

Kontrole

Prirodni i kontrolirani eksperimenti

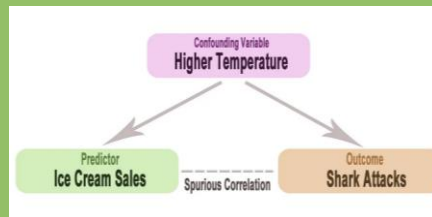
- Korelacijsko istraživanje (mjernim eksperimentom ili opažajno)
 - sustav se ne mijenja
 - uobičajeno su jednostavnija pa znače „manje posla“
 - manje su rizična za provedbu
 - 3 važna problema: „korelacija nije kauzacija“, problemi su tzv. **treća varijabla i reverzna uzročnost**
 - takva istraživanja nekada nisu moguća iz ekoloških razloga
- Eksperimentalna manipulacijom (kontrolirani eksperiment)
 - sustav se mijenja, pa je i veća vjerojatnost neželjenih učinaka;
 - takva istraživanja nekada nisu moguća iz praktičnih ili etičkih razloga

„Treća varijabla” i reverzna uzročnost



- U gotovo svakom korelacijskom istraživanju postoji potencijalna „treća varijabla” koju nismo izmjerili (ili je nismo svjesni), a koja može biti uzrok povezanosti koju primjećujemo

- Pouzdanost podataka može se stoga donekle povećati mjerenjem nekih najvjerojatnijih „trećih varijabli”, ali



- JEDINI način koji osigurava uklanjanje problema „treće varijable” jest izvođenje eksperimentalne manipulacije, koja također zaobilazi i problem reverzne uzročnosti (budući da tijekom pokusa manipuliramo eksperimentalnom varijablom)

H: dugi repovi ptica razvili su se evolucijski kako bi mužjaci bili privlačniji



Korelacijsko: odaberemo lokalitet na kojem lovimo ptice, mjerimo im dužinu pera i prstenujemo u različite kategorije prema duljini pera. Pratimo im aktivnost parenja tijekom sezone

Prednosti: proučavamo prirodni sustav i radimo s relevantnom populacijom koju nismo mijenjali

Nedostaci: što ako je dužina repa posljedica bolje prehrane a ženke su privučene snagom (veza između kvalitete teritorija i parenja, treća varijabla neće biti primijećena)

Manipulativni: odaberemo lokalitet na kojem lovimo ptice, te ih kategoriziramo u kategorije. U jednoj kategoriji su one kojima smo podrezali repove, u drugoj bi bile ptice kojima bismo pera produljili odrezanim ostacima prve kategorije. Prstenujemo ih

Prednosti: potpuna kontrola duljine pera

Nedostaci: rezanje pera može osim direktno na privlačnost utjecati i na sposobnost letenja pa samim time ptice gube atraktivnost

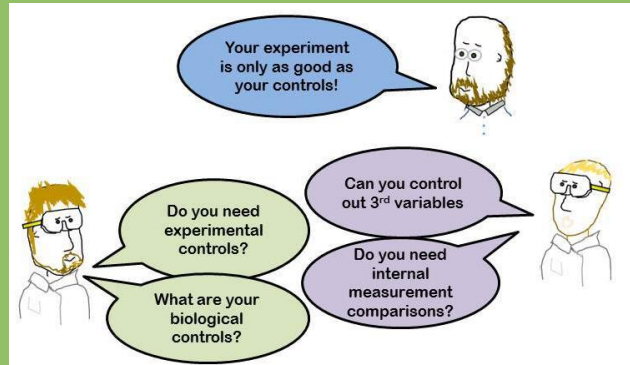
Čak i ako se provede genetičke modifikacija duljine pera treba osigurati da nema nekih dodatnih efekata

Što ako smo pera skratili ili produljili na duljine koje ne postoje u prirodnoj populaciji?

Kontrolna grupa bila bi?

Minimizacija efekata zbunjujuće varijable

- Randomizacija, blokiranje, klasifikacija
- Laboratorijsko istraživanje
- Kompletna kombinacija tretmana i kontrola



Tretmani

- Faktor koji manipuliramo u eksperimentu s ciljem utvrđivanja njegova efekta
- Varijable tretmana su one koje mi manipuliramo, treatment variable
- Varijable učinka su zavisne tj one koje mjerimo, dependent variable
- **U statističkom smislu, tretmani su grupe opažanja koje uspoređujemo**
- Tretmani moraju biti provedeni obzirom na njihov broj i njihovu razinu odnosno djelotvornu razinu
- PILOT ISTRAŽIVANJE I SAGLEDAVANJE SVIH MOGUĆIH ISHODA (koja je potrebna razina tretmana, kada tretirati...kada mjeriti)

Razina tretmana je efektivna količina istog koja će pokazati povezanost (ako postoji) ili ne povezanost (ako povezanost ne postoji) tretmana i učinka (mjerjenja)?

- Npr. Želite odrediti efekte djelovanja gnojiva na stopu rasta rajčice i imate na raspolaganju 30 biljaka.
- Kako bi proveli eksperiment?

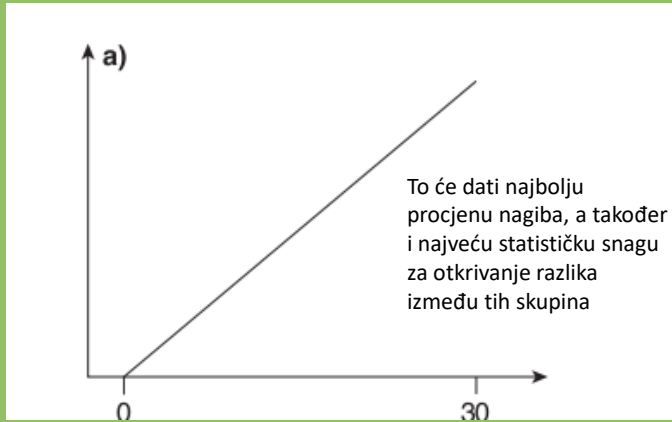
Prva ekstremna provedba: primjena graničnih količina (najviše i najmanje količine) gnojiva na uzorku od po 15 biljaka.

