9. _____ IV
- Tabell 7:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke om prosedyren fungerte optimalt. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c), og tiden prøvene har blitt stresset med temperatur. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. _____ V
- Tabell 8:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 11 og 13. _____ VI
- Tabell 9:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 17 og 19. _____ VII
- Tabell 10:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonnene viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonnene. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figur 21. _____ VIII
- Tabell 11:** Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonnene viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonnene. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 22, 23 og 25. _____ IX

Figurliste

Figur 1: Figuren viser en oversikt over alle de ulike hovedkapitlene i bacheloroppgaven. Oppgaven består av 7 hovedkapitler. _____	8
Figur 2: Modell av rollen til HSF1 i reguleringen av Heat Shock Protein ekspresjon. 1. Latent monomer form av HSF1 i cytosol. 2. Aktivering av stress som fører til at HSF1 binder seg til promotoren. 3. Transkripsjon og translasjon av HSP70. 4. Cytosoliske HSP70 som reparerer denaturerte proteiner. 5. Frie HSP70 i cytosol. 6. Økt konsentrasjon av HSP70 som resulterer i binding til HSF1 (1). _____	12
Figur 3: En grafisk fremstilling av lag-fase, log-fase, og platå-fase. X-aksen viser tid og y-aksen viser cellekonsentrasjon. _____	14
Figur 4: Figuren viser CHSE-214 som er tilsatt trypsin og løsnet fra underlaget. _____	14
Figur 5: Viser uttrykk av proteiner på 12% SDS-PAGE med støy i nedre del av gelen. _____	19
Figur 6: Kart over migrasjonen til proteiner ut fra deres størrelse i kDa på SDS-PAGE geler med ulike konsentrasjoner av akrylamid. Til høyre ser en kDa størrelsene, til venstre ser en prosent vandret i gelen og nederst ser en på hvilken konsentrasjon akrylamid vandringen har skjedd (35). _____	19
Figur 7: Illustrasjon av hvordan en proteinladder med molekylvekter fra 10 kDa til 250 kDa kan se ut når strukket ut på en gel. _____	20
Figur 8: Figuren viser et flytskjema over alle forsøkene som ble gjennomført. Cellesplitting ble gjennomført kontinuerlig også mellom forsøkene. Testforsøk 1, 2 og 3 var forsøk for å optimalisere prosedyren. Forsøk 1 og 2 var stressforsøk i 1-6 timer ved 26 °C, gjort ved to forskjellige dager. Forsøk 3 og 4 var stressforsøk i 12, 18 og 24 timer ved 26 °C, gjort ved to forskjellige dager. Detaljert oversikt over alle forsøkene er vist i tabell 4 (vedlegg A.2). _____	21
Figur 9: Viser test av stor celleflaske (S) mot medium celleflaske (M) inkubert ved 20 °C opp mot ladderens Kaleidoscope Prestained Standards (L) som viser 67 kDa på 12% SDS-PAGE. Tilhørende Qubit verdier er presentert i tabell 6. _____	X
Figur 10: Viser test av stor cell flaske (S) mot medium celleflaske (M) inkubert ved 20 °C opp mot ladderens Kaleidoscope Prestained Standards (L) som viser 67 kDa på 16% SDS-PAGE. Tilhørende Qubit verdier er presentert i tabell 6. _____	XI
Figur 11: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt $K_{a,b}$, for hver parallell. Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt $I_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt $2_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt $3_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 8. Ca. 70 kDa er beregnet ut fra figur 7, og er vist på venstre side. _____	XII
Figur 12: Utsnitt av figur 11 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel. _____	XII
Figur 13: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt $K_{a,b}$, for hver parallell. Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt $4_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt $5_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt $6_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 8. Ca. 70 kDa er beregnet ut fra figur 7, og er vist på venstre side. _____	XIII

Figur 14: Utsnitt av figur 13 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel. _____ XIII

Figur 15: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll, inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt 1_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt 2_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt 3_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XIV

Figur 16: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll, inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt 4_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt 5_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt 6_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XV

Figur 17: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt 1_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt 2_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt 3_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XVI

Figur 18: Utsnitt av figur 17 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel. _____ XVI

Figur 19: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt 4_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt 5_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt 6_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XVII

Figur 20: Utsnitt av figur 19 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel. _____ XVII

Figur 21: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt 24_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 10. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XVIII

Figur 22: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver

parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt 24_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XIX

Figur 23: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa (ikke vist), og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_{a,b}, for hver parallell. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XX

Figur 24: Utsnitt av figur 23 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød og lilla sirkel. _____ XX

Figur 25: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_{a,b}, for hver parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt 24_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side. _____ XXI

Figur 26: Utsnitt av figur 25 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel. _____ XXI

Figur 27: Figuren viser CHSE-214 celler med god cellevekst, sett gjennom invertmikroskop. _____ XXII

Figur 28: Figuren viser celleklumper som ligger oppå et monolag av CHSE-214 celler i en celleflaske. _____ XXII

Terminologi og forkortelser

- **Adherent celle:** Celle som fester seg til en overflate.
- **Passasjenummer:** Er et tall på hvor mange ganger en cellekultur har blitt splittet og delt inn i flere “datter” celleflasker.
- **Konfluens:** Sier noe om hvor tett celler vokser, og hvor stor andel av cellene som dekker overflaten. For eksempel en konfluens på 50% vil si at cellene dekker halvparten av overflaten.
- **Plating efficiency:** (Forkortet PE) Er et mål på antallet kolonier som stammer fra enkeltceller. Det regnes ut som antall celler som vokser til kolonier per 100 celler inokulert. Man kan regne ut PE ved hjelp av følgende formel:

$$PE = \frac{\# \text{ cells on day 1}}{\# \text{ cells plated on day 0}} \times 100$$

- **Denaturering av proteiner:** Betyr at strukturen til proteinet (polypeptidkjedene i proteinet) blir helt eller delvis ødelagt. Dette kan skje både ved kjemisk og fysisk påvirkning.
- **Native proteiner:** Er en betegnelse på proteiner som er i sin naturlige tilstand.
- **Intron:** Ikke kodende sekvens RNA.
- **Proteolyse:** Nedbryting av protein til kortere peptidkjeder eller aminosyrer.
- **Lysering:** Er nedbrytning av cellemembran, som fører til celledød. Kan utføres ved lyseringsbuffer eller mekanisk ved for eksempel sentrifugering.
- **Proteaseinhibitorer:** Er molekyler som hemmer funksjonen til proteaser (proteaser er enzymer som driver proteolyse).
- **Vitalitet:** Det å være vital: livsglede, livskraft, levedyktighet.
- **Kontaminasjon:** Oppstår når et smittestoff (oftest bakterier) fører til forurensing i kultur.
- **HSP** – Heat Shock Protein
- **EDTA** – Etylendiamintetraacetat
- **SDS-PAGE** – Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Forutsetninger og avgrensninger

Forutsetninger:

- **Nødvendig utstyr tilgjengelig** - For å kunne utføre forsøket er det nødvendig å ha alt utstyr tilgjengelig. Dette innebærer både en levende cellekultur, aktuelle reagenser og annet utstyr, som for eksempel gelkar.

Begrensninger:

- **Tidsbruk** - Tidsperioden som ble satt av til å jobbe med bacheloroppgaven var fra 09.01.19 til innleveringsdatoen, 28.05.19. Dette setter begrensninger til forsøket da det må være ferdig i god tid før fristen.
- **Økonomi** - Alt av utstyr og reagenser ble finansiert av NTNU i Ålesund.
- **Leveringstid på reagenser** - Reagenser som var aktuelle for forsøket hadde lang leveringstid. Det var derfor ikke mulig å benytte seg av disse.

1.0 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn for valg av tema

Gjennom studiet i bioteknologi har vi vært gjennom mye praktisk arbeid på laboratoriet og lært ulike laboratorieteknikker som blir hyppig brukt innenfor ulike fagområder. Et av laboratoriekursene omhandlet dyrking av adherente celler i LAF-benk og ekstraksjon av DNA. Dette var et tidkrevende laboratoriekurs i forhold til mange av de andre kursene vi hadde hatt, men det var også ett av de mest spennende. I etterkant av dette laboratoriekurset hadde alle på gruppen et ønske om å jobbe med et lignende forsøk i bacheloroppgaven.

Tema for bacheloroppgaven ble satt da vi kom over en tidligere bacheloroppgave skrevet av Stine Marie Jensen og Ørjan Dahl ved NTNU i Ålesund. Denne bacheloroppgaven omhandlet CHSE-214 celler og deres stressrespons ved ulike temperaturer. Oppgaven rettet fokus mot å finne den optimale temperaturen for proteinuttrykket av HSP70. Vi syntes dette var interessant og innenfor vårt ønskede område, og ville derfor bygge videre på denne forskningen. Videre ble det bestemt at vi skulle se på endringen i proteinekspressjon av HSP70 (70kDa) med formål om å få en dypere forståelse av stressresponsen til CHSE-214.

1.2 Problemstilling

Hvordan vil proteinuttrykket av HSP70 i CHSE-214 celler endre seg ved påføring av stress ved høy temperatur og hva kan gjøres for å optimalisere metoden?

Et av de viktigste punktene som ble sett på når problemstilling skulle velges var at den var mulig å forske på i praksis. Bacheloroppgaven består av en stor forskningsdel og derfor var det nødvendig å vite at der var tilgjengelige ressurser og utstyr. I tillegg var det viktig at det var tilgjengelige kilder som kunne støtte opp med kunnskap om emnet. Problemstillingen inneholder to spørsmål som begge kan besvares gjennom det samme forsøket. Ønsket var å kunne diskutere både resultatene av forskningen samt fremgangsmåten.

1.3 Leserveiledning

Oppgaven tar for seg relevant teori som er knyttet opp til forsøket, samt materialer og metoder som har blitt brukt på laboratoriet. Videre presenteres resultatene av analysene, etterfulgt av en diskusjon. Oppgaven avsluttes med en konklusjon og en litteraturliste.



Figur 1: Figuren viser en oversikt over alle de ulike hovedkapitlene i bacheloroppgaven. Oppgaven består av 7 hovedkapitler.

2.0 TEORI

Forskning er grundige og aktive undersøkelser som har som formål å øke kunnskap og finne ny viten. I dette forsøket studeres stressresponsen i CHSE-214 cellelinje, hentet fra kongelaks. Forskningen på disse cellene kan si noe om tilstanden cellene befinner seg i, og gi indikasjoner på om fisk har blitt utsatt for sykdom. Når en celle blir utsatt for stress forårsaket av ytre miljøfaktorer vil proteinekspressjonen av HSP70 øke. HSP70 er en del av cellens naturlige forsvarsmekanisme som beskytter mot denaturering av proteiner (2).

Industrielt sett kan denne informasjonen blant annet brukes til å gi informasjon om helsetilstanden til fisk i en merd.

Dette forsøket blir utført "in vitro" som vil si utenfor en levende organisme/på laboratoriet. Det forskes her på cellekulturer i celleflasker på laboratoriet. Grunnen til at celler blir tatt i bruk i dette forsøket er for å unngå å utsette fisk eller andre større dyr for unødvendige påkjennelser.

2.1 CHSE-214 celler

CHSE står for Chinook Salmon Embryo og er celler som er derivert fra embryoceller hos Chinook laks (*Oncorhynchus tshawytscha*) som også blir kalt kongelaks. Cellene har et epitel lignende utseende og er adherente (3).

CHSE-214 har tidligere blitt brukt i lignende celleforsøk. En forskningsrapport som ble publisert i 2005 (4) tok for seg veksten og metabolismen til Chinook Salmon Embryo celler, samt hvordan de reagerte ved mangel på glukose og glutamin. Denne rapporten forklarte hvordan CHSE-214 cellene klarte å opprettholde energibalanse på tross av mangel på næringsstoff, og konkluderte med at cellene ikke har et strengt næringsbehov (4).

2.1.1 Bakgrunn

CHSE-214 cellene er adherente som vil si at de fester seg til underlaget og er dermed begrenset til å kunne vokse på et gitt område. Dersom konfluensen blir for høy vil cellene begynne å vokse oppå hverandre noe som vil hindre tilførsel av næringsstoff (5). For at cellene skal ha optimale levetilstander og tilgang på medium må de splittes når de når en konfluens mellom 70-80%, dette er for å unngå overvekst og celledød (6). Konfluensen kan sjekkes ved hjelp av invertmikroskop.

I tidligere studier har L-15 medium vist seg å være et egnet vekstmedium for CHSE-214 cellene. Når cellene har nådd en konfluens på 80% og må subkultiveres blir de løsnet fra underlaget ved hjelp av trypsin. Cellekulturene med nytt medium blir fordelt i nye flasker i forholdet 1:2 eller 1:3, avhengig av konfluensen. Splitting av cellekulturen bør gjøres hver 1-2 uker avhengig av størrelsen på flaskene (7). CHSE-214 cellene har en plating efficiency på $10,2 \pm 2,5\%$ og en fordoblingstid på $2,2 \pm 0,3$ dager avhengig av om cellene har tilgang på de riktige levevilkårene for optimal vekst (3).

2.1.2 Levevilkår

Levevilkårene til en celle sier noe om hvilke forhold som må ligge til rette for at en celle skal ha optimale forhold for å kunne vokse og dele seg. Levevilkår som må ligge til rette er blant annet riktig temperatur, pH, konfluens, mengde lys, valg av medium og tilsetningsstoffer som antibiotika og andre supplementer. Celler kan bli utsatt for kontaminasjon selv om de er tilsatt stoff som skal være med på å forhindre at det oppstår, det er derfor viktig å bruke riktig sterilteknikk på laboratoriet. I celleforsøk blir vanligvis laminar flow cabinet (LAF-benk) tatt i bruk, benken steriliserer luft gjennom et filter. Dette gjøres for å forhindre at kontaminanter havner på innsiden av kabinettet (8). Ved dyrkning av CHSE-214 celler er det nødvendig å tilpasse levevilkårene for denne type celler. Cellene egner seg å dyrke både i celleflasker og på cellebrett, hvor de trives godt i temperatur på rundt 20 °C under en atmosfære av karbondioksid (7). Ifølge produsenter av CHSE-214 celler anbefales det også å dyrke dem i mørket (9). Cellene trives best ved en pH rundt 7,4-7,6 (10).

Cellene tilføres L-15 medium som er beregnet på blant annet embryonale celler. Mediet er buffret av fosfater og frie base-aminosyrer istedenfor natriumbikarbonat. Mediet er laget for å støtte cellevekst i miljø som ikke er i CO₂-likevekt.

L-15 medium for bruk på CHSE-214 celler er modifisert som følgende:

Tabell 1: Tabellen viser en liste over reagenser brukt i L-15 medium som er tilpasset forsøk med CHSE-214 celler. Venstre kolonne viser hva som er med, og høyre kolonne viser hva som ikke er med.

Med	Uten
• Galaktose	• Glukose
• Phenol Red	• HEPES
• GlutaMAX™	• Sodium Bikarbonat
• Sodium Pyruvat	

L-15 medium minimerer oppbygging av giftig ammonium og øker cellevitaliteten og veksten. På grunn av at L-15 medium ikke inneholder proteiner, lipider eller vekstfaktorer kreves det supplementering, og det mest vanlige supplementet å bruke er 10% FBS (11).

FBS står for fetal bovine serum og er avledet fra kalvefoster. Serumet blir hyppig brukt for å holde celler i live over lengre tidsperioder. FBS er en kompleks mikstur som inneholder mange ulike komponenter som for eksempel vekstfaktorer, proteiner, vitaminer, sporelement og hormoner som er nødvendige for vekst og vedlikehold av cellekulturen (12).

I tillegg til å tilsette FBS blir ofte gentamicin tilsatt som en komponent i mediet. Gentamicin er antibiotika som har vist seg å være svært effektivt mot et vidt spekter av organismer. Den største fordelen med gentamicin er at det holder andre kontaminanter borte samtidig som det ikke er giftig for cellekulturen. Gentamicin er stabilt over et bredt pH-område, termostabilt og påvirker ikke virusstabilitet, replikasjon eller produksjon av interferon. Anbefalt dose er 0,5 til 50 µg/ml (13).

2.1.3 Stressrespons og proteinekspressjon av HSP70 i celler

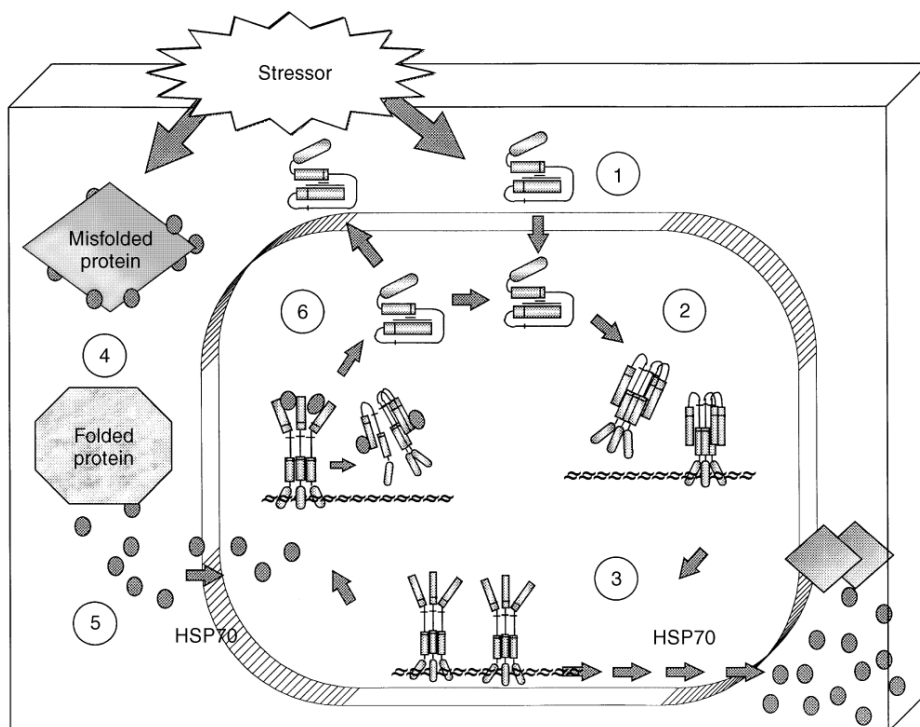
Celler vil gjennom sin levetid møte mange former for stimuli, både intern og ekstern, der noen av disse kan føre til stress. Stress i en celle kan føre til endret cellerespons på ulike signaler som cellen mottar, og i verste fall føre til celledød. Dersom en celle blir utsatt for stress over en lengre periode kan dette føre til skade på DNA, protein og lipid (14). Om cellen ikke klarer å reparere skadene kan det føre til utvikling av ulike sykdommer. Cellulær stressrespons er en reaksjon med endringer eller svingninger av ekstracellulære forhold som kan forårsake skade på strukturen og funksjonen til makromolekyler (14).

