

Arbeidskrav 6 Celle-/molekulærbiologisk metode

Gard, Henrik og Sebastian

Hvorfor og hvordan måler vi Western Blot?

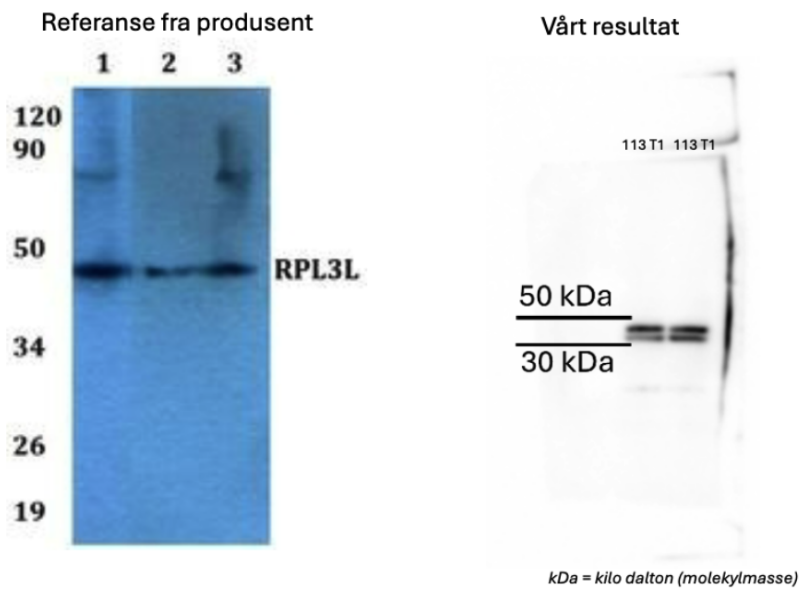
Ribosomal aktivitet og regulering av proteinsyntese er sentrale mekanismer i muskulær tilpasning etter belastning. Baar og Esser viste at fosforylering av proteinet p70S6K korrelerte nesten perfekt med senere økning i muskelmasse ($r = 0,998$) (1). Dette viser hvordan bruk av måleproteiner kan være relevant 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 kvantivering i G:box, i tråd med anbefalinger for Western Blot i fysiologisk forskning (3) (4) (5).

Resultater

RPL3L

For RPL3L-antistoffet fra Invitrogen, ble det observert to bånd i området mellom 50 og 30 kDa i vårt resultat. Dette er i samsvar med forventet proteinstørrelse på rundt 50 kDa, som er angitt i referansebilde fra produsenten (6).

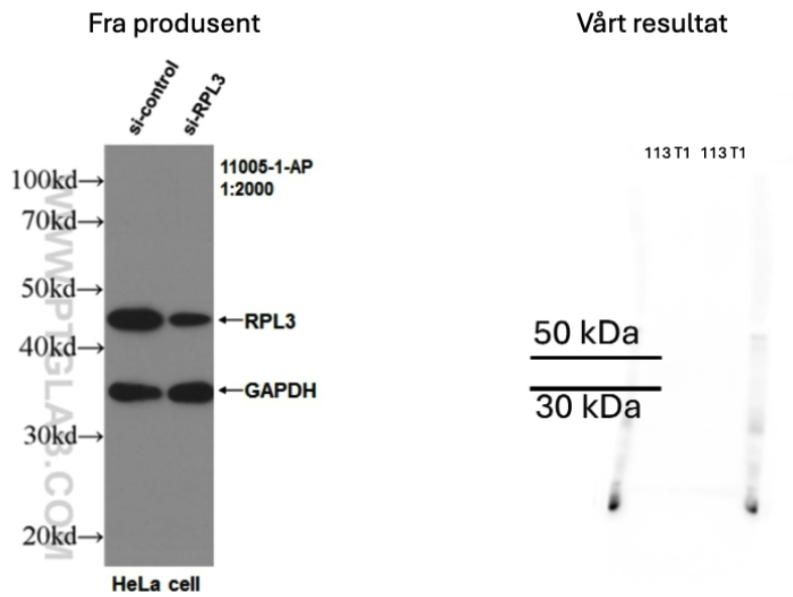
RPL3L - invitrogen



RPL3

For RPL3-antistoffet, ble det ikke observert noen tydelige bånd i vårt resultat, selv om referansebilde fra produsenten viser et bånd ved rundt 45 kDa (7).

