

Mappeeksamen

Håvard C. Lorentzen

2021-12-02

Contents

1	Realabilitet	5
1.1	Introduksjon	5
1.2	Metode	5
1.3	Resultater	5
1.4	Diskusjon	5
2	Labrapport - cDNA synthesis using Superscript IV and general qPCR	7
2.1	Formål	7
2.2	Metode	7
2.3	Exploring the data	9
2.4	Resultater	9
2.5	Diskusjon	12
3	Vitenskapsteori	13
3.1	1. Falsifikasjonisme	13
3.2	2. HD-metoden og abduksjon/Bayesisme	13
3.3	3. Replikasjonskrisen	13
4	Studiedesign	15
4.1	Introduksjon	15
4.2	Metode	15
4.3	Resultat	15
4.4	Videre forskning	15

5	1 vs 3 sett	17
5.1	Introduksjon	18
5.2	Metode	18
5.3	Resultat	18
5.4	Diskusjon	18

Kapittel 1

Realabilitet

Placeholder

1.1 Introduksjon

1.2 Metode

1.3 Resultater

1.4 Diskusjon

Kapittel 2

Labrapport - cDNA synthesis using Superscript IV and general qPCR

2.1 Formål

RNA-overflodsanalyse er gjort ved hjelp av syntese av komplementært DNA fra enkelttrådet RNA. Vi ønsker å amplifisere opp bestemte proteiner ved hjelp av bestemte primere og qPCR. Vi ønsker å få frem en cQ-verdi for å kunne evaluere gen-opphopningen, og sammenlikne mål-genene med referanse gener.

Estimere reaksjonseffektivitet Dobler mengden målgene per syklus

2.2 Metode

3 forsøkspersoner fra pre-test og test uke 2 (venstre ben) Laget fortynningsserie av cDNA 1:1, 5 ganger. Dette resulterer i fortynning ved hjelp DEPC-behandlet vann 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250, 1:31250, 1:156250. Vortex ble brukt mellom hver fortynningsfase.

Laget sju forskjellige master mixer ved hjelp av 3 referansegener (REEP5, CHMP2A, B2M) og 4 målgener (MyHC I, 2A, 2X, rRNA 475). Mastermix bestod av: 5 µl sybr green, 1 µl valgt gen, 2 µl DEPC-behandlet vann, 2 µl fortynnet cDNA. Fylte hver brønn med 2 µl prøve, og 8 µl med mastermix. Dekke brett med plastfilm, og sentrifugere 1min på 1200rpm, før PCR protokoll.

Forberedt en PCR protokoll i Quant studio 5 50 grader i 2 min, og 95 grader i 2 min + 40 sykluser med 1 sek på 95 grader, og 30sek på 60 grader

```

if("qpcR" %in% rownames(installed.packages()) == FALSE) install.packages("qpcR")
if("readxl" %in% rownames(installed.packages()) == FALSE) install.packages("readxl")
if("parallel" %in% rownames(installed.packages()) == FALSE) install.packages("parallel")
# Check if qpcrpal is installed, otherwise install
if("qpcrpal" %in% rownames(installed.packages()) == FALSE) {

  library(remotes)
  remotes::install_github("dhammarstrom/qpcrpal", build_vignettes = TRUE)

}
# Load packages
library(qpcR)

```

```
## Loading required package: MASS
```

```
## Loading required package: minpack.lm
```

```
## Loading required package: rgl
```

```
## Warning: package 'rgl' was built under R version 4.1.2
```

```
## Loading required package: robustbase
```

```
## Loading required package: Matrix
```

```

library(readxl)
library(parallel)
library(qpcrpal)
library(tidyverse)

```

```
## -- Attaching packages ----- tidyverse 1.3.1 --
```

```

## v ggplot2 3.3.5      v purrr   0.3.4
## v tibble  3.1.4      v dplyr   1.0.7
## v tidyr   1.1.3      v stringr 1.4.0
## v readr   2.0.1      v forcats 0.5.1