Ulike stressfaktorer og ulik intensitet av stress kan føre til følgende cellulære responser:

1. Føre til at cellens repareringsmekanismer blir aktivert; disse mekanismene bruker betraktelige mengder med tilgjengelige ressurser og fører ofte til bedring i normale celler.
2. Føre til en cellerespons som igjen fører til en midlertidig tilpassing til stresset.
3. Føre til autofagocytose som er en forsvarsmekanisme der cellen pakker inn og fordøyer deler av sitt eget cytoplasma (15).
4. Føre til celledød (14).

Når en celle blir utsatt for stress utløses det ofte en mekanisme kalt Heat Shock Response. Denne responsen fører til at Heat Shock Transkripsjonsfaktor (HSF) blir aktivert og binder seg til en promotorregion, kalt Heat Shock Elements (HSE), foran Heat Shock genet i DNA. Hoved Heat Shock genene inneholder ikke introner, noe som fører til at mRNA umiddelbart kan translateres til nye proteiner innen få minutter etter cellen har blitt utsatt for stress. Det finnes flere forskjellige HSFer, men bare HSF1 regulerer ekspresjonen av HSP70. Stress endrer ikke mengden av HSF1, men fører til at det går fra å være inaktivt til aktivt som resulterer i HSP70 ekspresjon (1).

I cellens normale tilstand vil HSP70 være bundet til en HSF1 monomer i cytosol. Når en celle blir stresset vil HSP70 bli dissosiert fra HSF1. Dette fører til at HSF1 går fra latent form til aktiv form og fraktes inn i cellekjernen. HSF1 binder seg deretter til HSE av HSP70 genpromotoren. Videre blir HSP70 genet transkribert, noe som resulterer i HSP70 ekspresjon. Transkripsjonen av nye HSP70 fortsetter så lenge det er behov. HSP70 fraktes ut i cytosol for å reparere denaturerte proteiner sammen med andre HSP70. Etterhvert som proteiner får sin native form, øker konsentrasjon av frie HSP70 i cytosol. Dette fører til at HSP70 binder seg til HSF1 i kjernen slik at det løsner fra DNA, og transkripsjonen avsluttes. HSF1 går deretter tilbake til latent monomer form, se *figur 2* under (1).



Figur 2: Modell av rollen til HSF1 i reguleringen av Heat Shock Protein ekspresjon. 1. Latent monomer form av HSF1 i cytosol. 2. Aktivisering av stress som fører til at HSF1 binder seg til promotoren. 3. Transkripsjon og translasjon av HSP70. 4. Cytosoliske HSP70 som reparerer denaturerte proteiner. 5. Frie HSP70 i cytosol. 6. Økt konsentrasjon av HSP70 som resulterer i binding til HSF1 (1).

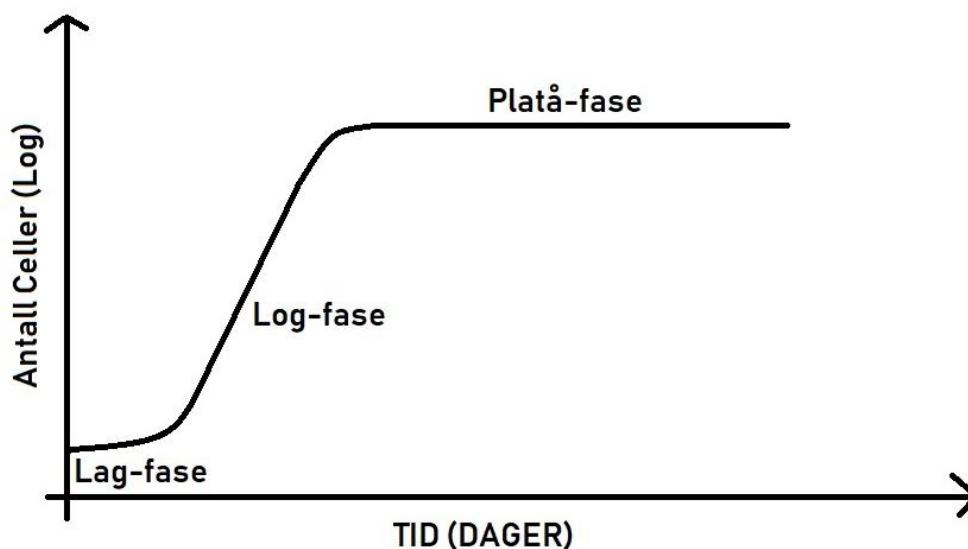
2.1.4 HSP og HSP70

Heat Shock Proteiner (HSP) ble opprinnelig oppdaget i *Drosophila melaogaster* celler som ble utsatt for forhøyede temperaturer, og fikk navnet derfra. Mer nylig, viser det seg at Heat Shock Proteiner uttrykkes når celler blir stresset av ytre miljøfaktorer, ikke bare temperatur, for å beskytte seg mot ytre påvirkninger. Dette kan være ved varmesjokk, oksidativt stress eller for eksempel ved tilstedeværelse av tungmetaller. Heat Shock Proteiner vil også øke sjansen for overlevelse ved at de assosieres med denaturerte eller delvis utfoldede proteiner, hvor de beskytter proteinene mot ytterligere denaturering og fremmer proteinfolding. HSPer uttrykkes kontinuerlig i cellene, også i normalt tilstand, slik at den er i stand til å fremme proteinfolding hele tiden. Under stress vil cellen uttrykke mer HSP enn normalt (2). Heat Shock Proteiner er også kategorisert etter sin funksjon, DNA sekvens, og størrelse. De mest vanlige gruppene er 90 kDa, 70 kDa og 60 kDa, og er vanligvis referert til som HSP90, HSP70 og HSP60 (1).

HSP70 er en av de mest konserverte HSPer som er funnet i alle studerte celler, unntatt nesledyr. HSP70-familien er en gruppe proteiner som er essensielle molekylære chaperoner som spiller en viktig rolle i proteinbiogenese, transport og degradering. Chaperoner er proteiner som hindrer aggregering av andre proteiner som produseres i cellen og hjelper dem til å folde seg til en korrekt struktur (16). Strukturen til HSP70 chaperoner består av to store domener. N-terminale eller ATPase domenet som binder og hydrolyserer ATP, og det C-terminale domenet som er nødvendig for polypeptidbinding. Et samarbeid mellom begge domene er nødvendig for proteinfolding (17, 18).

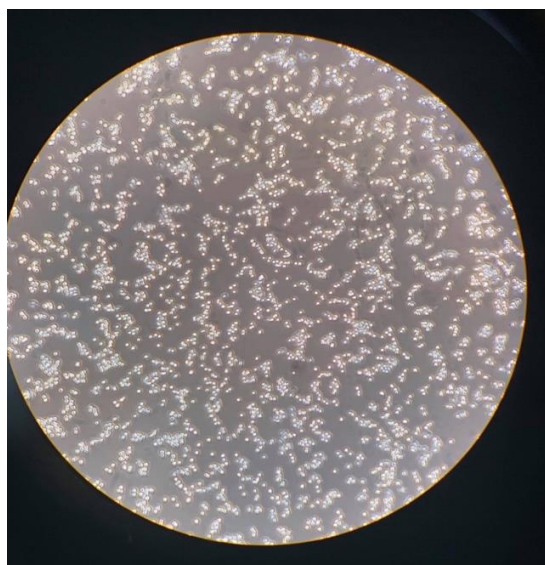
2.1.5 Splitting av celler ved hjelp av Trypsin

Celler sin vekst går gjennom tre faser: lag-fase, log-fase og platå-fase, se *figur 3* under. I lagfasen vil cellene ha lite eller ingen vekst. Grunnen til liten vekst kan være tilvenning til nye omgivelser etter at cellene nylig har blitt splittet eller trypsinert. I logfasen vil antall celler øke eksponentielt, hvor nesten alle cellene deler seg og det skjer en fordobling. I platåfasen vil celleantallet avta eller holdes konstant, her dekker cellene hele bunnen i celleflasken og konfluensgrensen er nådd (19).



Figur 3: En grafisk fremstilling av lag-fase, log-fase, og platå-fase. X-aksen viser tid og y-aksen viser cellekonsentrasjon.

På grunn av at CHSE-214 celler vokser adherent og fester seg til underlaget de vokser på, må de løsnes før de splittes. Dette gjennomføres ved en konfluens rundt 70-80%. *Figur 4* under viser celler som har blitt trypsinert for å løsne dem fra underlaget.



Figur 4: Figuren viser CHSE-214 som er tilsatt trypsin og løsnet fra underlaget.

Når adherente celler skal splittes kan 0,25% Trypsin-EDTA benyttes. Trypsin er et enzym med proteolytisk effekt som brukes for å løsne cellene fra underlaget. Dette skjer ved at trypsin bryter ned proteinene som fester cellene til underlaget. Trypsin virker hovedsakelig på den C-terminale enden av Lysin eller Arginin. Trypsin trenger litt tid for å kunne virke, men ved for lang inkuberingstid kan man risikere at trypsin begynner å bryte ned overflateproteinene til cellene, noe som vil føre til celledød.

Basert på celletype og applikasjon blir trypsin dannet med ulike tilsetningsstoffer og konsentrasjoner. Etylendiamintetraacetat (EDTA) er et slikt tilsetningsstoff. EDTA vil binde kalsium- og magnesiumioner som normalt hemmer trypsinaktivitet (20).

For at trypsineringen skal være så effektiv som mulig er det viktig å vaske grundig bort rester av medium, da FBS i mediet har en inhiberende effekt på trypsin. Av denne grunn brukes også medium for å inaktivere trypsin etter en gitt tid, dette for å unngå skade på overflateproteinene (19).

2.1.6 Tidligere studier

En studie fra 1982 publisert av *The University of Calgary* i Canada undersøkte proteinekspresjon av Heat Shock Proteiner (HSP) i Chinook Salmon Embryo (CHSE-214) celler som ble eksponert for temperaturendring. CHSE-214 celler ble dyrket i et medium tilsatt 5% fetal bovine serum (FBS) og 0,15% natriumbikarbonat ved 20 °C under en atmosfære av karbondioksid som holdt mediet på pH 7,4-7,6. Deretter ble cellene stresset ved temperaturen 24 °C, samt kontroll ved 20 °C i 2-24 timer, hvor resultatene ble visualisert på 17% SDS-PAGE. Det viste seg at proteinuttrykket av HSP70 var høyest etter 2 timer ved 24 °C, etter 5 timer var det fortsatt en forhøyning og etter 24 timer ved 24 °C var proteinuttrykket av HSP70 nede på kontrollnivå igjen. Det ble også bevist at uttrykket av HSP var en reversibel prosess. Cellene som hadde blitt stresset i to timer ved 24 °C ble satt tilbake i 20 °C, og etter 8 timer var HSP nede på kontrollnivå igjen (10).

I en annen studie publisert av samme universitet i 1989 ble det også undersøkt endringer i proteinekspresjon av Heat Shock Proteiner ved temperaturendringer i CHSE-214 cellelinje, i tillegg til metallothioneins (MTs). MTs er en gruppe proteiner som er cysteinrik og tungmetall bindende. Cellene ble dyrket ved 18 °C, og for Heat Shock Protein analyse ble de inkubert ved 26 °C, i en periode på 1 til 120 timer. Resultatene ble presentert på 7-17% SDS-PAGE. CHSE-214 syntetiserte en rekke polypeptider når de ble inkubert ved 26 °C. Proteinene som hadde høyest uttrykk ved varmesjokk var 70 kDa, eller HSP70. Andre proteiner som 95, 84, 74 og 28 kDa var også syntetisert. CHSE cellene syntetiserte ikke MTs i respons med varmesjokk (21).

I en nyere studie presentert av BioOne (2000) ble ekspresjon av HSP70 og HSP90 under ulike stressfaktorer undersøkt, hvorav temperatur var en. CHSE-214 celler ble dyrket ved 18 °C i et medium tilsatt 10% fetal bovine serum (FBS) som inneholdt 1% penicillin/streptomycin (PS). Cellene som ble utsatt for varmesjokk ble inkubert ved 24 °C i 3, 6 og 9 timer. Cellene ble lysert og proteiner isolert ved hjelp av 10% trikloreddiksyre (TCA) og natriumdodecylsulfat (SDS) lyseringsbuffer. Resultatene ble presentert på 10% SDS-PAGE. Ved varmesjokk på 24 °C var proteinuttrykket av HSP70 mye høyere enn HSP90 i CHSE-214 cellene. Proteinuttrykket av HSP70 var høyest i innledende fase (3 timer), og etter 6-9 timer var uttrykket av HSP70 nede igjen på kontroll nivå. Mellom 3-6 timer ved varmesjokk var det en antydning til proteinuttrykk av HSP90, men ble gradvis redusert etter 6 timer (22).

I en tidligere bacheloroppgave (2018) gjennomført ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU) ble det etablert og optimalisert en metode for å studere stressrespons hos CHSE-214 celler, hvor også temperatur ble undersøkt. Resultatene viste at ved 29 °C var proteinuttrykket av HSP70 høyest etter 1 time sammenlignet med 20 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 30 °C og 37 °C, men var tilnærmet likt kontrollnivå etter 3 timer (23).

2.2 Proteinisolering

Ved proteinisolering prøver man å isolere ut så mye proteiner som mulig fra en aktuell prøve. Det finnes mange forskjellige metoder for å isolere proteiner fra celler, og disse deles som regel inn i to kategorier: de utbredte metodene og de biologiske metodene. Felles for disse metodene er at de lyserer cellene for å ekstrahere proteiner som ligger i cytosol. Det er vanligst å bruke en lyseringsbuffer når man skal isolere ut proteiner. Under lysering vil cellemembranen enten bli delvis eller fullt nedbrutt. Som en konsekvens av dette vil hydrolaser (fosfataser, glykosidaser og proteaser) være tilstede i en homogen proteinløsning og kan potensielt endre proteinkomposisjonen til de lyserte cellene (24). Derfor er det anbefalt å gjøre lysering og ekstraksjon i kalde omgivelser, helst så nært 0 °C som mulig for å være sikker på at det ikke er noe enzymaktivitet som kan denaturere proteiner. Noen proteaser kan også være resistente mot temperatur, og det er derfor vanlig at lyseringsbufferne inneholder proteaseinhibitorer, for eksempel EDTA (25). Etter endt isolering er det mulig å fortsette med videre forsøk, eller fryse ned proteinlysate. Dersom proteinlysate skal fryses ned kan det ligge lagret opptil en uke ved -20 °C (26).

2.2.1 RIPA buffer

RIPA buffer er en av de mest pålitelige bufferne som brukes til å lysere dyrkede celler. Bufferen muliggjør proteinutvinning fra cytoplasmatiske membraner og kjerneproteiner. RIPA inneholder ikke proteaseinhibitorer, noe som må tilsettes dersom det er nødvendig. Det er anbefalt at bufferen er satt på is en god stund før bruk for å sikre at den er 0 °C. RIPA bufferen er en optimal lyseringsbuffer for proteinisolering i mange forskjellige celletyper ettersom den inneholder tre ikke-ioniske og ioniske detergenter (27).

2.3 Qubit analyse

Ved en ekstraksjon av proteiner kan det være optimalt å gjøre en effektiv analyse for å bekrefte tilstedeværelse av proteiner i prøven før en tar den med til videre undersøkelser. Qubit er et fluorometer som brukes for å gjøre en nøyaktig og sensitiv kvantitetsmåling basert på fluorescens av en prøve (28). Qubit fluorometer bruker fluorescerende fargestoffer som er spesifikke for molekylene av interesse. Disse fargestoffene avgir bare fluorescens når de er bundet til målmolekylene, selv ved lave konsentrasjoner. Qubit er antatt å ha større presisjon enn andre UV absorbanse analyse metoder da den kan skille mellom DNA, RNA, nukleotider og proteiner. Dette gjør at Qubit ofte brukes og foretrekkes som metode for referanseanalyse til forsøk (29). En begrensning med Qubit instrumentet er dens deteksjonsgrense. Qubit kan detektere konsentrasjoner i spennet 12,5 µg/mL til 5 mg/mL (30). Dette kan være en begrensning å ta i betraktning om en skal gjøre analyser hvor det kreves konsentrasjoner utenfor deteksjonsområdet. Dette gjelder spesielt ved større konsentrasjoner.

2.4 SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) er en proteinanalyse teknikk som er universelt brukt i ulike disipliner som biokjemi, immunologi, virologi og cellebiologi (31). Proteiner blir separert av polyakrylamid i gelmatrix ut ifra molekylstørrelsen (32, 33). SDS-PAGE kommer i forskjellige akrylamid konsentrasjoner. Det er akrylamiden som separerer proteinene fra hverandre i gelen. Ved å justere konsentrasjonen av akrylamid, som løst i vann er polyakrylamid, justerer man størrelsen på maskenettverket i gelen sin matrix (34). Konsentrasjonen av polyakrylamid i en SDS-PAGE er som oftest fra 4 til 20 prosent. Dette er fordi geler utenfor disse konsentrasjonene har vist seg å være for skjøre eller sprø. Slike geler klarer ikke å stå imot den fysiske manipuleringen som kreves for visualisering av protein (31).

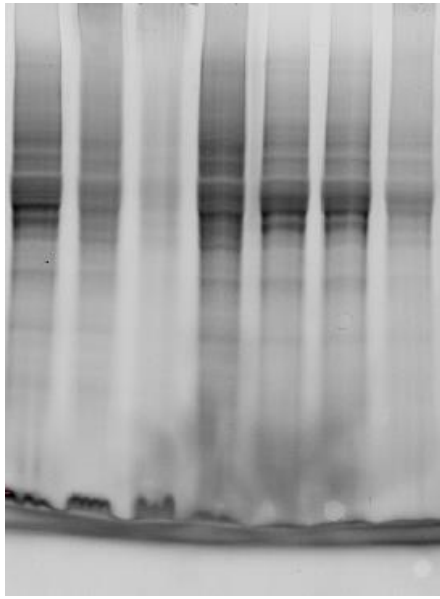
Natriumdodecylsulfat (SDS) sammen med denatureringsmidler denaturerer proteiner totalt i separasjonen slik at de kan vandre langstrakt i gelen. I tillegg til å denaturere binder SDS seg ikke-kovalent til proteinene. Dette medfører tre ting:

1. At proteinene får en negativ ladning siden SDS er negativ.
2. En lik ladning til masseratio. Dette fordi SDS binder seg 1,4 gram per 1 gram protein.
3. Proteinene får en lang utstruktet form istedenfor en kompleks tertiær konformasjon (33).

