

10015

10031

# Utvikling av protokoll for SDS-PAGE analyse av A549 cellelinje, og studie av endring i proteinekspresjonsmønster som følge av tilsetning av sialinsyre i dyrkningsmedium.

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2021



10015

10031

# **Utvikling av protokoll for SDS-PAGE analyse av A549 cellelinje, og studie av endring i proteinekspresjonsmønster som følge av tilsetning av sialinsyre i dyrkningsmedium.**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2021

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 to studenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) og beskriver vårt avsluttende arbeid i en bachelor i bioteknologi.

Gjennom dette semesteret har vi jobbet kontinuerlig med oppgaven og lagt ned veldig mange arbeidstimer, til tross for at NTNU i Ålesund stengte ned periodevis i henhold til koronapandemien som har pågått. Med denne oppgaven håper vi på å vise hvilke kunnskaper vi har lært oss gjennom tre studieår ved NTNU i Ålesund.

Vi ønsker å gi en takk til NTNU i Ålesund som har tilrettelagt med tilgjengelige laboratorier og økonomisk støtte slik at vi har kunnet utføre forsøket med de reagensene og utstyret vi har trengt. Vi ønsker også å rette en stor takk til veilederen vår Ann-Kristin Tveten som har vært tilgjengelig under hele prosessen og hjulpet oss underveis, i tillegg til å ha bidratt med mye kunnskap.

## Sammendrag

For å studere endring i proteinekspressjonen av ulike SIGLEC proteiner, ble A549 cellelinjen brukt. Cellekulturen ble dyrket i DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% AA dyrkingsmedium, samt ulike konsentrasjoner av sialinsyre.

I begynnelsen av forsøket gikk mye av arbeidet ut på å optimalisere prosedyren for proteinekspressjon av SIGLEC under SDS-PAGE. Celleprøvene som ble benyttet under forsøkene hadde blitt dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre, disse var 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM.

En betydelig del av forsøket gikk ut på å optimalisere metodeutviklingen. Gjennom denne ble det testet ulike mengder med radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, forholdet på 2,5:1 RIPA lysesbuffer til prøve ga best resultat. Videre ble det benyttet to ulike SDS-PAGE gel konsentrasjoner, 12% og 16%, for å finne gelen som var mest optimal for proteinuttrykk av SIGLEC. Avgjørelsen falt på 12% SDS-PAGE gelen da denne ga klarere og bedre visualiserte proteinbånd enn 16% SDS-PAGE gelen.

Resultatene av prøvene dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre viste lite til ingen endring i proteinekspressjonsmønster. Det ble konkludert at metoden som ble benyttet ikke ga tilstrekkelig med informasjon om de ulike proteinene i prøvene, anbefaler videre testing med western blotting.

## Summary

When studying the changes in the protein expression of different SIGLEC proteins, the cell line A549 was used. These cells were cultivated in DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% AA culture medium with differing concentrations of sialic acid.

At the beginning of the experiment, a significant amount of the work went into optimizing the procedure used to visualize protein expression of SIGLEC with SDS-PAGE. The samples were cultivated at different concentrations of sialic acid, these concentrations were 0 mM, 0,1 mM, 1 mM and 2mM.

A significant portion of the experiment was the optimization of methods. Different volumes of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer were tested and the concentration of 2,5:1 RIPA buffer to test sample was found to give the best results. This was used with different concentrations of SDS-PAGE gels to find the best one for protein expression of SIGLEC proteins. 12% and 16% concentrations were tested and 12% SDS-PAGE gel was found to provide a clearer visualization of the protein bands than the 16% SDS-PAGE gel.

The results of the samples cultivated on different concentrations of sialic acid showed little to no change in the protein expression of the SIGLEC proteins. These results suggest that not enough information were given by this method. It is therefor recommended to try a different method such as western blotting.

## Innholdsfortegnelse

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Bakgrunn for valg av tema. ....                                                            | 1  |
| 1.2 Problemstilling.....                                                                        | 1  |
| 2 TEORI.....                                                                                    | 2  |
| 2.1 A549 celler.....                                                                            | 2  |
| 2.1.1 Dyrkning av A549 celler.....                                                              | 2  |
| 2.2 Sialinsyre.....                                                                             | 3  |
| 2.3 SIGLEC (Sialic acid-binding Ig-like lectins). ....                                          | 3  |
| 2.3.1 Funksjonen til SIGLEC 1: .....                                                            | 3  |
| 2.3.2 Funksjonen til SIGLEC 5, SIGLEC 6, SIGLEC 9, SIGLEC 12, SIGLEC 14, og<br>SIGLEC 16: ..... | 4  |
| 2.3.3 Funksjonen til SIGLEC 7, SIGLEC 10 og SIGLEC 11: .....                                    | 4  |
| 2.3.4 Funksjonen til SIGLEC 8 og SIGLEC 15: .....                                               | 5  |
| 2.4 Proteinekspresjon.....                                                                      | 5  |
| 2.5 Proteinisolering .....                                                                      | 5  |
| 2.5.1 RIPA lysesbuffer. ....                                                                    | 6  |
| 2.6 SDS-PAGE .....                                                                              | 6  |
| 2.6.1 EZ-vision: .....                                                                          | 7  |
| 2.6.2 peqGOLD Protein Markør II: .....                                                          | 7  |
| 2.7 ChemiDoc – visualisering av SDS-PAGE.....                                                   | 7  |
| 2.7.1 Tolkning av polyakrylamid geler etter visualisering med ChemiDoc. ....                    | 8  |
| 2.8 Fargemetode for polyakrylamid gel.....                                                      | 8  |
| 2.8.1 Coomassie Brilliant Blue .....                                                            | 8  |
| 2.8.2 Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution .....                                  | 9  |
| 2.9 Qubit® Protein Assay Kits for kvalitetssikring og normalisering av prøver.....              | 9  |
| 3. MATERIALER OG METODER.....                                                                   | 10 |
| 3.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved hjelp av RIPA lysesbuffer .....           | 10 |
| 3.2 Utprøving av polyakrylamid gel på 12% og 16%.....                                           | 12 |
| 3.3 Analyse av prøver ved hjelp av SDS-PAGE og peqGOLD Protein Markør II. ....                  | 13 |
| 3.4 Utprøving av fargeprosedyre Coomassie blue.....                                             | 15 |
| 4 RESULTATER.....                                                                               | 17 |
| 4.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved bruk av RIPA lysesbuffer .....            | 17 |
| 4.2 Utprøving av polyakrylamid gel 12% og 16% .....                                             | 17 |



|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3 Visualisering av SDS-PAGE gel .....                                               | 17 |
| 4.4 Utprøving av fargeprosedyre Commassie blue.....                                   | 18 |
| 5 DISKUSJON.....                                                                      | 19 |
| 5.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved hjelp av RIPA lysesbuffer. .... | 20 |
| 5.2 Utprøving av polyakrylamid gel 12% og 16% .....                                   | 21 |
| 5.3 Analyse av prøver ved hjelp av SDS-PAGE og peqGOLD Protein Markør II .....        | 22 |
| 5.4 Utprøving av fargeprosedyre Commassie blue.....                                   | 23 |
| 6 KONKLUSJON .....                                                                    | 25 |
| 7 LITTERATURLISTE: .....                                                              | 26 |
| A.0 VEDLEGG.....                                                                      | I  |
| A.1 Tabeller .....                                                                    | I  |
| A.1.1 SIGLEC.....                                                                     | I  |
| A.2 Figurer .....                                                                     | II |
| A.2.1 SDS-PAGE.....                                                                   | II |

## Tabelliste

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabell 1: Utgitte A549 celleprøver som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre. ....                                                                | 10 |
| Tabell 2: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                        | 11 |
| Tabell 3: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                        | 11 |
| Tabell 4: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                        | 11 |
| Tabell 5: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 72 timer. ....                                        | 12 |
| Tabell 6: Forskjeller mellom 12% polyakrylamid gel og 16% polyakrylamid gel. ....                                                                                             | 12 |
| Tabell 7: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer. ....                                        | 13 |
| Tabell 8: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                        | 13 |
| Tabell 9: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer. ....                                        | 14 |
| Tabell 10: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                       | 14 |
| Tabell 11: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer. ....                                       | 15 |
| Tabell 12: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer. ....                                       | 15 |
| Tabell 13: Viser en oversikt over alle SIGLEC proteinene. Oversikten inneholder isoformer, lengden i basepar og størrelsen oppgitt i kDa hos de ulike SIGLEC proteinene. .... | I  |

## Figurliste

|                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figur 1: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | II  |
| Figur 2: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | II  |
| Figur 3: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | III |
| Figur 4: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 72 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | III |
| Figur 5: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | III |
| Figur 6: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | IV  |
| Figur 7: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | IV  |
| Figur 8: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. ....                                                                | IV  |
| Figur 9: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Prøvene ble farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution i 30 minutter etter SDS-PAGE. ....  | V   |
| Figur 10: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Prøvene ble farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution i 30 minutter etter SDS-PAGE. .... | V   |

Figur 11: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. .... VI

Figur 12: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE. .... VI

## **Terminologi og forkortelser.**

**Adenokarsinom:** En hyppig form for lungekreft.

**Adhesjon:** Klistre eller henge sammen ulike objekter og materialer.

**Alveoler:** Blæreformede utvidelser i enden av luftveiene i lungene.

**Lysat:** Preparat som inneholder produktene fra lysering av celler.

**Hypotriploide:** Inneholder mindre enn tre ganger antall kromosomer av en haploid menneskelig gamet.

**kDA:** Måling av molekylvekt i kilodalton.

**Klatrinavhengig endocytose:** Transport av vesikler til/fra plasmamembranen i celler hvor overflaten av vesiklene er dekket av klatriner.

**Ligand:** Molekyl, funksjonell kjemisk gruppe eller grunnstoff (ion) som binder seg til en annen kjemisk forbindelse som fungerer som et mottakermolekyl (reseptor). Ved at liganden binder seg til reseptormolekylet vil det som oftest bli overført ett signal.

**Mannose:** Et monosakkarid og en viktig heksose.

**Rekombinant:** Gener eller biter av DNA fra to forskjellige kilder som er kunstig bundet sammen, enten fra samme eller fra ulike organismer.

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

**SIGLEC:** Sialic acid binding Ig-like lectins.

**Supernatant:** En klar væske som legger seg oppå faste rester etter en sentrifugering, krystallisering eller sedimentering.

**Transfeksjon:** Innføring av fremmed DNA inn i en eukaryot celle.

**Transfeksjonsvert:** En vert som innfører et fremmed DNA inn i en eukaryot celle.

# 1 INNLEDNING

## 1.1. Bakgrunn for valg av tema.

Underveis på studiet i bioteknologi ble det gjennomgått mange forskjellige arbeidsmetoder på laboratoriet og på denne måten lært ulike teknikker som blir brukt innenfor ulike fagområder. Det har blitt jobbet med forskjellige mikroorganismer slik som bakterier, alger og celler. Ønsket var å jobbe med eukaryote celler i bacheloren da dette laboratoriekurset var noe av det mest spennende og lærerike. I tillegg ble det gitt innspill fra veilederen etter at hun og kollegaen hennes hadde dyrket A549 celler med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre. De var interessert i om det er mulig å se endringer i proteinekspresjon i cellen når den er tilsatt sialinsyre til dyrkingsmedium. Hvordan ville det påvirke proteinuttrykket av SIGLEC som et resultat av dette? På grunnlag av dette ble valget av oppgave enkelt da det var ett ønske om å jobbe med dyrkning av celler på forhånd, for å kunne analysere proteinuttrykk etter en stressrespons.

## 1.2 Problemstilling.

«Kan man anvende SDS-PAGE til å studere SIGLEC proteinekspresjonen i A549 celler etter at disse cellene har blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i tidsintervallene 24, 48 og 72 timer?»

