

Kandidatnummer 10022 & 10008 & 10005 &
10023

Optimalisering av kortisolekstraksjon fra bovint hår

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Yanran Cao

Medveileder: Anne S. Røsvik

Mai 2021

Kandidatnummer 10022 & 10008 & 10005 & 10023

Optimalisering av kortisolekstraksjon fra bovint hår

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Yanran Cao
Medveileder: Anne S. Røsvik
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

I dette forsøket var målet å optimalisere metode for måling av kortisol fra hårprøver. I forsøket ble det brukt hår fra kyr. Det er gunstig å finne en god optimalisert og standardisert metode for prepareringen, slik at resultatene i større grad blir sammenlignbare.

Det ble utført seks forskjellige ekstraksjonsmetoder for kortisol på seks forskjellige hårprøver for å svare på problemstillingen; «Hvilken ekstraksjonsmetode gir høyest mengde ekstrahert kortisol?». Resultatet ble vurdert ut fra hvilken metode som ga høyest konsentrasjon av kortisol ved analysering, da det å få ekstrahert så mye kortisol som mulig vil gi det mest korrekte resultatet. Preparering og ekstraksjon av prøvene ble gjort i batch etter metode.

Konsentrasjonene ble kvantitert ved hjelp av kompetitiv ELISA-analyse fra NEOGEN.

Det ble benyttet hår fremfor andre medium, som eksempelvis blod, feces eller spytt grunnet at kortisol målt i blod, feces og spytt ikke vil kunne si noe om kortisol over lengre tid - kortisolnivåene målt vil kun være representativt for tidspunktet prøven ble tatt. Kortisolnivåene vil da også muligens være påvirket av forhøyede stressnivåer, som for eksempel en blodprøvetaking kan forårsake.

Resultatene fra forsøket viser at temperatur ikke har en betydelig innvirkning på resultatene. Det som hadde høyest innvirkning på kortisol konsentrasjon var om prøven var knust eller ikke. I tillegg var det en betydelig forskjell på prøver som ble knust ved hjelp av Tissuelyser II og prøver som ble knust ved hjelp av både Tissuelyser II og sonikering. Prøver knust med sonikering og Tissuelyser II hadde de høyest konsentrasjonsnivåene.

Abstract

The goal of this study was to optimize the process of cortisol extraction from hair samples. In this study, hair from cows was used. It would be beneficial to find the most optimized method for preparation of samples for cortisol extraction, as so the results between different laboratories will be comparable.

Six different methods of cortisol extraction were performed on six different samples of hair to answer the question; "Which extraction method gives the highest amount of extracted cortisol?". The results were assessed on the basis of which method gave the highest concentration of cortisol, as extracting the highest amount of cortisol will give the most correct result. Preparation and extraction of the samples were done in batch by method. The results were quantified by using a competitive ELISA kit made by NEOGEN.

Hair was used over other media, such as blood, faeces or saliva due to the fact that cortisol measured in blood, faeces and saliva will not be able to say anything about long-term cortisol levels, as the cortisol levels measured will only be representative of the time the sample was taken. Cortisol levels measured by such methods might also possibly be affected by elevated stress levels, which for instance taking a blood sample can cause.

The results from the experiment show that temperature does not have a significant effect on the results. What had the highest effect on cortisol concentration was whether the sample was crushed or not. In addition, there was a significant difference between samples that were crushed using TissueLyser II and samples that were crushed using both TissueLyser II and sonication. Samples crushed by sonication and TissueLyser II had the highest concentration levels.

Forord

Denne bacheloroppgaven ble utført ved NTNU Ålesund. Start for oppgaven var 23. mars og den ble levert inn 27. mai. Arbeidet på laboratoriet ble påbegynt 27. mars og avsluttet 3. mai. I denne oppgaven ble det utført ulike metoder for kortisol ekstraksjon og måling av kortisol ved hjelp av ELISA enzymteknikk. Av litteratursøket vi gjorde var det mange ulike metoder forpreparering av prøver for kortisolekstraksjon og vi ville se hvilken metode som ga mest optimal ekstraksjon av kortisol.

Faglig veileder for forsøket var førsteamanuensis Ph.D Yanran Cao og prosessveileder var førsteamanuensis og programansvarlig for bioingeniørutdanning Anne S. Røsvik. Vi vil takke faglig veileder, Yanran Cao for veiledning under planlegging til forsøket, utdeling av prøvemateriale til oppgaven, samt opplæring på ELISA. Vi vil og takke Anne S. Røsvik for hjelp med oppsett av oppgave, herav organisering av stoffet, og veiledning under skriving av oppgaveteksten.

Innhold

1. Introduksjon.....	4
1.1 Hensikt	4
1.2 Problemstilling	5
1.2.1 Formulering av problemstilling	5
1.2.2 Avgrensninger av problemstilling	5
1.2.3 Antagelser	5
1.3 Etikk og risikovurdering.....	6
1.3.1 Etikk.....	6
1.3.2 Risikovurdering	7
1.4 Bakgrunn	7
1.4.1 Bakgrunn Kortisol	7
1.4.2 Bakgrunn hår	11
1.5 Faktorer som påvirker kortisol ekstraksjon.....	12
1.5.1 Faktorer.....	12
1.5.2 Forhåndsbehandling av prøvene	13
1.5.3 Ekstrahering av kortisol fra hår	13
1.5.4 Nitrogenfordampning	13
1.5.5 Sonikering.....	13
1.5.6 Elisa immunoassay	14
2. Metoder og materialer.....	16
2.1 Materialer	16
2.2 Forbehandling av prøvene.....	18
2.3 Ekstraksjon av kortisol	19
2.3.1 Knusing.....	19
2.3.2 Sonikering.....	19
2.3.3 Metanolbehandling	20
2.3.4 Fordampning ved hjelp av nitrogengass	21
2.3.5 Overføring av ekstrahert kortisol til eppendorfrør	21
2.4 ELISA.....	22
2.4.1 Utføring av ELISA immunoassay	22

2.4.2 Beregninger fra absorbanstil konsentrasjon	23
2.4.3 statistisk metode	23
3. Resultater	25
3.1 Variabler som ble testet.....	25
3.1.1 Metode A og C sammenlignet med metode B og D.....	25
3.1.2 Metode A og B sammenlignet med metode C og D.....	25
3.1.3 Metode A sammenlignet med metode E.....	26
3.1.4 Metode E sammenlignet med metode F	26
3.2 Standardkurve.....	26
3.3 Metodesammenligning	28
4. Diskusjon	29
4.1 Målet med oppgaven og forventninger	29
4.2 De ulike faktorenes innvirkning på ekstraheringen.....	29
4.2.1 Knusing av prøver	29
4.2.2 Sonikering.....	30
4.2.3 Temperatur.....	30
4.2.4 Tid.....	30
4.2.5 Anvendelse av funn	30
4.3 Styrker og svakheter med oppgaven	31
4.4 Sammenligning med tidligere funn	32
4.5 Forslag til videre forskning	32
5. Konklusjon.....	34
Referanser:	35

Ordliste:

HPA-aksen: Hypofysen, hypothalamus og binyrebarken. Nevroendokrin akse som skiller ut stresshormon.

Glukokortikoid: En klasse steroid-hormoner som blir produsert i binyrebarken. Mange glukokortikoider blir også laget syntetisk og blir brukt som medikament, eksempelvis kortison. Glukokortikoider er hydrofobiske.

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay, en metode for kvantitering av biologiske molekyler.

Inkubering: Å holde kjemiske substanser ved en spesifikk temperatur over en gitt periode, for å styre en kjemisk reaksjon.

Bovint hår: Hår fra kyr

Sonikering: Agitering av stoffer i en væske ved å tilføre energi i form av ultrasonisk lyd.

Oscillering: En form for bevegelse som går frem og tilbake med regelmessig svinging.

Epitop: et område på et antistoff som vil bestemme hvilke antigener det vil reagere med

Biologisk varians: varierende verdier på diverse målinger avhengig av faktorer som tid på døgnet, diett og menstruasjonssyklus.

Hormon: kjemiske molekyler i kroppen som fraktes via blodet til et målorgan, hvor det vil binde seg til en reseptor og starte en biologisk respons.

Vital: essensiell for normal funksjon, dødelig om fraværende.

ACTH: Hormon som stimulerer til produksjon av kortisol, samt regulering av metabolske prosesser som proteinproduksjon og glukoseopptak

Lyse: Et suffiks som betyr at noe blir brutt ned, eller går i oppløsning

Transkripsjon: En prosess hvor DNA blir omskrevet til RNA molekyler

Reseptor: Et molekyl i en celle som kan motta signalmolekyler og føre til en respons

1. Introduksjon

1.1 Hensikt

I løpet av de siste par tiårene har det blitt satt et økende fokus på velferd blant dyr. Det har vært et tema at dyr som holdes som husdyr, for matproduksjon eller holdt i dyrehager skal ha akseptable levevilkår og generell velferd. Med denne økte fokuseringen på velferd vil monitorering av stress være en viktig metode for å sikre at velferden er opprettholdt. Grunnet dette har det blitt gitt mer oppmerksomhet på kortisol som en biologisk markør for stress, og derved en indikator på dyrevelferd (1).

Imidlertid finnes det fortsatt ikke en standardisert metode til å preparere prøver for ekstraksjon av kortisol. Dette kan by på utfordringer på hvorvidt prøver vil være sammenlignbare mellom ulike laboratorier, dersom teknikkene for preparering og ekstraksjon varierer. Det er ulik praksis for hvordan en ekstraherer kortisol. Variablene som ble observert mellom forsøk i relevant litteratur er blant annet metoden for knusing, der ulike metoder som sonikering eller maskinell knusing benyttes. Inkubasjonstiden er og noe som varierer mellom ulike forsøk, og spriker mellom 18 til 72 timer. Til slutt er inkubasjonstemperaturen en faktor som også er observert til å variere i forskjellige artikler (2, 3).

På grunn av forskjeller i variablene som benyttes i vitenskapelige artikler, ble det satt opp et forsøk hvor disse variablene testes opp mot hverandre. Målet var å se på hvilke variabler for behandling av prøver som har mest innvirkning på mengde kortisol ekstrahert. Formålet ble da å finne den mest optimale metoden for kortisolekstraksjon fra hår. Det finnes en gitt mengde kortisol som befinner seg i håret, noen metoder får ikke ut alt og derved gir disse metodene misvisende resultat.

Denne oppgaven er relevant for eventuelt å kunne videre utvikle en standardisert prosedyre for ekstraksjon av kortisol fra hår, da det for øyeblikket ikke finnes en. En standardisering vil være et godt hjelpemiddel for all framtidig monitorering av dyrevelferd og langtidsstress hos dyr.

Målet med eksperimentet var å kunne konkludere hvilken metode som ga høyest nivå av ekstrahert kortisol, og dermed på sikt kunne få til en standardisert metode for kortisol. Dette forsøket kan være relevant for fremtidig monitorering av stress, og derved langtidsmonitorering

av dyrenes velferd. Forsøket ble utført under forventningen at finknust hår og sonikert hår vil gi høyere konsentrasjon av ekstrahert kortisol enn de som er uknust.

1.2 Problemstilling

1.2.1 Formulering av problemstilling

Problemstillingen for denne oppgaven blir; «Hvilken ekstraksjonsmetode gir høyest mengde ekstrahert kortisol?».

1.2.2 Avgrensninger av problemstilling

Det vil i denne oppgaven bli fokusert på kortisol ekstrahert fra bovint hår. Kortisol kan måles i flere medium slik som; blod, spytt, feces og hår. Av disse mediene er det hår som lagrer kortisol mest stabilt og over lengre tid. Dette gjør at hår er utmerket å bruke til langtidsmonitorering av kortisol- og stressnivåer hos dyr med pels (1).

Gitt begrensninger med tid og prøvemateriale, ble det valgt å avgrense forsøket til å fokusere på noen faktorer fremfor andre. Det ble valgt å ikke inkubere prøvene i over et døgn, ettersom dette ville ha krevd mer tid enn gruppen hadde tilgjengelig på lab. Inkubasjonstiden måtte i tillegg være forenelig med åpningstider til laboratoriet, da det var åpent fra klokken 08:00 til klokken 16:00.

På grunn av disse tidsrelaterte utfordringene ble det valgt å benytte inkuberingstiden 18 timer, med unntak av forsøket hvor inkuberingstiden var på fem timer. Det var ønskelig å benytte en lengre inkuberingstid for dette forsøket, men det ville ikke ha vært forenlig med kravet om å få gjort alt laboratoriearbeidet til forsøket fra klokken 08:00 til klokken 16:00.

Det hadde også vært ønskelig med forsøk som inkluderer en større utvalgsstørrelse, og repetisjon av forsøket for å danne mer data. Ettersom det bare var nok prøvemateriale til seks prøver over seks metoder, kunne forsøkene bare utføres en gang.

1.2.3 Antagelser

Det antas at det blir høyere konsentrasjon ekstrahert kortisol der knust hår benyttes, sammenlignet med der uknust hår benyttes. Det forventes også at det blir ekstrahert lavere

konsentrasjoner av kortisol for metodene hvor ekstraheringen blir inkubert i romtemperatur, sammenlignet med inkubering i 50°C. Ved sonikering forventes en høyere konsentrasjon enn ved vanlig knusing, ettersom her vil cellene lyseres, og det intracellulære innholdet blir mer tilgjengelig for metanolløsningen.

Det ble også antatt at sonikeringen muligens kan ha en forstyrrende effekt på kortisolmolekylet. Hvis molekylet ødelegges, og strukturen til epitopet endres, vil det ikke lengre kunne bindes til antistoffet under kvantiteringen med ELISA, og det vil da måles en lav konsentrasjon med kortisol.

1.3 Etikk og risikovurdering

1.3.1 Etikk

Dyrevelferd er en viktig faktor når en skal gjøre forsøk på dyr. Dyrevelferd er ikke en enstemmig definisjon, men Brambellkommisjonen utredet i 1965, fem punkter som brukes som en målsetting for dyrevelferd, disse fem punktene er hentet ut fra Mattilsynets nettsider:

- **Frihet fra sult, tørste og feilernæring** - ved at dyra har fri tilgang på friskt vann og en diett som opprettholder god helse og trivsel.
- **Frihet fra fysisk ubehag** - ved at dyra holdes i egnet levemiljø med komfortabel liggeplass og ly for vær og vind.
- **Frihet fra smerte, sykdom og skade** - ved forebygging, rask diagnostisering og behandling.
- **Frihet til å utøve normal atferd** - ved at dyra får nok plass i egnede driftssystemer og samvær med dyr av samme art.
- **Frihet fra frykt og stress** - ved at dyra holdes og behandles på en slik måte at de unngår vedvarende frykt og stress.

“Kommissjonen slo fast at de to første punktene stort sett er oppfylt i moderne husdyrhold, mens friheten til å utøve normal atferd er dårligst ivaretatt.” De fem friheter” har påvirket utviklingen av regelverk for hold av husdyr i hele verden, spesielt i EU-landene og også i Norge. “

Sitatet er relevant også i dag i Norge, og brukes som en veiledning (4).

Det ble vurderte etiske betraktninger ut fra disse fem punktene. Når det kommer til monitorering av kortisol, vil bruken av hår være en relativt lite invasiv metode for prøveinnsamling sammenlignet med å utsette dyret en blodprøvetaking. Ved korrekt uthenting vil kyrne i relativt liten grad bli utsatt for både smerte og stress, sammenlignet med blodprøvetaking. I praksis er måling av kortisol fra hår også gunstig da det kan lettere fraktes og lagres, enn for eksempel blod eller urin. Som nevnt ovenfor er innsamling av hårprøve lite invasivt, samt at resultatene vil ikke bli påvirket av det momentane stresset som kan oppstå ved prøvetaking, da kortisol i hår ikke påvirkes av stress under prøveinnsamling og brukes til å måle kortisolvåer over lengre tid.