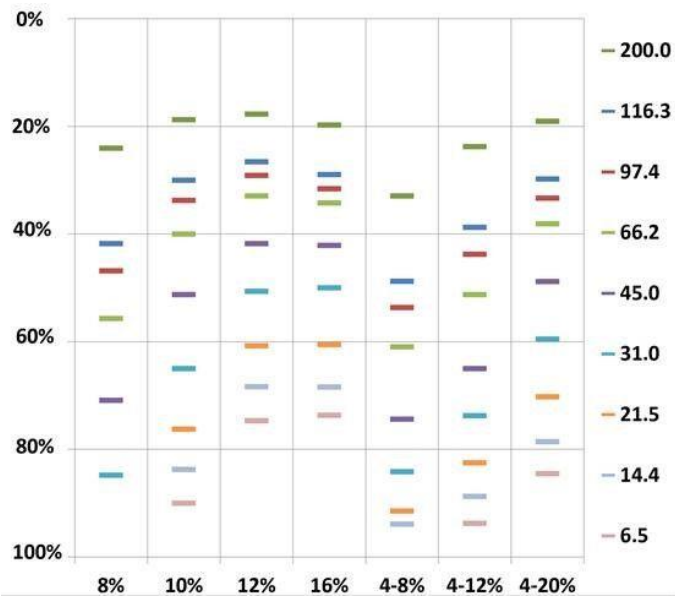
I tillegg til å være en styrke med SDS-PAGE er dette også en limitasjon for analysemetoden. Alt SDS gjør med proteinene man vil analysere fører til at en ikke kan bestemme enzymaktivitet, proteinbindingsinteraksjoner eller detektere kofaktorer på en SDS-PAGE (32).

Når en analyserer prøver av proteiner fra cellekulturer vil prøvematerialet variere i konsentrasjon. Fra celleflaske til celleflaske vil det være en variasjon i vitaliteten, konfluensen og proteinuttrykket. Totalsummen av disse og andre faktorer gir konsentrasjonen av proteiner i prøven. For gode resultater på gel bør man ha en viss proteinkonsentrasjon. Det er anbefalt at konsentrasjonen av proteiner ikke underskriver 0,5 mg/mL i en prøve (33). Konsentrasjoner under 0,5 mg/mL vil gi svake svar som er vanskelige å tolke. I tillegg kan for høy konsentrasjon medføre et overtrykk i SDS-PAGE som vil ødelegge analysen. Det er altså nødvendig å finne en gylden middelvei mellom for lav og for høy konsentrasjon i prøven som settes på gel.

10% til 12% SDS-PAGE er de mest brukte gelene for visualisering av protein. Spesielt når en skal detektere proteiner som er mellom 15-250 kDa (35). En kan se på *figur 6* under at en 12% SDS-PAGE kan detektere mindre proteiner enn 15 kDa, men det vil være mye støy rundt disse, noe en kan se på *figur 5* under. *Figur 6* viser i hovedsak at man bør bruke akrylamid konsentrasjonen som passer best den eller de proteinene man skal analysere, dess mindre konsentrasjon dess større proteiner.



Figur 5: Viser uttrykk av proteiner på 12% SDS-PAGE med støy i nedre del av gelen.



Figur 6: Kart over migrasjonen til proteiner ut fra deres størrelse i kDa på SDS-PAGE geler med ulike konsentrasjoner av akrylamid. Til høyre ser en kDa størrelsene, til venstre ser en prosent vandret i gelen og nederst ser en på hvilken konsentrasjon akrylamid vandringen har skjedd (35).

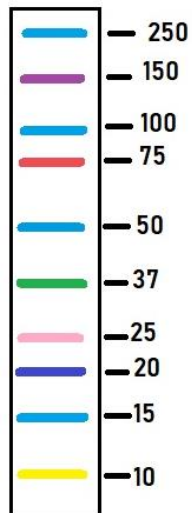
2.4.1 EZ-vision

EZ-vision er et fluorescerende fargestoff som brukes for visualisering på SDS-PAGE. Dens funksjon er å binde seg til proteiner og peptider. Løsningen blandes inn og migrerer gjennom gelen med analyseprøvene. Den optimale bølgelengden for illuminering er på 302nm og det optimale filteret for visualisering er etidiumbromidfilter (36). EZ-vision fungerer både som visualiseringsfargestoff og som loading dye som holder proteinprøvene nede i brønnene før analyse.

2.4.2 Molekylvekter

Molekylvekter for protein brukes som referanseproteiner for å identifisere spesifikke områder på en gel. Dette er gjerne områder hvor proteiner man vil undersøke befinner seg (37).

Referanseproteinene skal gjerne ha molekylvekt som omtrentlig samsvarer med proteinene man undersøker. En kan i dag kjøpe mange ferdiglagde molekylvekter for protein. Disse kan være ferdig farget eller fargefri slik at man kan farge dem med egen ønsket løsning før de settes på gel (38). Det er vanlig å få disse molekylvektene som proteinladdere. Slike laddere er løsninger som inneholder mange molekylvekter i ulike størrelser som vist med *figur 7* under. Eksempler på enkelt molekylvekter i gel kan en se på *figur 16* (vedlegg A.4.3) i brønnene T og B på 23 kDa og 68,5 kDa.

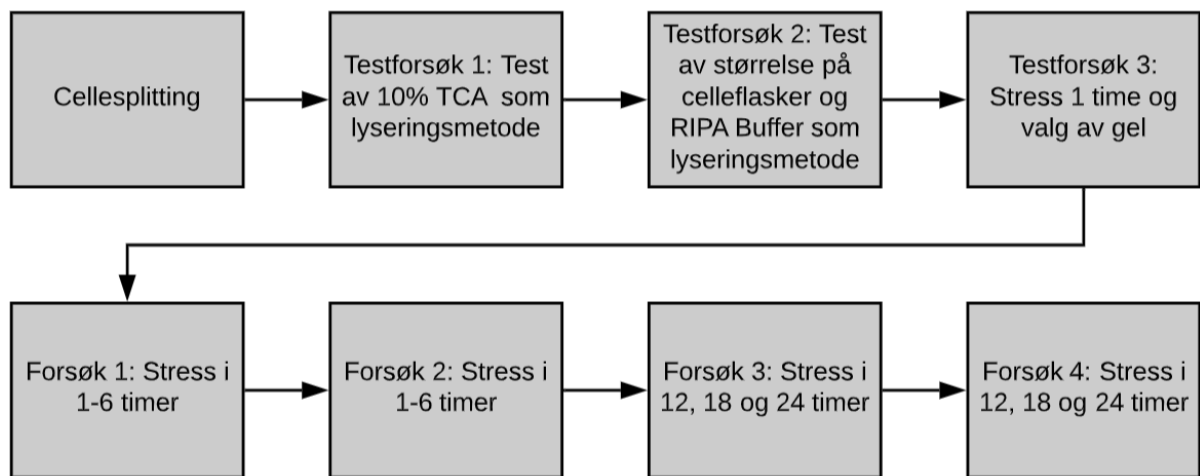


Figur 7: Illustrasjon av hvordan en proteinladder med molekylvekter fra 10 kDa til 250 kDa kan se ut når strukket ut på en gel.

2.5 Optimalisering av prosedyrer

Optimalisering av en prosess gjøres for å få frem best mulig resultat. Dette oppnås ved å gjøre en prosess så god som mulig og bringe den til et optimum under de betingelsene som er gitt (39). Optimalisering av et hvilket som helst forsøk på et laboratorium er avhengig av at man har planlagt forsøket gjennom en workflow som er tilpasset til reagenser og annet utstyr tilgjengelig på laboratoriet. I de fleste typer forsøk har forsøksgruppen selv ansvar for å sikre at laboratoriet har komponentene som trengs for å kunne utføre forsøket. Dette må bestilles inn i god tid før forsøket skal begynne, og man må etter mottagelse av komponentene vite hvordan disse skal lagres og behandles. Et forsøk kan være tidkrevende og gå over flere uker/måneder/år. Det er derfor viktig at man optimaliserer forsøket slik at det blir mest mulig tidseffektivt uten at det går utover kvaliteten. Ulike forsøk har forskjellige deler man kan se på når man skal optimalisere en metode. I et forsøk som omhandler celler, proteinekstraksjon og SDS-PAGE kan man blant annet optimalisere mengden med protein som ekstraheres. Dette kan gjøres ved å bruke ulike metoder for dyrkning og ekstraksjon. Man kan også se på ulike geler for å finne den som gir best mulig visuelt resultat, og man kan justere temperaturen som cellene gror eller stresses på for å påvirke proteinkonsentrasjonen og tilstanden som cellene befinner seg i (40).

3.0 MATERIALER OG METODER



Figur 8: Figuren viser et flytskjema over alle forsøkene som ble gjennomført. Cellesplitting ble gjennomført kontinuerlig også mellom forsøkene. Testforsøk 1, 2 og 3 var forsøk for å optimalisere prosedyren. Forsøk 1 og 2 var stressforsøk i 1-6 timer ved 26 °C, gjort ved to forskjellige dager. Forsøk 3 og 4 var stressforsøk i 12, 18 og 24 timer ved 26 °C, gjort ved to forskjellige dager. Detaljert oversikt over alle forsøkene er vist i tabell 4 (vedlegg A.2).

3.1 Dyrking av CHSE-214 celler

Tillaging av L-15 medium (Gibco, A: 31415-029) ble gjennomført ut ifra tabell 2 under.

Fetal bovine serum (Gibco, A: A3160801) ble tint opp til romtemperatur før den ble tilsatt i L-15 medium sammen med gentamicin (Gibco, A: 15750-037).

Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over reagenser og volum brukt for å lage til medium

Reagens	Volum
L-15 Medium (1X) + GlutaMAX	500 mL
Fetal Bovine Serum (FBS), One Shot	50 mL
Gentamicin (50mg/mL)	0,5 mL

En batch med CHSE-214 celler ved p=249 ble tatt ut fra nitrogentank med flytende nitrogen. Når ca. 50% av cellekulturen var tint ble 1 mL L-15 medium tilsatt. Cellekulturen ble deretter resuspendert med L-15 medium til en 75 cm² celleflaske.

CHSE-214 cellene ble dyrket i 75 cm² celleflasker i et inkubatorskap ved 20 °C. Cellene ble kontinuerlig observert gjennom uken i invertermikroskop, for å sjekke cellekonfluensen. En konfluens mellom 70-80% var tilstrekkelig for å splitte cellekulturen. Cellekulturen ble hovedsakelig splittet med forhold 1:2.

Når cellekulturen skulle splittes ble gammelt medium sugd av og kastet, før den ble vasket to ganger med 5 mL HBSS (GE Healthcare - Hyclone, A: SH30588.02). Deretter ble 1 mL Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco, A: 25200-072) tilsatt celleflaskene og satt på inkubering i 5-7 minutter ved romtemperatur. Ett dunk i celleflaskene ble tilført for å løsne cellene fra underlaget. De ble videre studert i invertermikroskop og når 80% av cellene hadde løsnet var trypsineringen ferdig. Trypsinen ble deretter inaktivert ved å tilsette 4 mL L-15 medium. Hele cellesuspensjonen ble overført til et 50 mL falconrør. Videre ble falconrørene sentrifugert i 3,5 minutt ved 1200 rpm. Etter sentrifugeringen ble det sjekket om det var pellet før supernatanten ble sugd av og forkastet. Først ble 1 mL L-15 medium tilsatt for å løse opp pelleten, og deretter ble 6 mL med L-15 medium tilsatt. For hver ny 75 cm² celleflaske ble det tilsatt 17 mL L-15 medium, samt 3 mL cellekultur fra falconrøret slik at totalvolumet i celleflasken ble 20 mL.

3.2 Initiering og stress ved temperatur

Cellekulturen ble studert i invertermikroskop for å se om konfluensen var ca. 80% og tilstrekkelig nok til å gå videre med forsøket. Det gamle mediet ble sugd av og forkastet før cellene ble vasket to ganger med 5 mL HBSS. Deretter ble alle celleflaskene tilført 17 mL med nytt næringsrikt L-15 medium. Celleflaskene som skulle fungere som kontroll ble plassert tilbake i inkubatorsskapet på 20 °C gjennom hele stressforsøket. Celleflaskene for stress ble satt inn i et inkubatorskap på 26 °C. De forskjellige celleflaskene ble stresset fra 1 til 6 timer, samt 12, 18 og 24 timer før proteinisolering.

3.3 Proteinisolering

RIPA buffer (Thermo Scientific, A: 89900) ble satt på is slik at den ble kald før bruk. Celleflasker ble tatt ut fra inkubatorskapet etter gitte tider. Gammelt medium ble fjernet fra celleflaskene og cellekulturen vasket med to ganger 5 mL HBSS. Det gamle mediet ble tatt vare på sammen med HBSS som ble brukt til vasking. Det ble så tilsatt 1 mL trypsin til celleflaskene slik at de adherente cellene løsnet fra underlaget ved inkubering i 5-7 minutter

ved romtemperatur. Det ble tilsatt 4 mL L-15 medium for inaktivering av trypsinen. Cellesuspensjonen ble så overført til et 50 mL falconrør. Det gamle mediet og HBSS som ble tatt vare på ble tilført falconrøret med sin tilhørende cellesuspensjon. Falconrøret ble deretter sentrifugert ved 1200 rpm i 4 minutter slik at cellepellet ble dannet. Etter dette ble supernatanten i falconrøret fjernet så man satt igjen med kun pelleten.

150 µL kald RIPA buffer ble så tilsatt falconrøret, som også var satt på is, for å løsne opp pelleten. Her ble i tillegg fysisk blanding med pipette utført. Cellesuspensjonen ble deretter overført til et eppendorfrør som ble lukket. Eppendorfrøret ble plassert i ett tomt 50 mL falconrør og satt på en rulle på kjøling (4 °C) i 30 minutter. Deretter ble eppendorfrøret med prøven sentrifugert på 14000 rpm i 20 minutter.

18 µL cellelysat med proteiner ble overført fra det sentrifugerte eppendorfrøret til nye eppendorfrør, hvor det ble laget til tre paralleller. Dette medførte at man fikk flere eppendorfrør med cellelysat fra en prøve.

3.4 Qubit 2.0

Tillaging av working solution (WS) ble gjort ved å fortynne Quant-iT protein reagent (Invitrogen, A: Q33221) 1:200 med Quant-iT protein buffer (Invitrogen, A: Q33221). Hvert qubitrør hadde mellom 190 µL og 199 µL WS tilført. 190 µL ble tilført rørene som skulle inneholde en av tre standarder av typen Qubit protein standard (Invitrogen, A: Q33221), mens 199 µL ble tilført qubitrørene for prøvene som skulle analyseres. Alle qubitrørene skulle ha et totalvolum på 200 µL. Dette medførte at standardene for kalibrering ble tilført ved mengden 10 µL som anvist i Assay kittet (Invitrogen, A: Q33221) sin manual, og prøvene for analyse ved mengden 1 µL. Alle rørene ble vortexet i 2-3 sekunder før de ble satt til inkubering i 15 minutter ved romtemperatur.

Det ble brukt et Qubit 2.0 fluorometer for analysering. Før prøvene kunne bli analysert måtte Qubit fluorometeret bli kalibrert. Ved å følge instruksjonene på skjermen til Qubit 2.0 ble instrumentet kalibrert ved at man satte inn de tillagde standardene i en gitt rekkefølge. Da dette var gjort ble det mulig å analysere prøvene. Første dataen man fikk av analyseringen viste konsentrasjonen av proteiner etter at den hadde blitt fortynnet i WS, oppgitt i mikrogram per milliliter. For å finne konsentrasjonen av proteinene uten fortynning valgte man videre «Calculate sample concentration». Da oppga man hvor mange mikroliter prøve

som var tilført qubitrøret. Qubit 2.0 ville da regne ut konsentrasjonen av protein i prøven før fortynning i milligram per milliliter. Det var også mulig å regne ut konsentrasjonen av proteiner ved hjelp av denne formelen:

$$c = \text{Qubit verdi} * \left(\frac{200}{1}\right)$$

3.5 Visualisering på SDS-PAGE

Før visualiseringen måtte man tilføre EZ-vision (VWR Chemicals, A: N836-1ML) til prøvene man ville analysere. Den skulle tilføres prøven i et 1:4 forhold. Da hver prøve i ett eppendorfrør var 18 µL ble det derfor tilført 6 µL EZ-vision. Deretter ble det stukket hull på eppendorflokkene med en nål slik at rørene kunne settes på koking ved 98 °C på en varmeblokk i 5 minutter.

Bufferen brukt til SDS-PAGE var 20x Running Buffer (Expedeon, A: NXB50500). Den skulle fortynnes 1:20 og man trengte cirka en liter totalt. Det ble derfor brukt 50 mL 20x Running Buffer og 950 mL destillert vann for å oppnå 1:20 forhold.

12 % SDS-PAGE gel (Expedeon, A: NXG01212) ble vasket først med destillert vann og så med Running Buffer. Gelen ble etter vask satt godt ned i gelkaret. Bufferen ble så tilsatt i det innerste karet til det var rett over brønnåpningene. Deretter ble ytterkaret fylt opp med buffer slik at totalvolumet ikke overskred 880 mL. Det ble så applisert 10 µL prøve til sin respektive brønn, pluss 5 µL Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, A: 161-0324) som ladder i egen brønn. Det ble brukt 5 µL Bovine Serum Albumin (VWR Chemicals, A: 421501J) og 15 µL Trypsin (VWR Chemicals, A: M150-1G) som molekylvekter i de senere forsøkene da det ble tomt for Kaleidoscope Prestained Standards. Etter at prøvene hadde blitt applisert ble gelkaret koblet til 200 volt i cirka 35-40 minutter til båndene hadde vandret $\frac{3}{4}$ av gelen.

