

IDR 4000 MAPPEKSAMEN

KAND NR 415

2024-05-11

Table of contents

Preface

This is a Quarto book.

To learn more about Quarto books visit <https://quarto.org/docs/books>.

1 Reliabilitet

1.1 Materialer og metoder

1.1.1 Forberedelser

Forberedelser til utholdenhetstester involverte flere trinn. Først ble utstyret kalibrert. Dette inkluderte justering av temperatur og luftfuktighet ved hjelp av enhetens kontroller. For å gjøre dette, ble “Ambient Conditions” valgt, og temperaturen og luftfuktigheten ble sjekket på gradestokken. Eventuelle justeringer ble gjort ved å trykke “F1” for å endre luftfuktighet og temperatur, og deretter trykke “F12” for å lagre endringene.

Videre ble volumkalibrering utført ved å sette inn “Trippel V” og koble til “Sample line”. En slange ble deretter festet fra Oxycon’s miksekammer’s bakside til volumkalibreringspumpen. “Volume Calibration” ble valgt, og kalibreringen ble startet ved å trykke “F1”. Spaken på pumpen ble beveget forsiktig frem og tilbake til grafene på skjermen flatet ut på omtrent 4 på y-aksen. Det ble pumpet frem til tallene ble vist i høyre margin. Deretter ble verdiene for oksygen (O₂) og karbondioksid (CO₂) sjekket. Kalibreringen ble ansett som vellykket hvis feilmarginen var innenfor 1,0 %, noe som tilsvarer et område mellom 99,0 og 101,0. Hvis kalibreringen ikke ble godkjent, ble den gjentatt ved å trykke “F9”. Hvis den ble godkjent, ble resultatene lagret ved å trykke “F12”. Gasskalibrering var neste steg. “GAS Calibration” ble valgt og “F1” ble trykket for å starte kalibreringen. Kalibreringen fortsatte til tallene viste seg i høyre marg. Igjen ble verdiene for oksygen (O₂) og karbondioksid (CO₂) sjekket. Kalibreringen ble ansett som godkjent hvis tallene var innenfor en feilmargin på 1,0, noe som tilsvarer et område mellom -1,0 og 1,0. Gassflasken ble deretter lukket i riktig retning, og hvis kalibreringen ikke var godkjent, kunne den gjentas ved å trykke “F9”. Hvis den var godkjent, ble resultatene lagret ved å trykke “F12”.

Alle forberedelsene for testen ble grundig gjennomført før selve testingen startet. Først ble munnstykket satt sammen, og neseklypen ble funnet frem. Deretter ble forsøkspersonen veid uten sko og med så lite klær som mulig. Etter veiingen ble 300 g trukket fra vekten som følge av klærnes vekt. Forsøkspersonens data ble deretter lagt inn i systemet ved å trykke på “New Patient”. Her ble prosjektnavn, ID-nummer, fødselsdato, kjønn, høyde og vekt (hvor 300 g ble trukket fra) ført inn. Videre ble «Lode Device Manager 10» startet, og sykkelen ble nøyaktig justert for forsøkspersonen. Dette inkluderte å bytte til riktig pedal og notere ned disse justeringene. Krankarmen ble stilt inn til 172,5. Kalibreringen av krankarmene ble

utført, og vi stilte inn Lode-sykkelen til forsøkspersonens preferanser. På pre-testen ble disse innstillingene lagret.

Sluttforberedelsene inkluderte å feste den ene enden av slangen til munnstykket og den andre enden til maskinen, med slangen teipet fast til sykkelen. Til slutt ble VO₂-opptaket klargjort ved å trykke på “Mixing Chamber”. Det ble dobbeltsjekket at innstillingene viste “small mouthpiece” og “30 s delta time” i det oppgitte vinduet, og deretter ble klargjøringen fullført ved å trykke “ok”. Ved å trykke “F1” ble opptaket startet, og etter 15 s var maskinen klar for selve testen.

1.1.2 Før testingen

Før testen startet, ble forsøkspersonene informert om testprosedyren. De ble instruert om å gjennomføre hele testen sittende, og det ble festet en teipbit på nesen deres for å sikre at neseklipsen ikke falt av. Forsøkspersonen tilpasset sykkelen og setestillingen med hjelp fra testlederen, og denne setestillingen ble notert for bruk på neste testdag. Temperaturen og luftfuktigheten i rommet ble også notert. Submaksimal utholdenhetstest Testprosedyren startet med en submaksimal utholdenhetstest der forsøkspersonene tråkket på 75 W for kvinner og 100 W for menn ved en tråkkfrekvens på 90 ± 5 RPM i 90 s. Forsøkspersonene ble informert om å ta på neseklype og munnstykke 30 s før målingene begynte. Oksygenopptaket ble deretter målt hvert 30. sekund fra 2 til 4 min. 20 s før de 4 minuttene var ferdige, ble forsøkspersonene bedt om å vurdere sin opplevde anstrengelse på Borgs skala. Etter 4 min økte motstanden til 125 W for kvinner og 150 W for menn, og neseklypen og munnstykket ble tatt av/ut. Forsøkspersonene informerte om hvor de lå på Borgs skala, og denne prosessen ble gjentatt på neste trinn. Forsøkspersonene fikk deretter en 2 min aktiv pause på 50 W og ble bedt om å forbli sittende på sykkelen gjennom hele den aktive pausen.