Druga ekstremna provedba: 1. biljka-0 g, 2. biljka -1 g, 3. biljka-2 g itd.

Kako odrediti što je bolje?

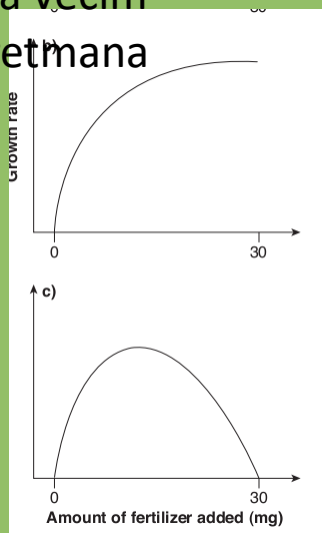
Pilot istraživanjem odrediti očekujemo li linearan ili neki drugi odnos

- Pretpostavka 1) znate da su efekti na stopu rasta linearni s količinom gnojiva i želite saznati koja je brzina porasta



- Pretpostavka 2) ako odnos nije linearan možda odnos doseže plato (b) ili opada (c)

Potreba za većim brojem tretmana



U prvom slučaju ne biste mogli vidjeti ono bitno biološki (i vjerojatno ekonomski) učinak da pri niskim razinama gnojiva malo povećanje ima veliki učinak na stopu rasta, dok pri visokim razinama isto povećanje ima mali učinak. U drugom slučaju možete zaključiti da gnojivo nema nikakav učinak (ili čak negativno!), iako u srednjim koncentracijama gnojivo ima veliki pozitivan učinak.

Za svaki odabir postoje prednosti i nedostaci – odabir se temelji i ovisan je o prethodnom znanju

Uvijek uvrstiti neke međuvrijednosti ako se ne zna kakav je odnos

Kontrole

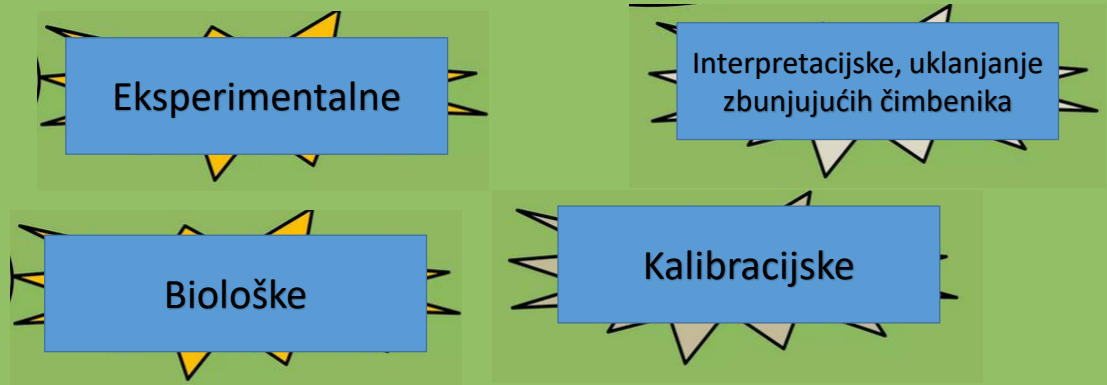
- Nužan dio eksperimentalnog dizajna u biologiji i prirodnim znanostima
- **Kontrola je referenca sa kojom se rezultat eksperimentalne manipulacije (tretman) može se usporediti.**



- Ključna pretpostavka 1 – Vaš eksperiment je dobar onoliko koliko su dobre vaše kontrole
- Ključna pretpostavka 2 – Potrebna je kontrola svega što bi moglo utjecati na tumačenje vaših podataka

"Kontrole" su dodatne stvari koje ugrađujete u svoj eksperimentalni dizajn kako biste lakše protumačili, interpretirali i povećali vjerodostojnost dobivenog rezultata.

- Pri odabiru kontrola treba najkritičnije razmišljati o ishodima eksperimenta te ga provesti na način da imate objašnjenja za svaki mogući ishod (potvrdu ili odbacivanje H, odnosno pogrešaka u provedbi)



To su ekstra tretmani koje uvodimo u eksperiment koji omogućuju razumijevanje svakog problema kada se pojavi

Kontrole se koriste se za sljedeće ciljeve

- Pozitivne i negativne kontrole eksperimenta – za pomoć pri rješavanju problema
- Pozitivne i negativne biološke kontrole – kako biste potvrdili da vaš eksperiment "radi" provjerom jesu li rezultati koje dobijete stvarno onakvi kakvima mislite da jesu; da je pozitivan rezultat stvarno pozitivan, a negativan rezultat stvarno negativan
- Isključivanje alternativnih tumačenja – kontrola trećih ili zbunjujućih varijabli (interpretacijske kontrole ili postupci)
- Kalibriranje eksperimentalnog sustava – unutarnja normalizacija za kontrolu bioloških varijacija

U mnogim eksperimentima zapravo ćete uključiti više kontrola nego testnih uzoraka i obično možete vjerovati svojim rezultatima samo ako vaše kontrole rade.

Eksperimentalne

- One se potrebne jer pokazuju da je vaš eksperiment uspio onako kako želite.

Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

Koje kontrole koristite, i zašto?