1.3.2 Risikovurdering

Det ble utført risikovurdering i samråd med faglig veileder. Risikoreporten er lagt ved som vedlegg nr. 8.

1.4 Bakgrunn

1.4.1 Bakgrunn Kortisol

I denne delen vil det fokuseres på teori om kortisol, hår og dyrevelferd, samt teori om selve delprosessene av forsøket. Under vises et bilde av den molekylære strukturen til kortisol, samt strukturformelen.

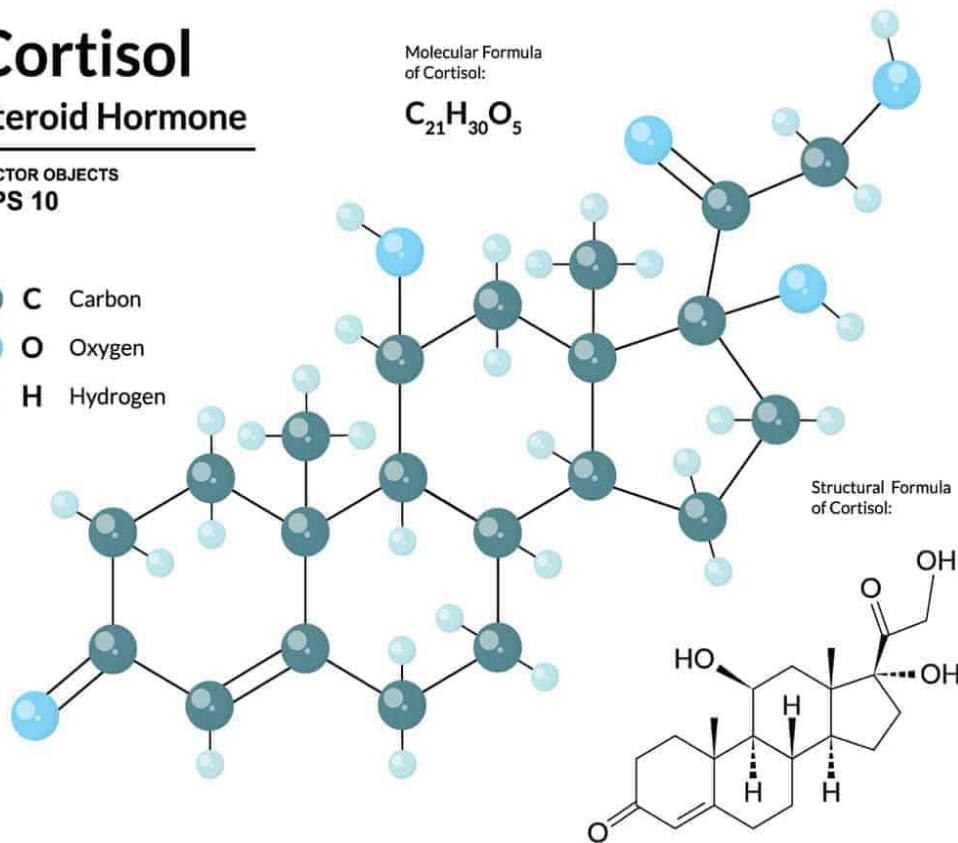
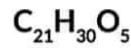
Cortisol

Steroid Hormone

VECTOR OBJECTS
EPS 10

● C Carbon
● O Oxygen
● H Hydrogen

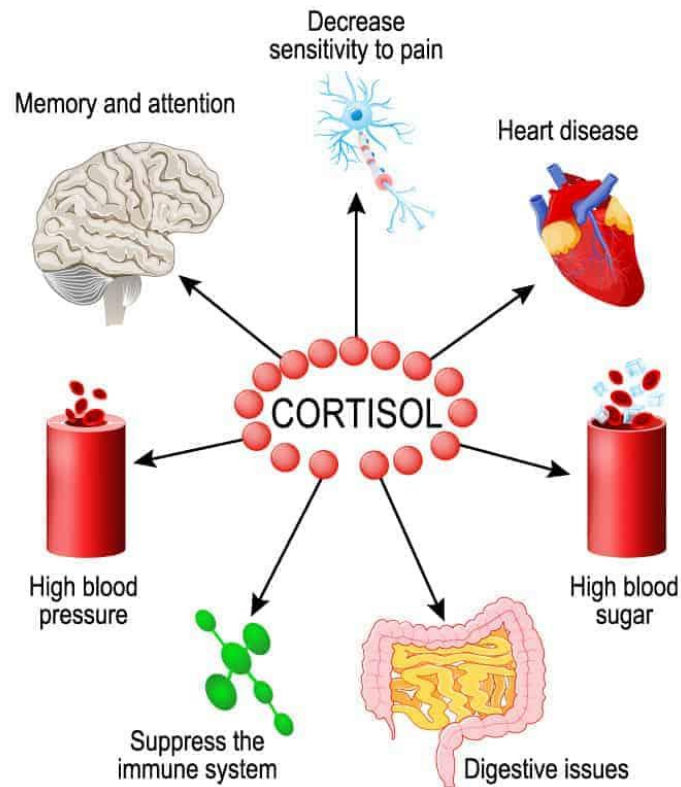
Molecular Formula
of Cortisol:



Figur 1: Molekylstruktur og strukturformel for kortisol (5).

Biologisk respons til psykologisk stress er en meget viktig funksjon avgjørende for ens evne til å takle situasjoner som gir grunn for nevnt stress. Utskillelse av kortisol, også kjent som “stresshormonet”, vil gi en reaksjon som bedrer kroppens evne til å takle stresset. Hormoner er kjemiske forbindelser som gir en direkte biologisk innvirkning på målcellene sine, eller indirekte ved å stimulere videre produksjon av mer lokale hormoner (6, s. 682)

Glukokortikoider er en gruppe vitale hormoner som regulerer omsetningen av glukose, blodsukker, i kroppen. Produksjonen av disse er aktivert av hormonet ACTH (adrenokortikotrop hormon) og vil føre til en endring i metabolismen av blodsukkeret som tillater til økt opptak av blodsukker. Glukokortikoider vil også hjelpe med å undertrykke immunrespons, og brukes dermed som medikamenter ment til å dempe allergiske reaksjoner (6).



Figur 2: Oversikt over hva kortisol kan påvirke (5).

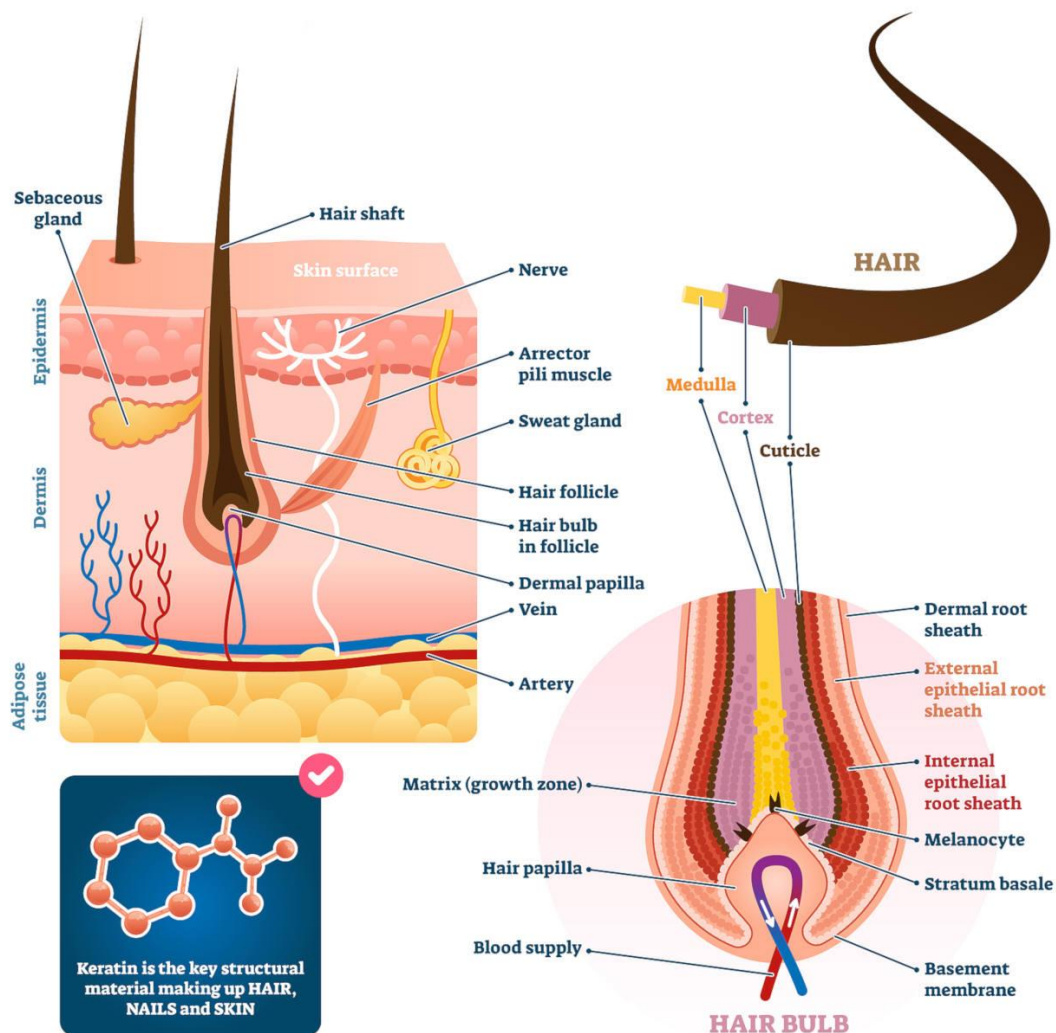
Kortisol er et glukokortikoid som spiller en viktig rolle i både immunforsvaret og metabolismen. “Kortisol er kroppens viktigste glukokortikoid, og er ansvarlig for mer enn 95% av glukokortikoidenes virkning.”(7, s.229). Det påvirker mange forskjellige celler i kroppen på forskjellige måter. For eksempel kan det virke som aktivator av kortisolreseptorer, som igjen bidrar til å aktivere transkripsjon (8, s.264, s. 276). Hormonet påvirker vevenes opptak av glukose, og dermed også forbruk av glukose. Kortisol blir ofte skilt ut som en del av stressresponsen og har dermed også fått tilnavnet ‘stresshormonet’. Det er kjent at det er en sammenheng mellom forhøyede kortisolnivåer og sykdommer som diabetes type 2, osteoporose, samt hjerte og karsykdommer (7, s. 229-232).

Kortisol måles ofte ved hjelp av blodprøve, spytt og ved urinprøve, det kan også måles i feces. Imidlertid kan det være et problem at disse analysene ikke gir et representativt bilde av stress over lengre tid. Kortisolmengden målt i spytt og blod vil variere ut ifra når på døgnet prøven er tatt, sammen med biologisk varians. I tillegg vil resultatene kun være representative for øyeblikket prøven blir tatt (7, s.230). Kortisol ekstrahert fra hår kan gi et bilde på stressnivå over et lengre tidsløp.

Utskillelse av kortisol skjer ved aktivering av HPA-aksen. Ved aktivering av responsen vil en få et skift mot mer oksygentilførsel til hjerne og skjelettmuskulatur, samtidig vil det som en konsekvens medføre at ikke adaptive funksjoner som eksempelvis spising, vekst og reproduksjon ikke blir prioritert. Dette vil, i tillegg til nedsatt velferd over lengre tid, føre til en mindre effektiv vekst blant dyr alet for produksjon av kjøtt og meieriprodukter (9).

Mange faktorer vil kunne aktivere stressresponsen hos kyr, som ved melking, transport, avhorning og gruppering. Kronisk stress kan medføre immunsuppresjon og dermed føre til mer sårbarhet for sykdom, redusert fertilitet, i tillegg er det ved høye kortisol konsentrasjoner observert atferdsendringer (10, 11).

1.4.2 Bakgrunn hår



Figur 3: Anatomi av hår (12).

Hårvekst er et typisk trekk for de fleste pattedyr, samt pungdyr. Hos forskjellige arter har hår og pels forskjellige funksjoner, som for eksempel kamuflasje, beskyttelse og isolasjon fra ytre faktorer som kulde. Hår vokser ut fra follikler i dermis, og det består hovedsakelig av døde celler. Disse cellene er beriket med protein, der keratin er proteinet med høyest forekomst. Hårstråene er delt inn i tre lag, fra innerst til ytterst: medulla, korteks og kutikula. Hormoner, som kortisol, og andre små molekyler ender opp i håret via blod som kommer fra kapillærene som videre er koblet til hårfolliklene (6, s. 211-214). Anatomien til hår og hvordan det ligger i huden er vist i figur 2 ovenfor. Kortisol ekstrahert fra hår kan gi et bilde på stressnivå over et lengre tidsløp.

Ved hårlengde mellom 2-4 cm kan kortisolet være representativt 3 måneder bak i tid, da hår hos kyr gjennomsnittlig vokser med 0,6-1,0 cm per måned(13). Det er gunstig å måle stressnivået til kyr som skal benyttes for eksempel i kjøttproduksjon og/eller melkeproduksjon. Stressnivået er tett knyttet til den generelle dyrevelferden, kyrnes vekst og kvaliteten på matproduktene. Derfor er det vanlig praksis for storfebønder å regelmessig ta hårprøver av kyrne for monitorering av stress (1).

1.5 Faktorer som påvirker kortisol ekstraksjon

1.5.1 Faktorer

Det er diverse ulike faktorer som kan ha en innvirkning på hvor optimal en kortisol ekstrahering fra hår vil være. I forsøket ble variasjoner innenfor noen av disse faktorene testet:

- Inkubasjonstemperatur
Temperatur har en innvirkning på reaksjonshastigheter. Derfor vil temperaturen i løsningen under ekstraherings steget ha en innvirkning på resultatet (14, s. 603).
- Inkubasjonstid
Det forventes å få forskjellige resultater ut ifra hvor lenge en reaksjon pågår. Som resultat forventes å få forskjellige resultater ved variasjoner i inkubasjonstid (14, s. 611).
- Størrelse på hårpartikler i løsningen - Knusing av prøver
Ettersom forsøket involverer diffusjon av kortisol fra hår til metanol, vil ekstraheringen være begrenset til overflatearealet av håret. En vil da forvente forskjellige reaksjonshastigheter for hår som er pulverisert, sammenlignet med hår som kun er klippet opp i små biter. Dette er fordi pulver vil ha et større samlet overflateareal.
- Mekanisk risting
En løsning som utsettes for en form for risting eller vending, vil blandes bedre enn en løsning som ligger i ro. Partiklene i løsningen vil kontinuerlig utsettes for kollidering med andre stoffer i løsningen, og dette vil føre til en hurtigere reaksjonsfart (15).

1.5.2 Forhåndsbehandling av prøvene

Vanlig praksis er at håret blir behandlet med enten isopropanol eller metanol. Til eksperimentet ble det i dette tilfellet brukt isopropanol, isopropanol og metanol har mindre ulikheter på mørkt hår, mens ved lysere hår vil isopropanol kunne gi en høyere kortisolkonsentrasjon (16).

1.5.3 Ekstrahering av kortisol fra hår

Kortisol er løselig i metanol, løseligheten er 6.2 mg/ml ved 25°C (17). Når overflaten av håret kommer i kontakt med en metanolløsning, vil kortisolet ved overflaten til håret diffundere over i løsningen over tid.

