**Dag 1.**

Først følges innstruksene på labarket, hvor vi skrudde på stråleapparatet og lot røntgenrøret varmes opp i 30 min.

6 prøver ble hentet fra inkubatoren. Korken på flasken har to trinn, et hvor det slipper luft inn og et hvor det er lukket. I inkubatoren var det ca. 4% CO2 som får cellekulturen til å vokse ved at «Næringsmiddeled» trenger CO2? I mikroskopet var det en del flate celler og noen runde. De runde var i mitose, i ca. 1 time.

Deretter ble alle 6 cellene brakt ned til strålingsrommet. De ble markert med riktig dose, hvor en av dem ble ubestrålt. Vi brukte 1 min per halve Gy istedenfor oppgitt tidsenhet. Legger merke til at selv den ubestrålte ble tatt med ned slik at den opplever det samme, risting nedkjøling etc. Bestrålingen var ferdig kl. 10:25 hvor de står i 2 timer. Muligens litt mer, vi satt 12:30 til møtetid i tillegg til at resten tar tid.

Trypsin brukes for å få løs cellene fra flaske bunnen, de er bundet til bunnen. Denne bryter proteiner opp, men ikke ha den oppi for lenge hvor den bryter opp cellene.

Vi startet med å fjerne CM fra Control. Deretter tilsettetes ca. 1.5 ml trypsin, flasken roteres littegrann og deretter suges trypsinen ut igjen og fjernes. Dette gjøres to ganger. Så settes flasken i inkubatoren i noen minutter til man ser at cellene løsner på innsiden. Deretter tilsettes det 1 ml PBS. Dette spyles fra venstre til høyre med flasken på hell noen ganger slik at man får med seg alle cellene. Til slutt suges alt ut og overføres til en eppendorf tube. Dette gjøres kronologisk. Fakta om PBS, det er et salt som har lik saltkonsentrasjon som i cellene, dette gjør at det ikke skapes osmosisk trykk og den har stabil pH.

Eppendorftubene ble veid før veske ble overført til den og tidene det ble tilsatt trypsin og PBS ble notert. Vi startet 12:44.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Dose (Gy) | Trypsin klokkeslett | PBS klokkeslett |
| Control | 12:52 | 12:58 |
| 0.5 | 12:54 | 13:03 |
| 1.0 | 12:55 | 13:05 |
| 1.5 | 13:08 | 13:15 |
| 2.0 | 13:12 | 13:21 |
| 2.5 | 13:16 | 13:25 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Dose (Gy) | Vekt før (g) | Vekt etter (g) | Differanse (g) | RIPA tilført (l) |
| Control | 0.9953 | 1.0078 | 0.0125 | 125 |
| 0.5 | 0.9961 | 1.0132 | 0.0171 | 171 |
| 1.0 | 0.9902 | 1.0029 | 0.0127 | 127 |
| 1.5 | 0.9941 | 1.0050 | 0.0108 | 108 |
| 2.0 | 1.0058 | 1.0266 | 0.0208 | 208 |
| 2.5 | 0.9905 | 1.0092 | 0.0187 | 187 |

Disse ble så sentrifugert ved 6000 rpm og cellene ble trykt til bunnen og til siden. Videre sugdes all ekstra væske vekk fra eppendorftubene slik at kun cellene var igjen. RIPA ble tilført med mengden listet i tabellen. Dette ble også blandet slik at cellene var helt løst opp. Deretter ble det tilsatt 40 l 2x SDS sample buffer, dette ble tilsatt under avtrekk hvor det måtte mikses raskt pga. det blir veldig sticky. Dette ble varmet på 100 oC i 5 min hvor det ble ristet i vortexen underveis. Etter 5 min ble det overført raskt til is. Prøven ble satt i fryseren og vi tok dagen.

Feilkilder: Bobler i røret og ikke blandet fort nok.