Ved valg av problemstilling ble det avgjørende at det praktiske arbeidet kunne utføres når som helst og i tillegg var mulig å vente mellom hvert laboratorieforsøk. Dette ble en viktig forutsetning da koronasituasjonen gjorde at tilgangen til laboratoriet var begrenset og periodevis stengt. Det var også viktig at problemstillingen var noe som kunne forskes på i praksis. Utgangspunktet for oppgaven ga en utfordring som inkluderte utarbeiding av prosedyre og utprøving av analyseparameter for å studere proteinekspresjon.

## 2 TEORI

«*In vitro*» forsøk er en metode som anvendes for å studere cellulære funksjoner i laboratorium. Dette er en biologisk eller medisinsk metode hvor eksperimentet blir utført i for eksempel et prøveglass eller en petriskål, altså utenfor en levende organisme (1). Fordelen med å benytte *in vitro* forsøk er at de biologiske funksjonene forenkles betraktelig i forhold til «*in vivo*» (i en organisme) forsøk. Celler består av flere bestemte organeller og funksjoner, og for å studere spesifikke funksjoner i en celle vil det ofte være nødvendig å fjerne komponentene fra sin opprinnelige tilhørighet. Ved å gjøre forsøk på denne måten kan en tilegne seg kunnskap om detaljerte biologiske prosesser som igjen kan forskes videre på. I tillegg til dette vil benyttelsen av cellekulturer i eksperimenter unngå at organismer slik som dyr og mennesker utsettes for unødvendige påkjenninger (2). Å studere proteinekspressjon i celler er et eksempel på forsøk *in vitro*. Proteinekspressjon i denne sammenhengen er å analysere sammensetningen av ulike proteiner som produseres i en cellekultur på laboratoriet under kontrollerte forhold (3).

### 2.1 A549 celler.

A549 celler er lungekarsinom epitelceller som utgjør en cellelinje, denne cellelinjen er en ikke-småcellet lungekreft som deler seg raskt. A549 cellelinjen består av hypotriploide humane alveoler basale epitelceller. Dette betyr at cellelinjen er en grunnleggende epitelcelle i lungene med små hulrom og har mindre enn en tredjedel av menneskelige kjønnselle kromosomer. D.J. Giard oppdaget i 1972 A549 cellelinjen ved å fjerne og dyrke lungekarsinomvev fra en eksplantert svulst hos en 58 år gammel kaukasisk mann. A549 celler er ansvarlige for diffusjonen av vann og elektrolytter over alveolene. Cellene vokser sammen i ett lag og egner seg derfor som en transfeksjonsvert (4).

#### 2.1.1 Dyrkning av A549 celler.

A549 celler dyrkes på DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% AA dyrkingsmediet. DMEM/F-12 er et medium som suksessfullt kan benyttes på blant annet gliaceller, fibroblaster og humane endotelceller, noe som gjør at dette mediet egner seg godt for A549 celler. Dette mediet består av et 1:1 forhold av DMEM og Ham's F-12. DMEM inneholder høye konsentrasjoner av glukose, aminosyrer, og vitaminer, mens F-12 inneholder et stort spekter av komponenter. DMEM/F-12 mangler vekstfaktorer og dermed benyttes ofte 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (5). FBS blir mye brukt som veksttilskudd i medier da det har et høyt innhold av embryonale

vekstfremkallende faktorer. I riktig konsentrasjon har FBS vist seg å tilfredsstillende spesifikke krav til dyrkning av celler (6). A549 celler har celledeling ca. hver 22 time når forholdene for cellekulturen er optimalisert. Mediet som er benyttet på A549 cellekulturene i dette forsøket er DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% AA. I tillegg til dette mediet har cellekulturen også blitt dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre.

## **2.2 Sialinsyre.**

Sialinsyre er en mannose, denne er bundet til en aminogruppe og er festet til et pyruvat. De utgjør en avgjørende del av glykoproteiner som dekker epitelceller på de indre overflatene i kroppen, luftveier, tarmkanal og kjønnsveier (7). Sialinsyre består av til sammen ni karboner. Ved de ulike beliggenhetene og den endeløse fordelingen, kan sialinsyre formidle eller endre et stort utvalg av fysiologiske og patologiske prosesser. Dette gjør at de kan brukes som komponenter i bindingssteder for ulike patogener og toksiner. Flesteparten av disse interaksjonene forekommer når patogenbindende proteiner gjenkjenner bestemte former for sialinsyrer. Disse blir uttrykt i spesifikke koblinger til en definert underliggende sukkerkjede. Sialinsyrer er bundet til reseptorer på celle overflaten (8). Sialinsyrer er negativt ladet terminale rester av glykankjeder. Disse er medført i elektrostatiske baserte intermolekylære interaksjoner som signaliserer til celle-cellegjenkjenning, celleadhesjon og intercellulær signalisering. Endring av sialinsyre-innholdet i glykoproteiner og glykolipider er betydningsfull for en normal nevroutvikling. Dette krever ett tett regulert uttrykk og effektiv nedregulering av sialinsyreholdige makromolekyler (9).

## **2.3 SIGLEC (Sialic acid-binding Ig-like lectins).**

SIGLEC er en gruppe av sialinsyrebindende proteiner. Disse proteinene antas å fremme celle til celle interaksjoner og regulere funksjonene til cellene i det medfødte og adaptive immunforsvaret. Dette foregår gjennom gjenkjenning av glykaner (10). (For en fullstendig oversikt over SIGLEC proteinene se VEDLEGG A.1.1, *Tabell 13*).

### *2.3.1 Funksjonen til SIGLEC 1:*

Dette proteinet fungerer som en endosytisk reseptor og denne reseptoren formidler om klatrinavhengig endocytose. SIGLEC 1 har også tilknytning til makrofager hvor proteinet fungerer som et adhesjonsmolekyl som frakter sialinsyreavhengige bindinger til lymfocytter, makrofager, naturlige drepeceller, B-celler og CD8 T-celler (11).



### *2.3.2 Funksjonen til SIGLEC 5, SIGLEC 6, SIGLEC 9, SIGLEC 12, SIGLEC 14, og SIGLEC 16:*

Alle disse SIGLEC proteinene fungerer som et adhesjonsmolekyl som gir beskjed til cellene om sialinsyreavhengige bindinger. SIGLEC 5 og SIGLEC 9 binder seg både til alfa-2,3-koblet og alfa-2,6-koblet sialinsyre. SIGLEC 6 kobler seg til alfa-2,6-koblet sialinsyre. Gjenkjenningsstedet til sialinsyre kan bli dekket av cis-interaksjoner av sialinsyrer på den samme celleoverflaten. Dette vil si at både sialinsyren og dens reseptor uttrykkes på samme celleoverflate (12) (13) (14) (15) (16) (17).

### *2.3.3 Funksjonen til SIGLEC 7, SIGLEC 10 og SIGLEC 11:*

Både SIGLEC 7, SIGLEC 10 og SIGLEC 11 er antatt til å være adhesjonsmolekyl som gir beskjed til cellene om sialinsyreavhengige bindinger på samme måte som SIGLEC proteinene forklart i gruppen over. I tillegg til dette binder både SIGLEC 7 og SIGLEC 10 seg til alfa-2,3-koblet og alfa-2,6-koblet sialinsyre. SIGLEC 11 binder seg til alfa-2,8-koblet sialinsyre. Gjenkjenningsstedet til sialinsyre kan bli dekket av cis-interaksjoner av sialinsyrer på den samme celleoverflaten. Ved en immunrespons kan SIGLEC 7, SIGLEC 10 og SIGLEC 11 virke som en hemmende reseptor ved hjelp av ligandindusert fosforylering. Det som skjer ved immun responsen er at det skaffes cytoplasmatisk fosfatase som hentes via SH2-domenet til liganden. Videre hindres det at signalet overføres gjennom defosforylering av signalmolekyler (18) (19) (20). SIGLEC 7 gir også beskjed om hemming av cytoksitet ved naturlige drapsceller (21).

SIGLEC 10 er involvert i en negativ regulering av antigenreseptorsignalering i B-celler. Denne inhiberingen er avhengig av PTPN6/SNP-1. Sammen med CD24 kan SIGLEC 10 være involvert i undertrykkelse av immun respons mot fareassosierte molekyler slik som HSP70, HSP90 og HMGB1. HSP70 og HSP90 er proteiner som skilles ut hvis en celle blir utsatt for stress. I tillegg til dette kan også SIGLEC 10 og CD24 regulere immunforsvaret til naturlige drepeceller (22).

#### 2.3.4 Funksjonen til SIGLEC 8 og SIGLEC 15:

SIGLEC 8 er antatt til å være ett adhesjonsmolekyl som gir beskjed om sialinsyreavhengige bindinger til røde blodceller. SIGLEC 8 binder seg til alfa-2,3-koblet og alfa-2,6-koblet sialinsyre (23). SIGLEC 15 binder sammen sialylerte glykoproteiner (24).

#### 2.4 Proteinekspresjon

Proteinekspresjon er måten proteiner syntetiseres, modifiseres og reguleres i levende organismer. Proteiner syntetiseres og reguleres avhengig av det funksjonelle behovet i cellen. Oppskriften for proteiner er lagret i DNA og blir avlest av høyt regulerte transkripsjonsprosesser for å produsere messenger RNA (mRNA). Meldingen kodet av et mRNA blir deretter translert til et protein. Transkripsjon er overføring av informasjon fra DNA til mRNA, og translasjon er syntesen av protein basert på en sekvens spesifisert av mRNA (25).

*In vitro* proteinekspresjon er en gjennomførbar teknikk for forskere, dette for å raskt kunne uttrykke og produsere små mengder funksjonelle proteiner. Sammenlignet med *in vivo*-teknikker basert på bakterie- eller vevskulturceller, er *in vitro*-proteinekspresjon betraktelig raskere da det ikke krever gen-transfeksjon, cellekultur eller omfattende proteinrensing. *In vitro* proteinekspresjon er framstilling av rekombinante proteiner i løsning. Ved hjelp av biomolekulære translasjonsmaskineri blir disse ekstrahert fra cellene. Her forekommer proteinsyntese i cellelysater, i stedet for i dyrkede celler. Denne metoden kalles også cellefritt proteinekspresjon. Cellefri proteinsekresjon kan brukes med ulike typer og arter av celleekstrakt, denne metoden har flere fordeler og funksjoner som utfyller tradisjonelle *in vivo*-metoder (26).

#### 2.5 Proteinisolering

Proteinisolering er en laboratorieteknikk hvor det isoleres så mye protein som mulig fra en aktuell prøve. Ved denne teknikken lyses cellene og proteiner ekstraheres fra cellenes cytosol. Generelt sett blir celledestruksjon delt inn i to hoved-kategorier: varsom og grov. Effektiviteten av en bestemt metode for å lysere cellene blir bestemt av tilgjengeligheten av alle intracellulære proteiner til disposisjon. Varsom celledestruksjon protokoller er generelt sett brukt når prøven av interesse inneholder celler som enkelt lyserer. Biologisk materiale ved hard cellevegg og mange vevstyper krever mer grove metoder, som i hovedsak er basert

på mekanisk nedbrytning. Gjennom lysering av cellene vil oppdelingen av cellen bli delvis eller helt ødelagt, alt ettersom hvilken lyseringsmetode som blir brukt. Som en konsekvens av dette vil hydrolaser (fosfataser, glykosidaser og proteaser) være til stede i en homogen proteinløsning og muligens endre proteinsammensetningen til de lyserte cellene.

Denaturering av proteiner under eller rett etter lysering av cellene blir oppnådd ved bruk av ulike bufferkomponenter, den vanligste er med lyseringsbuffer (27).

