



# REPLIKE

dr. sc. Mateja Jagić  
Metodologija znanstveno-istraživačko rada u biologiji, 2024/2025

# Što su replike?

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

# Vrste replika

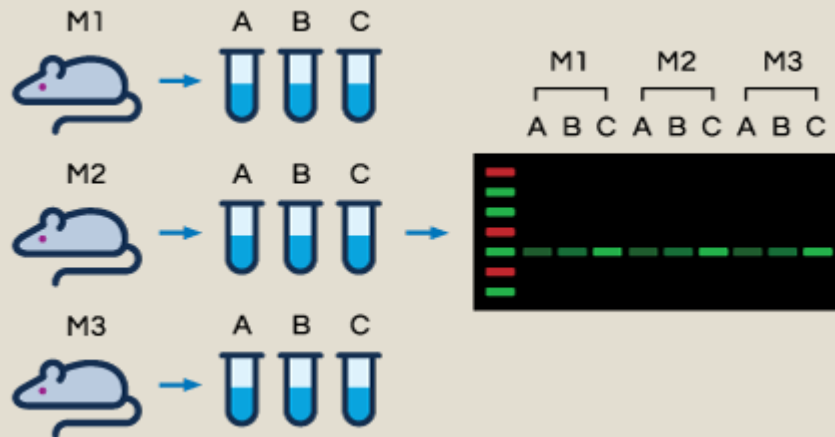
## Biološke replike

- 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
- Omogućuju generalizaciju bez obzira na varijabilnost



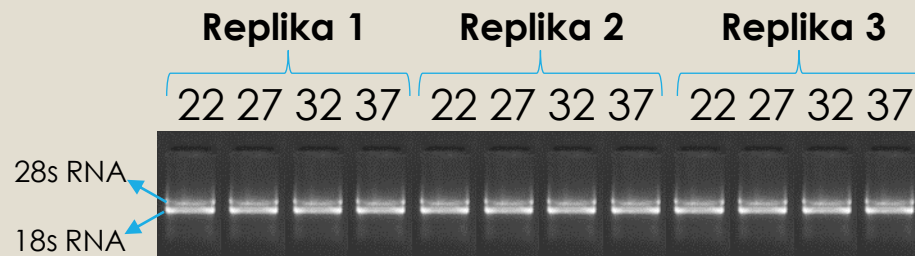
## Tehničke replike

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



# Endogene kontrole i replike - primjer qPCR-a

- Želite istražiti relativnu ekspresiju gena DREB2A iz uročnjaka u uvjetima povišene temperature. Uzgojili ste biljke te ih u odrasloj fazi tretirali 3 sata na sljedećim temperaturama: 22 °C, 27 °C, 32 °C i 37 °C. Izolirali ste RNA, konvertirali je u cDNA te krećete s određivanjem relativne ekspresije gena (qPCR).
- Za početak, koje ste sve kontrole trebali imati u svom eksperimentu?
  - Kontrolna grupa – biljke koje su uzorkovane u istoj vremenskoj točki, ali su cijelo vrijeme držane u uvjetima uzgoja (kontrolnim uvjetima): **22 °C**
  - Provjera kvalitete RNA



# Endogene kontrole i replike - primjer qPCR-a

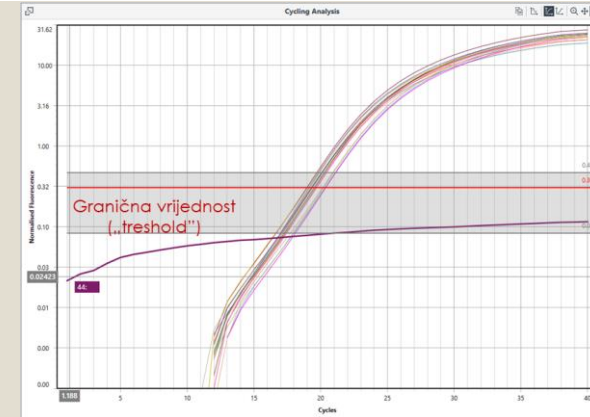
- Želite istražiti relativnu ekspresiju gena DREB2A iz uročnjaka u uvjetima povišene temperature. Uzgojili ste biljke te ih u odrasloj fazi tretirali 3 sata na sljedećim temperaturama: 22 °C, 27 °C, 32 °C i 37 °C. Izolirali ste RNA, konvertirali je u cDNA te krećete s određivanjem relativne ekspresije gena (qPCR).
- Za početak, koje ste sve kontrole trebali imati u svom eksperimentu?
  - Kontrolna grupa – biljke koje su uzorkovane u istoj vremenskoj točki, ali su cijelo vrijeme držane u uvjetima uzgoja (kontrolnim uvjetima): **22 °C**
  - Provjera kvalitete RNA
  - Provjera cDNA
    - Endogena kontrola (ACT3)
    - Pozitivna kontrola (gDNA)
    - Negativna kontrola