**Dag 2.**

Gelen som brukes består av 10 brønner. Det blir plassert prøvene som i oppgaveteskten, men MW er byttet til høyre siden og med samme antall l som resten av prøvene. For p53 blir det brukt 10 l og for -actin blir det brukt 4 l. Rundt gelen i apparatet ble det fyllt med en væske. Gelen ble satt til 160 V i apparatet og 50 min.

Teori innskudd:

I prøven vår finnes det 10000 forskjellige peptid kjeder, bundet med disulfid bindinger intrapeptid. Hvor peptidene plukkes fra hverandre. SDS pakker petidene inn og til fører en ladning som er proporsjonal med lengden.

Gelen består av 10 brønner, hvor sample buffer fylles inn på sidene for å få lik salt konsentrasjon overalt slik at man ikke får osmosisk trykk. MW brukes som markør fordi det er kjente størrelser i løsningen. I prøven ender små peptidkjeder på bunnen og store på toppen. P53 er på 53 Dalton og vil ende relativt langt nede. Det er en spenning fra top til bunnen av gelen hvor det er negativ spenning på toppen og positiv på bunnen som trekker peptidene nedover.

Videre blir resultatene overført til en memebran hvor spenningen ikke er i lengderetningen av arket, men i tykkelsen.

Senere blir primær antistoffer bundet til p53, disse vil jo binde seg til og prøve ta p53? Sekundær antistoffer binder seg til primærantistoffene, disse er med chemiluminessens som kan måles i en detektor ved lysemisjon. Det er viktig å påpeke at det ikke er et en til en forhold mellom antistoffer og p53, men at den relative størrelsen er bevart. Vi ser altså relative størrelser.

-actin måles også i tillegg til p53. Dette er som en kontroll. -actin finnes det like mye av i cellene uansett hva som skjer med den. Dette kan brukes til å fortelle hvor mye celler det faktisk er i prøven, akkurat som vi veide prøven. Dvs. Hvis det er like mye -actin i alle brønenne så er det like mye celler i prøvene. Eller så må vi normalisere prøvene ved å sammenligne intensitetene.

Vider var det blotting. Det kuttes da av de bitene av gelen som ikke trengtes på begge gelene. Disse legges på et lag av membran på bunnen og to mindre lag på toppen av gel sandwhichen, viktig at det ikke kommer lufbobler mellom lagene. Også er det da viktig at lagene oppover er mindre enn hverandre slik at det ikke kommer en strøm mellom lagene og at apparatet kortsluttes. Alt klippes og fuktes i blotting buffer før blottingmaskinen settes i gang på 22V i 40 min

Deretter tas alt fra hverandre og man tar ut membranen og kutter den til riktig størrelse. Denne plasseres i en staining box hvor den tilsettes blocking solution. Det denne gjør er blokkere alle stedene det ikke er noe celleprøve, dvs. Mellom alle linjene. Dette er fordi antistoffet koster mye penger og vil binde seg til alle steder det ikke er noen prøve. Den dekker altså tomme områder. Satt i 30 min.

Etter 30 min renses den med vann 2 ganger i 5 min hver. Prøvene kuttes deretter fra hverandre å plasseres i hver sin staining box. De tilsettes hvert sitt antistoff, en til -actin og en til p53. Disse står å inkuberer i en time, dvs. at de står å blandes.

Deretter vaskes det 3 ganger med WB og deretter to ganger med Milli-Q vann. Vi korter ned tiden littegrann, som Joe sa «Når man lager en kake så smaker den ofte bedre når man kun bruker 60% av ingrediensene». Deretter mikses chemiluminiscent løsingene 3.8 ml og 0.9 ml. Han sa et 95% mot 5%. Dette sto i et par minutter og ble plassert i chemilumenicent boksen.

På bildet vi fikk var -actin på toppen. Rette linjer med noe svakhet. De lyseste punktene er p53 antistoffet. Dette må normaliseres for å se trenden. Men Joe sa at det de ser hvert år er at p53 øker frem til 1.5 Gy ca. Hvor strålingen hemmer cellen mer enn p53 klarer å fikse og den avtar litt igjen.