```

```
## -- Conflicts ----- tidyverse_conflicts() --
```

```

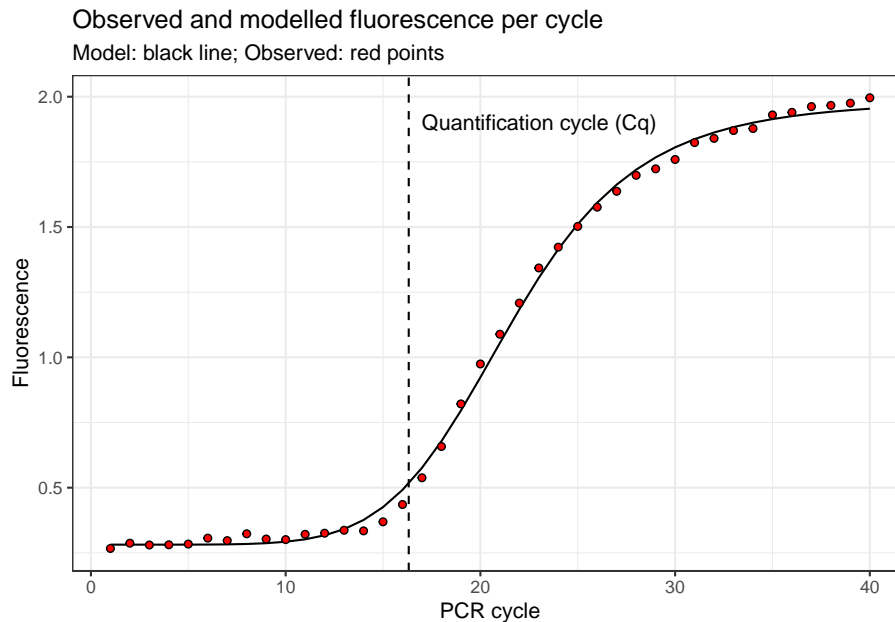
## x tidyr::expand() masks Matrix::expand()
## x dplyr::filter() masks stats::filter()
## x dplyr::lag()    masks stats::lag()
## x tidyr::pack()   masks Matrix::pack()
## x dplyr::select() masks MASS::select()
## x tidyr::unpack() masks Matrix::unpack()

```


2.3 Exploring the data

- Reading and analyzing qPCR-data is done in a stepwise manner using `qpcrpal`.
- The `read_quant5` function organizes the data from the instrument (QuantStudio 5)
- `model_qpcr` creates models of the fluorescence from each reaction
- `analyze_models` use the information in each model to calculate summaries for each reaction.

```
group1 <- read_quant5("./data/IDR4000-Group1-precision.xls", skip = 47) %>%  
  mutate(ID = paste0(Well, "_", ID))  
models <- model_qpcr(group1)  
results_group1 <- analyze_models(models)
```

