

Određivanje ekspresije egzoribonukleaze EXOSC10 u embrionalnim razvojnim stadijima ribe zebrice (*Danio rerio*)

Škrinjar, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:209662>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Nina Škrinjar
0058215521

**ODREĐIVANJE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEAZE
EXOSC10 U EMBRIONALNIM RAZVOJNIM STADI-
JIMA RIBE ZEBRICE (*Danio rerio*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2022.
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za istraživanje mora i okoliša
Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje ekspresije egzoribonukleaze EXOSC10 u embrionalnim razvojnim stadijima ribe
zebrice (*Danio rerio*)

Nina Škrinjar, 00581215521

Sažetak:

Western blot metodom ispitana je ekspresija proteina EXOSC10 u embrionalnim fazama razvoja ribe zebrice (*Danio rerio*). Protein EXOSC10 sudjeluje u regulaciji ekspresije gena te u procesiranju i degradaciji molekula RNA. Western blot metoda se bazira na specifičnoj interakciji antitijela s proteinom na temelju čega se potvrđuje prisutnost traženog proteina uz određivanje molekulske mase istog. Metoda uključuje redom: pripremu uzoraka, gel elektroforezu, transfer proteina s gela na membranu, inkubiranje primarnim antitijelom, inkubiranje sekundarnim antitijelom i detekciju. Od ranije je poznato da je protein EXOSC10 prisutan u jetri, gonadama, očima i mozgu zebrice, te da je transkript prisutan u prvih 5 dana embrionalnog razvoja. U ovom radu smo pokazali da je protein EXOSC10, molekulske mase oko 100 kDa, prisutan u uzorcima embrija 24 sata, 72 sata i 96 sati nakon fertilizacije.

Ključne riječi : Western Blot imunodetekcija, egzoribonukleaza EXOSC10, riba zebrica (*Danio rerio*), embrionalna faza razvoja.

Rad sadrži: 28 stranica, 12 slika, 2 tablice, 10 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: dr.sc. Jovica Lončar

Datum obrane: 16. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of sea and environment
Laboratory for molecular ecotoxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of the expression of exoribonuclease EXOSC10 in embryonic developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*)

Nina Škrinjar, 00581215521

Abstract:

The expression of the EXOSC10 protein in the embryonic developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*), whose role is the regulation of gene expression, processes, and degradation of the RNA molecule, was examined using the Western blotting method. The method is based on the specific interaction of the antibody with the protein, on the basis of which the presence of the sought protein is confirmed, and its molecular weight is determined. In detail, the method includes: sample preparation, gel electrophoresis, protein transfer from the gel to a membrane, incubation with primary antibody, incubation with secondary antibody, and detection. It was previously known that the EXOSC10 protein is present in the liver, gonads, eyes, and brain and that the transcript is present in the first 5 days of embryonic development. We have shown that the EXOSC10 protein, with a molecular weight of about 100 kDa, is present in embryo samples at 24 hours, 72 hours, and 96 hours after fertilization.

Keywords: Western Blot immunodetection, exoribonuclease EXOSC10, zebrafish (*Danio rerio*), embryonic stage of development.

Thesis contains: 28 pages, 12 figures, 2 tables, 10 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Technical support and assistance: dr.sc. Jovica Lončar