# Endogene kontrole i replike - primjer qPCR-a

- Želite istražiti relativnu ekspresiju gena DREB2A iz uročnjaka u uvjetima povišene temperature. Uzgojili ste biljke te ih u odrasloj fazi tretirali 3 sata na sljedećim temperaturama: 22 °C, 27 °C, 32 °C i 37 °C. Izolirali ste RNA, konvertirali je u cDNA te krećete s određivanjem relativne ekspresije gena (qPCR).
- Koje kontrole trebate imati u qPCR eksperimentu
  - Kontrolna grupa: **22 °C**
  - Endogena kontrola (konstitutivno eksprimirani geni, barem 2, idealno 3)
  - Negativna kontrola (no template control)
- Replike
  - Biološke replike (barem 3)
  - Tehničke replike (barem 2, ali bolje 3)

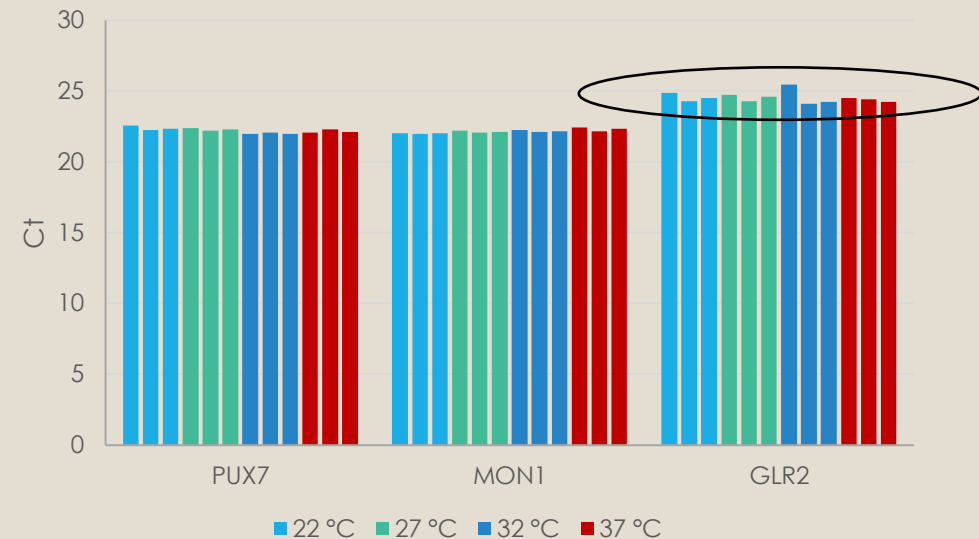
# Endogene kontrole i replike - primjer



Važnost dobrog odabira endogene kontrole, odnosno referentnog gena

- U Vašem eksperimentu testirali ste tri potencijalno dobra referentna gena: PUX7, MON1 i GLR2

Treatment	Replicate	Cycle Threshold		
		PUX7	MON1	GLR2
22 °C	R1	22.57	22.00	24.84
22 °C	R2	22.23	21.98	24.29
22 °C	R3	22.31	22.01	24.52
27 °C	R1	22.58	22.18	24.71
27 °C	R2	22.21	22.08	24.29
27 °C	R3	22.48	22.10	24.58
32 °C	R1	21.76	22.24	25.46
32 °C	R2	22.06	22.12	24.07
32 °C	R3	21.95	22.17	24.22
37 °C	R1	22.07	22.40	24.48
37 °C	R2	22.28	22.16	24.42
37 °C	R3	22.11	22.31	24.23





# Endogene kontrole i replike - primjer qPCR-a

Bazična metoda delta delta Ct:

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene}) - Ct (\text{reference gene})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{target sample}) - \Delta Ct (\text{reference sample})$$

Efikasnost početnica (E) nije uvijek ista za sve gene, stoga je bolje koristiti modificiranu formulu koja u obzir uzima i efikasnost početnica:

$$\text{Ration } \Delta Ct (\text{sample}) = E (\text{reference gene})^{Ct (\text{reference gene})} / E (\text{target gene})^{Ct (\text{target gene})}$$

$$\text{Ration } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{target sample}) / \Delta Ct (\text{reference sample})$$

