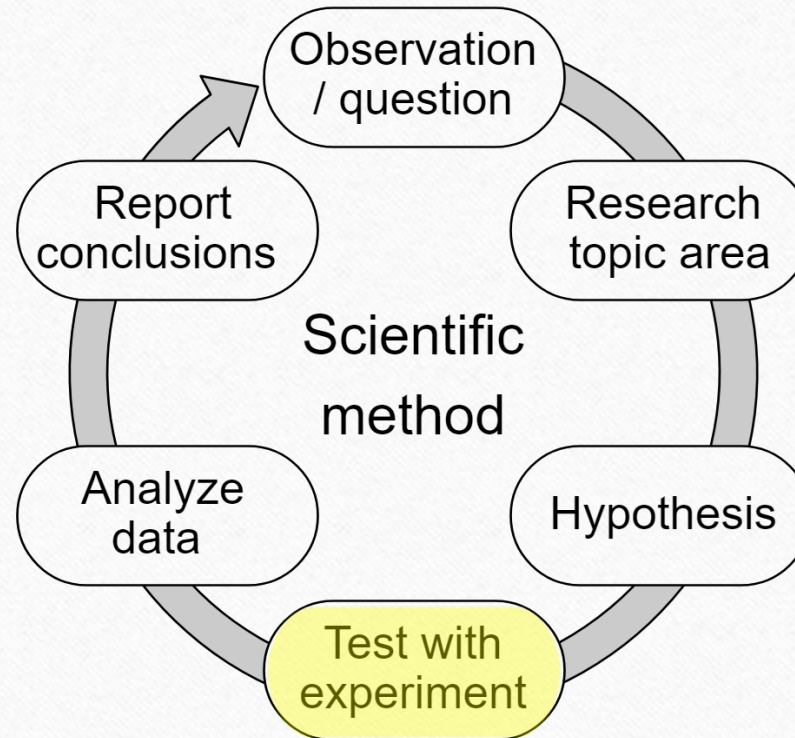


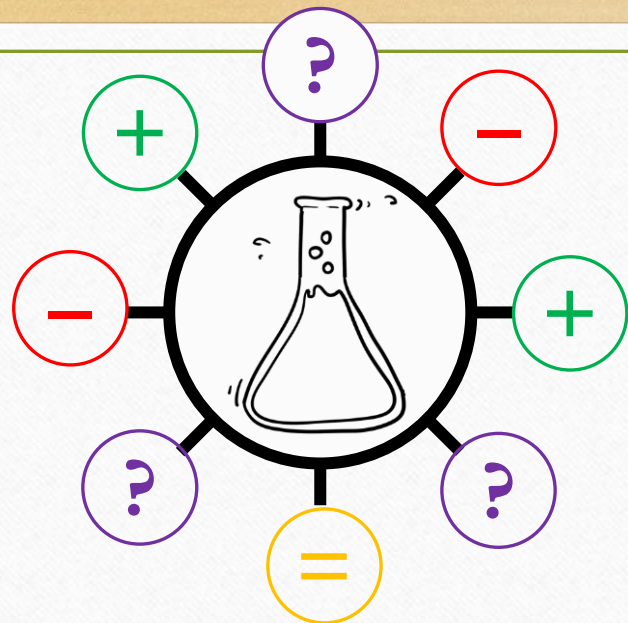
Kontrole u biološkim eksperimentima

dr. sc. Mateja Jagić

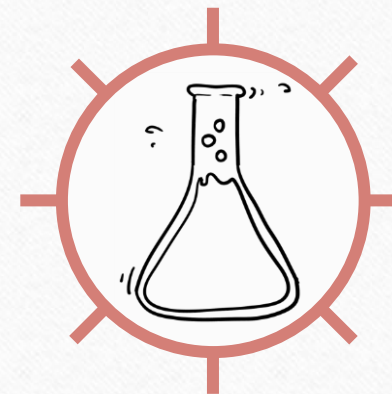
Metodologija znanstveno-istraživačko rada u biologiji, 2024/2025

Znanstvena metoda





Kontrole



Pozitivna kontrola

Negativna kontrola

Endogena kontrola

Eksperimentalna kontrola
(kontrolne grupe)

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

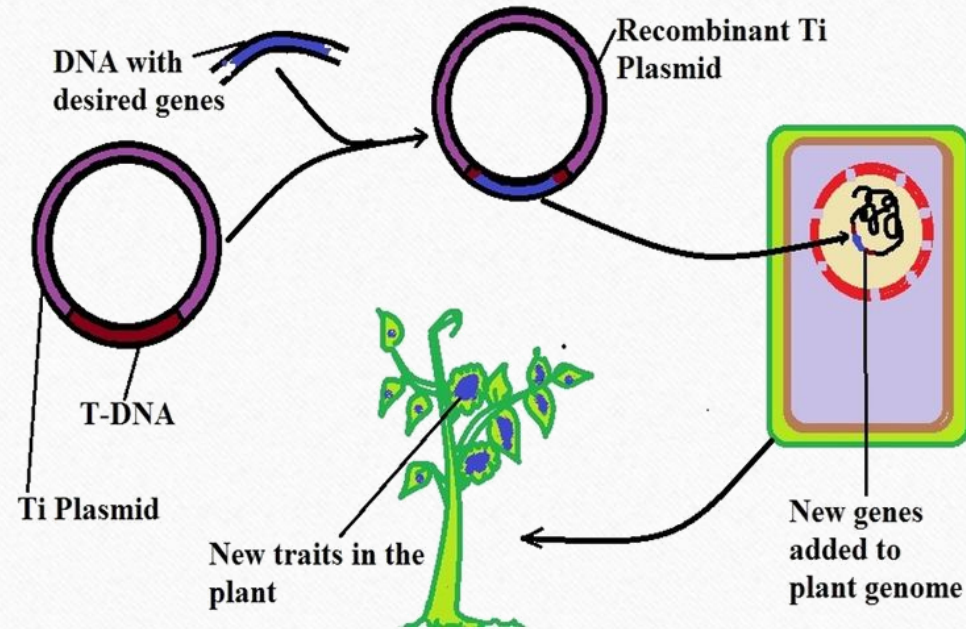
Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. U tu svrhu generirali ste transgenične biljke s prekomjernom ekspresijom gena *OsRHP1*.

OsRHP1 – *Oryza sativa* RING-H2 protein 1

35S

OsRHP1

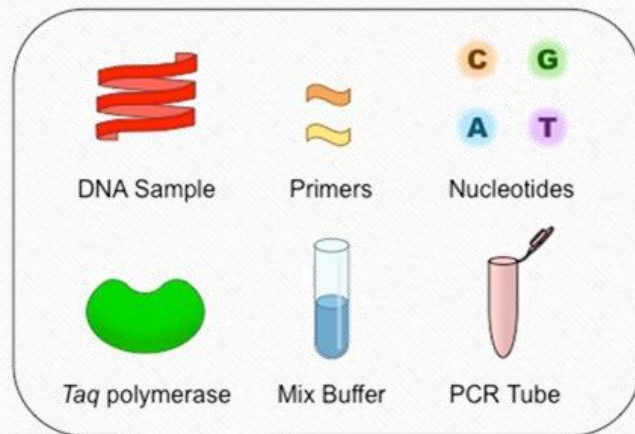
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima



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?



Thermal Cycler

Negativna kontrola

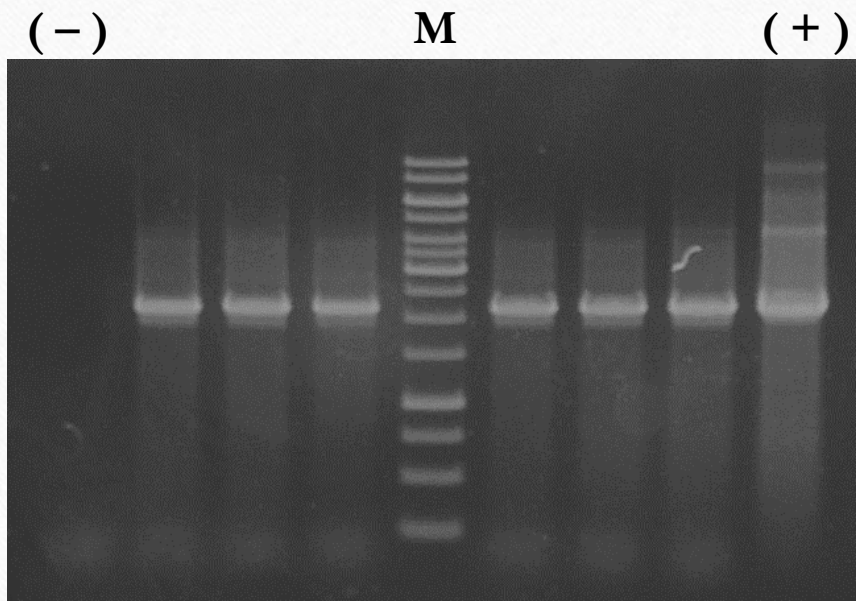
- Smjesa za PCR s početnicama, ali bez kalupa (DNA)

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

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

Pozitivna kontrola

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

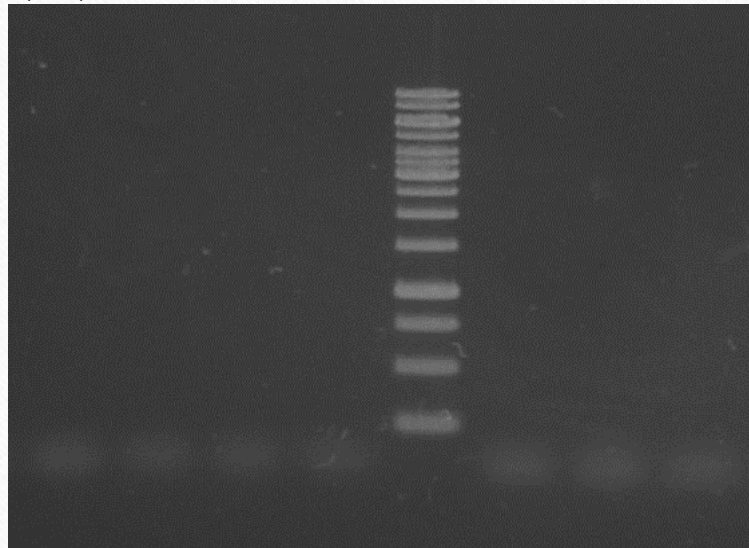
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

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?

Opcija 1 – bez pozitivne kontrole

(-)

M

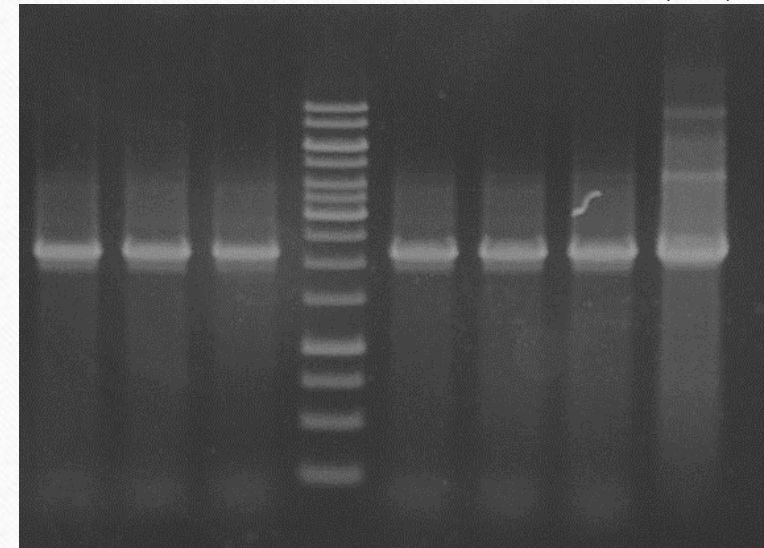


Ne znamo je li izostanak vrpca na gelu uzrokovan nedostatkom ili nedostatnom ekspresijom, ili neka komponenta reakcije PCR nije valjana.