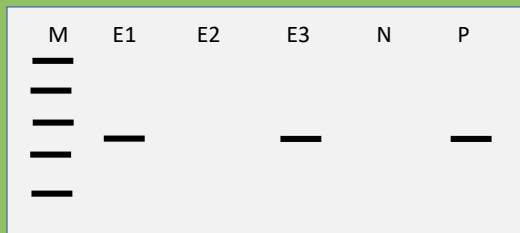
Čemu sve služi pozitivna kontrola?



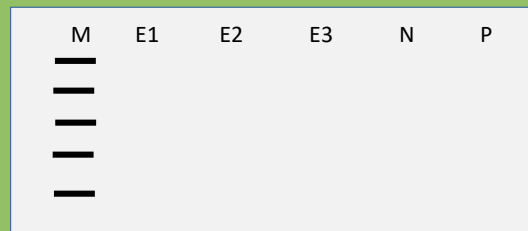
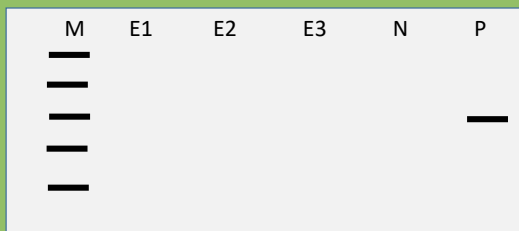
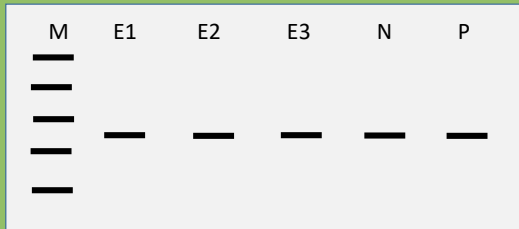
Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

Koje kontrole koristite, i zašto?

Čemu sve služi pozitivna kontrola?



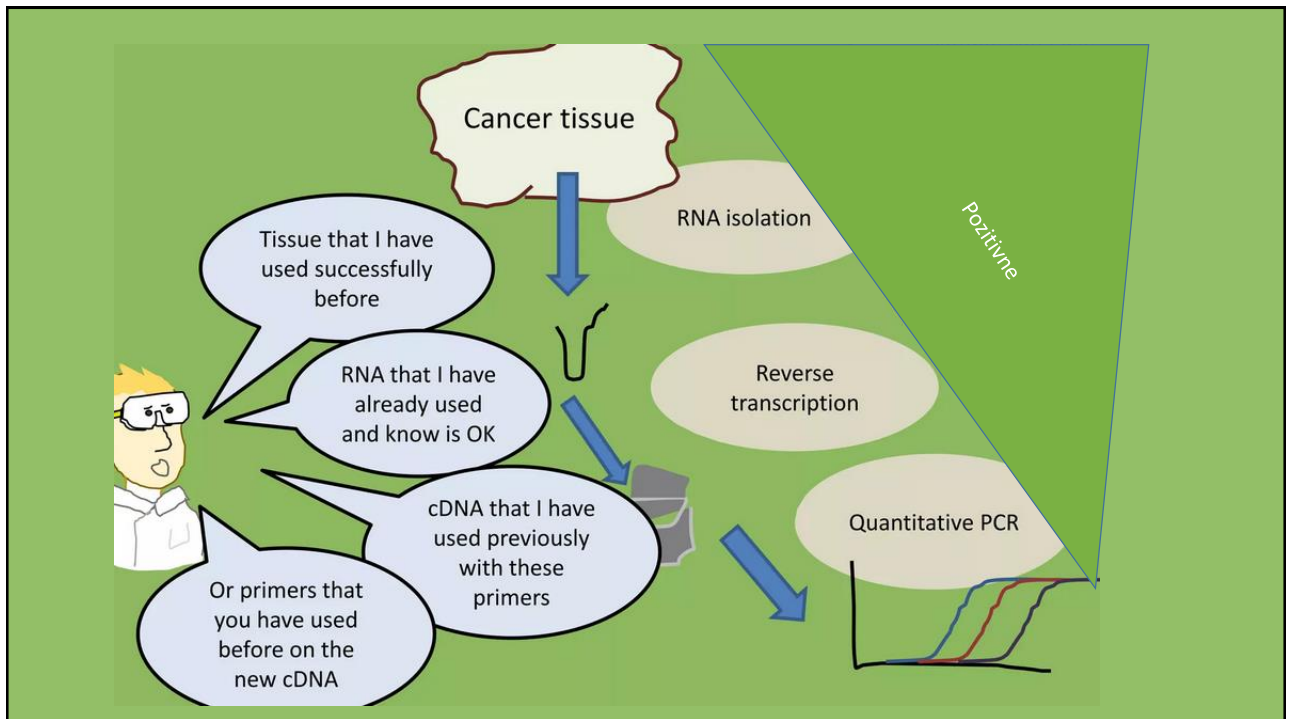
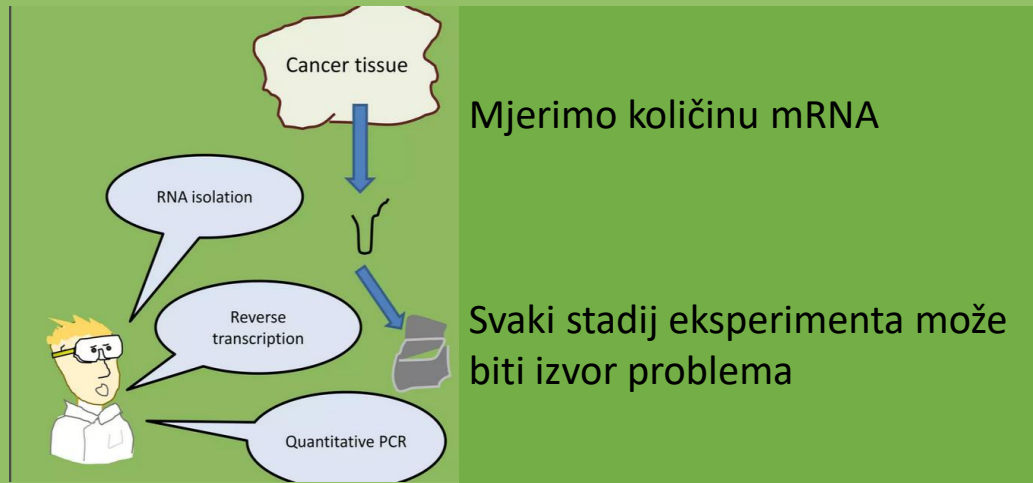
Negativnom kontrolom doznajete da nemate kontaminaciju, ili da primeri ne umnazaju nespecificno, što doznajete pozitivnom kontrolom?