1.1.3 Maksimalt oksygenopptak (VO₂-maks) test

Etter submaksimal utholdenhetstest fulgte VO₂-maks testing, som startet på 150 W og økte med 25 W hvert min til utmattelse. Utmattelse ble definert som når forsøkspersonene ikke lenger klarte å opprettholde en tråkkfrekvens på > 60 RPM. Det var fri tråkkfrekvens på begge testdagene, og forsøkspersonene hadde neseklype og munnstykke gjennom hele testen. Klokken ble nullstilt etter en 5 minutters pause når opptaket viste et helt minutt pluss 1 sekund. Forsøkspersonene fikk beskjed om å sykle til utmattelse (dvs. RPM < 60), og verbal kommunikasjon ble benyttet for å informere dem underveis. Watt-maks og sekundene siden siste økning ble notert, og forsøkspersonene ble spurt om deres opplevde anstrengelsesnivå på Borgs RPE-skala umiddelbart etter fullført test. Etter testen forlot ikke forsøkspersonene sykkelen, og opptaket ble lagret ved å trykke “F1”, etterfulgt av “F12” for å lagre opptaket. All data fra de to høyeste målingene ble notert. Maximum accumulated oxygen uptake (MAOD) test Etter VO₂-maks testing, gjennomførte forsøkspersonene en Maximum Accumulated Oxygen Uptake (MAOD) test. De syklet på 50 W for menn og kvinner i fem min før MAOD-testen startet.

MAOD-testen involverte at forsøkspersonene syklet så lenge de kunne ved den høyeste effekten (W) de oppnådde i minst 30 s under VO₂-maks testing. De ble instruert om å opprettholde samme tråkkfrekvens som under den submaksimale testen. Testlederen ga verbal oppmuntring når forsøkspersonene viste tegn til utmattelse. Testen ble avsluttet når forsøkspersonene ikke lenger kunne opprettholde en tråkkfrekvens på > 60 RPM. Forsøkspersonene ble spurt om deres opplevde anstrengelsesnivå på Borgs skala umiddelbart etter avsluttet test.

1.1.4 Etter testingen

Etter testingen ble alt utstyr desinfisert og ryddet opp. Eventuelle endringer i sykkelinnstillinger ble også notert. Til slutt ble dataene notert ned ved å gå inn på skjermrapporten "Hil_MIX_30." Tiltak for å sikre reliabilitet For å sikre reliabilitet ble det gjennomført en rekke tiltak under testprosedyren. Testene ble gjennomført på nøyaktig samme måte hver gang, med standardisering av alle faktorer, til det beste av vår kunnskap, som kunne påvirke resultatene. Testene ble utført til samme tidspunkt på døgnet. Videre ble det lagt vekt på å opprettholde tilnærmet lik luftfuktighet og temperatur i testrommet, med nøye notering av disse forholdene. Da det gjaldt kalibrering av utstyret, ble det benyttet samme utstyr på begge testdagene. Det ble også påsett at de samme vektskivene ble brukt på både testdag 1 og testdag 2. For å sikre nøyaktige data av kroppsvekt, veide forsøkspersonene seg med så lite klær som mulig, uten sko, og det ble trukket fra 300 g fra vekten som følge av klær. Dette ble gjentatt eksakt likt på begge testdagene. Under testingen ble hele prosedyren gjennomført sittende. Det var også viktig å ha kontinuitet med hensyn til testledere og observatører, så de samme personene ble benyttet på begge testdagene. Videre ble forsøkspersonene instruert til å ha to dagers restitusjonstid mellom testdag 1 og testdag 2 for å minimere eventuelle påvirkninger fra tidligere testing. Testlederne opplyste ikke om VO₂-maks nivået under selve testen, og den samme testlederen ble brukt på begge testdagene. Testlederne fulgte protokollen på samme måte, og det ble lagt vekt på å gi tilnærmet lik tilbakemelding og engasjement. Under VO₂-maks-testen ble tilbakemeldingen gradvis økt utover testen for å motivere forsøkspersonene til sitt ytterste. Det ble også notert hvor mye og når forsøkspersonene hadde spist før testdag 1, og dette ble gjentatt på testdag 2. Spesielt var det viktig å sikre inntak av energirik mat og drikke. Dette er en rekke viktige tiltak for å sikre høy reliabilitet i fysiologisk testing (Halperin, Pyne, and Martin 2015). Forsøkspersonene fikk klare retningslinjer, inkludert å avstå fra hard fysisk trening de siste 48 timene før testing, opprettholde tilnærmet lik fysisk aktivitet og døgnrytme de siste 48 timene før de to testdagene. I tillegg ble de instruert om å unngå inntak av nikotin og/eller alkohol de siste 48 timene før testing. Inntak av koffein på testdagene ble også regulert for å sikre lik mengde. Forsøkspersonene ble instruert om å ha samme type og mengde mat og drikke samme dag som testen, med siste måltid minst 2 timer før testing. Det var også krav om å bruke samme klær og sko på begge testdagene for å minimere variabler som kunne påvirke resultatene. Disse tiltakene ble nøye implementert for å sikre pålitelige og sammenlignbare resultater mellom de to testdagene.