Det ble brukt en ChemiDoc MP image system fra Bio-Rad til å ta bilde av den ferdige gelen. Det ble tatt ett bilde av gelen med plastdekselet på og ett uten. Dette var fordi man ikke så ladderer gjennom plastdekselet da den ikke inneholdt EZ-vision. Dekselet ble derfor tatt av og et nytt bilde ble tatt med Ultra fiolett lys (UV) slik at ladderer ble synlig på gelen sammen med båndene til prøven.

4.0 RESULTAT

4.1 Dyrking av CHSE-214 celler

CHSE-214 cellene hadde god vekst gjennom hele forsøket. Cellene hadde en hyppig vekst uten antydning til kontaminasjon, se *figur 27* (vedlegg A.5). Figuren viser celler med god vekst i en celleflaske, sett gjennom invertmikroskop. Konfluensen anslås å være rundt 80% som er optimalt for cellesplitting.

4.2 12% SDS-PAGE

Resultatene fra det første forsøket ved varmesjokk 1 til 6 timer er presentert i *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2). Molekylvekten som ble benyttet for å finne 70 kDa er vist på *figur 9* (vedlegg A.4.1). Både cellene som ble inkubert ved 20 °C og 26 °C ble påvist å ha uttrykk av proteiner rundt 70 kDa.

Det er en sammenheng mellom proteinkonsentrasjon og båndstyrke i prøven. Man må derfor ha tilnærmet lik proteinkonsentrasjon for å danne et virkelig bilde av forskjeller i proteinuttrykket. Et utsnitt av *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2) er presentert i *figur 12* og *14* (vedlegg A.4.2). De viser en sammenligning av prøver med tilnærmet like proteinkonsentrasjoner. *Figur 12* (vedlegg A.4.2) sammenligner kontroll K_a med prøve 3_c. Det vises et klart forhøyet uttrykk i området 70 kDa hos prøve 3_c i forhold til kontroll K_a. *Figur 14* (vedlegg A.4.2) sammenligner kontroll K_a med prøve 6_c. Området rundt 70 kDa viser et klart forhøyet proteinuttrykk i prøve 6_c sammenlignet med kontroll K_a. Tilhørende Qubit verdier til forsøket er presentert i *tabell 8* (vedlegg A.3.4). Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon til kontroll, 1 time, 2 timer, 3 timer, 4 timer, 5 timer og 6 timer i *tabell 8* (vedlegg A.3.4) er 4,62 mg/mL.

Resultatet fra det andre forsøket ved varmesjokk 1 til 6 timer er presentert i *figur 17* og *19* (vedlegg A.4.4). Molekylvektene Trypsin (23 kDa) og Bovine Serum Albumin (68,5 kDa) ble benyttet. Både cellene som ble inkubert ved 20 °C og 26 °C ble påvist å ha uttrykk av proteiner rundt 70 kDa. Et utsnitt av resultatene er presentert i *figur 18* og *20* (vedlegg A.4.4). *Figur 18* (vedlegg A.4.4) sammenligner kontroll K_a og prøve 2_c. Det er antydning til et svakt forhøyet proteinuttrykk i prøve 2_c i forhold til kontroll K_a. *Figur 20* (vedlegg A.4.4) sammenligner kontroll K_a og prøve 4_c. Her er det et markant forhøyet uttrykk i området rundt

70 kDa i forhold til kontroll K_a. Tilhørende Qubit verdier til forsøket er presentert i *tabell 9* (vedlegg A.3.5). Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon til kontroll, 1 time, 2 timer, 3 timer, 4 timer, 5 timer og 6 timer er 4,95 mg/mL.

Resultatet fra forsøk ved varmesjokk i 12, 18 og 24 timer er presentert i *figur 23* og *25* (vedlegg A.4.7). Molekylvektene Trypsin (23 kDa) og Bovine Serum Albumin (68,5 kDa) ble benyttet. Både cellene som ble inkubert ved 20 °C og 26 °C ble påvist å ha uttrykk av proteiner rundt 70 kDa. Et utsnitt av resultatene ble fremstilt i *figur 24* og *26* (vedlegg A.4.7). *Figur 24* (vedlegg A.4.7) sammenligner kontroll K_a med prøve 12_c og kontroll K_b med prøve 18_b. Her ser man et tilnærmet likt proteinuttrykk rundt 70 kDa i prøve 12_c sammenlignet med kontroll K_a. Prøve 18_b ser ut til å ha en tilsynelatende svak forhøyning sammenlignet med kontroll K_b. *Figur 26* (vedlegg A.4.7) sammenligner kontroll K_b og prøve 24_b, også her ser prøven ut til å ha tilnærmet likt proteinuttrykk sammenlignet med kontrollen. Tilhørende Qubit verdier til resultatet er presentert i *tabell 11* (vedlegg A.3.7). Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon til kontroll, 12 timer, 18 timer og 24 timer er 2,34 mg/mL.

Både resultatet fra første og andre forsøk ved varmesjokk i 1-6 timer viser en forhøyning ved 70 kDa etter 1 til 3 timer i forhold til kontrollene. Proteinuttrykket stiger gradvis og er høyest etter 4 til 6 timer. Resultatet fra 12, 18 og 24 timer ved varmesjokk viser en redusering av proteinuttrykket etter 12 timer, og etter 24 timer er det nede på kontrollnivå sammenlignet med kontrollene.

5.0 DISKUSJON

5.1 Dyrking av CHSE-214 celler

CHSE-214 cellene hadde relativt god og hyppig vekst gjennom hele forsøket som et resultat av at standard sterilteknikk for LAF-benk ble opprettholdt og det ble tilrettelagt for gunstige leveforhold for cellekulturen, se *2.1.2 Levevilkår*. Underveis i dyrking av cellekulturen oppstod det et avvik hvor cellekulturen fikk tilført L-15 medium med dobbel dose av FBS og gentamicin. Det ble videre bestemt å forkaste alle celleflaskene og begynne på nytt med en ny cellekultur fordi det var en risiko for at cellekulturen hadde blitt stresset av dette. Det ville da gitt et ufullstendig resultat ettersom det ville blitt vanskelig å vurdere om cellene hadde blitt stresset av mediet eller varmesjokket.

Gjennom forsøket ble det utført totalt 12 celledelinger, fra passasje 249 til 261.

Cellekulturen ble splittet kontinuerlig når konfluens på cirka 80% var nådd, for å hindre overvekst og opprettholde gunstige leveforhold, se *2.1.1 Bakgrunn*. Cellekulturen ble hovedsakelig splittet med forhold 1:2, men også 1:1 eller 1:3 avhengig av konfluens og hvor mange celleflasker som var nødvendig for videre analyser. Det var ingen antydning til kontaminasjon gjennom dyrkingen, men ved et par tilfeller ble det oppdaget celleklumper på monolaget i celleflasken, se *figur 28* (vedlegg A.5). Dette var mest sannsynlig et resultat av uopløst pellet som kom med videre i nye celleflasker. Disse celleflaskene ble forkastet da det var risiko for en ytre stressfaktor.

5.2 Stressforsøk og isolering

Etter dyrking og splitting av cellekulturen var det tilstrekkelig med celleflasker til å kjøre stressforsøk, som ble gjennomført i henhold til prosedyre, se *3.2 Initiering og stress ved temperatur*. Det ble benyttet totalt seks celleflasker til forsøkene med 1 til 6 timer, og tre celleflasker til forsøkene med 12, 18 og 24 timer. I tillegg ble det benyttet én celleflaske som kontroll til hvert enkelt forsøk som ikke ble stresset.

I tidligere studier hvor stressresponsen ble undersøkt varierte inkubasjonstemperaturene fra 24 °C til 37 °C, og inkubasjonstidene fra 1 til 120 timer, se *2.1.4 Tidligere studier*. På bakgrunn av informasjonen i disse studiene ble det bestemt å bruke 26 °C for å undersøke

endringer av HSP70. Deretter ble det bestemt at det ikke var hensiktsmessig å stresse lengre enn 24 timer ettersom tidligere studier har vist at uttrykket av HSP70 synker ned til kontrollnivå igjen etter ett døgn. I forsøket ble det brukt 9 tidsintervaller for å dekke alle de 24 timene. Følgende intervaller ble benyttet: 1 time, 2 timer, 3 timer, 4 timer, 5 timer, 6 timer, 12 timer, 18 timer og 24 timer. Da vil hele forløpet av en stressrespons være dekket ifølge tidligere studier, se *2.1.4 Tidligere studier*. Under stressforsøkene ble tiden nøye fulgt med på. Alle celleflaskene som ble utsatt for varmesjokk ved 26 °C ble tatt ut fra inkubatorskapet nøyaktig etter sin gitte tid.

Isoleringsprosessen startet direkte etter endt stressforsøk i henhold til prosedyre, se *3.3 Proteinisolering*. Det ble sørget for at isoleringsprosessen tok like lang tid for hver enkelt prøve for å unngå avvik. Ettersom ekspresjonen av HSP70 er en reversibel prosess vil celler som er stresset eller isolert ved ulik tid gi et varierende resultat, se *2.1.4 Tidligere studier*. Forsøkene ved varmesjokk 1 til 6 timer ble isolert i en uavbrutt prosess hvor isoleringsprosessen tok like lang tid for hver enkelt prøve. Forsøkene ved varmesjokk 12, 18 og 24 timer hadde en flaskehals ved første sentrifugering, for dannelse av pellet, på grunn av manglende kapasitet på tilgjengelige sentrifuger. Dette medførte forsinkelser under isoleringsprosessen, som igjen kan ha hatt en innvirkning på proteinkonsentrasjonene etter endt isolering.

5.3 Visualisering på SDS-PAGE 12%

Det ble gjennomført totalt seks SDS-PAGE forsøk: tre forsøk for 1-6 timer stress og tre forsøk for 12, 18 og 24 timer stress i henhold til prosedyre, se *3.5 Visualisering på SDS-PAGE*. I alle forsøkene ble det gjennomført Qubit analyse hvor proteinkonsentrasjonene ble målt. På grunn av ulike konsentrasjoner i parallellene blir prøver med tilnærmet lik Qubit verdi sammenlignet. Dette fordi prøver med ulik verdi vil gi et unøyaktig sammenligningsgrunnlag. For å sikre lik avstand på proteinbåndene ble alle gelene kjørt i 35-40 minutter ved 200V.

Det første forsøket for 1-6 timer stress er presentert i *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2). På figurene er ikke ladder fremstilt, ettersom denne forsvant under elektroforesen, da det ikke ble tilsatt EZ-vision. Derfor ble ladderene Kaleidoscope Prestained Standards, se *figur 9*

(vedlegg A.4.1), fra et tidligere forsøk brukt for å finne området ved 70 kDa, samt for å sammenligne proteinbåndene.

Et utsnitt av *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2) er presentert i *figur 12* og *14* (vedlegg A.4.2). Prøve 3_c (*figur 12*) og 6_c (*figur 14*) stresset i 3 og 6 timer ble sammenlignet med kontroll K_a (*figur 12* og *14*). Prøvene og kontrollen hadde tilnærmet like Qubit verdier på henholdsvis 4,71, 4,71 og 4,74 mg/mL, se *tabell 8* (vedlegg A.3.4), som gjorde det mulig å sammenligne disse med hverandre. Prøvene 3_c og 6_c viste et forhøyet uttrykk av proteiner rundt 70 kDa i forhold til kontroll K_a. Prøve 3_c hadde et tydelig forhøyet uttrykk sammenlignet med kontroll K_a, men prøve 6_c hadde høyest proteinuttrykk sammenlignet med prøve 3_c og kontroll K_a. Proteinkonsentrasjonen i Qubit analysen var jevn, se *tabell 8* (vedlegg A.3.4), noe som gjenspeiles i *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2)

I tidligere studier ble det vist høyest proteinuttrykk av HSP70 etter 2 timer, og en fortsatt forhøyning i proteinuttrykk etter 5 timer, se *2.1.4 Tidligere studier*. I *figur 11* og *13* (vedlegg A.4.2) kan man se en forhøyning av proteinuttrykk i området 70 kDa etter 2 timer. Etter 4-5 timer er proteinuttrykket ved 70 kDa høyest, men viser fortsatt en forhøyning etter 6 timer. Forskjellen i proteinuttrykket ved 70 kDa mellom dette forsøket og den tidligere studien publisert av BioOne (2000), se *2.1.6 Tidligere studier*, ligger antagelig i inkubasjonstemperaturen. Den tidligere studien brukte en inkubasjonstemperatur ved 24 °C og dette forsøket hadde inkubasjonstemperatur ved 26 °C.

Det andre forsøket for 1-6 timer stress er presentert i *figur 17* og *19* (vedlegg A.4.4). På grunn av mangel på Kaleidoscope Prestained Standards og lang leveringstid, ble trypsin (23 kDa) og BSA (68,5 kDa) benyttet som molekylvekter. Det ble benyttet kun én kontroll, på grunn av begrenset antall brønner per gel. Som vist i *figur 15* og *16* (vedlegg A.4.3) har proteinbåndene og parallellene varierende styrker. Tilhørende Qubit verdier til forsøket er vist i *tabell 9* (vedlegg A.3.5). Tabellen viser en større spredning i proteinkonsentrasjoner enn forrige Qubit analyse, se *tabell 8* (vedlegg A.3.4), som kan forklare den varierende styrken. Årsaker til denne spredningen kan være unøyaktig pipettering, menneskelige feil, proteiner som ikke er ordentlig denaturert og/eller forskjeller i de forskjellige cellekulturene før påført stress.

For å avdekke mulige feilkilder ble det gjennomført ny elektroforese, se *figur 17* og *19* (vedlegg A.4.4). Resultatene fra *figur 17* (vedlegg A.4.4) viser at parallellene 1_a, 1_b, 1_c har sterkere proteinbånd enn parallellene 2_a, 2_b, 2_c, noe som gjenspeiles i Qubit analysen, se *tabell 9* (vedlegg A.3.5). Proteinkonsentrasjonene fra Qubit analysen til parallellene 1_a, 1_b, 1_c var 4,37 mg/mL (1_a), 4,20 mg/mL (1_b), 4,51 mg/mL (1_c) i forhold til parallellene 2_a, 2_b, 2_c som hadde svakere proteinbånd og konsentrasjonene: 3,50 mg/mL (2_a), 3,73 mg/mL (2_b) og 3,74 mg/mL (2_c).

Et utsnitt fra *figur 17* og *19* (vedlegg A.4.4) er presentert i *figur 18* og *20* (vedlegg A.4.4). Prøve 2_c (*figur 18*) og 4_c (*figur 20*), stresset i 2 og 4 timer, ble sammenlignet med kontroll K_a (*figur 18* og *20*). De øvrige prøvene hadde varierende proteinkonsentrasjoner og var dermed vanskelige å vurdere, se *tabell 9* (vedlegg A.3.5). Prøve 2_c sammenlignet med kontroll K_a viste tilnærmet likt proteinuttrykk. Prøve 4_c sammenlignet med kontroll K_a viste et klart forhøyet proteinuttrykk. En mulig påvirkning til den store forskjellen i proteinuttrykket mellom prøve 4_c og kontroll K_a kan være ulikheten i proteinkonsentrasjon på 0,18 mg/mL, se *tabell 9* (vedlegg A.3.5).

Avsluttende forsøk for stress i 12, 18 og 24 timer ble gjennomført ved 26 °C. I det første forsøket ble proteinbåndene i brønn K_a, 18_a, 18_b, 18_c, 24_a, 24_b og 24_c utydelige, se *figur 21* (vedlegg A.4.5). Tilhørende Qubit verdier til det første forsøket, se *tabell 10* (vedlegg A.3.4), ga gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon på 1,98 mg/mL, noe som ble ansett å være lavt. En ny Qubit analyse ble gjennomført for å avdekke mulige feilkilder til de lave konsentrasjonene. Denne analysen ga gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon på 2,31 mg/mL. Ettersom begge analysene fikk lave verdier ble det besluttet å kjøre et nytt forsøk.

Det andre forsøket er fremstilt på *figur 22* (vedlegg A.4.6). Tilhørende Qubit verdier til forsøket er presentert i *tabell 11* (vedlegg A.3.7). Gjennomsnittlig konsentrasjon var på 2,34 mg/mL. Dette forsøket ga tydeligere resultater enn det første forsøket til tross for at begge hadde lav gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon. Det ble likevel gjennomført en ny elektroforese ettersom brønnene 18_a, 18_b, 18_c var for svake til å tydes. Resultatet fra elektroforesen er presentert på *figur 23* og *25* (vedlegg A.4.7).

Et utsnitt av *figur 23* og *25* (vedlegg A.4.7) er presentert i *figur 24* og *26* (vedlegg A.4.7). Prøve 12_c (*figur 23*), stresset i 12 timer, viste et tilnærmet likt proteinuttrykk sammenlignet

med kontroll K_a. Prøve 18_b (*figur 23*), stresset i 18 timer, sammenlignet med kontroll K_b viste en svak forhøyning i proteinuttrykk, og prøve 24_b (*figur 25*), stresset i 24 timer, sammenlignet med kontroll K_b viste tilnærmet likt proteinuttrykk. Området rundt 70 kDa i prøvene stresset i 12, 18 og 24 timer viste at kontrollene og prøvene hadde tilnærmet likt proteinuttrykk.

I tidligere studier har det blitt vist at ekspresjonen av HSP70 er nede på kontrollnivå igjen etter 9-24 timer, se *2.1.6 Tidligere studier*. Prøven stresset i 18 timer hadde tilsynelatende svak forhøyning av proteinuttrykk sammenlignet med kontrollen, men på grunn av svært lave Qubit verdier og utydelig resultat er det ikke mulig å bekrefte denne påstanden. Prøvene stresset i 12 og 24 timer sammenlignet med kontrollen hadde ikke forhøyet proteinuttrykk, noe som støtter teorien om at proteinuttrykket har gått ned til kontrollnivå, se *2.1.6 Tidligere studier*. Qubit verdiene til de avsluttende forsøkene var gjennomgående lave gjennom alle analysene som ble utført. De lave konsentrasjonene kan være en konsekvens av det langvarige stresset, da det kan ha ført til skade på DNA og proteiner hos cellene. Dette vil føre til at en lavere mengde med proteiner uttrykkes, se *2.1.3 Stressrespons og proteinkonsentrasjon av HSP70 i celler*.