1.5.4 Nitrogenfordamping

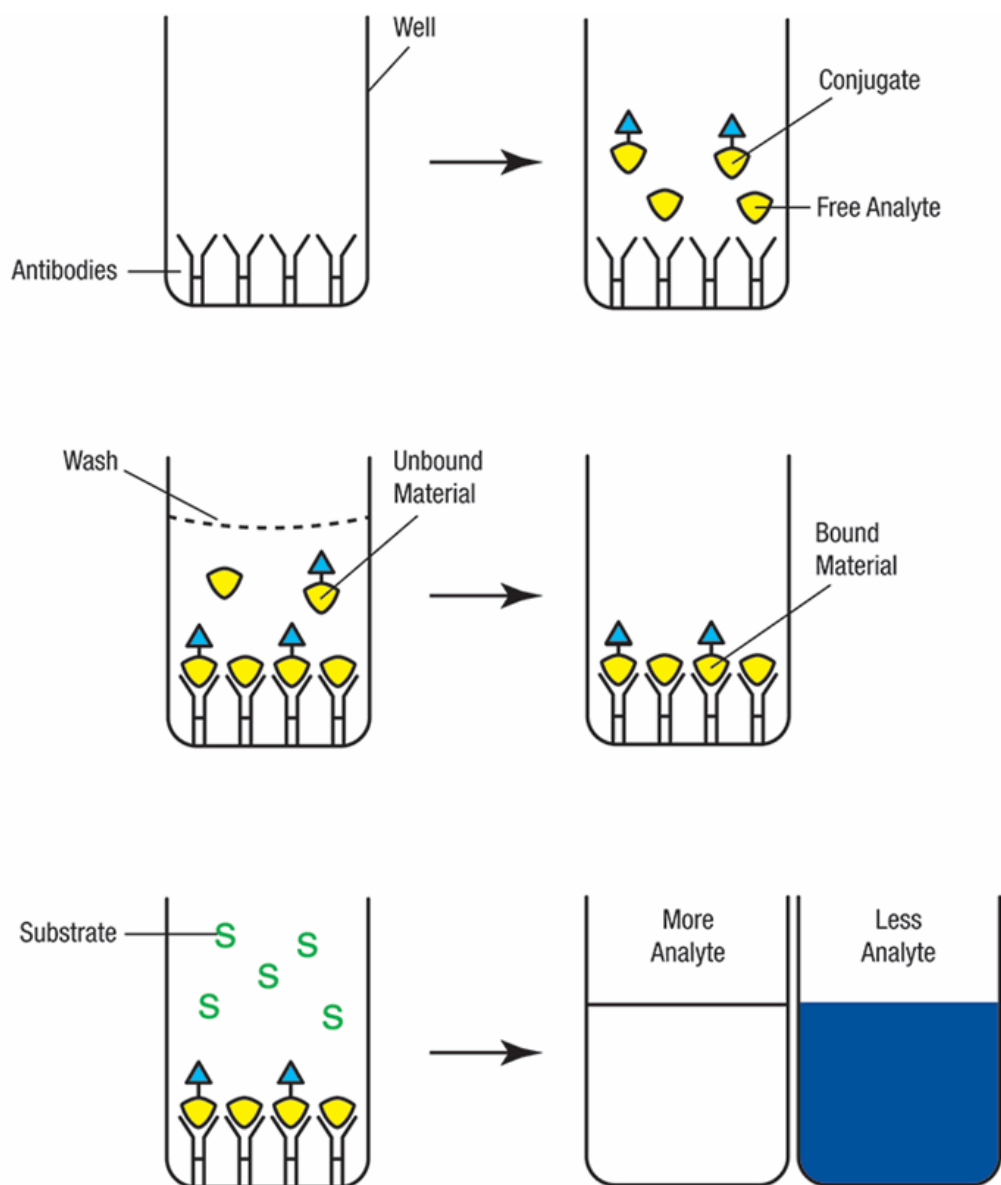
Nitrogenfordamperen blåser en kontinuerlig strøm med nitrogengass ned i reagensrøret, og ned på metanolløsningen. Dette senker damptrykket, og gjør det lettere for metanol å gå over til gassform. Nitrogen opptrer som en inert gass i denne prosedyren, og vil ikke reagere kjemisk med noen av forbindelsene i løsningen (18).

Dette fører til at stoffene som var løst opp i metanolløsningen vil ende opp som tørrstoff i bunnen på reagensglasset. Kortisolet som skal måles er blant dette tørrstoffet, men tørrstoffet inneholder andre stoffer som ikke skal måles. Derfor kreves det en analysemetode som er spesifikk for kortisol, og har minst mulig interferens fra andre substanser i løsningen.

1.5.5 Sonikering

Sonikering er en prosess som benytter ultrasoniske vibrasjoner for å tilføre energi til en løsning. Denne energitilførselen fører til blant annet lysering av celler, som kan bidra til uthenting av intracellulære forbindelser. Teknikken har en rekke anvendelser, og benyttes til ulike former for ekstrahering. For dette forsøket ble sonikering benyttet for å bryte ned håret ytterligere, med mål om at dette skulle føre til at kortisol ligger mer tilgjengelig for ekstrahering. Det er uvisst om sonikeringen kan ha en ødeleggende effekt på selve kortisol molekylet (10, 19).

1.5.6 Elisa immunoassay



Figur 4: Skjematisk oversikt over prinsippet for kompetitiv ELISA for NEOGENs kortisol-kit (20).

Til å måle konsentrasjon ble det ble brukt kompetitiv ELISA. ELISA er en metode som benyttes for kvantitering av biologiske molekyler. Det er en teknikk som baserer seg på at en brønn er dekket med antistoff. Kortisol har et epitop som kun vil binde seg til antistoffene i brønnene. Antistoffene i kitet som ble brukt er spesifikke for mål-molekylet, kortisol, som skal kvantiteres. Disse brønnene kommer i form av mikroplater, hvor det er vanlig å ha 96 brønner

på hver plate. Kvantiteringen skjer som et resultat av måling av enzymaktiviteten til antistoffet som er bundet til mikroplaten.

Kompetitiv ELISA baserer seg på konkurranse mellom mål-molekylet og et molekyl som også kan binde seg til antistoffet mikroplaten er dekket med. Dette molekylet som også kan binde seg til antigenet kommer som et kunstig produsert konjugat. Dette konjugatet som kan binde seg til antigenet på mikro platene vil ha en annerledes egenskap enn mål-molekylet dersom det binder seg til antigenet på mikroplaten.

For ELISA metoden som ble benyttet for dette forsøket, vil det konjugerte molekylet sammen med substratet skape en fargeutvikling. Dersom det i stedet er mål-molekylet som binder seg til antistoffet, vil ikke denne fargeutviklingen skje. Antigenet har en høyere affinitet for mål-molekylet, og det vil dermed utkonkurrere det konjugerte molekylet som danner fargeutvikling. Som kvalitetssikrende tiltak blir en viss del av brønnen delegert til dannelsen av en standardkurve.

Det ble valgt å benytte ELISA immunoassay til dette forsøket, ettersom det er en analysemetode som har høy spesifisitet. Forsøket behøvde en metode som kunne måle kortisolnivåer nøyaktig, og skille mellom kortisol og andre organiske forbindelser som også kan ha bli ekstrahert (21). I tillegg er det en metode som kan detektere konsentrasjoner i rekkevidden 0,04 ng/ml til 10,0 ng/ml, som passer med konsentrasjonene som forventes å måle. (Se vedlegg 7.)

Det er en rekke substanser som kan krysstreakere med antigenet som er bundet i brønnene på mikroplaten. Listen for disse er oppgitt i manualen. De mest signifikante interfererende substansene er: Prednisolon, kortison og 11-Deoxykortisol (20).

2. Metoder og materialer

Laboratoriearbeidet ble påbegynt 26. mars og ble ferdigstilt den 3. mai. Det ble mottatt hårprøver fra fem ulike kyr, og disse prøvene ble vasket, og ble brukt for seks ulike metoder for ekstraksjon. Ved den ene prøven var det både mørkt og lyst hår og da behandlet som to ulike prøver for å se forskjell på mørkt og lyst hår. Prøvene som ble mottatt stammer fra melkekyr i Tingvoll, og ble utdelt av faglig veileder.

Det ble valgt å benytte bovint hår ettersom det i større grad er gjennomførbart. Hårprøver må tas så nært inntil hårroten som mulig. Det blir derfor vanskelig å kunne samle inn signifikante mengder med humant hår. Dette forsøket vil dermed begrense seg til kun å gjelde bovint hår, selv om metodene kan utføres på hår fra alle typer dyr med pels.

I forsøket har det blitt utført en kvantitering av kortisol ekstrahert fra kuhår. Ekstraheringen ble utført med seks ulike metoder, med alle seks prøvene. Det ble utlevert hårstrå som alle ble mekanisk vasket for urenheter med vann og såpe. I henhold til bakgrunn har isopropanol en tendens til å kunne måle en høyere konsentrasjon av kortisol fra mørkt hår. Etter vasking ble hårstråene tørket i 24 timer, for å hindre noe væske fra å påvirke innveilingen av hår. Denne innveilingen må være nøyktig, ettersom hver prøve består av 100mg hår. Etter dette ble prøvene vasket med Isopropanol og prøvene fikk deretter tørke i tre timer. Til ekstraksjon prosessen var ekstraksjonsmiddelet som ble anvendt en løsning med rent metanol.

2.1 Materialer

Det ble utført ekstrahering av kortisol fra fem hårprøver fra ulike melkekyr, hvorav ene prøven hadde to prøver med ulik hårfarge. Prøvene ble sortert etter farge. Alle prøvene ble tatt så langt mot hårroten som mulig, og seks metoder ble tatt i bruk med hensikt på å finne den beste prosedyren for den manuelle ekstraheringen. Prøvene ble levert av en melkebonde i Tingvoll, Norge og ble utdelt av faglig veileder Yanran Cao. Den ene prøven (8001) inneholdt både mørke og lyse hår, den ble derfor delt opp i to delprøver (8001A og 8001B). En prøve ble levert ferdig vasket og knust (2528).

Prøvenummer	Farge på hår
8001a	Lyst
8001b	Mørkt
8003	Lyst
8006	Mørkt
8007	Lyst
2528 (mottatt ferdig vasket og knust)	Lyst

Figur 5: Oversikt over prøvene som ble brukt og farge på disse

Metode	Utførelse
A	Knust, 50°C i vannbad 18 timer
B	Uknust, 50°C i vannbad 18 timer
C	Knust, 23°C i vannbad 18 timer
D	Uknust, 23°C i vannbad 18 timer
E	Ultralyd-knusing (knust, 50° i vannbad i 18)
F	Ultralyd-knusing Knust, 50°C redusert inkubasjonstid til 5 timer i vannbad

Figur 6: Oversikt over alle metoder brukt til ekstraksjon:

2.2 Forbehandling av prøvene

Alle prøvene ble forbehandlet ved samme metode slik at resultatene skulle være mest mulig sammenlignbare.

Steg 1: Alle prøvene ble først vasket for overflødige urenheter manuelt, individuelt ved bruk av vann og oppvasksåpe. Deretter lagt til tørk over natten for å hindre at interferens av vannet ved veiing av prøvene. Etter tørking ble de behandlet med isopropanol

Isopropanol ble brukt som vaskemiddel ettersom tidligere forskning på grizzlybjørn har vist at kortisolnivåene fra mørkt bovint teoretisk vil kunne være høyere ved vasking ved bruk av isopropanol.

Steg 2: Når alle prøvene var vasket og tørket, ble de rengjort ved bruk av isopropanol for en grundigere fjerning av overflatestoffer. Håret ble ført inn i et begerglass, hvor isopropanolet ble tilført. Etter håret ble grundig dekket i isopropanol, ble det tørket ved at det ble lagt på papirbiter i avtrekkskap.

Steg 3: De rengjorte hår prøvene ble så manuelt klippet opp ved bruk av saks, med fokus på en uniform lengde for alle prøvene. Hårstråene ble kuttet opp i minst mulig segmenter da noen av de senere skulle knuses. De oppklippede prøvene blir oppsamlet i midlertidige papirposer, merket med prøvenummer.

Steg 4: Måling av de oppklippede prøvene med en mg-vekt. Dette ble utført ved å veie inn hår ved bruk av et veieskip av papir. Veieskipene ble lagd ved å klippe opp A4 ark, og brette dem på midten slik at håret samlet seg i midten, og at veieskipets vekt kun ble støttet opp av vektens vektsensor. Det ble veid opp 100 mg, med en feilmargin på +/- 4 mg. Det ble brukt veieskip av papir fremfor veieskip av plastikk ettersom det var enklere å overføre prøvemateriale fra papir til eppendorfrør.

2.3 Ekstraksjon av kortisol

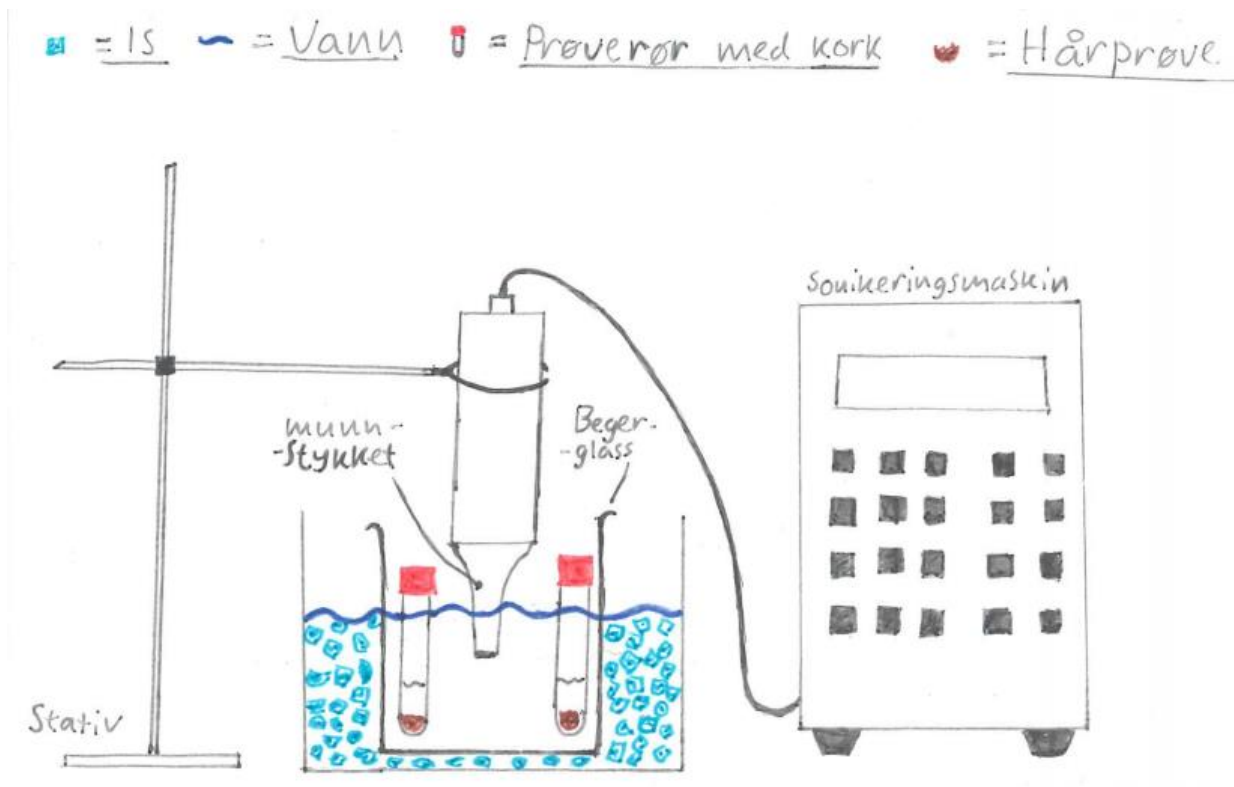
For å måle kortisol konsentrasjonen i hår, må kortisolet ekstraheres ut fra håret, og løses i en løsning hvor konsentrasjonen kan analyseres. Kortisol er et glukokortikoid hormon, som betyr at det er hydrofobt, og vil ikke kunne løses i vann. Dermed måtte det brukes organisk løsemiddel for å løse opp kortisolet i et medium (22).