Pfaffl et al.(2004)

# Endogene kontrole i replike - primjer qPCR-a

Bazična metoda delta delta Ct:

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{DREB2A}) - Ct (\text{PUX7, MON1, GLR2})$$

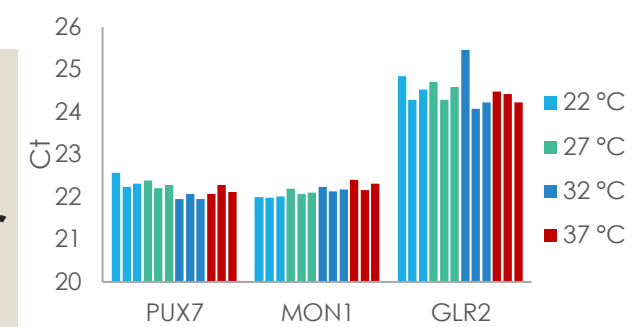
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{temperaturni tretman}) - \Delta Ct (\text{kontrola, 22 } ^\circ\text{C})$$

Efikasnost početnica (E) nije uvijek ista za sve gene, stoga je bolje koristiti modificiranu formulu koja u obzir uzima i efikasnost početnica:

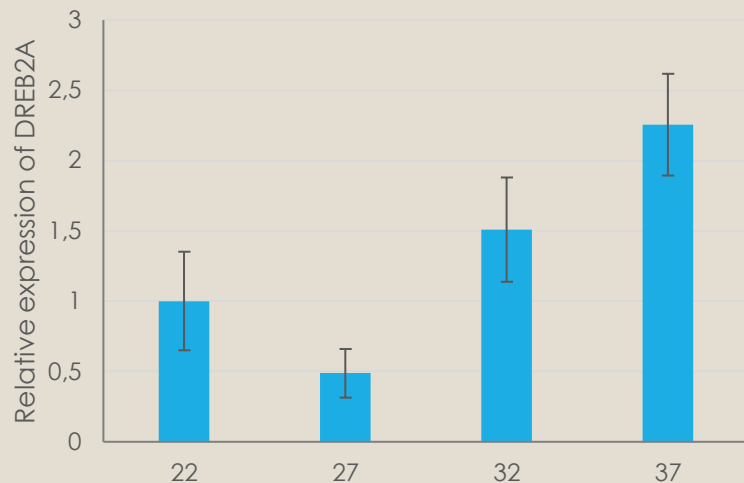
$$\text{Ratio } \Delta Ct (\text{sample}) = E (\text{PUX7, MON1, GLR2})^{\Delta Ct (\text{PUX7, MON1, GLR2})} / E (\text{DREB2A})^{\Delta Ct (\text{DREB2A})}$$

$$\text{Ration } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{temperaturni tretman}) / \Delta Ct (\text{kontrola, 22 } ^\circ\text{C})$$