KONTROLA REAGENSA I EKSPERIMENTA

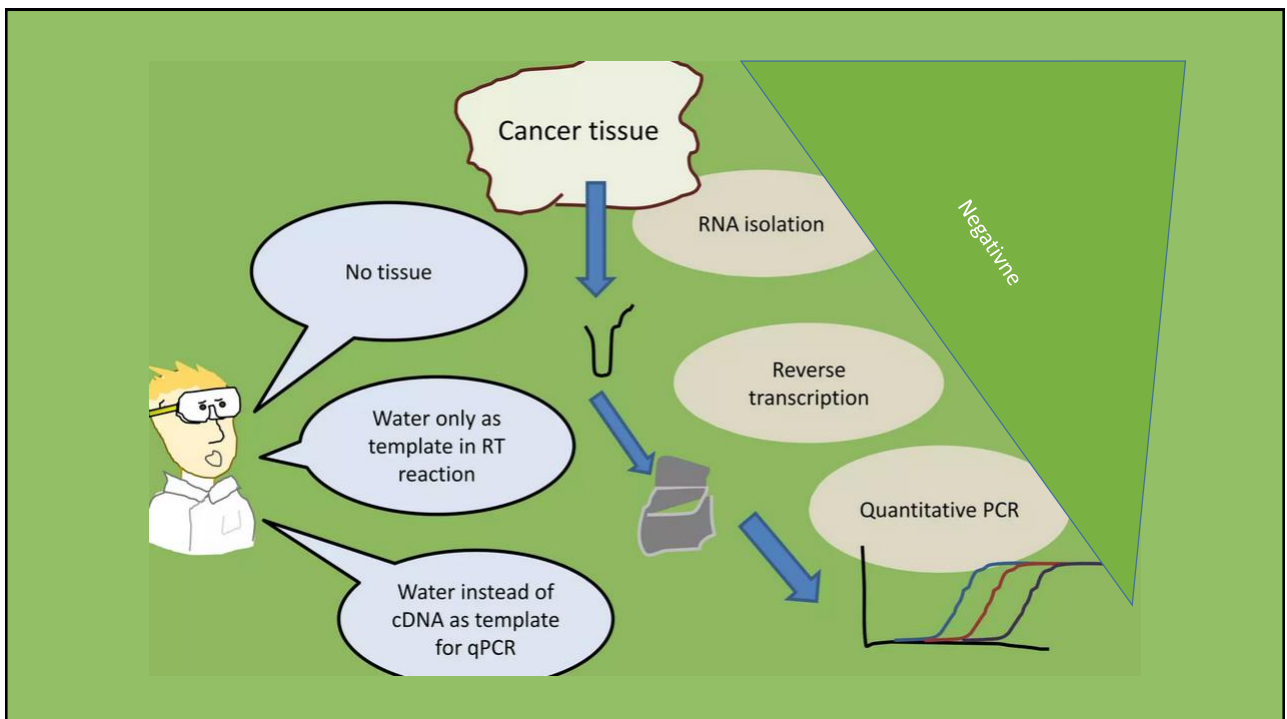
Eksperimentalne kontrole

H: mRNA proteina A i mRNA proteina B su smanjene u bolesnom tkivu u odnosu na zdravo



POZITIVNA EKSPERIMENTALNA KONTROLA

- Većina laboratorijskih eksperimenata može (i hoće) poći po zlu na ovaj ili onaj način, a vi ćete morati znati zašto.
- Zbog toga provodite eksperimentalne kontrole koje će vam pomoći u rješavanju problema provedbe i prilagodbi vaših protokola.
- Trebali biste uključiti: Uzorak koji će vam dati pozitivan rezultat u eksperimentu. Obično će to biti uzorak koji ste pripremili prije eksperimenta i za koji znate da radi. To bi moglo biti tkivo/protein/DNA/RNA koji ste izolirali jednom drugom prilikom i već ste testirali.
- Poanta je da što više znate o ovom uzorku to bolje. Trebali biste znati što možete očekivati i stoga ćete znati da postoji problem ako ne dobijete rezultat koji očekujete.
- Idealno bi bilo da imate kontrolu za svaki korak eksperimenta.
- Eksperimentalne i biološke kontrole se često poklapaju



NEGATIVNE KONTROLE

- Važne su opet u svakoj fazi.
- Često su to jednostavne poput korištenja vode umjesto jednog ključnog reagensa (npr. umjesto kalupa u vašem PCR-u za kontrolu kontaminacije bilo koje druge otopine pufera/enzima).
- Eksperimentalna negativna kontrola povremeno može biti ista kao vaša biološka kontrola, ali opet, ona služi drugoj svrsi: strogost bioloških kontrola trebala bi biti najveća. Broj i specifičnosti svake kontrole ovisit će o tome što zapravo radite.