2.3.1 Knusing

Noen av prøvene ble videre knust ved at de ble plassert i et 1,5 ml eppendorfrør. Hver 100 mg prøve ble tilsatt tre wolframkarbid kuler, kulene målte 3 mm i diameter. Rørene ble satt i Tissuelyser II, en ristemaskin laget av QIAGEN, slik at håret ble knust til et pulver. Dette ble utført for prøvene til metodene A, C, E og F, prøvene til metode B og D ble ikke knust da dette ikke var en del av disse metodene. Her benyttes eppendorfrør av plast, ettersom rør av glass vil knuse av denne behandlingen. Ristingen foregikk på en frekvens av 28 hertz, i 2 x 5 minutter.

2.3.2 Sonikering

Prøve til metodene E og F ble enda finere knust ved hjelp av sonikering, dette ble gjort etter prøvene ble tilsatt metanol, men før prøvene ble satt til inkubering. Til sonikeringen benyttes det sonikeringsmaskinen "Sonics **Vibra-Cell™** VCX 500". Prøverørene ble deretter satt i et begerglass, begerglasset ble fylt opp med vann slik at vannet dekket alt prøvematerialet. Begerglasset ble plassert i en beholder med is, for å unngå overoppheting av prøvene da selve sonikeringen forårsaket høy temperatur. Munnstykket til sonikeringsmaskinen ble deretter plassert i begerglasset. Sonikeringsmaskinen kjørte et sekund av, et sekund på med 100% styrke, med en varighet på 30 minutter. Oppsettet for sonikeringen er vist ved figuren nedenfor:



Figur 7: Illustrasjon av oppsettet for sonikeringen. Figuren ble tegnet for hånd.

2.3.3 Metanolbehandling

Prøvene ble forflyttet fra eppendorfrør til 100mm reagensrør av glass med kork, ved å tilføre 1,5 ml rent metanol og danne en suspensjon av hår. metanolet ble tilført på en måte som gjorde at håret ble "vasket ut" av eppendorfrøret. Suspensjonen ble overført fra eppendorfrørene til reagensrørene ved hjelp av pipettering. Etter suspensjonen var overført ble ytterligere 1,5 ml metanol tilført, og overført til reagensrørene av glass. Den totale mengden av metanol per prøve var 3 ml. Dette ble gjort for å overføre eventuelle hårrester fra eppendorfrørene.

Reagensglassene ble da plassert i et vannbad med et oscillerende brett. Oscilleringen bidro med en kontinuerlig blanding av prøvematerialet. Temperaturen i vannbadet ble satt til 50°C for alle prøver, med unntak av prøvene til metodene C og D, ettersom disse skulle inkuberes i romtemperatur. Temperaturen lå mellom 22-23°C for disse prøvene. De ble puttet i vannbadet slik de også skulle blir utsatt for oscilleringen til vannbadet.

Etter prøvene var inkubert i vannbadet i 18 timer, ble metanolløsningen ført videre til 110 mm reagensrør av plast. Det ble valgt å bruke rør av plast fordi rør av glass ville ikke ha tålt stresset påført fra sentrifugeringen. Løsningen fra hver prøve ble ført videre ved hjelp av pipettering, mesteparten av håret ble værende igjen i glassrøret, og målet var å videreføre mest mulig metanolløsning, med minst mulig av håret.

For å kvitte seg med de små resten av hår som fremdeles var i suspensjonen, ble prøverørene sentrifugert ved 2000g i 10 minutter. Etter sentrifugeringen var utført, ble metanolløsningen overført til glassrør ved helling.

2.3.4 Fordamping ved hjelp av nitrogengass

Reagensrørene med prøvene ble satt i en fordamper, REACTI-THERM III #TS-18824 fra Thermo Scientific. Den var satt til 50°C, og prøvene ble utsatt for en jevn strøm med nitrogengass ned i reagensrøret. Fordampningen ble utført under et avtrekksskap. Mengden gjenværende væske ble regelmessig sjekket med intervaller på ~7 minutter. Denne behandlingen ble utført helt til alt metanolløsningen fordampet, noe som tok omtrent 20 minutter til sammen.

2.3.5 Overføring av ekstrahert kortisol til eppendorfrør

Da metanolløsningen hadde blitt fullstendig fordampet, ble 150 µl med ekstraksjonsbuffer tilført glassrørene i to omganger, til sammen 300 µl. Det ble overført ved pipettering med automatpipette. Bufferen ble tilført slik at den dekket alt tørrstoffet, det ble i tillegg benyttet VORTEX for å løse opp rester som kunne være igjen i bunnen/på siden av reagensglasset. Løsningen ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør og lagret inntil det ble målt med teknikken kompetitiv ELISA. Det ble lagret i et kjøleskap ved 4°C.

Nedenfor er det vedlagt en forenklet figur av metoden som hver prøve gjennomgår.

	A	B	C	D	E	F
Knusing	✓	✗	✓	✗	✓	✓
Sonikering	✗	✗	✗	✗	✓	✓
Metanol i vannbad	50°C 18 t	50°C 18 t	23°C 18 t	23°C 18 t	50°C 18 t	50°C 5 t

Figur 7: Flowchart over hva som utføres for de forskjellige metodene

2.4 ELISA

Det ble i dette forsøket benyttet et kompetitivt ELISA Immunoassay kit fra NEOGEN CORPORATION. Dette kitet var spesialtilpasset og beregnet for kortisol avlesninger. Instruksjonene som fulgte med settet ble benyttet, disse instruksjonene er vedlagt (vedlegg nr. 7).

2.4.1 Utføring av ELISA immunoassay

Prøven og enzym konjugat blir tilsatt mikroplaten, som har antigen bundet på bunnen av brønner. Mikroplaten blir så blandet og inkubert i en time slik at antistoff kan bindes til antigen. Mengden kortisol antistoff som bindes vil være avhengig av kortisol konsentrasjonen i prøven. Platen blir så vasket med buffer og alt ubundet materiale blir vasket vekk, det som ikke blir vasket vil kunne måles ved hjelp av at en tilsetter substrat. Etter 30 minutter vil en oppnå optimal farging. På slutten av inkubasjonstiden ble det tilsatt stop solution, som ved denne analysen var 50 µl 1M HCl. Deretter ble målingen foretatt ved 450 nm bølgelengde, se vedlegg nr. 7.

For utførelsen av kvantitering av kortisol ved bruk av ELISA immunoassay ble instruksjonene fra NEOGEN benyttet. Vedlagt ligger instruksene, samt oppsettet for hvor på brettet de ulike prøvene ble plassert.

Det ble benyttet et Brett hvor prøvene ble forberedt, slik de kunne bli pipetert over til brønnene som ble supplert med ELISA kit. de ukjente prøvene ble fortynnet med et 1:2 blandeforhold, hvor det ble benyttet 70 µl kortisol fra hår løst i ekstraksjonsbuffer, og 70 µl EIA buffer. Til å stoppe reaksjonen ble det benyttet 50 µl 1M HCL, absorbansen ble målt i henhold til manualen ved bølgelengden 450 nm.

2.4.2 Beregninger fra absorbans til konsentrasjon

Beregningene ble utført delvis manuelt ved bruk av google regneark, vedlegg nr 1, etter instruksjonen som var gitt i ELISA-kitet, vedlegg nr. 7, samt utført automatisk via nettsiden myassays.com. Se vedlegget Kortisol ELISA kit instruks for detaljert gjennomgang av hvordan kalkuleringen utføres. Se vedlegget rådata og manuell utregning for den manuelle utregningen fra absorbansverdier til konsentrasjoner.

Utregningene ble startet ved å slå sammen og regne ut gjennomsnittet av alle duplikatene, disse gjennomsnittsverdiene står oppført i vedlegg, tabell 2 i for standardene og tabell 4 for prøvene. Disse gjennomsnittsverdiene til standardene ble så brukt til å regne ut prosenten for maksimal binding, framstilt som %B/B₀-verdien i tabell 2. Disse ble brukte sammen med de tilsvarende konsentrasjonene for å konstruere standardkurven i figur 3. Videre ble %B/B₀-verdien for alle prøvene kalkulert (tabell 5 i vedlegg), og ved bruk av formelen generert ut fra standardkurven ble konsentrasjonene til alle prøvene kalkulert, de ble samtidig ganget med fortynningsfaktoren (x2x3), vist i tabell 6. Alle verdiene ble så satt inn i et søylediagram for enkleste visuelle sammenligning av resultat (figur 9).

2.4.3 statistisk metode

For å regne ut forskjellen mellom de ulike metodene, ble gjennomsnittskonsentrasjonen for hver metode regnet ut. Formelen, $100\% - 100\% \cdot \frac{\text{konsentrasjon 2}}{\text{konsentrasjon 1}}$, ble benyttet for å finne endringene i kortisolkonsentrasjon fra en metode til en annen. Metodene ble sammenlignet opp mot hverandre på måter som illustrerer hvor mye kortisol de ulike metodene ekstraherte, i

forhold til hverandre. Se vedlegg nr. 4 for å se den komplette utregningen av forskjeller i prosent. Sammenligningene ble som følgende:

Metode A + B ble sammenlignet med C + D for å se på forskjell kortisol ekstrahert ved 50°C sammenlignet med kortisol ekstrahert ved 23°C.

Metode A + C ble sammenlignet med metode B + D for å se på forskjellen i mengde kortisol ekstrahert fra hår som knuses, sammenlignet med hår som ikke knuses.

Metode A ble sammenlignet med metode F for å se på forskjellen ekstrahert kortisol ved en metode som ikke benytter sonikering og en metode som benytter sonikering av hårprøvene.

Metode F ble sammenlignet med metode E for å sammenligne en metode hvor prøvene inkuberte i varmebad i 18 timer, sammenlignet med en inkubasjon som varte i 5 timer.

3. Resultater

For å sammenligne resultatene for de forskjellige metodene, ble det valgt å regne ut gjennomsnitt konsentrasjonen til kortisol ekstrahert for hver metode, og se på forskjellene i disse gjennomsnittsverdiene.

Da forskjellen ble kalkulert mellom det ekstrahert kortisolet fra de knuste og de uknuste prøvene, ble det avgjort at verdiene for prøve 2528 under metodene B og D, som baserer seg på at prøvene ikke blir knust, skulle ekskluderes, og ble dermed ikke tatt med i beregningen. Prøvematerialet ble levert ferdig knust, og derfor ville ikke gi representative verdier for en metode som ikke benytter knusing.

3.1 Variabler som ble testet

De ulike variablene under ble sammenlignet for å se i hvilken grad de påvirket resultatet. Det ble valgt å sammenligne de ulike metodene ved å beregne gjennomsnittet for hver metode, og så se på forskjell målt i prosent mellom de ulike metodene.

3.1.1 Metode A og C sammenlignet med metode B og D

Gjennomsnittskonsentrasjonen for begge metodene som benyttet knusing (A + C), ble beregnet, og sammenlignet dette gjennomsnittet med gjennomsnittet til prøvene som ikke ble knust (B + D). Her ble resultatene fra prøven “Ku 2528” ekskludert, ettersom denne prøven kom til laboratoriet ferdig knust.

Det ble funnet at gjennomsnittskonsentrasjonen for uknuste prøver var 50,42% lavere enn gjennomsnittskonsentrasjonen for knuste prøver.

3.1.2 Metode A og B sammenlignet med metode C og D

Gjennomsnittskonsentrasjonen til begge metodene som inkuberte i 50° celsius (A og B), ble kalkulert, og dette gjennomsnittet ble sammenlignet med gjennomsnittet for prøvene som inkuberte i romtemperatur (C og D). Resultatet var at prøvene som inkuberte i romtemperatur hadde i snitt 1,95% høyere kortisol konsentrasjoner enn prøvene som inkuberte i 50°.

3.1.3 Metode A sammenlignet med metode E

Resultatet fra metode A ble sammenlignet med resultatene fra metode E. Her var målet å sammenligne vanlig knusing med sonikering, og hvorvidt sonikeringen endrer mengden ekstrahert kortisol. Metode E fikk i gjennomsnitt 21.44% høyere konsentrasjoner av kortisol enn metode A.

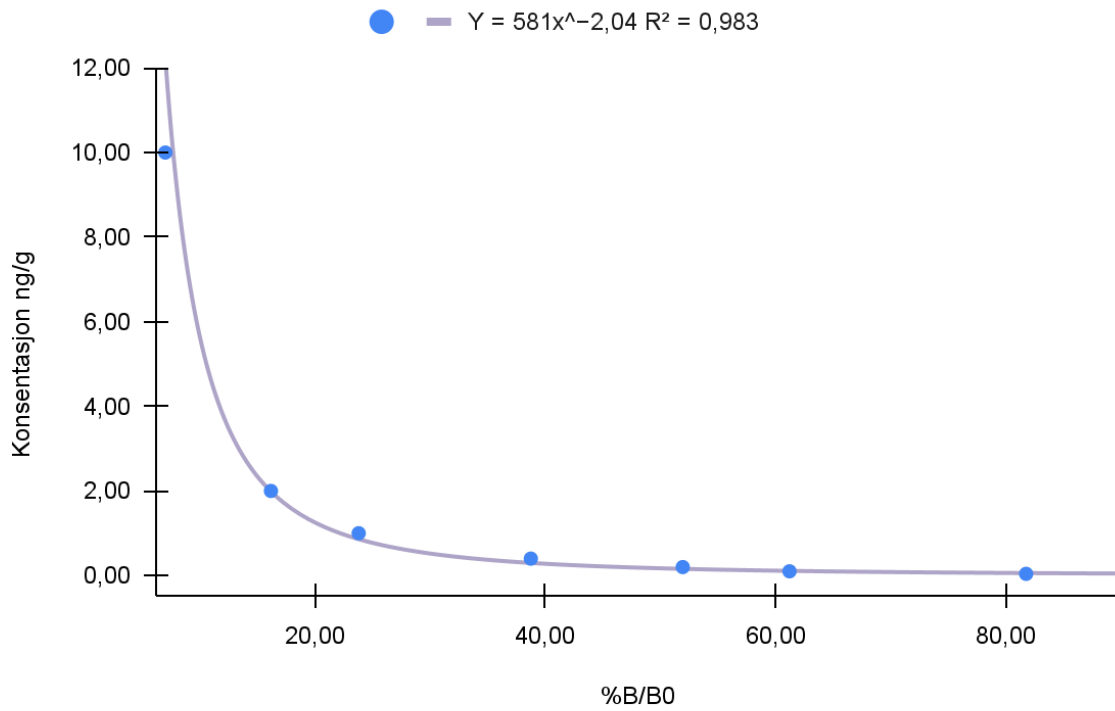
3.1.4 Metode E sammenlignet med metode F

Sammenligningen mellom de to metodene som benytter sonikering viser en 26,88% reduksjon fra metoden hvor prøvene inkuberte i 18 timer, og metoden hvor prøvene inkuberte i 5 timer.