### 2.5.1 RIPA lyseringsbuffer.

RIPA buffer (the radio-immunoprecipitation assay buffer) er en effektiv lyserer, som henter ut protein fra pattedyrceller, belagte celler og pelleterte suspensjonsceller. RIPA lyseringsbufferen benyttes dermed under proteinisolering og ekstraherer proteiner fra et prøvemateriale og gjør det mulig å analysere disse proteinene videre i SDS-PAGE. RIPA lyseringsbuffer er kompatibel med mange applikasjoner, inkludert reporteranalyser, proteinanalyser, immunanalyser og proteinrensing. Den tillater ekstraksjon av membran-, kjernefysiske og cytoplasmatiske proteiner (28).

## 2.6 SDS-PAGE

En standard laboratorieteknikk er sodium dodecyl sulfate - polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE), hvor ladete proteinmolekyl transporteres gjennom en løsning ved hjelp av et elektromagnetisk felt. Denne laboratorieteknikken er brukt mye innenfor biokjemi, immunologi, virologi og cellebiologi (29). Proteiner og nukleinsyrer separeres ut ifra størrelsen på molekylet av polyakrylamidgelen under SDS-PAGE. (30)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) denaturer proteinene under elektroforesen. Proteinene blir også negativt ladet ved at SDS binder seg til proteinene. Ca. 1,5 g SDS binder seg til 1 g protein. Bindingen mellom SDS og proteinene gir et likt forhold mellom masse og ladning. Dette gjør det mulig for proteinene å vandre i gelen mot den positive elektroden (anoden) når gelen er satt på 180 - 200V (31).

Denatureringen av proteinene gjør at disse mister sin opprinnelige tertiære form og danner en stavliknende form under gel elektroforesen. På grunnlag av at proteinene har lik ladning og form vil dermed ikke form eller ladning være faktorer som påvirker separasjonen av proteinene under SDS-PAGE. De separeres kun ut ifra størrelse (32).

Ved proteinanalyser under SDS-PAGE vil mengden prøvemateriale variere. På grunnlag av at ulike cellekulturer kan gi forskjellige konsentrasjoner av prøvemateriale er det viktig å beregne mengden av proteiner i hver enkelt prøve. For høye konsentrasjoner av prøvemateriale kan gi ett overtrykk av proteiner ved proteinbåndene under SDS-PAGE og dermed gi dårlige resultater. For lave konsentrasjoner av prøvemateriale kan også gi dårlige resultater ved at proteinbåndene kommer for utydelig frem under SDS-PAGE (31).

#### *2.6.1 EZ-vision:*

EZ-vision er en fluorescerende reagens som danner synlige visualiseringer av proteinbånd under en SDS-PAGE ved at denne reagensen samvandrer med protein-SDS kompleksene under elektroforesen. Resultatet kan visualiseres øyeblikkelig etter SDS-PAGE ved å plassere gelen på en standard UV «transilluminator», slik som for eksempel GelDoc eller ChemiDoc (32).

#### *2.6.2 peqGOLD Protein Markør II:*

peqGOLD Protein Markør II er satt sammen av 14 rekombinante, høyt rensede proteiner. Denne benyttes som en stige under SDS-PAGE. Disse er designet for presis dimensjonering av proteiner ved SDS-PAGE. Proteinstigen leveres 'klar til bruk' i en loading buffer. peqGOLD Protein Marker II er optimalisert for migrering på 8-16% SDS polyakrylamidgeler. Etter analysen av SDS-PAGE har proteinene blitt løst opp til klare definerte og skarpe bånd på en størrelse fra 10 kDa til 200 kDa. Båndene blir visualisert ved farging av Coomassie Brilliant Blue R-250. Proteinbåndet på 50 kDa har større intensitet og vil fungere som en referanse (33).

### **2.7 ChemiDoc – visualisering av SDS-PAGE.**

ChemiDoc XRS + -systemet baseres på CCD-høyoppløselige, høysensitive detekteringsteknologier og modulære alternativer. Ved å bruke dette systemet kan det analysere og detektere på ulike metoder: inkludert fluorescens, kolorimetri, densitometri, kjemiluminescens og kjemifluorescens. Systemet styres av programvaren «Image Lab» for å optimalisere bilders ytelse for rask, integrert og automatisert bildefotografering og analyse av forskjellige prøver. Inne i ChemiDoc XRS + er det plass til et bredt spekter av prøver, fra store håndlagde polyakrylamidgeler til små Ready-Agarose-geler. Systemet er et ideelt følge til PCR-, rensings- og elektroforesesystemer. Dette muliggjør bildeanalyse og dokumentasjon

av: restriksjonsfordøyelser, forsterkede nukleinsyrer, genetisk fingeravtrykk, RFLP, proteinrensing og karakterisering (34). ChemiDoc XRS + -systemet optimaliserer reproduserbare og pålitelige eksperimentelle data, og muliggjør kvantitative sammenligninger mellom forskjellige eksperimenter. Ved hjelp av egne algoritmer blir dette bildesystemet kalibrert ved oppsett for å sikre gode bilder hvor bilde er i fokus til enhver tid. Dette er uavhengig av zoomnivå eller prøveposisjon, bildeartefakter blir også automatisk korrigert. Systemet inneholder et overfølsomt 16-biters CCD-kamera som er superkjølt for påvisning av svake prøver. ChemiDoc XRS + -systemet kan brukes til bildebehandling med et bredt spekter av applikasjoner som krever høy oppløsning og følsomhet (35).

### *2.7.1 Tolkning av polyakrylamid geler etter visualisering med ChemiDoc.*

For å tolke visualiserte bilder av polyakrylamid geler med ChemiDoc må en først lete etter et reproduserbart mønster som er lett å tolke. I tillegg til dette bør man være på utkikk etter unormale assosiasjoner av bånd. Det er lite sannsynlig at to ikke-relaterte polypeptidbånd med veldig lik fargingsintensitet vil dukke opp tett sammen på en gel. Dette vil bli omtalt som en "dublett". En dublett indikerer ofte nærvær av to polypeptider som deler den samme aminosyresekvensen for det meste, med bare noen få ulikheter. Polypeptider fra cytoplasmatiske proteiner eller som er membranassosierte ytre til en membran, har en tendens til å danne godt oppløste smale bånd med skarpe kanter. Polypeptider som danner indre proteiner har sekvenser av hydrofobe sidekjedder som både vil og ikke vil denaturere fullstendig. De danner ofte bånd som er bredere med mindre forskjellige kanter. Svært store bånd som ellers er tydelig dannet, antyder enten overbelastning av protein i en brønn eller tilstedeværelse av et dominerende polypeptid i en prøve (36).

## **2.8 Fargemetode for polyakrylamid gel**

Det finnes ulike metoder å farge en polyakrylamid gel etter SDS-PAGE. En av metodene er Coomassie Brilliant Blue som blir forklart nedenfor.

### *2.8.1 Coomassie Brilliant Blue*

Coomassie Brilliant Blue er et fargestoff som ofte blir brukt i SDS-PAGE. Dette ble først beskrevet av den tyske forskeren Volker Neuhoff. Coomassie Brilliant Blue har navnet sitt fra den afrikanske byen Kumasi, tidligere Coomassie, en by i sentrale Ghana. For tiden finnes det to typer Coomassie-fargestoffer: R-250 og G-250 (37).

Begge Coomassie-fargestoffene er bygget opp av disulfonert trifenylmetanforbindelser. R-250 (rødfarget) mangler to metylgrupper som er til stede i G-250 (grønnfarget) form. "250" betegnet opprinnelig fargenes renhet (38). Under fargingsreaksjonen vil Coomassie Brilliant Blue binde seg til proteiner. Dette skjer gjennom ioniske interaksjoner mellom sulfonsyregrupper og positive proteinaminingrupper, på grunn av Van der Waals attraksjoner (39).

### *2.8.2 Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution*

Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution brukes for å avfarge gelene etter bruk av Coomassie Brilliant Blue R-250. Denne er satt sammen av metanol, eddiksyre og vann. Coomassie Brilliant Blue R-250 binder seg tettere til proteinene enn til gelmatrisen, som gjør at dette kan fjernes fra de proteinfrie delene av gelen ved bruk av Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution (40).

## **2.9 Qubit® Protein Assay Kits for kvalitetssikring og normalisering av prøver.**

Qubit® Protein Assay Kits gjør kvantifisering av proteiner enkelt og nøyaktig. Pakken består av konsentrert analysereagens, fortynningsbuffer og fortynnet BSA-standarder. Reagenset blir fortynnet ved hjelp av bufferen, man tilsetter prøven (hvilket som helst volum 1–20 µL er akseptabelt). Etter dette leser man av konsentrasjonen ved hjelp av Qubit® fluorometer. Analysen er nøyaktig for innledende prøvekonsentrasjoner fra 12,5 µg/ml til 5 mg/ml og viser lav protein-til-protein-variasjon. Analysen utføres ved romtemperatur, og signalet er stabilt i 3 timer (41)

### 3. MATERIALER OG METODER

#### 3.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved hjelp av RIPA lysesbuffer

Første forsøk ble gjennomført for å vurdere fremgangsmåte for å etablere protokoll til proteinekspresjon ved bruk av RIPA buffer. Til forsøket ble det anvendt A549 celler dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i dyrkningsmediumet i to forskjellige tidsintervall (*Tabell 2*).

*Tabell 1: Utgitte A549 celleprøver som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre.*

| <b>A549 celler dyrket med sialinsyre tidsperiode</b> | <b>Ingen sialinsyre tilsatt (Kontroll)</b> | <b>Sialinsyre-konsentrasjon 1</b> | <b>Sialinsyre-konsentrasjon 2</b> | <b>Sialinsyre-konsentrasjon 3</b> |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>48 timer</b>                                      | 0 mM                                       | 0,1 mM                            | 1 mM                              | 2 mM                              |
| <b>72 timer</b>                                      | 0 mM                                       | 0,1 mM                            | 1 mM                              | 2 mM                              |

Først ble 1,5 ml mikrosentrifugerør som inneholdt A549 celler og RNA-later lagringsbuffer blandet og 200 µl ble tilsatt i hvert sitt nye mikrofugerør (to paralleller). Dette ble gjort for alle prøvene som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner og tidsintervall. Cellesuspensjonen ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter ved 4 °C, og deretter ble supernatanten over cellepelleten fjernet. 1 ml iskald RIPA buffer ble tilsatt til cellepelleten og dette ble vortexet og inkubert i mikrofuge rør i 15 minutter ved 4 °C i henhold til produsentens prosedyre. Rørene ble videre sentrifugert på 14000G i 15 minutter ved 4 °C, og supernatanten ble overført til nye rør og plassert på is.

For SDS-PAGE ble 35 µl av supernatanten tilsatt 15 µl EZ-vision, og prøven ble varmet i 6 minutter ved 95 °C i henhold til produsentens prosedyre. 12 µl prøve ble tilsatt til separate brønner på SDS-PAGE gelen. Hver prøve ble analysert med to paralleller på to geler, henholdsvis 12% og 16% polyakrylamid geler. Separasjon i polyakrylamid gelen ble gjennomført ved 200V i 40 minutter under SDS-PAGE. Resultatet ble visualisert i ChemiDoc.