Poanta je u tome da želite imati neku mjeru uspješnosti u svakoj fazi svog višefaznog protokola kako biste mogli uočiti ne samo da postoji problem, već i koji mu je uzrok (u kojem mu je koraku uzrok)

Primjer

recimo da želite napraviti qPCR eksperiment uspoređujući količine dviju mRNA između stanica nakon liječenja lijekom ili neliječenih. Ovaj eksperiment ima više faza - rast stanica, liječenje lijekovima, izolacija RNA, reverzna transkripcija i qPCR za oba gena.

Kad bi proveli cijeli eksperiment i ne bi dobili nikakve podatke, ne bismo znali gdje je problem.

Dakle, u svom eksperimentalnom dizajnu treba razmišljati što se sve može dogoditi. **Treba unaprijed pogledati stanice kako bi se znalo jesu li uopće vijabilne – vjerojatno nije potrebna dodatna kontrola.**

- **Dio odrediti količinu tretmana odnosno liječenja na temelju poznavanja sustava ili pilot istraživanja**
- Međutim, izolacija RNA mogla bi poći po zlu iz čisto eksperimentalnog razloga – stari reagensi ili neodgovarajući protokol za tip stanice ili bilo što drugo – pa bih uključili pozitivnu kontrolu RNA za koju sam već znamo da je u redu.
- Sljedeći korak je reverzna transkripcija koja bi mogla ne uspjeti iz nekog razloga (npr. PCR grijač ne radi), pa bismo dodali RNA za koju znamo da je OK za RT i primere.
- Sada imamo cDNA za qPCR, ali uzimamo i kontrolnu cDNA...
- Takvom provedbom imamo kontrolu nad svakim korakom

BIOLOŠKE KONTROLE

Pozitivne i negativne biološke kontrole – kako biste potvrdili da vaš eksperiment "radi" provjerom jesu li rezultati koje dobijete stvarno onakvi kakvima mislite da jesu **odnosno da je pozitivan rezultat stvarno pozitivan, a negativan rezultat stvarno negativan**

You can't prove a negative without a positive!

You can't prove a positive without a negative!

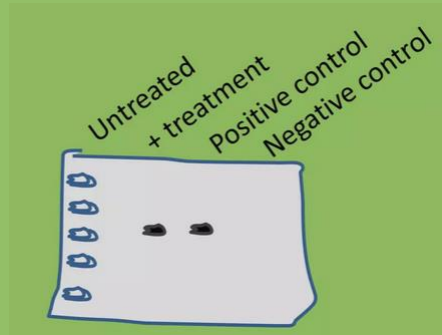
- Tretirano i netretirano

- Ovome treba dodati još i pozitivnu kontrolu koja povećava sigurnost da ako razlika između tretiranog i netretiranog postoji da će biti uočljiva



Vrlo slično kontroli eksperimenta

Ali i negativnu biološku kontrolu za koju smo sigurni da neće dati odgovor



- Potrebnu seriju bioloških kontrola treba procijeniti sagledavajući sve moguće ishode eksperimenta
- Svaki ishod mora se moći argumentirati

IDEALIZACIJA BIOLOŠKIH KONTROLA

- na primjer, ako želimo istražiti učinak pušenja na tkivo pluća, kontrolnu skupinu čine uzorci tkiva nepušača

Sve ostale okolnosti eksperimenta moraju biti identične



Što znači – identična u svakom smislu?

- Pitanje koje treba definirati u skladu s hipotezom
- ista linija životinja, isto porijeklo, isti uvjeti kultivacije i sl.
- Kontrolna grupa nam omogućuje praćenje utjecaja dodatka vitamina u hrani



Kontrole kao dio eksperimentalnog dizajna

- Obavezno definirati u ovisnosti sa svim mogućim ishodima
- Utemeljeno na postojećem znanju (dugotrajno i temeljito praćenje dostupne relevantne literature)



Balansirani (uravnotežen) dizajn/ balansirani uzorak

- Isti broj replika u tretiranim i kontrolnim uzorcima
- Treba uvijek težiti balansiranom dizajnu no postoje iznimke koje opravdavaju nebalansirani dizajn s ciljem smanjivanja jedinki u tretiranim uzorcima



Eksperimenti na životinjama – odstupanje od normalnog balansirano uzorkovanja

- Patnja životinja – pitanje etičnosti istraživanja
- Broj jedinki u tretiranoj (visoka razina patnje) i kontrolnoj grupi (niska razina patnje)
- Nebalansirani ima nižu snagu
- Nadomjestak je povećan broj jedinki u kontrolnoj grupi
- Predmet odluke eksperimentatora (uvijek slušati savjete)



Efektivnost kontrole

- Istraživanje “srčanog elektrostimulatora” na dugovječnost štakora. Kontrolna skupina?

Etičnost kontrola

- Bolje ne eksperimentirati uopće nego izbaciti kontrole (ili koristiti loše i zastarjele statistike kao kontrole (povijesne kontrole)
- Primjena nebalansiranog dizajna



Priistranost eksperimentatora obzirom na kontrolnu skupinu

Istraživač treba biti indiferentan u određivanju subjekta i kontrole.

Nasumično dodjeljivanje (uzorkovanje) s istim dodatnim pretpostupcima

Tipovi pokusa s obzirom na kontrolnu skupinu

- **sljepi** (procjenjivač ne zna je li uzorak iz tretirane ili netretirane skupine)
- **dvostruko sljepi** (procjenjivač ni uzorak kada se radi o ljudima, ne znaju u kojoj su skupini, dodatno se pokus ojačava placebo = potpuno identičan pravom tretmanu, osim parametra koji se istražuje)

I jos neke vrste kontrola...