Thesis defended: September 16th, 2022

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RIBA ZEBRICA (DANIO RERIO)	2
2.2. EXOSC10 RIBONUKLEAZA	3
2.3. WESTERN BLOT METODA	4
2.3.1. Povijest.....	4
2.3.2. O metodi	4
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. Kemikalije.....	7
3.1.2. Puferi.....	7
3.1.3. Uređaji	8
3.1.4. Zebrice.....	8
3.2. METODA	9
3.2.1. Mrijest i prikupljanje embrija	9
3.2.2. Priprema lizata embrija i određivanje koncentracije	9
3.2.3. Priprema gelova za SDS elektroforezu	10
3.2.4. Priprema uzoraka.....	11
3.2.5. Slaganje modula za elektroforezu.....	12
3.2.6. Transfer proteina s gela na membranu.....	14
3.2.7. Blokiranje membrane i inkubacija s antitijelima	14
3.2.8. Detekcija	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Western Blot metoda datira iz 1979. godine, zasniva se na vezanju antitijela za protein, a podrazumijeva imunodetekciju specifičnog proteina u uzroku. Kompleksni uzorak prethodno se razdvaja u mreži poliakrilamidnog gela, nakon čega slijedi prijenos proteina s gela na membranu, vezanje primarnog antitijela, vezanje sekundarnog antitijela i detekcija. Kao signal za detekciju služi kemijska reakcija cijepanja luminola enzimom peroksidazom koji je vezan na sekundarno antitijelo. Metoda se koristi u istraživanjima molekularne biologije, stanične biologije, biokemije te u bliskim poljima znanosti (Najahov i Hoxhaj, 2017). Ovom metodom ispitivana je proteinska ekspresija gena *exosc10*, potvrđena istraživanjem na razini transkripta, u embrionalnim razvojnim stadijima ribe zebrice. Riba zebrica (*Danio rerio*) slatkovodna je, tropska riba koja se svrstava u razred pravih koštunjača (Mišić, 2021). Karakteristike kao što su vanjska oplodnja i razvoj, jednostavna građa stabilnog genoma, odvijanje jednakih osnovnih staničnih funkcija kao i kod kompleksnijih organizama čine ga modelnim organizmom u toksikološkim i genetičkim istraživanjima (Ribas i Piferrer, 2014). EXOSC10 ribonukleaza svrstava se u skupinu egzonukleaznih RNaza D (DEDD). Njezina uloga je procesiranje i degradacija RNA molekule, kontrola održavanja telomera, regulacija ekspresije gena, kao i sudjelovanje u popravku dvostrukog prekida. S obzirom da je dio polimernog nuklearnog RNA egzosoma, sudjeluje u interakciji s brojnim proteinima, prisutna je u staničnoj diobi i diferencijaciji stanica, a važna je i za autoimune poremećaje i onkologiju (Stuparević i sur., 2021).

Ekspresija proteina najizraženija je od 1 do 6 sati nakon oplodnje (Oreški, 2019). Očekivano je da će prilikom detekcije, protein biti vidljiv u obliku vrpce na membrani, u svim uzetim fazama embrionalnog razvoja (24, 48, 72, 96 i 120 sati nakon oplodnje).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RIBA ZEBRICA (*Danio rerio*)

Ribe su životinje koje pripadaju skupini kralježnjaka te su zahvaljujući svojoj filogenetskoj raznolikosti modelni organizmi u istraživanjima procesa evolucije, bolesti i razvojnih stadija. Riba zebrica je slatkovodna tropska riba, podrijetlom iz Južne Azije, koja je svrstana u razred pravih koštunjača iz porodice Cyprinidae (šarani). Ime joj dolazi iz benglaske riječi „dhani“ što znači „od rižinih polja“ jer je zbog obitavanja u rijekama južne i jugoistočne Azije često viđena uz polja riže (Mišić, 2021). Prosječna veličina zebrice je 5 cm, mase oko 0,5- 0,9 g. Ribe zebrice imaju kraći životni ciklus u usporedbi s drugim ribama, u prosjeku žive do 36 mjeseci, a jedinke su spolno zrele već u trećem mjesecu života. Zahvaljujući maloj veličini odrasle jedinke, lakom uzgoju, vanjskoj oplodnji i razvoju, ribe zebrice se koriste u toksikološkim i genetičkim istraživanjima jer su promatranje i kontrola embrija, a kasnije manipulacija uzoraka, olakšani (Oreški, 2019).

Karakteristike koje životinjski organizam treba posjedovati da bi služio kao modelni organizam u istraživanju su: jednostavna struktura, posjedovanje osnovnih staničnih procesa koji se odvijaju u složenijim organizmima, jednostavno rukovanje i ekonomičnost, mogućnost uzgoja u laboratoriju te mali i stabilan genom podložan genetičkom inženjerstvu (Ribas i Piferrer, 2014).

Sposobnost prilagodbe zebricama omogućava obitavanje u staništima različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Optimalni uvjeti okoline za zebricu su: temperatura u rasponu od 26 °C do 29 °C, tvrdoća vode 72 - 200 mg/L, pH 7-8 i vodljivost od 700 – 1000 µS (Ribas i Piferrer, 2014).