1.1.5 Databehandling

VO2maks (ml/min) ble regnet ut ved å finne gjennomsnittet av målingene de to siste hele halvminuttene under VO2maks-testen. Maksimalt akkumulert oksygenunderskudd (MAOD) ble regnet ut med data fra både den submaksimale testen og MAOD-testen ved hjelp av en formel hentet fra boken *Physiological Tests for Elite Athletes 2nd Edition* (Tanner 2012).

1.1.6 Statistiske analyser

Før vi utførte statistiske analyser, ble datasettet rengjort for eventuelle feilregistreringer eller manglende data. Statistiske analyser ble utført i programvaren RStudio (versjon 2023.06.2+561; RStudio Team, 2023), og ble organisert i Microsoft Excel (versjon 16.73, Microsoft Corporation, 2023). Deskriptiv statistikk er presentert som gjennomsnitt, standardavvik (SD) og minimums- og maksimumsverdi. Basert på anbefalingene til (W. G. Hopkins 2000) benyttet vi variasjonskoeffisient (CV %) for å undersøke test-retest reliabiliteten til følgende tester: VO2-maks, Wmaks og MAOD.a. CV % (SD dividert med gjennomsnittet, multiplisert med 100) ga et mål på presisjonen og reproduserbarheten av dataen, og er ofte anvendt innen kvantitativ forskning (Pélabon et al. 2020; Tian 2005). Dårlig reliabilitet ble ansett som $CV > 10\%$, akseptabel reliabilitet ble ansett som $CV = 5\text{--}10\%$ og god reliabilitet ble ansett som $CV < 5\%$ (Cronin, Hing, and McNair 2004; Taylor et al. 2010). For å videre undersøke om testene var reliable nok til å observere betydningsfulle forskjeller anvendte vi minste betydningsfulle forskjell (SWC). Beregningen av SWC ble gjort i henhold til W. Hopkins et al. (2009). Når $CV\% \leq SWC$, ble testen ansett i stand til å oppdage betydningsfulle forskjeller (W. G. Hopkins 2000).

1.2 Resultater

Deskriptiv statistikk av forsøkspersonenes VO2-maks, Wmaks og MAOD.a ved T1 og T2 er presentert i Tabell 1. I tillegg er en boksplott, som viser test-retest reliabiliteten til VO2-maks, Wmaks og MAOD.a, illustrert i Figur 1. Det ble funnet god test-retest reliabilitet for VO2-maks og Wmaks ($CV = 1,84$ og $4,77$, henholdsvis), samt akseptabel test-retest reliabilitet for MAOD.a testen ($CV = 6,77$). Videre ble det observert at VO2-maks testen var reliabel nok til å oppdage betydningsfulle forskjeller i VO2-maks ($SWC = 3,67$). På tross av å ha vist henholdsvis god og akseptabel test-retest reliabilitet, ble det funnet at Wmaks og MAOD.a testen ikke var reliable nok til å observere betydningsfulle forskjeller i Wmaks og MAOD.a ($SWC = 4,04$ og $0,88$, henholdsvis).