Ved andre gjennomgang av prosedyren ble det testet to forskjellige mengder med RIPA buffer som ble tilsatt i prøvematerialet. Mengdene som ble testet var 250 µl og 500 µl. Prøvematerialet som ble benyttet i dette forsøket var A549 celler som hadde blitt dyrket med sialinsyre i 48 timer. Det ble brukt to 12 % polyakrylamid geler hvor den ene inneholdt

prøver med 250 µl RIPA buffer og den andre inneholdt prøver med 500 µl RIPA buffer. Her er en oversikt over prøveoppsett i de to 12% polyakrylamid gelene (Tabell 3 og Tabell 4):

Tabell 2: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer..

| Brønn | 1 | 2 | 3    | 4    | 5      | 6      | 7    | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 |
|-------|---|---|------|------|--------|--------|------|------|------|------|----|----|
| Prøve |   |   | 0 mM | 0 mM | 0,1 mM | 0,1 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |

Tabell 3: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer.

| Brønn | 1 | 2 | 3    | 4    | 5      | 6      | 7    | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 |
|-------|---|---|------|------|--------|--------|------|------|------|------|----|----|
| Prøve |   |   | 0 mM | 0 mM | 0,1 mM | 0,1 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |

Først ble prøvene med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer tatt ut av fryser og satt på is. Videre ble de blandet og 2 paralleller på 100 µl tilført i hvert sitt nye mikrofugerør. Dette gjaldt alle de ulike prøvene. Cellesuspensjonen av de ulike prøvene ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter for så å fjerne supernatanten. Etter fjerning av supernatant ble det tilsatt 250 µl iskald RIPA buffer til halvparten av prøvene og 500 µl RIPA buffer til den resterende halvparten av prøvene. Cellepelleten med RIPA buffer ble videre vortexet og inkubert i mikrofugerør i 15 minutter ved 4 °C. Etter inkubering ble rørene sentrifugert på 14 000G i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført til nye rør og plassert på is og cellepelleten ble kastet. 30 µl av supernatanten ble mikset med 10 µl EZ-vision og prøvene ble varmet på 95 °C i 6 minutter. 15 µl prøve ble tilsatt per brønn på polyakrylamid gelen. En prøve var nok til to paralleller på en polyakrylamid gel. Polyakrylamid gelen ble satt på 200 V i 40 minutter under SDS-PAGE og resultatene ble visualisert i ChemiDoc.

Ved tredje gjennomgang av prosedyren så ble 250 µl RIPA buffer tilsatt prøvene. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler som hadde blitt dyrket med sialinsyre i 48 timer og 72 timer. Her er en oversikt over prøveoppsett på to 12% polyakrylamid geler (Tabell 5 og Tabell 6):

Tabell 4: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 250 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer

| Brønn | 1 | 2 | 3    | 4    | 5      | 6      | 7    | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 |
|-------|---|---|------|------|--------|--------|------|------|------|------|----|----|
| Prøve |   |   | 0 mM | 0 mM | 0,1 mM | 0,1 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |



Tabell 5: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 72 timer

| Brønn | 1 | 2 | 3    | 4    | 5      | 6      | 7    | 8    | 9    | 10   | 11 | 12 |
|-------|---|---|------|------|--------|--------|------|------|------|------|----|----|
| Prøve |   |   | 0 mM | 0 mM | 0,1 mM | 0,1 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |

Prøvene med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer ble hentet ut av fryser og satt på is. Disse ble blandet og 200 µl prøvemateriale ble tilført i hvert sitt mikrofugerør. Dette ble gjort for alle prøvene. Cellesuspensjonen ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter og supernatanten ble fjernet etter sentrifugeringen. 250 µl iskald RIPA buffer ble tilsatt til cellepelleten og dette ble vortexet og inkubert i 15 minutter ved 4 °C. Mikrofugerørene ble videre sentrifugert på 14 000G i 15 minutter ved 4 °C. Videre ble supernatanten overført i nye rør og plassert på is og cellepelleten ble kastet. 30 µl av prøvematerialet ble mikset med 10 µl EZ-vision og prøvene ble oppvarmet ved 95 °C i 6 minutter. 15 µl prøvemateriale ble tilsatt per brønn på polyakrylamid gelen. Polyakrylamid gelen ble satt på 200V i 40 minutter under SDS-PAGE og resultatet ble visualisert i ChemiDoc.

### 3.2 Utprøving av polyakrylamid gel på 12% og 16%

Gjennom forsøket ble det utviklet ulike metoder, dette for å optimalisere visualiseringen av proteinbåndene etter SDS-PAGE. Det ble benyttet ulike geler, 12% og 16% polyakrylamid gel.

Tabell 6: Forskjeller mellom 12% polyakrylamid gel og 16% polyakrylamid gel

| Polyakrylamid gel | Seperasjonsbredde i kDa | Konsentrasjonen av polyakrylamid i gelen. |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| 12%               | 10 – 200 kDa            | 12%                                       |
| 16%               | 5 – 60 kDa              | 16%                                       |

Polyakrylamid gelen på 12% kan separere molekyler fra størrelse 10 kDa til 200 kDa, mens polyakrylamid gelen på 16% kan separere molekyler fra 5 kDa til 60 kDa. I forsøket ble det testet ut hvilken polyakrylamid gel som ga best visualisering av SIGLEC proteiner etter SDS-PAGE. Små proteiner ville vandre best i 16% polyakrylamid gelen, mens større proteiner ville vandre best i 12% polyakrylamid gelen.

I denne delen av forsøket ble det testet hvilken av 12% eller 16% polyakrylamid gelen som ga best visualisering av proteinbånd etter SDS-PAGE. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i tidsintervallene 48 timer og 72 timer.

Prøver med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer ble tatt ut av frys og blandet. Videre ble to paralleller på 200 µl overført til nye sentrifugerør og sentrifugert i 6 minutter på 2000G. Supernatant ble fjernet over cellepelleten og 1 ml iskald RIPA buffer ble tilsatt. Dette ble vortexet og inkubert i 15 minutter ved 4 °C. Mikrofugerørene ble videre sentrifugert på 14 000G i 15 minutter ved 4 °C og supernatant ble overført i nytt rør. Cellepellet ble kastet. 35 µl prøve ble mikset med 15 µl EZ-vision før SDS-PAGE. Dette ble varmet opp ved 95 °C i 6 minutter. Det ble tilsatt 15 µl prøve per brønn på polyakrylamid gelen og denne ble satt på 200V i 40 minutter under SDS-PAGE. Resultatet ble visualisert i ChemiDoc, men ikke lagret. 12% polyakrylamid gelen ga best synlige proteinbånd.

### 3.3 Analyse av prøver ved hjelp av SDS-PAGE og peqGOLD Protein Markør II.

I starten av forsøket ble protokoll for proteinekspresjon og SDS-PAGE optimalisert for å få best mulig visualiserte proteinbånd etter SDS-PAGE. I denne delen av forsøket ble det tilsatt peqGOLD Protein Markør II ladder til polyakrylamid gelen som en standard for å kunne sammenligne proteinbåndene med de ulike prøvene. Prøvematerialet som ble benyttet i denne delen av forsøket var A549 celler som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i tidsintervallene 24 timer og 48 timer. peqGOLD Protein Markør II ble også testet. Det ble benyttet to 12% polyakrylamid geler. Oversikt over prøveoppsett og proteinmarkør i de to 12% polyakrylamid gelene vises nedenfor (*Tabell 7 og Tabell 8*):

*Tabell 7: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

*Tabell 8: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

Først ble prøvene med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer hentet ut fra frys og satt på is og deretter blandet. 200 µl prøvemateriale ble overført til nye sentrifugerør og dette ble gjort for alle prøvene. Cellesuspensjonen ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter ved 4 °C. Deretter ble supernatant over cellepelleten fjernet. 500 µl iskald RIPA buffer ble tilsatt cellepelleten og dette ble vortexet og inkubert i 15 minutter ved 4 °C. Rørene ble videre sentrifugert på 14 000G i 15 minutter ved 4°C. Supernatant ble overført til nye rør og plassert på is og cellepelleten ble kastet. Konsentrasjonen av totalt protein ble målt med Qubit og normalisert til 2 µg per prøve. peqGOLD Protein Markør II ble satt inn og behandlet som en prøve. 30 µl av prøve og peqGOLD Protein Markør ble mikset med 10 µl EZ-vision. Prøvene og peqGOLD Protein Markør II ble varmet opp ved 95 °C i 6 minutter. 15 µl prøve og peqGOLD Protein Markør II ble tilsatt per brønn på polyakrylamid gelen. Deretter ble polyakrylamid gelen ble satt på 200V i 40 minutter under SDS-PAGE og resultatet ble visualisert i ChemiDoc.

Ved andre gjennomgang med peqGOLD Protein Markør II ble det tilsatt en større mengde prøvemateriale og peqGOLD Protein Markør II til EZ-vision. 20 µl prøve ble tilsatt per brønn på polyakrylamid gelen for å se om proteinbåndene kom tydeligere frem. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i tidsintervallene 24 timer og 48 timer og peqGOLD Protein Markør II. Det ble benyttet to 12% polyakrylamid geler. En oversikt over prøveoppsett og peqGOLD Protein Markør II i de to 12% polyakrylamid gelene vises nedenfor (*Tabell 9 og Tabell 10*):

*Tabell 9: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

*Tabell 10: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

Prøver med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer ble tatt ut av frys og blandet. Deretter ble 200 µl av prøvematerialet tilsatt i nye mikrofugerør. Dette ble gjort for alle prøvene. Mikrofugerørene ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter ved 4 °C. Supernatanten over cellepelleten ble fjernet etter sentrifugeringen. 500 µl iskald RIPA buffer ble tilsatt til

cellepelleten og dette ble vortexet og inkubert i mikrofuge rør i 15 minutter ved 4 °C. Rørene ble videre sentrifugert på 14000G i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført til nye rør og plassert på is, cellepelleten ble kastet. Deretter ble konsentrasjon av totalt protein målt med Qubit og normalisert til 2 µg per prøve. peqGOLD Protein Markør II ble satt inn og behandlet som en prøve. 45 µl av prøvene og peqGOLD Protein Markør II ble mikset med 15µl EZ-vision. Disse ble oppvarmet i 6 minutter ved 95 °C. Det ble tilsatt 20 µl prøve per brønn på polyakrylamid gelen og denne ble satt på 200V i 40 minutter under SDS-PAGE. Resultatet ble visualisert i ChemiDoc.

### 3.4 Utprøving av fargeprosedyre Commassie blue.

Siste del av forsøket var testing av fargeprosedyre Commassie Blue etter SDS-PAGE for å se om visualiseringen av proteinbåndene på polyakrylamid gelene ble mer synlige. I tillegg ble det testet en mindre voltstyrke under SDS-PAGE. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner i tidsintervallene 24 timer og 48 timer og peqGOLD Protein Markør II. En oversikt over prøveoppsett og proteinmarkør i de 2 12% polyakrylamid gelene vises nedenfor (*Tabell 11 og Tabell 12*):

*Tabell 11: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 24 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

*Tabell 12: Oversikt over brønner i 12% polyakrylamid gel med 500 µl RIPA buffer tilsatt i prøver dyrket med sialinsyre i 48 timer.*

| Brønn | 1 | 2 | 3             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10 | 11 | 12 |
|-------|---|---|---------------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|
| Prøve |   |   | Proteinmarkør | 0 mM | 0 mM | 1 mM | 1 mM | 2 mM | 2 mM |    |    |    |

Prøver med A549 celler og RNA-later lagringsbuffer ble først tatt ut av frys og blandet. 200 µl av prøvematerialet ble tilsatt i nye mikrofugerør. Dette ble gjort for alle prøvene. Cellesuspensjonen ble sentrifugert på 2000G i 6 minutter ved 4 °C. Deretter ble supernatanten over cellepelleten fjernet. 500 µl iskald RIPA buffer ble tilsatt til cellepelleten. Dette ble videre vortexet og inkubert i mikrofuge rør i 15 minutter ved 4 °C. Rørene ble videre sentrifugert på 14000G i 15 minutter ved 4 °C og deretter ble supernatanten overført til nye rør og plassert på is. Cellepelleten ble kastet. Konsentrasjon av totalt protein ble målt med Qubit og normalisert til 2 µg per prøve. 30 µl av supernatanten ble mikset med 10 µl EZ-vision og oppvarmet i 6 minutter ved 95 °C. Det ble tilsatt 15 µl prøve per brønn på

polyakrylamid gelen. Det ble også tilsatt 15 µl romtemperert peqGOLD Protein Markør II til en av brønnene på polyakrylamid gelen og denne ble videre satt på 180V i 45 minutter under SDS-PAGE.

