

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).

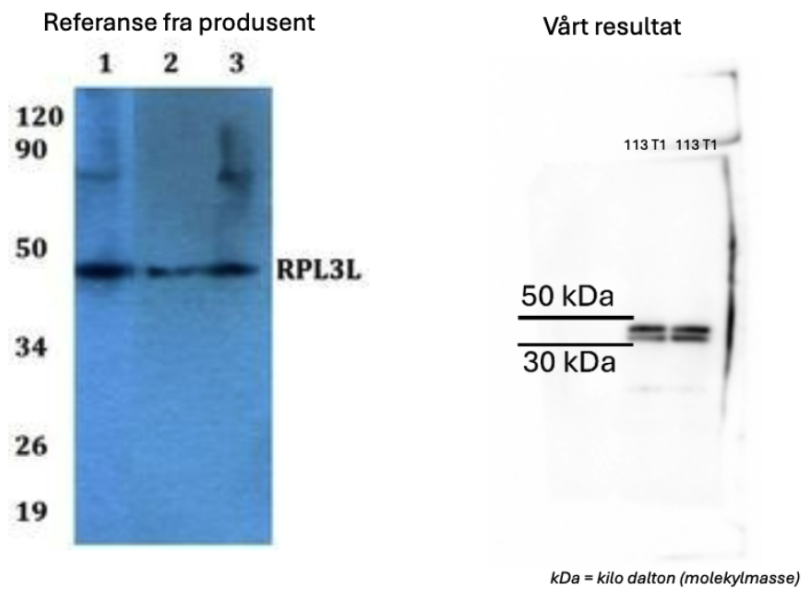
Resultater

Western blot-analyse ble utført for å detektere fire ribosomale proteiner: RPL3L, RPL3, RPS6 og UBF.

RPL3L

For RPL3L-antistoffet fra Invitrogen ble det observert to distinkte bånd i området mellom 50 og 30 kDa, hvorav det øverste båndet var mest intenst. Dette samsvarer med forventet proteinstørrelse på rundt 50 kDa, som angitt i produsentens referansebilde (6).

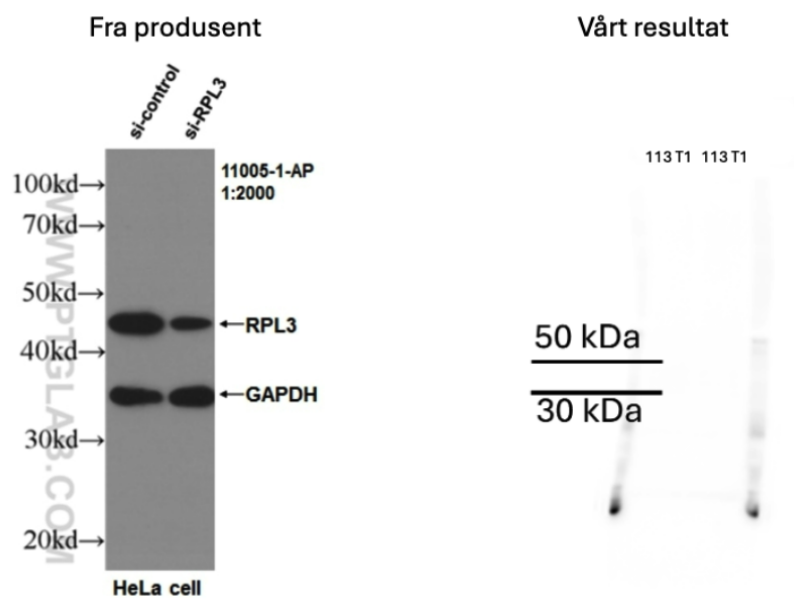
RPL3L - invitrogen



RPL3

For RPL3-antistoffet ble det ikke observert noen detekterbare bånd. Produsentens referansebilde viser et forventet bånd ved rundt 45 kDa (7).