Razmnožavanje u laboratoriju, za razliku od razmnožavanja u prirodnom staništu, vrlo je osjetljivo na promjenu temperature i pH vrijednosti vode. Optimalna temperatura vode iznosi 28 °C, na temperaturi od 27 °C dolazi do smanjenja, dok na 26 °C nema rasploda. Poželjan pH iznosi od 7,6 do 7,7. Pri pH 7 i 8,4 ne dolazi do rasploda s time da je broj embrija veći pri pH 8 nego pri pH 8,2 ili 8,3. Vodljivost je također bitan parametar u rasplodu te optimalna vrijednost iznosi 1100 µS/cm. Preporučeni raspon vodljivosti vode je 1000-1200 µS/cm. Pri vrijednostima nižim od 500 µS/cm ne dolazi do razmnožavanja. Poželjan omjer broja mužjaka i ženki prilikom parenja je 3 mužjaka naprema 2 ženke. Zebrice se mriju tokom cijele godine, a generacijsko vrijeme traje od 3 do 5 mjeseci. Ženka zebrice može izleći 200 do 300 jaja svakih 5 do 7 dana.

Mužjak i ženka razlikuju se oblikom, bojom i veličinom tijela: tijelo mužjaka vitko je, u obliku torpeda po kojem se protežu uzdužne tamne linije, a trbušna strana zlatne je boje što nije toliko zamjetno kod ženki koje su i veće i deblje.

Riba zebrica ima dva seta kromosoma u jezgri tjelesnih stanica što bitno olakšava provedena istraživanja s obzirom da je većina riba triploidna, odnosno tetraploidna. U usporedbi s ljudskim organizmom koji je diploidan, genom riba zebrica (veličine 1700 Mbp) mnogo je složeniji jer sadrži 25 kromosomskih parova. Tijekom evolucije pravih koštunjača došlo je do razlike prilikom duplikacije cijelog genoma. Duplikacijom gena, neki od njih dobili su novu funkciju, neki zadržali ishodnu, a neki se eksprimiraju u drugim tkivima s obzirom na gen iz kojeg su nastali (Hill i sur., 2005). Prilikom diobe stanica kod embrija sisavca, mutacija uzrokuje smrt embrija, što kod zebrica ne mora biti slučaj. Upravo zbog duplikacije genoma i većeg broja paraloga koji međusobno mogu preuzimati funkciju, nakon mutacije iz embrija će se razviti jedinka pomoću koje se može definirati funkcija određenog gena (Oreški, 2019).

Zebrice se koriste u humanim istraživanjima zbog toga što im je zajednička većina razvojnih puteva, organskih sustava i fizioloških mehanizama, a stupanj konzerviranosti genoma iznosi otprilike 70 % (Višić, 2017).

2.2. EXOSC10 RIBONUKLEAZA

EXOSC10 ribonukleaza je protein molekulske mase 100 kDa, koji se nalazi u jezgri stanica kvasca (pod nazivom Rrp6 kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*) te u jezgri, nukleoplazmi i citoplazmi u stanicama čovjeka. Pripada obitelji egzonukleaznih RNaza D (DEDD) za koje je specifično da u aktivnom mjestu katalitičke domene sadrže 4 aminokiselinska ostatka (tri aspartatna ostatka i jedan glutamatni ostatak), koji uz pomoć dva dvovalentna metalna iona, čija je uloga aktivacija vode, dovode do hidrolitičkog cijepanja fosfodiesterne veze nukleinskih kiselina u 3'-5' smjeru (Steitz i Steitz, 1993).

RNaze mogu sadržavati i dodatni tirozinski ili histidinski ostatak te se prema tome svrstavaju u obitelji DEDD-Y i DEDD-H, primjer je EXOSC10 ribonukleaza kod ljudi i kvasca, koja pripada DEDD-Y obitelji. Osim što je dio katalitičke podjedinice polimernog egzosoma, može se i sam vezati na RNA molekulu, zahvaljujući svojoj C terminalnoj domeni (CDT). EXOSC10 ribonukleaza posjeduje više specifičnih domena u svom sastavu: N- terminalnu PMC2NT domenu, HRDC domenu i HRDC 2 domenu uz spomenute DEDD

i CDT domene. PMC2NT domena sudjeluje u međudjelovanju proteina EXOSC10 s kofaktorom C1d (Rrp47 kod kvasaca). HRDC domena ključna je u odvijanju procesa izvan proteina. Protein EXOSC10 veže se u blizini kape egzozoma i hidrolitički cijepa molekulu RNA u smjeru 3' prema 5' pri čemu je struktura supstrate pogodna za hidrolizu u jednolančanom području. EXOSC10 ribonukleaza kod ljudi može pocijepati supstrate kompliciranije strukture od nukleaze kvasca (Oreški, 2021).