3.2 Standardkurve

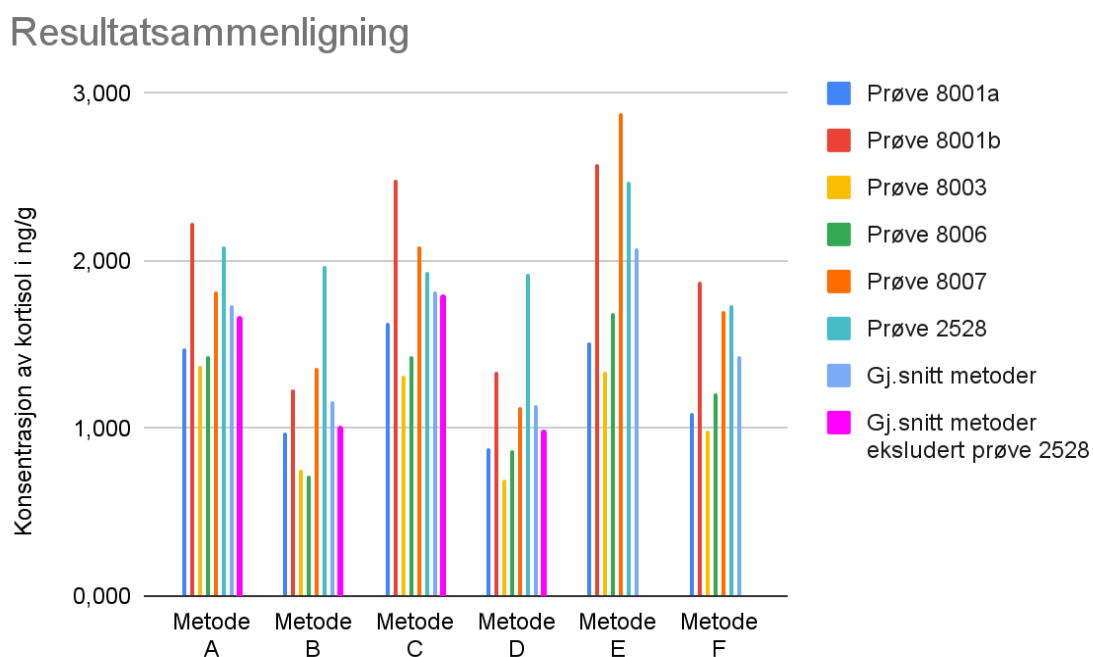
Standardkurven (figur 8) ble lagd som beskrevet under beregninger og statistiske metoder, med konsentrasjon oppgitt i mg/g på y-aksen og prosent for maksimal binding på x-aksen. Ved bruk av denne standardkurven som ble konstruert ut fra kjente konsentrasjoner. Vedlagt standardkurve ble benyttet konvertere absorpsjonsverdier til konsentrasjon av kortisol i prøvene.

Standardkurve



Figur 8: Standardkurve som viser konsentrasjon i forhold til maksimal binding av kortisol i ELISA platen som kom ferdig belagt.

3.3 Metodesammenligning



Figur 9: metodesammenligning, Resultater fra ELISA-analysen i søylediagram, der hver farge representerer en prøve og nivåene viser konsentrasjon av kortisol i ng/g, Metode oppsett er vist i metodedelen.

Til måling av konsentrasjon ble standardkurven benyttet. Bemerk det blir presentert et gjennomsnitt hvor prøven 2528 er ekskludert, ettersom den ikke egner seg til å sammenligne metoder med knusing, og uten knusing.

4. Diskusjon

4.1 Målet med oppgaven og forventninger

Målet med oppgaven var å svare på «Hvilken ekstraksjonsmetode gir høyest mengde ekstrahert kortisol?». Problemstillingen vår var basert på at det ikke eksisterer en standardisert metode for måling av kortisol i bovint hår. Bakgrunn for oppgaven baserte seg på vitenskapelige artikler, og det ble dannet antagelser og forventninger til resultat ut fra dette. Metodisk ble det brukt fem hårprøver fra ulike kyr og det ble gjennomført seks ulike metoder. Alle prøvene ble delt opp slik at en kunne teste alle metodene på alle hårprøvene.

Variabler som knusing, temperatur og inkubasjonstid ble testet på hver av prøvene. Målet var å finne ut hvilke faktorer som hadde den største innvirkningen på kortisol ekstraksjon, og dermed også den optimale metoden for å ekstrahere kortisol ut fra parameterne for de seks ulike metodene som vist i metodedelen. Av bakgrunn for forsøket var forventningen at temperatur, inkubasjonstid og knusing ville være de viktigste faktorene for kortisol ekstraksjon.

4.2 De ulike faktorenes innvirkning på ekstraheringen

4.2.1 Knusing av prøver

Metode A og D ble knust mens metode B og C var uknust. Prøvene fra “Sample 2528” er tatt vekk fra sammenligningen da disse prøvene kom ferdig knust. Det vil derfor ikke være hensiktsmessig å inkludere resultatene fra denne prøven for metoder hvor håret ikke skal være knust.

Av bakgrunns litteraturen ble det gjort noen forventninger og antagelser for hvordan knusingen ville påvirke resultatet. Ettersom de knuste prøvene har mindre totalvolum for hver bit med hår i prøven vil det medføre at kortisol ligger mer tilgjengelig i de knuste prøvene. I resultatet ble det observert at prøver som ble knust ved hjelp av «Tissuelyser II» samt ved sonikering hadde høyere kortisolnivåer enn ubehandlet prøver.

4.2.2 Sonikering

Resultatene viser til en trend hvor prøver som ble knust ved hjelp sonikering hadde mer kortisol enn prøver som bare gjennomgikk mekanisk knusing ved bruk av «Tissuelyser II». Endringen er stor nok til at vi ser på sonikering som et nødvendig steg for å ekstrahere hele mengden kortisol som befinner seg i håret. I bakgrunnen var det fryktet at sonikering muligens kunne ha en ødeleggende effekt på epitopene i kortisolet, dette viste seg å ikke være tilfellet får våre prøveresultater. Gitt dette vil sonikering være mer effektivt enn mekanisk knusing. Sonikering vil dermed være et nødvendig steg for optimal kortisol ekstraksjon.

4.2.3 Temperatur

Temperaturendringen fra 23°C til 50°C hadde en minimal innvirkning på mengden ekstrahert kortisol. Det ble observert en ~2% endring som er neglijerbar. Dersom en går ut ifra at temperatur for inkuberingen vil ha en effekt på reaksjonshastighet, vil dette foreslå at ved 18 timer har inkuberingen foregått over en lengre tid enn nødvendig. Prøven som inkuberer under 23°C vil ha en tregere reaksjonsfart enn prøven som inkuberer under 50°C. Siden begge disse metodene fikk ekstrahert en tilnærmet lik kortisol konsentrasjon, gir dette inntrykket av at en prøve som blir inkubert i 50°C potensielt kan ekstrahere kortisolet på under 18 timer.

4.2.4 Tid

Ut fra vårt begrensede forsøk hvor tiden for inkubasjon ble kortet ned, så vi en viss senkning i konsentrasjonen av ekstrahert kortisol. Prøver som ble inkubert i 18 timer hadde en høyere konsentrasjon med kortisol enn prøver som kun ble inkubert i 5 timer. Det ble ikke undersøkt hvorvidt en lengre inkubasjonstid vil påvirke resultatet grunnet tidligere begrensningene av tidsbruk på laboratoriet. Men ut fra resultatene vil lengre inkubasjonstid sannsynligvis gi en høyere kortisolkonsentrasjon.

4.2.5 Anvendelse av funn

Ut fra resultatene vil det være gunstig for laboratorier som skal ekstrahere kortisol fra hår benytter en form for knusing av håret. Funnene viser til en fordobling av ekstrahert kortisol dersom en pulveriserer håret før det ekstraheres ut via metanol. En vil derfor få et mer representativt bilde over den reelle mengden kortisol som er lagret i håret. Dersom det er mulig, burde laboratoriet også benytte sonikering av prøvene, for å ekstrahere mest mulig av den lagrede kortisol mengden.

Av de seks metodene vi benyttet i dette forsøket, var det metode E som fikk den høyeste kortisol konsentrasjonen i gjennomsnitt. Ut ifra problemstillingen vil det derfor være denne metoden som er den mest optimale av de seks metodene som ble testet.

4.3 Styrker og svakheter med oppgaven

Dette er en originalartikkel som tar sikte på å svare på spørsmålet «Hvilken ekstraksjonsmetode gir høyest mengde ekstrahert kortisol?». Dette medfører at vi i stor grad baserer oss på egne innsamlede data, og også vår egen bearbeiding og tolkning av data. Gitt begrenset med tidligere artikler vil resultatene og konklusjon konsekvent være avhengig av at vi har foretatt en korrekt tolkning av resultatet og tatt hensyn til de variablene som kan påvirke resultatet. Nedenfor er disse nevnt og beskrevet. Videre forskning vil være nødvendig for å kunne validere våre funn.

Kontaminasjon og svinn av prøvemateriale av prøvene er de mest aktuelle feilkildene ved dette forsøket. Ved knusing og overføring av prøvemateriale ble det observert at hårstrå festet seg til røret, det ble grundig vasket med metanol for å kunne overføre mest mulig, men svinn vil fremdeles kunne være en faktor som kan påvirke resultatene. Kontaminasjon er en aktuell feilkilde da eksempelvis gjenværende mikroskopiske hårstrå i eppendorfrørene kan gi utslag ved ELISA.

Inkubasjonstiden som ble satt viser kun forskjellen mellom 18 timer og 5 timer av praktiske årsaker. Ideelt sett skulle vi også sett på endringer mellom 18 timer og 72 timer, for å kunne se en eventuell endring hvis en øker inkubasjonstiden. Av litteraturen ble det ikke funnet noen forsøk som brukte en inkubasjonstid som var under 18 timer og vi ville se hvilken innvirkning dette hadde.

Forsøkene som ble utført var dermed ikke satt opp på en slik måte at det ble en grundig testing for optimalisering av tid. Fem av de seks ulike metodene som ble satt opp inkuberte i den samme mengden tid, en tid vi ikke vet om er optimal eller ikke. Men av resultatet vil resultatet for 18 timer være fordelaktig om en sammenligner med resultatet som ble gjort med 5 timer.

Informasjon tilgjengelig om hårstråene og innsamlingsmetoden til hårstråene er og begrenset, variabler som hårtap, alder på kyr, tilstand ved prøvetaking kan ha drastiske innvirkning på

resultatet. Vårt forsøk baserer seg i stor grad på sammenligning mellom metoder og hvordan vi kan kunne ekstrahere mest mulig kortisol fra selve håret, og ikke hvilke faktorer som vil påvirke kortisol konsentrasjonen in vitro, eksempelvis sykdom og alder (3).

4.4 Sammenligning med tidligere funn

I dette forsøket ble det observert høyere kortisol konsentrasjon i mørkt hår enn i lyst hår, henholdsvis 2528A og 2528B, dette var prøver fra samme ku. I tidligere vitenskapelige artikler som har sett på forskjellene mellom lyst og mørkt, hår har det vært en tydelig trend at lysere hår har en høyere konsentrasjon enn prøver med mørkt hår (10).

I vårt forsøk ble det brukt isopropanol til vasking av håret. Forskning på grizzlybjørn viser til tendenser hvor bruk av isopropanol vil måle høyere kortisol konsentrasjoner, enn ved bruk av metanol i mørkt hår. I tillegg er det ovenfor nevnt at mulige feilkilder som eksempelvis kontaminasjon og svinn kan ha hatt en betydelig innvirkning på resultatet mellom lyst og mørkt hår. Det blir vanskelig å kunne konkludere da forskningen som viser sammenhengen er basert på forskning på hår fra grizzlybjørn mens i dette forsøket ble det benyttet bovint hår. Det er uvisst i hvilken grad resultatene mellom grizzlybjørn hår og bovint hår kan brukes mellom hverandre. Videre forskning må til for å kunne konkludere (16).

4.5 Forslag til videre forskning

I dette forsøket ble det forsket på ulike faktorerers innvirkning på total mengde ekstrahert kortisol ved ekstrahering fra hår. Våre variabler er bare en liten del av hva som kan forskes på her og det er enkelte begrensninger ved vårt forsøk. Ved videre forskning vil det være gunstig å kunne se på flere variabler enn det som ble utført. Det er en rekke faktorer som kan videre utredes for deres innvirkning på metodens resultater.

Forslag til videre forskning:

- Videre forsøk for å se om hvordan antall steg for knuste prøver kan kuttes ned. Vårt forsøk involverte flere steg som kan kuttes ut for prøver hvor håret ikke skal knuses. Et eget forsøk for å se om svinn fra de ekstra stegene har en betydelig endring på prøvesvar kan være fordelaktig for en reell metodesammenligning.
- Mer uniform knuseprosess. Våre knuste prøver var ikke knust til like stor grad, sannsynligvis som et resultat av for lange hår segmenter i knuseren
- Teste for endring i resultater med og uten oscillerende vannbad

- Omfattende testing av ulike inkubasjonstider.
- Videre forskning må til for å hvilken innvirkning metanol mot Isopropanol ved vasking har på resultatet av prøvene.
- Ettersom forskning på inkubasjonstid var begrenset for dette forsøket, er forskning for optimalisering av inkubasjonstid noe som kan være nyttig for videre optimalisering av kortisolekstrahering fra hår. Som nevnt i diskusjonsdelen, mistenker vi at det er mulig å forkorte ned inkuberingstiden videre ned fra 18 timer. Det kan også være gunstig å validere inkuberingstiden 18 timer, ettersom vi ikke kan utelukke at dette er en for kort inkuberingstid.

5. Konklusjon

Ut fra problemstillingen: «Hvilken ekstraksjonsmetode gir høyest mengde ekstrahert kortisol?», kan det konkluderes med at knusing av hår og inkubasjon vil føre til en betydelig endring i hvor mye kortisol som kan ekstraheres i løpet av 18 timer, temperatur vil i større grad ha en mindre innvirkning. Det konkluderes med at metode E var den metoden som ga høyest mengde målt kortisol, og var av metodene gjennomført den mest optimale. Det konkluderes også at det må gjøres mer forskning, ettersom denne populasjonen ikke er stor nok til å si med sikkerhet at disse metodene vil være representativt for alle typer hår. Det er derfor nødvendig med videre forskning for å validere funnene.

Referanser:

1. Stubsoen SM, Sorheim K, Chincarini M, Bohlin J, Brunberg E, Fuchs B, et al. Exploring hair cortisone concentration as a novel tool to assess chronic stress in sheep with tick-borne fever. *Small Ruminant Res.* 2018;164:110-9.
2. Salaberger T, Millard M, El Makarem S, Mostl E, Grunberger V, Krametter-Frotscher R, et al. Influence of external factors on hair cortisol concentrations. *Gen Comp Endocrinol.* 2016;233:73-8.
3. Sharma A, Umapathy G, Kumar V, Phillips CJC. Hair Cortisol in Sheltered Cows and Its Association with Other Welfare Indicators. *Animals.* 2019;9(5):248.
4. Hva er dyrevelferd? Mattilsynet: Mattilsynet; 2013 [oppdatert 2016-02-23; hentet 2021-05-16. Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrevelferd/rad_om_dyrevelferd/hva_er_dyrevelferd.5017.
5. Cortisol: Coast to Coast Compounding; [2021-05-11]. Tilgjengelig fra: <https://ctocrx.com/cortisol/>.
6. Martini FH, Nath JL, Bartholomew EF. *Fundamentals of Anatomy & Physiology.* 11. utg; Pearson Education; 2018. 1300 s.
7. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. *Menneskekroppen.* 3. utg. Norge: Gyldendal Akademisk; 2018. 666 s.
8. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology.* 4. utg. USA: Garland Publishing Inc; 2014 17.02.14. 864 s.
9. Fosse R. Epigenetiske endringer ved alvorlige psykiske lidelser Helsebiblioteket.no: PsykNytt; 2018 [2021-05-25]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/psykisk-helse/aktuelt/epigenetiske-endringer-ved-alvorlige-psykiske-lidelser-tidsskrift-for-norsk-psykologforening>.
10. Burnett TA, Madureira AML, Silper BF, Nadalin A, Tahmasbi A, Veira DM, et al. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of dairy science.* 2014;97(12):7685-90.
11. González-de-la-Vara MdR, Valdez RA, Lemus-Ramirez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can J Vet Res.* 2011;75(3):216-21.
12. What is the Role of the Hair Follicle? : Elithair; [2021-05-11]. Tilgjengelig fra: <https://elithairtransplant.com/hair-follicle/>.
13. Baier F, Grandin T, Engle T, Edwards-Callaway L. Evaluation of Hair Characteristics and Animal Age on the Impact of Hair Cortisol Concentration in Feedlot Steers. *Front Vet Sci.* 2019;6:323-.
14. Brady JE. *Generell kjemi.* 2. utg. Norge: Tapir akademisk forlag; 2004.
15. Key JA. Factors that Affect the Rate of Reactions: BCcampus Open Publishing; [hentet 2021 22.05]. Tilgjengelig fra: <https://opentextbc.ca/introductorychemistry/chapter/factors-that-affect-the-rate-of-reactions-2/>.
16. Kroshko T, Kapronczai L, Cattet MRL, Macbeth BJ, Stenhouse GB, Obbard ME, et al. Comparison of methanol and isopropanol as wash solvents for determination of hair cortisol concentration in grizzly bears and polar bears. *MethodsX.* 2017;4:68-75.
17. Hydrocortisone [Internet]. NCBI. [cited 2021-05-12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrocortisone#section=Experimental-Properties&fullscreen=true>.
18. Types of Solvent Evaporators – An Overview: BioChromato; 2018 [2021-05-15]. Tilgjengelig fra: <https://biochromato.com/types-of-solvent-evaporators-an-overview/>.

