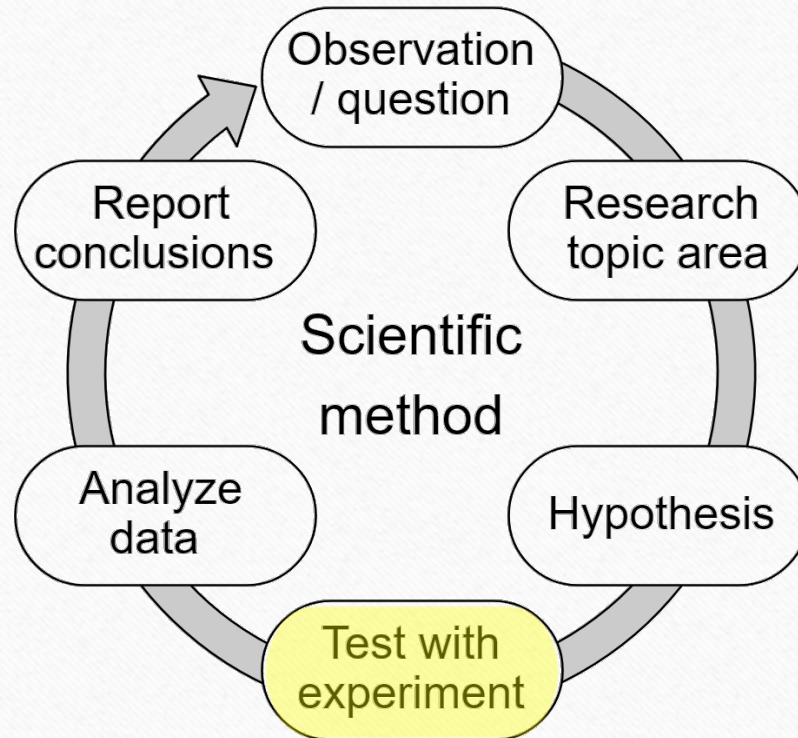


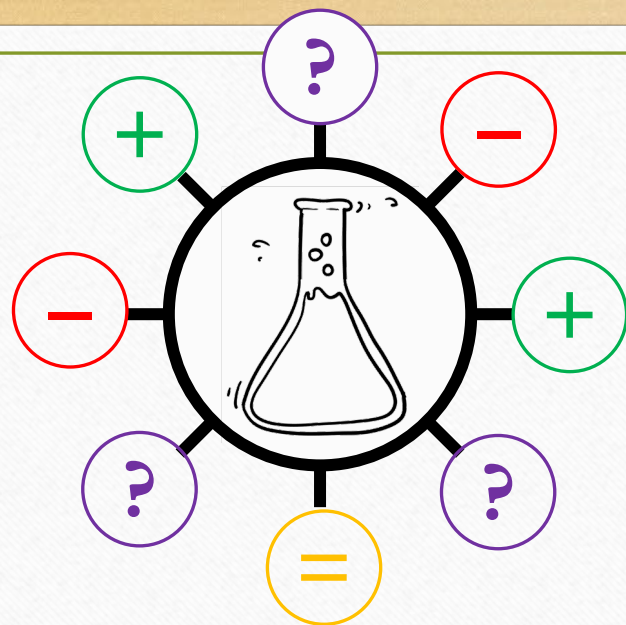
Kontrole u biološkim eksperimentima

dr. sc. Mateja Jagić
dr. sc. Karlo Miškec

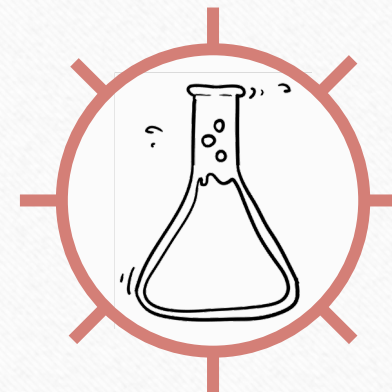
Metodologija znanstveno-istraživačko rada u biologiji, 2025./2026.

Znanstvena metoda





Kontrole



Pozitivna
kontrola

Negativna
kontrola

Endogena
kontrola

Eksperimentalna
kontrola
(kontrolne grupe)

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

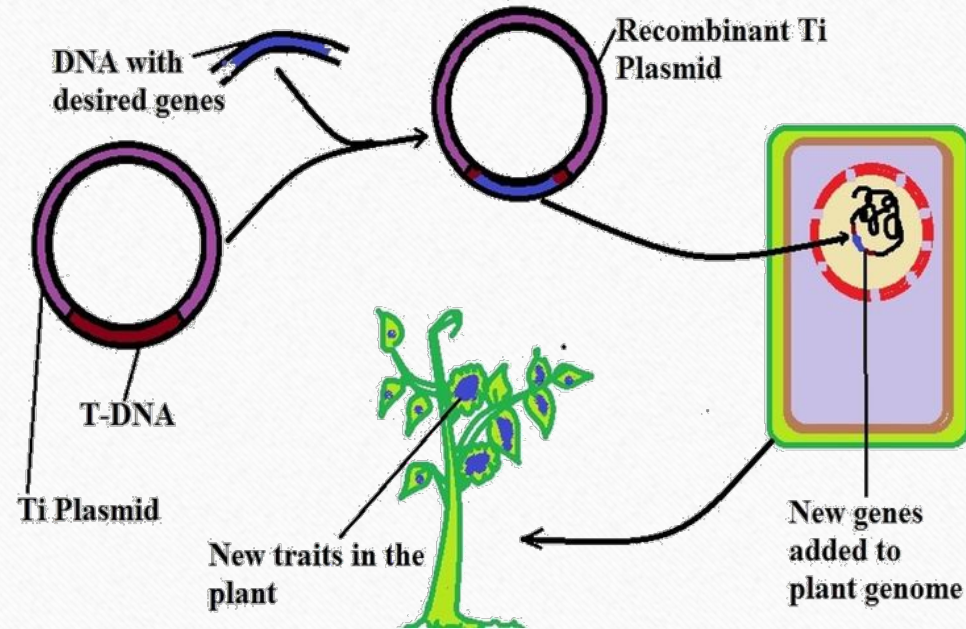
Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*.

OsRHP1 – *Oryza sativa* RING-H2 protein 1

35S

OsRHP1

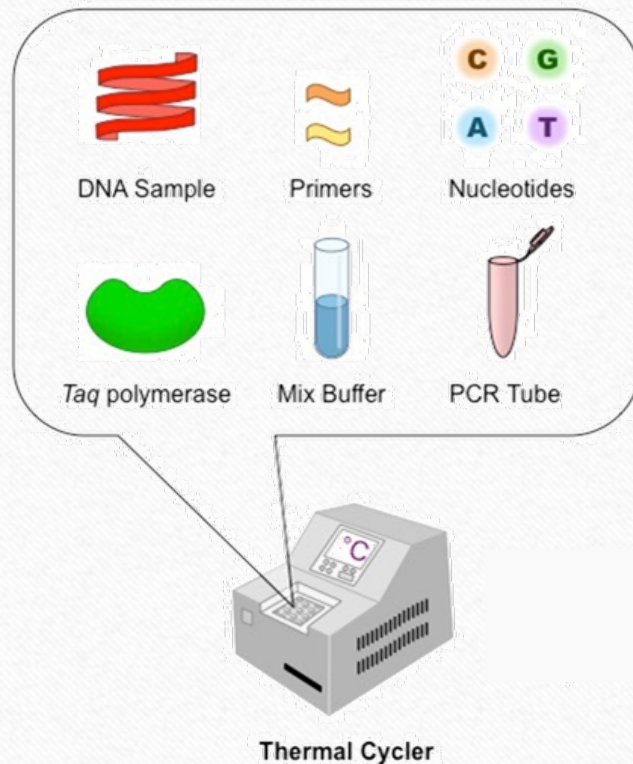
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima



Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*.

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*. Vaš prvi korak je utvrditi je li došlo do uspješne ugradnje tog konstrukta (*35S::OsRHP1*) u genom riže što provjeravate lančanom reakcijom polimerazom (PCR) koristeći gen specifične početnice i kao kalup izoliranu DNA iz biljaka. Koje kontrole trebate koristiti u ovom eksperimentu?



Negativna kontrola

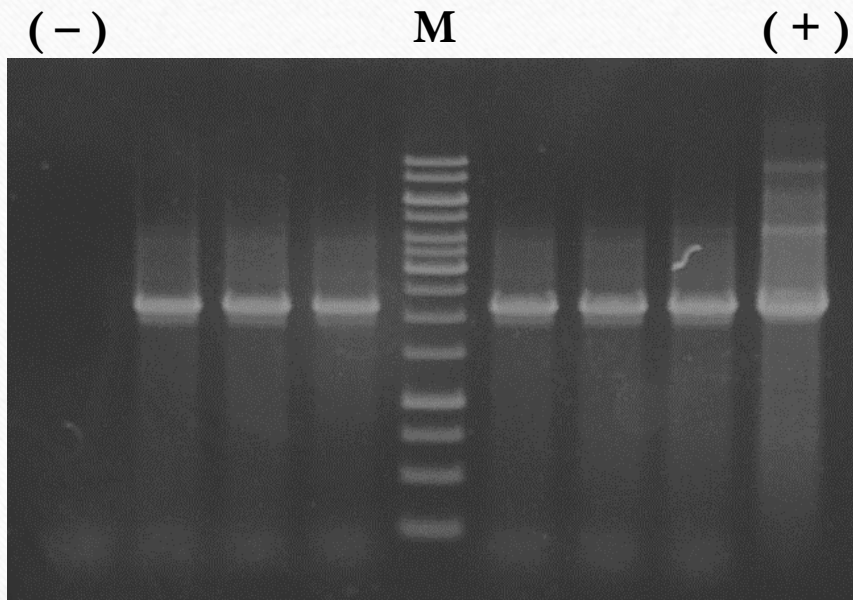
- Smjesa za PCR s početnicama, ali bez kalupa (DNA)

Pozitivna kontrola

- Kao kalup koristite plazmidnu DNA koja sadrži CDS gena od interesa (*OsRHP1*)

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*. Vaš prvi korak je utvrditi je li došlo do uspješne ugradnje tog konstrukta (*35S::OsRHP1*) u genom riže što provjeravate lančanom reakcijom polimerazom (PCR) koristeći gen specifične početnice i kao kalup izoliranu DNA iz biljaka. Koje kontrole trebate koristiti u ovom eksperimentu?



Negativna kontrola

Pozitivna kontrola

- Smjesa za PCR s početnicama, ali bez kalupa (DNA)

- Kao kalup koristite plazmidnu DNA koja sadrži CDS gena od interesa (*OsRHP1*)

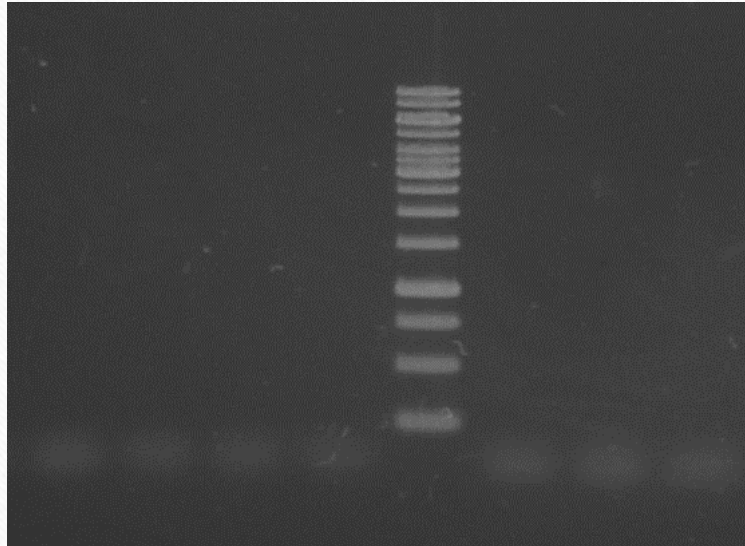
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*. Vaš prvi korak je utvrditi je li došlo do uspješne ugradnje tog konstrukta (*35S::OsRHP1*) u genom riže što provjeravate lančanom reakcijom polimerazom (PCR) koristeći gen specifične početnice i kao kalup izoliranu DNA iz biljaka. Koje kontrole trebate koristiti u ovom eksperimentu?

Opcija 1 – bez pozitivne kontrole

(-)

M

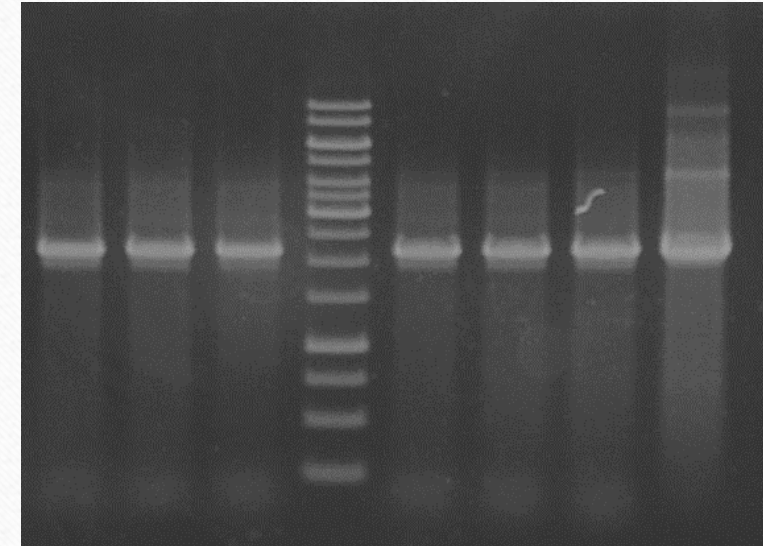


Ne znamo je li izostanak vrpca na gelu uzrokovan nedostatkom ili nedostatnom ekspresijom, ili neka komponenta reakcije PCR nije valjana.

Opcija 2 – bez negativne kontrole

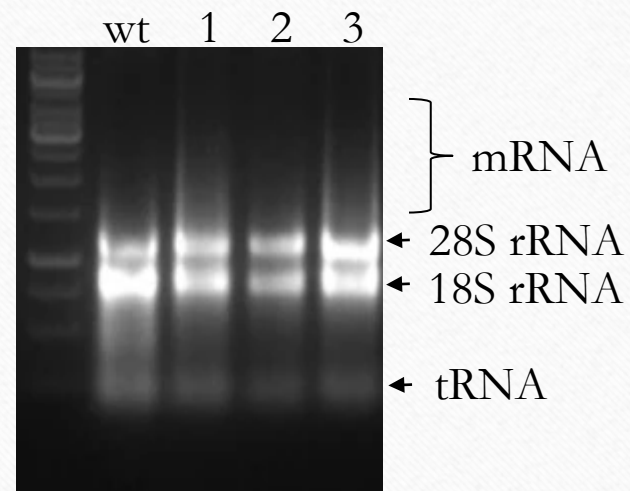
M

(+)



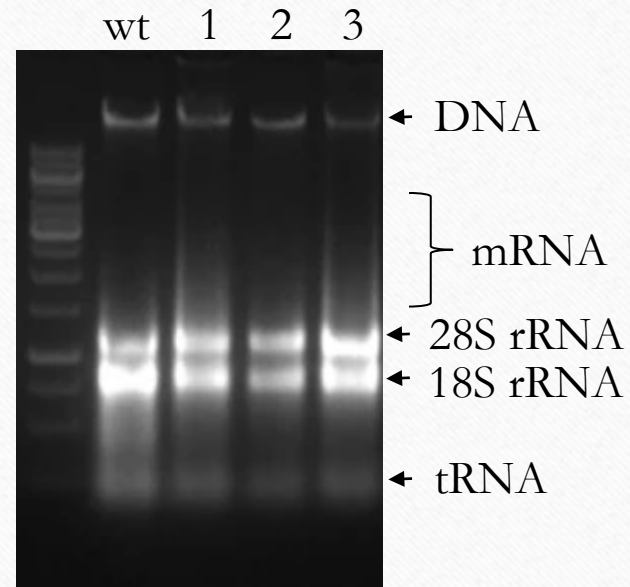
Ne znamo je li umnažanje možda posljedica kontaminacije u nekoj od komponenti PCR smjese.

Vaš idući korak je utvrditi je li transgen *35S::OsRHP1* stvarno prekomjerno eksprimiran u Vašim generiranim transgeničnim biljkama. Prvo ste izolirali ukupnu RNA iz divljeg tipa i tri nezavisne transgenične linije (T2). Kako bi provjerili kvalitetu izolirane RNA?

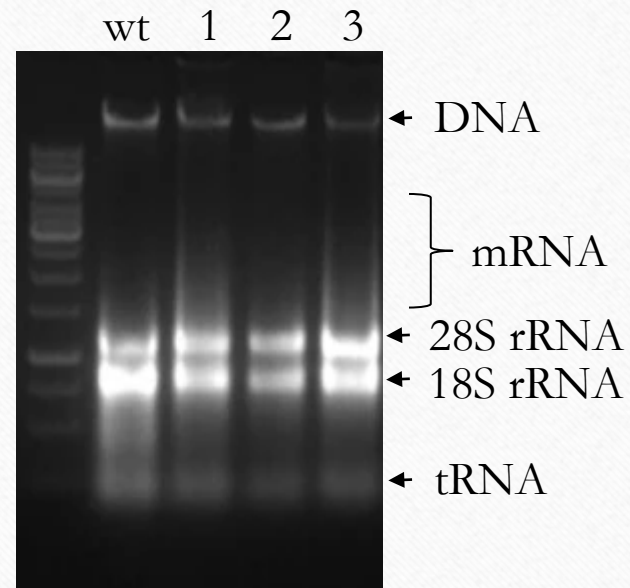


Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Vaš idući korak je utvrditi je li transgen *35S::OsRHP1* stvarno prekomjerno eksprimiran u Vašim generiranim transgeničnim biljkama. Prvo ste izolirali ukupnu RNA iz divljeg tipa i tri nezavisne transgenične linije (T2). Kako bi provjerili kvalitetu izolirane RNA?



Vaš idući korak je utvrditi je li transgen *35S::OsRHP1* stvarno prekomjerno eksprimiran u Vašim generiranim transgeničnim biljkama. Prvo ste izolirali ukupnu RNA iz divljeg tipa i tri nezavisne transgenične linije (T2). Kako bi provjerili kvalitetu izolirane RNA?



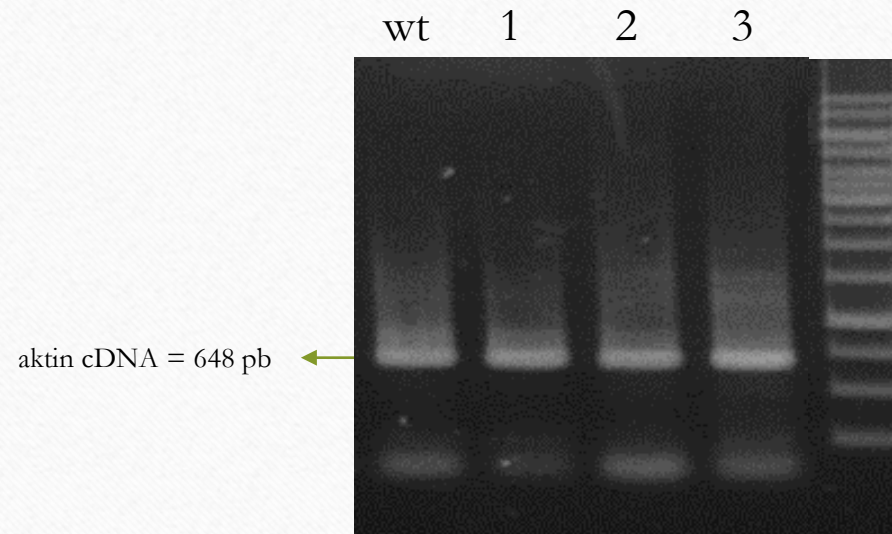
Kako biste riješili problem kontaminacije s DNA?