Etter SDS-PAGE ble proteinene farget med Coomassie Brilliant Blue R-20 ved romtemperatur i 30 minutter. Deretter ble polyakrylamid gelene vasket med Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution til all overflødig Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution ble borte. Resultatet ble visualisert i ChemiDoc.

## 4 RESULTATER

### 4.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved bruk av RIPA lysesbuffer

Resultatene fra det første forsøket ved dyrkningsperiode på 48 timer og 72 timer som ble analysert på 12% og 16% polyakrylamid geler ble visualisert ved hjelp av ChemiDoc. Resultatene ble ikke lagret da 16% polyakrylamid gelen ga betydelig dårligere resultat enn 12% polyakrylamid gel.

Resultatene fra andre gjennomgang av prosedyren er presentert i *Figur 1* og *Figur 2* (VEDLEGG A.2.1). *Figur 1* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 250 µl RIPA buffer, det ses klare bånd som er lett leselige. *Figur 2* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer. Det ses mer upresise bånd som gir ugyldige resultater. Forholdet 1:2,5 med RIPA buffer ga det sikreste resultatet.

Resultatene fra tredje gjennomgang av prosedyren er presentert i *Figur 3* og *Figur 4* (VEDLEGG A.2.1). *Figur 3* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 250 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 48 timer. Her ble det avbildet upresise bånd, i tillegg til at båndene med sialinsyre konsentrasjon 1 mM ikke vises. *Figur 4* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 250 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 72 timer. Det ble avbildet mer presise bånd, men båndene med sialinsyre konsentrasjon 2 mM var mer upresis.

### 4.2 Utprøving av polyakrylamid gel 12% og 16%

Prøver med dyrkningsperiode på 48 timer og 72 timer som ble analysert på 12% og 16% polyakrylamid geler, ble avbildet ved hjelp av ChemiDoc. Resultatene av denne avbildningen ble ikke lagret, dette fordi 16% polyakrylamid gelen ga betydelig dårligere resultat enn 12% polyakrylamid gelen. Det ble besluttet å kun bruke 12% polyakrylamid geler videre i forsøket.

### 4.3 Visualisering av SDS-PAGE gel

Resultatene fra første gjennomgang av prosedyren med peqGOLD Protein Markør II er presentert i *Figur 5* og *Figur 6* (VEDLEGG A.2.1). *Figur 5* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer

analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 24 timer, det ble avbildet en luftboble i polyakrylamid gelen. Luftboblen ga ugyldige resultater, *Figur 5* (VEDLEGG A.2.1) var ikke brukbar. *Figur 6* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 48 timer. Det ble avbildet noen mer upresise bånd og to sterke bånd på hver sin konsentrasjon av sialinsyre. Brønnen med proteinmarkører viste tre svakere bånd.

Resultatene fra andre gjennomgang av prosedyren med peqGOLD Protein Markør II er presentert i *Figur 7* og *Figur 8* (VEDLEGG A.2.1). *Figur 7* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 24 timer, det ble avbildet tydelige bånd på prøvene. Brønnen med proteinmarkøren fremstilte ingen bånd. Prøve nummer to av 1 mM sialinsyre konsentrasjon har ugyldig resultat. *Figur 8* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 48 timer, det ble visualisert tydelige bånd. Det ble avbildet to sterke og to svakere bånd på hver sin konsentrasjon av sialinsyre. Brønnen med proteinmarkører viste tre uskarpe bånd, det er for mye støy i bakgrunnen til å lese av disse.

#### **4.4 Utprøving av fargeprosedyre Commassie blue**

Resultatene fra siste gjennomgang av prosedyren med utprøving av fargeprosedyre Commassie Blue er presentert i *Figur 9*, *Figur 10*, *Figur 11* og *Figur 12* (VEDLEGG A.2.1). *Figur 9* og *Figur 10* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer polyakrylamid geler etter farging med Commassie Blue. *Figur 9* (VEDLEGG A.2.1) er av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 24 timer, *Figur 10* (VEDLEGG A.2.1) er av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 48 timer. *Figur 11* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 24 timer, det ble avbildet uskarpe bånd som ikke analyseres. Brønnen med proteinmarkører viste ingen bånd. *Figur 12* (VEDLEGG A.2.1) visualiserer analyseresultatet av prøver tilsatt med 500 µl RIPA buffer ved en dyrkningsperiode med sialinsyre i 48 timer, det ble avbildet uskarpe bånd som ikke analyseres, prøve nummer to med 0 mM konsentrasjon med sialinsyre har ingen bånd. Brønnen med proteinmarkører viste ingen bånd.

## 5 DISKUSJON

I dette forsøket ble det nødvendig med optimalisering av protokoll brukt for proteinekstraksjon og visualisering på SDS-PAGE. Dette var nødvendig for å få et så godt resultat som mulig hvor proteinbåndene ble tydelig gjennom visualiseringen på ChemiDoc etter SDS-PAGE. Delene i prosedyren som måtte optimaliseres var typen polyakrylamid gel som ble benyttet under SDS-PAGE, mengde prøvemateriale, mengde RIPA buffer og mengde prøvemateriale i brønnene på gelen. Dette ble optimalisert slik at det ble mulig å se proteinbåndene tydelig på polyakrylamid gelen etter SDS-PAGE. Det som ble avgjørende i forsøket var å isolere og få ut nok proteiner fra prøvene før de ble tilført i brønnene på gelen. I starten av optimaliseringsprosessen ble det benyttet 1 ml RIPA buffer, deretter ble det testet 500 µl og 250 µl RIPA buffer. I tillegg ble det testet forskjellige mengder av prøvemateriale i brønnene. Det ble testet både 12 µl, 15 µl og 20 µl prøvemateriale i brønnene på gelen i løpet av optimaliseringsperioden.

Optimaliseringsperioden av prosedyren varte i to måneder og besto av flere forsøk. Denne perioden ble lengre enn beregnet på grunnlag av koronasituasjonen som gjorde at NTNU i Ålesund stengte ned periodevis og da også laboratoriet.

Det ble gjennomført flere forsøk for å optimalisere protokoll for proteinisolering og visualisering av proteinbånd ved hjelp av SDS-PAGE. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler som hadde blitt dyrket med forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i tre forskjellige tidsperioder: 24 timer, 48 timer og 72 timer. Oppsettet for A549 celler dyrket med sialinsyre var slik:

1 prøve, 24 timer: 0 mM, 1 mM og 2 mM.

2 prøver, 48 timer: 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM.

1 prøve 72 timer: 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM.

Ved 24 timer og en av 48 timers prøve ble det gjennomført Qubit analyse, dette for å sikre lik proteinkonsentrasjon i alle prøvene. For å sikre lik avstand på proteinbåndene ble alle gelene kjørt i 40 minutter ved 200V, med unntak av siste forsøk hvor gelene ble kjørt i 45 minutter ved 180V. Ved utførelse av de første forsøkene ble det ikke brukt peqGOLD Protein Markør II da begynnelsen gikk mest til optimalisering av prosedyren.



### 5.1 Etablering av prosedyre for proteinekspresjon ved hjelp av RIPA lyseringsbuffer.

Ved første gjennomgang av protokoll ble det brukt A549 celler som var dyrket med sialinsyre i 48 timer og 72 timer. Disse prøvene var dyrket med ulike konsentrasjoner av sialinsyre; 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM. Gjennom prosedyren ble det tilsatt 1 ml RIPA buffer i prøvene. For å analysere prøve ble det brukt både 12% og 16% polyakrylamid gel. Gjennom visualisering i ChemiDoc kom det fram utydelige resultater. Dette var på grunn av for mye RIPA buffer. Selv med utydelige resultat ble det konkludert at 12% polyakrylamid gelen ga tydeligere resultat, og det ble valgt å bruke denne fremover i stedet for 16% polyakrylamid gel. Ingen bilder ble lagret da de ikke var mulig å lese av.

Ved andre gjennomgang av protokoll ble det brukt A549 celler som var dyrket med sialinsyre i 48 timer. Disse prøvene var dyrket med ulike konsentrasjonene av sialinsyre; 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM. Dette forsøket ble gjort for å teste ulik mengde av RIPA buffer, 500 µl og 250 µl. Denne mengden skulle bli testet med 200 µl av prøvemateriale, men det ble gjort en feil og det ble brukt 100 µl prøvemateriale. For å analysere prøvene ble det brukt 12% polyakrylamid gel. Gjennom visualisering i ChemiDoc kom det fram ulike kvaliteter i resultatene, resultatene vises i *Figur 1* og *Figur 2* (VEDLEGG A.2.1). Prøvene med 250 µl viste seg å være de beste, se *Figur 2* (VEDLEGG A.2.1). Det ble bestemt å bruke 250 µl til de neste prosedyrene. I dette forsøket kan en se at proteinbåndene vises nokså likt i alle prøvene på begge polyakrylamid gelene, men at proteinbåndene kommer mer tydelig frem på den med 250 µl RIPA buffer.

På *Figur 1* (VEDLEGG A.2.1) kan man se 5 bånd i hver prøve, ett svakt, tre sterke og ett mindre strekt. De mindre sterke, samt båndet mellom de to tykkeste båndene, kan antas å bestå av en polypeptid. De to andre båndene kan antas å være en dublett av to polypeptider. På *Figur 2* kan man se noe likt resultat hvor det øverste båndet i *Figur 1* (VEDLEGG A.2.1) ikke vises her, ellers likt.

Ved tredje gjennomgang av prosedyre ble A549 celler som var dyrket med sialinsyre i 48 timer og 72 timer benyttet. Disse prøvene var dyrket med ulike konsentrasjonene av sialinsyre; 0 mM, 0,1 mM, 1 mM og 2 mM. I dette forsøket ble det brukt 200 µl prøve og 250 µl RIPA buffer, dette ble feil prøve-buffer forhold da det ikke ble tenkt på mengde prøvemateriale som ble brukt i prosedyre 2. For å analysere prøvene ble det brukt 12% polyakrylamid gel. Gjennom visualisering i ChemiDoc kom det fram dårligere kvalitet i

resultatene ved forrige gjennomgang av prosedyren. Resultatene vises i *Figur 3* og *Figur 4* (VEDLEGG A.2.1). Dette resultatet kan bli forklart med for lite RIPA buffer. Ved for lite RIPA buffer vil ikke nok proteiner bli lysert ut fra cellens cytosol og det er dermed ikke nok protein materiale til gode bånd på SDS-PAGE.

På *Figur 3* (VEDLEGG A.2.1) kan en se at rekke fem og seks mangler, dette kan være resultatet av en feilkilde. Prøven på 48 timer med sialinsyre-konsentrasjon på 1 mM ble mistet i bakken etter sentrifugeringen, dette resulterte med at prøven ble satt i sentrifugen en ekstra gang. Etter oppvarming var denne prøven klissete noe som gjorde det vanskelig å bruke den. Prøven på 72 timer hadde ugyldig resultat ved de to første brønnene, dette var prøver med sialinsyre -konsentrasjon på 2 mM. Polyakrylamid gelen ble lagt inn feil vei og resultatet blir derfor lest av fra høyre. Det ble visualisert en skummet prøve og dette var 72 timer prøven med sialinsyre -konsentrasjon på 2 mM. Dette kan forklare det ugyldige resultatet. Gjennom resten av prosedyrene ble det flere feil kilder, og ved sentrifugering var start temperaturen på 14 °C og gikk ned til 6 °C, denne skulle være på 4 °C. Grunnet disse feilkildene ble resultatet dårlig.

Ved både *Figur 3* og *Figur 4* (VEDLEGG A.2.1) er det visualisert to bånd i hver prøve (med unntak av brønnene omtalt ovenfor) disse kan antas å være en dublett av to polypeptider.