2.3. WESTERN BLOT METODA

2.3.1. Povijest

Prvotna izvedba Western blot metode opisana je 1979. godine u laboratorijima instituta Friedrich Miescher u Baselu (Švicarska) i sveučilišta Stanford u Kaliforniji (SAD). Harry Towbin i kolege začetnici su metode u Švicarskoj, a George Stark u SAD-u. Naziv “Western blotting” uveo je znanstvenik W. Neal Burnette, 1981. godine, kad je došlo do unaprjeđenja same metode. Metoda je dobila naziv po lokaciji laboratorija Fred Hutchinson Cancer Research Center (Washington, SAD), koji se nalazi na zapadnoj obali Amerike, po uzoru na prethodno razvijene metode: Southern blotting metoda za detekciju DNA (1975.) i Northern blotting metoda za detekciju RNA (1977.). Prema podacima Google Scholar, radovi Harrya Towbina o Westernskoj metodi navođena su kao pravac u istraživanjima oko 54 000 puta, u posljednjih 38 godina.

2.3.2. O metodi

Western Blot metoda (Immunoblotting) koristi se za određivanje ciljanog proteina u kompleksnom uzorku, pomoću specifičnog vezanja antitijela, na temelju kojeg se može odrediti količina proteina, molekulska masa i posttranslacijske modifikacije proteina. Metoda se najčešće koristi u biokemiji, molekularnoj biologiji, u poljima stanične biologije, a svoju primjenu može pronaći i u srodnim granama znanosti. Princip metode leži u interakciji antitijela s proteinom na temelju afiniteta epitopa za antitijelo. S obzirom na epitet antigena, antitijela mogu biti monoklonska i poliklonska. Monoklonska antitijela su specifičnija, odnosno vežu se na pojedinačni epitet pojedinačnog antitijela, dok se poliklonska antitijela vežu na različite epitope antigena ili različite antigene (Milčić, 2016). Western blot metoda može biti kvantitativna ili semikvantitativna ovisno o vrsti reagensa koji se koristi te mogućnosti pojačavanja signala pri čemu se mogu detektirati količine proteina u pikogramima. Metoda se sastoji od nekoliko koraka: pripreme uzoraka, gel

elektroforeze, transfera proteina s gela na membranu, inkubiranju primarnim antitijelom, inkubiranju sekundarnim antitijelom i detekcije.

Uzorci se mogu pripremiti korištenjem različitih pufera u svrhu denaturacije proteina uz prisutne proteazne i fosfatazne inhibitore kako bi se spriječila razgradnja proteina, odnosno defosforilacija ako je ciljani protein u fosforiliranom obliku. Poželjna količina proteina koja se nanosi na gel obično iznosi 10-50 µg te je važno da su svi uzorci jednakog volumena pri nanošenju u jažice gela jer volumen utječe na kretanje proteina kroz gel te će uzorak većeg volumena interferirati uzorku manjeg volumena. Proteine je prije gel elektroforeze potrebno denaturirati pomoću SDS anionskog deterdženta. Vežanjem jedne molekule SDS-a na dva aminokiselinska ostatka u proteinu, protein prelazi u linearnu strukturu te ima jednoličan negativan naboj. Gel elektroforeza omogućava razdvajanje proteina različite molekulske mase, prolaskom uzorka kroz pore akrilamidnog gela primjenom električnog polja.

Poliakrilamidni gel kemijski je inertan, termostabilan i pogodan za oblikovanje pora različitih veličina. Gel može biti izlijevan u obliku koncentracijskog gradijenta, što omogućava bolje razdvajanje proteina različitih molekulskih veličina. Veličina pora gela ovisi o udjelu akrilamida te se određuje ovisno o molekulskoj masi ciljanog proteina (Tablica 1.).

Tablica 1. Preporučena koncentracija gela za različite raspone veličine proteina (Najahov i Hoxhaj, 2017).

% gel (akrilamid:bis = 29:1)	Preporučeni raspon veličina
6	60-250 kDa
8	50-200 kDa
10	25-100 kDa
12	15-80 kDa
15	14-60 kDa

Osim pripremljenih uzorka, na gel se nanose i marker proteini koji služe kao skala veličina molekulskih masa od 10 do 250 kDa. Postoje dvije vrste marker proteina, tzv. prethodno obojeni markeri pomoću kojih je moguće pratiti rezoluciju proteina u stvarnom vremenu te

neobojeni markeri koji daju bolju procjenu molekularnih veličina od obojenih, ali potrebno ih je prethodno obojati s Ponceau S i označiti olovkom na membrani.