Kontrola tretmana

- Recimo da tretirate svoj uzorak (bilo da se radi o stanicama, miševima, ljudima, bilo čemu) sa spojem razrijeđenim u nekom otapalu (DMSO je prilično uobičajen). Spoj bi mogao imati učinak, a isto tako i otapalo, tako da će vam trebati kontrolni tretman za samo otapalo.
- Često će ovaj uzorak tretiran otapalom biti vaša prava skupina za usporedbu. Ovakav scenarij vrijedi za reagense za transfekciju, virusne čestice itd.

Povijesna kontrola

H: Novi tretman u liječenju bolesti daje bolje rezultate od trenutno primjenjivanog (ranije testiranog).

- 1) Usporedba novog tretmana i netretiranog –ne odgovara na pitanje nego pokazuje odnos tretiranog s novim tretmanom i netretiranog (jednostavan dizajn, jednofaktorijski s dvije razine)
- 2) Uvođenje starog tretmana bilo bi poželjno ali ponekad neetično
- 3) Primjena “povijesne” kontrole tj. postojećih znanja o primjenjivanoj metodi (kada koristiti)?**
- 4) Povijesna kontrola uvodi faktor vremena

Interpretacijske kontrole

- Uklanjanje zbunjujućih čimbenika ili alternativnih tumačenja
- Budite jako kritični prema podacima koje biste mogli dobiti te razmisliti o svim drugim potencijalnim razlozima zbog kojih biste mogli dobiti isti ishod i razmislite kako biste to mogli kontrolirati.

- Primjer: Proučavanje ima li trening na visini utjecaja na VO2 max (maksimalni aerobni kapacitet kojeg tijelo može iskoristiti u jednoj minuti tijekom napora). Krenuli bi u eksperiment misleći da su dob, spol i BMI sudionika zbunjujuće varijable, dok bi općenito razina vježbanja, učestalost vježbanja i nadmorska visina na kojoj vježbaju bile relevantni faktori.

1) Mogli bih svoje sudionike nasumično rasporediti u grupe za visinske treninge u odnosu na one koji ne treniraju na nadmorskoj visini, a zatim uzeti u obzir te razlike u analizi,

2) ili bih mogao stratificirati svoje grupe tako da proporcionalno odražavaju populaciju koja se proučava.

Oboje bi moglo funkcionirati a vjerojatno bi najbolja opcija bila stratificirati neke pretpostavljene zbunjujuće čimbenike i objasniti razlike kroz analizu za druge.