5.4 Optimalisering av prosedyre

Optimalisering av prosedyre var nødvendig for å oppnå et rent og nøyaktig resultat på SDS-PAGE. Her er det mange ulike faktorer som spiller inn og hvert trinn i prosedyren må optimaliseres. Utfordringen er å finne en metode som isolerer ut nok proteiner uten å denaturere eller ødelegge dem før de blir tilsatt i brønnene. SDS-PAGE skal i teorien gi bånd en kan tyde ved en proteinkonsentrasjon på 0,5 mg/mL i en prøve, se *2.4 SDS-PAGE*. Det ble erfart gjennom forsøkene at en konsentrasjon rundt 4-5 mg/mL ga gode og tydelige proteinbånd. Forskjellige ekstraksjonsmetoder ble testet for å finne ut hvilken metode som ga høyest proteinkonsentrasjon, dette ble målt med Qubit 2.0 fluorometer. Første ekstraksjonsmetode brukte 10% TCA og 95% iskald etanol, for å lysere cellene og isolere ut proteinene. Proteinkonsentrasjonene etter første ekstraksjonsmetode ga en gjennomsnittlig konsentrasjon på 2,87 mg/mL på de tre parallellene, se *tabell 5* (vedlegg A.3.1). På SDS-PAGE ble også proteinbåndene svake (ikke data), og det ble konkludert med at TCA ikke var optimalt å bruke på grunn av den lave proteinkonsentrasjonen og svake proteinbånd. Videre ble en ekstraksjonsmetode med RIPA lysesbuffer testet, se *3.3 Proteinisolering*, for metode. RIPA bufferen ga høyere proteinkonsentrasjonsverdier enn TCA ved Qubit analyse. Ved første testforsøk med RIPA buffer ble ikke gammelt medium og HBSS tatt vare på. Dette medførte en gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon på 3,99 mg/mL, se *tabell 6* (vedlegg

A.3.2). Her er gjennomsnittet forhøyet da halvparten av celleflaskene var store celleflasker. Ser en kun på medium celleflasker, som er flaskestørrelsen brukt videre, kom gjennomsnittskonsentrasjonen på 3,48 mg/mL. I neste forsøk ble gammelt medium og HBSS tatt vare på, se prosedyre 3.3 *Proteinisolering*, da en antok at man tapte proteiner ved å forkaste disse. Dette tiltaket medførte at den gjennomsnittlige proteinkonsentrasjonen med RIPA buffer økte til 4,94 mg/mL, se *tabell 7* (vedlegg A.3.3), noe som ble ansett som en god gjennomsnittskonsentrasjon ved ekstraksjon. De videre forsøkene ga en samlet gjennomsnittsproteinkonsentrasjon som var litt lavere på 4,79 mg/mL, se *tabellene 8 og 9* (vedlegg A.3.4 og A.3.5), men ble også ansett som en god konsentrasjon. På SDS-PAGE fikk proteinbåndene et godt uttrykk, se *figur 10* (vedlegg A.4.1). De gode resultatene med bruk av RIPA buffer førte til en konsensus om at RIPA buffer var en optimal metode for proteinisolering.

I tidligere studier ble det brukt både 10% og 17% SDS-PAGE, se 2.1.4 *Tidligere studier*, mens ifølge andre artikler er 10% og 12% SDS-PAGE best å bruke dersom en skal detektere proteiner mellom 15-250 kDa, se 2.4 *SDS-PAGE*. Det ble derfor bestemt å teste 12% og 16% SDS-PAGE for å sjekke hvilken gel som egner seg til dette forsøket. Det viste seg at både 12% og 16% ga gode proteinbånd, men 12% SDS-PAGE ga tydeligere bånd rundt 70 kDa, se *figur 9 og 10* (vedlegg A.4.1). Ettersom det var området rundt 70 kDa som var mest interessant i dette forsøket ble 12% brukt i videre forsøk.

6.0 KONKLUSJON

Ved optimalisering av prosedyren ble ulike metoder og reagenser testet for å være tilpasset forsøket. Gjennom optimaliseringsprosessen ble det funnet en metode som ga ønskede resultater. I den optimaliserte metoden ble medium celleflasker benyttet da disse ga tilstrekkelig mengde med prøvemateriale. 10% TCA ble byttet ut med RIPA buffer, da konsentrasjonen av isolert protein ble høyere ved bruk av denne. 12% og 16% SDS-gel ble satt opp mot hverandre, der 12% ga et resultat som var mer oversiktlig og lettere å lese. Det ble dermed valgt å bruke denne videre i forsøket. Prøvene ble kvalitetssikret ved hjelp av Qubit 2.0 fluorometer, der resultatene viste høy proteinkonsentrasjon, hvilket bekrefter en god ekstraksjonsmetode.

Endringer i proteinkonsentrasjonen ble observert i celler som ble utsatt for varmesjokk i lengre perioder. Uttrykk av proteiner ved 70 kDa på SDS-PAGE ble påvist. Det ble konkludert med størst økning i proteinuttrykk rundt 70 kDa etter stress i 4-6 timer ved 26 °C. Etter 12-24 timer stress ved 26 °C var resultatene fra de ulike prøvene tilnærmet lik kontrollen som ble inkubert på 20 °C, og det ble videre konkludert med at proteinuttrykket vil bli redusert til kontrollnivå ved langvarig stress.

7.0 LITTERATURLISTE

1. Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB, Vijayan MM. Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish* [Internett]. 1. mars 1998 [sitert 26. mars 2019];8(1):35–56. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1023/A:1008812500650>
2. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* [Internett]. april 1996 [sitert 26. mars 2019];1(1):23–8. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC313013/>
3. Ryan LA, Seymour CB, O'Neill-Mehlenbacher A, Mothersill CE. Radiation-induced adaptive response in fish cell lines. *J Environ Radioact* [Internett]. 1. april 2008 [sitert 25. april 2019];99(4):739–47. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2007.10.001>
4. Chen J, Sun X, Zhang Y. Growth and metabolism of marine fish Chinook salmon embryo cells: response to lack of glucose and glutamine. *Biotechnol Lett* [Internett]. 1. mars 2005 [sitert 25. april 2019];27(6):395–401. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1774-1>
5. Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture - NO [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>
6. CHSE/F (formerly known as CHSE-214) [Internett]. CellBank Australia. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.cellbankaustralia.com/chse-f-formerly-known-as-chse-214.html>
7. Pham PH, Sokeechand BSH, Hamilton ME, Misk E, Jones G, Lee LEJ, mfl. VER-155008 induced Hsp70 proteins expression in fish cell cultures while impeding replication of two RNA viruses. *Antiviral Res* [Internett]. 1. februar 2019 [sitert 25. april 2019];162:151–62. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.001>

8. NTNU HMS-avdelingen, SINTEF HMS-seksjonen. Laboratorie- og verkstedshåndbok. 6. utg. Trondheim: Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet & SINTEF; 2016. 142 s.
9. ECACC General Cell Collection: CHSE-214 [Internett]. Public Health England. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=91041114&collection=ecacc_gc
10. Heikkila JJ, Schultz GA, Iatrou K, Gedamu L. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. *J Biol Chem* [Internett]. 25. oktober 1982 [sitert 25. april 2019];257(20):12000–5. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7118927>
11. Leibovitz's L-15 Medium, GlutaMAX Supplement [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/31415086?SID=srch-srp-31415086>
12. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen Å, Honegger P, Knudsen LE, mfl. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* [Internett]. 1. juni 2010 [sitert 25. april 2019];24(4):1053–63. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
13. Gentamicin [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/antibiotics/gentamicin-reagent-solution.html>
14. Milisav I. Cellular Stress Responses. I: Wislet-Gendebien S, redaktør. *Advances in Regenerative Medicine* [Internett]. Rijeka: InTech; 2011 [sitert 20. mai 2019]. s. Ch. 10. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.5772/26118>
15. Seglen PO. autofagi [Internett]. Store Norske Leksikon. 2018 [sitert 5. oktober 2019]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/autofagi>

16. Kristensen T. chaperon – biokjemi [Internett]. Store Norske Leksikon. 2009 [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: http://snl.no/chaperon_-_biokjemi
17. Sriram M, Osipiuk J, Freeman B, Morimoto R, Joachimiak A. Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure* [Internett]. 15. mars 1997 [sitert 29. april 2019];5(3):403–14. Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00197-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00197-4)
18. MORANO KA. New Tricks for an Old Dog. *Ann N Y Acad Sci* [Internett]. 1. oktober 2007 [sitert 26. mars 2019];1113(1):1–14. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1196/annals.1391.018>
19. Livik M. Et eksperimentelt studium av kreftceller fra livmorhals - Strålesensitivitet, effektutvikling og cGMP nivåer [Internett] [Masteroppgave]. [Tromsø]: Norges Arktiske Universitet; 2008 [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://munin.uit.no/handle/10037/1905>
20. Cell Dissociation with Trypsin [Internett]. Sigma-Aldrich. [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html>
21. Misra S, Zafarullah M, Price-Haughey J, Gedamu L. Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr* [Internett]. 12. april 1989 [sitert 25. april 2019];1007(3):325–33. Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(89\)90155-3](https://doi.org/10.1016/0167-4781(89)90155-3)
22. Hyun Na Koo, Su Young Oh, Kwang Kang, Dae Yeon Moon, Han Do Kim, Ho Sung Kang. Modulation of HSP70 and HSP90 Expression by Sodium Salicylate and Aspirin in Fish Cell Line CHSE-214. *Zoolog Sci* [Internett]. 1. desember 2000 [sitert 25. april 2019];17(9):1275–82. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.2108/zsj.17.1275>
23. Dahl Ø, Jensen SM. Etablere og Optimalisere Metode for Genekspresjonsanalyse med Komparativ qPCR for å Studere Stressrespons hos CHSE-214-celler [Bacheloroppgave]. [Ålesund]: Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet; 2018.

24. Posch A. Sample preparation guidelines for two-dimensional electrophoresis. *Arch Physiol Biochem* [Internett]. 1. desember 2014 [sitert 25. april 2019];120(5):192–7. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.3109/13813455.2014.955031>
25. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* [Internett]. september 2012 [sitert 26. mars 2019];4(9):429–34. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
26. Bethyl Cell Lysate Preparation [Internett]. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.biomol.com/dateien/Bethyl--Cell-Lysate-Preparation.pdf>
27. RIPA Lysis and Extraction Buffer [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89900>
28. The Qubit® 2.0 Fluorometer [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-issues-2011/bioprobes-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html>
29. O’Neill M, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, McMillan N. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *J Phys Conf Ser* [Internett]. 17. august 2011 [sitert 25. april 2019];307(1). Tilgjengelig på: <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>
30. Campanella C, Bucchieri F, Merendino AM, Fucarino A, Burgio G, Corona DFV, mfl. The Odyssey of Hsp60 from Tumor Cells to Other Destinations Includes Plasma Membrane-Associated Stages and Golgi and Exosomal Protein-Trafficking Modalities. *PLOS ONE* [Internett]. 25. juli 2012 [sitert 25. april 2019];7(7):e42008. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042008>
31. Rath A, Cunningham F, Deber CM. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proc Natl Acad Sci* [Internett]. 24. september 2013 [sitert 25. april 2019];110(39):15668–73. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1073/pnas.1311305110>

32. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* [Internett]. 23. april 2014 [sitert 21. januar 2019];6(5):1068–78. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1039/C4MT00033A>
33. Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection [Internett]. Bio-Rad; [sitert 25. april 2019]. 47 s. Tilgjengelig på: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
34. The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [Internett]. MBL Life Science. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/sds-page.html>
35. RunBlue™ TEO-Tricine SDS Gels [Internett]. Expedeon. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.expedeon.com/products/electrophoresis/runblue-protein-gels/runblue-sds-gels/runblue-sds-protein-gels/>
36. Protein EZ-Vision®, 4X [Internett]. VWR. [sitert 26. mars 2019]. Tilgjengelig på: <https://no.vwr.com/store/product/10386404/protein-ez-vision-4x>
37. Protein Ladders [Internett]. LI-COR. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.licor.com/bio/reagents/protein-ladders>
38. Protein Ladders and Standards (Markers) [Internett]. Bio-Rad. [sitert 25. april 2019]. Tilgjengelig på: <http://www.bio-rad.com/en-no/category/protein-ladders-standards-markers?ID=09507551-2848-4bd1-a3c1-650b4d41aa48>
39. Grøn Ø. optimalisere [Internett]. Store Norske Leksikon. 2018 [sitert 5. oktober 2019]. Tilgjengelig på: <https://snl.no/optimalisere>
40. Kemp M. How to Plan and Design a Lab to Be Best Optimized [Internett]. Lab Manager. 2017 [sitert 10. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.labmanager.com/lab-design-and-furnishings/2016/07/how-to-plan-and-design-a-lab-to-be-best-optimized#.XMrMwOgzbic>

A.0 VEDLEGG

A.1 Reagenser

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over reagenser og kit som har blitt brukt i prosedyren, samt artikkelnummer.

Prosedyre	Reagens	Artikkelnummer
Dyrking av CHSE-214 celler	L-15 Medium (1X) + GlutaMAX	31415-029
	Fetal Bovine Serum (FBS), One Shot	A3160801
	Gentamicin (50mg/mL)	15750-037
	HBSS (1X)	SH30588.02
	Trypsin-EDTA (0,25%)	25200-072
Proteinisolering	Pierce RIPA Buffer	89900
Qubit	Qubit Protein Assay Kit, 100 assays	Q33211
	Qubit protein Buffer	Q33221
	Qubit protein Reagent	Q33221
	Qubit protein Standard #1	Q33221
	Qubit protein Standard #2	Q33221
	Qubit protein Standard #3	Q33221
SDS-PAGE	RunBlue SDS gel 12%	NXG01212
	RunBlue 20X SDS Run Buffer	NXB50500
	Protein EZ-vision	N836-1ML
	Kaleidoscope Prestained Standards (Ladder)	161-0324
	Bovine Serum Albumin	421501J
	Trypsin	M150-1G

A.2 Forsøk

Tabell 4: Viser en detaljert forklaring av flytskjema, se figur 8 (3.0 MATERIALER OG METODER), for alle forsøkene som ble gjennomført på laboratoriet. I venstre kolonne ser vi hvilken type forsøk som ble utført den spesifikke dagen, og i høyre kolonne kommer en forklaring på hva som ble gjort i dette spesifikke forsøket.

Forsøk	Forklaring
Cellesplitting (04.02.2019)	Passasje 249
Cellesplitting (08.02.2019)	Passasje 250
Cellesplitting (11.02.2019)	Passasje 251
Testforsøk 1: Optimalisering av proteinisolering ved hjelp av 10% TCA som lyseringsmetode (12.02.2019)	Her ble det brukt 10% TCA som lyseringsmetode før proteinet ble ekstrahert fra cellene.
Cellesplitting (15.02.2019)	Passasje 252
Cellesplitting (18.02.2019)	Passasje 253 Splittet til medium og stor celleflaske som forberedelse til neste testforsøk.
Testforsøk 2: Optimalisering av proteinisolering ved hjelp av RIPA Buffer som lyseringsmetode, samt testing av celleflasker med ulik størrelse. (21.02.2019)	Her ble det brukt RIPA Buffer som lyseringsmetode før proteinet ble ekstrahert fra cellene. To flasker med ulik størrelse ble sammenlignet med hverandre for å se hvilken som ga mest tilfredsstillende bånd i gelen.
Cellesplitting (25.02.2019)	Passasje 254
Cellesplitting (01.03.2019)	Passasje 255
Testforsøk 3: Optimalisering av metode ved å teste ulike geler med ulik prosent. Testet stress i 1 time for å sjekke tilstrekkelig proteinkonsentrasjon og tydelig bånd i gel. (06.03.2019)	Her ble det benyttet to ulike geler med ulik tetthet i nettverket (12% og 16%) som skiller proteinene fra hverandre for å se hvilken av de to som ga de beste resultatene. I dette forsøket var cellene stresset i 1 time for å se om endringen i konsentrasjon av området 70 kDa var tydelig nok til å gå videre med metoden.

Cellesplitting (08.03.2019)	Passasje 256
Cellesplitting (12.03.2019)	Passasje 257
Forsøk 1: Stress 1-6 timer (14.03.2019)	Etter alle testforsøkene ble følgende metode valgt: lysering med RIPA Buffer, medium celleflasker og 12% SDS PAGE. Denne metoden ble videre brukt gjennom alle forsøkene. I dette forsøket testes proteinuttrykket av området 70 kDa ved stress etter 1-6 timer.
Cellesplitting (15.03.2019)	Passasje 258
Forsøk 2: Stress 1-6 timer (19.03.2019)	I dette forsøket ble det kjørt en parallell til forsøk nr. 1 for å se at resultatene ble de samme. Her måtte visualiseringen på SDS PAGE kjøres to ganger på grunn av dårlige resultat første gangen, trolig på grunn av pipetteringsfeil.
Cellesplitting (21.03.2019)	Passasje 259
Forsøk 3: Stress 12,18 og 24 (25.03.2019)	I dette forsøket ble konsentrasjonen av området 70 kDa testet etter at cellene var utsatt for stress i 12, 18 og 24 timer.
Cellesplitting (28.03.2019)	Passasje 260
Forsøk 4: Stress 12, 18, 24 (02.04.2019)	Her ble det kjørt en parallell til forsøk nr. 3 for å verifisere resultatene. Her ble visualiseringen på SDS PAGE kjørt to ganger på grunn av dårlige resultat første gangen, trolig på grunn av pipetteringsfeil.

A.3 Proteinkonsentrasjon med Qubit

A.3.1 Proteinkonsentrasjon ved ekstraksjon med TCA

Tabell 5: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke om TCA var optimal metode for å isolere ut protein. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c). Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne.

Qubit-analyse nr. 1		Dato: 12.02.2019
Stressvarighet (timer), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS ($\mu\text{g/mL}$)	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)
Kontroll (a)	14,30	2,80
Kontroll (b)	14,60	2,88
Kontroll (c)	14,80	2,95

A.3.2 Proteinkonsentrasjon ved sammenligning av celleflasker

Tabell 6: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke forskjellen i konsentrasjonen i medium- og stor celleflaske. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c). Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE i figur 9.