Slik en ser så ble resultatene av prøvene som var tilsatt forskjellig mengde med RIPA buffer (se *Figur 1*, *Figur 2*, *Figur 3*, og *Figur 4* i VEDLEGG A.2.1) ulik i alle gjennomgangene av prosedyren. Dette kan komme av at forskjellige forhold mellom prøvemateriale og RIPA bufferen gjør at forskjellig mengde med protein lyserer og dermed isoleres ut av cellens cytosol. I tillegg vil mengden protein som isoleres variere og dette vil også påvirke visualiseringen av proteinekspressjon ved en SDS-PAGE. På grunn av at SDS-PAGE elektroforese kun separerer proteiner ut ifra størrelse så er det vanskelig å kunne si noe om hvilke proteiner som ble uttrykt. På grunnlag av dette kan det ikke bli sagt noe om uttrykket av SIGLEC proteiner ble påvirket av at A549 celler ble dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre.

## **5.2 Utprøving av polyakrylamid gel 12% og 16%**

I denne delen av forsøkt så ble det testet ut forskjellige polyakrylamid geler, 12% og 16%. Dette ble testet ut for å finne ut hvilken av disse gelene som var mest optimal for å analysere proteinuttrykk ved SDS-PAGE. Resultatet ble visualisert i ChemiDoc, men bildene ble ikke lagret. Det avbildete resultatet viste best proteinbånd på 12% polyakrylamid gelen fremfor

16% polyakrylamid gelen. Dette kan komme av at proteinene som ble uttrykt hadde et bredt spekter i størrelsen på molekylene (kDa). 12% polyakrylamid egner seg best for proteiner i størrelse 10 – 200 kDa, mens 16% polyakrylamid gelen egner seg best for mindre proteiner fra 5 – 60 kDa. En høyere konsentrasjon av polyakrylamid i gelen vil gi større motstand for proteinene når disse vandrer i polyakrylamidgelen under SDS-PAGE. Dette er trolig hovedårsaken til at 12% polyakrylamid gelen egnet seg best for de protokollene som ble gjennomført underveis i dette forsøket.

### **5.3 Analyse av prøver ved hjelp av SDS-PAGE og peqGOLD Protein Markør II**

I denne delen av forsøket var mengden RIPA buffer og polyakrylamid gel optimalisert for proteinekspressjon og visualisering ved hjelp av SDS-PAGE. Her ble det gitt ut nye prøver og disse var A549 celler som var dyrket med sialinsyre i 24 timer og 48 timer. Prøvene var dyrket på ulike konsentrasjoner av sialinsyre; 0 mM, 1 mM og 2 mM. I dette forsøket ble det brukt 200 µl prøve og 500 µl RIPA buffer. I de nye prøvene ble konsentrasjonen av totalt protein målt med Qubit og normalisert til 2 µg per prøve. Det ble også brukt peqGOLD Protein Markør II og denne ble behandlet likt som prøvene. For å analysere prøvene ble det brukt 12% polyakrylamid gel med 15 µl prøve i hver brønn. Gjennom visualisering i ChemiDoc kom det fram dårligere kvalitet i resultatet enn forventet, resultatene vises i *Figur 5* og *Figur 6* (VEDLEGG A.2.1). Både proteinbåndene og peqGOLD Protein Markør II var dårlig visualisert. I *Figur 5* (VEDLEGG A.2.1) kan det ses en luftboble som gjorde det vanskelig å lese av resultatet. På *Figur 5* (VEDLEGG A.2.1) ble det visualisert en luftboble i gelen, denne gjorde at resultatet her ble ugyldig og ble derfor ikke brukt. *Figur 6* (VEDLEGG A.2.1) ga bra resultater, men kvaliteten var noe mindre enn forventet, dette kan skyldes feilkilder ved bruk av EZ-vision. Det skjedde noen feil underveis i forsøket og det ble funnet klumper av EZ-vision i prøven. Dette kan skyldes for dårlig oppvarming av EZ-vision før den ble tatt i prøvene. Ved *Figur 6* (VEDLEGG A.2.1) er det visualisert to bånd i hver prøve, disse er av forskjellig kvalitet, men man kan anta at båndene er duplett av to polypeptider.

Ved andre gjennomgang av prosedyre hvor peqGOLD Protein Markør II var tilsatt ble det benyttet litt mer prøvemateriale per brønn på polyakrylamid gelen. Gjennom visualisering i ChemiDoc kom det frem bilder med grei kvalitet, resultatene vises i *Figur 8* og *Figur 9* (VEDLEGG A.2.1). Ved å øke prøvevolum var håpet at peqGOLD Protein Markør II skulle komme mer frem, det var ikke resultatet. Ved *Figur 7* og *Figur 8* (VEDLEGG A.2.1) ble det

visualisert bra resultater, men kvaliteten var fremdeles noe mindre enn forventet, dette kan òg skyldes feilkilder ved bruk av EZ-vision. Det ble funnet klumper av EZ-vision i prøven, noe som kan skyldes for dårlig oppvarming av EZ-vision før den ble tatt i prøvene. På *Figur 7* (VEDLEGG A.2.1) kan man se tre bånd i hver prøve, luftboblene på toppen av gelen kan ha forstyrret visualiseringen av flere bånd. Båndet mellom de to tykkeste båndene kan være en polypeptid. De to andre båndene er trolig en dublett av to polypeptider. På *Figur 8* kan man se noe likt resultat, hvor det vises et ekstra bånd øverst i *Figur 8* (VEDLEGG A.2.1), ellers likt, dette båndet antas å bare bestå av en polypeptid.

Resultatene i denne delen av forsøket (se *Figur 5*, *Figur 6*, *Figur 7* og *Figur 8* i VEDLEGG A.2.1) viste utydelige bånd av peqGOLD Protein Markør II. Båndene fra peqGOLD Protein Markør II var lite synlige i forhold til proteinbåndene fra prøvene. Dette kan trolig skyldes en produksjonsfeil ved peqGOLD Protein Markør II som ble benyttet. Ut ifra resultatet virker det som at det var lite proteiner som ble uttrykt i peqGOLD Protein Markør II, noe som tilsier at det kan ha vært for lite protein i denne for å visualisere proteinbånd etter SDS-PAGE.

#### **5.4 Utprøving av fargeprosedyre Commassie blue**

I siste del av forsøket ble fargeprosedyre med Commassie Blue testet ut for å farge proteinene på polyakrylamid gelen etter SDS-PAGE. Prosedyren for proteinekstraksjon og SDS-PAGE gikk som normalt, men etter SDS-PAGE ble polyakrylamid gelene farget. Prøvematerialet som ble benyttet var A549 celler dyrket med sialinsyre i 48 timer. Prøven med 0 mM var brukt opp, så denne ble ikke analysert. peqGOLD Protein Markør II ble behandlet for seg selv på lik linje som de andre prøvene. For å analysere prøvene ble det brukt 12% polyakrylamid gel med 15 µl prøve i hver brønn. Etter analysen ble gelene farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution før det ble fjernet med Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution og visualisert med ChemiDoc. Grunnen til denne fargemetoden var anbefalingen som kom med peqGOLD Protein Markør II. *Figur 9* og *Figur 10* (VEDLEGG A.2.1) viser bilder av gelen etter gjennomgått farging. Denne metoden ga dårligere kvalitet i resultatet enn forventet, resultatene vises i *Figur 11* og *Figur 12* (VEDLEGG A.2.1). Ved å se på *Figur 11* og *Figur 12* (VEDLEGG A.2.1) ble det konkludert med for utydelig resultat, og at disse ikke skulle brukes videre.

Ut ifra resultatene (se *Figur 9*, *Figur 10*, *Figur 11* og *Figur 12* i VEDLEGG A.2.1) i denne delen av forsøket kan en trolig anta at det er en produksjonsfeil ved peqGOLD Protein

Markør II. Slik en ser på resultatet så vises proteinbåndene dårlig etter farging med Commassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution. Fargemetoden ga dårlig resultat på polyakrylamid gelen ved at proteinbåndene ikke kom synlig frem og disse ble utydelig.

Resultatene av alle prosedyrene viser tre tydelige bånd som ligger nokså likt for alle prøvene på gelene. Prøvene viser dermed lite endringer i proteinmønster. Ut ifra resultatene er det vanskelig å si noe om proteinekspressjonen av SIGLEC da SDS-PAGE metoden som ble benyttet ikke gir tilstrekkelig med informasjon om de ulike proteinene i prøvene. For å få mer informasjon om proteinuttrykket av SIGLEC vil nok western blotting være en bedre metode å benytte. I denne metoden bindes spesifikke proteiner seg til et antistoff i gel elektroforese, og andre proteiner vaskes vekk når de ikke er bundet til antistoff. Dermed vil western blotting være mer gunstig da det er mulig å studere spesifikke proteiner, og ikke alle proteiner samtidig slik som i SDS-PAGE. I tillegg ble proteinene denaturert under SDS-PAGE, dette gjorde at en ikke kunne analysere proteinene ut ifra form og ladning. Dette er også en faktor som gjorde det vanskelig å si noe om hvilke proteiner som ble uttrykt i de forskjellige prøvene som ble visualisert.

## 6 KONKLUSJON

Gjennom metodeoptimaliseringen ble ulike metoder og prøver testet for å gi best resultat. Selv etter mange utviklinger ga prosedyre med 250 µl RIPA buffer best resultat. I dette forsøket ble det brukt 100 µL prøve av feiltagelse, dette ble testet sammen med 250 µl og 500 µl RIPA buffer. Prøvene ble satt på 12% SDS-PAGE polyacylamid gel og visualisert på ChemiDoc. Her ga den første et mer oversiktlig resultat som var lett å lese.

Visualisering av proteinmønstrene i de leselige resultatene viser gode bånd av enslige og dubletter av polypeptid. På de ulike resultatene ser man ingen endring i proteinmønstrene på kontrollen 0 mM og prøvene 0,1 mM, 1 mM og 2 mM. Det ble konkludert at metoden som ble benyttet ikke ga tilstrekkelig med informasjon om de ulike proteinene i prøvene, anbefaler videre testing med western blotting.

## 7 LITTERATURLISTE:

1. What Does In Vivo and In Vitro Mean, definition, similarities and differences, [internett], 18.11.2019, [hentet 11.05.2021] tilgjengelig fra:  
<https://www.verywellhealth.com/what-does-in-vivo-and-in-vitro-mean-2249118>
2. Differences between in vitro, in vivo, and in silico studies. The Marshall Protocol Knowledge Base. [internett]; 09.01.2019, [hentet 13.05.2021] tilgjengelig fra;  
[https://mpkb.org/home/patients/assessing\\_literature/in\\_vitro\\_studies#:~:text=In%20vitro%20%28Latin%20for%20within%20the%20glass%29%20refers,biology%20are%20conducted%20outside%20of%20organisms%20or%20cells.](https://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies#:~:text=In%20vitro%20%28Latin%20for%20within%20the%20glass%29%20refers,biology%20are%20conducted%20outside%20of%20organisms%20or%20cells.)
3. Overview of protein expression. [internett] Thermo Fisher Scientific. [hentet 13.05.2021] tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html>
4. Everything You Need To Know About A549 Cells [internett] Synthego [hentet 17.05.2021] tilgjengelig fra: <https://www.synthego.com/a549-cells>
5. DMEM/F-12, [internett] Thermo Fisher SCIENTIFIC, [hentet 28.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11320033#/11320033>
6. Fetal Bovine Serum (FBS) for cell culture. [internett] MERCK KGaA, 2021, [hentet 28.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>
7. Glykobiologi [internett] institutt for biovitenskap. [publisert; 31. Mars 2020] [hentet; 19.05.2021] tilgjengelig fra:  
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/glykobiologi.html>

8. Varki, A., *Sialic acids in human health and disease*. Trends in Molecular Medicine, 2008. **14**(8): p. 351-360.
9. Prolo, L.M., H. Vogel, and R.J. Reimer, *The Lysosomal Sialic Acid Transporter Sialin Is Required for Normal CNS Myelination*. Journal of Neuroscience, 2009. **29**(49): p. 15355-15365.
10. Crocker Paul R., C. Paulson James and Varki Ajit, Siglecs and their roles in the immune system, Nature reviews, 2007 april, 7, 255-265
11. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZZ2>
12. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/O15389>
13. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/O43699>
14. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y336>
15. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96PQ1>
16. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q08ET2>



17. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 7. oktober 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/A6NMB1>
18. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y286>
19. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q96LC7>
20. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q96RL6>
21. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y286>
22. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q96LC7>
23. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NYZ4>
24. Uniport.org [Internett]. The Universal Protein Resource; 2. desember 2020 [hentet 21. januar 2021]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZMC9>

25. Overview of protein expression [internet] Thermo Fisher Scientific [hentet; 19.05.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html>
26. Cell-Free Protein Expression [internett] Thermo Fisher Scientific. [hentet 20.05.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/cell-free-protein-expression.html>
27. Posch Anton, Sample preparation guidelines for two-dimensional electrophoresis, Arch physiol biochem, [publisert; 11.09.2014, 120(5):192-197] [hentet 14.05.2021]
28. RIPA Lysis and Extraction Buffer [internett] Thermo Fisher Scientific. [hentet 09.03.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89900#/89900>
29. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. Proc Natl Acad Sci [Internett]. 24. september 2013 110(39):15668–73. Tilgjengelig fra:  
<https://www.pnas.org//content/pnas/110/39/15668.full.pdf>
30. Bio-Rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection [Internett] [hentet 15.05.2021] 47 s. Tilgjengelig fra:  
[https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf)
31. Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Protein Separation [internett] Ukessays. [hentet 12.05.2021] tilgjengelig fra:  
<https://www.ukessays.com/essays/biology/polyacrylamide-gel-electrophoresis.php>

32. Protein EZ-Vision® 4X, internett] VWR AMRESCO LIFE SCIENCE [hentet 30.03.2021], Tilgjengelig fra:  
[https://uk.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_GB/id/18501752/contents](https://uk.vwr.com/assetsvc/asset/en_GB/id/18501752/contents)
33. Protein Marker II (unstained), peqGOLD [Internett]. Avantor® [hentet 24.04.2021]  
Tilgjengelig fra:  
[https://uk.vwr.com/store/product/16894118/protein-marker-ii-unstained-peqgold?fbclid=IwAR0r1t4IkSkYGRXuIbXHWG-\\_Jf3QE3imZ5ler7MCMTeyv2RC0K-riTK2qjo](https://uk.vwr.com/store/product/16894118/protein-marker-ii-unstained-peqgold?fbclid=IwAR0r1t4IkSkYGRXuIbXHWG-_Jf3QE3imZ5ler7MCMTeyv2RC0K-riTK2qjo)
34. ChemiDoc XRS+ System [Internett]. BIO RAD [hentet 27.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.bio-rad.com/en-no/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4>
35. ChemiDoc XRS+ System [Internett]. BIO RAD [hentet 27.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.bio-rad.com/en-no/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4>
36. Analysis of Protein Gels (SDS-PAGE) [Internett]. Rice undergraduates [hentet 27.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab3.html>
37. Coomassie Brilliant Blue [Internett]. DNR Bio-Imaging Systems [hentet 27.04.2021]  
Tilgjengelig fra:  
[https://www.berthold-jp.com/pdf/coomassie\\_blue.pdf](https://www.berthold-jp.com/pdf/coomassie_blue.pdf).
38. Coomassie Blue (R-250, G-250) [Internett]. Interchim [hentet 27.04.2021]  
Tilgjengelig fra: <https://www.interchim.fr/ft/1/115252.pdf>.
39. Coomassie Brilliant Blue [Internett]. DNR Bio-Imaging Systems [hentet 27.04.2021]  
Tilgjengelig fra:  
[https://www.berthold-jp.com/pdf/coomassie\\_blue.pdf](https://www.berthold-jp.com/pdf/coomassie_blue.pdf).

40. Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution #1610439 [Internett]. BIO RAD [hentet 27.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.bio-rad.com/en-no/sku/1610439-coomassie-brilliant-blue-r-250-destaining-solution?ID=1610439#>
41. Qubit® Protein Assay Kits [Internett]. Thermo Fisher Scientific [hentet 28.04.2021] Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33211?SID=srch-srp-Q33211#/Q33211?SID=srch-srp-Q33211>

## A.0 VEDLEGG

### A.1 Tabeller

#### A.1.1 SIGLEC

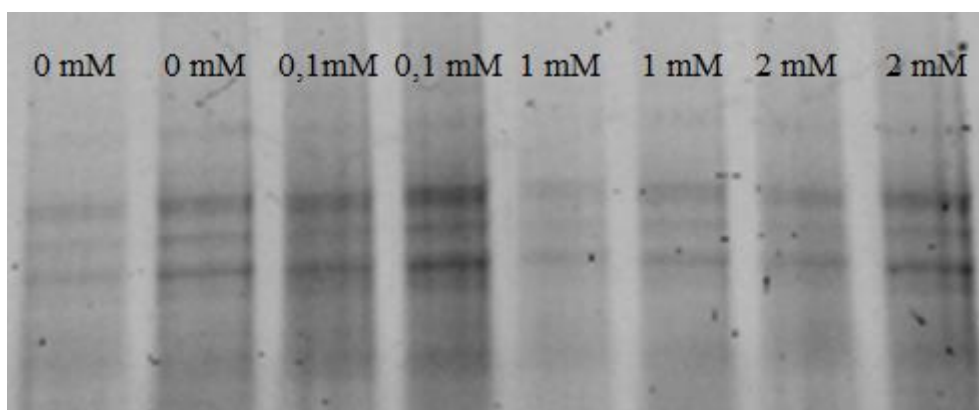
Tabell 13: Viser en oversikt over alle SIGLEC proteinene. Oversikten inneholder isoformer, lengden i basepar og størrelsen oppgitt i kDa hos de ulike SIGLEC proteinene.

| NAVN             | ISOFORM                                      | LENGDE BP | MASSE (kDa) |
|------------------|----------------------------------------------|-----------|-------------|
| <b>SIGLEC 1</b>  | Isoform 1(identifiser: <b>Q9BZZ2-1</b> )     | 1709      | 183 kDa     |
| <b>SIGLEC 5</b>  | -                                            | 551       | 61 kDa      |
| <b>SIGLEC 6</b>  | isoform 1 (identifiser: <b>O43699-1</b> )    | 453       | 50 kDa      |
| <b>SIGLEC 7</b>  | Isoform 1 (identifiser: <b>Q9Y286-1</b> )    | 467       | 51 kDa      |
| <b>SIGLEC 8</b>  | Isoform 1 (identifiser: <b>Q9NYZ4-1</b> )    | 499       | 54 kDa      |
| <b>SIGLEC 9</b>  | Isoform 1 (identifiser: <b>Q9Y336-1</b> )    | 463       | 50 kDa      |
| <b>SIGLEC 10</b> | Isoform 1 (identifiser: <b>Q96LC7-1</b> )    | 697       | 77 kDa      |
| <b>SIGLEC 11</b> | Isoform 1 (identifiser: <b>Q96RL6-1</b> )    | 698       | 76 kDa      |
| <b>SIGLEC 12</b> | Isoform long (identifiser: <b>Q96PQ1-1</b> ) | 595       | 65 kDa      |
| <b>SIGLEC 14</b> | -                                            | 396       | 44 kDa      |

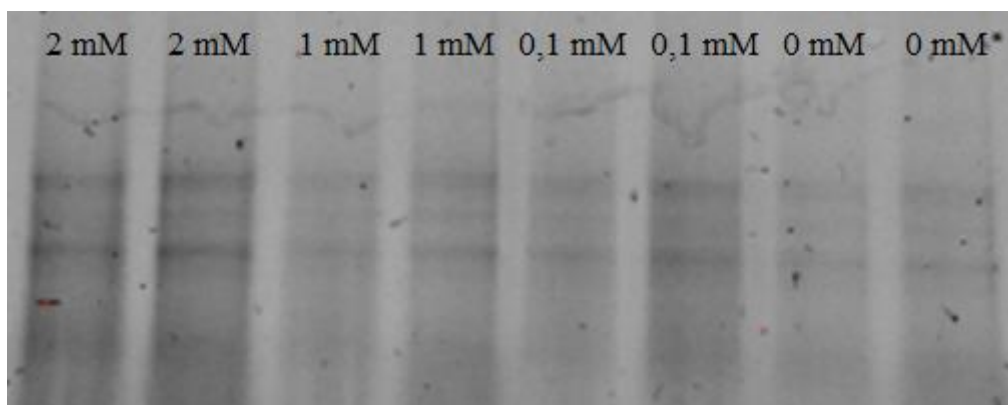
|                  |                                           |     |        |
|------------------|-------------------------------------------|-----|--------|
| <b>SIGLEC 15</b> | Isoform 1 (identifiser: <b>Q6ZMC9-1</b> ) | 328 | 36 kDa |
| <b>SIGLEC 16</b> | -                                         | 481 | 53 kDa |

## A.2 Figurer

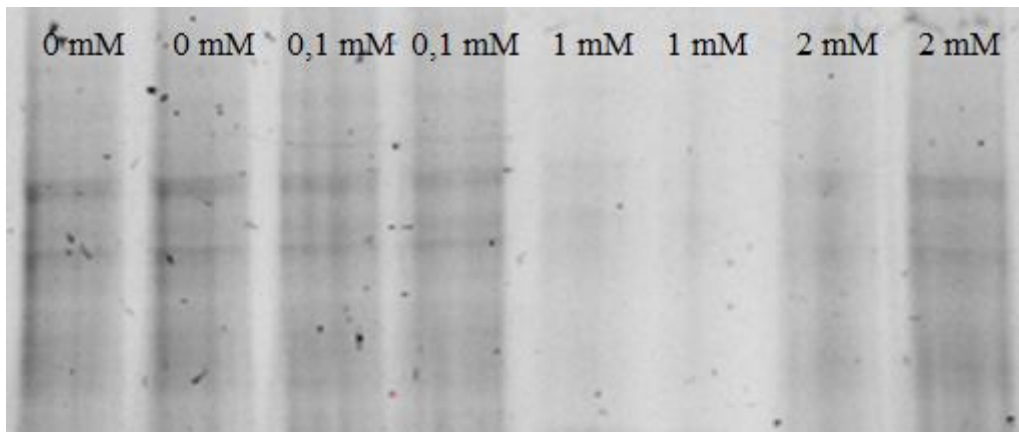
### A.2.1 SDS-PAGE.