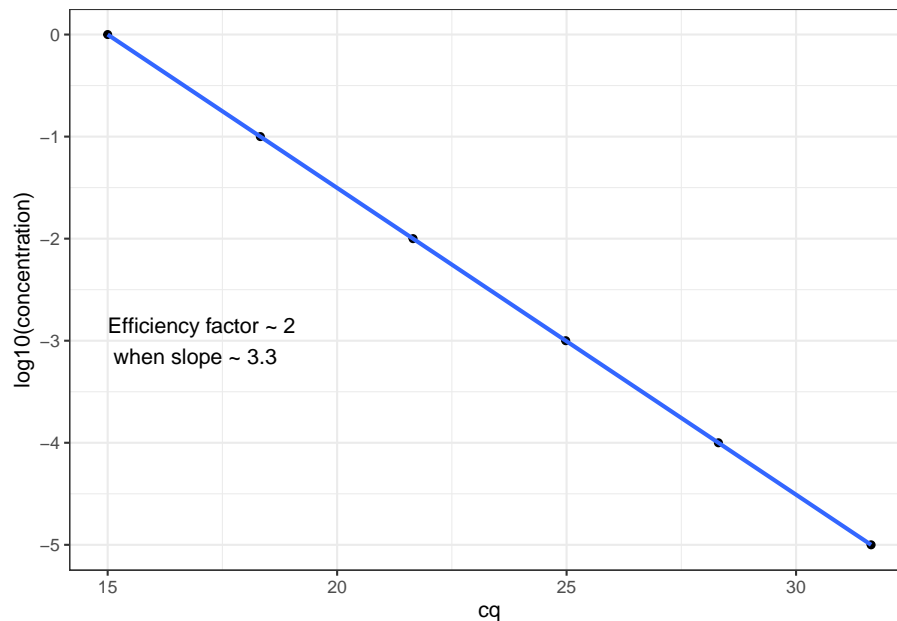


2.4 Resultater

Modellen viser sammenhengen mellom antall sykluser og fluorescence. Flere PCR-sykluser gir flere kopier, og dermed også en økt konsentrasjon i prøven. På denne måten kan vi bruke fluorescence til å si noe om hvor mange sykluser som må til for å oppnå en bestemt terskelverdi (Cq-verdi). Med primerne vi benyttet i forsøket var det ønskelig med et sted mellom 10 og 40 sykluser for å sikre at vi oppnådde terskelverdien. Det ble derfor kjørt 40 sykluser.

```
#hvordan mengden av kopiert RNA utvikler seg med antall PCR-sykluser/Cq verdier??
cyc.diff <- 3.327
dat <- data.frame(concentration = c(1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000),
                  cq = c(15,
                        15 + cyc.diff,
                        15 + cyc.diff*2,
                        15 + cyc.diff*3,
                        15 + cyc.diff*4,
                        15 + cyc.diff*5))
slope <- coef(lm(cq ~ log10(concentration), data = dat))[2]
dat %>%
  ggplot(aes(cq, log10(concentration))) +
  geom_point() + geom_smooth(method = "lm") +
  theme_bw() +
  annotate("text", x = 15, y = -3, hjust = 0, label = "Efficiency factor ~ 2\n when slo
```

```
## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'
```



```
## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'
```

```
# Create models and extract the second coefficient from each model (the slope)
b2m_slope <- coef(lm(cq ~ log10(concentration), data = filter(efficiency_est_data, targ
```