Opcija 2 – bez negativne kontrole

M

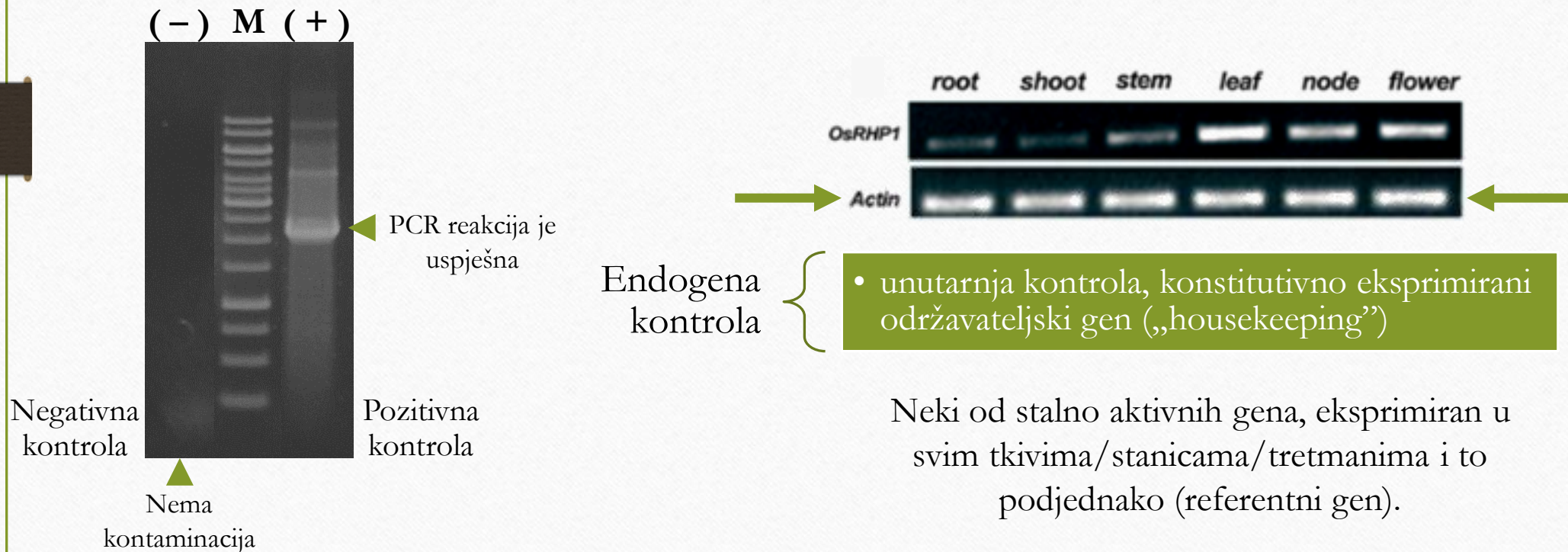
(+)



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

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. Vaš idući korak je utvrditi u kojim tkivima biljke i u kojoj mjeri je nativni gen eksprimiran te ste izolirali ukupnu RNA iz različitih tkiva te ju preveli u komplementarnu DNA (cDNA). Radite semi-kvantitativni PCR koji ćete potom provjeriti kvantitativnom PCR reakcijom u stvarnom vremenu (qPCR). Koje kontrole trebate koristiti u ovim eksperimentima?



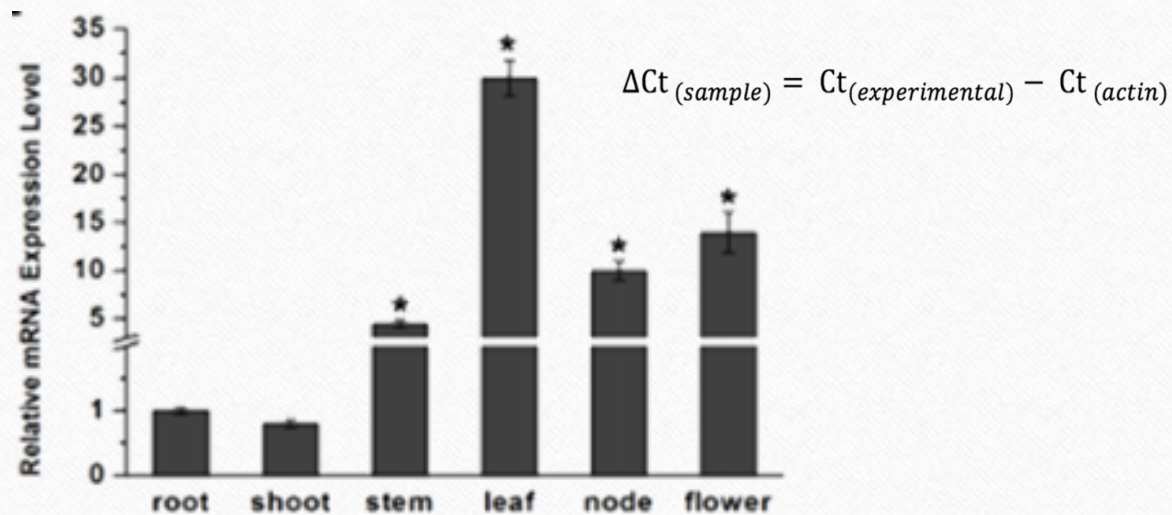
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. Vaš idući korak je utvrditi u kojim tkivima biljke i u kojoj mjeri je nativni gen eksprimiran te ste izolirali ukupnu RNA iz različitih tkiva te ju preveli u komplementarnu DNA (cDNA). Radite semi-kvantitativni PCR koji ćete potom provjeriti kvantitativnom PCR reakcijom u stvarnom vremenu (qPCR). Koje kontrole trebate koristiti u ovim eksperimentima?

Semi-kvantitativni PCR



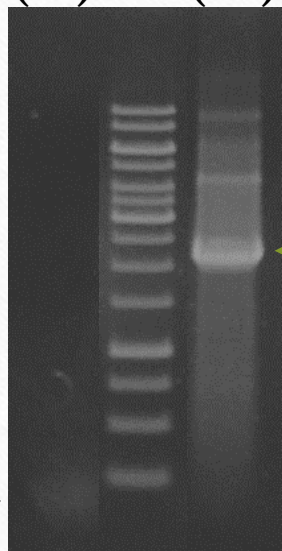
Endogena kontrola



$$\Delta Ct_{(sample)} = Ct_{(experimental)} - Ct_{(actin)}$$

qPCR

(-) M (+)



PCR reakcija je uspješna

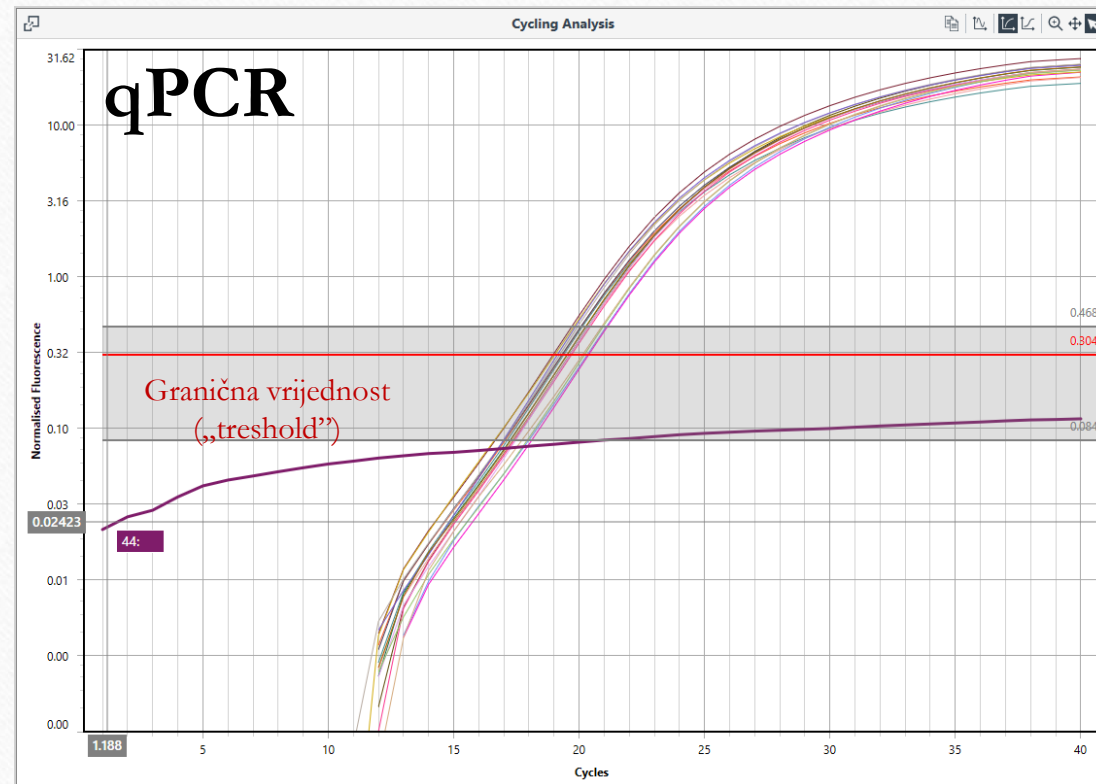
Negativna kontrola

Pozitivna kontrola

Nema kontaminacija

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. Pitanje koje Vam se sljedeće nameće je li transgen *35S::OsRHP1* stvarno prekomjerno eksprimiran u Vašim generiranim transgeničnim biljkama. Metoda koju provodite je opet qPCR. Koje kontrole bi koristili?