Qubit-analyse nr. 2		Dato: 21.02.2019
Størrelse på celleflasker, (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS ($\mu\text{g/mL}$)	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)
Medium celleflaske (a)	17,30	3,46
Medium celleflaske (b)	17,50	3,50
Medium celleflaske (c)	17,40	3,48
Stor celleflaske (a)	22,40	4,47
Stor celleflaske (b)	22,70	4,54
Stor celleflaske (c)	22,60	4,52

A.3.3 Proteinkonsentrasjon for testforsøk

Tabell 7: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene fra et testforsøk som ble gjennomført for å sjekke om prosedyren fungerte optimalt. Venstre kolonne viser prøver med paralleller, angitt (a), (b) og (c), og tiden prøvene har blitt stresset med temperatur. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne.

Qubit-analyse nr. 3		Dato: 06.03.2019
Stressvarighet (<i>timer</i>), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS ($\mu\text{g/mL}$)	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)
Kontroll (a)	24,00	4,79
Kontroll (b)	25,00	5,10
Kontroll (c)	22,00	4,50
1 time (a)	>26,00	For høy
1 time (b)	26,00	5,20
1 time (c)	25,00	5,10

A.3.4 Proteinkonsentrasjon for første forsøk 1-6 timer stress

Tabell 8: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 11 og 13.

Qubit-analyse nr. 4		Dato: 14.03.2019
Stressvarighet (timer), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS (µg/mL)	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)
Kontroll (a)	23,70	4,74
Kontroll (b)	23,80	4,76
Kontroll (c)	24,10	4,81
1 time (a)	22,40	4,40
1 time (b)	20,40	4,08
1 time (c)	23,30	4,66
2 timer (a)	22,60	4,52
2 timer (b)	22,90	4,58
2 timer (c)	22,70	4,54
3 timer (a)	22,90	4,58
3 timer (b)	22,90	4,58
3 timer (c)	23,50	4,71
4 timer (a)	23,50	4,70
4 timer (b)	23,80	4,76
4 timer (c)	23,00	4,61
5 timer (a)	23,10	4,62
5 timer (b)	22,90	4,57
5 timer (c)	23,10	4,61
6 timer (a)	24,00	4,81
6 timer (b)	23,30	4,66
6 timer (c)	23,60	4,71

A.3.5 Proteinkonsentrasjon for andre forsøk 1-6 timer stress

Tabell 9: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonne viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonne. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 17 og 19.

Qubit-analyse nr. 5		Dato: 19.03.2019
Stressvarighet (timer), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS (µg/mL)	Proteinkonsentrasjon (mg/mL)
Kontroll (a)	18,80	3,77
Kontroll (b)	23,30	4,63
Kontroll (c)	>26,00	For høy
1 time (a)	21,80	4,36
1 time (b)	21,00	4,20
1 time (c)	22,60	4,51
2 timer (a)	17,50	3,50
2 timer (b)	18,60	3,73
2 timer (c)	18,70	3,74
3 timer (a)	19,30	3,87
3 timer (b)	20,60	4,11
3 timer (c)	24,80	4,96
4 timer (a)	>26,00	For høy
4 timer (b)	20,90	4,19
4 timer (c)	19,80	3,95
5 timer (a)	24,70	4,94
5 timer (b)	>26,00	For høy
5 timer (c)	26,00	5,20
6 timer (a)	20,70	4,13
6 timer (b)	23,10	4,63
6 timer (c)	23,10	4,61

A.3.6 Proteinkonsentrasjon for første forsøk 12-24 timer stress

Tabell 10: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonnene viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonnene. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figur 21.

Qubit-analyse nr. 6			Dato: 25.03.2019	
Stressvarighet (timer), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS, forsøk 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasjon fortynnet i WS, forsøk 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Proteinkons- entrasjon, forsøk 1 (mg/mL)	Proteinkons- entrasjon, forsøk 2 (mg/mL)
Kontroll (a)	14,10	11,90	2,81	2,37
Kontroll (b)	12,60	11,60	2,53	2,33
Kontroll (c)	12,30	11,60	2,46	2,32
12 timer (a)	6,82	11,90	1,36	2,38
12 timer (b)	7,43	11,60	1,49	2,31
12 timer (c)	7,28	11,80	1,46	2,35
18 timer (a)	8,25	10,90	1,65	2,17
18 timer (b)	8,95	11,80	1,79	2,35
18 timer (c)	8,72	11,70	1,74	2,35
24 timer (a)	11,00	12,30	2,20	2,47
24 timer (b)	10,50	11,00	2,10	2,20
24 timer (c)	11,20	10,30	2,23	2,07

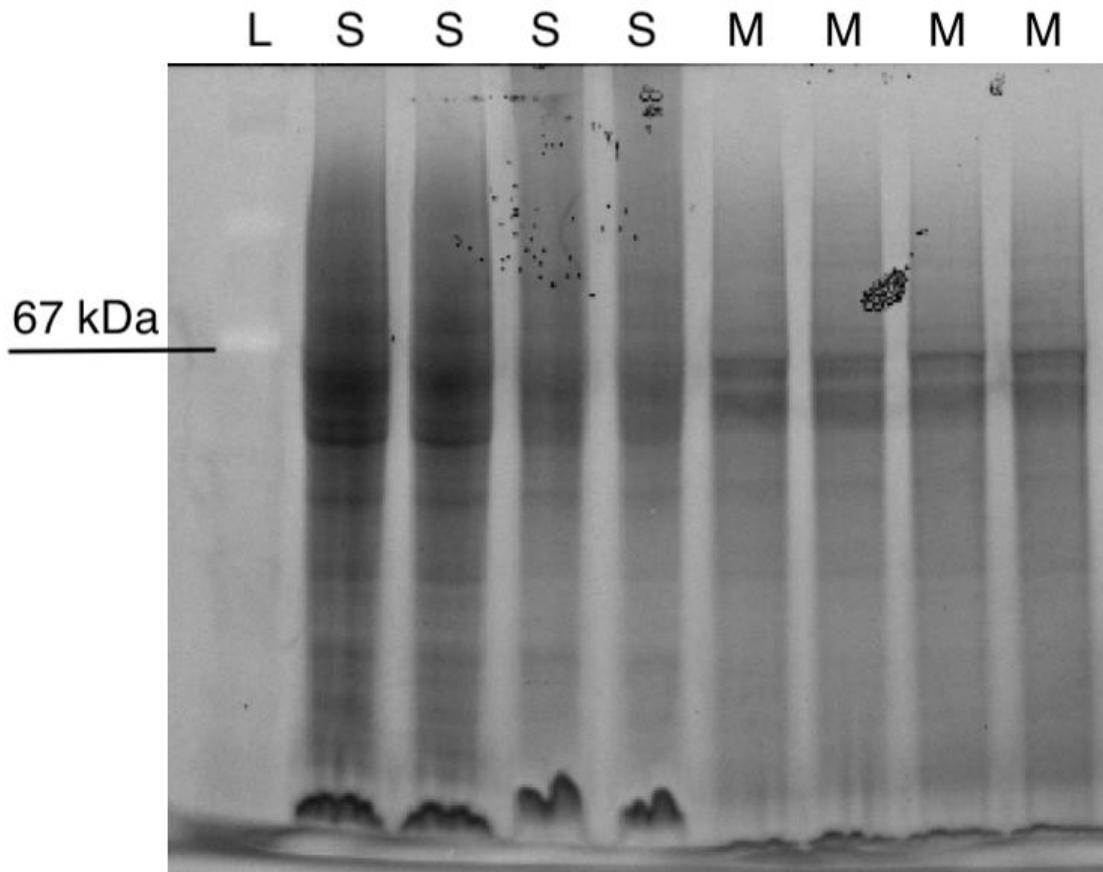
A.3.7 Proteinkonsentrasjon for andre forsøk 12-24 timer stress

Tabell 11: Tabellen viser proteinkonsentrasjonene (mg/mL) hos kontroll (20 °C) og de ulike prøvene som har blitt utsatt for stress (26 °C) ved ulike paralleller (a), (b) og (c), samt hvor lenge de har blitt stresset, angitt i timer. Venstre kolonne viser ulike prøver med paralleller og tid. Høyre kolonnene viser proteinkonsentrasjonen fra prøvene, regnet ut fra konsentrasjonen fra midterste kolonnene. Proteinene fra hver parallell er visualisert på SDS-PAGE figurene 22, 23 og 25.

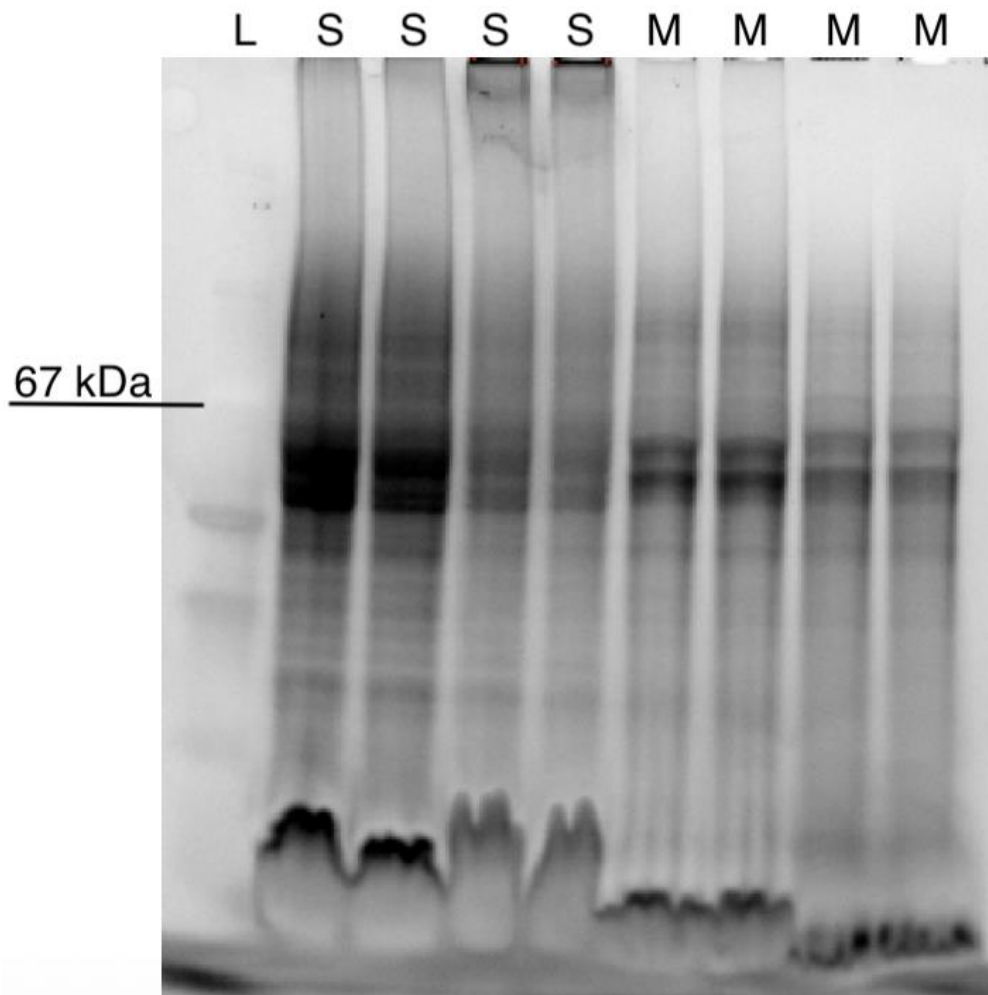
Qubit-analyse nr. 7				Dato: 02.04.2019
Stressvarighet (timer), (a,b,c)=Parallell	Konsentrasjon fortynnet i WS, forsøk 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasjon fortynnet i WS, forsøk 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Proteinkons- entrasjon, forsøk 1 (mg/mL)	Proteinkons- entrasjon, forsøk 2 (mg/mL)
Kontroll (a)	12,80	12,20	2,57	2,44
Kontroll (b)	11,50	11,50	2,30	2,30
Kontroll (c)	11,60	12,70	2,31	2,55
12 timer (a)	6,83	12,10	1,37	2,42
12 timer (b)	6,92	11,20	1,38	2,24
12 timer (c)	6,82	12,10	1,36	2,43
18 timer (a)	7,83	11,80	1,57	2,37
18 timer (b)	7,79	11,60	1,56	2,33
18 timer (c)	8,02	11,80	1,60	2,35
24 timer (a)	9,95	10,80	1,99	2,16
24 timer (b)	10,10	11,70	2,03	2,35
24 timer (c)	9,80	10,90	1,96	2,18

A.4 SDS-PAGE

A.4.1 Sammenligning av celleflaskestørrelser

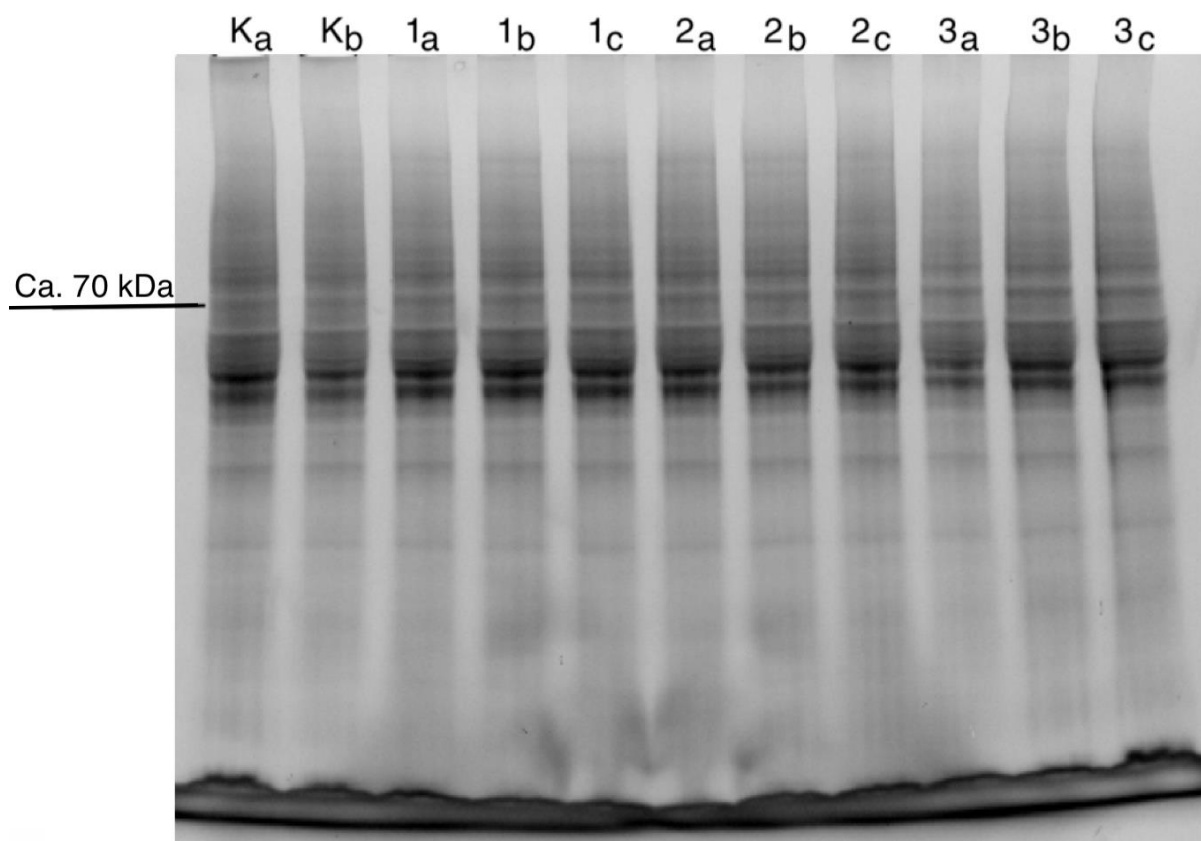


Figur 9: Viser test av stor celleflaske (S) mot medium celleflaske (M) inkubert ved 20 °C opp mot ladderen Kaleidoscope Prestained Standards (L) som viser 67 kDa på 12% SDS-PAGE. Tilhørende Qubit verdier er presentert i tabell 6.

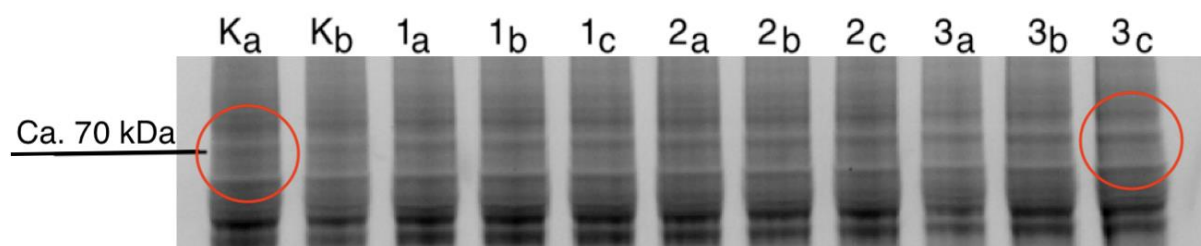


Figur 10: Viser test av stor cell flaske (S) mot medium celleflaske (M) inkubert ved 20 °C opp mot ladderen Kaleidoscope Prestained Standards (L) som viser 67 kDa på 16% SDS-PAGE. Tilhørende Qubit verdier er presentert i tabell 6.