Tretman DNazom I

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Nakon izolacije i provjere RNA, RNA ste preveli u komplementarnu DNA (cDNA) reverznom transkripcijom (RT). Kako bi provjerili je li RT bila uspješna?

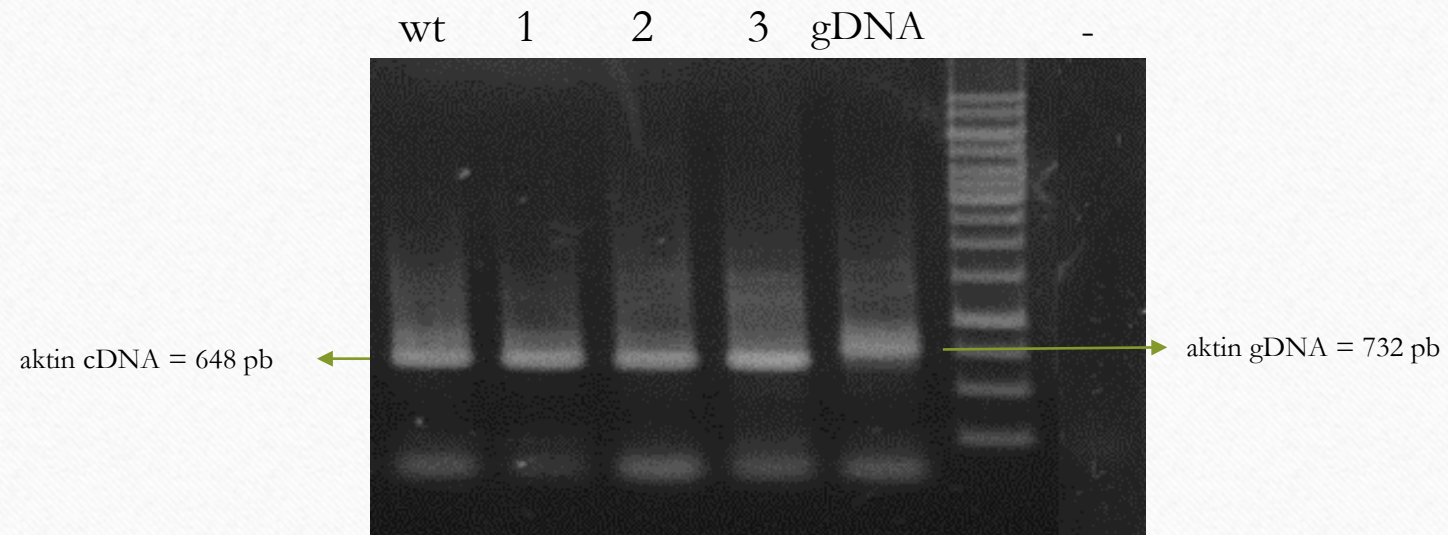
Umnažanje konstitutivno eksprimiranog gena (npr. aktin) metodom PCR - endogena kontrola



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Nakon izolacije i provjere RNA, RNA ste preveli u komplementarnu DNA (cDNA) reverznom transkripcijom (RT). Kako bi provjerili je li RT bila uspješna?

Umnažanje konstitutivno eksprimiranog gena (npr. aktin) metodom PCR - endogena kontrola

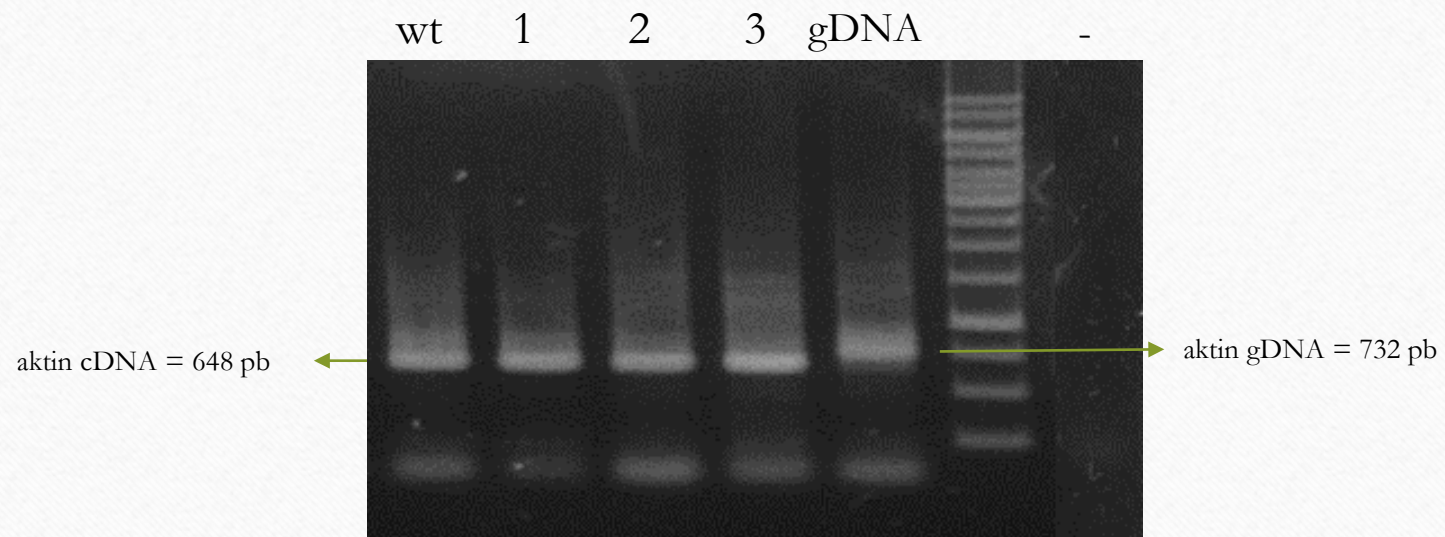


Aktin nam ovdje ujedno služi i kao pozitivna kontrola PCR reakcije (uzorak s genomskom DNA)

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Nakon izolacije i provjere RNA, RNA ste preveli u komplementarnu DNA (cDNA) reverznom transkripcijom (RT). Kako bi provjerili je li RT bila uspješna?

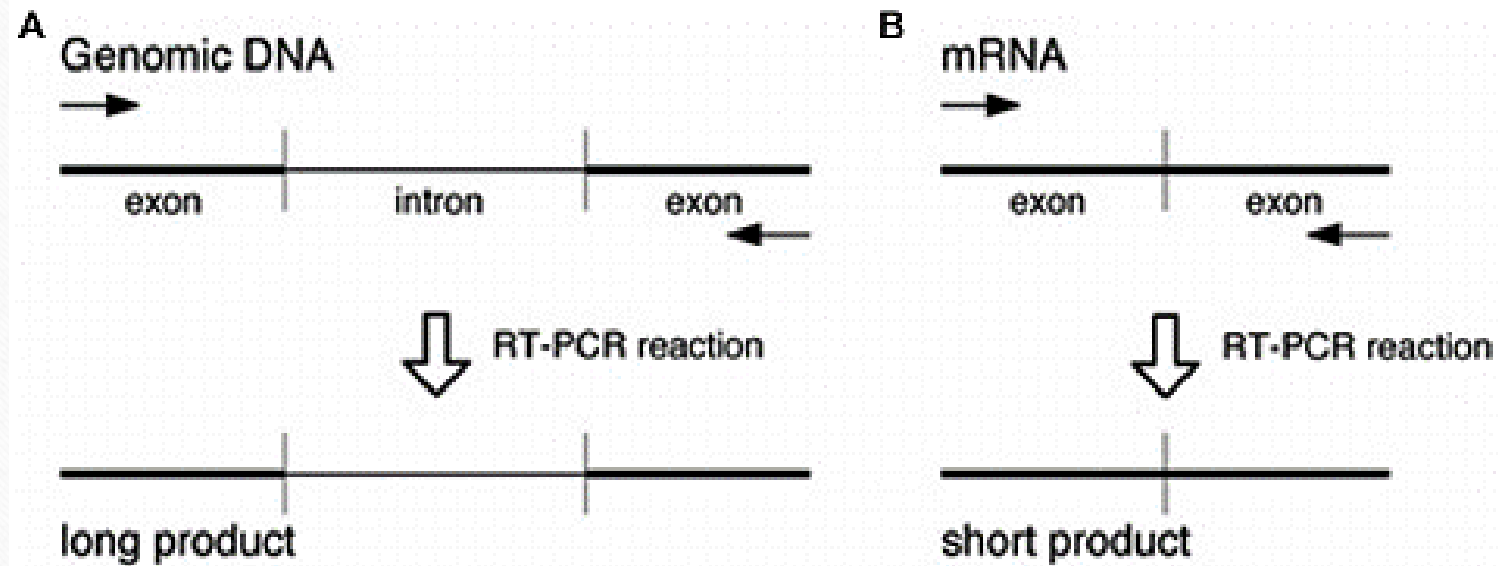
Umnažanje konstitutivno eksprimiranog gena (npr. aktin) metodom PCR - endogena kontrola



Aktin nam ovdje ujedno služi i kao pozitivna kontrola PCR reakcije (uzorak s genomskom DNA), ali može poslužiti i kao dodatna provjera kontaminacije cDNA genomskom DNA. Kako?

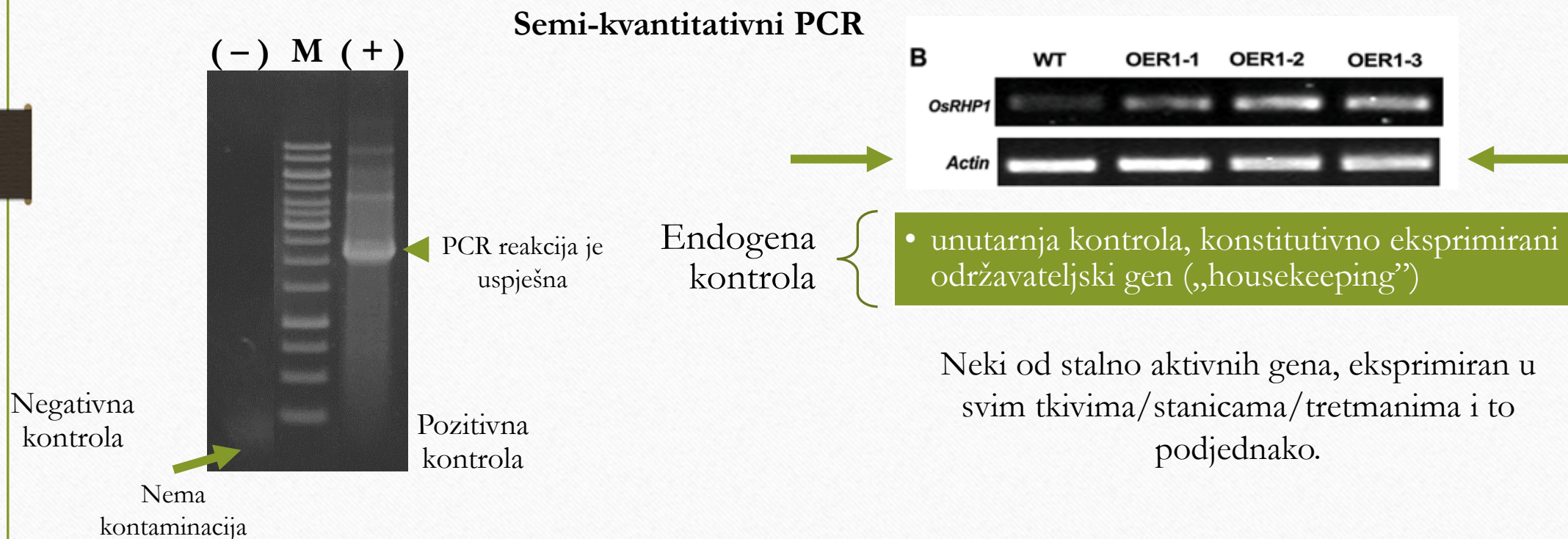
Kako možemo provjeriti je li nam cDNA kontaminirana genomskom DNA pomoću PCR reakcije?

Dizajn početnica!



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

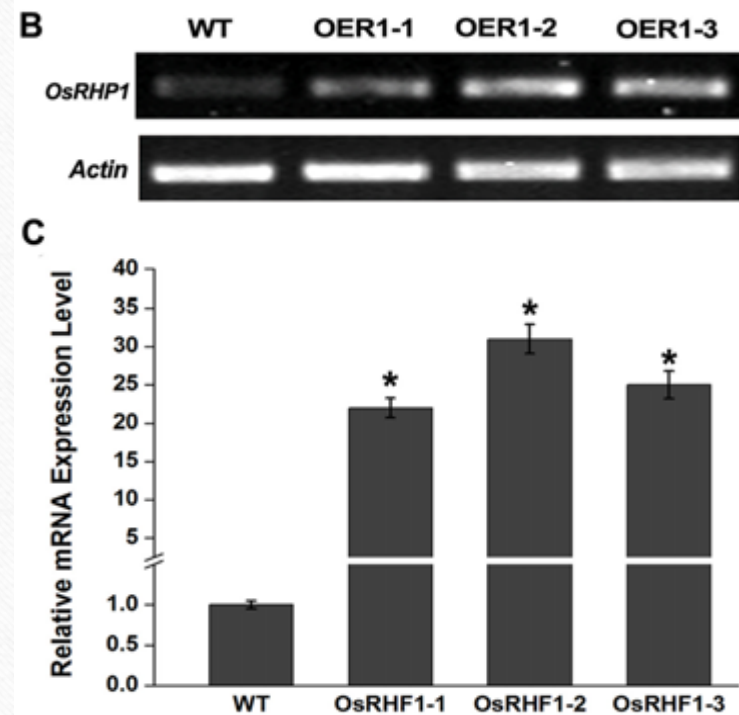
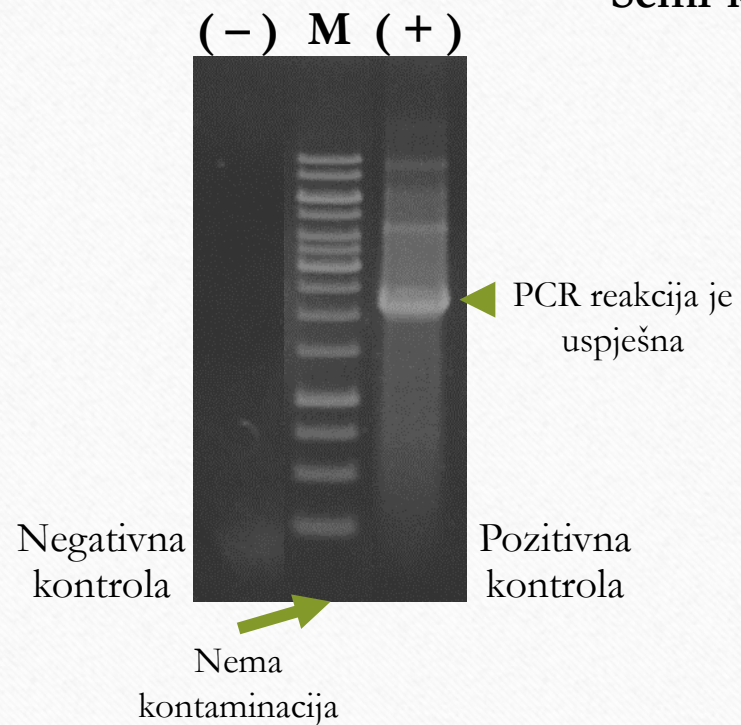
Nakon što ste utvrdili da je cDNA dobra, ekspresiju gena provjeravate semi-kvantitativnim PCR-om koji ćete potom provjeriti kvantitativnom PCR reakcijom u stvarnom vremenu (qPCR). Koje kontrole trebate koristiti u ovim eksperimentima?



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Nakon što ste utvrdili da je cDNA dobra, ekspresiju gena provjeravate semi-kvantitativnim PCR-om koji ćete potom provjeriti kvantitativnom PCR reakcijom u stvarnom vremenu (qPCR). Koje kontrole trebate koristiti u ovim eksperimentima?

Semi-kvantitativni PCR



Denzitometrijske metode kvantifikacije

Osim kontrola, što je još nužno imati u eksperimentu, a do sad nije spomenuto?

Hint:

- Ključan dio svakog eksperimentalnog dizajna
- Poništavaju utjecaj varijabilnosti među jedinkama
- Temelj statističke obrade rezultata!
- Eksperimentalne jedinice koje su prošle identične tretmane, neovisno jedna od druge

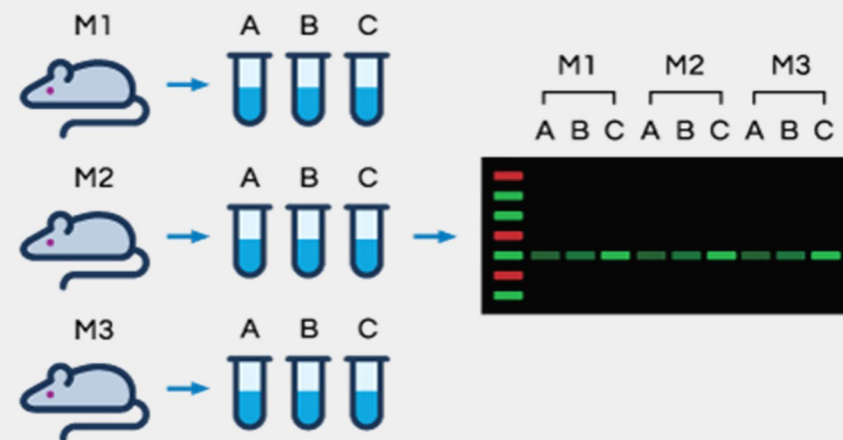
REPLIKE → Više replika = pouzdaniji rezultati!

Ključno je odrediti optimalan broj replika ovisno o istraživanju koje provodimo.