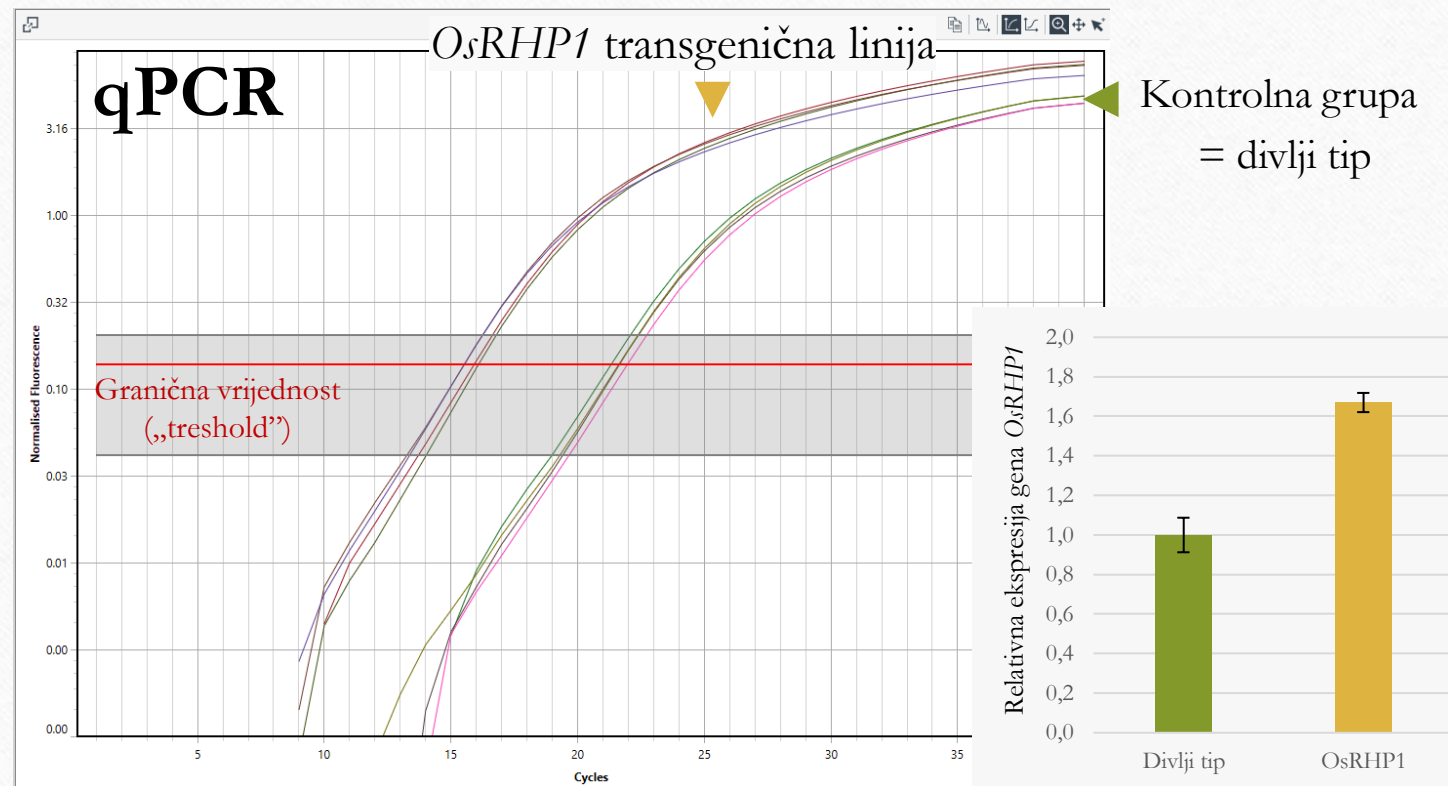
Endogena kontrola
= Gen za aktin

NTC = no template control

▲
Negativna
kontrola

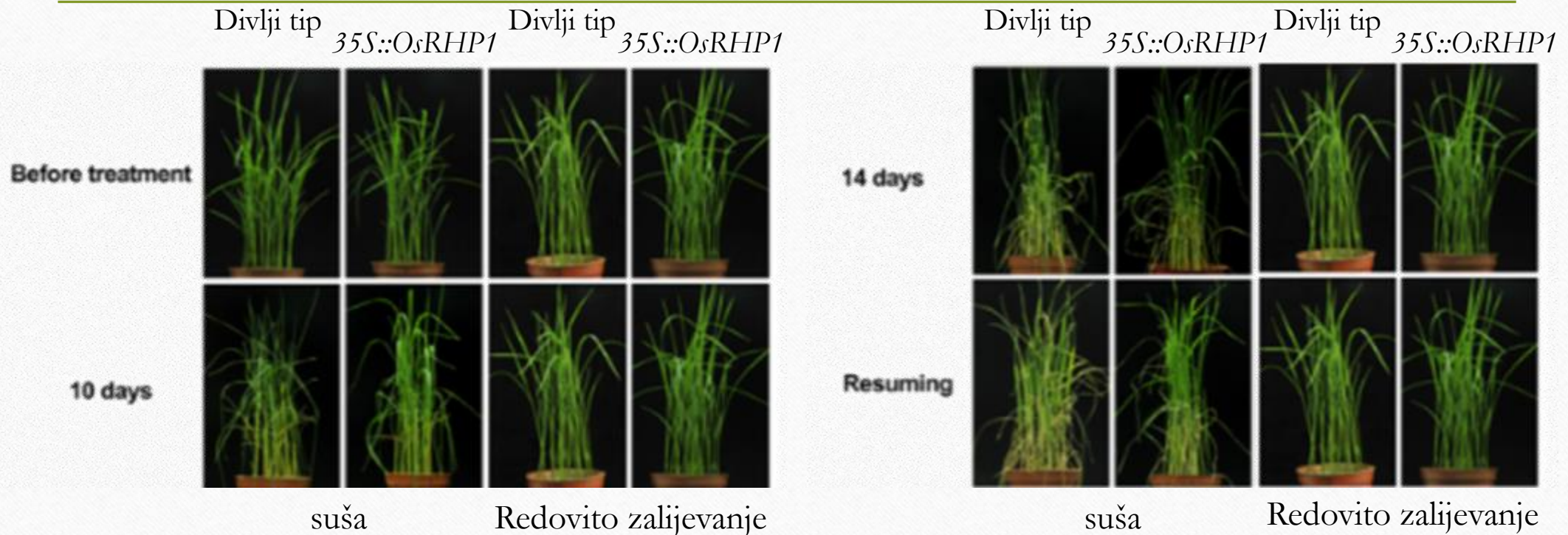
Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu. Pitanje koje Vam se sljedeće nameće je li transgen *35S::OsRHP1* stvarno prekomjerno eksprimiran u Vašim generiranim transgeničnim biljkama. Metoda koju provodite je opet qPCR. Koje kontrole bi koristili?



Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

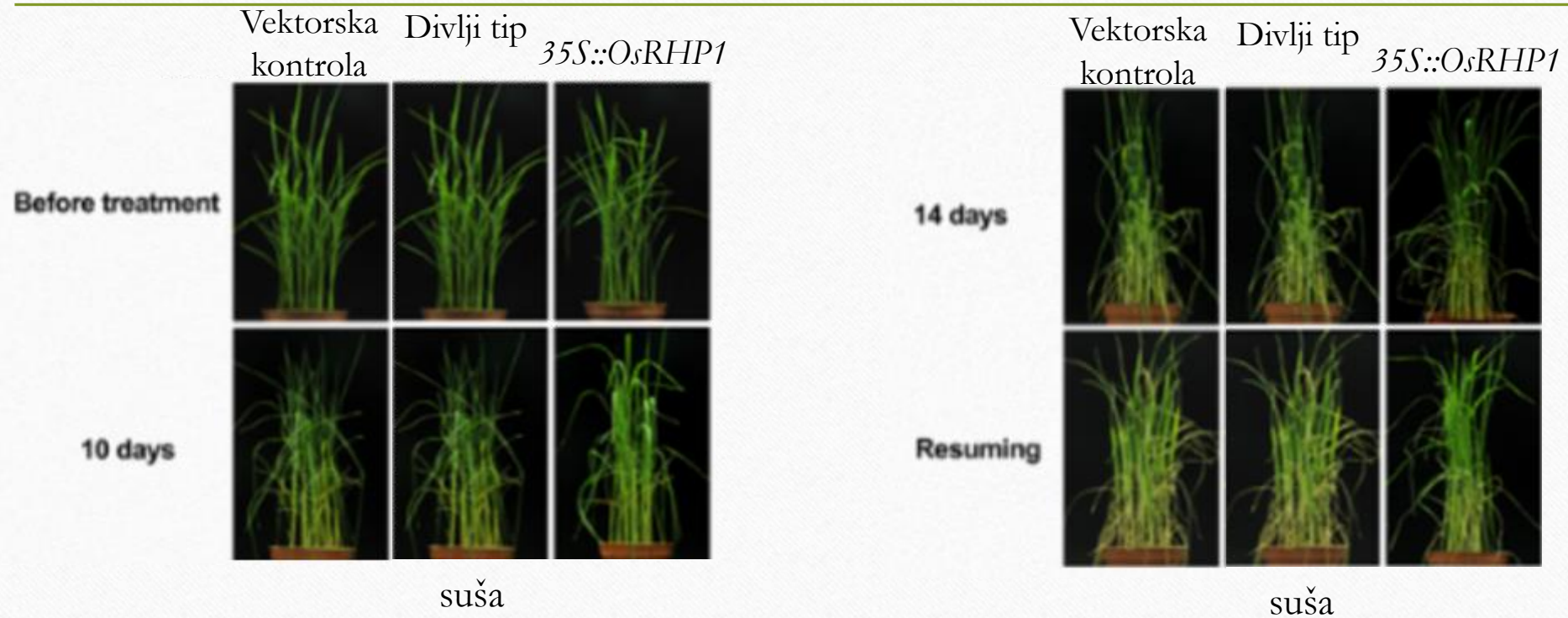
Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu i konačno ste došli do dijela gdje ćete testirati utjecaj suše na Vaše transgenične biljke. Tri tjedna stare biljke *35S::OsRHP1* uzgajane u standardnim uvjetima i do tad redovito zalijevane, izlažete suši na 10,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



Kontrolne grupe

Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

Istražujete funkcionalnu ulogu novo otkrivenog gena *OsRHP1* u toleranciji riže na sušu i 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).

Overexpressing a Novel RING-H2 Finger Protein Gene, *OsRHP1*, Enhances Drought and Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.)

De-Er Zeng^{1,2}, Pei Hou¹, Fangming Xiao³ and Yongsheng Liu^{1,4*}

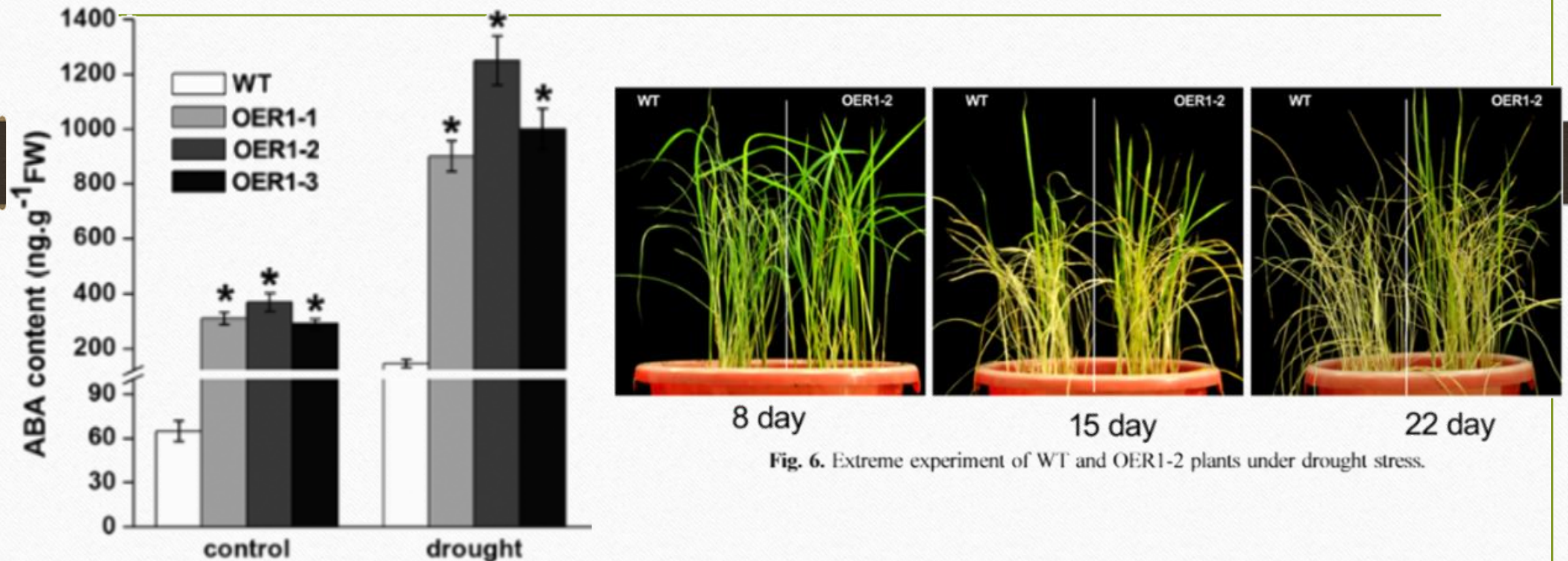


Fig. 6. Extreme experiment of WT and OER1-2 plants under drought stress.

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.

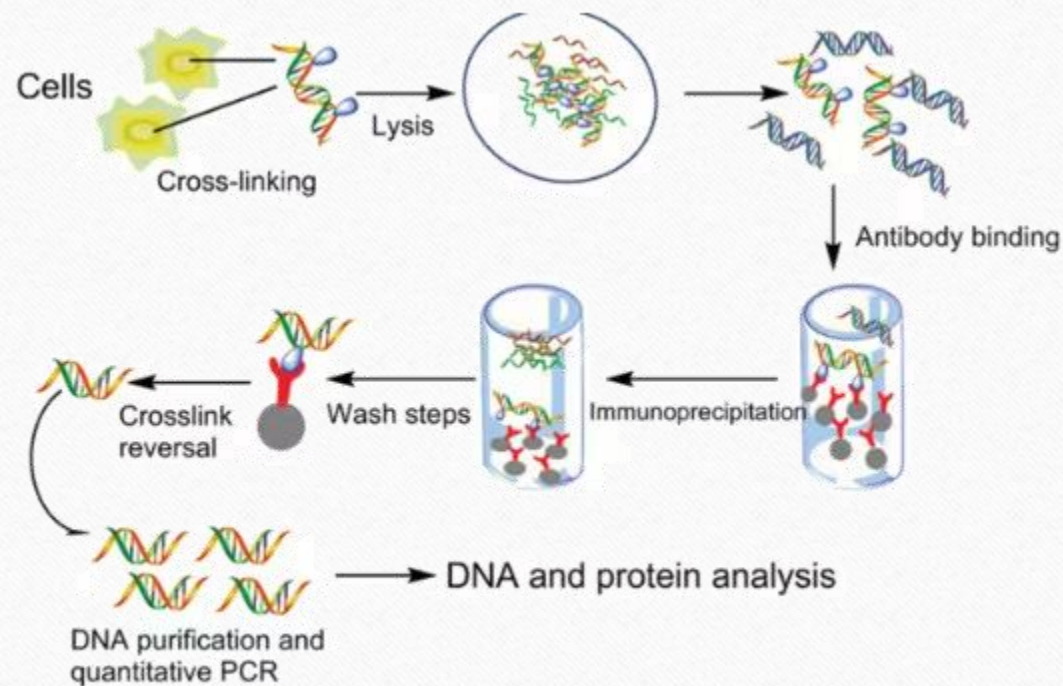


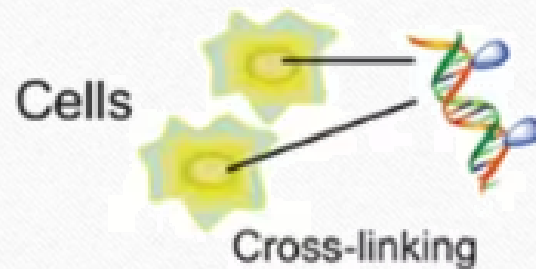
Figure 1. ChIP procedure workflow

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.