- Npr. stratificirano uzorkovanje, blocking

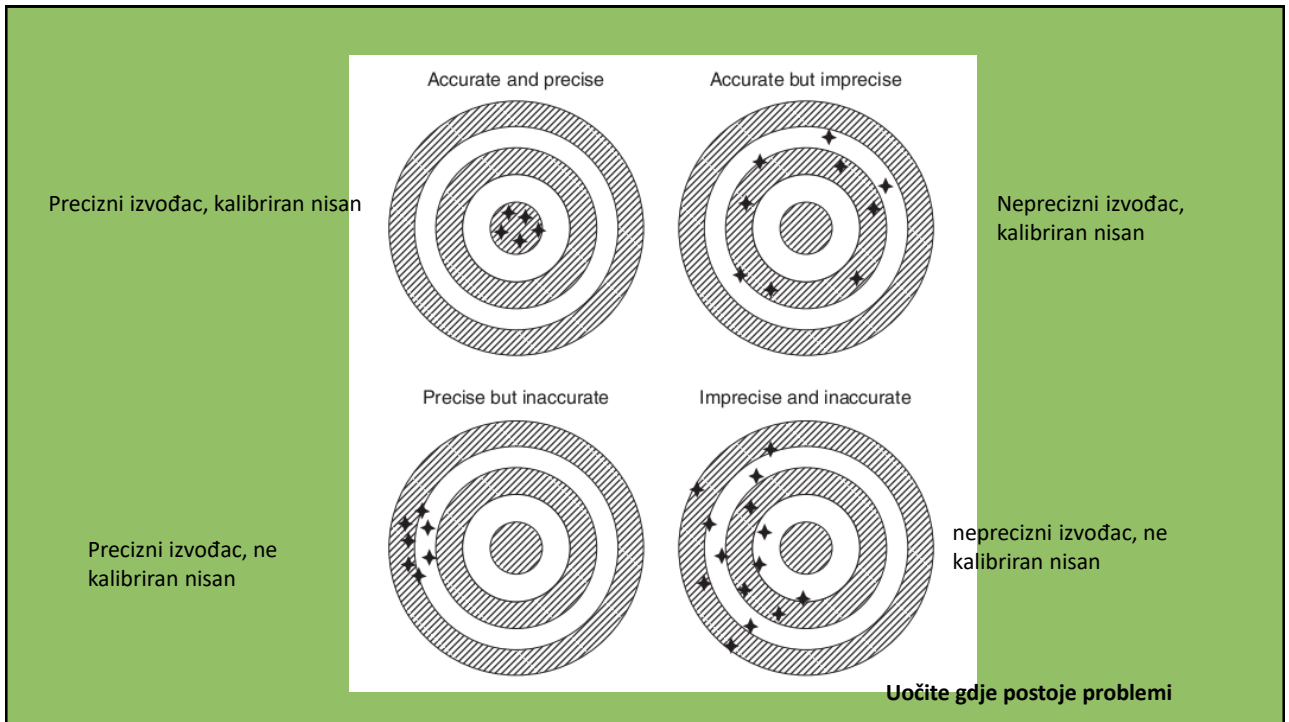
Kalibracijske kontrole ENDOGENE

- Možda ćete također trebati unutarnju normalizaciju. Na primjer, možda će vam trebati referentni transkripti (obično više od jednog) za eksperimente tipa ekspresije qPCRom ili kontrolni proteini za western blot (iako se općenito preferiraju ukupni proteini).
- Ono što ćete koristiti ovisi o postavkama eksperimenta,
- Kao i s drugim dijelovima vašeg eksperimentalnog dizajna, na kraju ćete morati opravdati svoju odluku ako pokušate napraviti širu interpretaciju. U najmanju ruku, navest ćete svoj pristup unutarnje normalizacije u svojim metodama i legendama slika. Bitno je zapamtiti da ako ćete trebati ove stvari, ne zaboravite ih isplanirati u svoj eksperimentalni dizajn!

Što još moramo kontrolirati?

Kontrola mjerenja/uređaja (netočnost i nepreciznost)

- Uključuje provjeru uređaja i podešavanje mjerne skale ako je potrebno
- Ne oduzima puno vremena
- Problem **netočnih** mjerenja (krivo kalibriran uređaj)
- Problem **nepreciznih** mjerenja (neprecizan uređaj ili provedba)
- Posvetiti vrijeme procjeni točnosti mjerenja



Ponavljanje mjerenja/nekalibriran uređaj

- Dobivanje istih rezultata višestrukim ponavljanjem govori u prilog preciznosti pri mjerenju ali ne i točnosti rezultata (ako je uređaj nekalibriran)

•Vaša su mjerenja ponovljiva ali ponovljivo kriva!

Varijabilnost unutar promatrača

Promatračev pomak

Zamislite da imate 1000 fotografija muškaraca od 25 godina te brojevima od 1 do 5 morate procijeniti dlakavost na licu. To radite oko 3 sata.

TIJEKOM TOG VREMENA NESVJESNO MOŽEMO PROMIJENITI UVJETE KATEGORIZIRANJA

Rješenje problema

1. način: Detaljan opis kategorija npr. ako brkovi prelaze 80% dužine gornje usne smatraju se punima i samo takvi brkovi su kategorija 2.

Definiranje graničnih slučajeva

- Sve manje od toga je kategorija 1

2. način: Definiranje graničnih slučajeva fotografijama

NA TAJ SE NAČIN SMANJUJE tzv. VARIJABILNOST UNUTAR PROMATRAČA

Istu kategorizaciju morate napraviti za još 1000 fotografija nakon mjesec dana

- Prije analize treba provesti **STUDIJU PONOVLJIVOST** što znači na određen broj fotografija iz prve analize treba ponovo procijeniti i nova procjena mora biti u skladu s onom prvom

Dodatna kontrola metode, drugim metodolozkim pristupima s istim ciljem

- Osim pažljivim odabirom pozitivnih kontrola, **KONTROLA METODE** podrazumijeva **upotrebu druge metode s ciljem postizanja istog rezultata**
- Smanjuju rizik ali ne eliminiraju opasnost dobivanja krivog rezultata zbog nepoznatih efekata
- Najbolje je uvijek koristiti drugu (treću) alternativu i kemikalije i metode



Koji su efekti kofeina na krvni tlak ? – osnovno pitanje



Potpitanja: Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

Definirajte kontrole



Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

REZULTAT

kava bez kofeina neg. kontrola	10
kava s kofeinom	30

kofein

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10

kofein i jos nesto iz
kave...???

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10
voda	5

kofein, voda + nesto
drugo iz kave

VAŽNOST KONTROLA



Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

REZULTAT

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10
voda	5

kofein, voda + nesto drugo iz kave

VAŽNOST KONTROLA

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10
voda	5
Bez pijenja	X

Tretman bez pijenja pokazuje na psihološki učinak mjerenja nije bitan (ako je bio dovoljno velik uzorak)



Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

REZULTAT

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10
voda	5
Bez pijenja	X

Tretman bez pijenja, ako je 0, pokazuje na psihološki učinak mjerenja nije bitan (ako je bio dovoljno velik uzorak)

VAŽNOST KONTROLA

kava bez kofeina	0
kava s kofeinom	0
vode s kofeinom	0
voda	0
Bez pijenja	0

Koji su problemi kod ovakvog ishoda?

Nedostje pozitivna kontrola, npr. Lijek ya porsat krvnog tlaka koji bi pokatao radi li mjerenje.



Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

Tretman	porasta KT (%)
voda	10
Voda s kofeinom	10
Lijek za porast KT	30

Dokaz da mjerenje radi – pozitivna kontrola, ali da je količina kofeina nedostatna

Neočekivani rezultat - sumnja

Exp 3	tretman	porasta KT (%)
	voda	10
	Voda s kofeinom (ekvivalent 1 šalice kave)	10
	Voda s kofeinom (ekvivalent 2 šalice kave)	12
	Voda s kofeinom (ekvivalent 3 šalice kave)	15
	Voda s kofeinom (ekvivalent 4 šalice kave)	20
	Lijek za porast KT	30

Potreba za pravilnom odabirom razine tretmana



Zanima nas signalni put koji potiče NGF*, preko vezanja na kinazni receptor TrkA što dovodi do fosforilacije proteina Akt

Treba definirati koji uvjet moraju zadovoljiti stanice za istraživanje (moraju imati receptor za NGF)

Treba definirati eksperiment u kojem bude mjerljiva promjena fosforilacije

**NGF (nerve growth factor) je mali protein koji određene stanice potiče da postaju "neuron-like" i kasnije neuroni.*

TrkA je receptor kinaza, NGF se veže na receptor i potiče fosforilaciju kinazne domene unutar stanice – prijenos fosfata na Akt

Negativna kontrola u eksperimentima u kulturi tkiva (stanica)

P: da li NGF* uzrokuje fosforilaciju proteina Akt ?