19. Suslick KS. Sonochemistry. *Science*. 1990;247(4949):1439-45.
20. Cortisol ELISA Kit: NEOGEN; [2021-05-20]. Tilgjengelig fra: <https://www.neogen.com/categories/life-science-research/cortisol-elisa-kit/?highlight=WzUwXQ==>.
21. ELISA: Types of ELISA: BIO-RAD; [2021-05-19]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>.
22. Endokrinologi: UiO - Institutt for Biovitenskap; 2019 [oppdatert 2020-05-07/2021-05-16]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/e/endokrinologi.html>.

Vedlegg 1: Tabeller for semimanuell utregninger

Tabell 1: Råverdier av prøvenes absorbans i duplikat fra ELISA for videre utregning.

	Standard		Metode A		Metode B		Metode C		Metode D		Metode E		Metode F		Prøve
S0	1,87 8	1,86 6	0,776	0,90 9	1,03 7	1,03 0	0,85 0	0,75 5	1,06 4	1,09 9	0,82 9	0,83 5	0,91 3	1,03 8	800 1a
S1	1,51 9	1,54 3	0,644	0,73 3	0,89 3	0,95 1	0,62 9	0,67 7	0,86 3	0,91 0	0,61 2	0,67 0	0,75 8	0,74 1	800 1b
S2	1,18 5	1,10 8	0,835	0,91 4	1,11 2	1,23 7	0,82 5	0,96 2	1,14 6	1,28 7	0,88 4	0,88 4	0,99 3	1,06 3	800 3
S3	1,00 9	0,93 6	0,856	0,85 6	1,16 3	1,24 3	0,81 7	0,89 1	1,06 4	1,11 5	0,78 2	0,79 6	0,90 5	0,95 4	800 6
S4	0,74 3	0,70 8	0,738	0,78 3	0,83 0	0,92 1	0,66 8	0,75 6	0,94 9	0,97 1	0,59 0	0,62 4	0,76 0	0,81 2	800 7
S5	0,46 9	0,42 2	0,647	0,77 7	0,69 5	0,76 9	0,67 7	0,80 0	0,71 7	0,76 4	0,64 2	0,66 6	0,75 0	0,80 7	252 8
S6	0,31 3	0,29 2													
S7	0,13 1	0,13 2													

Tabell 2: Gjennomsnitt av ABS for standardene gitt som BX-verdi, beregning gjennom google regneark

B0	1,872
B1	1,531
B2	1,146
B3	0,973
B4	0,725
B5	0,446
B6	0,303
B7	0,131

Tabell 3: Sammenheng %B/B0 verdier og konsentrasjon av kortisol standarder, S1-S7, for standardkurven vist i figur 2.

%B/B0	[Kortisol] i ng/ml
81,78	0,04
61,23	0,10
51,95	0,20
38,76	0,40
23,80	1,00
16,18	2,00
7,01	10,00

Tabell 4: Gjennomsnitt av duplikatene for hver prøve

Gjennomsnitt ABS						
Metode A	Metode B	Metode C	Metode D	Metode E	Metode F	Prøve
0,842	1,033	0,802	1,081	0,832	0,976	8001a
0,689	0,922	0,653	0,886	0,641	0,750	8001b
0,875	1,174	0,894	1,217	0,884	1,028	8003
0,856	1,203	0,854	1,089	0,789	0,930	8006
0,760	0,876	0,712	0,960	0,607	0,786	8007
0,712	0,732	0,739	0,740	0,654	0,778	2528

Tabell 5: %B/B0 verdier av prøvene, beregnet gjennom google regneark

	%B/B0 prøver					
Prøve	Metode A	Metode B	Metode C	Metode D	Metode E	Metode F
8001a	44,99	55,21	42,87	57,77	44,45	52,11
8001b	36,78	49,26	34,89	47,35	34,26	40,05
8003	46,72	62,74	47,75	64,99	47,22	54,93
8006	45,73	64,27	45,63	58,20	42,16	49,66
8007	40,61	46,78	38,04	51,28	32,42	41,98
2528	38,03	39,09	39,46	39,56	34,94	41,57

Tabell 6: Konsentrasjon av kortisol i prøver gitt i ng/g, beregnet gjennom google regneark

	[Kortisol] prøver ng/g X2X3(fortynningsfaktor)					
Prøve	Metode A	Metode B	Metode C	Metode D	Metode E	Metode F
Prøve 8001a	1,479	0,974	1,632	0,888	1,516	1,096
Prøve 8001b	2,231	1,229	2,484	1,333	2,578	1,875
Prøve 8003	1,369	0,750	1,310	0,698	1,340	0,984
Prøve 8006	1,431	0,714	1,437	0,875	1,689	1,209
Prøve 8007	1,822	1,366	2,082	1,133	2,886	1,703
Prøve 2528	2,084	1,970	1,933	1,923	2,477	1,738
Gj.snitt metoder	1,736	1,167	1,813	1,142	2,081	1,434
Gj.snitt metoder ekskludert prøve 2528	1,666	1,007	1,789	0,985	ikke relevant	ikke relevant

Vedlegg 2: Oversikt over prøvers plassering på mikroplaten ved ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S ₀	S _a	1 _a	1 _b	2 _a	2 _b	3 _a	3 _b	4 _a	4 _b	5 _a	5 _b
B	S ₁	S _a	2 _a	2 _b	3 _a	3 _b	4 _a	4 _b	5 _a	5 _b	6 _a	6 _b
C	S ₂	S _a	3 _a	3 _b	4 _a	4 _b	5 _a	5 _b	6 _a	6 _b	7 _a	7 _b
D	S ₃	S _a	4 _a	4 _b	5 _a	5 _b	6 _a	6 _b	7 _a	7 _b	8 _a	8 _b
E	S ₄	S _a	5 _a	5 _b	6 _a	6 _b	7 _a	7 _b	8 _a	8 _b	9 _a	9 _b
F	S ₅	S _a	6 _a	6 _b	7 _a	7 _b	8 _a	8 _b	9 _a	9 _b	10 _a	10 _b
G	S ₆	S _a	31 _a	31 _b	33 _a	33 _b	35 _a	35 _b				
H	S ₇	S _a	32 _a	32 _b	34 _a	34 _b	36 _a	36 _b				

metode 1
 metode 2
 metode 3
 metode 4
 metode 5
 metode 6

metode nr. for dx
 ulik registrering
 nummerene

Ex
 med standard 1 2 3 4 5

6

Vedlegg 3: Oversikt over nummerering av prøver og metode i oppsett på ELISA-mikroplate

Prøvenummer	Ekstraheringsnummer	Metode
8001A	1	A
8001B	2	
8003	3	
8006	4	
8007	5	
2528	6	

8001A	7	B
8001B	8	
8003	9	
8006	10	
8007	11	
2528	12	

8001A	13	C
8001B	14	
8003	15	
8006	16	
8007	17	
2528	18	

8001A	19	D
8001B	20	
8003	21	
8006	22	
8007	23	
2528	24	

8001A	25	E
8001B	26	
8003	27	
8006	28	
8007	29	
2528	30	

8001A	31	F
8001B	32	
8003	33	
8006	34	
8007	35	
2528	36	

Vedlegg 4:

Utregning av forskjeller mellom de ulike metodene i prosent

For å se på den statistiske forskjellen mellom de ulike metodene, regnet vi ut forskjellene i prosent, og benytter denne prosentandelen som veiledende gjennomsnittlig forskjell mellom metoder. Tallene ble hentet fra [tabell med verdier]

Denne formelen for reduksjon i prosent ble brukt: $100\% - 100\% \cdot \frac{\text{konsentrasjon 2}}{\text{konsentrasjon 1}}$ Hvor

konsentrasjon 1 er den som skal sammenlignes opp mot konsentrasjon 2

Konsentrasjoner i gjennomsnitt:

Metode	A	B	C	D	E	F
Snitt	1,947	1,185	2,047	1,146	2,365	1,535
Korrigert snitt	1,849	0,972	2,010	0,941	Ikke relevant	Ikke relevant

A+C til B+D

$$100\% - 100\% \cdot \frac{0,972+0,941}{1,849+2,010} = 50,43\% \text{ reduksjon}$$

Her ble det korrigerede snittet brukt, ettersom det testes for endring ved testing av knusing.

Verdiene fra prøven som kom ferdig knust (2528) ble trukket fra denne utregningen

A+B til C+D

$$100\% - 100\% \cdot \frac{2,047+1,146}{1,947+1,185} = -1,948\% \text{ reduksjon, en negativ reduksjon vil da bety en økning.}$$

A til E

$$100\% - 100\% \cdot \frac{2,365}{1,947} = -21,47\% \text{ reduksjon, en negativ reduksjon vil da bety en økning.}$$

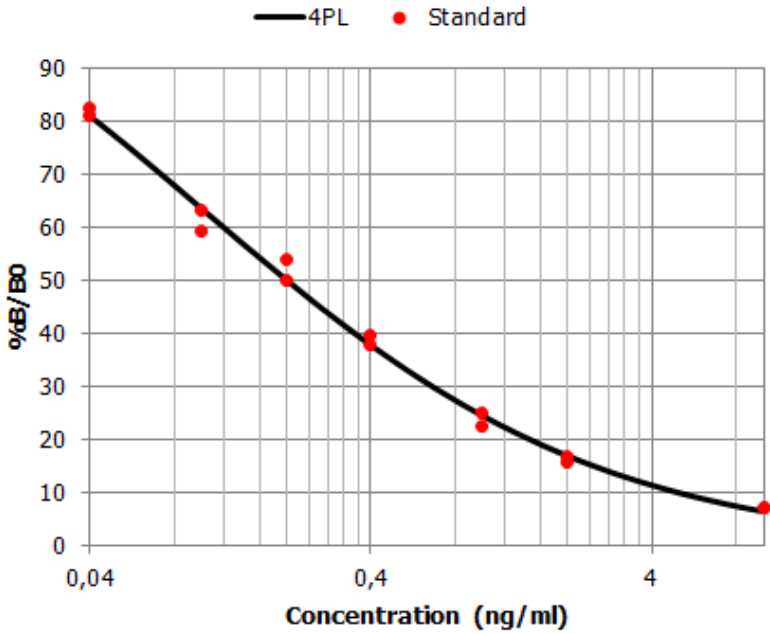
E til F

$$100\% - 100\% \cdot \frac{1,535}{2,365} = 35,10\% \text{ reduksjon}$$

Vedlegg 5: kortisolverdier målt i ng/g hår, uthentet fra resultatene som ble utregnet via MyAssays.com

	A	B	C	D	E	F
Ku 8001A	1,625	0,9219	1,812	0,8089	1,638	1,102
Ku 8001B	2,595	1,265	2,893	1,4	3,018	2,106
Ku 8003	1,456	0,636	1,398	0,5692	1,406	0,9401
Ku 8006	1,526	0,5833	1,545	0,7923	1,864	1,237
Ku 8007	2,043	1,455	2,402	1,133	3,389	1,889
Ku 2528	2,439	2,246	2,231	2,174	2,875	1,936

Vedlegg 6: Resultater fra MyAssays.com



a	-0,7123
b	-0,6149
c	0,1023
d	127
MSE	3,25
R ²	0,9947
SS	45,49
SYX	2,133

Calibrator	Conc. (ng/ml)	Wells	%B/B0	SEM	Backfit	Recovery %
Standard1	0,04	B1	81,1	0,646	0,03993	99,82
		B2	82,4		0,03716	92,89
Standard2	0,1	C1	63,3	2,06	0,1016	101,6
		C2	59,2		0,1254	125,4
Standard3	0,2	D1	53,9	1,95	0,1644	82,21
		D2	50		0,2018	100,9
Standard4	0,4	E1	39,7	0,948	0,358	89,51
		E2	37,8		0,4009	100,2
Standard5	1	F1	25,1	1,25	0,9584	95,84
		F2	22,6		1,176	117,6
Standard6	2	G1	16,7	0,558	2,052	102,6
		G2	15,6		2,322	116,1
Standard7	10	H1	6,98	0,024	8,918	89,18
		H2	7,03		8,822	88,22

	Sample	Dilution	Wells	Raw	%B/B0	Conc .	Conc .	%CV	SD	SEM
--	--------	----------	-------	-----	-------	--------	--------	-----	----	-----

							(Average)			
1	6	A3	0,776	45	1,941	1,625	27,5	0,447	0,316	
		A4	0,909		1,309					
2	6	B3	0,644	36,8	2,974	2,595	20,6	0,535	0,378	
		B4	0,733		2,217					
3	6	C3	0,835	46,7	1,624	1,456	16,3	0,237	0,168	
		C4	0,914		1,289					
4	6	D3	0,856	45,7	1,525	1,526	0,104	0,001	0,001	
		D4	0,856		1,527					59
5	6	E3	0,738	40,6	2,184	2,043	9,77	0,199	0,141	
		E4	0,783		1,902					
6	6	F3	0,647	38	2,944	2,439	29,3	0,714	0,505	
		F4	0,777		1,934					
31	6	G3	0,913	52,1	1,293	1,102	24,5	0,27	0,191	
		G4	1,04		0,910					6
32	6	H3	0,758	40	2,05	2,106	3,81	0,080	0,056	
		H4	0,741		2,163					2
7	6	A5	1,04	55,2	0,913	0,921	1,35	0,012	0,008	
					19			4	79	

		A6	1,03		0,930 7					
8	6	B5	0,893	49,3	1,37	1,265	11,7	0,148	0,105	
		B6	0,951		1,16					
9	6	C5	1,11	62,7	0,742 7	0,636	23,7	0,151	0,107	
		C6	1,24		0,529 3					
10	6	D5	1,16	64,3	0,646 3	0,583 3	15,3	0,089 1	0,063	
		D6	1,24		0,520 3					
11	6	E5	0,83	46,8	1,646	1,455	18,6	0,271	0,191	
		E6	0,921		1,263					
12	6	F5	0,695	39,1	2,508	2,246	16,5	0,371	0,262	
		F6	0,769		1,984					
33	6	G5	0,993	54,9	1,031	0,940 1	13,7	0,129	0,091 3	
		G6	1,06		0,848 8					
34	6	H5	0,905	49,7	1,322	1,237	9,71	0,12	0,084 9	
		H6	0,954		1,152					
13	6	A7	0,85	42,9	1,551	1,812	20,4	0,369	0,261	
		A8	0,755		2,074					