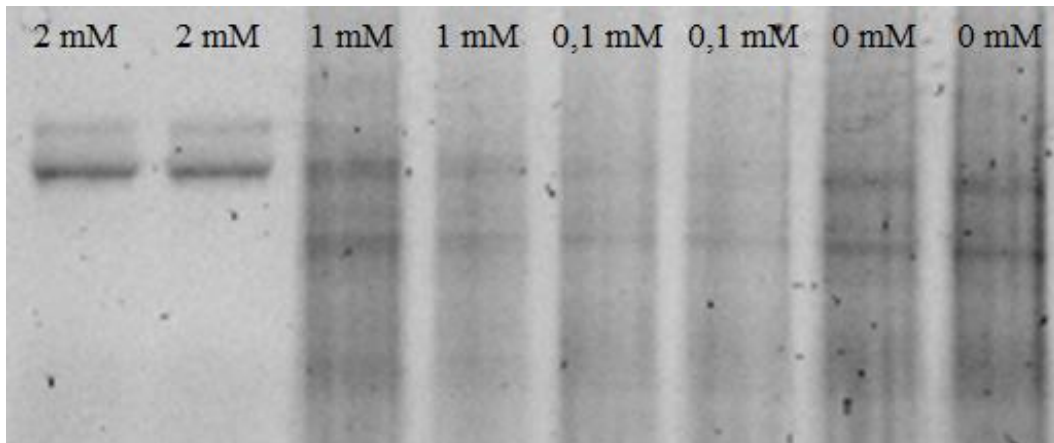
Figur 1: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



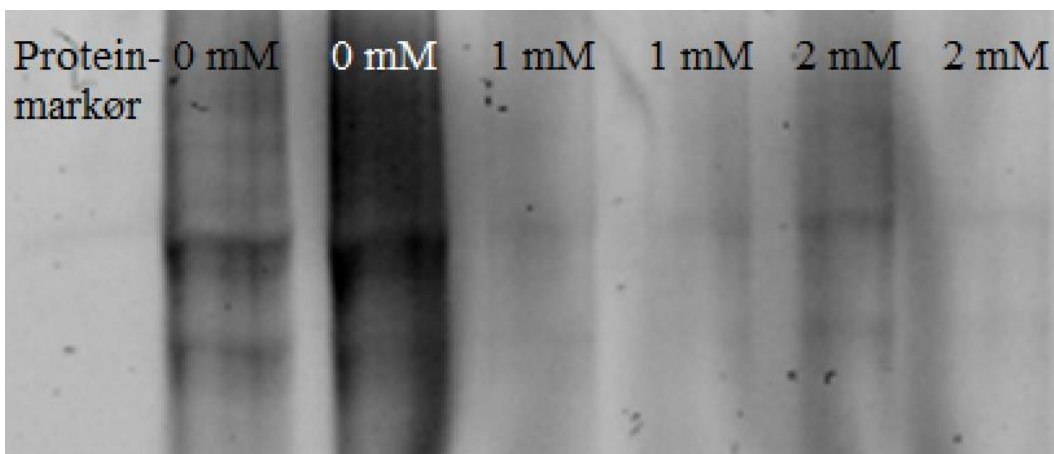
Figur 2: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



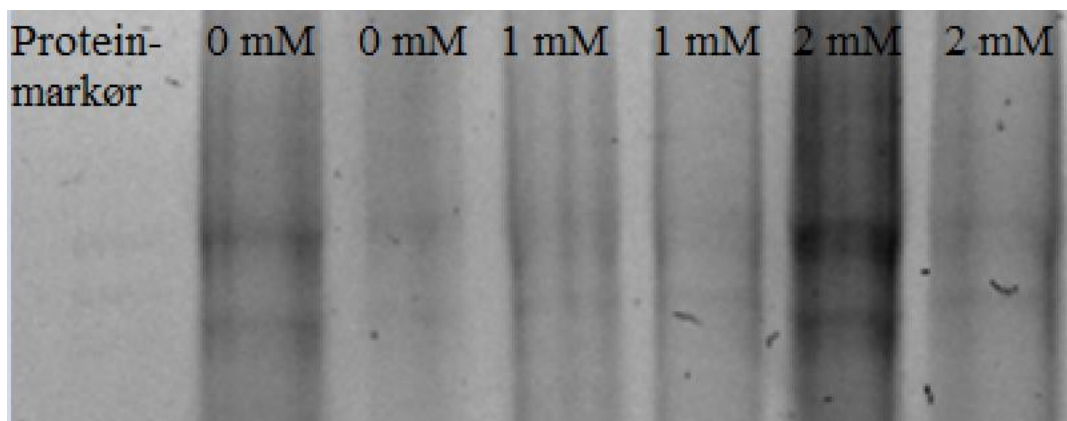
Figur 3: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



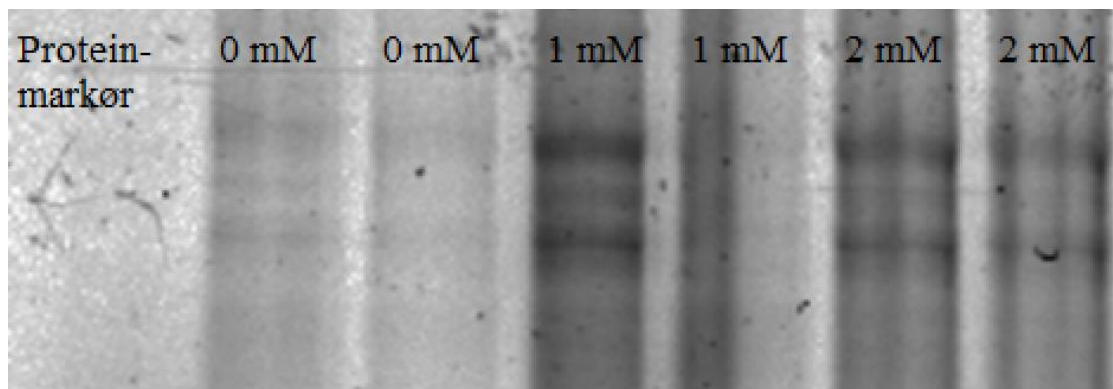
Figur 4: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 250  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 72 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



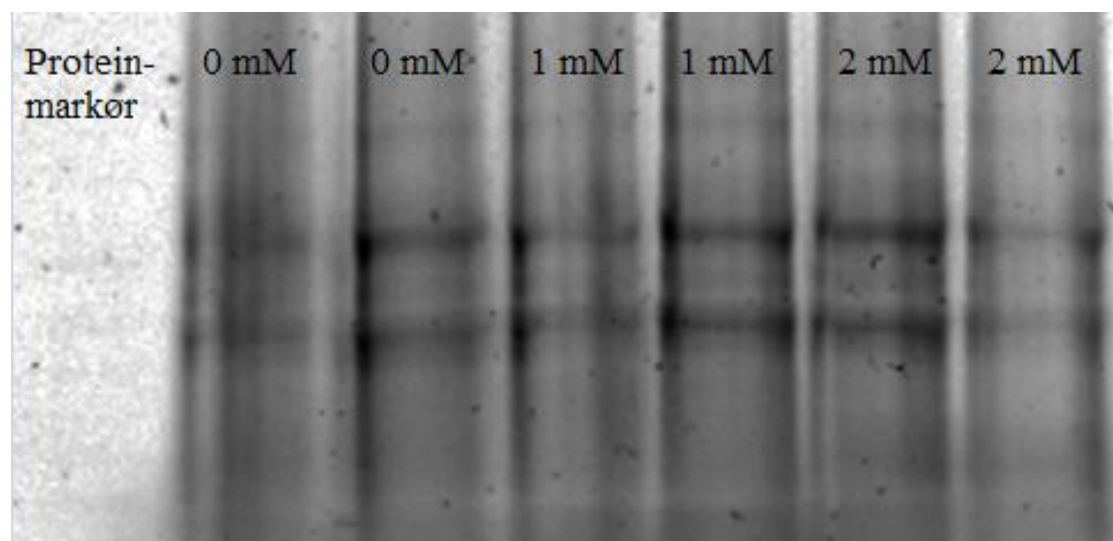
Figur 5: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE..



Figur 6: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.

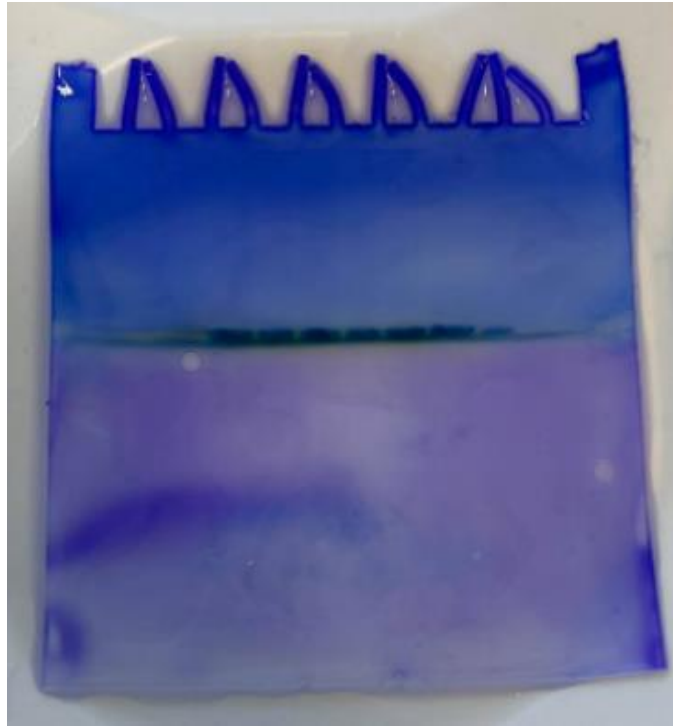


Figur 7: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



Figur 8: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.

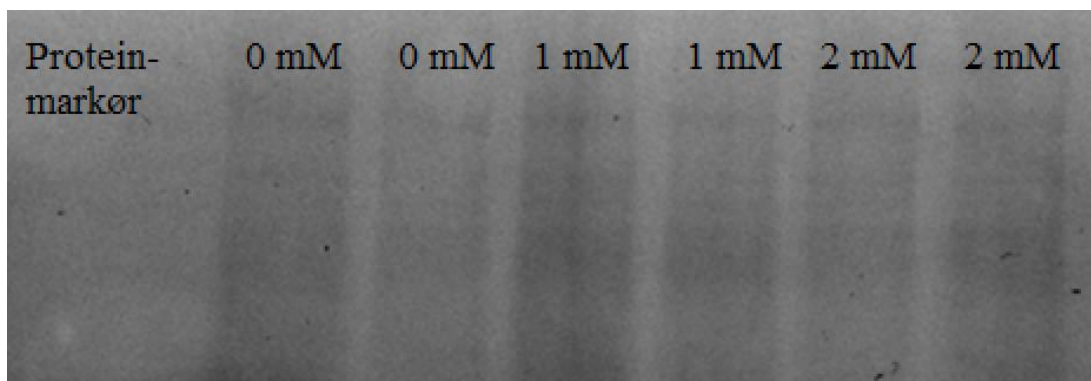




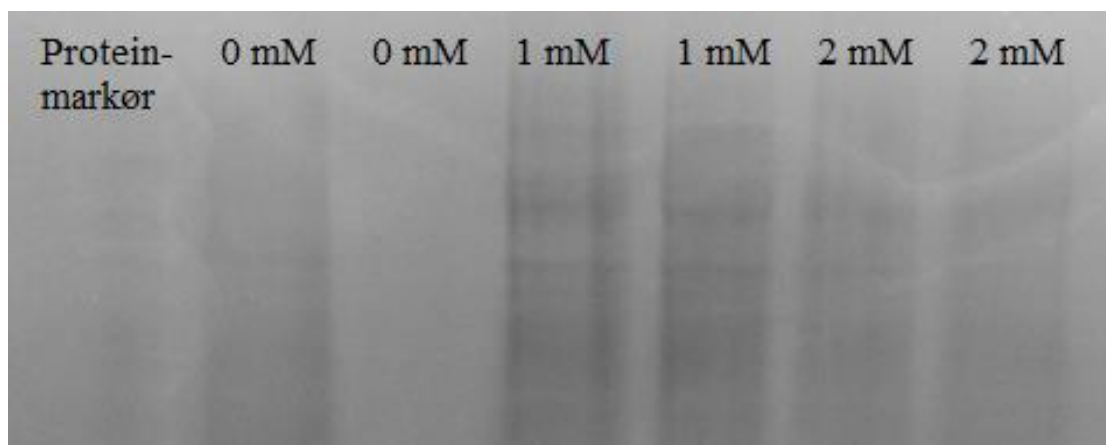
*Figur 9: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Prøvene ble farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution i 30 minutter etter SDS-PAGE.*



*Figur 10: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Prøvene ble farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution i 30 minutter etter SDS-PAGE.*



Figur 11: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 24 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.



Figur 12: Oversikt over prøver på 12% polyakrylamid gel med 500  $\mu$ l RIPA buffer og dyrket på forskjellige konsentrasjoner av sialinsyre i 48 timer. Visualisert på ChemiDoc etter SDS-PAGE.