Nakon razdvajanja u gelu, proteini se, pomoću električnog polja, prenose na membranu. Prijenos na membranu se koristi zbog veće čvrstoće membrane s obzirom na gel, jednostavnosti daljnje izvedbe metode te bolje izloženosti epitopa za specifično vezanje s antitijelom. Koriste se dvije vrste membrana: PVDF (polivinilidenfluorid) i nitrocelulozna. Prednost PVDF membrane je pojačavanje signala ukoliko je vezanje antitijela slabo ili je količina proteina mala. Transfer proteina može se odvijati u polusuhim ili vlažnim uvjetima. Polusuhi transfer zahtijeva manje količine transfernog pufera i u pravilu je brži, no vlažni transfer ima bolju učinkovitost. U slučaju vlažnog transfera, transfer sendvič slaže se redom spužva-filter papir-gel-membrana-filter papir-spužva. Transfer se odvija od negativne katode prema pozitivnoj anodi kao i kod elektroforeze.

U svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja primarnog i sekundarnog antitijela, membrana se blokira proteinima obranog mlijeka ili albuminima goveđeg seruma. Primarna antitijela, odnosno imunoglobulini, specifični su tjelesni odgovor imunskog sustava na unos antigena u organizam. Primarna antitijela u Western blot metodi dobivena su reakcijom na ubrizgavanje antigena u tijelo zeca, miša, koze, ovce te mogu, osim ciljanog proteina, prepoznati i proteinsku modifikaciju kao što je fosforilacija. Na primarno antitijelo veže se sekundarno antitijelo uz prisutni enzim peroksidazu ili alkalnu fosfatazu. Sekundarno antitijelo razvija i pojačava signal koji će biti detektiran pomoću uređaja povezanog sa softverom.

Enzim peroksidaza razvija kemiluminiscentni signal oksidacijom luminola pri čemu se oslobađa energija u obliku elektromagnetskog zračenja. Količina svjetlosti koja nastaje reakcijom s ECL reagensom direktno je proporcionalna broju epitopa na membrani s obzirom da je sekundarno antitijelo s enzimom vezano na primarno antitijelo, a primarno antitijelo je specifično vezano na ciljani protein. Svjetlo se može detektirati izlaganjem rendgenskom filmu što predstavlja dobiveni signal. Također membranu je važno isprati TBST puferom u svrhu uklanjanja viška primarnog antitijela prije inkubiranja sekundarnim te uklanjanje viška sekundarnog antitijela prije dodavanja kemiluminiscentnog reagensa (ECL) (Najahov i Hoxhaj, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Korištene kemikalije prilikom provođenja eksperimenta su:

30 % otopina akrilamid/bis-akrilamid: Sigma (Njemačka)

Izopropanol: Gram Mol (Hrvatska)

Temed: Alfa Aesar (Njemačka)

Tween 20: Alfa Aesar (Njemačka)

Etanol: Kemika (Hrvatska)

Metanol: Gram Mol (Hrvatska)

NaCl: Kemika (Hrvatska)

Glicin: Thermoscientific (Njemačka)

SDS: Roth (Njemačka)

HCl: Kemika (Hrvatska)

APS: Sigma (Njemačka)

TRIS: Kemika (Hrvatska)

Luminol: Biorad (SAD)

Glicerol: Kemika (Hrvatska)

Bromfenol plavo: Biorad (SAD)

3.1.2. Pufferi

Pufer za razdvajanje: 1,5 M TRIS, 0,4 % SDS, milli Q voda (mQ)-voda pročišćena uloškom za izmjenu iona, HCl (za podešavanje pH vrijednosti), pH 8,8

Pufer za sabijanje: 0,5 M TRIS, 0,40 % SDS, milli Q voda (mQ), HCl (za podešavanje pH vrijednosti), pH 6,8

Loading pufer: 2 % SDS, 10 % glicerol, 0,05 % bromfenol plavo, 50 mM TRIS-HCl, pH 6,8

Running pufer: 0,025 M TRIS/GLICIN, 0,10 % SDS, deionizirana voda (dH₂O)

Transfer pufer: 20 % metanol, 0,025 M TRIS/GLICIN, 0,10 % SDS, deionizirana voda (dH₂O)

1XTBST: 10 X TBS, 0,10 % Tween 20, DH₂O

10X TBS: TRIS, NaCl, HCl (za podešavanje pH vrijednosti), pH 7,6

Pufer za pripremu lizata embrija: RIPA pufer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Na-deoxycholate, 0,5 % SDS; pH 8) s dodatkom fosfataznih i proteinaznih inhibitora.

