**Dag 1.**

Først følges innstruksene på labarket, hvor vi skrudde på stråleapparatet og lot røntgenrøret varmes opp i 30 min.

6 prøver ble hentet fra inkubatoren. Korken på flasken har to trinn, et hvor det slipper luft inn og et hvor det er lukket. I inkubatoren var det ca. 4% CO2 som får cellekulturen til å vokse ved at «Næringsmiddeled» trenger CO2? I mikroskopet var det en del flate celler og noen runde. De runde var i mitose, i ca. 1 time.

Deretter ble alle 6 cellene brakt ned til strålingsrommet. De ble markert med riktig dose, hvor en av dem ble ubestrålt. Vi brukte 1 min per halve Gy istedenfor oppgitt tidsenhet. Legger merke til at selv den ubestrålte ble tatt med ned slik at den opplever det samme, risting nedkjøling etc. Bestrålingen var ferdig kl. 10:25 hvor de står i 2 timer. Muligens litt mer, vi satt 12:30 til møtetid i tillegg til at resten tar tid.

Trypsin brukes for å få løs cellene fra flaske bunnen, de er bundet til bunnen. Denne bryter proteiner opp, men ikke ha den oppi for lenge hvor den bryter opp cellene.

Vi startet med å fjerne CM fra Control. Deretter tilsettetes ca. 1.5 ml trypsin, flasken roteres littegrann og deretter suges trypsinen ut igjen og fjernes. Dette gjøres to ganger. Så settes flasken i inkubatoren i noen minutter til man ser at cellene løsner på innsiden. Deretter tilsettes det 1 ml PBS. Dette spyles fra venstre til høyre med flasken på hell noen ganger slik at man får med seg alle cellene. Til slutt suges alt ut og overføres til en eppendorf tube. Dette gjøres kronologisk. Fakta om PBS, det er et salt som har lik saltkonsentrasjon som i cellene, dette gjør at det ikke skapes osmosisk trykk og den har stabil pH.

Eppendorftubene ble veid før veske ble overført til den og tidene det ble tilsatt trypsin og PBS ble notert. Vi startet 12:44.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Dose (Gy) | Trypsin klokkeslett | PBS klokkeslett |
| Control | 12:52 | 12:58 |
| 0.5 | 12:54 | 13:03 |
| 1.0 | 12:55 | 13:05 |
| 1.5 | 13:08 | 13:15 |
| 2.0 | 13:12 | 13:21 |
| 2.5 | 13:16 | 13:25 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Dose (Gy) | Vekt før (g) | Vekt etter (g) | Differanse (g) | RIPA tilført (l) |
| Control | 0.9953 | 1.0078 | 0.0125 | 125 |
| 0.5 | 0.9961 | 1.0132 | 0.0171 | 171 |
| 1.0 | 0.9902 | 1.0029 | 0.0127 | 127 |
| 1.5 | 0.9941 | 1.0050 | 0.0108 | 108 |
| 2.0 | 1.0058 | 1.0266 | 0.0208 | 208 |
| 2.5 | 0.9905 | 1.0092 | 0.0187 | 187 |

Disse ble så sentrifugert ved 6000 rpm og cellene ble trykt til bunnen og til siden. Videre sugdes all ekstra væske vekk fra eppendorftubene slik at kun cellene var igjen. RIPA ble tilført med mengden listet i tabellen. Dette ble også blandet slik at cellene var helt løst opp. Deretter ble det tilsatt 40 l 2x SDS sample buffer, dette ble tilsatt under avtrekk hvor det måtte mikses raskt pga. det blir veldig sticky. Dette ble varmet på 100 oC i 5 min hvor det ble ristet i vortexen underveis. Etter 5 min ble det overført raskt til is. Prøven ble satt i fryseren og vi tok dagen.

Feilkilder: Bobler i røret og ikke blandet fort nok.

**Dag 2.**