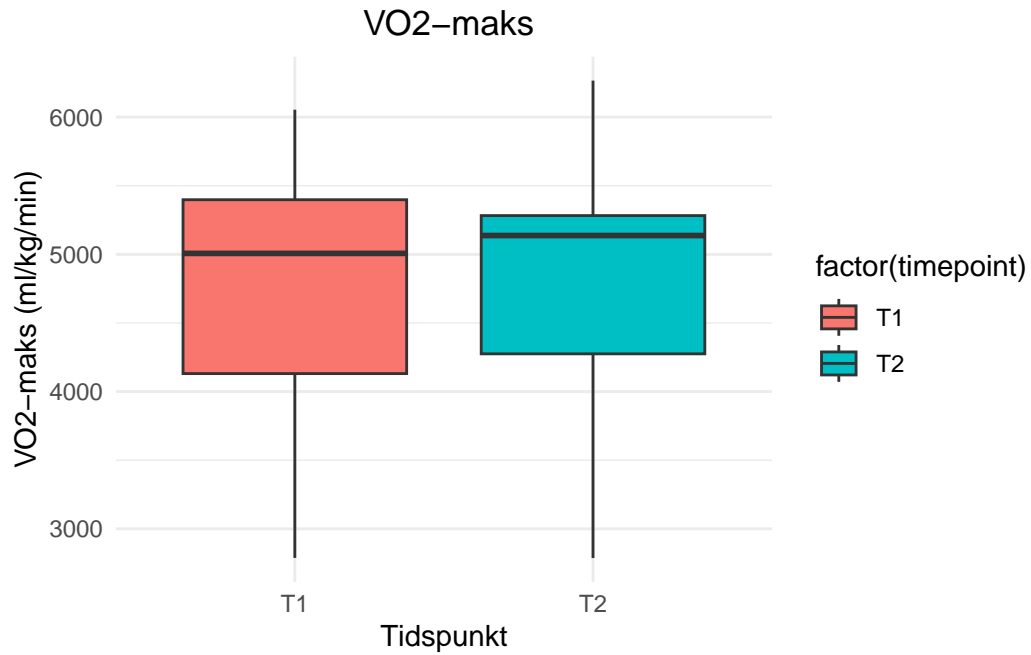


Figure 1.1: **Figur 1:** Boksplot av VO2-maks på testdag 1 (T1) og testdag 2 (T2).

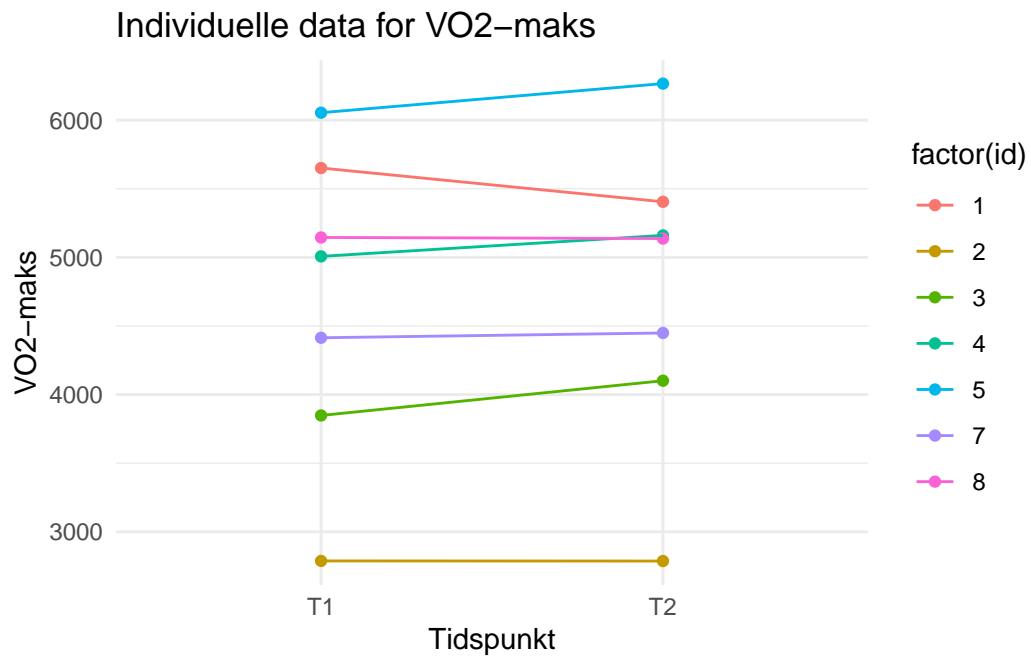


Figure 1.2: **Figur 2:** Figuren viser VO2-maks målinger fra testdag 1 (T1) til testdag 2 (T2).

Table 1.1: **Tabell 1:** Deltakernes karakteristika ved oppstart ($N = 7$).

Variabel	Gjennomsnitt	Standardavvik	Median	Minimum	Maksimum
Alder (år)	24.14	2.18	24.00	22.00	29.00
Høyde (cm)	179.43	4.60	176.00	175.00	187.00
Vekt (kg)	77.64	7.97	79.20	60.60	88.90
VO2-maks (ml/min)	4729.43	1071.11	5072.00	2787.00	6266.00
Watt-maks (W)	421.43	82.54	437.50	275.00	525.00
MAOD.a (%)	69.34	17.43	77.88	43.21	92.41

Notat: Data er presentert som gjennomsnittet, standardavviket, median og minimums- og maksimumsverdi. VO2-maks = maksimalt oksygenopptak; MAOD.a = maksimalt akkumulert oksygenunderskudd.