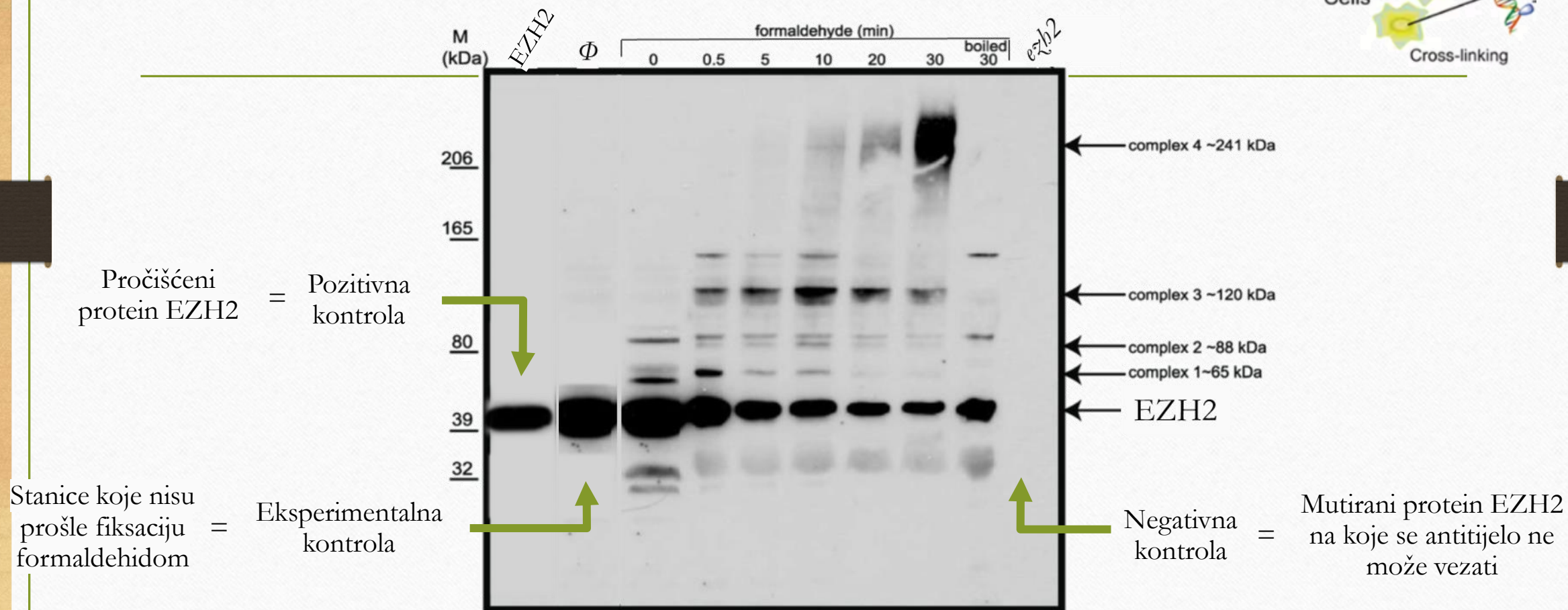
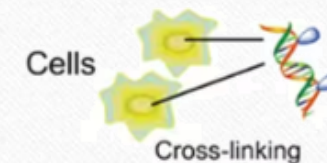
Prvi korak u eksperimentu je uzorkovanje stanica i fiksiranje protein-DNA interakcija u kromatinu (crosslinking). A osnova za daljnji tijek eksperimenta je potvrda da su protein-DNA interakcije stvarno fiksirane. Ovo ćemo testirati imunodetekcijom koristeći antitijelo koje veže naš protein od interesa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



day 1

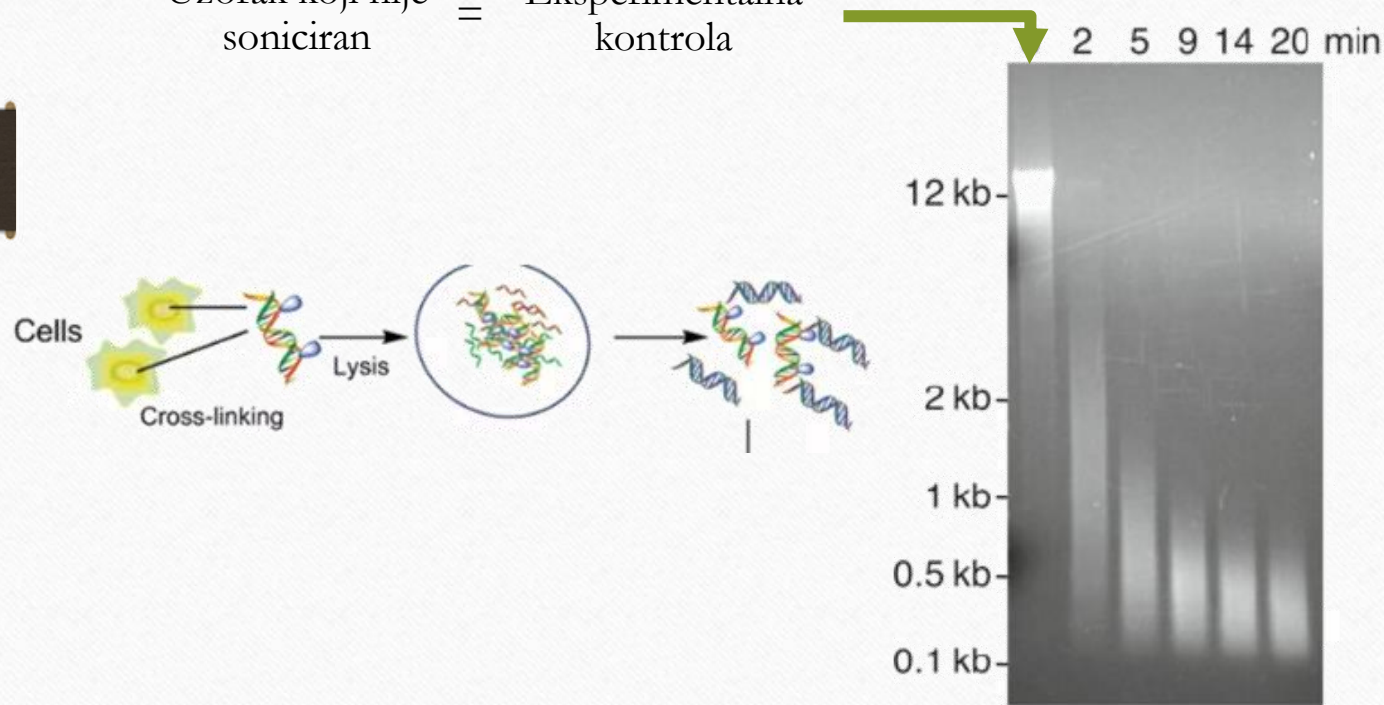
Harvest cells and crosslink DNA
to proteins.

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?



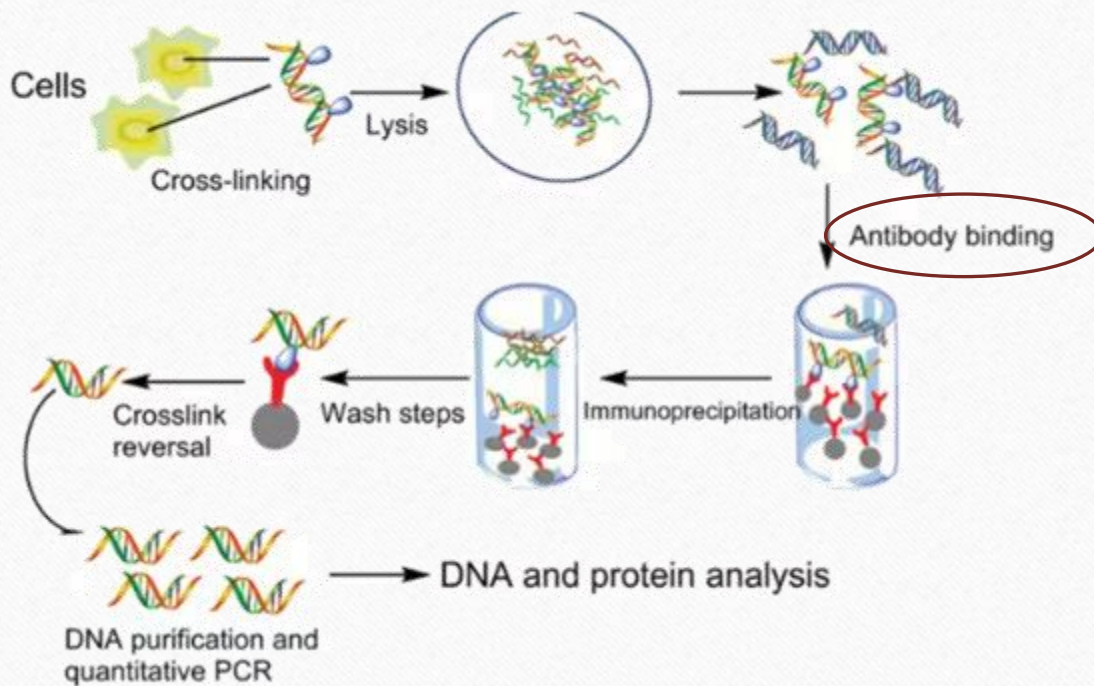
Utvdili ste da su interakcije između DNA i proteina fiksirane i zaključili ste kako je optimalno vrijeme fiksacije 10 min jer tako hvatate komplekse različitih veličina. Sljedeći korak je izolacija jezgri, liza jezgri te fragmentacija kromatina sonikacijom. Kako bi provjerili je li sonikacija bila uspješna?

Uzorak koji nije soniciran = 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.

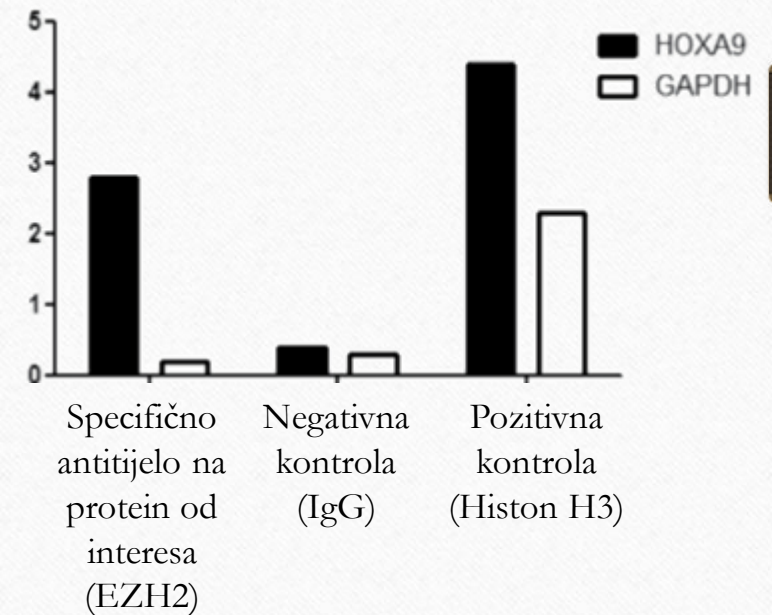


day 1	Harvest cells and crosslink DNA to proteins.
day 2	Isolate nuclei. Lyse nuclei and sonicate chromatin.
day 3	Sonication check. ChIP – antibody binding.
day 4	Beads binding. Wash beads. Elute DNA.
day 5	Reverse crosslinking and precipitate DNA.