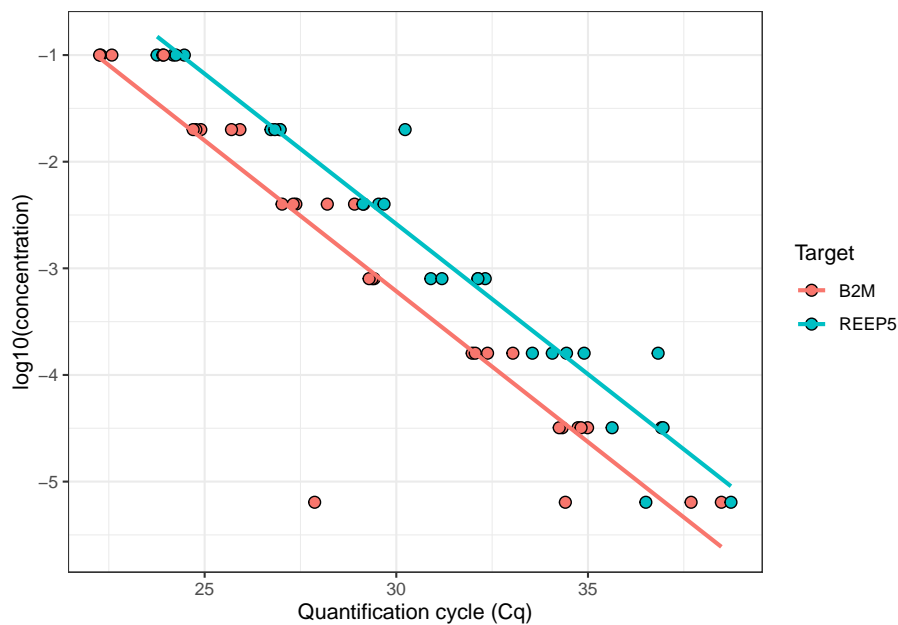


Figure 2.1: Efficiency calculations made from serial dilution of cDNA

```
reep5_slope <- coef(lm(cq ~ log10(concentration), data = filter(
  efficiency_est_data, target == "REEP5")
# Calculate and store the data in a data frame
efficiency_estimates <- data.frame(target = c("B2M", "REEP5"),
  Efficiency = c(10~(1/b2m_slope),
    10~(1/reep5_slope)))
```

```
## Estimerte cq verdier?
library(flextable)
```

```
##
## Attaching package: 'flextable'

## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      compose
```

```
fc_g1 <- results_group1 %>%
  separate(ID, into = c("well", "sample", "subsample", "time", "target")) %>%
  dplyr::select(well:target, cq = cpD2) %>%
  filter(sample %in% c("FP1", "FP2", "FP3")) %>%
```

```
dplyr::select(sample, time, target, cq) %>%
mutate(target = toupper(target),
       target = gsub("RRNA475", "RRNA47S", target)) %>%
group_by(sample)%>%
pivot_wider(names_from = target, values_from = cq) %>%
arrange(time) %>%
flextable() %>%
print()
```

```
## Warning: Expected 5 pieces. Additional pieces discarded in 70 rows [1, 2, 3, 4,
## 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ...].
```

```
## a flextable object.
## col_keys: `sample`, `time`, `MYHC1`, `MYHC2A`, `MYHC2X`, `RRNA47S`, `CHMP2A`, `REEP5`
## header has 1 row(s)
## body has 6 row(s)
## original dataset sample:
##   sample time MYHC1 MYHC2A MYHC2X RRNA47S CHMP2A REEP5  B2M
## 1   FP1   w0 19.53  20.03  22.87   24.88  26.68 26.68 23.79
## 2   FP2   w0 19.70  20.04  29.80   27.54  26.78 26.59 25.22
## 3   FP3   w0 20.33  18.25  22.87   25.27  25.97 26.55 24.53
## 4   FP1   w2 19.96  17.59  26.01   32.36  26.73 26.87 24.01
## 5   FP2   w2 20.20  14.64  26.23   27.00  26.45 26.40 24.56
```

2.5 Diskusjon

Cq-verdien sier noe om hvor mange PCR-sykluser som trengs for å detektere ulike targets. En høyere Cq-verdi indikerer altså at mengden RNA må dobles flere ganger for å detektere en terskelverdi av target. En lavere Cq-verdi indikerer at terskelverdien oppnås ved færre PCR-sykluser, altså at konsentrasjonen av target er høyere. En lavere Cq-verdi ved uke 2, sammenlignet med uke 0 (baseline) som i forsøket, indikerer høyere konsentrasjon ved uke 2 enn ved uke 0. (Dermed en effekt av intervensjonen, avhengig av funksjonen til target - gen).

Kapittel 3

Vitenskapsteori

Placeholder

3.1 1. Falsifikasjonisme

3.2 2. HD-metoden og abduksjon/Bayesisme

3.3 3. Replikasjonskrisen

Kapittel 4

Studiedesign

Placeholder

4.1 Introduksjon

4.2 Metode

4.3 Resultat

4.4 Videre forskning

Kapittel 5

1 vs 3 sett

Placeholder

5.1 Introduksjon

5.2 Metode

5.2.1 Etikk

5.2.2 Deltagere

5.2.3 Trening

5.2.4 Testing

5.2.4.1 Styrketester

5.2.4.2 Testing av Muskelmasse

5.2.5 Statestikk

5.3 Resultat

5.3.1 Muskelmasse

5.3.2 Muskelstyrke

5.4 Diskusjon

5.4.1 Treningsanbefaling

5.4.2 Konklusjon