Table 1.2: **Tabell 2:** Utrekning av variasjonskoeffisient (%) og standardavvik ($N = 7$).

id	cv_vo2max	cv_wmax	cv_maoda	std_dev_vo2max	std_dev_wmax	std_dev_MAODa
1	3.15	10.88	3.41	34.79	10.61	0.55
2	0.03	6.15	4.51	0.14	3.54	0.73
3	4.50	4.88	2.32	35.78	3.54	0.22
4	2.13	11.47	7.68	21.64	10.61	1.26
5	2.43	0.00	4.47	29.98	0.00	0.80
7	0.56	0.00	2.22	4.95	0.00	0.23
8	0.11	0.00	22.68	1.13	0.00	2.33

Notat: Data er presentert variasjonskoeffisient (%) og standardavvik for hver av de tre utfallsvariablene for hver deltaker. cv_vo2max = variasjonskoeffisient (%) for maksimalt oksygenopptak; cv_wmax = variasjonskoeffisient (%) for watt-maks; cv_maoda = variasjonskoeffisient (%) for maksimalt akkumulert oksygenunderskudd; std_dev_vo2max = standardavvik for maksimalt oksygenopptak; std_dev_wmax = standardavvik for watt-maks; std_dev_maoda = standardavvik for maksimalt akkumulert oksygenunderskudd.

Table 1.3: **Tabell 3:** Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient (%) og minste betydningsfulle forskjell ($N = 7$).

Variable	CV (%)	SWC
VO2max	1.84	18.34
W.max	4.77	4.04
MAOD.a	6.76	0.88

Notat: Data er presentert som gjennomsnittlig variasjonskoeffisient (%) og minste betydningsfulle forskjell for hver av de tre utfallsvariablene. VO_{2max} = maksimalt oksygenopptak; W_{max} = watt-maks; $MAOD.a$ = maksimalt akkumulert oksygenunderskudd; CV = variasjonskoeffisient; SWC = minste betydningsfulle forskjell.

1.3 Metodisk diskusjon

Noen aspekter ved metoden kan i retrospekt ha vært suboptimale, og kan følgelig ha påvirket validiteten til resultatene i negativ grad. Under den submaksimale testen ble testdeltakerne bedt om å sykle på den samme tråkkfrekvensen som de ville sykle på under MAOD-testen. Ettersom belastningen under den submaksimale testen er mye lavere enn under MAOD-testen, kan tråkkfrekvensen oppleves kunstig høy under den submaksimale testen, og følgelig føre til en dårlig arbeidsøkonomi. For å fjerne feilkilden, kunne man ha individualisert hvilken watt den enkelte testdeltaker syklet på under de submaksimale dragene, slik at oksygenopptaket blir representativt for den gitte motstanden. Mengden verbal tilbakemelding fra testleder til forsøksperson under VO_{2max} - og MAOD-testen kunne variere mellom T1 og T2. Dette kan skyldes at testlederne var noe tilbakeholdne på T1, og ble mer selvsikre på T2. Dette kan tenkes å ha påvirket testdeltakerne sin innsats i varierende grad mellom T1 og T2. Flere av testdeltakerne hadde W_{max} som varierte mye mellom første og andre testdag. Det regjerer således tvil om LODE-sykkelen som ble benyttet under testingen samsvarte med den motstanden vi stilte den inn på. Dette kan ha påvirket testresultatene.

1.4 Konklusjon

De fysiologiske testene viste varierende reliabilitet. Noen av testene viste svært god reliabilitet for noen av forsøkspersonene, og dårlig reliabilitet for andre. Vi konkluderte med at dette hovedsakelig skyldtes at Lode-sykkelen hadde varierende motstand på en gitt watt. På grunn av disse begrensningene, kan vi ikke være sikre på at en ny test ville gi de samme resultatene som testene utført her. Fremtidige studier bør se til at sykkelen har konsekvent motstand, individuelt tilpasse watten på de submaksimale dragene og standardisere verbal tilbakemelding.

2 Labbrapport - ekstraksjon og analyse av protein

2.1 Introduksjon

Proteiner gjør det meste av arbeidet i cellene i kroppen, og er nødvendig for strukturen, funksjonene og reguleringen av kroppens vev og organer. De er essensielle deler av organismen, og deltar praktisk talt i alle prosesser i kroppen (Alberts et al. 2002). Det å kunne analysere proteiner vil derfor være av stor betydning, og svært interessant å se på innen ulike fagområder, som celle- og molekylærbiologi.

Det å studere protein og proteinkonsentrasjonen i muskelceller har blitt brukt i flere treningsstudier [Hammarström et al. (2020); Stec et al. (2016)]. Den biologiske tilpasningen til motstandstrening varierer mellom personer, på bakgrunn av variabler som treningsvolum, intensitet, repetisjoner og frekvens av treningsøktene [American College of Sports Medicine (2009)]. I tillegg til at genetiske og epigenetiske disposisjoner og miljøfaktorer spiller en rolle for variasjoner i tilpasninger Timmons (2011). Ved å studere protein kan man se på blant annet interaksjon, lokasjon og aktiveringsstatus av ulike proteiner. Dette kan for eksempel brukes for å fremme gunstige treningstilpasninger.