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:

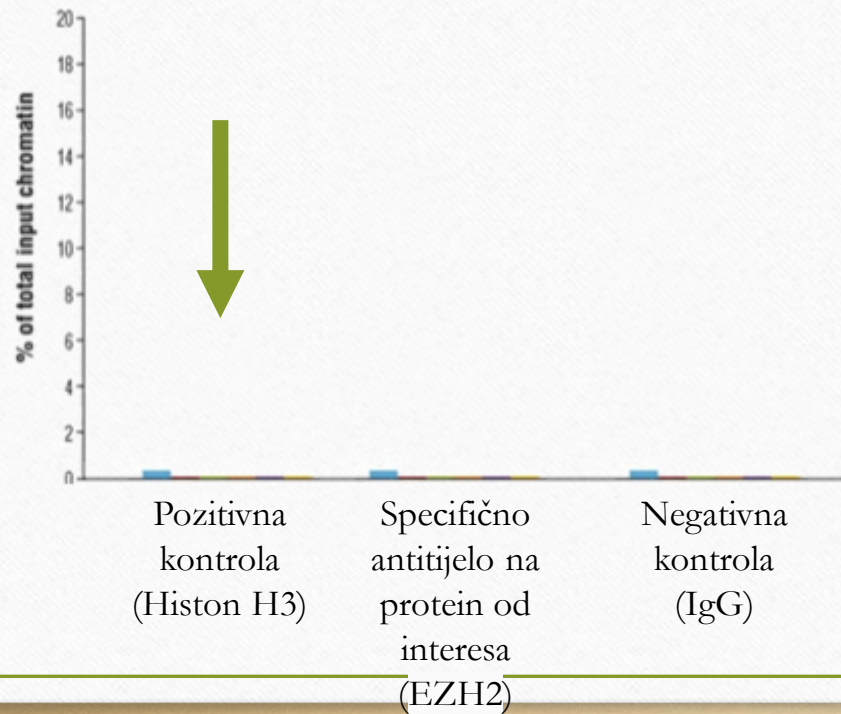
- Pozitivna kontrola – antitijelo koje će se vezati na sekvence DNA, neovisno o aktivnosti lokusa koji se istražuju u eksperimentu. U tu svrhu najčešće se koristi antitijelo koje se veže na sve varijante histona H3 (Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated)).
- Negativna kontrola (tzv. „mock”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



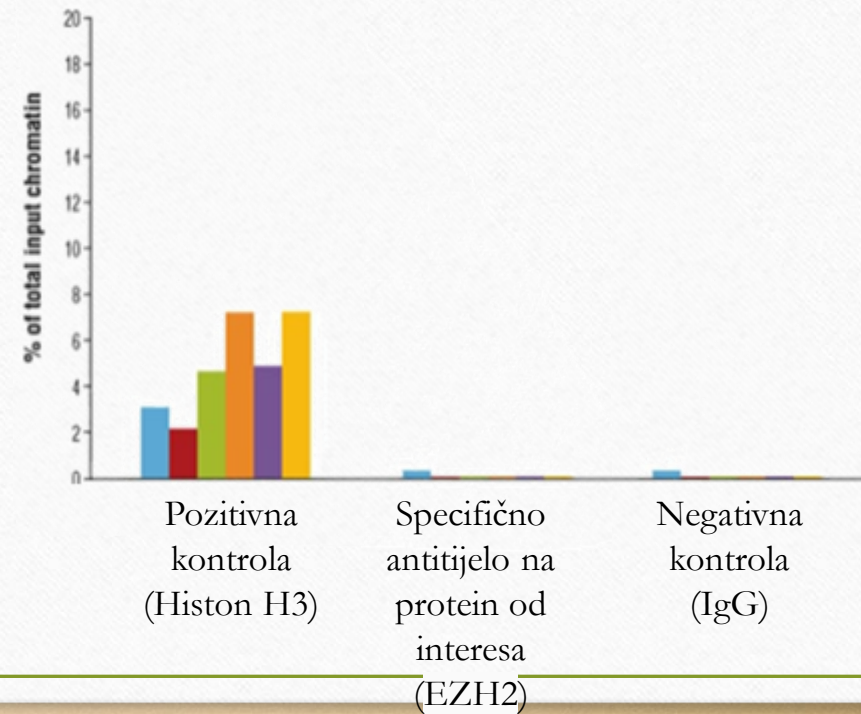
HOXA9 = poznato vezno mjesto histona H3 i proteina EZH2 (pozitivna kontrola)
GAPDH = lokus za koji je poznato da se na njega ne veže EZH2 (negativna kontrola)

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 uredno, ali specifično antitijelo ne radi



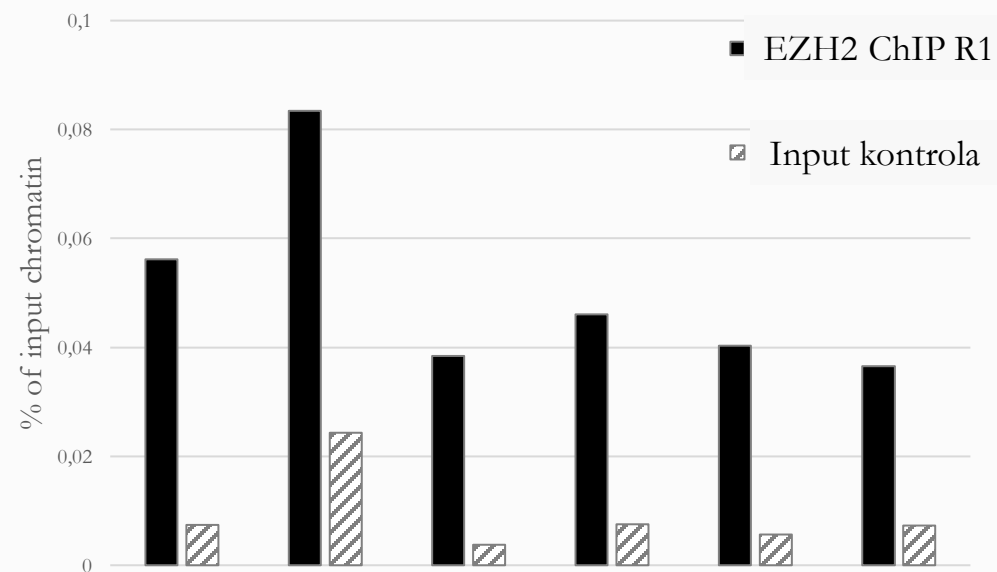
Uspješno ste fragmentirali kromatin te sad slijedi vezanje antitijela za ChIP. Koristite već spomenuto antitijelo anti-EZH2. Nakon vezanja antitijela slijedi imunoprecipitacija samo onih fragmenata za koje se antitijelo specifično veže, odvajanje vezanih proteina od DNA te precipitacija fragmenata DNA 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:

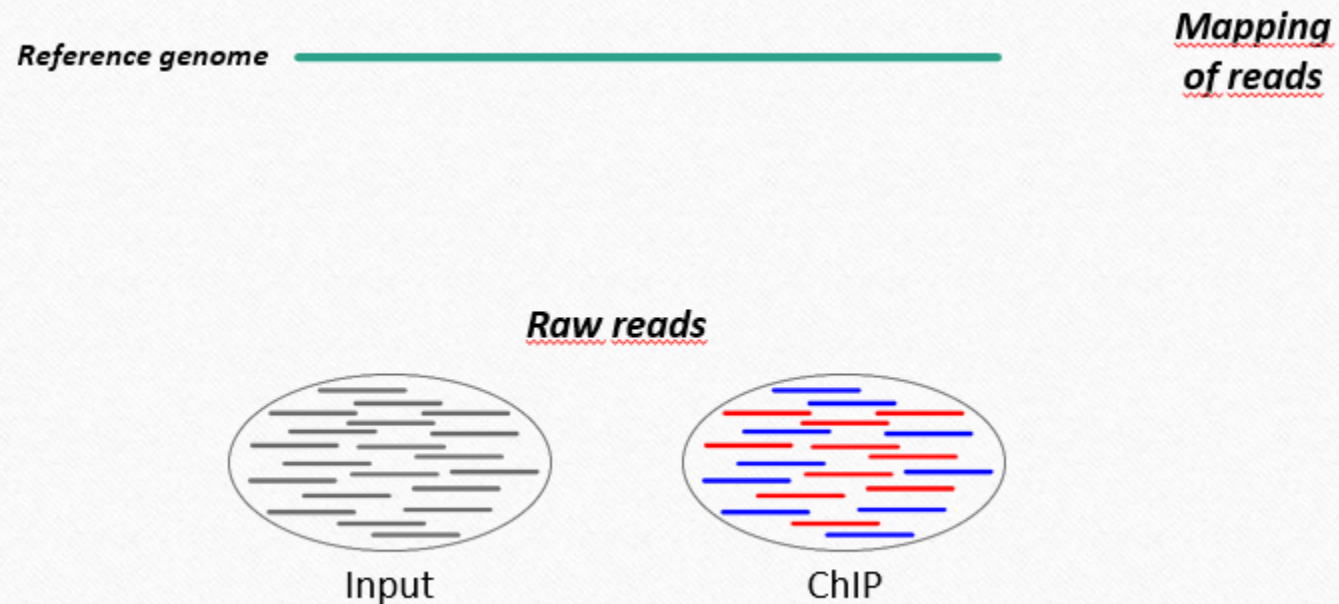
- Pozitivna kontrola – antitijelo koje će se vezati na sekvence DNA, neovisno o aktivnosti lokusa koji se istražuju u eksperimentu. U tu svrhu najčešće se koristi antitijelo koje se veže na sve varijante histona H3 poput Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated).
- Negativna kontrola (tzv. „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.

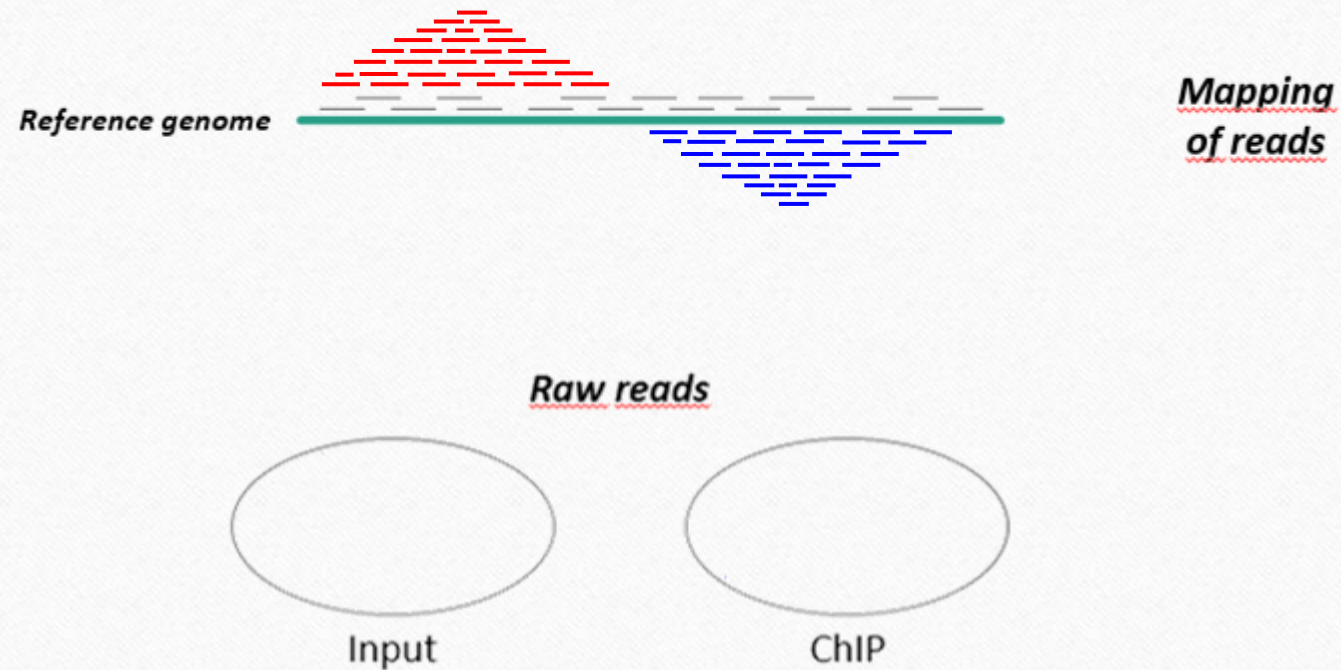
- „Input” kontrola – uzorak koji je prošao crosslinking i fragmentaciju, ali ne i imunoprecipitaciju. Ova kontrola se koristi jer sonikacija nije u potpunosti nasumičan proces te se ovime eliminiraju lažno pozitivni rezultati



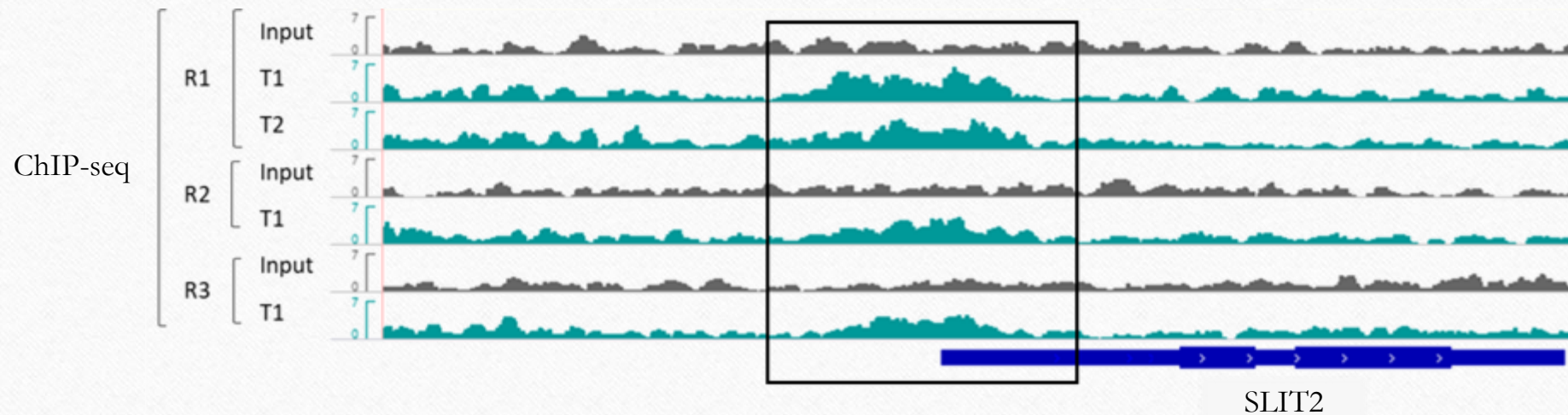
Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.