Vrste replika

Biološke replike

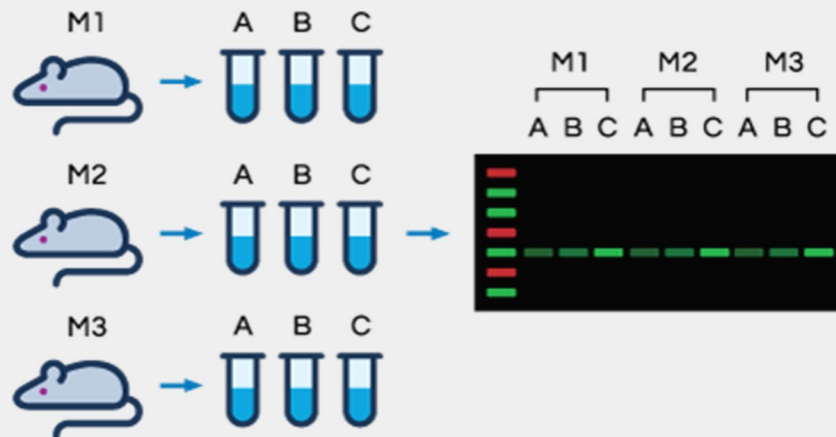
- Paralelna mjerenja biološki različitih uzoraka u istim uvjetima
- Poništavaju biološku varijabilnost među uzorcima
- Omogućuju generalizaciju bez obzira na varijabilnost
- Uvid je li razlika između pokusnih skupina nastala zbog učinka čimbenika koji mjerimo ili zbog slučajnosti



Vrste replika

Biološke replike

- Paralelna mjerenja biološki različitih uzoraka u istim uvjetima
- Poništavaju biološku varijabilnost među uzorcima



Tehničke replike

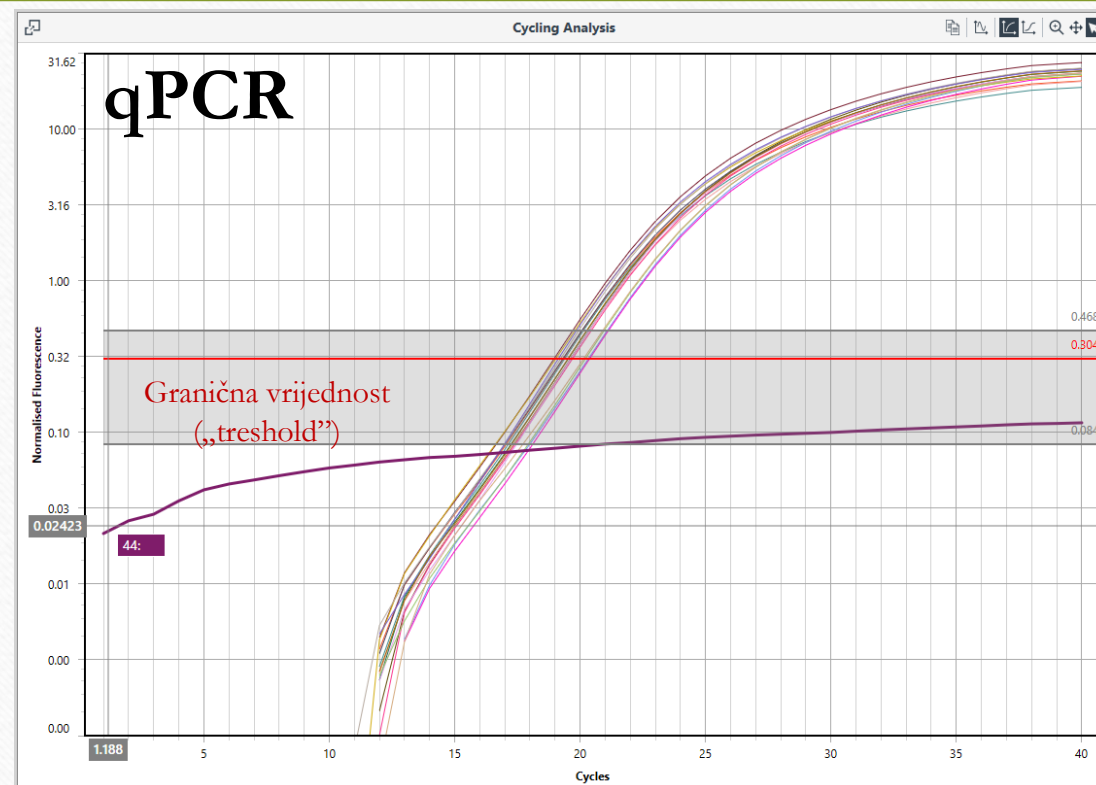
- Ponovljena mjerenja istog uzorka
- Poništavaju varijabilnost protokola
- Reproducibilnost tehnike!
- Ukazuju na valjanost mjerenja i greške u protokolu



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Vraćamo se našem eksperimentu i kontrolama. Vrijeme je za qPCR. Koje kontrole morate imati u ovom eksperimentu? Koje replike i koliko njih trebate imati?

Idealno bi u ovakvim eksperimentima trebalo imati 3 biološke replike, i za svaku biološku barem dvije tehničke.



Endogena kontrola

= npr. gen za aktin

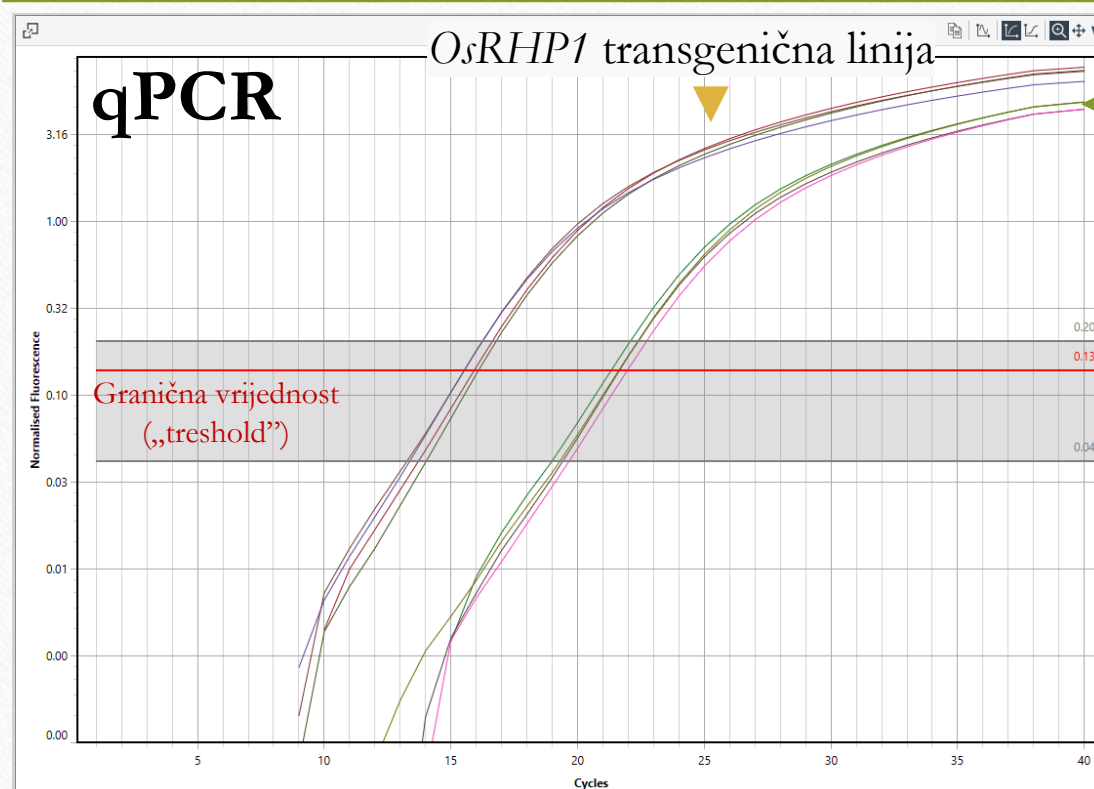
→ Za što točnije rezultate potrebno je koristiti barem 2 pomno odabrane endogene kontrole, idealno 3.

NTC = no template control

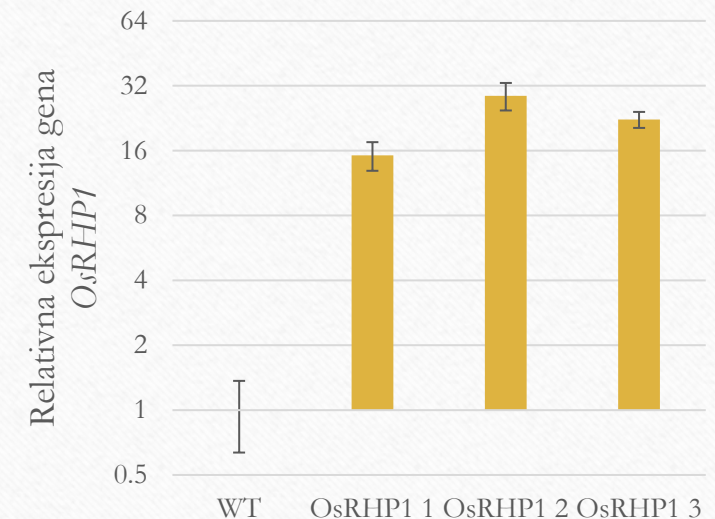


Negativna kontrola

Vraćamo se našem eksperimentu i kontrolama. Vrijeme je za qPCR. Koje kontrole morate imati u ovom eksperimentu? Što bi koristili kao replike?



Kontrolna grupa
= divlji tip



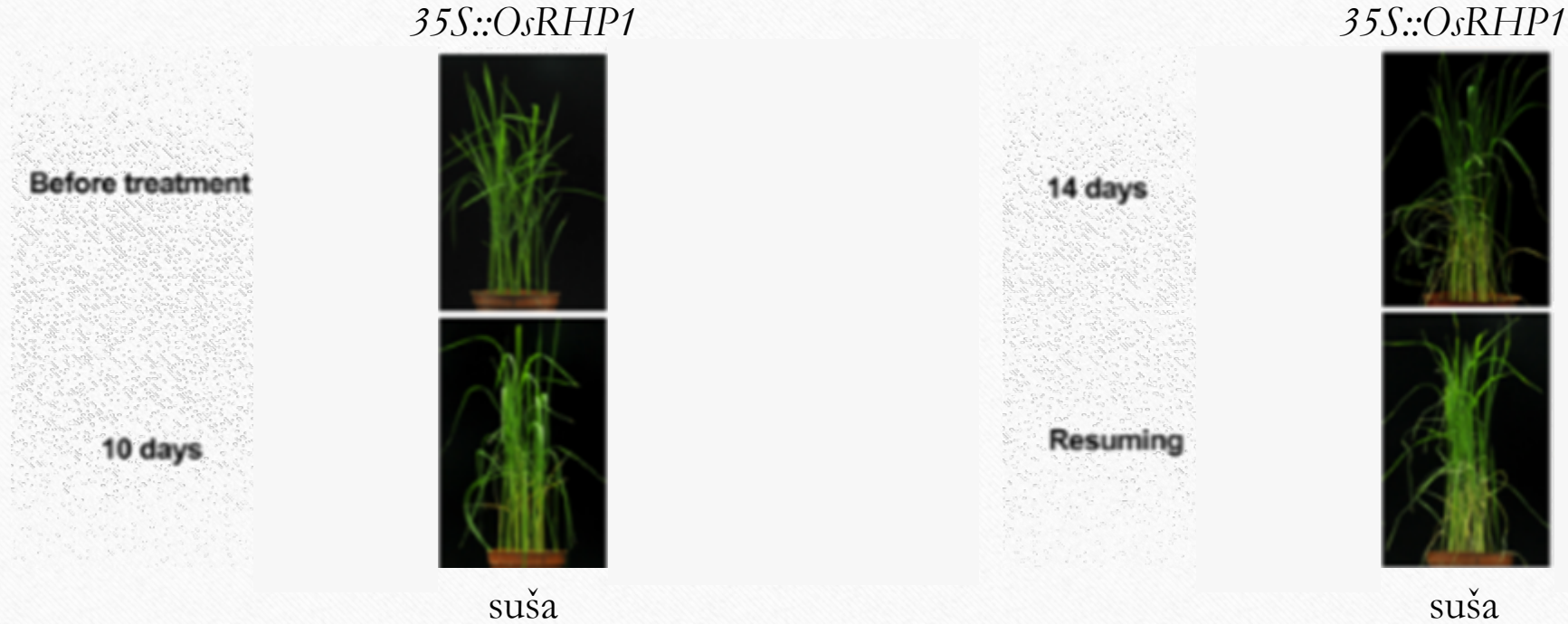
$$\Delta Ct (\text{uzorak}) = Ct (\text{gen od interesa}) - Ct (\text{endogena kontrola})$$



$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uzorak}) - \Delta Ct (\text{kontrolna grupa})$$

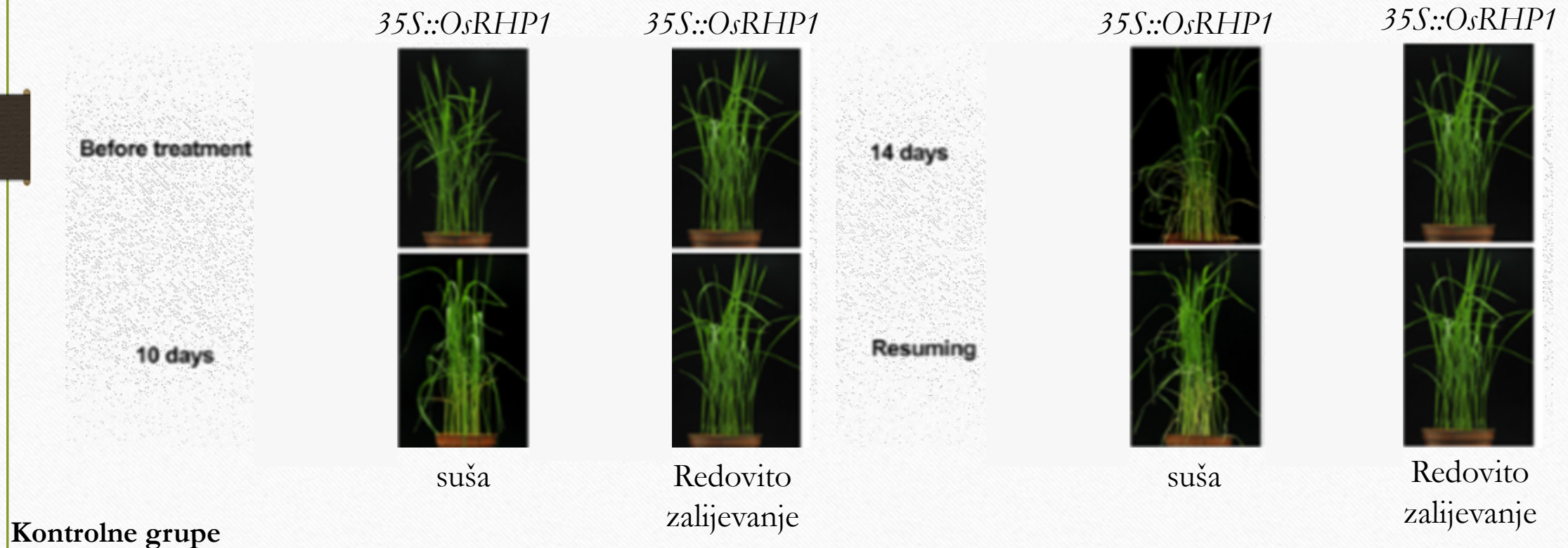
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Konačno ste došli do dijela gdje ćete testirati utjecaj suše na Vaše transgenične biljke. Tri tjedna stare biljke *35S::OsRHP1* uzgajane u standardnim uvjetima i do tad redovito zalijevane, izlažete suši na 10, 14 ili 22 dana te na kraju svakog perioda pregledavate biljke i bilježite promjene. Koje kontrole su nužne u ovom eksperimentu?



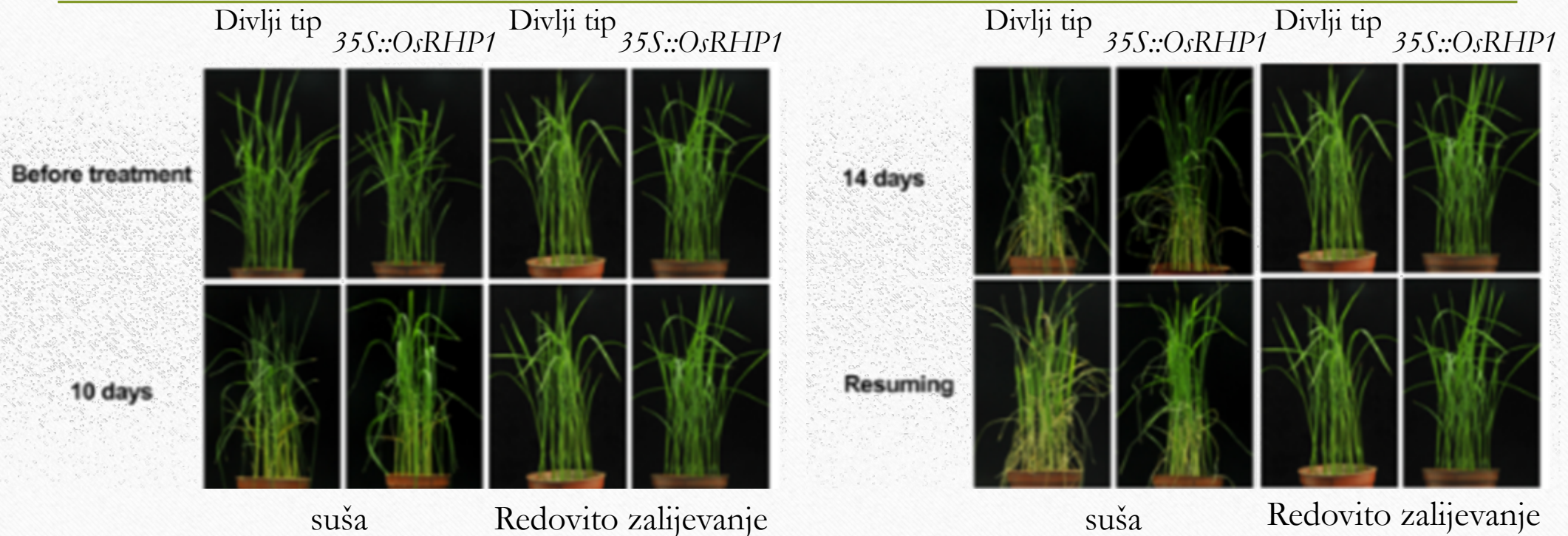
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Konačno ste došli do dijela gdje ćete testirati utjecaj suše na Vaše transgenične biljke. Tri tjedna stare biljke *35S::OsRHP1* uzgajane u standardnim uvjetima i do tad redovito zalijewane, izlažete suši na 10, 14 ili 22 dana te na kraju svakog perioda pregledavate biljke i bilježite promjene. Koje kontrole su nužne u ovom eksperimentu?



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Konačno ste došli do dijela gdje ćete testirati utjecaj suše na Vaše transgenične biljke. Tri tjedna stare biljke *35S::OsRHP1* uzgajane u standardnim uvjetima i do tad redovito zalijevane, izlažete suši na 10, 14 ili 22 dana te na kraju svakog perioda pregledavate biljke i bilježite promjene. Koje kontrole su nužne u ovom eksperimentu?