KOJE SU KONTROLE POTREBNE ?

- EXP:
1. stanice tretirane NGF-om (NGF se otapa u puferu X)
 2. netretirane stanice – **NEGATIVNA kontrola 1**
 3. ????

*NGF se otapa u puferu – tretman puferom **NEGATIVNA kontrola 2**



Pozitivne kontrole u ovom eksperimentu

P1 Kontrola koja ukazuje da li je signal NGF uopće prenesen u stanice (treba pratiti promjenu tj. Aktivaciju receptora – TrkA protein)

- *Na temelju toga saznati koliko **NGFa** je potrebno za fosforilaciju (aktivaciju) receptora TrkA*

P2 Kontrola da se događa aktivacija Akt upotrebom nečeg za što se zna da aktivira Akt (to je IGF1)

- *Kontrola koja pokazuje da je fosforilaciju proteina Akt moguće mjeriti*



- Uzorak 1-3 Ništa – neg. Kontrola
- Uzorak 4-6 Pufer (isti za oba faktora rasta)
- Uzorak 7-9 NGF, razina dostatna da aktivira TrkA, u puferu
- Uzorak 10-12 IGF, razina dostatna da stimulira IGF receptor, u puferu –**pozitivna kont**

Neg. kont

Dodatan parametar za mjerjenje je aktivacija receptora Trk A, kontrola metode



Ishod 1 (kompletan eksperiment, 1. set rezultata):

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	410	745%	4%
11	NGF	290	333%	4%
12	NGF	320	530%	5%

Zaključak 1

Pozitivna kont – radi; IGF aktivira Akt fosforilacija je mjerljiva

Dodano je dovoljno NGF da aktivira TrkA

NGF aktivira Akt jednako uspješno kao i IGF



Ishod 2 (kompletan experiment, 2. set rezultata):

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	3%	745%	4%
11	NGF	7%	333%	4%
12	NGF	4%	530%	5%

Zaključak2

NGF aktivira receptor ali ne Akt !!!; uspješnost mjerenja aktivacije Akt pokazana je s IGF-1 (poz. kont.)



bez IGF pozitivne kontrole, 2. set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%
5	Buffer	3%	3%
6	Buffer	2%	0%
7	NGF	3%	745%
8	NGF	7%	333%
9	NGF	4%	530%

Sumnja: ili nema aktivacije ili antitijela za detekciju fosforiliranog Akt ne rade



bez TrkA pozitivne kontrole, 2. set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	0%
5	Buffer	3%	2%
6	Buffer	2%	1%
7	IGF-1	220%	500%
8	IGF-1	380%	625%
9	IGF-1	340%	400%
10	NGF	3%	4%
11	NGF	7%	4%
12	NGF	4%	5%

Sumnja: ili stvarno nema aktivacije ili je nedostatna količina NGFa



Ishod 3 (kompletan experiment, treći set rezultata)

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	50%	745%	4%
11	NGF	40%	333%	4%
12	NGF	32%	530%	5%

Akt je znatno slabije aktiviran NGF-om nego IGF-1-om, iako je aktivacija receptora visoka



bez IGF-R pozitivne kont. treći set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%
5	Buffer	3%	3%
6	Buffer	2%	0%
7			
8			
9			
10	NGF	50%	745%
11	NGF	40%	333%
12	NGF	32%	530%

NGF aktivira Akt, nema šanse da uočimo značajniji učinak drugog faktora rasta
Ne zna se da li je ovakva razina aktivacije fiziološki važna



Standardi I apsolutna mjerenja

- Univerzalno prihvaćene vrijednosti upotrebljive su i za druge istraživače

(moguća je šira komparacija rezultata)

Ukoliko je moguće pokušajte također izvršiti mjerenja koja su apsolutna; izraziti ih u vrijednostima koje su univerzalno prihvaćene kao standardi.

npr. Sadržaj RA u kalusu raslom na mediju s dodatkom tvari X u odnosu na komercijalnu RA (standard) za HPLC visoke čistoće.



Apsolutna mjerenja

- Ukoliko je moguće pokušajte također izvršiti mjerenja koja su apsolutna; izraziti ih u vrijednostima koje su univerzalno prihvaćene kao standardi.

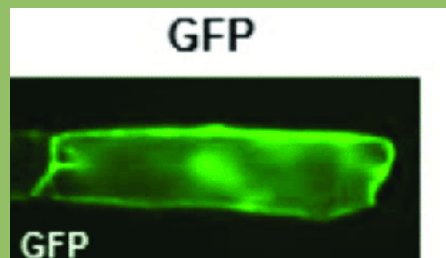
npr. Sadržaj RA u kalusu raslom na mediju s dodatkom tvari X u odnosu na komercijalnu RA (standard) za HPLC visoke čistoće.



Vježba za DZ:

Koje kontrole su poželjne u pokusu privremeno transformiranih biljnih stanica nekim vektorom koji sadrži reporter gen GFP pod kontrolom tkivno specifičnog promotora promotora X?

Svaka sugerirana kontrola mora biti argumentirana!



kontrole pri pokusu privremene ekspresije stranog gena:

1. autofluorescencije stanica,
2. gfp pod konstitutivnim promotorom da se vidi je li gfp OK,
3. ekspresije tkivno-specifičnog promotora u drugom tipu stanica da se vidi je li tkivno specifičan,
4. vektor bez promotora (da li nešto iz stanica aktivira reporter-gen),
5. kontrola postupka transformacije (npr. particle bombardement ili elektroporacija),...