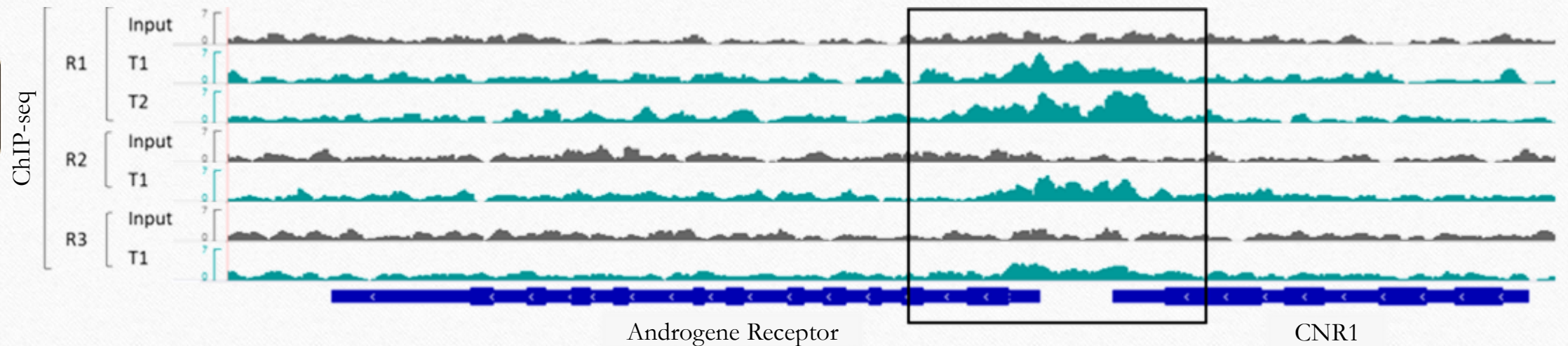
Nakon što ste proveli eksperimente, pripremili sve potrebne uzorke (biološke i tehničke replike) i kontrole, šaljete ih u servis gdje će se odraditi priprema knjižnice i sekvenciranje, a vama onda slijedi analiza dobivenih podataka.



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.

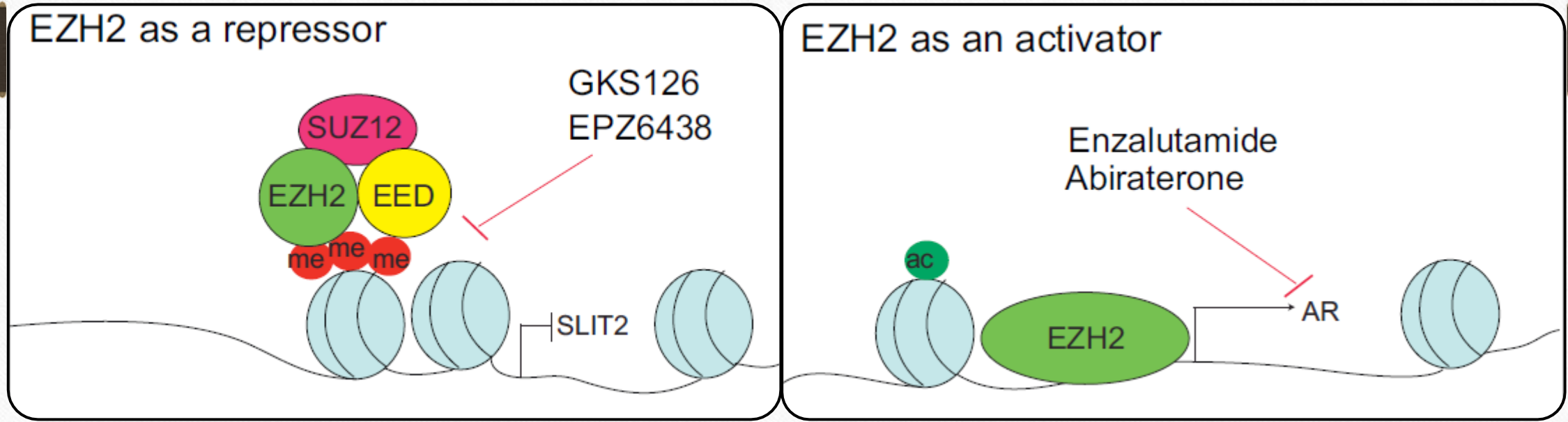




Cell Reports
Article

Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator

Jung Kim,^{1,6} Yongik Lee,^{1,6} Xiaodong Lu,¹ Bing Song,¹ Ka-Wing Fong,¹ Qi Cao,^{2,3} Jonathan D. Licht,^{1,2,4} Jonathan C. Zhao,^{1,2,*} and Jindan Yu^{1,2,5,7,*}

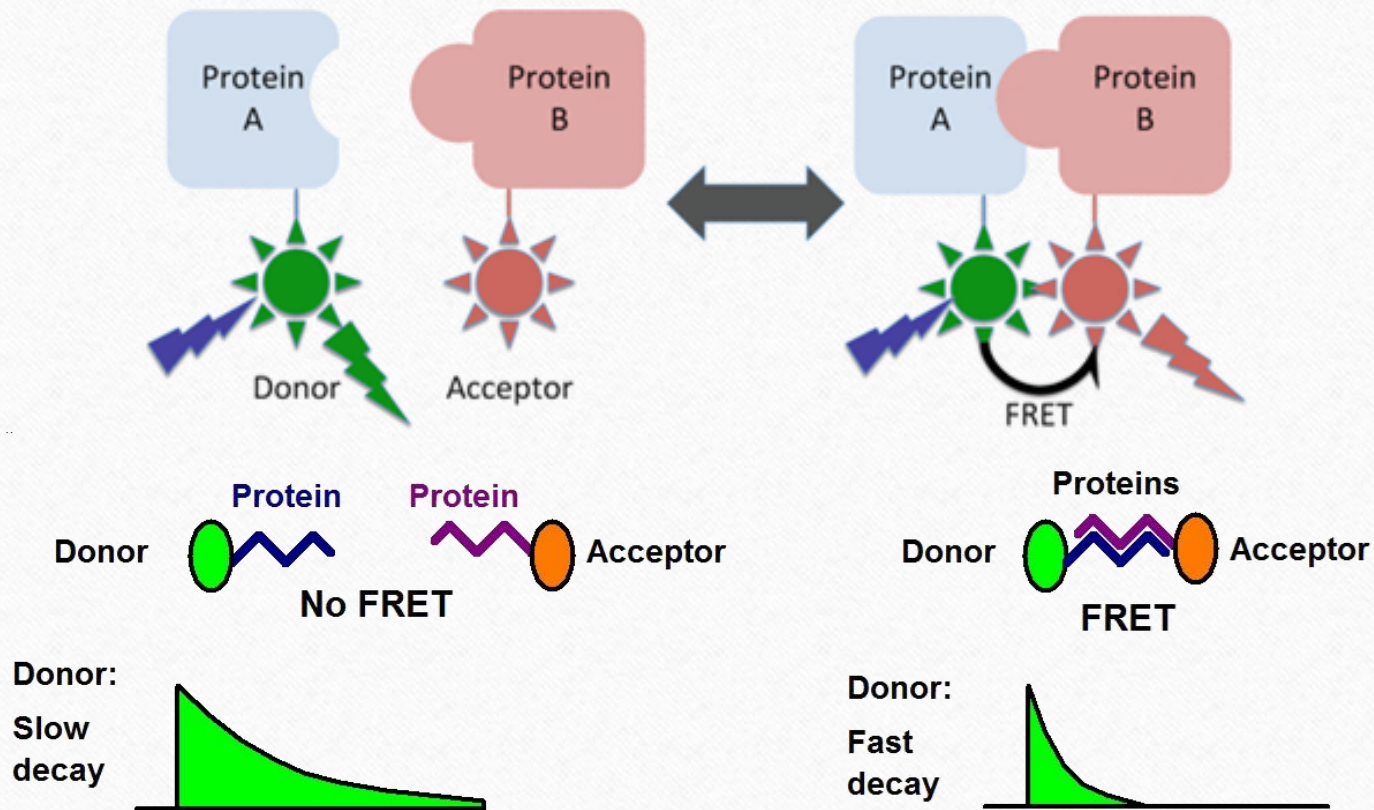


Primjeri upotrebe kontrola u eksperimentima

FRET-FLIM

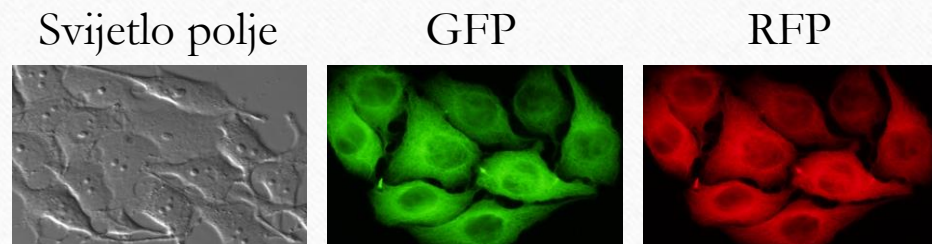
FRET-FLIM

(Förster resonance energy transfer - fluorescence lifetime imaging microscopy)

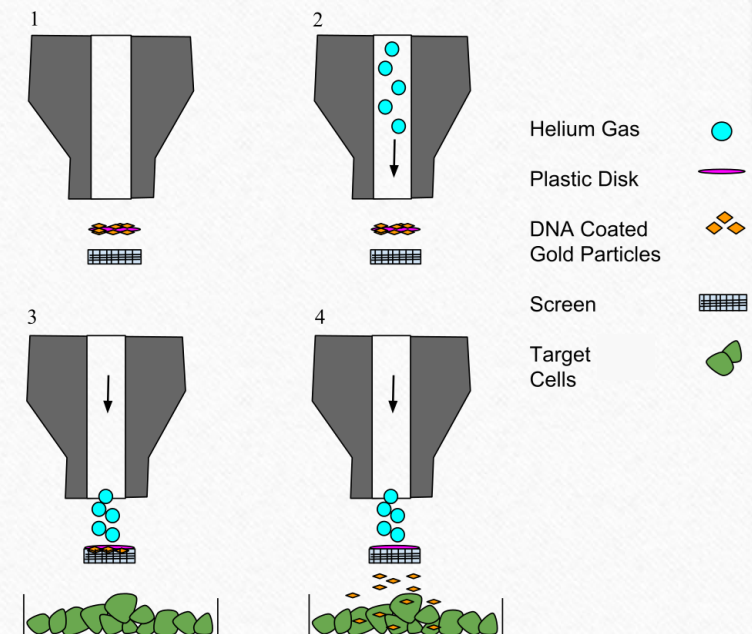


Istražujete utjecaj gama zračenja na unutarstaničnu lokalizaciju kinaza NME1 i NME2 te njihovu oligomerizaciju u stanicama HeLa. Gama zračenje uzrokuje oštećenja DNA, dok su kinaze NME1 i NME2 uključene u popravak oštećene DNA te sprečavanje nastanka metastatskih stanica. U istraživanju koristite konfokalni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