14 days

Resuming

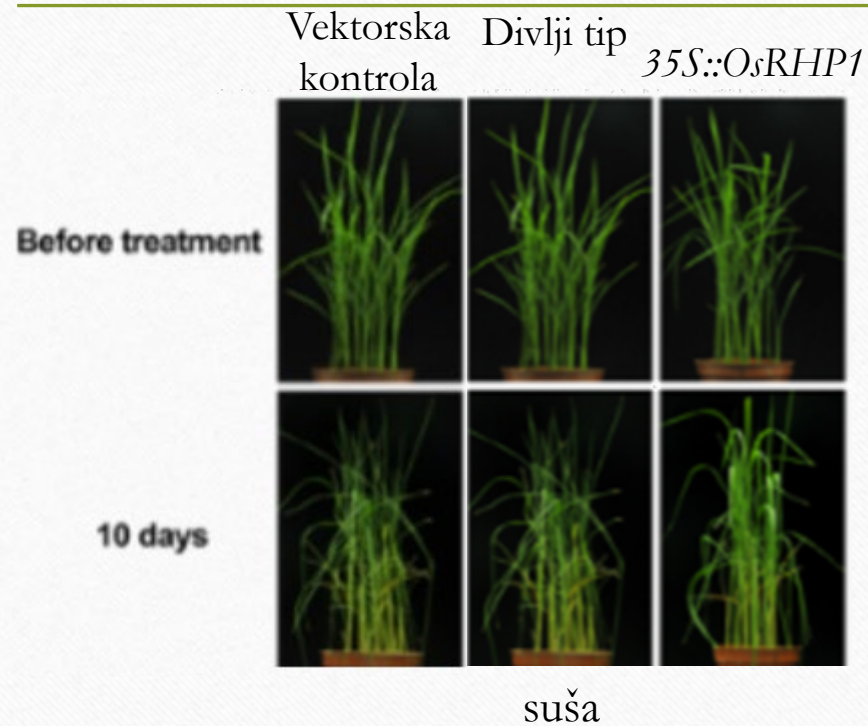
suša

Redovito zalijevanje

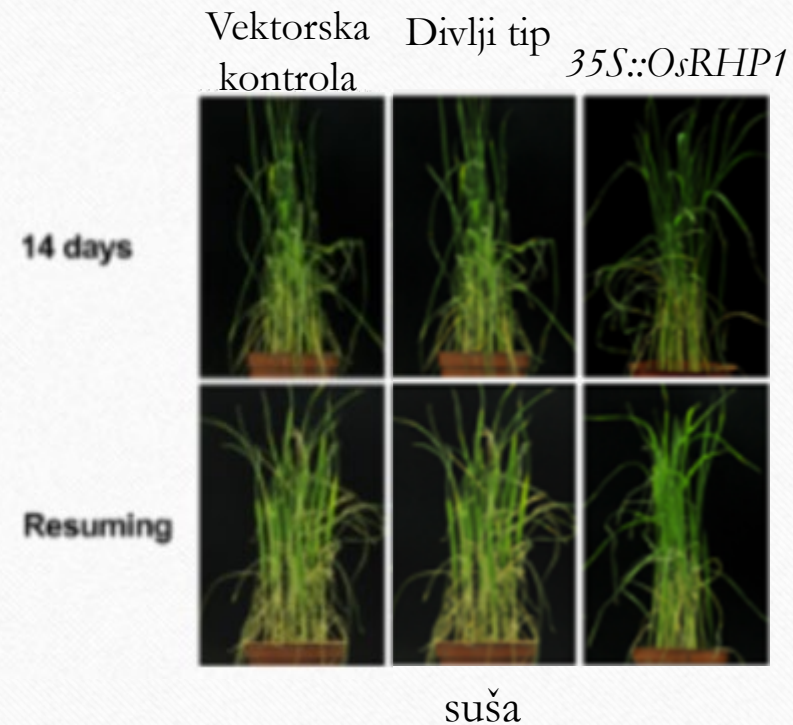
Kontrolne grupe

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Konačno ste došli do dijela gdje ćete testirati utjecaj suše na Vaše transgenične biljke. Tri tjedna stare biljke *35S::OsRHP1* uzgajane u standardnim uvjetima i do tad redovito zalijevane, izlažete suši na 10, 14 ili 22 dana te na kraju svakog perioda pregledavate biljke i bilježite promjene. Koje kontrole su nužne u ovom eksperimentu?



Kontrolne grupe



Plus sve navedene linije bez tretmana (redovito zalijevanje).

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Kromatinska imunoprecipitacija (ChIP)

Kromatinska imunoprecipitacija (ChIP)

day 1	Harvest cells and crosslink DNA to proteins.
day 2	Isolate nuclei. Lyse nuclei and sonicate chromatin.
day 3	Sonication check. ChIP – antibody binding.
day 4	Beads binding. Wash beads. Elute DNA.
day 5	Reverse crosslinking and precipitate DNA.

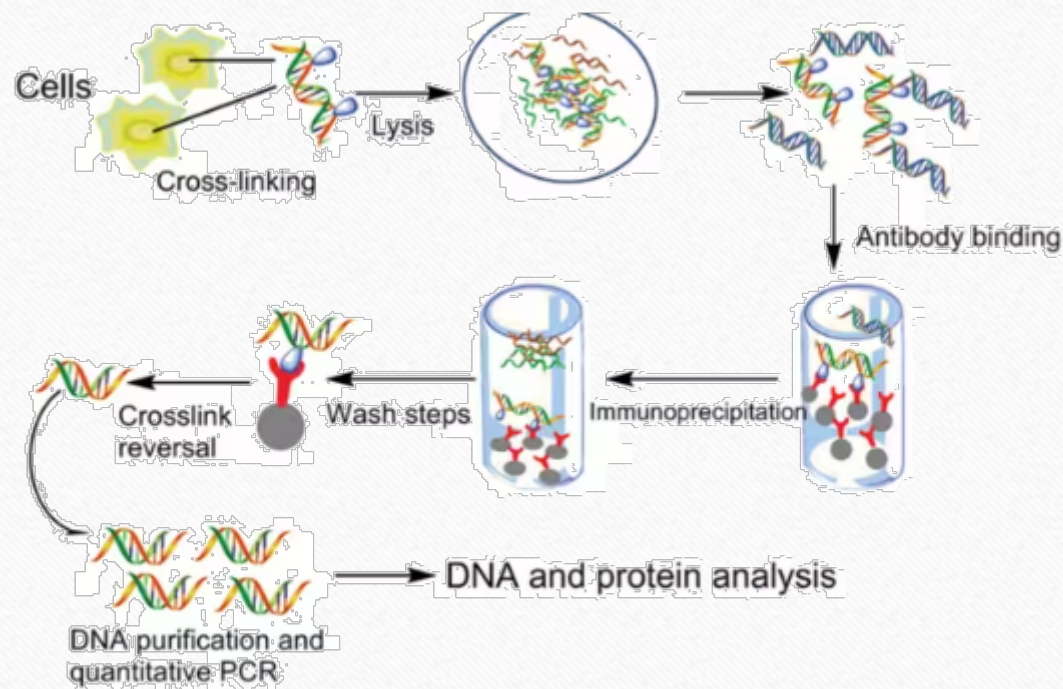


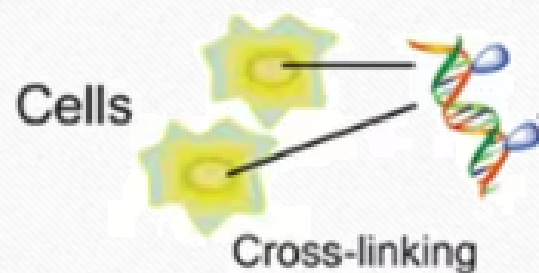
Figure 1. ChIP procedure workflow

Song et al., 2015

Kromatinska imunoprecipitacija je metoda koja se koristi za istraživanje interakcija između DNA i proteina unutar kromatina. Temeljni princip je da se DNA-vezujući proteini (primjerice transkripcijski faktori) mogu fiksirati za DNA na koju su vezani (crosslinking) i zatim uz pomoć specifičnog protutijela imunoprecipitirati. Iz istaloženih protein-DNA kompleksa se zatim razdvoji DNA od proteina te se vezna mjesta mogu dalje analizirati metodom qPCR ili pak sekvencirati.

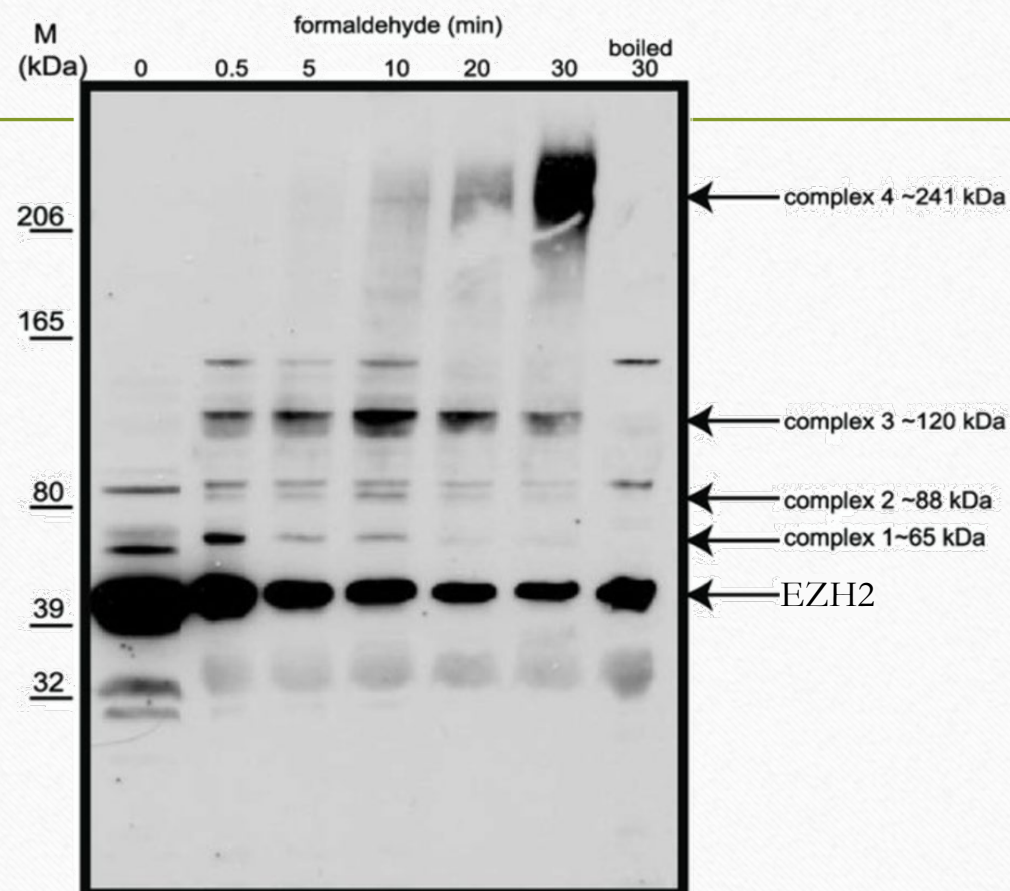
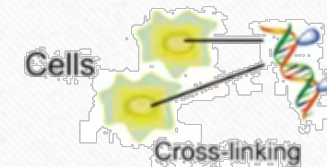
Želite istražiti koja su sve potencijalna mjesta vezanja metiltransferaze EZH2 na genom stanica raka prostate (stanična linija LNCaP). Primarna uloga enzima EZH2 je metilacija lizina u histonu H3 (H3K27), ali i nekih drugih proteina u stanicama sisavaca pri čemu dolazi do transkripcijskog utišavanja. Ukoliko je ova metiltransferaza mutirana, dolazi do promijenjene genske ekspresije i posljedično do razvoja karcinoma. Metoda koju provodite je ChIP, a tijekom cijelog eksperimenta vrlo je važno voditi računa da sve potrebne kontrole budu provedene.

Prvi korak u eksperimentu je uzorkovanje stanica i fiksiranje protein-DNA interakcija u kromatinu (crosslinking). A osnova za daljnji tijek eksperimenta je potvrda da su protein-DNA interakcije stvarno fiksirane. Ovo ćemo testirati imunodetekcijom koristeći antitijelo koje veže naš protein od interesa EZH2 (anti-EZH2). Koje kontrole su nam ovdje potrebne?

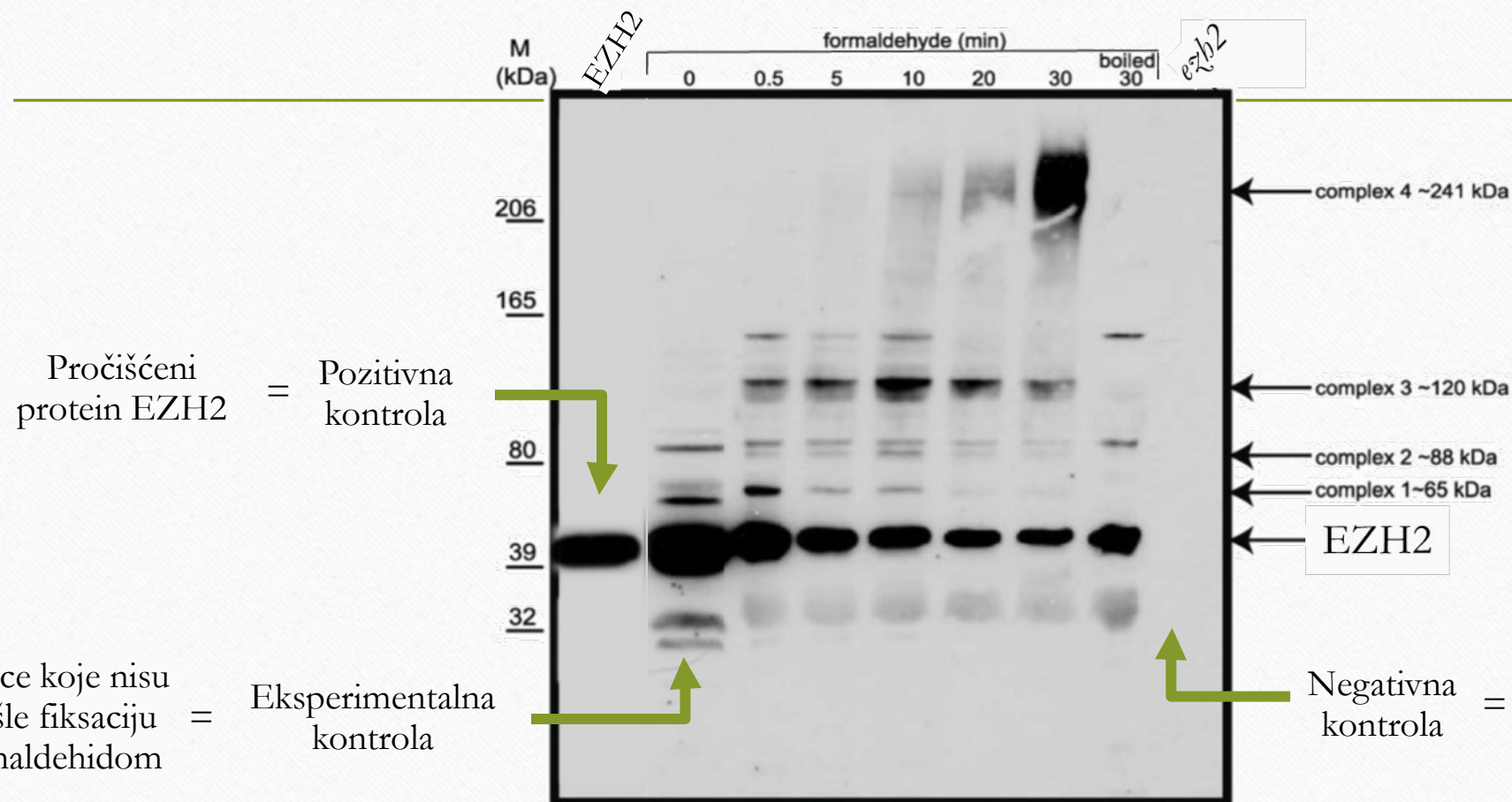
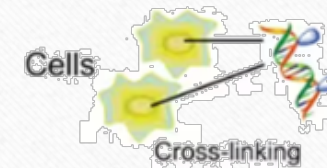


day 1	Harvest cells and crosslink DNA to proteins.
-------	--

Prvi korak u eksperimentu je uzorkovanje stanica i fiksiranje protein-DNA interakcija u kromatinu pomoću formaldehida (crosslinking). A osnova za daljnji tijek eksperimenta je potvrda da su protein-DNA interakcije stvarno fiksirane te koje je vrijeme fiksacije optimalno. Ovo ćemo testirati imunodetekcijom koristeći antitijelo koje veže naš protein od interesa EZH2 (anti-EZH2). Koje kontrole su nam ovdje potrebne?

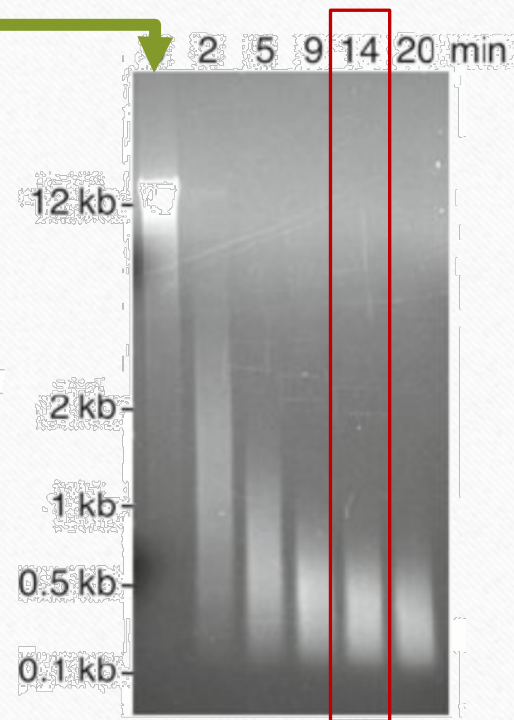
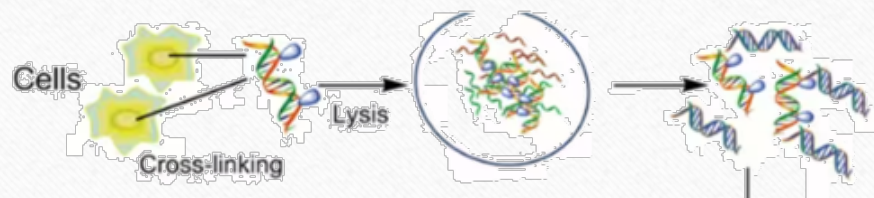


Prvi korak u eksperimentu je uzorkovanje stanica i fiksiranje protein-DNA interakcija u kromatinu pomoću formaldehida (crosslinking). A osnova za daljnji tijek eksperimenta je potvrda da su protein-DNA interakcije stvarno fiksirane te koje je vrijeme fiksacije optimalno. Ovo ćemo testirati imunodetekcijom koristeći antitijelo koje veže naš protein od interesa EZH2 (anti-EZH2). Koje kontrole su nam ovdje potrebne?



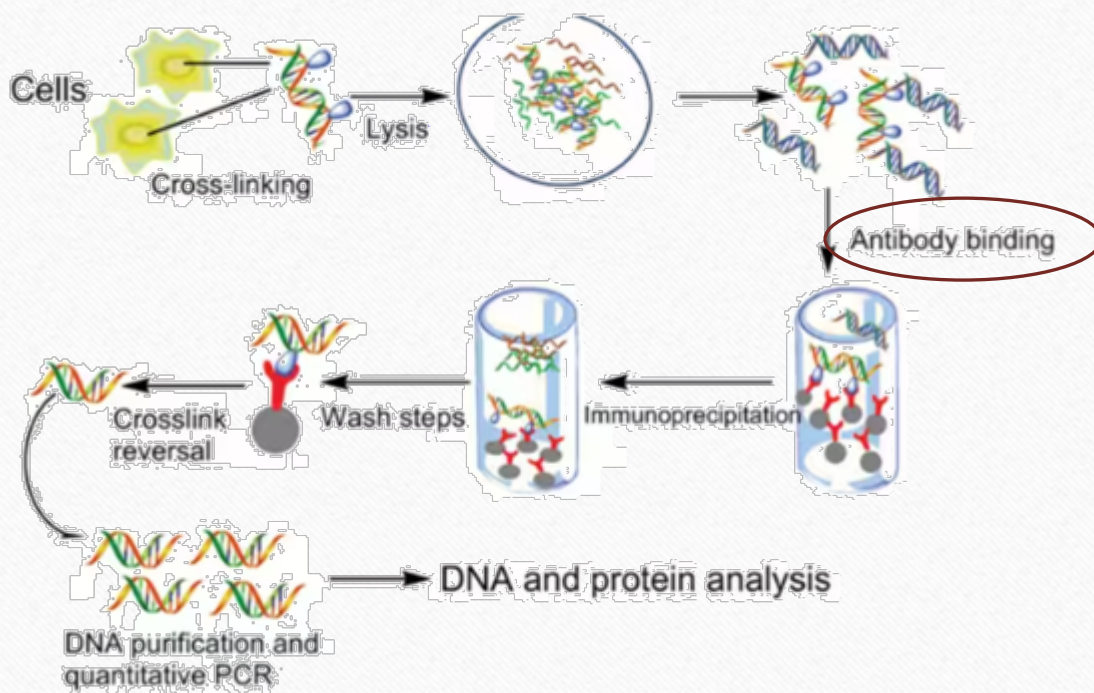
Utvdili ste da su interakcije između DNA i proteina fiksirane i zaključili ste kako je optimalno vrijeme fiksacije 10 min jer tako hvatate komplekse različitih veličina. Sljedeći korak je izolacija jezgri, liza jezgri te fragmentacija kromatina sonikacijom. Kako bi provjerili je li sonikacija bila uspješna?

