

# Arbeidskrav 6 Celle-/molekulærbiologisk metode

Gard, Henrik og Sebastian

## Hvorfor og hvordan måler vi Western Blot?

Ribosomal aktivitet og regulering av proteinsyntese er sentrale mekanismer i muskulær tilpasning etter belastning. Baar og Esser viste at fosforylering av proteinet p70S6K korrelerte nesten perfekt med senere økning i muskelmasse ( $r = 0,998$ ) (1). Dette viser hvordan bruk av måleproteiner kan være relevant når man undersøker molekulære effekter av trening. Under laboratoriearbeidet fulgte vi en fast protokoll. Vev ble homogenisert i iskald RIPA-buffer tilsatt protease- og fosfatasehemmere, og supernatanten ble samlet etter sentrifugering (40min på 15 000 g og i 4 grader celsius). Total protein ble kvantifisert med Bradford-metoden i 96-brønns plate, før prøvene ble normalisert i konsentrasjon og separert ved SDS-PAGE (250 V i 50 minutter på is) (2). Etter separasjon ble proteiner overført til PVDF-membran med “wet transfer” (400 mA, 1 time og 45 minutter i 4 grader celsius), med kontinuerlig buffering og kjøling for å sikre effektiv overføring. Membranene ble blokkert i 5 % melk, inkubert med primær- og sekundærantistoff og utviklet med ECL, før visualisering og kvantifisering i G:box, i tråd med anbefalinger for Western Blot i fysiologisk forskning (3) (4) (5).

## Resultater

## Referanser

1. Baar K, Esser K. [Phosphorylation of p70<sup>S6k</sup> correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise](#). American Journal of Physiology-Cell Physiology. 1999 Jan;276(1):C120–7.
2. Bradford MM. [A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding](#). Analytical Biochemistry. 1976 May;72(1-2):248–54.

3. Burnette WN. [“Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A](#). Analytical Biochemistry. 1981 Apr;112(2):195–203.
4. Kurien B, Scofield R. [Western blotting](#). Methods. 2006 Apr;38(4):283–93.
5. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. [The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting](#). Journal of Neuroscience Methods. 2008 Jul;172(2):250–4.