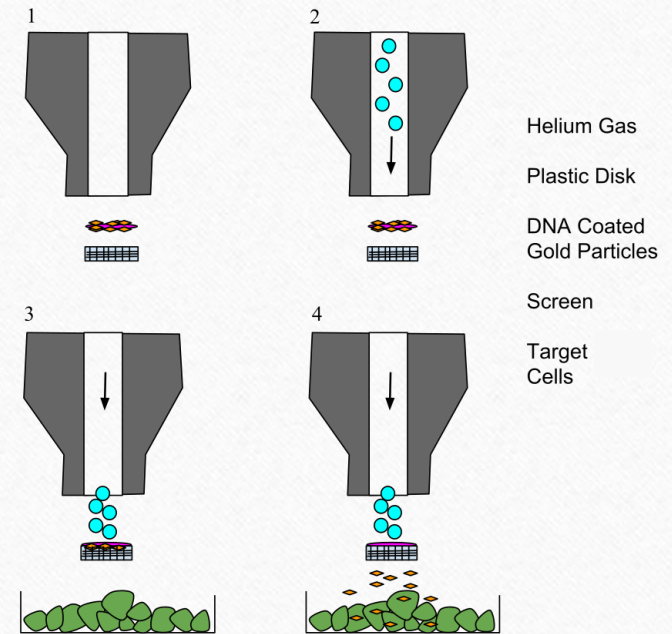
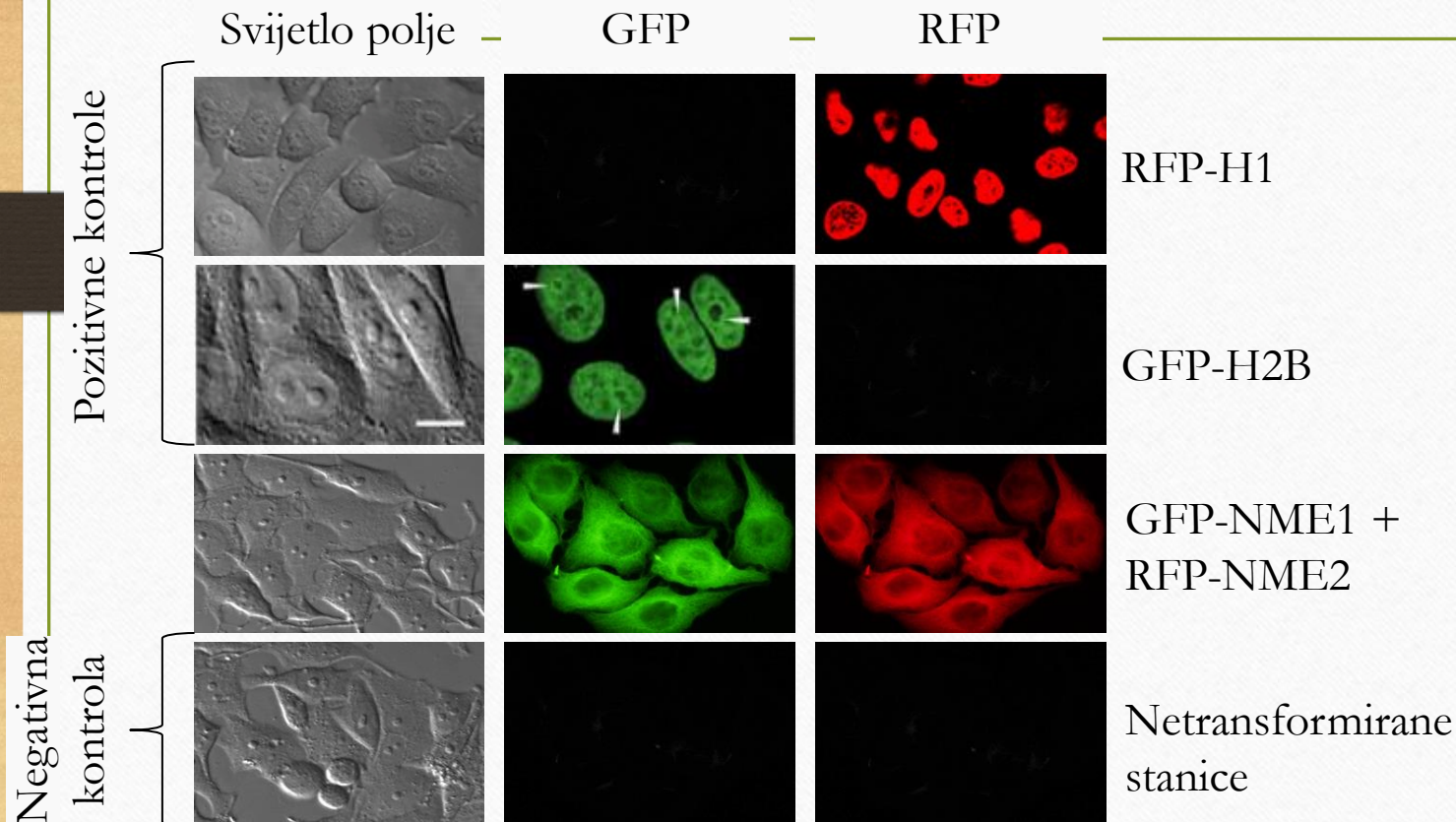
Prvi korak je trajna transformacija stanica fluorescentno obilježenim proteinima NME1 i NME2 te pod konfokalnim mikroskopom provjeravate je li transformacija bila uspješna. Koje kontrole morate imati?



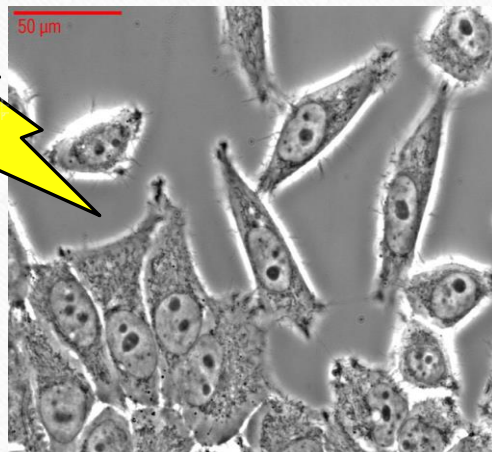
GFP-NME1 +
RFP-NME2



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



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?



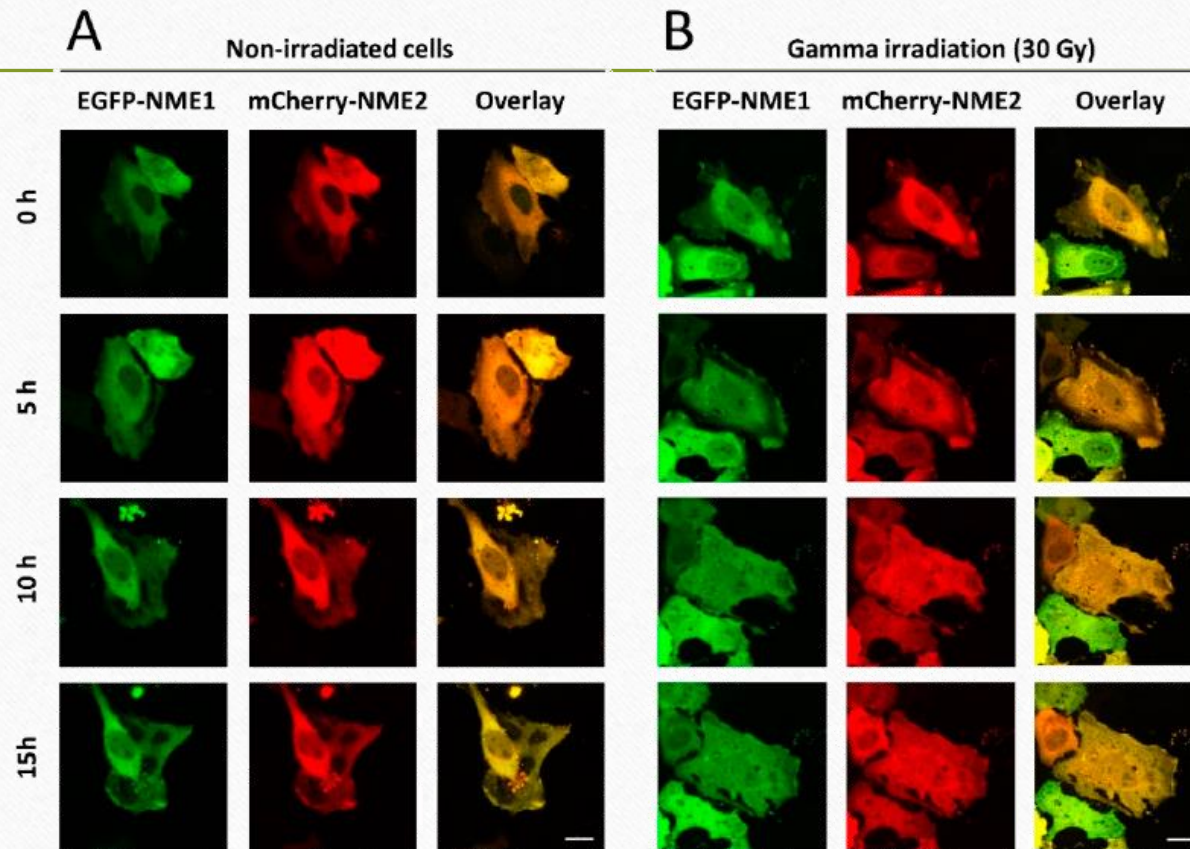
Tretirane stanice



Netretirane stanice

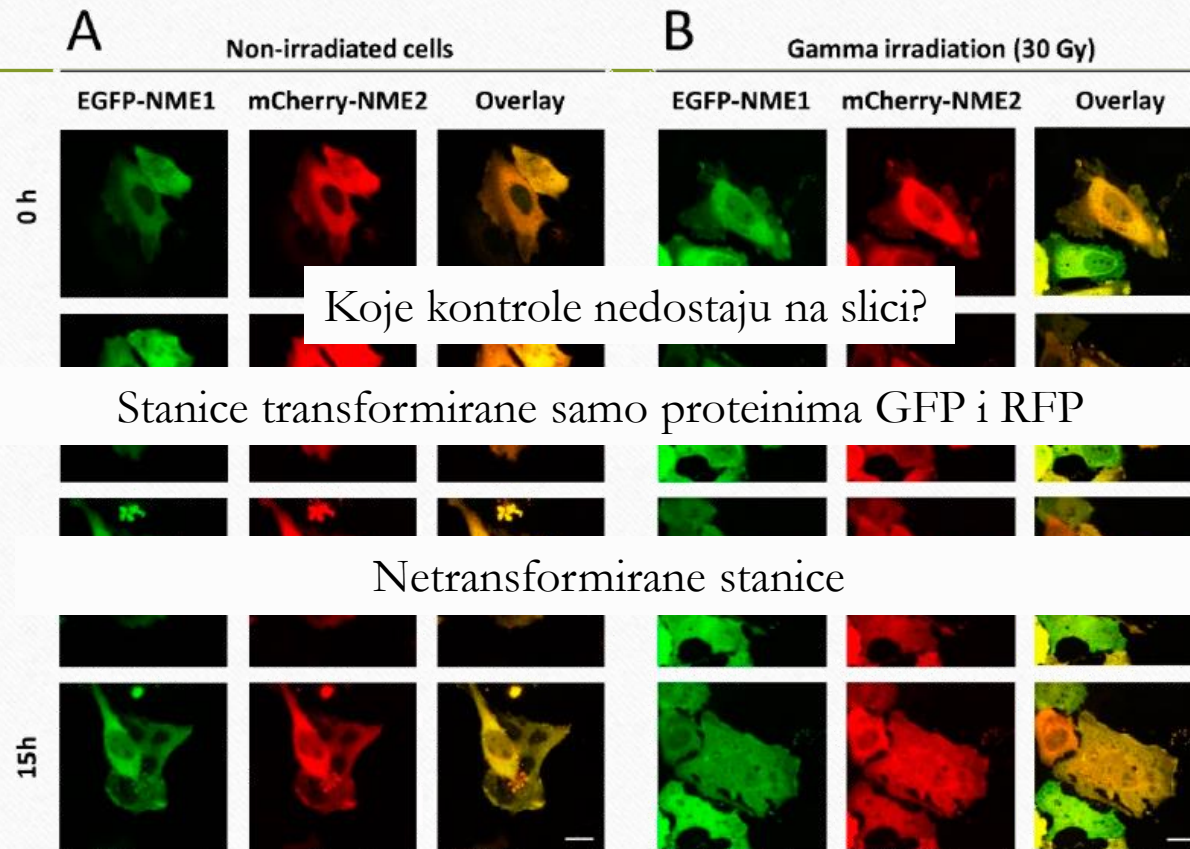
Kontrolna grupa

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?



Koje kontrole nedostaju na slici?

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?



Koje kontrole nedostaju na slici?

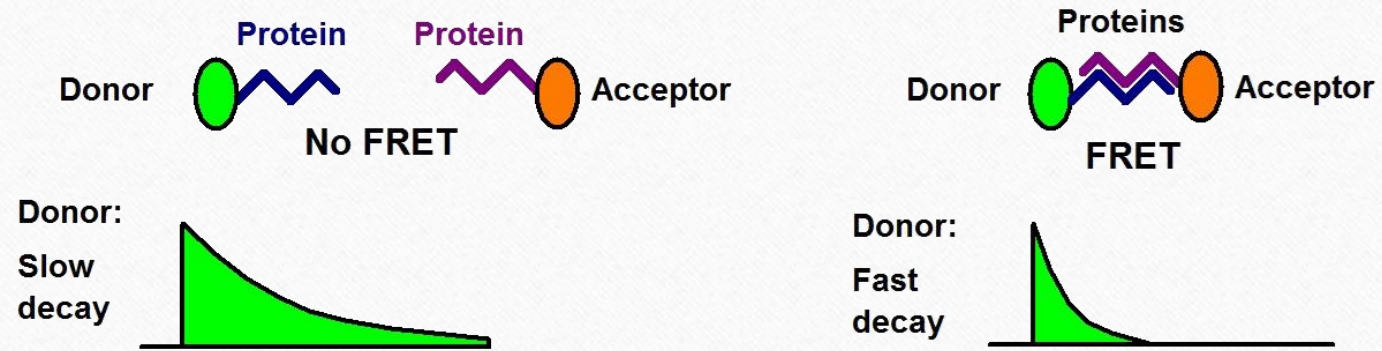
Stanice transformirane samo proteinima GFP i RFP

Netransformirane stanice

Ima li zračenje utjecaj na lokalizaciju molekula reportera?