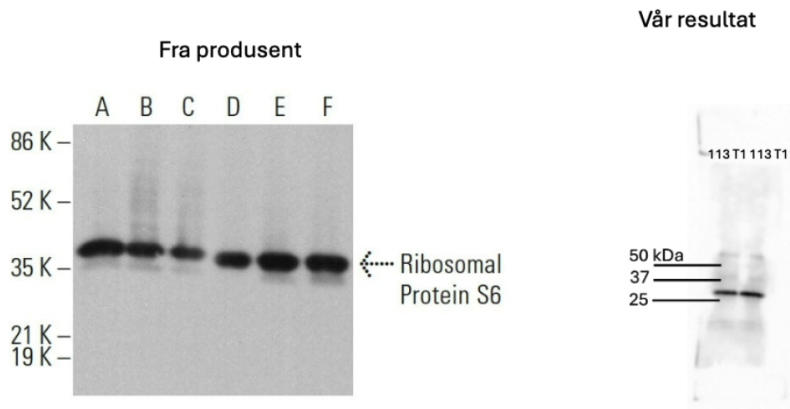
RPL3



RPS6

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

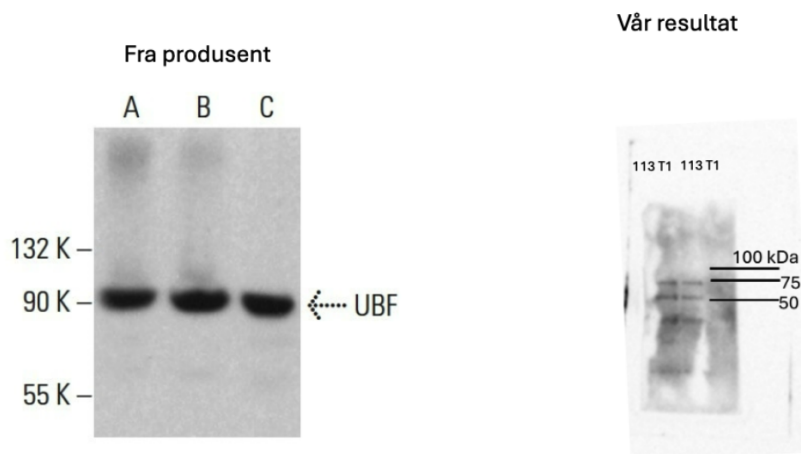
RPS6



UBF

For UBF-antistoffet ble det ikke observert noen detekterbare bånd. Produsentens referansebilde viser et forventet bånd ved rundt 90 kDa (9).

UBF



Diskusjon

Western blot-analysen viste vellykket deteksjon av RPL3L og RPS6, mens RPL3 og UBF ikke ga detekterbare signaler.

RPL3L og RPS6

For RPL3L ble det observert to bånd i stedet for ett. Det ekstra båndet kan skyldes proteinnedbrytning under prøveforberedelsen, selv om vi brukte protease-inhibitorer. RPS6 ga et tydelig bånd ved forventet størrelse, noe som viser at metoden fungerte for dette proteinet.

RPL3 og UBF

Fraværet av signal for RPL3 og UBF kan ha flere forklaringer. Den mest sannsynlige årsaken er at disse proteinene finnes i lavere mengder i vevsprøvene. Vi lastet ~20 µg total protein per brønn, og dette kan være for lite til å detektere proteiner med lavt uttrykk.

Western blot er en krevende metode med mange trinn hvor ting kan gå galt. Menneskelige feil under proteinekstraksjon, gelelektroforese, transfer, eller antistoffinkubering kan påvirke resultatet. Siden dette var vår første gang med å utføre protokollen, kan manglende erfaring ha bidratt til feil som påvirket resultatene. Antistoffene kan også ha redusert aktivitet hvis de er gamle eller har vært lagret feil. Det er vanskelig å peke på en enkelt årsak til hvorfor RPL3 og UBF ikke ga signal.

Konklusjon

Resultatene viser at metoden fungerte for RPL3L og RPS6, men ikke for RPL3 og UBF. Med mer erfaring og trening i protokollen kunne resultatene sannsynligvis blitt bedre. For å forbedre resultatene kunne vi også ha lastet mer protein, testet andre antistoffkonsentrasjoner, eller gjentatt forsøket med nye antistoffer.

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>;