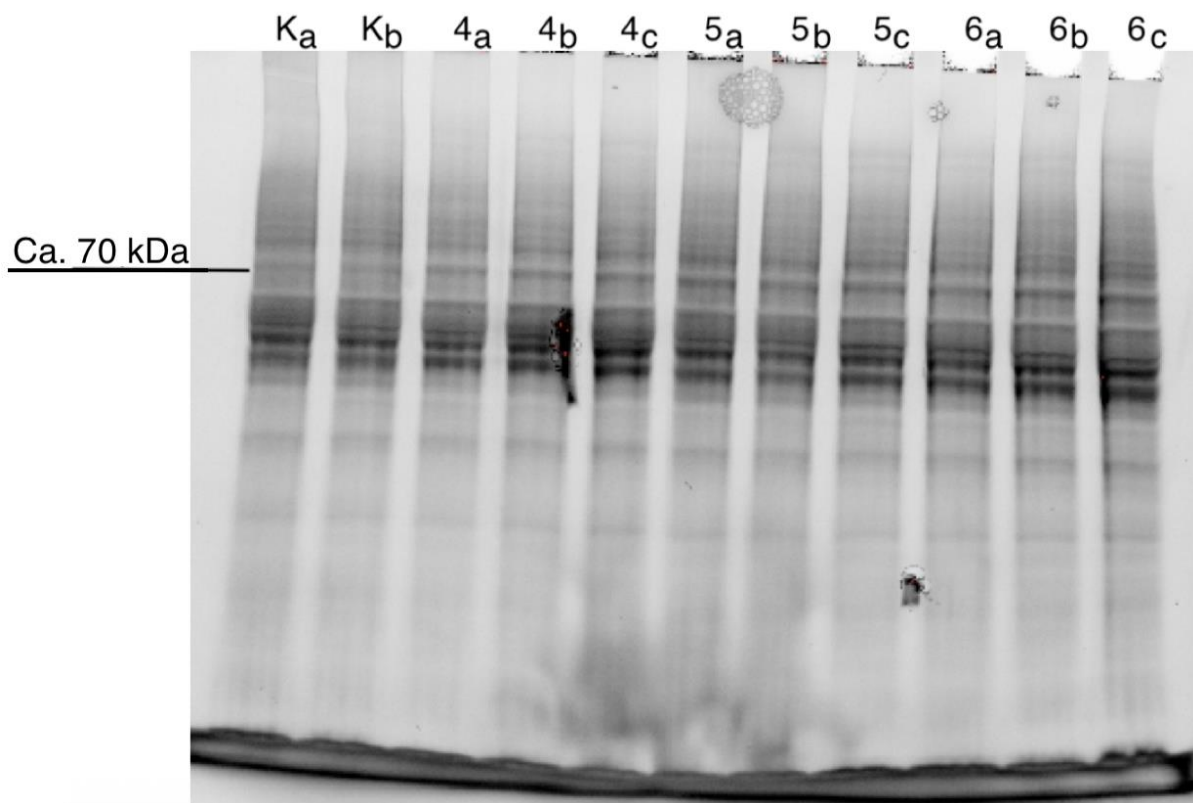
A.4.2 Første forsøk 1-6 timer stress



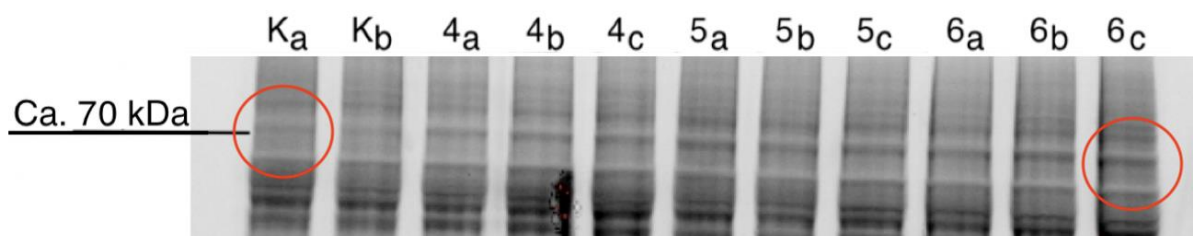
Figur 11: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt $K_{a,b}$, for hver parallell. Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt $1_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt $2_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt $3_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 8. Ca. 70 kDa er beregnet ut fra figur 7, og er vist på venstre side.



Figur 12: Utsnitt av figur 11 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel.

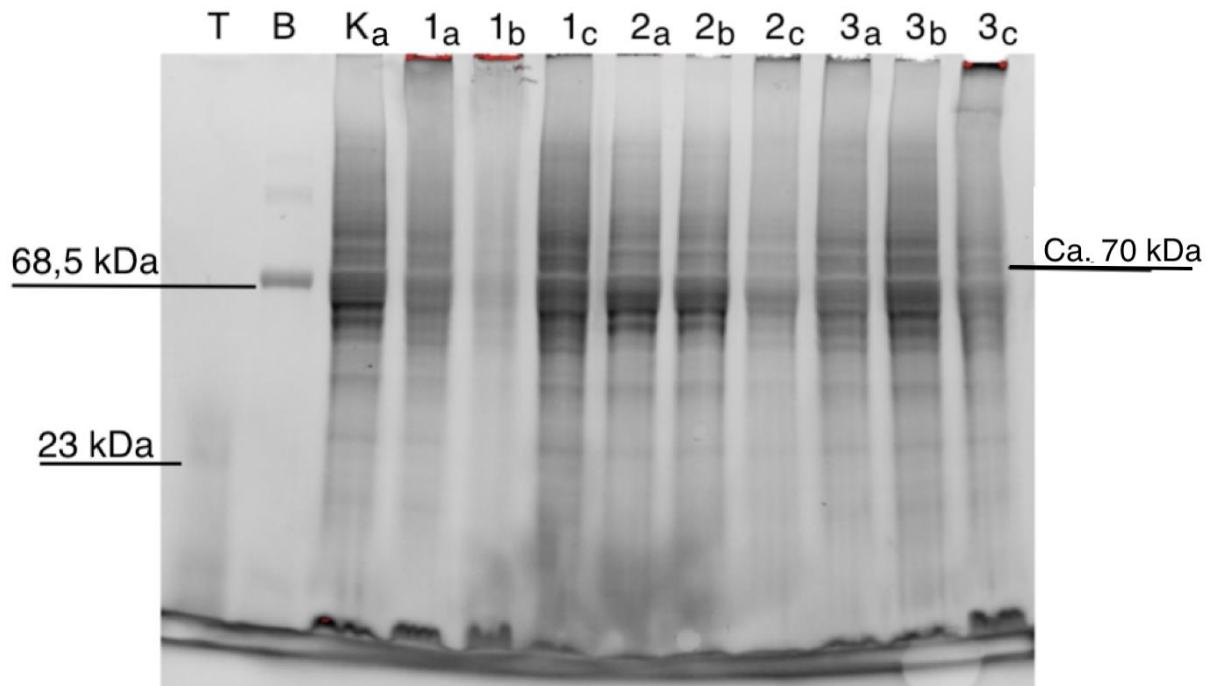


Figur 13: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt $K_{a,b}$, for hver parallell. Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt $4_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt $5_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt $6_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 8. Ca. 70 kDa er beregnet ut fra figur 7, og er vist på venstre side.

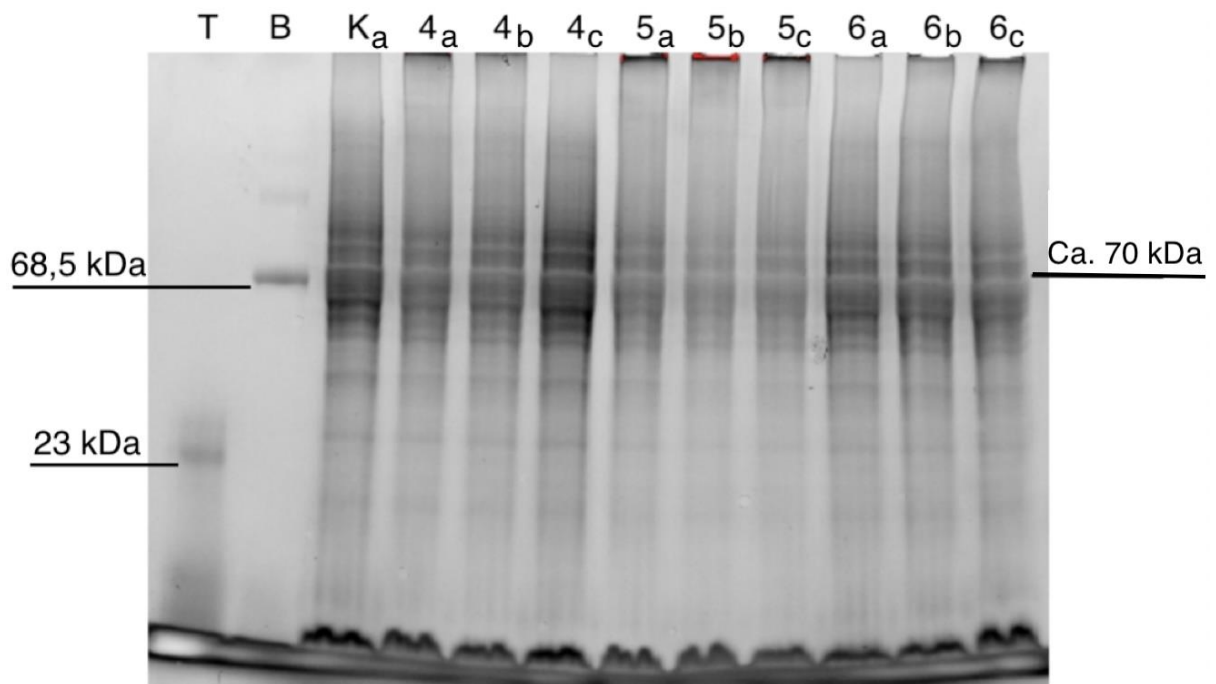


Figur 14: Utsnitt av figur 13 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel.

A.4.3 Andre forsøk 1-6 timer stress

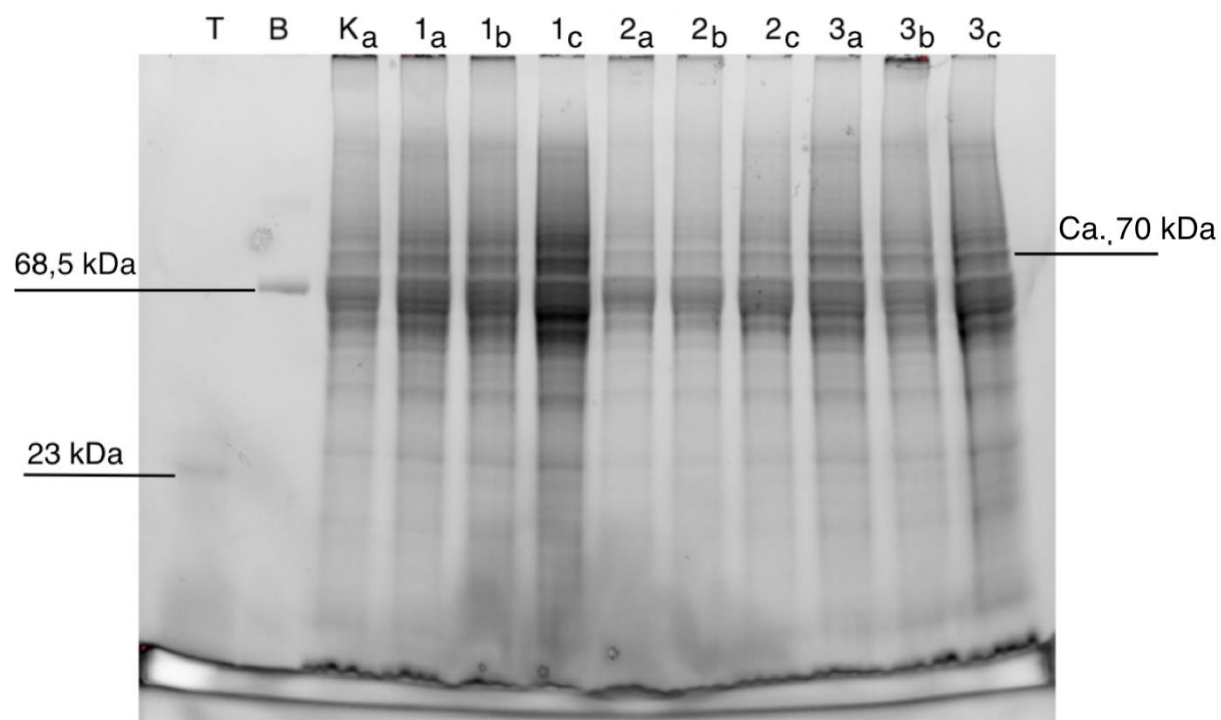


Figur 15: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll, inkubert ved 20 °C er navngitt K_a . Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt $1_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt $2_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt $3_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.

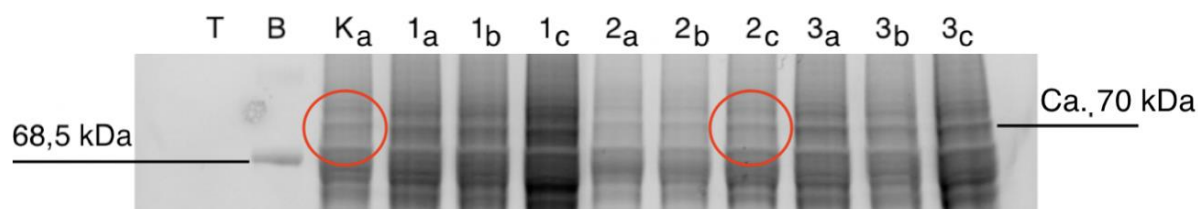


Figur 16: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll, inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt 4_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt 5_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt 6_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.

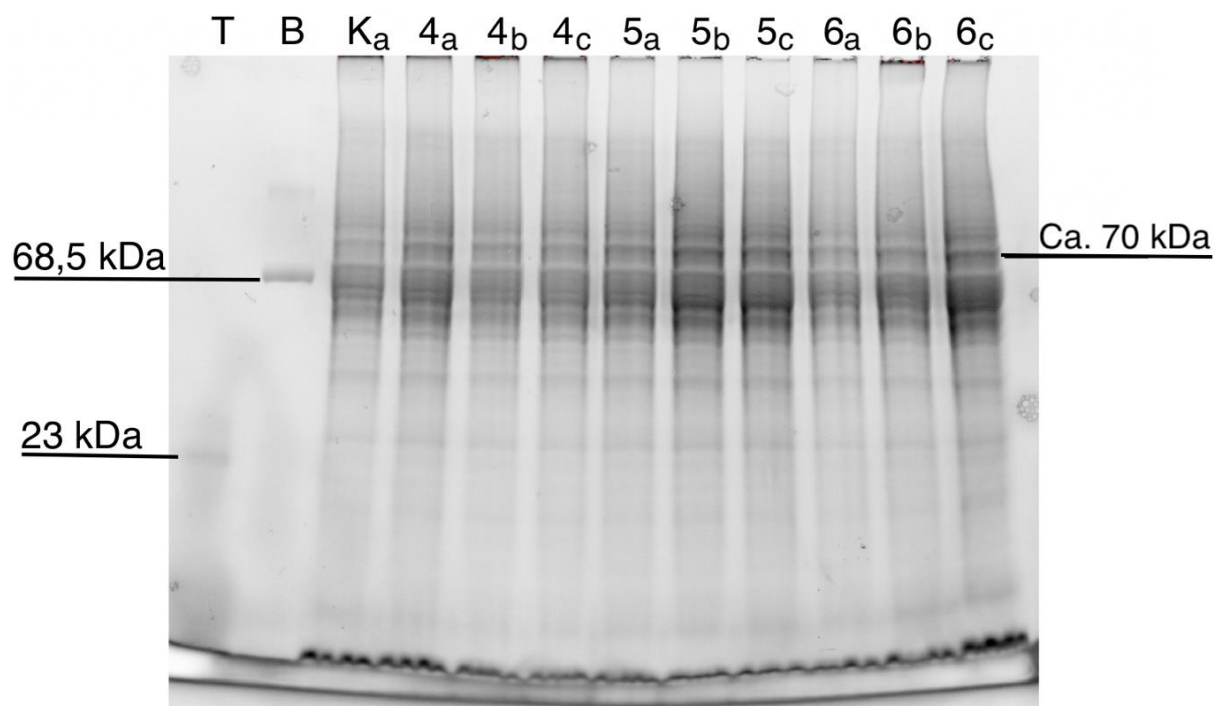
A.4.4 Andre forsøk 1-6 timer stress på nye geler



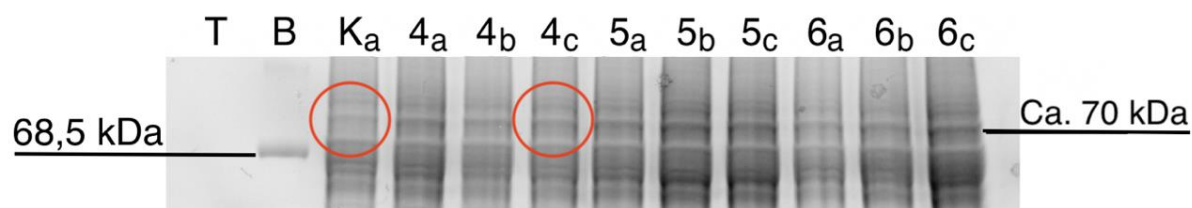
Figur 17: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a. Varmesjokk i 1 time ved 26 °C er navngitt 1_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 2 timer ved 26 °C er navngitt 2_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 3 timer ved 26 °C er navngitt 3_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.



Figur 18: Utsnitt av figur 17 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel.

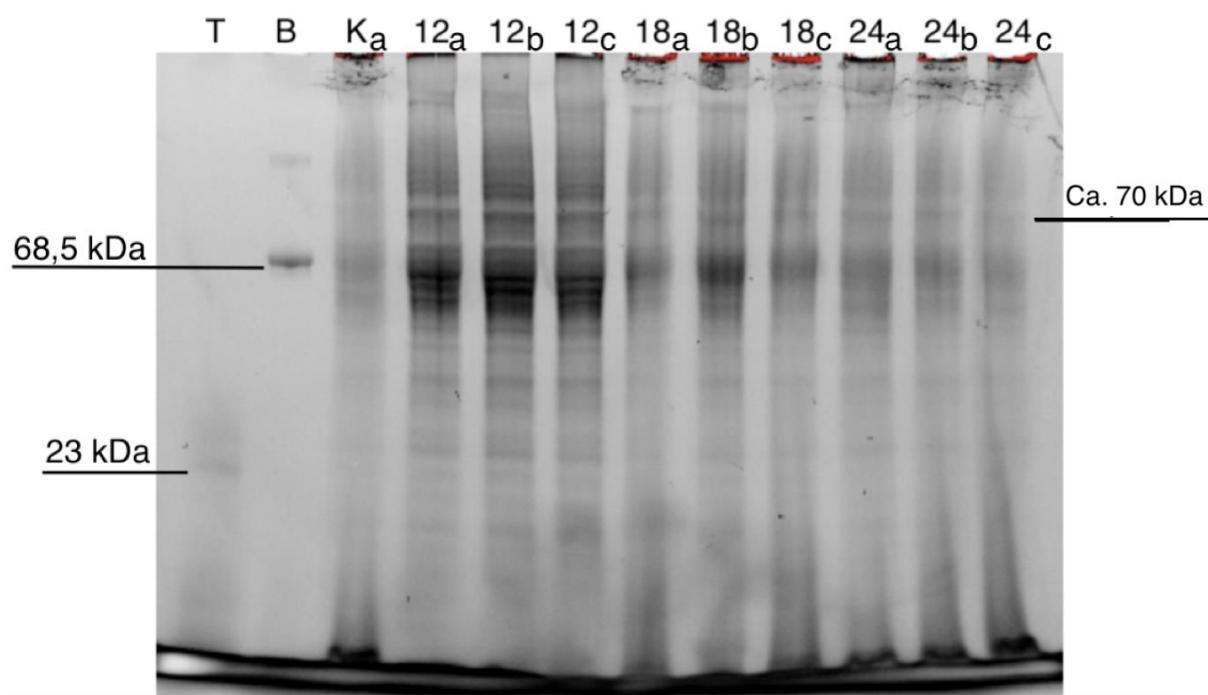


Figur 19: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_a . Varmesjokk i 4 timer ved 26 °C er navngitt $4_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 5 timer ved 26 °C er navngitt $5_{a,b,c}$, for hver parallell. Varmesjokk i 6 timer ved 26 °C er navngitt $6_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 9. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.