Uzorak koji nije sonificiran = Eksperimentalna kontrola



day 1	Harvest cells and crosslink DNA to proteins.
day 2	Isolate nuclei. Lyse nuclei and sonicate chromatin.
day 3	Sonication check.

Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA koji se potom analiziraju metodom qPCR za očekivana vezna mjesta, odnosno sekvenciranjem kako bi se otkrila nova vezna mjesta proteina EZH2 na genomu.

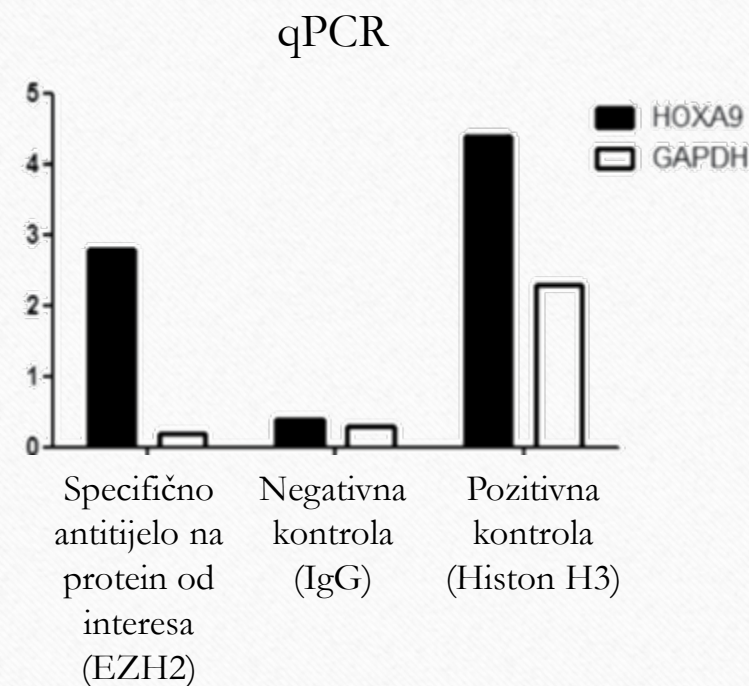


day 1	Harvest cells and crosslink DNA to proteins.
day 2	Isolate nuclei. Lyse nuclei and sonicate chromatin.
day 3	Sonication check. ChIP – antibody binding.
day 4	Beads binding. Wash beads. Elute DNA.
day 5	Reverse crosslinking and precipitate DNA.

Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA koji se potom analiziraju metodom qPCR za očekivana vezna mjesta, odnosno sekvenciranjem kako bi se otkrila nova vezna mjesta proteina EZH2 na genomu.

Ovo je ključan korak u kojem je bitno imati sve potrebne kontrole:

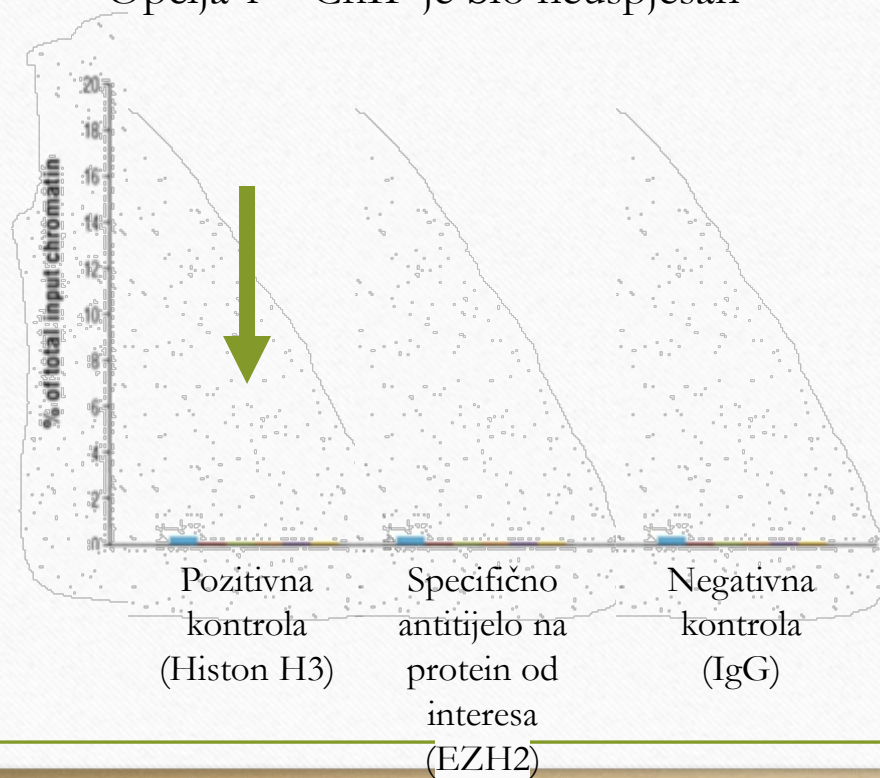
- Pozitivna kontrola – imunoprecipitacija pomoću antitijela koje će se vezati na sekvence DNA, neovisno o aktivnosti lokusa koji se istražuju u eksperimentu. U tu svrhu najčešće se koristi antitijelo koje se veže na sve varijante histona H3 (Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated)).
- Negativna kontrola (tzv. „mock” uzorak) – imunoprecipitacija pomoću antitijela koje ne prepoznaje specifične epitope te se koristi za detekciju nespecifičnih vezanja (npr. IgG iz kunića)



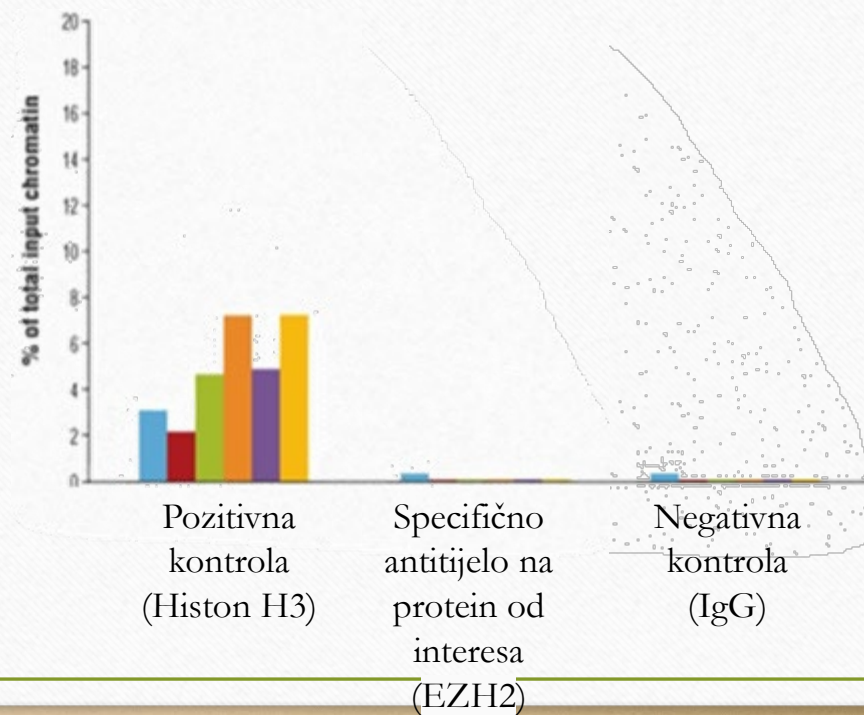
HOXA9 = poznato vezno mjesto histona H3 i proteina EZH2 (pozitivna kontrola)
 GAPDH = lokus za koji je poznato da se na njega ne veže EZH2 (negativna kontrola)

Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA koji se potom analiziraju metodom qPCR za očekivana vezna mjesta, odnosno sekvenciranjem kako bi se otkrila nova vezna mjesta proteina EZH2 na genomu.

Opcija 1 – ChIP je bio neuspješan



Opcija 2 – ChIP je uredi, ali specifično antitijelo (anti-EZH2) ne radi



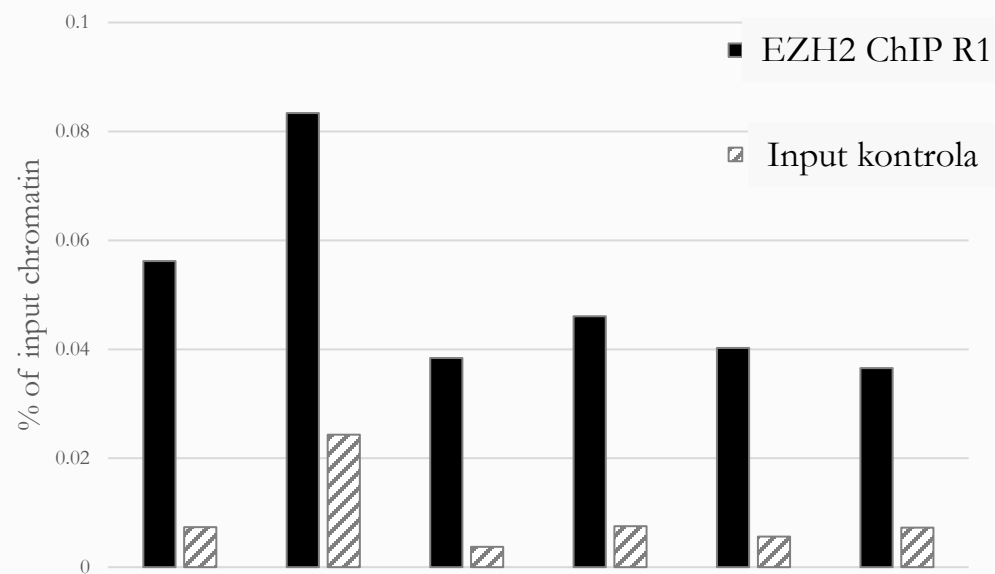
Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA koji se potom analiziraju metodom qPCR za očekivana vezna mjesta, odnosno sekvenciranjem kako bi se otkrila nova vezna mjesta proteina EZH2 na genomu.

Ovo je ključan korak u kojem je bitno imati sve potrebne kontrole:

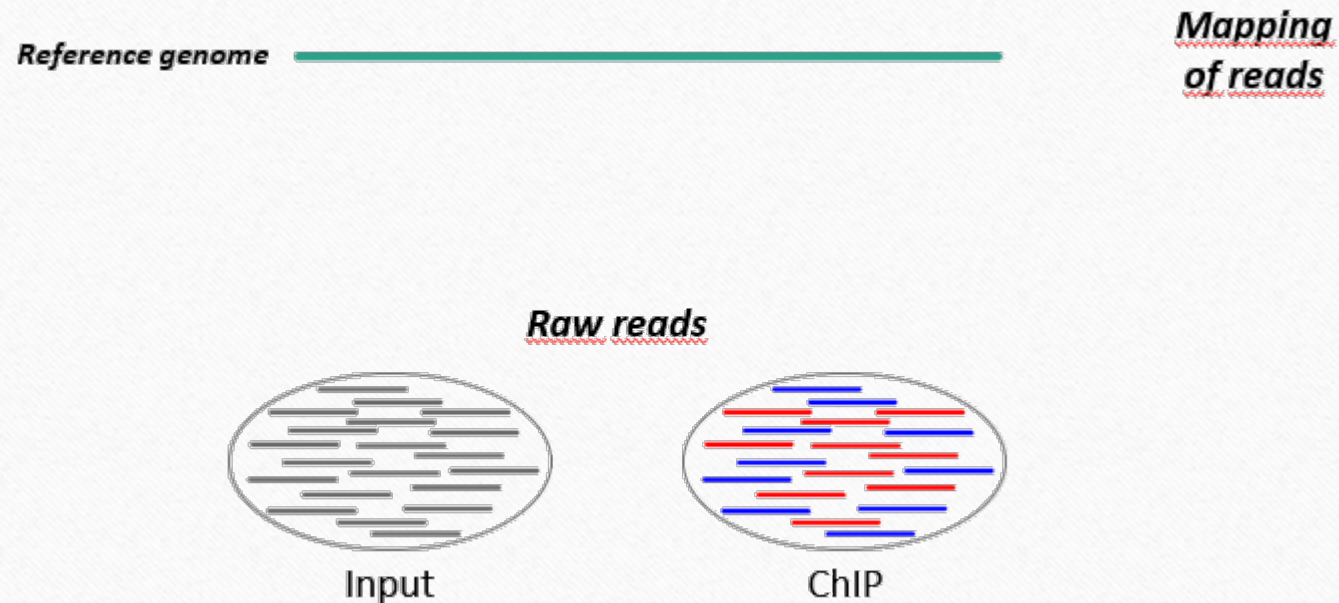
- Pozitivna kontrola – antitijelo koje će se vezati na sekvence DNA, neovisno o aktivnosti lokusa koji se istražuju u eksperimentu. U tu svrhu najčešće se koristi antitijelo koje se veže na sve varijante histona H3 poput Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated).
- Negativna kontrola (tzv. „mock” uzorak) – antitijelo koje ne prepoznaje specifične epitope te se koristi za detekciju nespecifičnih vezanja (npr. IgG iz kunića)
- „Input” kontrola – uzorak koji je prošao crosslinking i fragmentaciju, ali ne i imunoprecipitaciju. Ova kontrola se koristi jer sonikacija nije u potpunosti nasumičan proces te se ovime eliminiraju lažno pozitivni rezultati

Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA koji se potom analiziraju metodom qPCR za očekivana vezna mjesta, odnosno sekvenciranjem kako bi se otkrila nova vezna mjesta proteina EZH2 na genomu.

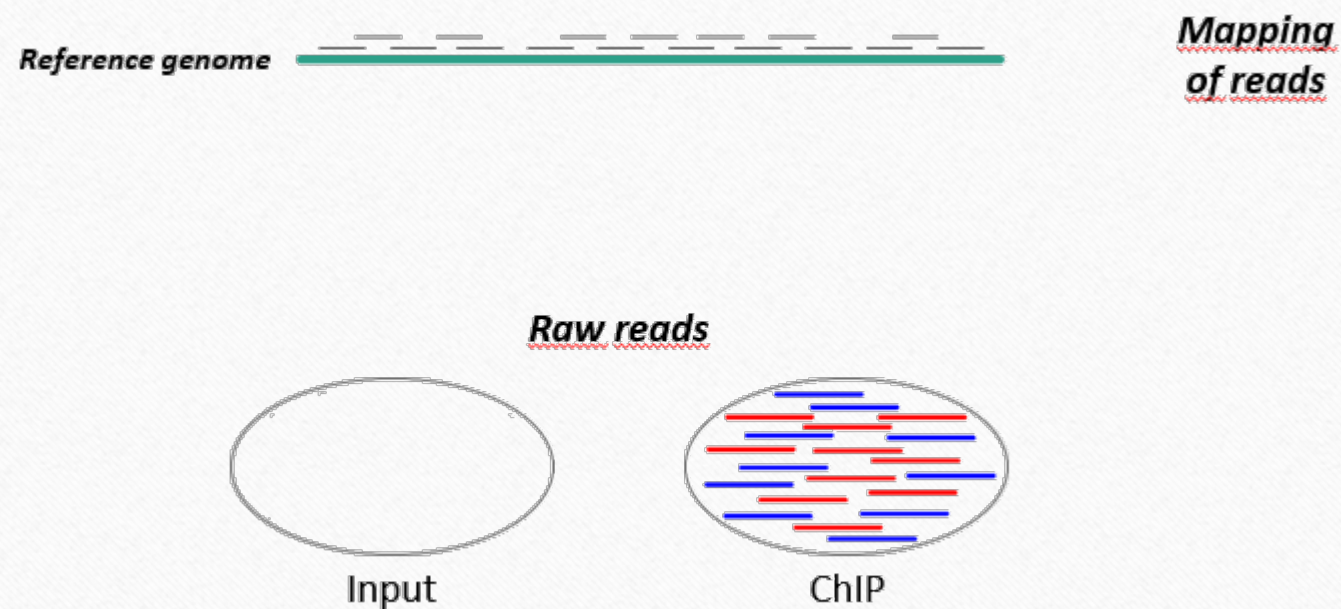
- „Input” kontrola – uzorak koji je prošao crosslinking i fragmentaciju, ali ne i imunoprecipitaciju. Ova kontrola se koristi jer sonikacija nije u potpunosti nasumičan proces te se ovime eliminiraju lažno pozitivni rezultati



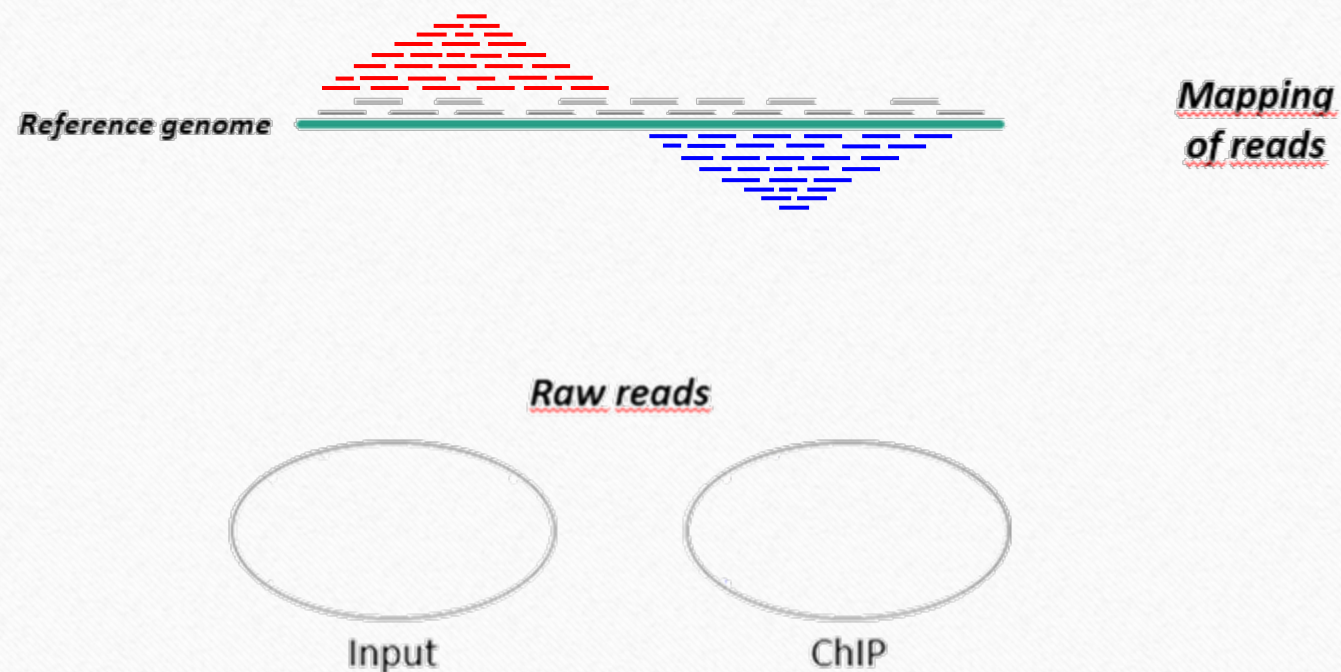
Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.