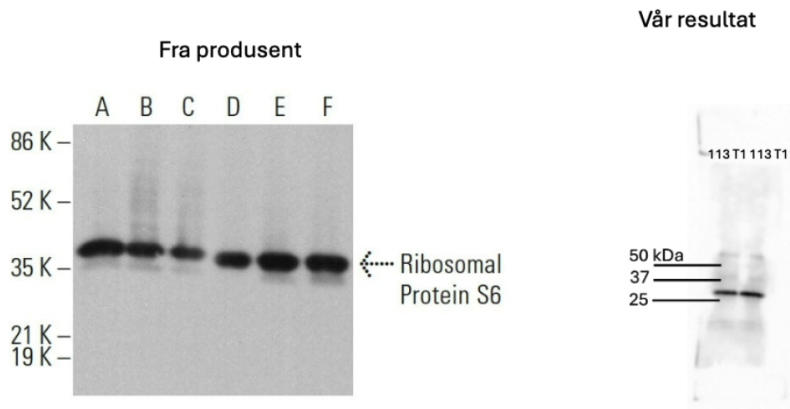
RPL3



RPS6

For RPS6-antistoffet, ble det observert et bånd i området mellom 37 og 25 kDa i vårt resultat. Dette er i overensstemmelse med referansebilde fra produsenten, der et bånd er forventet ved rundt 35 kDa (8).

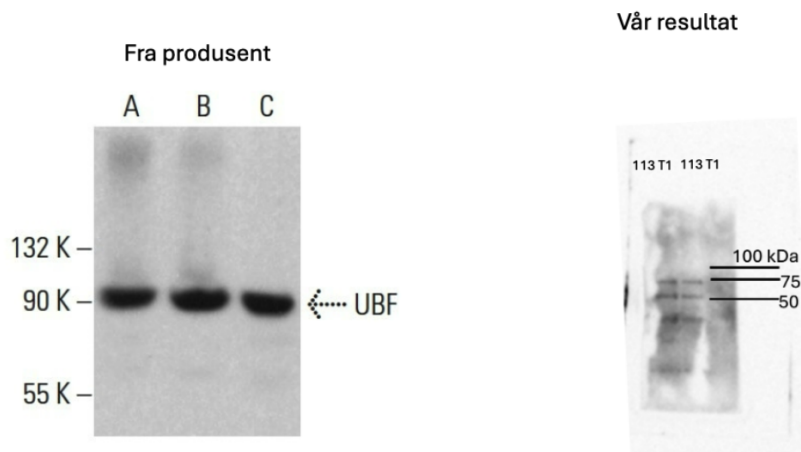
RPS6



UBF

For UBF-antistoffet, ble det ikke observert noen tydelige bånd i vårt resultat, selv om et bånd ved around 90 kDa er forventet i referansebilde fra produsenten (9).

UBF



Referanser

1. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70^{S6k} 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.
6. RPL3L Polyclonal Antibody (PA5-75763). <https://www.thermofisher.com/antibody/product/RPL3L-Antibody-Polyclonal/PA5-75763>;
7. 11005-1-AP. <https://www.ptglab.com/products/RPL3-Antibody-11005-1-AP.htm>;
8. SCBT. Ribosomal Protein S6 Antibody (E-13) | SCBT - Santa Cruz Biotechnology. <https://www.scbt.com/p/ribosomal-protein-s6-antibody-e-13>;
9. SCBT. UBF Antibody (F-9) | SCBT - Santa Cruz Biotechnology. <https://www.scbt.com/p/ubf-antibody-f-9>;