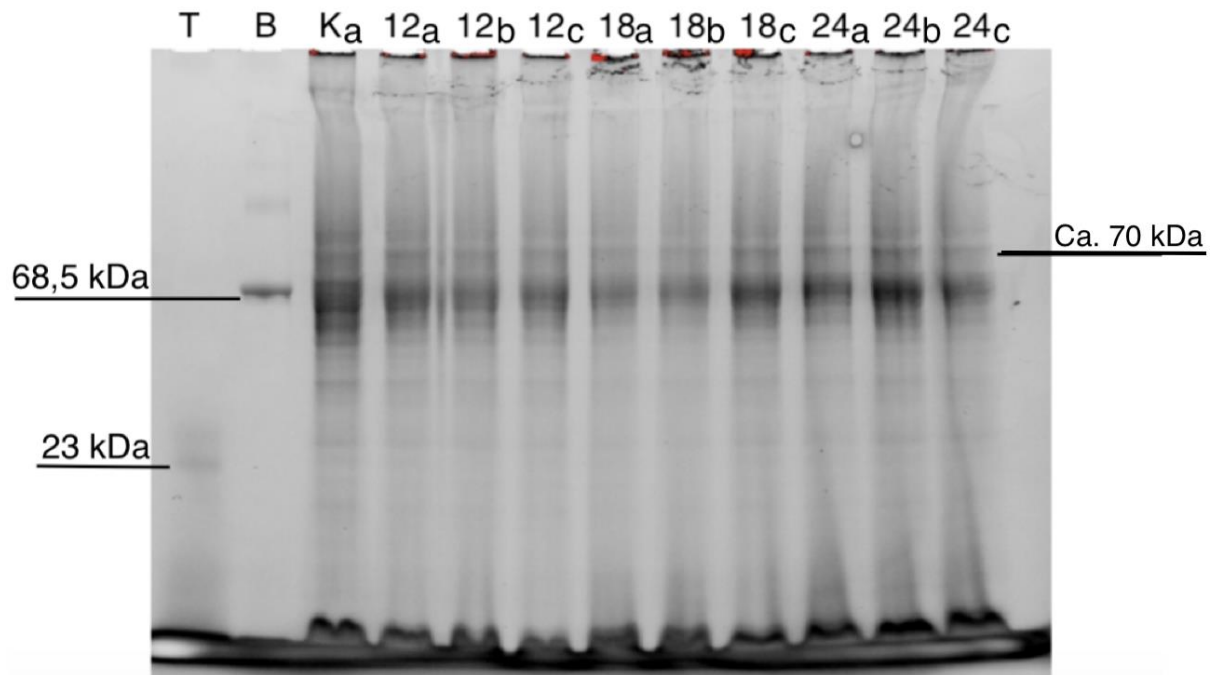
Figur 20: Utsnitt av figur 19 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel.

A.4.5 Første forsøk 12-24 timer stress



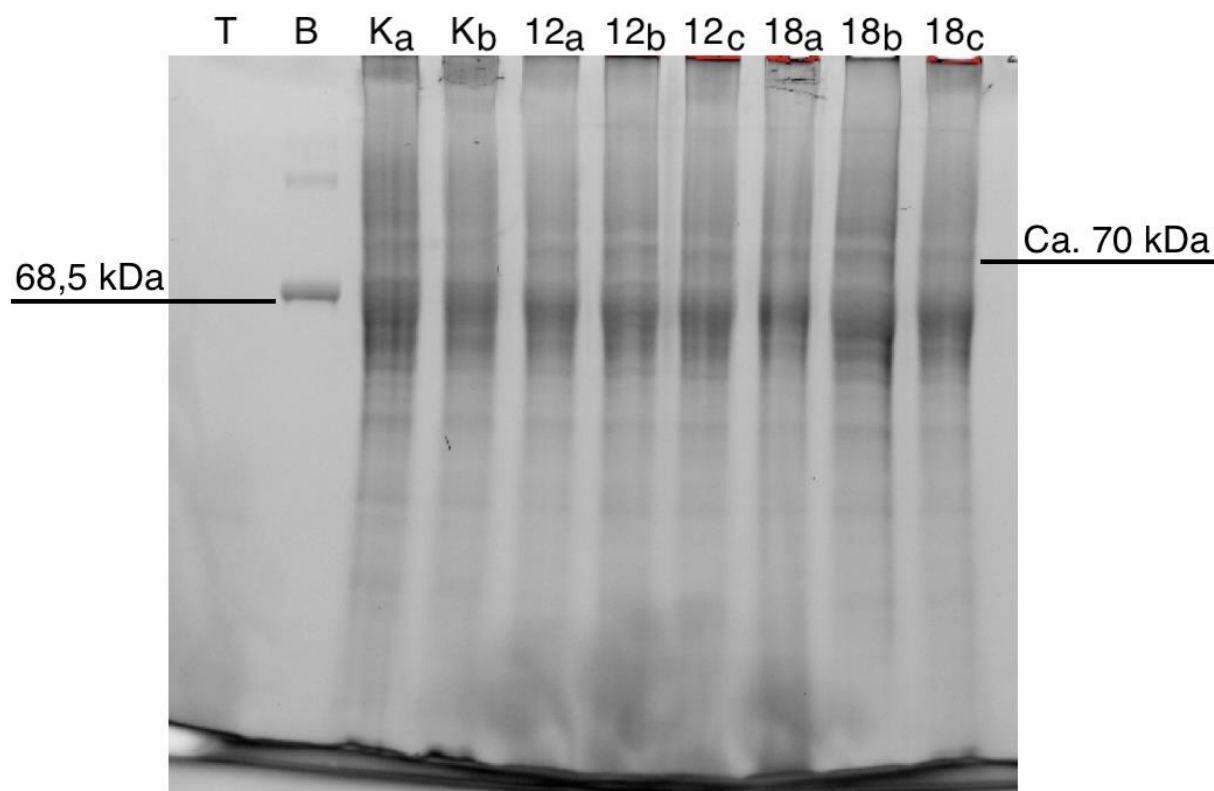
Figur 21: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt Ka. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt 24_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 10. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.

A.4.6 Andre forsøk 12-24 timer stress

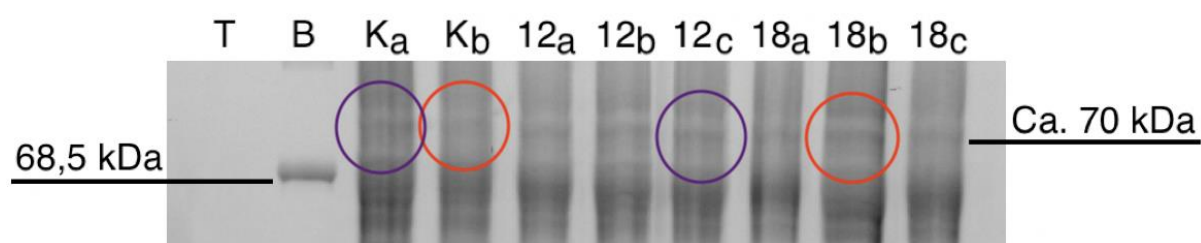


Figur 22: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt Ka. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt 24_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.

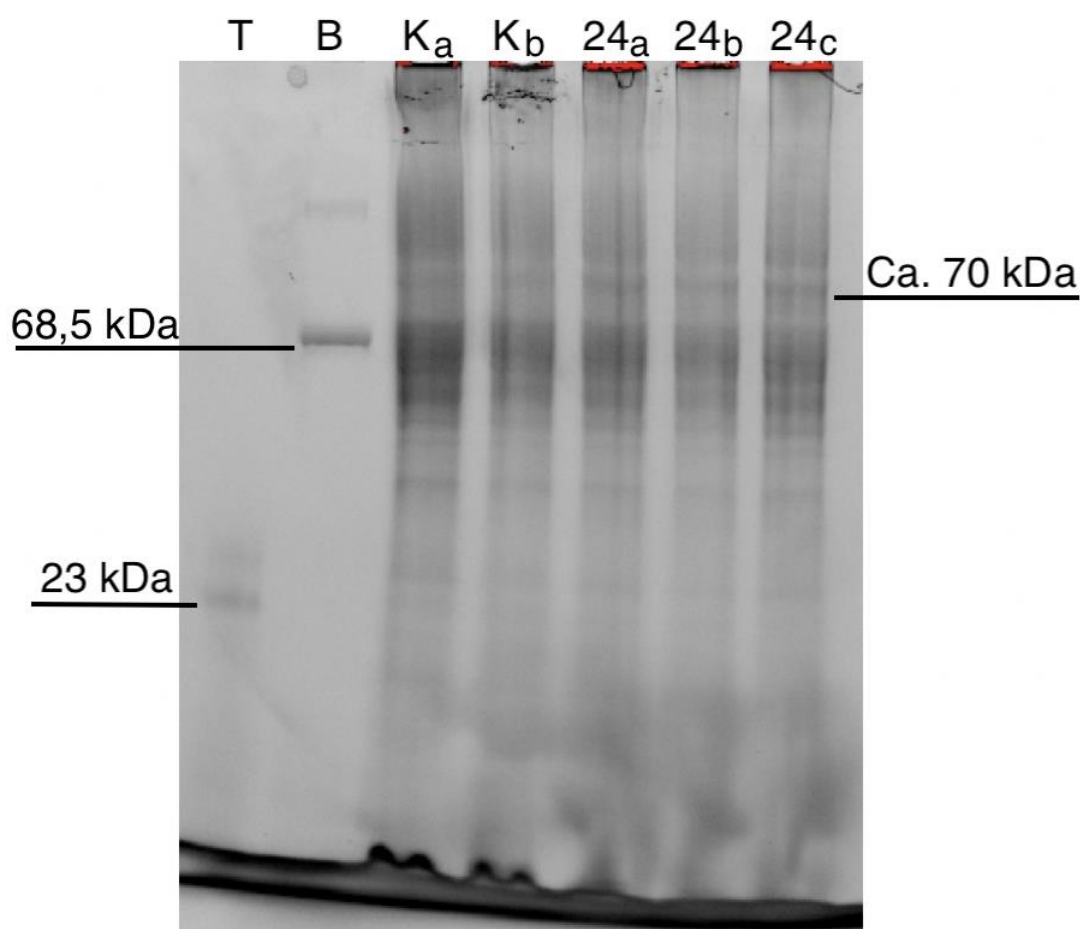
A.4.7 Andre forsøk 12-24 timer stress på nye geler



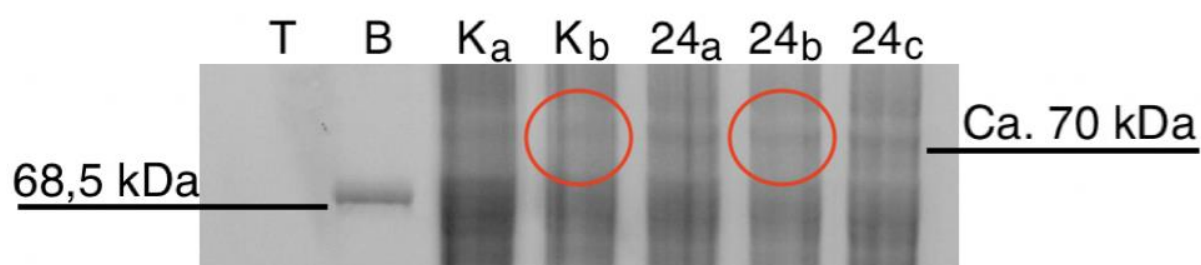
Figur 23: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa (ikke vist), og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt K_{a,b}, for hver parallell. Varmesjokk i 12 timer ved 26 °C er navngitt 12_{a,b,c}, for hver parallell. Varmesjokk i 18 timer ved 26 °C er navngitt 18_{a,b,c}, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.



Figur 24: Utsnitt av figur 23 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød og lilla sirkel.

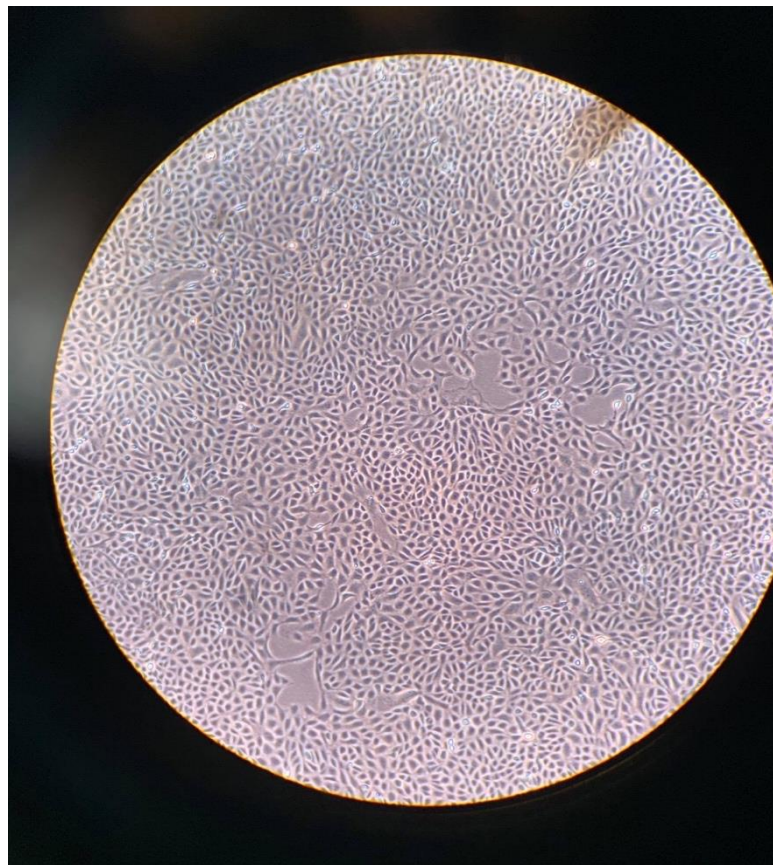


Figur 25: Viser SDS-PAGE etter gjennomført elektroforese. Gelen viser uttrykket av proteiner fra en 12% SDS-PAGE. Trypsin er angitt med T over sin brønn og har molekylvekten 23 kDa, og Bovine Serum Albumin med B over sin brønn med molekylvekten 68,5 kDa. Kontroll inkubert ved 20 °C er navngitt $K_{a,b}$, for hver parallell. Varmesjokk i 24 timer ved 26 °C er navngitt $24_{a,b,c}$, for hver parallell. Proteinkonsentrasjonen fra Qubit til hver parallell er gitt i tabell 11. Ca. 70 kDa er vist på høyre side.

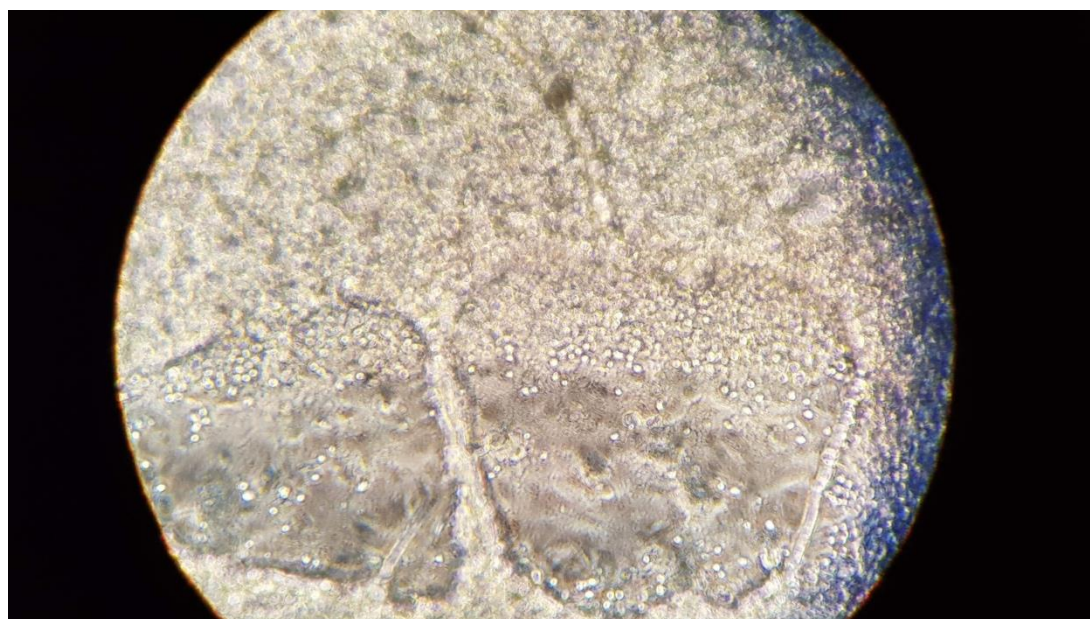


Figur 26: Utsnitt av figur 25 som viser proteinuttrykket i området 70 kDa. Sammenlignbare områder på proteinbånd er markert med rød sirkel.

A.5 CHSE-214 celler



Figur 27: Figuren viser CHSE-214 celler med god cellevekst, sett gjennom invertermikroskop.



Figur 28: Figuren viser celleklumper som ligger oppå et monolag av CHSE-214 celler i en celleflaske.