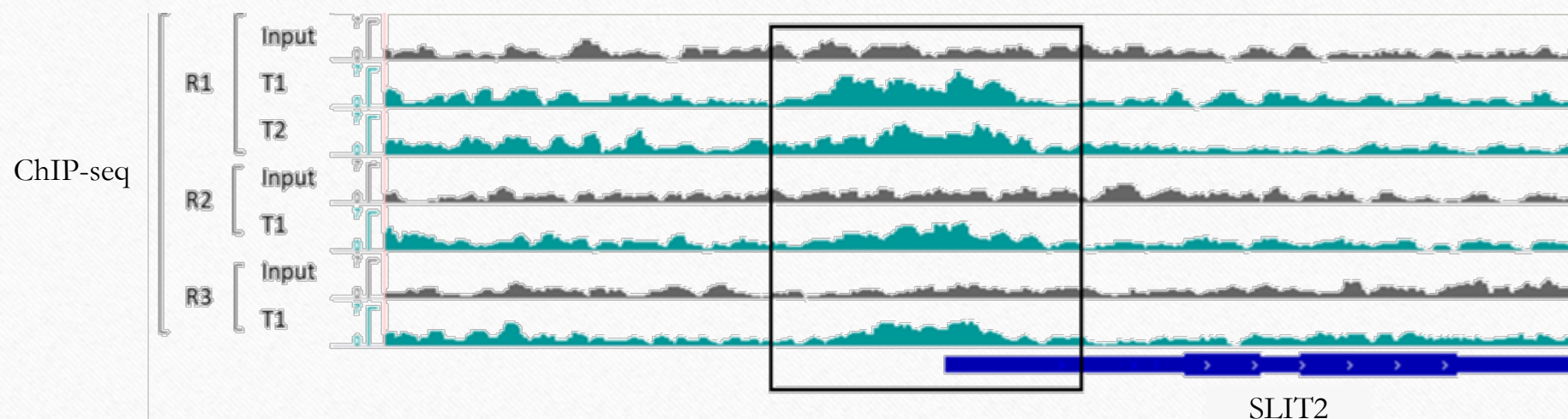
Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.



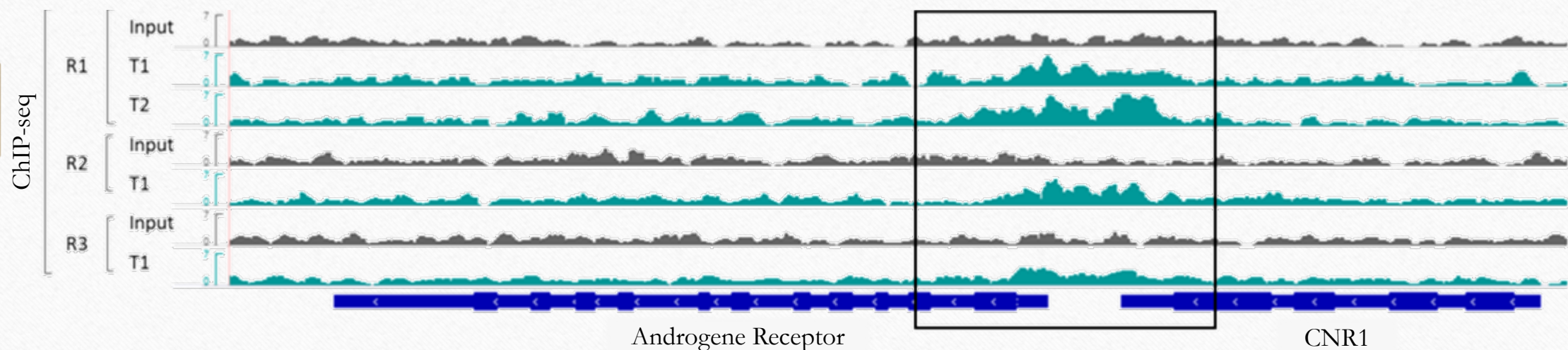
Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.



Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.

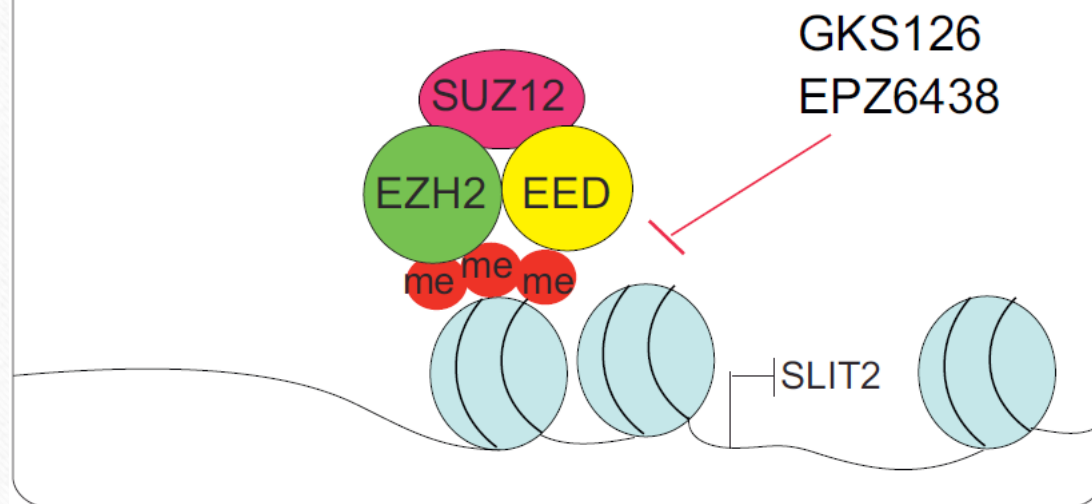


Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.

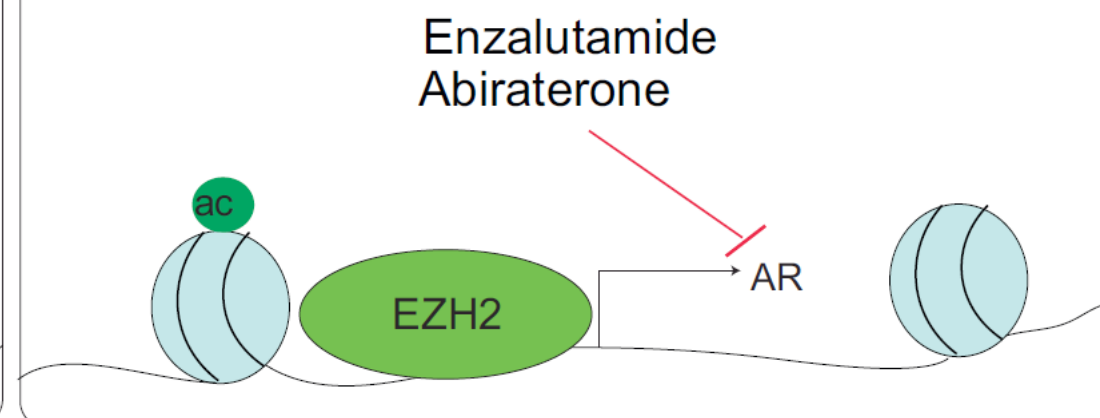


Dvostruka uloga EZH2

EZH2 as a repressor



EZH2 as an activator



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

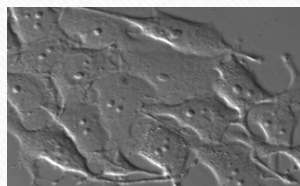
Unutarstanična lokalizacija (mikroskopijske tehnike)

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

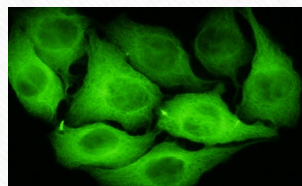
Istražujete utjecaj gama zračenja na unutarstaničnu lokalizaciju kinaza NME1 i NME2 u stanicama HeLa. Gama zračenje uzrokuje oštećenja DNA, dok su kinaze NME1 i NME2 uključene u popravak oštećene DNA te sprečavanje nastanka metastatskih stanica. U istraživanju koristite epifluorescencijski mikroskop, a proteini od interesa NME1 i NME2 obilježeni su fluorescentnim proteinima (GFP i RFP).

Prvi korak je trajna transformacija stanica fluorescentno obilježenim proteinima NME1 i NME2 te pod mikroskopom provjeravate je li transformacija bila uspješna. Koje kontrole morate imati?

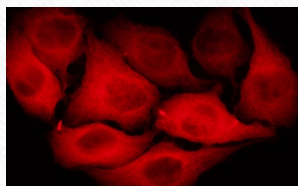
Svijetlo polje



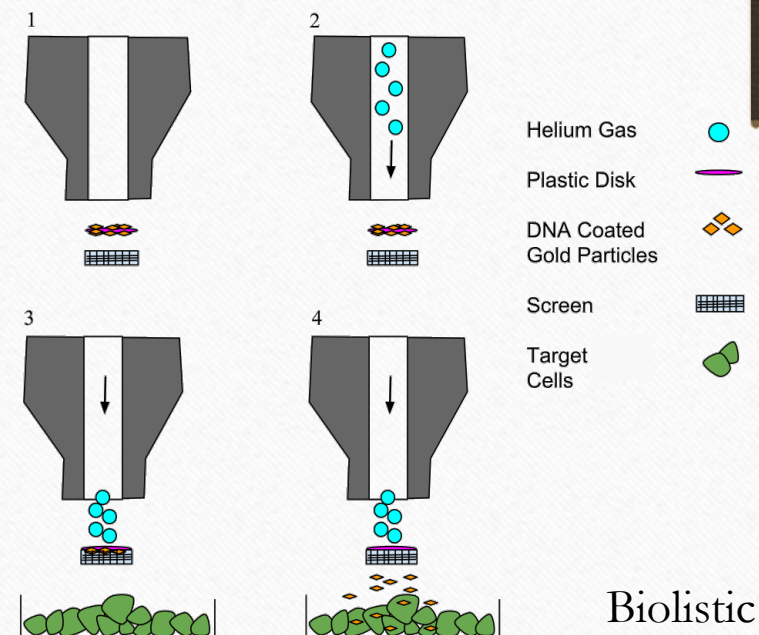
GFP



RFP

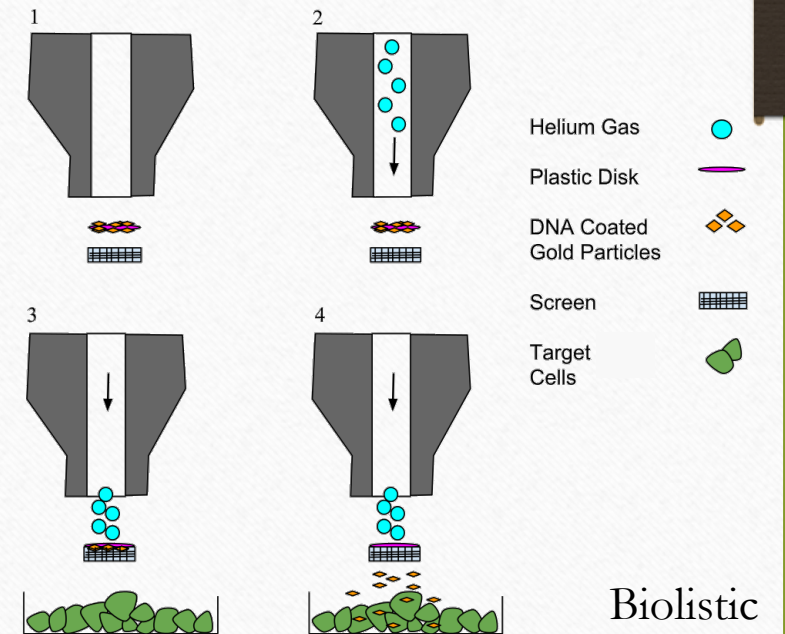
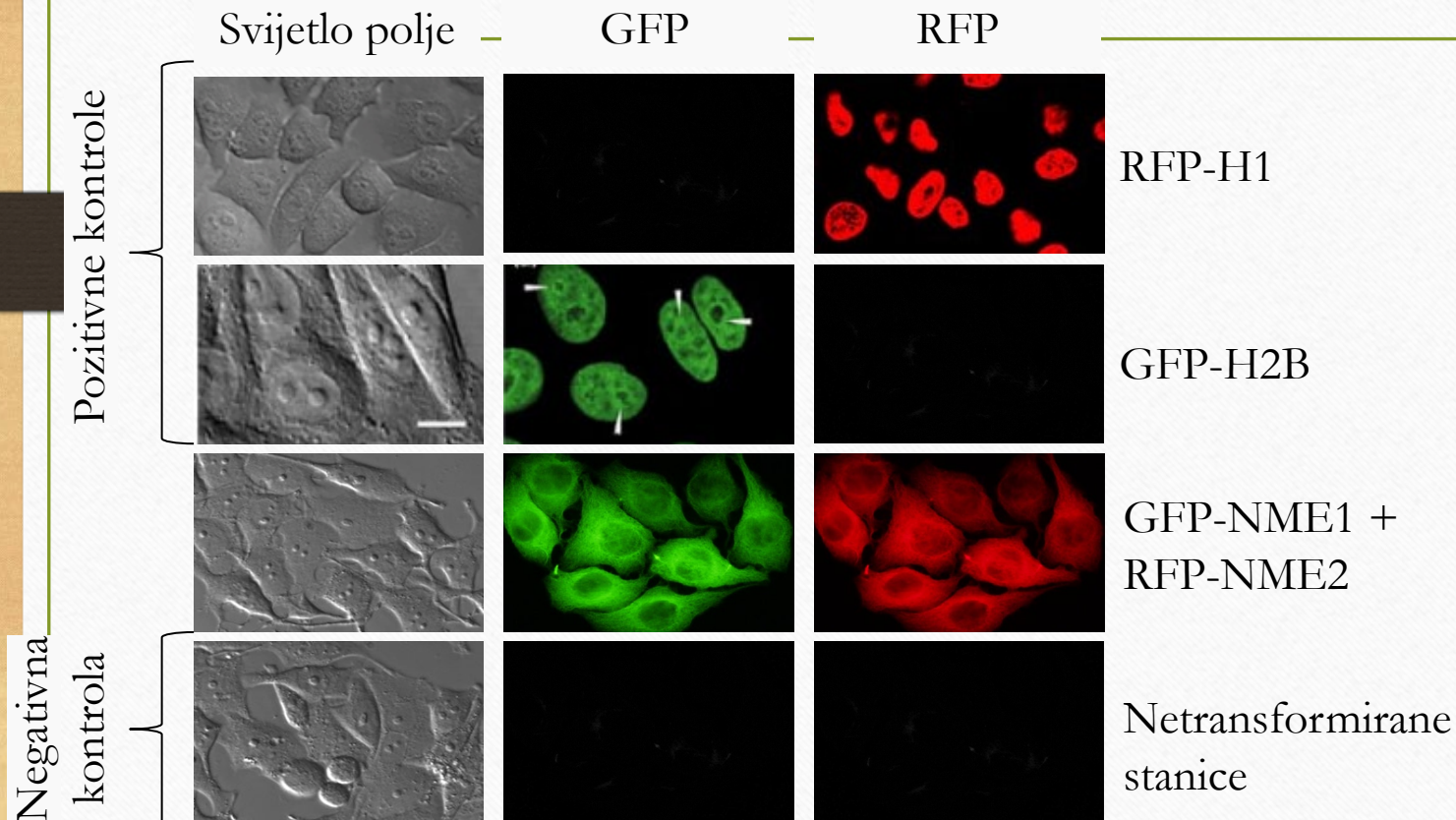


GFP-NME1 +
RFP-NME2



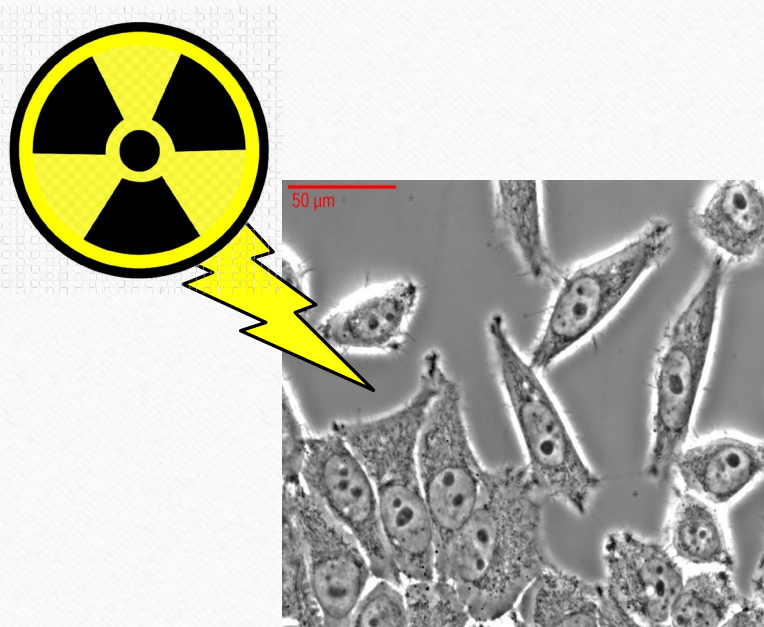
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Prvi korak je trajna transformacija stanica fluorescentno obilježenim proteinima NME1 i NME2 te pod mikroskopom provjeravate je li transformacija bila uspješna. Koje kontrole morate imati?

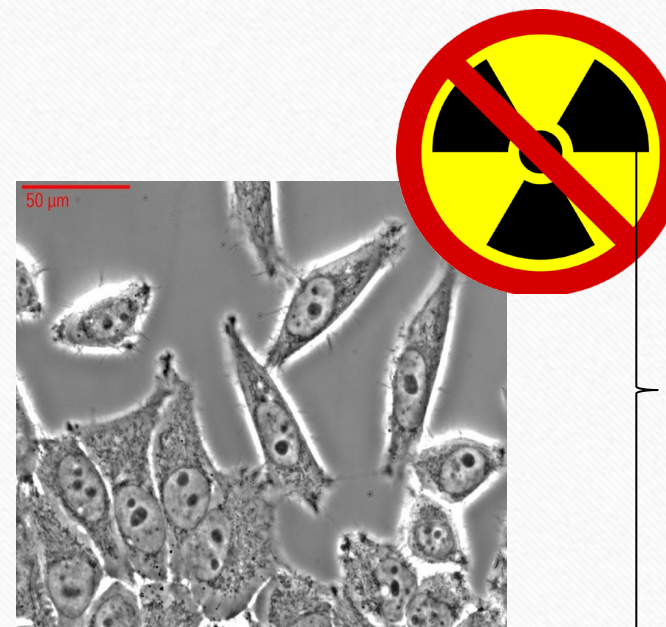


Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Idući korak je zračenje stanica te promatranje unutarstanične lokalizacije NME1 i NME2 kako bi utvrdili dolazi li do promjene u njihovoj lokalizaciji. Koje kontrole morate imati?