I denne labbrapporten har vi gjort en protein ekstraksjon og analyse. Én frivillig person meldte seg til å ta en mikrobiopsi fra vastus lateralis, i venstre og høyre bein. Personen gjennomførte eksentrisk beinpress til utmattelse på venstre bein før prøvetaking. Vi var interessert i å se på det fosforylerte p-70 proteinet til denne personen, og forskjellen i konsentrasjonen mellom venstre og høyre bein. Prøvene ble tatt på Høgskolen i Innlandet, 30.oktober 2023. Resterende prøver som er analysert er hentet fra mikrobiopsi fra én trent- og én utrent person. I denne analysen var vi interessert i å se på UBF-proteinet, og sammenlikne konsentrasjonen av dette proteinet mellom personene.

2.2 Teori

Det er individuelle forskjeller på adaptasjoner til styrketrening, målt i muskelstyrke og muskelmasse, og dette korrelerer med muskelcelle-karakteristikker i hvile og under trening (Raue et al. 2012; Stec et al. 2016; Terzis et al. 2008; Thalacker-Mercer et al. 2013). Hemmelse av proteinet mTORC1 svekker proteinsyntesen hos mennesker Drummond et al. (2009), mens

aktivering av proteinet S6-Kinase 1 (S6K1/p-70), som ligger nedstrøms for mTORC1, gir en økning i proteinsyntesen og påfølgende økning i muskelvekst Burd et al. (2010); Terzis et al. (2008). Et økt treningsvolum vil føre til større fosforylering av S6K1, og dermed markante tilpasninger gjennom gjentatte episoder med økt proteinsyntese [Burd et al. (2010); Terzis et al. (2010); Ahtiainen et al. (2015)]. Dette er grunnen til at vi ønsker å se på konsentrasjonen av p-70 i det beinet som har trent til utmattelse, mot det beinet som ikke har trent rett før prøvetaking.

Det er korrelasjon mellom mengden UBF-protein i cellene, og hastigheten på ribosomal DNA-transkripsjon i hvilende og serum-stimulerte celler (**glibetic1995?**). Mitotisk cellevekst krever kontinuerlig ribosombiogenese, som er nødvendig for å støtte proteinsyntesen. Desto raskere cellene går gjennom cellesyklusen, desto raskere må ribosombiogenesen skje. Denne prosessen begrenses av hastigheten på transkripsjonen av rRNA-genene (rDNA). Det betyr at dersom konsentrasjonen av UBF i cellene er stor, vil transkripsjonen av rDNA gå raskere. Dette er med på å styre produksjonen av ribosomer, og de er essensielle for proteinsyntesen og cellevekst (**glibetic1995?**). Dette er grunnen til at vi ønsker å se på konsentrasjonen av UBF-proteinet i beinet til én trent person versus en utrent.

For å analysere de aktuelle proteinene ble det brukt en metode kalt Western blot. Western blot er en immunologisk metode som brukes i celle- og molekylærbiologi. Teknikken brukes for å separere og identifisere spesifikke proteiner fra en kompleks blanding av proteiner ekstrahert fra celler. I Western blot blir en blanding av proteiner separert basert på molekylvekt og dermed type, gjennom gel-elektroforese. Resultatene overføres deretter til en membran, som produserer et bånd for hvert protein. Membranen inkuberes deretter med merkede antistoffer spesifikke for det ønskede proteinet (**yang2012?**).

De ubundne antistoffene vaskes bort, slik at det kun er de bundne antistoffene til proteinet som man er interessert i blir igjen. De bundne antistoffene detekteres ved fremkalling av film. Siden antistoffene bare binder seg ved de proteinene av interesse, skal kun ett bånd være synlig. Tykkelsen på båndet samsvarer med mengden protein som er til stede. Western blot er en nyttig teknikk proteindeteksjon der man får muligheten til å kvantifisere proteinuttrykk (**yang2012?**).

2.3 Metode

2.3.0.1 Prøvemateriale

En frivillig på gruppa meldte seg til å ta en mikrobiopsi fra vastus lateralis i både venstre og høyre ben. Vedkommende hadde trent styrke på formiddagen, men gjennomførte 10 sett eksentriske benpress med venstre fot til utmattelse. Derfor var vi interessert i å se på fosforylert p-70 protein. Resterende prøver vi analyserte var fra en mikrobiopsi fra en trent person mens andre var fra en utrent person. Her var vi interessert i å se på UBF-proteinet.

2.3.0.2 Oppsett og utgangspunkt for analyse

Til det vi gjorde i labben fikk vi ferdig behandlet muskelvev som var fryst ned over natta. Western blot og bestemmelse av total proteinkonsentrasjon ble gjort i motsatt rekkefølge, samt at prøven hvor det ble bestemt total proteinkonsentrasjon var en vilkårlig tilgjengelig prøve av tørt muskelvev som vi fikk utdelt.