14	6	B7	0,629	34,9	3,127	2,893	11,4	0,331	0,234
		B8	0,677		2,659				
15	6	C7	0,825	47,7	1,672	1,398	27,7	0,388	0,274
		C8	0,962		1,124				
16	6	D7	0,817	45,6	1,714	1,545	15,4	0,239	0,169
		D8	0,891		1,376				
17	6	E7	0,668	38	2,741	2,402	20	0,48	0,34
		E8	0,756		2,062				
18	6	F7	0,677	39,5	2,659	2,231	27,1	0,605	0,428
		F8	0,8		1,803				
35	6	G7	0,76	42	2,04	1,889	11,2	0,212	0,15
		G8	0,812		1,739				
36	6	H7	0,75	41,6	2,106	1,936	12,4	0,241	0,17
		H8	0,807		1,766				
19	6	A9	1,06	57,8	0,847	0,808	6,78	0,054	0,038
		A10	1,1		0,770				
20	6	B9	0,863	47,3	1,496	1,4	9,7	0,136	0,096
		B10	0,91		1,304				
21	6	C9	1,15	65	0,677	0,569	26,9	0,153	0,108

		C10	1,29		0,460 9					
22	6	D9	1,06	58,2	0,847	0,792 3	9,76	0,077 3	0,054 7	
		D10	1,11		0,737 6					
23	6	E9	0,949	51,3	1,167	1,133	4,34	0,049 2	0,034 8	
		E10	0,971		1,098					
24	6	F9	0,717	39,6	2,337	2,174	10,6	0,23	0,162	
		F10	0,764		2,012					
Unkn own3 1	6	G9	0,048 6	2,72	223,8	210,7	8,81	18,6	13,1	
		G10	0,053 4		197,6					
Unkn own3 2	6	H9	0,049	2,63	221,4	220,5	0,567	1,25	0,884	
		H10	0,049 3		219,7					
25	6	A11	0,829	44,5	1,651	1,638	1,16	0,019	0,013 4	
		A12	0,835		1,624					
26	6	B11	0,612	34,3	3,315	3,018	13,9	0,421	0,298	
		B12	0,67		2,72					
27	6	C11	0,884	47,2	1,406	1,406	0,041	0,000 577	0,000 408	
		C12	0,884		1,407					
28	6	D11	0,782	42,2	1,906	1,864	3,15			

		D12	0,796		1,823			0,058 7	0,041 5
29	6	E11	0,59	32,4	3,596	3,389	8,63	0,292	0,207
		E12	0,624		3,182				
30	6	F11	0,642	34,9	2,992	2,875	5,76	0,166	0,117
		F12	0,666		2,758				
Unkn own3 9	6	G11	0,053	2,93	199,6	190,9	6,42	12,3	8,67
		G12	0,056 7		182,2				
Unkn own4 0	6	H11	0,048 7	2,65	223,2	217,7	3,56	7,76	5,48
		H12	0,050 6		212,2				
B0		A1	1,88	100	0,011 74	0,012 05	3,6	0,000 434	0,000 307
		A2	1,87		0,012 36				

Brønnene markert med gul skrift hadde ikke prøver i seg, og blir derfor registrert som prøver utenfor måeområdet.

Vedlegg 7: NEOGENs prosedyre for ELISA Kortisolkit



Cortisol ELISA Kit Instructions

Please read all instructions carefully before beginning this assay **PRODUCT**
#402710

For Research Use Only

Store kit at 4°C at all times

Do not freeze kit components

DESCRIPTION

Cortisol, or hydrocortisone, is the primary corticosteroid secreted by the adrenal cortex. Cortisol is synthesized from cholesterol and may be found in the blood as free Cortisol or bound to corticosteroid-binding globulin. The release of Cortisol is controlled by ACTH, which is produced in the anterior pituitary. Plasma Cortisol levels are highest in the morning and decrease throughout the day. Cortisol concentration in the plasma also elevates in response to stress. Cortisol has an antiinflammatory effect and aids in carbohydrate metabolism, renal function and the promotion of gluconeogenesis.

Measurement of plasma Cortisol levels is useful in diagnosing conditions related to functions of the adrenal cortex, including Cushing's syndrome (hypercortisolism), Addison's disease (hypocortisolism) and adrenal tumors. Abnormal Cortisol levels may

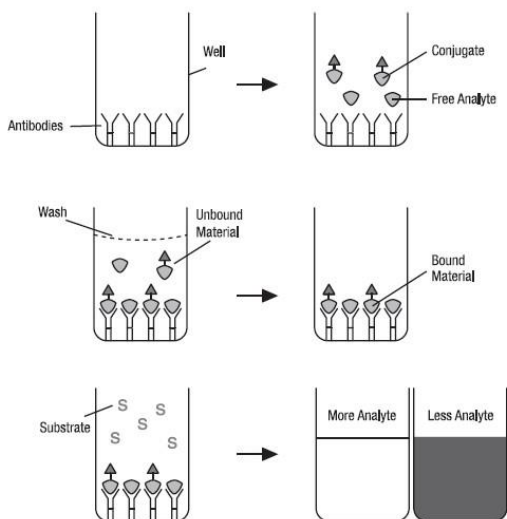
also possibly be linked to prostate cancer, depression, and schizophrenia.

PRINCIPLE OF ASSAY

This is an ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) for the quantitative analysis of Cortisol levels in biological fluid. This test kit operates on the basis of competition between the enzyme conjugate and the Cortisol in the sample for a limited number of binding sites on the antibody coated plate.

The sample or standard solution is first added to the microplate. Next, the diluted enzyme conjugate is added and the mixture is shaken and incubated at room temperature for one hour. During the incubation, competition for binding sites is taking place. The plate is then washed removing all the unbound material. The bound enzyme conjugate is detected by the addition of substrate which generates an optimal color after 30 minutes. Quantitative test results may be obtained by measuring and comparing the absorbance reading of the wells of the samples against the standards with a microplate reader at 650 nm. The extent of color development is inversely proportional to the amount of Cortisol in the sample or standard. For example, the absence of Cortisol in the sample will result in a bright blue color, whereas the presence of Cortisol will result in decreased or no color development.

PRINCIPLE OF ASSAY (continued)



MATERIALS PROVIDED

1. EIA BUFFER: 30 mL. Provided to dilute enzyme conjugate and Cortisol standards.
2. WASH BUFFER (10X): 20 mL. Dilute 10-fold with deionized water. Diluted wash buffer is used to wash all unbound enzyme conjugate, samples and standards from the plate after the one hour incubation.
3. K-BLUE SUBSTRATE: 20 mL. Stabilized 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) plus Hydrogen Peroxide (H_2O_2) in a single bottle. It is used to develop the color in the wells after they have been washed. Keep substrate refrigerated. LIGHT SENSITIVE.
4. EXTRACTION BUFFER (5X): 30 mL. Dilute 5-fold with deionized water. This buffer is used for diluting extracted and non-extracted samples.
5. CORTISOL ENZYME CONJUGATE: 150 μ L. Cortisol horseradish peroxidase concentrate. Blue capped vial.
6. CORTISOL STANDARD: 100 μ L. Cortisol standard provided at the concentration of 1 μ g/mL in methanol. Green capped vial.

7. CORTISOL ANTIBODY-COATED MICROPLATE: A 96 well Costar™ microplate with anti-Cortisol rabbit antibody precoated on each well. The plate is ready for use as is. DO NOT WASH!

MATERIALS NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. 300 mL deionized water to dilute wash buffer and extraction buffer.
2. Precision pipettes that range from 10 μ L-1000 μ L and disposable tips.

NOTE: If all or several strips are to be used at one time, it is suggested that a multichannel pipette be used.

3. Clean test tubes used to dilute the standards and conjugate.
4. Graduated cylinders to dilute and mix wash buffer and extraction buffer.
5. Microplate reader with 650 nm filter.
6. Plate cover or plastic film to cover plate during incubation.

OPTIONAL MATERIALS:

7. 1 N HCl or Neogen's Red Stop Solution.
8. Microplate shaker.

If performing an extraction on samples, the following will be required:

9. Ethyl ether or ethyl acetate
10. Nitrogen gas
11. Vortex

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. DO NOT use components beyond expiration date.
2. DO NOT mix any reagents or components of this kit with any reagents or components of any other kit. This kit is designed to work properly as provided.
3. DO NOT pipette reagents by mouth.
4. Always pour substrate out of the bottle into a clean test tube - DO NOT pipette out of the bottle. If the pipette tip is unclean this could result in contamination of the substrate.

5. All specimens should be considered potentially infectious. Exercise proper handling precautions.
6. DO NOT smoke, eat or drink in areas where specimens or reagents are being handled.
7. Use aseptic technique when opening and removing reagents from vials and bottles.
8. Keep plate covered except when adding reagents, washing or reading.
9. Kit components should be refrigerated at all times when not in use.

PROCEDURAL NOTES

1. It is not necessary to allow reagents to warm to room temperature before use.
2. Desiccant bag must remain in foil pouch with unused strips. Keep zip-lock pouch sealed when not in use to maintain a dry environment.
3. Always use new pipette tips to pipette buffer, enzyme conjugate, standards and samples.
4. Before pipetting a reagent, rinse the pipette tip three times with that reagent (i.e. fill the tip with the desired amount of reagent and dispense back into the same vial - repeat 2 times). Now the tip is properly rinsed and ready to dispense the reagent into your well or test tube.
5. When pipetting into the wells, DO NOT allow the pipette tip to touch the inside of the well, or any of the reagents already in the well. This can result in cross contamination.
6. Standards and samples should be assayed in duplicate.
7. To quantitate, always run samples alongside a standard curve. If testing a sample that is not extracted, standards should be diluted in the same type of medium being tested. This medium should be known to be negative.
8. Gently mix specimens and reagents before use. Avoid vigorous agitation.
9. When using only partial amounts of a kit, it is recommended to transfer the appropriate volume of each reagent to a clean vessel for

repeated dispensing. This will reduce reagent contamination caused by repeated sampling from the original container.

10. The enzyme conjugate is most stable in its concentrated form. Dilute only the volume necessary for the amount of strips currently being used.
11. Before taking an absorbance reading wipe the outside bottom of the wells with a lint-free wiper to remove dust and fingerprints.
12. Before opening the enzyme conjugate and standard vial, tap vial in an upright position to remove any liquid in the cap.

SAMPLE PREPARATION

This assay is non-specifies specific. Usually, urine and tissue culture supernatant can be assayed directly by diluting them with the diluted extraction buffer. Plasma and most other mediums will need to be extracted.

EXTRACTION OF CORTISOL

1. Pipette 100 μL of plasma into a glass tube (10x75 mm) and add 1 mL of ethyl ether.
2. Vortex the tube for 30 seconds and then allow the phases to separate.
3. Transfer the organic phase into a clean glass tube and evaporate the solvent with a stream of N_2 .
4. Dissolve the residue in 100 μL of diluted extraction buffer.
5. Dilute the extract 100 fold by adding 10 μL of the above extract into 990 μL of diluted extraction buffer.
6. Vortex and assay 50 μL in duplicates.
7. The values obtained are multiplied by 100 to give final ng/mL concentrations. If additional dilution is necessary, values must be multiplied by the additional dilution factor in order to calculate final ng/mL concentration.
8. If the concentration is higher than the high range of the standard curve, the samples in #6 need to be further diluted and reassayed.

NOTE: Extraction buffer must be diluted 5-fold with deionized water before use. Any precipitant present must be brought into solution before dilution.

TEST PROCEDURES

1. Prepare standards as follows:

Standard	Preparation
A	stock solution 1 $\mu\text{g/mL}$ (Provided in green capped vial)
B	take 20 μL of A, add to 980 μL of EIA buffer and mix=20 ng/mL
C	take 200 μL of B, add to 1.8 mL of EIA buffer and mix=2 ng/mL
D	take 200 μL of C, add to 1.8 mL of EIA buffer and mix=0.2 ng/mL

Continue standard preparation following Scheme I.

SCHEME I

Standards	ng/mL	EIA buffer (μL added)	B standard μL	C standard μL	D standard μL
S ₀	0	as is	-	-	-
S ₁	0.04	800	-	-	200
S ₂	0.1	500	-	-	500
S ₃	0.2	-	-	-	as is
S ₄	0.4	800	-	200	-
S ₅	1	500	-	500	-
S ₆	2	-	-	as is	-
S ₇	10	500	500	-	-

- Determine the number of wells to be used.
- Dilute the Cortisol enzyme conjugate. Add 1 μL of enzyme conjugate into 50 μL total volume of EIA buffer for each well assayed. For the whole plate, add 110 μL of the enzyme conjugate into 5.5 mL total volume of EIA buffer. Mix the solution thoroughly.
- Add 50 μL of standards (S) or unknown (U) (some samples may require diluting) to the appropriate wells in duplicate. See Scheme II for suggested template design.
- Add 50 μL of the diluted enzyme conjugate to each well. Use 8-channel pipette or 12-channel pipette for rapid addition.
- Mix by shaking plate gently. A microplate shaker may be used.
- Cover plate with plastic film or plate cover and incubate at room temperature for one hour. NOTE: Keep plate away from drafts and temperature fluctuations.
- Dilute concentrated wash buffer with deionized water (i.e. 20 mL of wash buffer plus 180 mL of deionized water). Mix thoroughly.
- After incubation, dump out the contents of the plate. Tap out contents thoroughly on a clean lint-free towel.

10. Wash each well with 300 μL of the diluted wash buffer. Repeat for a total of three washings. An automated plate washer can be used, however, increase wash cycles from three to five.
11. Add 150 μL of substrate to each well. Use multichannel pipette for best results. Mix by shaking plate gently.
12. Incubate at room temperature for 30 minutes.
13. Gently shake plate before taking a reading to ensure uniform color throughout each well.
14. Plate is read in a microplate reader at 650 nm. If a dual wavelength is used, set W_1 at 650 nm and W_2 at 490 nm.
15. If accounting for substrate background, use 2 to 8 wells as blanks with only substrate in the wells (150 μL /well). Subtract the average of these absorbance values from the absorbance values of the wells being assayed.

NOTE: Some microplate readers can be programmed to do these subtractions automatically when reading the plate.

Consult your instrument manual.

OPTIONAL TEST PROCEDURES

16. Add 50-100 μL of 1 N HCl or Neogen's Red Stop Solution to each well to stop enzyme reaction.
17. Read plate at 450 nm, if 1N HCl solution was used. Read plate at 650 nm, if Neogen's Red Stop Solution was used. 18. Plot the standard curve and estimate the concentrations of the samples from the curve. See "CALCULATIONS."

NOTE: Absorbance readings will approximately double when stopped with acid. If absorbance readings are too high for measuring with your microplate reader, decrease the substrate incubation by approximately 10 minutes but no more than 15 minutes.