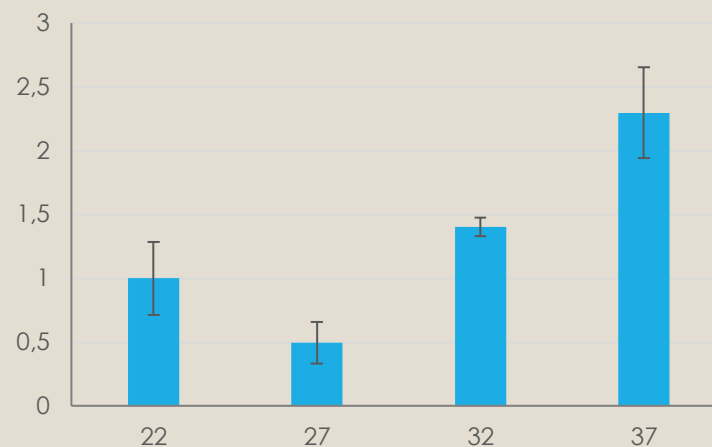
# Endogene kontrole i replike - primjer



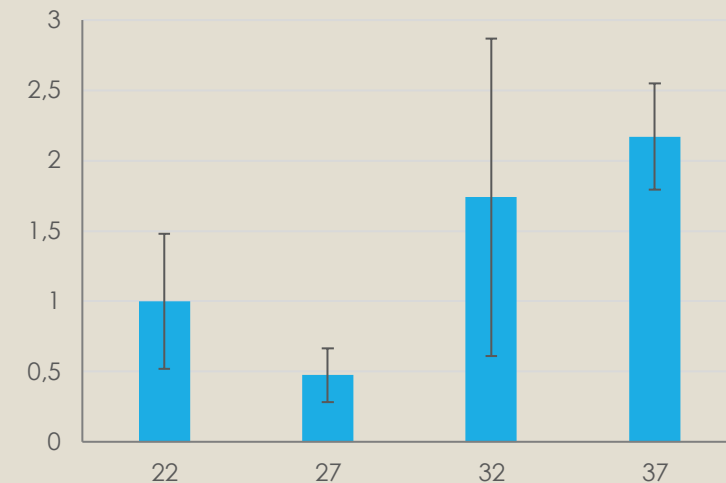
3 biološke replike, sva 3 referentna gena



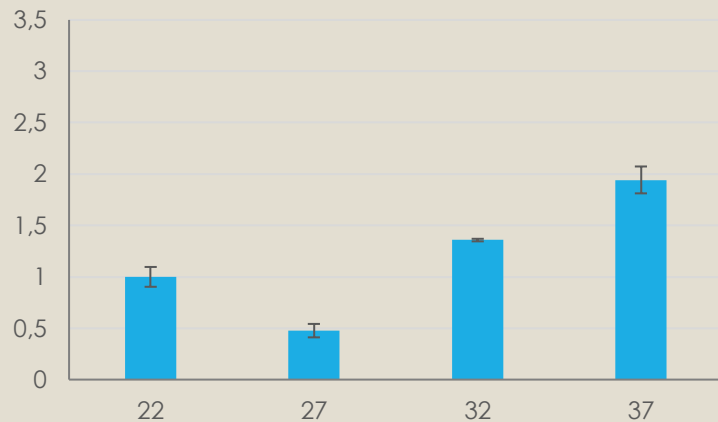
3 biološke replike, 2 dobra ref. gena: PUX7 i MON1



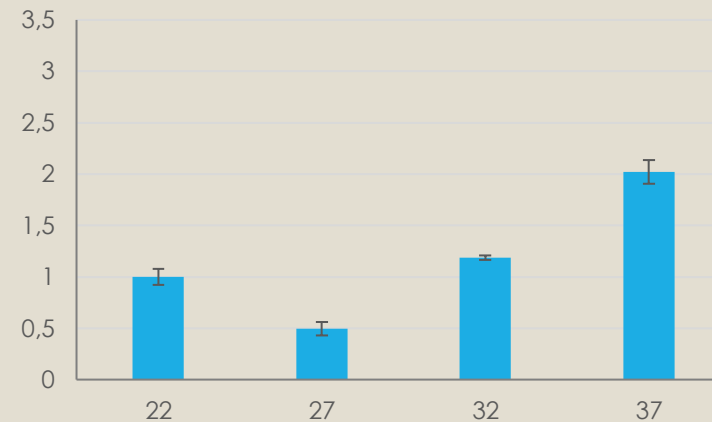
3 biološke replike, 1 ref. gen: GLR2



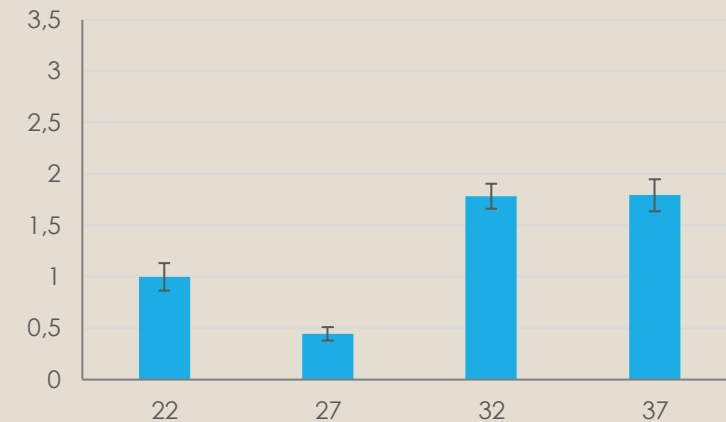
1 biološka replika, 3 ref. gena



1 biološka replika, 2 dobra ref. gena



1 biološka replika, 1 ref. gen: GLR2





RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures

A. Škiljaica, M. Jagić, T. Vuk, D. Leljak Levanić, N. Bauer & L. Markulin

Division of Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

- Testirano 10 potencijalnih referentnih gena na 5 različitih temperatura i 3 tipa tkiva