Muskelbiopsien fra den frivillige ble homogenisert av bioingeniør som beskrevet under metoden. Det ble ikke bestemt proteinkonsentrasjon, men prøven ble også fortynnet i Laemmlibuffer (Bio-Rad) til å ha en konsentrasjon på 1.5-2.0 µg/µl. Løsningen ble kokt i 5 min, 95 °C. Kjølt ned til romtemperatur og sentrifugert for å få ned kondens før vi begynte på Western blot slik det er beskrevet.

2.3.0.3 Western Blot

Elektroforesekommeret ble lagt på is og fylt med buffer. Gelen vasket vi med ultrarent vann (dH₂O) før den ble lagt i kammeret. Tilsatte 5 µl standard proteinstige, og 25 µl prøve (duplikat av hver) til gel etter skjema. Alt vi tilsatte ble vortexet og sentrifugert før pipettering. Satte i kjøleskap (4 °C) og kjørte elektroforese i 30 min, 300 volt.

Demonterte gelen og la i overføringsbuffer med proteinside opp. Membraner som proteinene skulle bli overført til klippet vi i ene hjørnet og plasserte i methanol for å aktivere dem. Stod på shaker i 5-10 min. Våtgjorde 2 filterpapirer i overføringsbuffer og plassert oppå gelen, snudde rundt og fjernet dem forsiktig sammen. Svamp som var vasket med dH₂O og hvor vannet var presset ut la vi i bunn i monteringsbrett (svart side ned). Helte oppi overføringsbuffer og plasserte filterpapiret med gel oppå svampen, fjernet eventuelle bobler. Til slutt la vi membranen oppå gel, med svamp på toppen og lukket igjen. La i overføringskammer som lå på is, fylte med overføringsbuffer og satte spenning på konstant 100 volt i 30 min.

Neste steg var å sjekke om vi fikk overført proteiner til membran og kutte overflødig membran. Dyppet membran raskt i dH₂O, la i MemCode sensitizer og satt på shaker i 2 min. Deretter la vi i MemCode reversible stain, og på shaker i 1 min. Dyppet så raskt 3 ganger i MemCode destain og ristet litt for å få det til å dekke membranen. Dekket membran med methanol/destain-løsning (blandet 1:1) og satte på shaker i 5 min. Skylte med dH₂O før vi tok bilde av membraner. Fortsatte med å legge i eraser/methanol-løsning (blandet 1:1), på shaker i 10 min. Vasket 4 ganger med dH₂O og kuttet membranen etter hvilke brønner vi hadde brukt. La over i TBS for lagring.

Deretter blokkerte vi membranen med melkeproteiner på de stedene hvor det ikke allerede er proteiner. La membran i blokkeringsløsning (2.5 % melk blandet med TBS-T) i 1 time i romtemperatur på shaker. Før vi helte ut blokkeringsløsningen og rensset i TBS. Primær antistoffet som ble brukt tilsatte vi oppi en løsning (5 % melk i TBS-T), før vi inkuberte membraner i løsningene over natten i 4 °C. Antistoffene er fortynnet 1:200 i melkeløsningen. Prøvene fra høyre og venstre bein til den frivillige fra gruppa ble lagt i p-70 antistoff fra

2.november. Mens de andre to prøvene vi hadde fra en trent og en utrent person i et annet prosjekt ble lagt i UBF-antistoff fra 2017 (t-UBF).

Neste dag vasket vi for primærantistoff før vi tilsatte sekundær antistoff. Vasket med TBS-T, 2 x 1 min + 3 x 5 min på shaker. Tilsatte sekundær antistoff (anti-mouse igG) til 2.5 % melk/TBS-T-løsning, i forholdet 1:3000. Brukte to ulike produsenter, membranen med p-70 primær antistoff ble lagt i anti-mouse igG fra Cell signaling, mens resterende i antistoff fra Thermo Fisher. Stod på vippebrett i 1 time i romtemperatur. Etterpå vasket vi med TBS, 4 x 5 min på shaker. Inkuberte membranen i ECL-løsning i 5-10 min, la den på platen for å ta bilde.

2.3.0.4 Homogenisering av muskelvev

Tørr muskelprøve veies, brukte 1.88 mg tørrvekt. Tilsatte protease/phosphatase inhibitorer til en iskald lysis buffer (Hepes buffer), 500 µl Hepes buffer og 5 µl inhibitorer. Viktig at prøven var på is til vi tilsatte Hepes buffer. Tilsatte 150 µl av blandingen til muskelprøven knuste mekanisk for hånd. Mos til det ikke er noen synlige biter igjen, første gang gikk det 20-30 sek før den ble satt på is igjen. Plasser på SB2 rotator i kjøleskap og roterte prøve i 30 min. Spinn den i 10 min på 10 000 g, 4 °C, før vi forflyttet supernatanten forsiktig til et nytt rør uten å forstyrre pelleten. Brukte ufortynnede prøver, men resultatene var over maksimal konsentrasjon. Derfor fortynnet vi med dH₂O og bestemte total proteinkonsentrasjon på en 1:1 fortynning. Konsentrasjonen bestemte vi med Bradford Assay, brukte 10 µl prøve + 250 µl reagent i hver brønn (Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Reagent, Thermo Fisher Scientific).