SCHEME II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	s0	s0	v1	v1	v9	v9	v17	v17	v25	v25	v33	v33

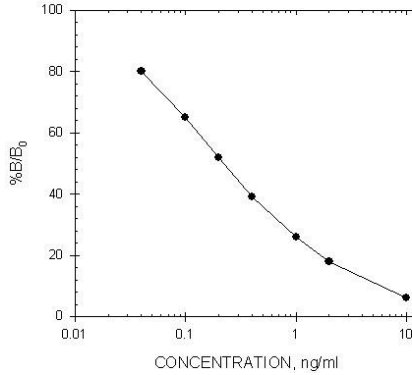
B	s ₁	s ₁	u ₂	u ₂	u ₁₀	u ₁₀	u ₁₈	u ₁₈	u ₂₆	u ₂₆	u ₃₄	u ₃₄
C	s ₂	s ₂	u ₃	u ₃	u ₁₁	u ₁₁	u ₁₉	u ₁₉	u ₂₇	u ₂₇	u ₃₅	u ₃₅
D	s ₃	s ₃	u ₄	u ₄	u ₁₂	u ₁₂	u ₂₀	u ₂₀	u ₂₈	u ₂₈	u ₃₆	u ₃₆
E	s ₄	s ₄	u ₅	u ₅	u ₁₃	u ₁₃	u ₂₁	u ₂₁	u ₂₉	u ₂₉	u ₃₇	u ₃₇
F	s ₅	s ₅	u ₆	u ₆	u ₁₄	u ₁₄	u ₂₂	u ₂₂	u ₃₀	u ₃₀	u ₃₈	u ₃₈
G	s ₆	s ₆	u ₇	u ₇	u ₁₅	u ₁₅	u ₂₃	u ₂₃	u ₃₁	u ₃₁	u ₃₉	u ₃₉
H	s ₇	s ₇	u ₈	u ₈	u ₁₆	u ₁₆	u ₂₄	u ₂₄	u ₃₂	u ₃₂	u ₄₀	u ₄₀

CALCULATIONS

1. After the substrate background has been subtracted from all absorbance values, average all of your duplicate well absorbance values.
2. The average of your two S₀ values is now your B₀ value. (S₁ now becomes B₁, etc.)
3. Next, find the percent of maximal binding (%B/B₀ value). To do this, divide the averages of each standard absorbance value (now known as B₁ through B₇) by the B₀ absorbance value and multiply by 100 to achieve percentages.
4. Graph your standard curve by plotting the %B/B₀ for each standard concentration on the ordinate (y) axis against concentration on the abscissa (x) axis. Draw a curve by using a curve-fitting routine (i.e. 4-parameter or linear regression).
5. Divide the averages of each sample absorbance value by the B₀ value and multiply by 100 to achieve percentages.
6. Using the standard curve, the concentration of each sample can be determined by comparing the %B/B₀ of each sample to the corresponding concentration of Cortisol standard.
7. If the samples were diluted, the concentration determined from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL STANDARD CURVE

Cortisol in EIA Buffer



TYPICAL DATA

NOTE: "Typical data" is a representation. Variances in data will occur. Optical density readings may fluctuate during the shelf-life of the kit, but the %B/B₀ should remain comparable. Measuring wavelength: 650 nm

Standard	Standard Concentration (ng/mL)	Optical Density (Absorbance Value)	%B/B ₀
S ₀ (B ₀)	0	1.235	100
S ₁ (B ₁)	0.04	0.984	80
S ₂ (B ₂)	0.1	0.808	65
S ₃ (B ₃)	0.2	0.642	52
S ₄ (B ₄)	0.4	0.486	39
S ₅ (B ₅)	1	0.318	26
S ₆ (B ₆)	2	0.217	18
S ₇ (B ₇)	10	0.080	6

CROSS REACTIVITY

CORTISOL

.....
.....100.0% PREDNISOLONE
.....
.....47.4%

CORTISONE

.....
.....15.7%

11-DEOXYCORTISOL

.....
.....15.0%

PREDNISONE

.....
.....7.83%

CORTICOSTERONE

.....
.....4.81%

6β-HYDROXYCORTISOL

.....
.....1.37%

17-HYDROXYPROGESTERONE

.....
.....1.36% DEOXYCORTICOSTERONE
.....

.....
.....0.94%

PROGESTERONE

.....
.....0.06%

BETAMETHASONE

.....
.....0.05%

DEHYDROEPIANDROSTERONE

.....0.03%

DEXAMETHASONE

.....0.03% BECLOMETHASONE

.....0.01% d-ALDOSTERONE

.....0.01% TESTOSTERONE

.....0.01% 17 α -HYDROXYPREGNENOLONE

.....<0.01%

ANDROSTENEDIONE

.....<0.01%

CHOLESTEROL

.....<0.01%

ESTRADIOL

.....<0.01%

ESTRIOL

.....<0.01%

ESTRONE

.....<0.01%

PREGNENOLONE

.....<0.01%

COPYRIGHT

All rights reserved worldwide. No part of this publication may be reproduced, transmitted, transcribed, or stored in any information-retrieval system, or translated into any human or computer language in any form or by any means (manual, electronic, mechanical, magnetic, optical, chemical, or otherwise) without expressed written permission.

WARRANTY

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the material from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen Corporation will provide a replacement product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product and any of the predictive models. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. Neogen Corporation shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

TECHNICAL ASSISTANCE

Technical assistance is available Monday-Friday, between 8:00 a.m. and 6:00 p.m. EST.



94 Nandino Blvd • Lexington KY
859/254- or 800/477-8201
Fax: 859/255-5532 • email: inform@neogen.com

©Neogen Corporation, 2014. Neogen®, K-Blue® and K-Gold® are registered trademarks of Neogen Corp., Lansing, MI. All other trademarks are properties of their respective companies.

D402710-8/22/14

Vedlegg 8: Risikovurdering ved laboratoriearbeid

ID	42295	Status	Date
Risk Area	Risikovurdering: Helse, miljø og sikkerhet (HMS)	Created	25.03.2021
Created by	Yanran Cao	Assessment started	25.03.2021
Responsible	Yanran Cao	Measures decided	25.03.2021
		Closed	26.03.2021

Risk Assessment:

Comparison of the extraction methods for hair cortisol

Valid from-to date:

4/4/2021 - 4/23/2021

Location:

Ålesund main building C332

Goal / purpose

This project will compare several methods for hair cortisol extraction

Background

Hair cortisol could be indicator for chronic stress evaluation. however, no standard methods are available.

Description and limitations

Hair cortisol will be extracted using several different method. The extracted cortisol level will be tested by ELISA.

Prerequisites, assumptions and simplifications

[Ingen registreringer]

Attachments

[Ingen registreringer]

References

[Ingen registreringer]

Summary, result and final evaluation

The summary presents an overview of hazards and incidents, in addition to risk result for each consequence area.

Hazard: **nitrogen gass**

Incident: **nitrogen gass release**

Consequence area: Helse

Risk before
measures:



Risiko after
measures:



Measure

Responsible

Registered

Deadline

Status

training

Yanran Cao

25.03.2021

23.04.2021

Submitted

Hazard: **working with chemicals**

Incident: **toxicity for health**

Consequence area: Helse

Risk before
measures:



Risiko after
measures:



Final evaluation

If the student are well trained and could control the operation routinely, the possibility of a risk occurring will become unlikely.

Organizational units and people involved

A risk assessment may apply to one or more organizational units, and involve several people. These are listed below.

Organizational units which this risk assessment applies to

- NTNU
- Prorektor for utdanning
- Avdeling for utdanningskvalitet
- Seksjon for etter- og videreutdanning
- Avdeling for studieadministrasjon
- Avdeling for studieadministrasjon - Ålesund
- Avdeling for studieadministrasjon - Gjøvik
- Avdeling for studenttjenester
- Universitetsbiblioteket
- Biblioteksjef stab
- Bibliotekseksjon for samlinger og digitale tjenester
- Bibliotekseksjon for kultur- og vitenskapshistorie
- Bibliotekseksjon for medisin og helsevitenskap
- Bibliotekseksjon for arkitektur, naturvitenskap, teknologi og økonomi
- Bibliotekseksjon for humaniora, samfunns- og utdanningsvitenskap
- Bibliotekseksjon i Ålesund
- Bibliotekseksjon i Gjøvik
- Prorektor for forskning
- Prorektor for nyskaping
- Viserektor Gjøvik
- Bygningsdrift Gjøvik
- Viserektor Ålesund
- Bygningsdrift Ålesund
- Direktør for økonomi og eiendom
- Avdeling for virksomhetsstyring
- Økonomiavdelingen
- Seksjon for økonomirådgivning
- Seksjon for økonomitjenester
- Servicesenter for økonomi
- Avdeling for campusservice
- Seksjon for bygningsdrift
- Seksjon for teknisk drift
- Servicesenter for eiendom
- Stab Campusservice
- Eiendomsavdelingen
- Seksjon for prosjektgjennomføring
- Direktør for organisasjon

- HR og HMS avdelingen
- Kommunikasjonsavdelingen

Avdeling for dokumentasjonsforvaltning

- IT-avdelingen
- Rektors stab
- Fakultet for arkitektur og design (AD)
- Kunstakademiet i Trondheim
- Institutt for design
- Institutt for arkitektur og teknologi
- Institutt for arkitektur og planlegging
- AD Fakultetsadministrasjonen
- Det humanistiske fakultet (HF)
- Institutt for filosofi og religionsvitenskap
- Institutt for historiske og klassiske studier
- Institutt for kunst- og medievitenskap
- Institutt for musikk
- Institutt for språk og litteratur
- Institutt for tverrfaglige kulturstudier
- HF Fakultetsadministrasjonen
- Institutt for moderne samfunnshistorie
- Fakultet for informasjonsteknologi og elektronikk (IE)
- Institutt for allmennfag
- Institutt for datateknologi og informatikk
- Institutt for elektroniske systemer
- Institutt for elkraftteknikk
- Institutt for IKT og realfag
- Institutt for informasjonssikkerhet og kommunikasjonsteknologi
- Institutt for matematiske fag
- Institutt for teknisk kybernetikk
- IE Fakultetsadministrasjonen
- Fakultet for ingeniørvitenskap (IV)
- Institutt for energi- og prosesseteknikk
- Institutt for marin teknikk
- Institutt for geovitenskap og petroleum
- Institutt for bygg- og miljøteknikk
- Institutt for konstruksjonsteknikk
- Institutt for maskinteknikk og produksjon
- Institutt for havromsoperasjoner og byggtteknikk
- Institutt for vareproduksjon og byggtteknikk
- IV Fakultetsadministrasjonen
- Fakultet for medisin og helsevitenskap (MH)
- Institutt for helsevitenskap i Gjøvik
- Institutt for helsevitenskap i Ålesund
- Kavliinstitutt for nevrovitenskap
- Institutt for klinisk og molekylærmedisin
- Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer
- Institutt for nevromedisin og bevegelsesvitenskap
- Institutt for psykisk helse
- Institutt for samfunnsmedisin og sykepleie

-
- Institutt for sirkulasjon og bildediagnostikk
 - Avdeling for komparativ medisin
 - MH Fakultetsadministrasjonen
 - Fakultet for naturvitenskap (NV)
 - Institutt for biologi
 - Institutt for biologiske fag Ålesund
 - Institutt for bioteknologi og matvitenskap
 - Institutt for bioingeniørfag
 - Institutt for fysikk
 - Institutt for kjemi
 - Institutt for kjemisk prosess teknologi
 - Institutt for materialteknologi
 - NV Fakultetsadministrasjonen og verksteder
 - Nanolab
 - Gunnerus
 - Fakultet for økonomi (ØK)
 - NTNU Handelshøyskolen
 - Institutt for internasjonal forretningsdrift
 - Institutt for industriell økonomi og teknologiledelse
 - Institutt for samfunnsøkonomi
 - ØK Fakultetsadministrasjonen
 - Fakultet for samfunns- og utdanningsvitenskap (SU)
 - Institutt for geografi
 - Institutt for lærerutdanning
 - Institutt for pedagogikk og livslang læring
 - Institutt for sosialt arbeid
 - Institutt for sosiologi og statsvitenskap
 - Institutt for psykologi
 - Institutt for sosialantropologi
 - SU Fakultetsadministrasjonen
 - NTNU Vitenskapsmuseet (VM)
 - Institutt for naturhistorie
 - Institutt for arkeologi og kulturhistorie
 - Vitenskapsmuseet administrasjon
 - BIBSYS

Participants

Ida-Cathrin Almli
Henrik Gran
Erlend Swe Dale
Jonas Moldesæter

Readers

[Ingen registreringer]

Others involved/stakeholders

[Ingen registreringer]

The following accept criteria have been decided for the risk area Risikovurdering:Helse, miljø og sikkerhet (HMS):

Helse

Materielle verdier

Omdømme

Ytre miljø



Overview of existing relevant measures which have been taken into account

The table below presents existing measures which have been taken into account when assessing the likelihood and consequence of relevant incidents.

Hazard	Incident	Measures taken into account
nitrogen gas	nitrogen gas release	Fume hood
working with chemicals	toxicity for health	Fume hood
	toxicity for health	Masks
	toxicity for health	gloves
	toxicity for health	gloves

Existing relevant measures with descriptions:

Fume hood

[Ingen registreringer]

Masks

[Ingen registreringer]

gloves

[Ingen registreringer]

Risk analysis with evaluation of likelihood and consequence

This part of the report presents detailed documentation of hazards, incidents and causes which have been evaluated. A summary of hazards and associated incidents is listed at the beginning.

The following hazards and incidents has been evaluated in this risk assessment:

- **nitrogen gass**
 - nitrogen gass release
 - **working with chemicals**
 - toxicity for health

Detailed view of hazards and incidents:

Hazard: nitrogen gass

Incident: nitrogen gass release

Likelihood of the incident (common to all consequence areas):

Less likely (2)

Kommentar:

less risk with well training

Consequence area: Helse

Assessed consequence: Medium (2)

Comment: [Ingen registreringer]



Hazard: working with chemicals

isopropanol
metanol

Incident: toxicity for health

Likelihood of the incident (common to all consequence areas):

Less likely (2)

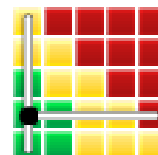
Kommentar:

[Ingen registreringer]

Consequence area: Helse

Assessed consequence: Small (1)

Comment: [Ingen registreringer]



Overview of risk mitigating measures which have been decided:

Below is an overview of risk mitigating measures, which are intended to contribute towards minimizing the likelihood and/or consequence of incidents:

- training

Overview of risk mitigating measures which have been decided, with description: training

training for using nitrogen gass

Measure decided by: Yanran Cao

Responsible for execution: Yanran Cao

Deadline for execution: 4/23/2021
Detailed view of assessed risk for each hazard/incident before and after mitigatingmeasur

Vedelgg 9: Utskrift av ELISA-avlesning

kortisol IHEJ.PLA 1 2 03.05.2021 13:27:29

Session:

Session: kortisol IHEJ
Plate format: 96 wells
Area: A1 - H12
Measurement type: 0 Single
Measurement mode: 1 Precision
Wavelength (nm): 450

Required temp (°C): No
Shaking: 2 Double
Duration (hh:mm:ss): 00:00:00
Shaking speed: 1 Medium

Run:

Instrument: Multiskan GO 1.01.12
Serial number: 1510-04828
Start time: 03.05.2021 13:24:54
Stop time: 03.05.2021 13:25:20
Start temperature: 21.0
Stop temperature: 21.7

Data: 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	10	11	12						
A	1.8781	1.8656	0.7758	0.9086	1.0369	1.0300	0.8503	0.7545	
	1.0639	1.0989	0.8293	0.8348					
B	1.5187	1.5429	0.6438	0.7332	0.8930	0.9511	0.6292	0.6771	
	0.8626	0.9100	0.6124	0.6702					
C	1.1846	1.1075	0.8349	0.9142	1.1122	1.2366	0.8251	0.9624	
	1.1459	1.2872	0.8840	0.8838					
D	1.0090	0.9360	0.8562	0.8557	1.1632	1.2429	0.8168	0.8913	
	1.0642	1.1147	0.7818	0.7964					
E	0.7432	0.7077	0.7380	0.7825	0.8303	0.9211	0.6679	0.7563	
	0.9489	0.9707	0.5896	0.6241					
F	0.4689	0.4222	0.6467	0.7770	0.6948	0.7687	0.6771	0.8000	
	0.7167	0.7642	0.6420	0.6661					
G	0.3133	0.2924	0.9131	1.0379	0.9930	1.0634	0.7598	0.8119	
	0.0486	0.0534	0.0530	0.0567					
H	0.1307	0.1316	0.7582	0.7410	0.9054	0.9537	0.7495	0.8069	
	0.0490	0.0493	0.0487	0.0506					
Checksum		64927							