Tretirane stanice

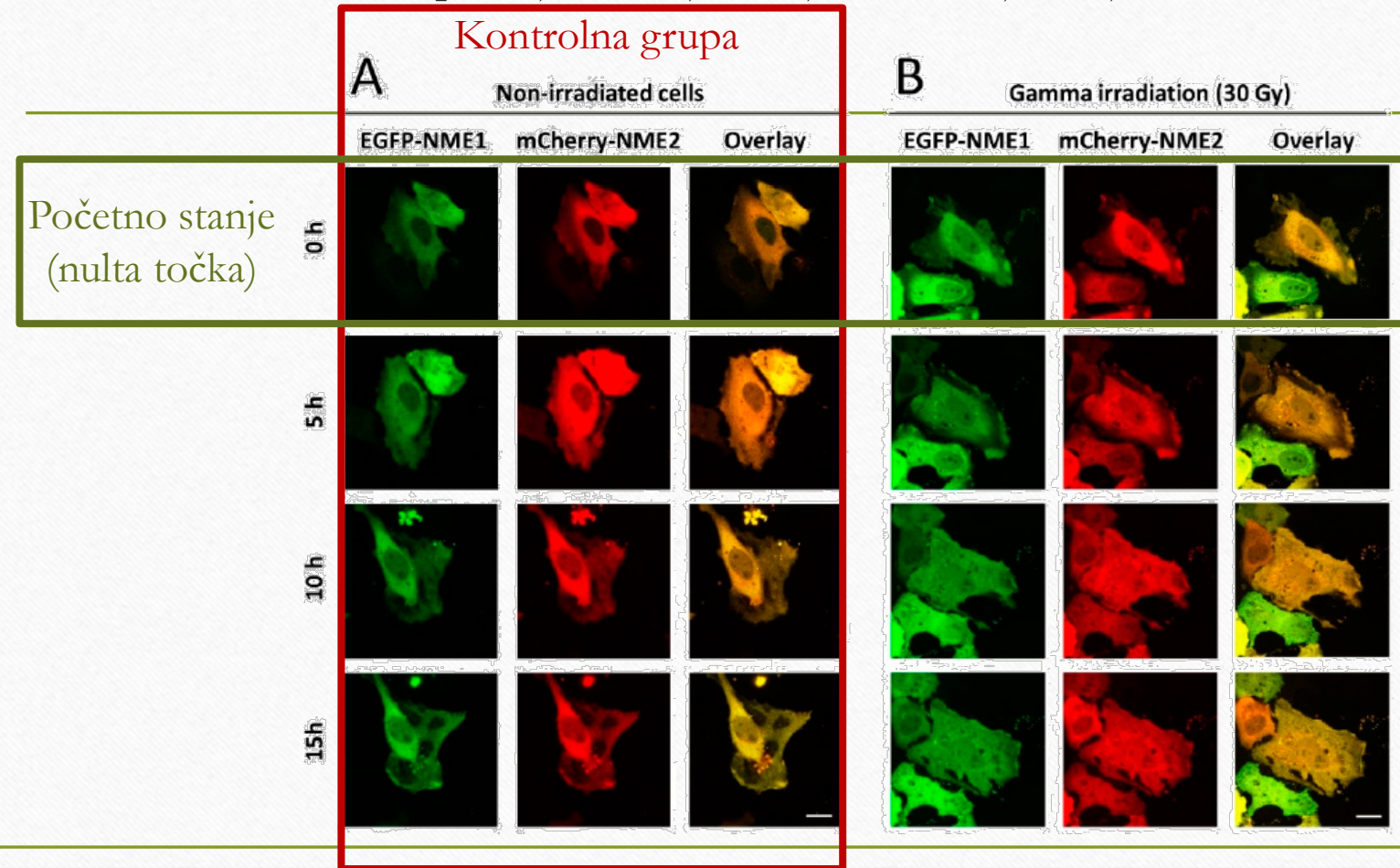


Netretirane stanice

} Kontrolna grupa

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

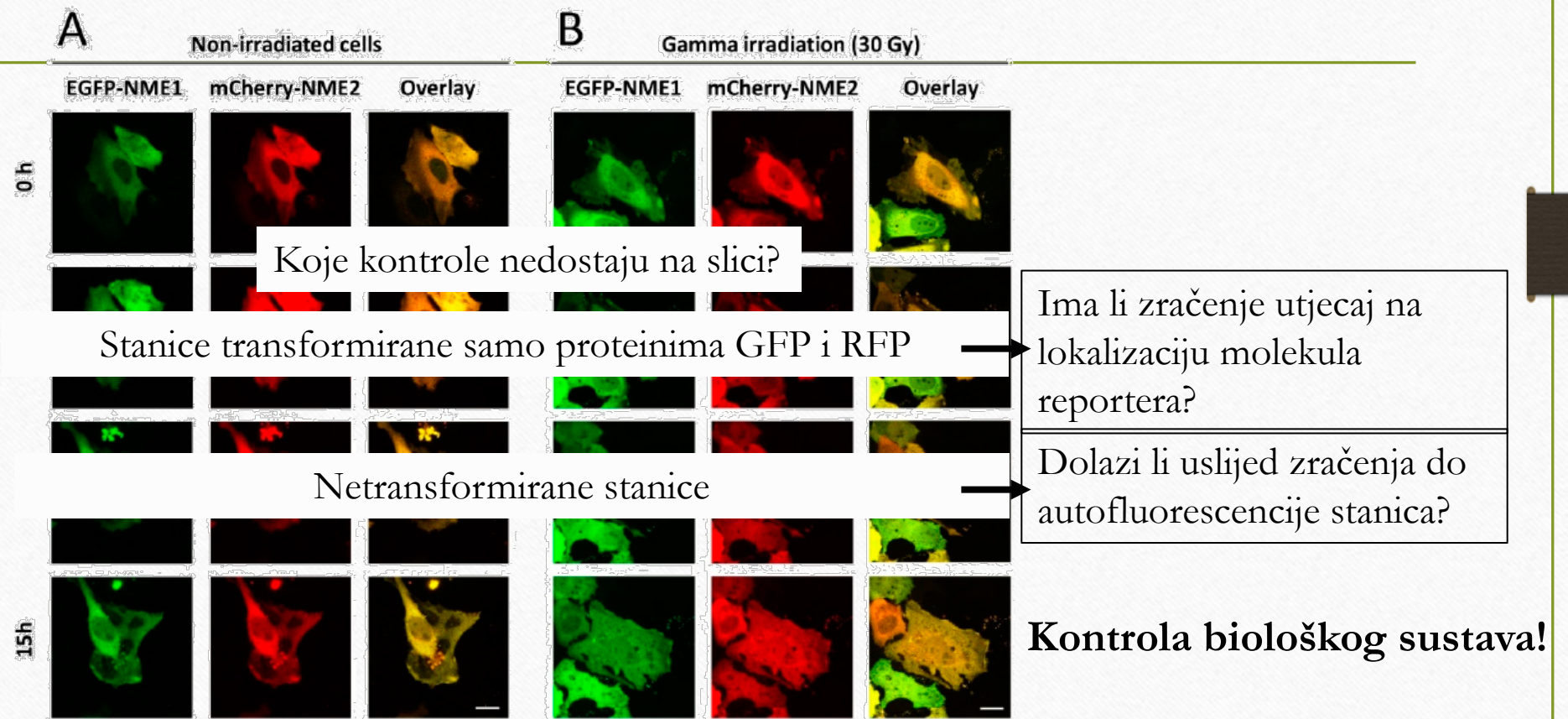
Idući korak je zračenje stanica te promatranje unutarstanične lokalizacije NME1 i NME2 kako bi utvrdili dolazi li do promjena u njihovoj lokalizaciji. Koje kontrole morate imati?



Koje kontrole nedostaju na slici?

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Prvi korak je zračenje stanica te promatranje unutarstanične lokalizacije NME1 i NME2 kako bi utvrdili dolazi li do promjene u njihovoj lokalizaciji. Koje kontrole morate imati?



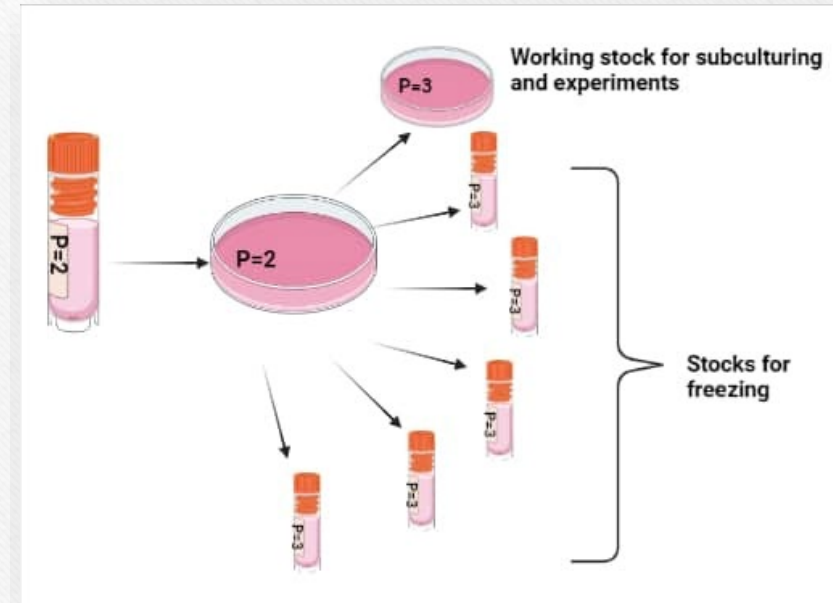
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Imunologija i kultura ljudskih stanica

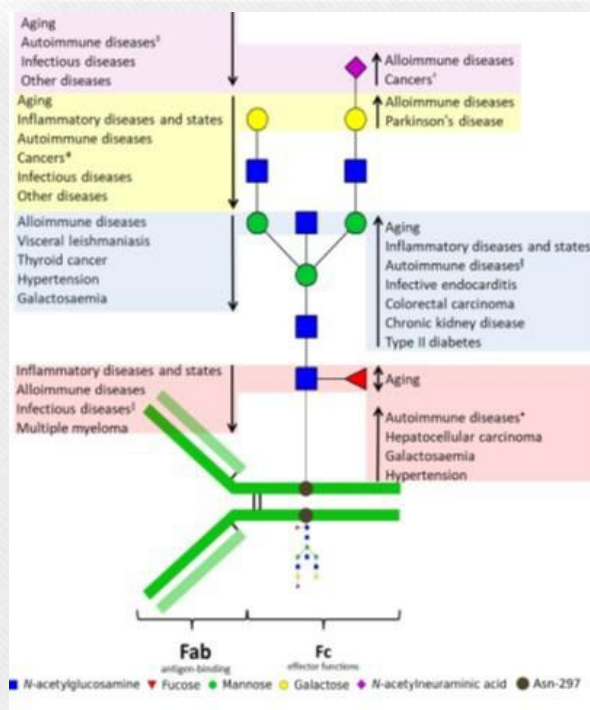
Biološke replike i kontrole u imunologiji i kulturi ljudskih stanica

- Stanice u kulturi se **pasažiraju** (presađuju)
- Svaka pasaža se označava kao p1, p2, p3 itd.
- Bilo koju pasažu **možemo smrznuti** no kada ju odmrznemo, pasažiranje se dalje navodi od spomenute pasaže
- Npr. Ako odmrznemo pasažu 2, prva njena pasaža je zapravo pasaža 3

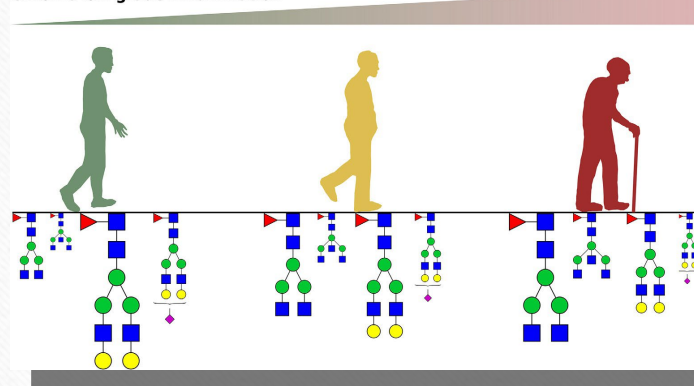
Zašto je to bitno kod određivanja bioloških replika i kontrola u animalnim stanicama?



Tumorske stanice, kao i ljudi, stare (glikanski biomarkeri)



Chronic low grade inflammation



The GlycanAge Index / The Glycan Clock

$$\text{Predicted male age} = 139.9 + (85.1 \times \text{GP6}) - (5.2 \times \text{GP6}^2) - (34.6 \times \text{GP14}) + (11.8 \times \text{GP15})$$

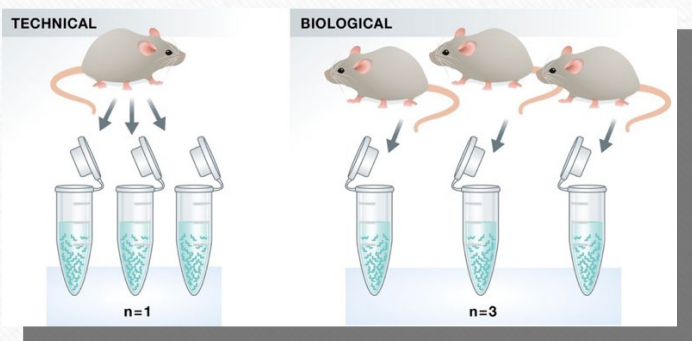
$$\text{Predicted female age} = 110.1 + (164.5 \times \text{GP6}) - (46.7 \times \text{GP6}^2) - (22.4 \times \text{GP14}) - (1.9 \times \text{GP15})$$

Lukšić et al. (2023)

Presadivanjem stanica kroz niz pasaža, **pada razina galaktoziliranih i fukoziliranih struktura**. Čak i ako su stanice immortalizirane one i dalje **pokazuju pad biomarkera za starenje**. Stoga za biološke replike je potrebno uzimati **vijale stanice koje su presađene u istoj pasaži**.

Replike u sustavu *in vivo* i *in vitro*

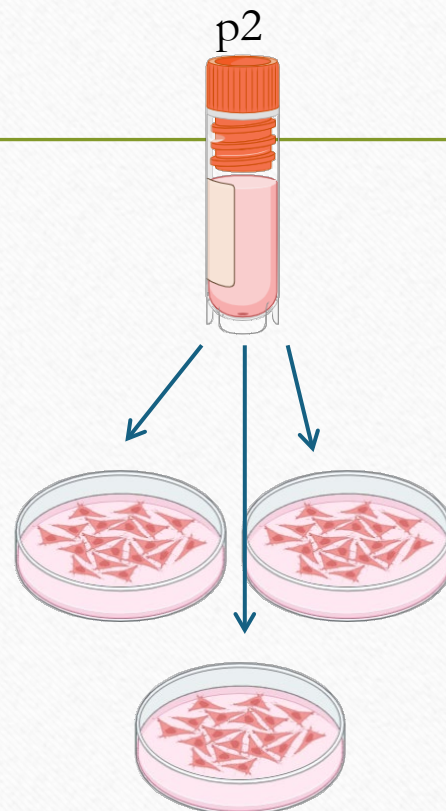
A)



Biološka replika - tri individualna miša iz **istog** legla **iste** starosti, **istog** spola. Svaka jedinka je za sebe.

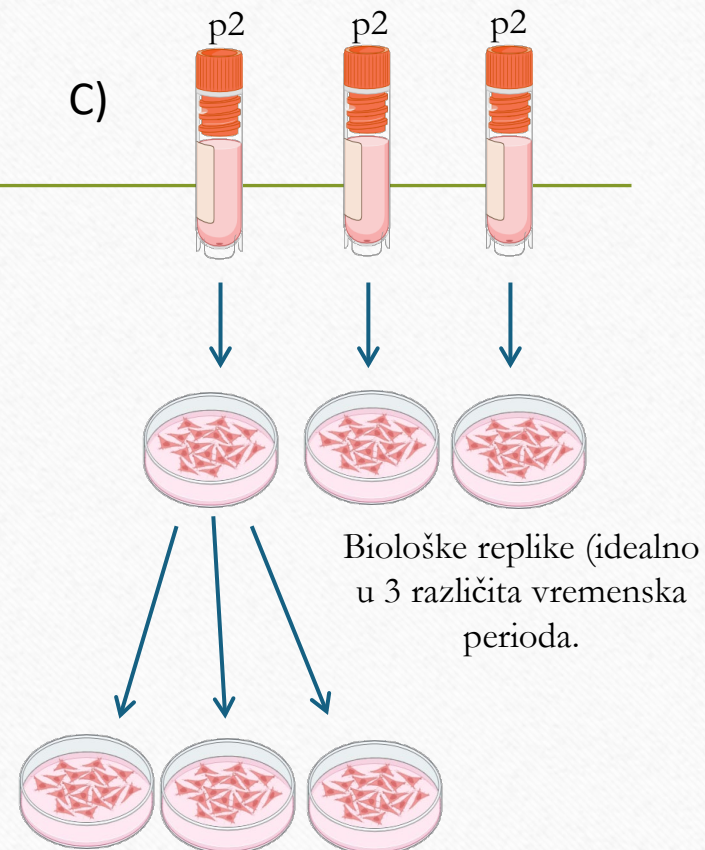
Tehnička replika – napravljena iz jednog miša više puta.

B)



Tehničke replike

C)



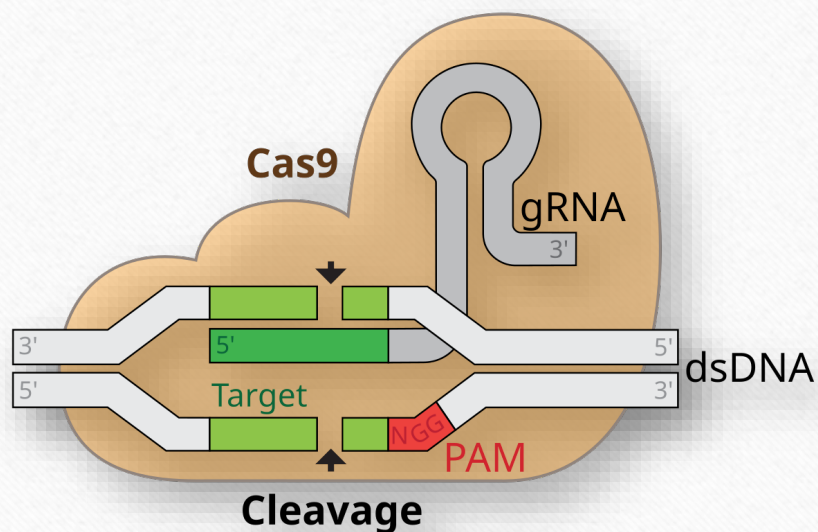
Biološke replike (idealno u 3 različita vremenska perioda.)