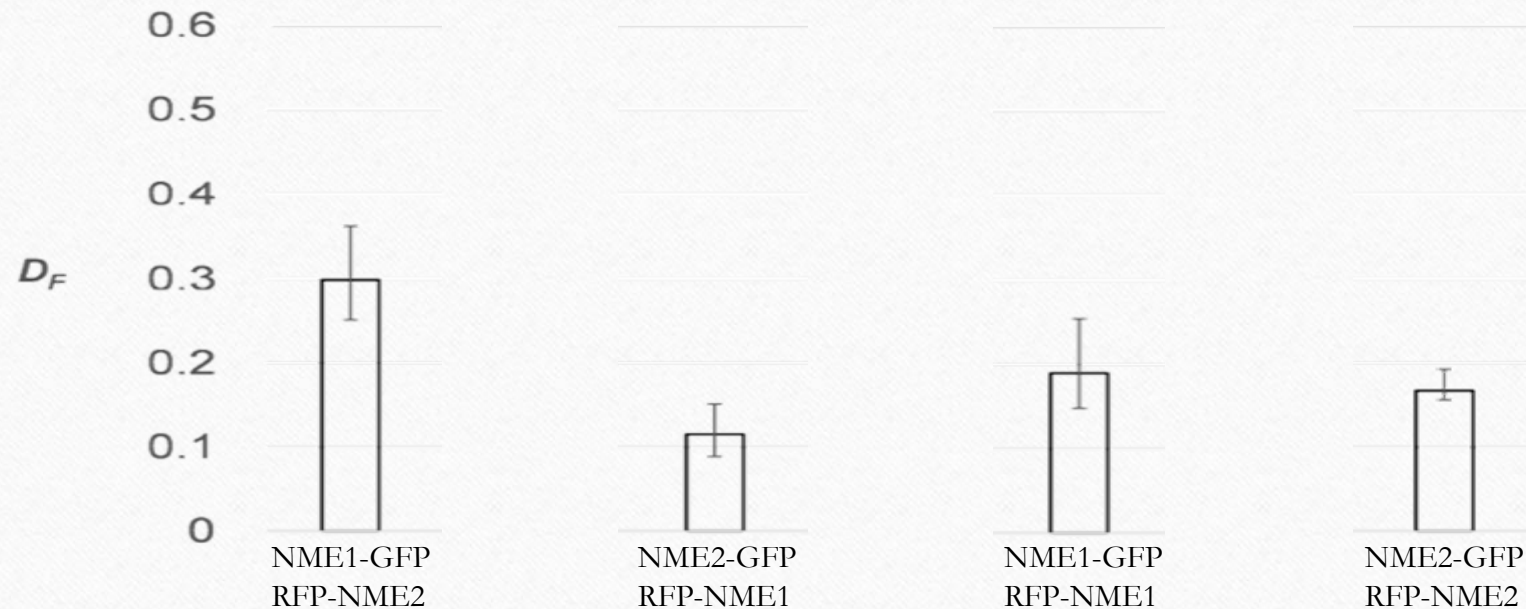
Dolazi li uslijed zračenja do autofluorescencije stanica?

I na kraju, želite utvrditi djeluju li proteini NME1 i NME2 u stanici kao homodimeri ili heterodimeri (pitanje oligomerizacije). Metodom FRET-FLIM testirat ćete postojanje homodimera NME1 i NME2, te interakcije proteina NME1 s NME2 (heterodimer). Koje bi vam ovdje bile kontrole?





I na kraju, želite utvrditi djeluju li proteini NME1 i NME2 u staniči kao homodimeri ili heterodimeri (pitanje oligomerizacije). Metodom FRET-FLIM testirat ćete postojanje homodimera NME1 i NME2, te interakcije proteina NME1 s NME2 (heterodimer). Koje bi vam ovdje bile kontrole?

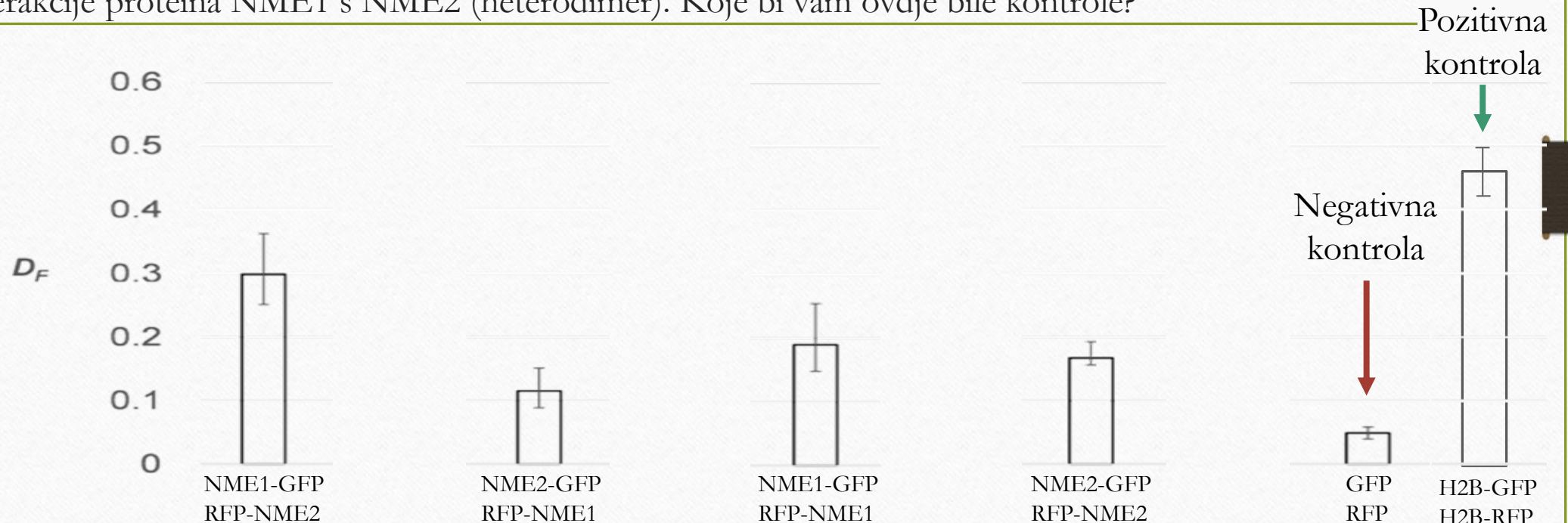


Kalibrator:
NME1-GFP





I na kraju, želite utvrditi djeluju li proteini NME1 i NME2 u staniči kao homodimeri ili heterodimeri (pitanje oligomerizacije). Metodom FRET-FLIM testirat ćete postojanje homodimera NME1 i NME2, te interakcije proteina NME1 s NME2 (heterodimer). Koje bi vam ovdje bile kontrole?





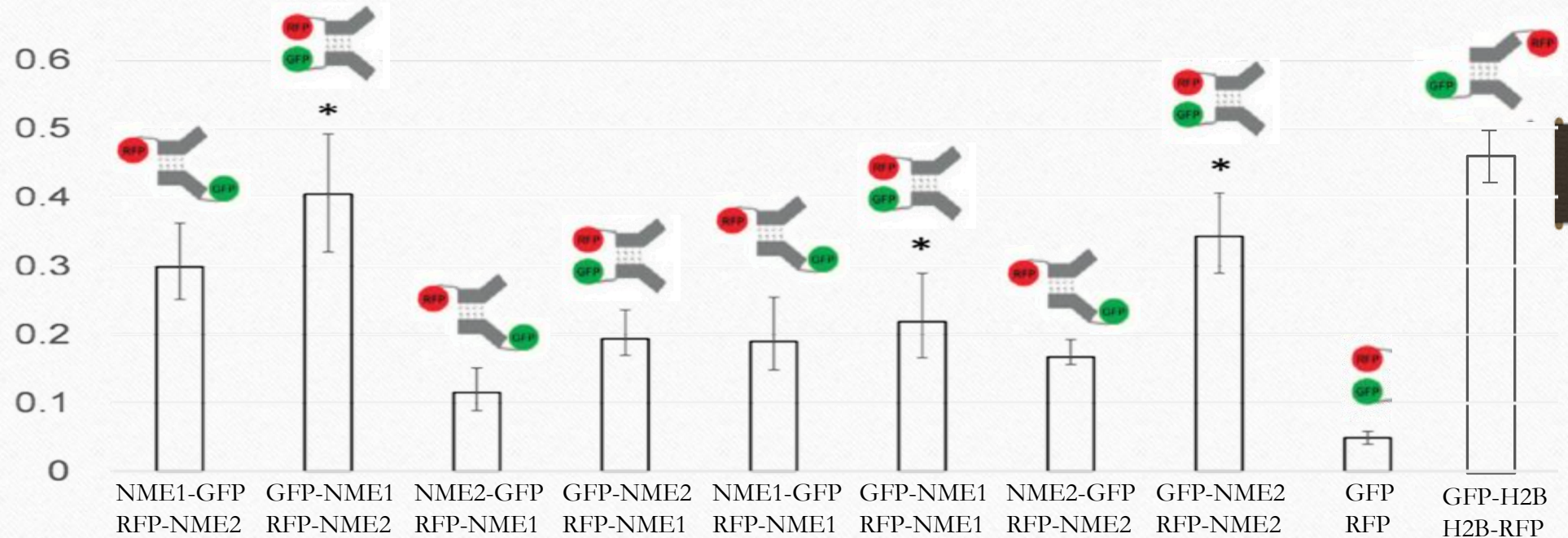
I na kraju, želite utvrditi djeluju li proteini NME1 i NME2 u staniци kao homodimeri ili heterodimeri (pitanje oligomerizacije). Metodom FRET-FLIM testirat ćete postojanje homodimera NME1 i NME2, te interakcije proteina NME1 s NME2 (heterodimer). Koje bi vam ovdje bile kontrole?

Kontrole koje nisu prikazane:

NME1-GFP + RFP



...



PROVJERA ORIJENTACIJE REPORTERA



The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage

Martina Radić¹, Marko Šoštar², Igor Weber² , Helena Četković², Neda Slade¹ and Maja Herak Bosnar^{1,*}

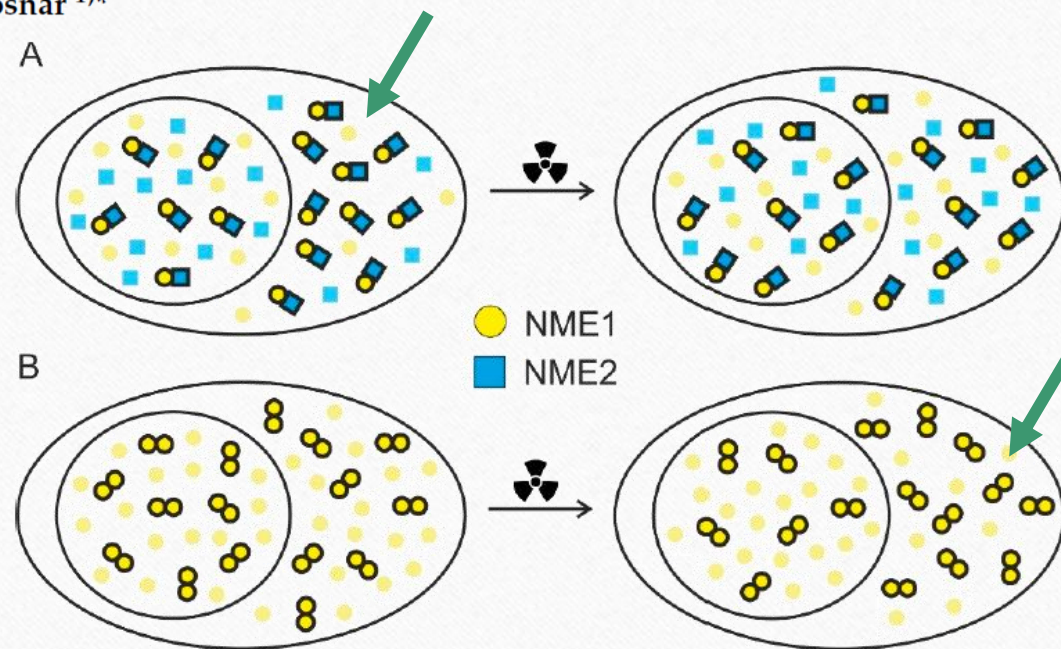


Figure 5. Schematic interpretation of the changes in D_F determined by FRET/FLIM experiments



DO YOU PREFER CONTROL OR EXPERIMENTAL?