2.4 Resultater

Mengden fosforylert p-70 var større i venstre bein enn i høyre bein, se Figure ???. Når det gjaldt homogeniseringen var det en god korrelasjon mellom signal og konsentrasjon i kontrollene og prøvene (se Figure ??). Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient på signalstyrken for kontrollene var 1.7, fremstilt i Table ??. Det ble funnet en 350 % større signalstyrke for p-70 i venstre bein versus høyre bein. Høyre bein hadde en signalstyrke på 2758 og 4842 (gjennomsnitt = 3800), mens venstre bein hadde en signalstyrke på 14826 og 11793 (gjennomsnitt = 13309). Homogeniseringen av de andre prøvene viste at 99,9 % av variasjonen i signal kunne forklares av konsentrasjon, og at signalstyrken for proteinmengden var på 2,532, 2,166 og 2,454, henholdsvis. I tillegg viste homogeniseringen akseptabel reliabilitet (variasjonskoeffisient [CV] = 20 %).

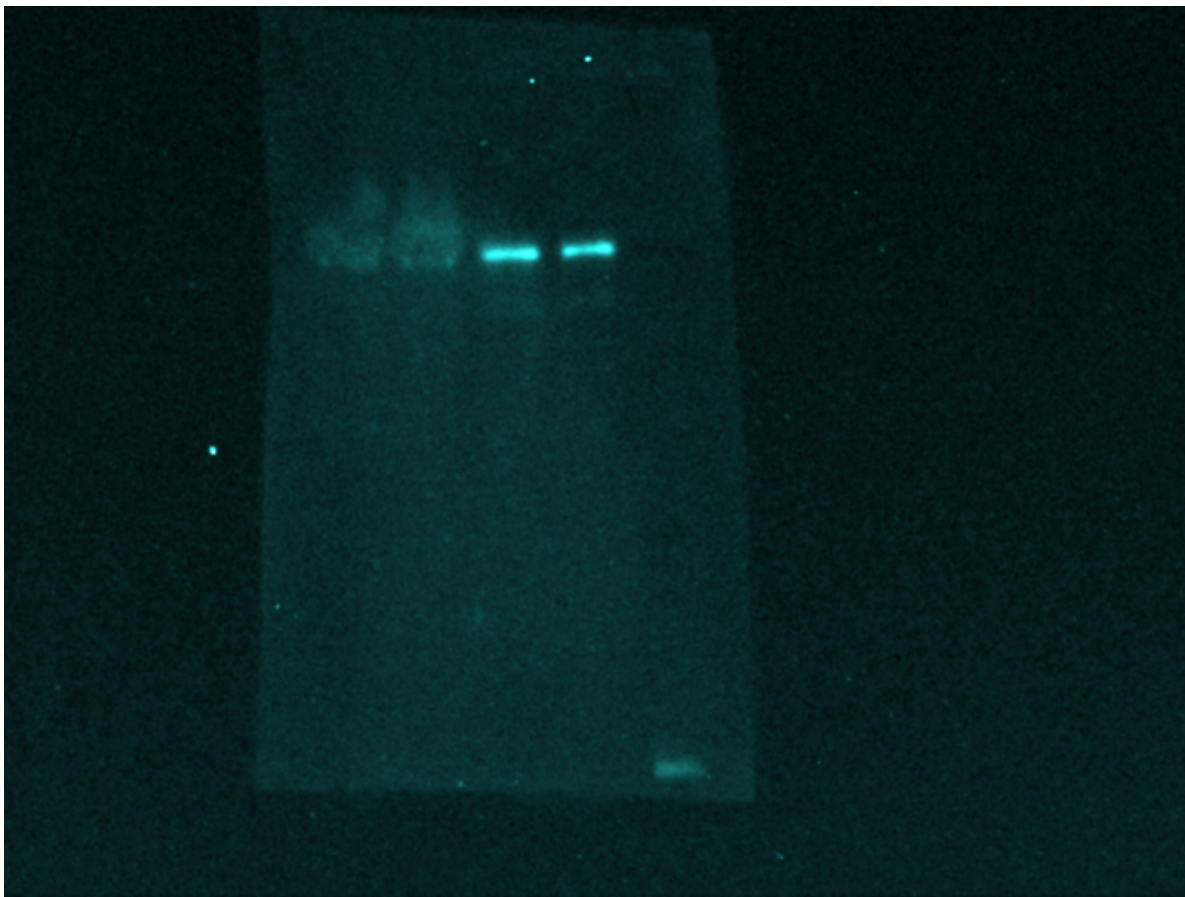


Figure 2.1: *Illustrasjon av mengden fosforylert p-70 i venstre versus høyre bein. De to boksene til venstre viser mengde p-70 i høyre fot og de to boksene til høyre viser mengde p-70 i venstre fot ($N = 1$).*