Tehničke replike

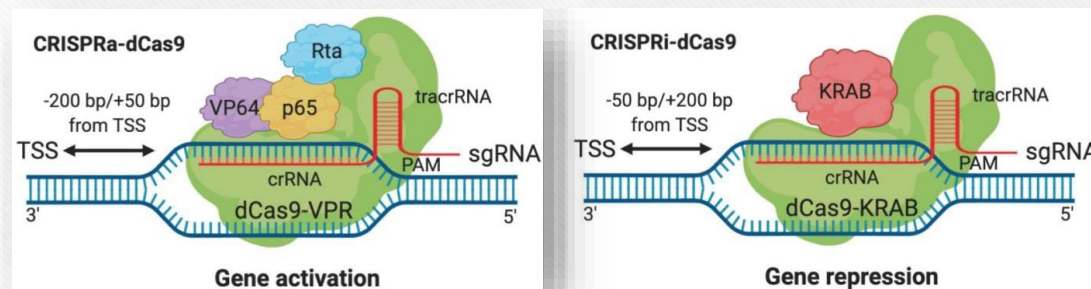
Replike u sustavu *in vivo* i *in vitro*

- Ako uzimate tri odvojene pasaže npr. p2, p3 i p4 to su **3 nezavisna eksperimenta** i u stvarnosti ne predstavljaju prave biološke replike no mnogi ih ipak smatraju pravim biološkim replikama.
- Dodatno postoji konroverza da su **biološke replike iz jedne iste vijale validne**, obzirom da se jedna petrijevka smrzava u nekoliko vijala što bi značilo da je sastav svake vijale isti, no još uvijek ne postoji sporazum. **Stoga je najbolje raditi 3 odvojene vijale iste pasaže u 3 odvojena vremenska perioda.**

Primjer kontrola u regulaciji imunoglobulina G u stanicama 293-F pomoću CRISPR-dCas9



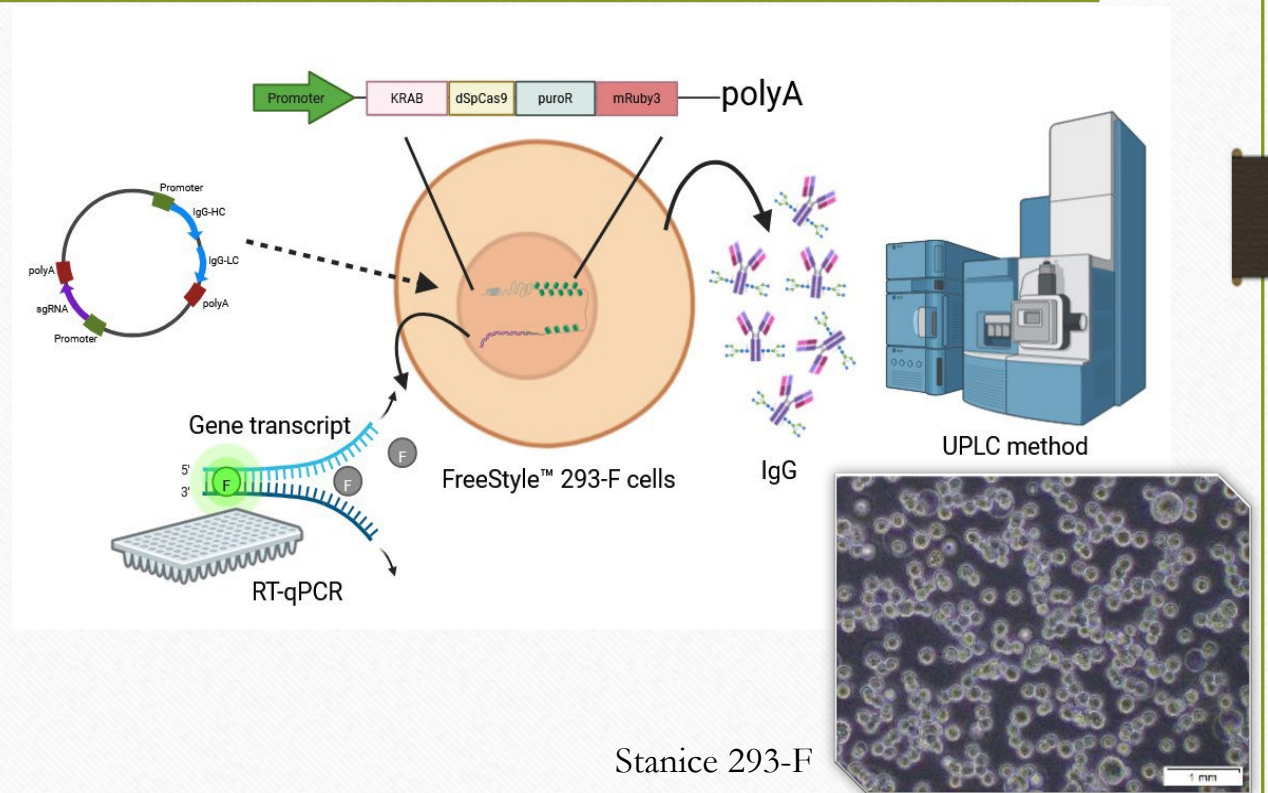
Aktivan Cas9 cijepa dsDNA na 2 mjesta pomoću domene RuvC i HNH.



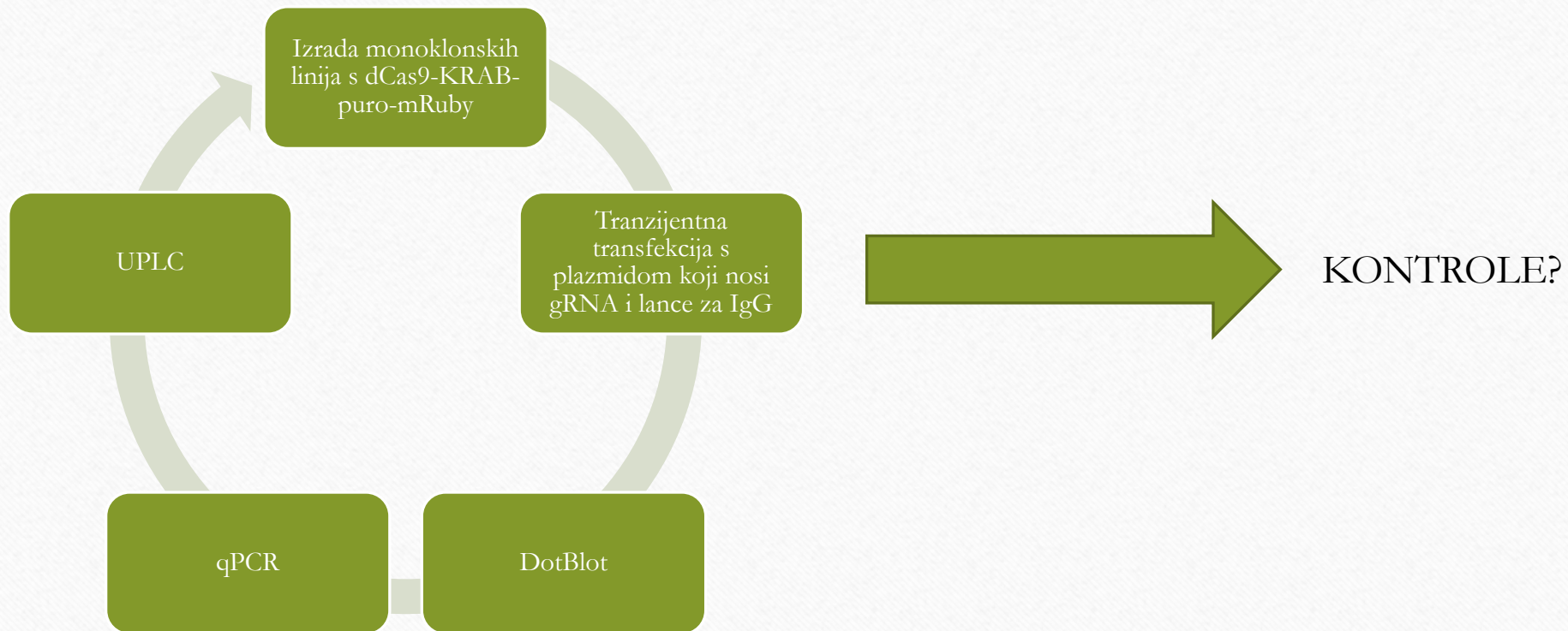
Mutacijom RuvC i HNH nukleaza, Cas9 postaje inaktivan (**dCas9**) te se na njega mogu fuzionirati epigenetičke domene za pojačavanje ekspresije gena (**VPR**) ili za smanjenje (**KRAB**)

Provjera GWAS gena za glikozilaciju IgG-a

- GWAS – cjelogenomsko asocijacijsko istraživanje
- Fokusira se na povezanost **SNP**-ova i osobina poput ljudskih bolesti
- Obzirom da IgG ima specifičan obrazac za ljudske bolesti, može se povezati uz **SNP**-ove određenih gena
- Modelni organizam 293-F – ne luči IgG pa se treba transfecirati **plazmidom s IgG-om**
- U glavnom genomu je **integriran dCas9-KRAB**, rezistencija na antibiotik i fluorescentni protein radi detekcije uspješnosti monoklonskih linija
- Dodatno se tranzijentno transfecira plazmidom koji kodira za gRNA i lance za laki i teški lanac IgG-a



Eksperimentalni dizajn

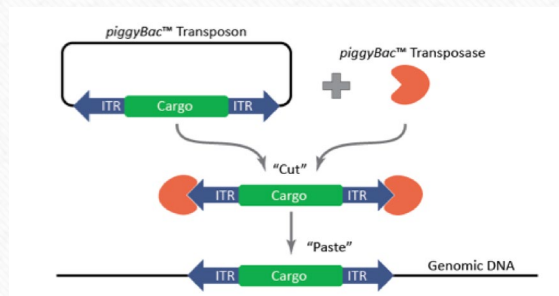


Izrada monoklonskih linija s dCas9-KRAB-puro-mRuby

- Stanične linije se stabilno transfeciraju konstruktom dCas9-KRAB-puro-mRUBy.

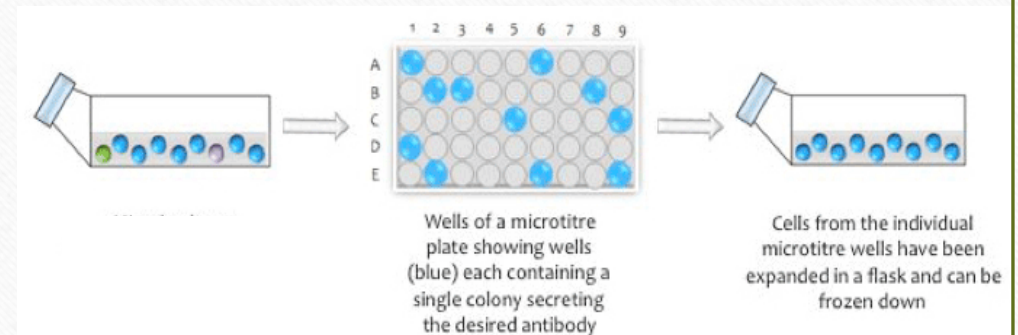
Koju metodu stabilne transfekcije bi koristili?

Transpozonima ili lentiviralno



Nakon stabilne ugradnje konstrukta koju metodu biste koristili za dobivanje monoklonskih linija (s ugrađenim konstruktom) ako znate da je efikasnost transfekcije 2%?

Protočna citometrija ili limiting dilution



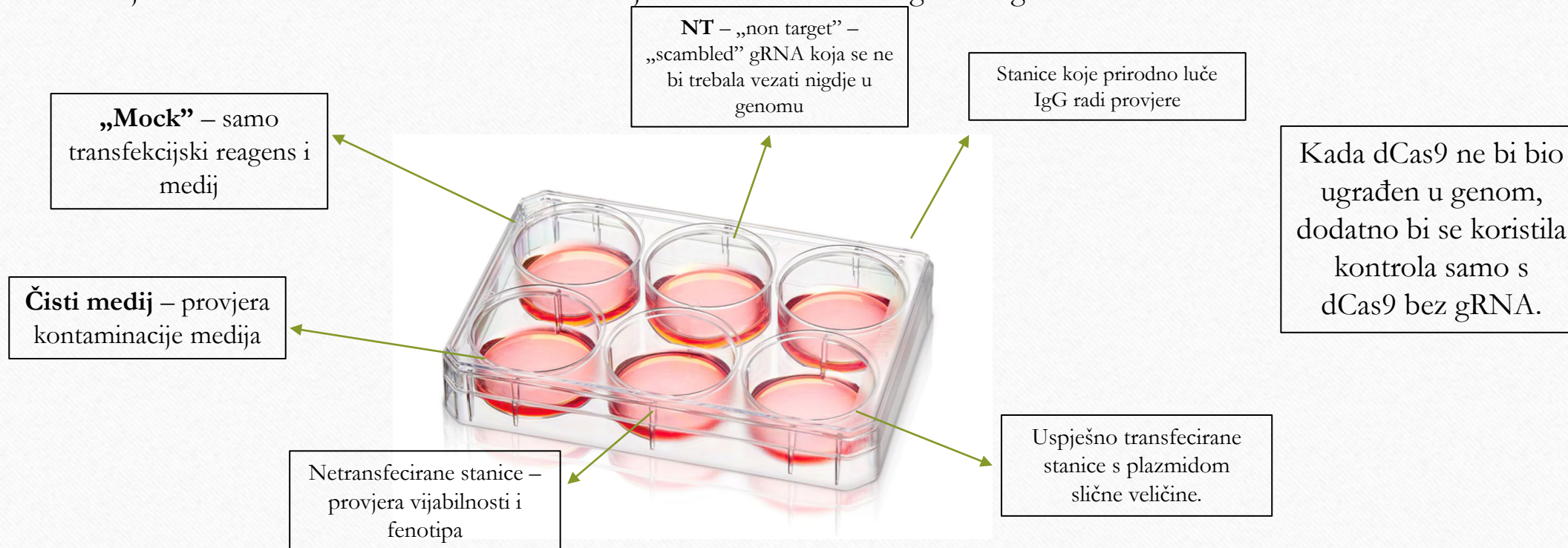
Izrada monoklonskih linija s dCas9-KRAB-puro-mRuby

- Nakon uspostave monoklonske linije dCas9-KRAB-puro-mRUBY trebate provjeriti da li je ova linija uistinu 100% monoklonska ili se izgubio konstrukt. Kako i s kojim **kontrolama** biste to provjerili?



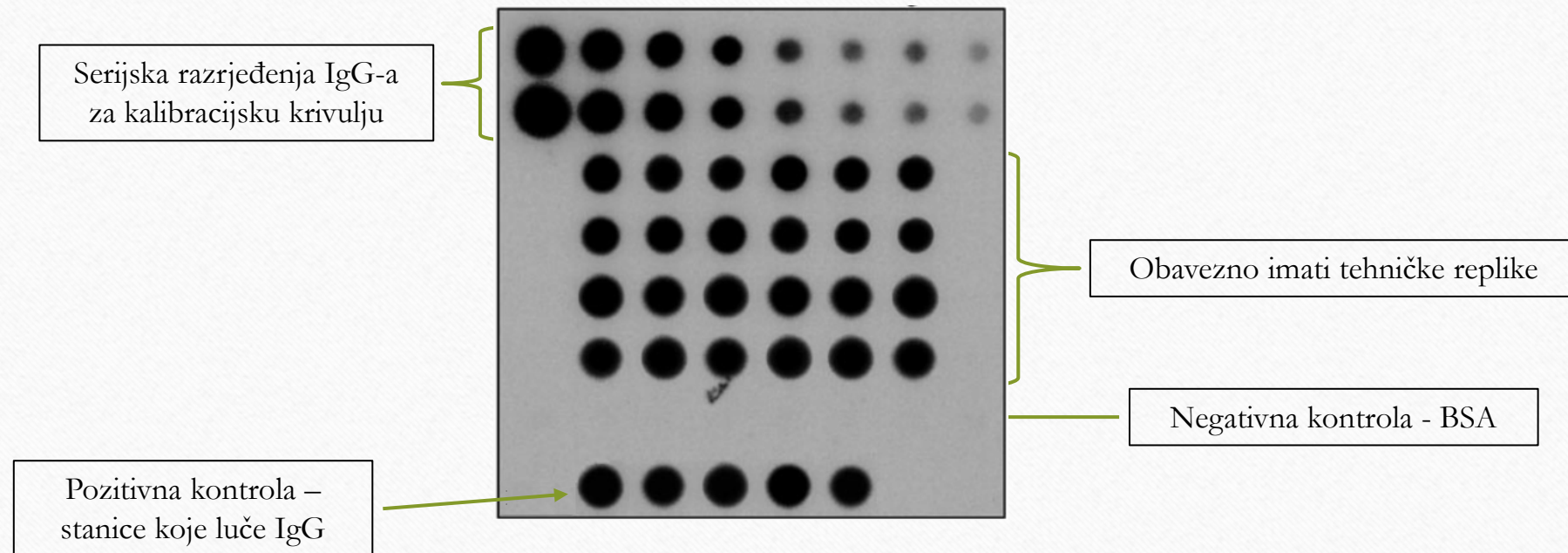
Transfekcija monoklonskih linija s gRNA-IgG konstruktima

- Koje **kontrole biste koristili** kod transfekcije stanica konstrukom gRNA-IgG?



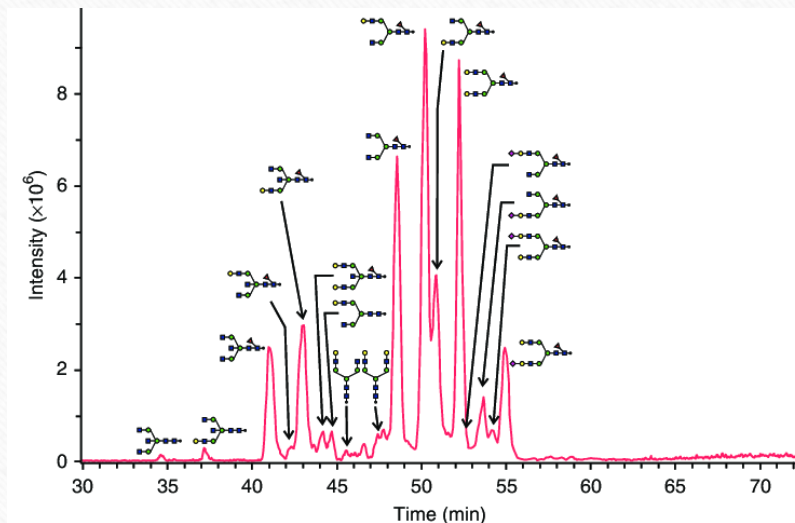
DotBlot kontrole

- Koristi se anti-IgG antitijelo direktno na membrani na koju su nakapani izolirani proteini.



UPLC kontrole

- **Pozitivna kontrola** – purificirani protein s poznatim epitopom
- **Negativna kontrola** – „blank”, najčešće samo reagensi
- **Loading kontrola** – neki housekeeping uzorak
- **Tehničke replike**



Literatura

- Zeng et al. (2014) Overexpressing a Novel RING-H2 Finger rotein Gene, *OsRHP1*, Enhances Drought and Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Biology 57. <https://doi.org/10.1007/s12374-013-0481-z>
- Kim et al. (2018) Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. Cell Reports 25. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.035>
- Radić et al. (2020) The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage. International Journal of Molecular Sciences 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21072363>
- Mijakovac et al. (2022) A Transient Expression System with Stably Integrated CRISPR-dCas9 Fusions for Regulation of Genes Involved in Immunoglobulin G Glycosylation. The CRISPR Journal 5. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.008>