3.1.3. Uređaji

BIORAD Thermal Cycler - zagrijavanje uzoraka (Berkeley, Kalifornija)

BIORAD Gel Holder kazeta- transfer proteina s gela na membranu (Berkeley, Kalifornija)

BIORAD Mini-Protean Tetra System - uređaj za elektroforezu (Berkeley, Kalifornija)

BIORAD ChemiDoc XRS+ with Image lab software – detekcija (Berkeley, Kalifornija)

Biomedical division, Angelantoni Industrie – ledomat (Milano, Italija)

Sartorius, PB-11 - elektroda za mjerenje pH (Göttingen, Njemačka)

Variomag Electronicrührer Multipoint HP Labortechnik - magnetna miješalica (Wasserburg, Njemačka)

KERN AND SOHN EMB 200-2 – vaga (Balingen, Njemačka)

BIORAD PowerPac 200 - izvor struje (Berkeley, Kalifornija)

Tecnomara, Rockomat - mućkanje uzoraka (Cavernago, Italija)

Corning Mini centrifuge - centrifugiranje uzoraka (New York, SAD)

Mikroskop Motic SMZ-171-sakupljanje embrija (Kowloon, Hong Kong)

Mrijestilica Tecniplast (Varese, Italija)

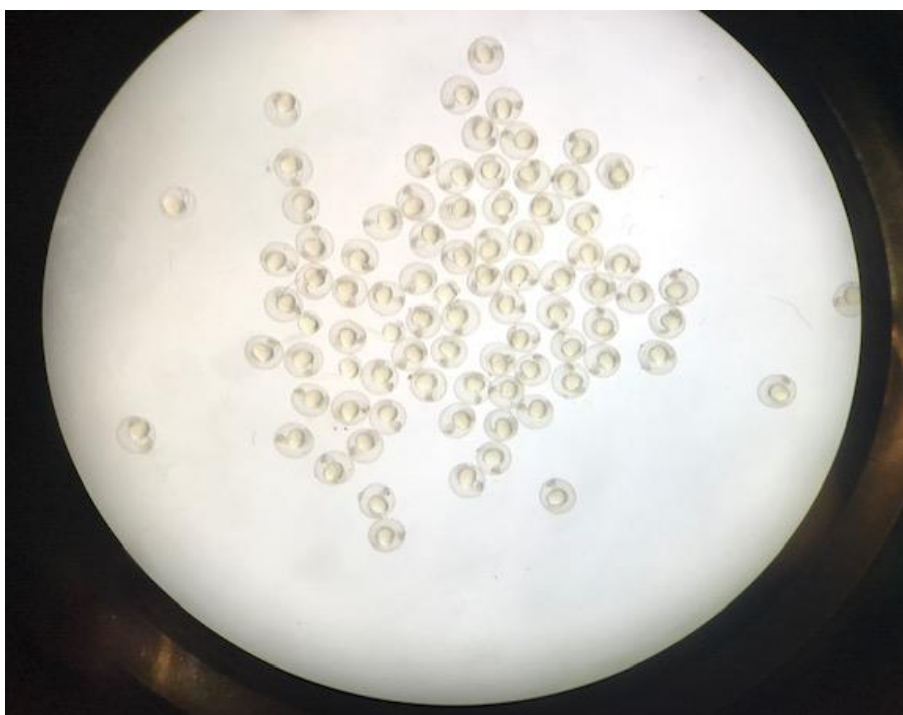
3.1.4. Zebrice

Za mrijest su korištene odrasle zebrice AB soja, stare godinu dana. Zebrice su uzgojene u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković.

3.2. METODA

3.2.1. Mrijest i prikupljanje embrija

Večer prije mrijesta su dvije ženke i tri mužjaka prebačeni u mrijestilicu u kojoj su razdvojeni plastičnom pregradom. Ujutro je pregrada uklonjena, a mrijest je počeo paljenjem svjetla. Oplođena jaja su prikupljena nakon mrijesta, isprana i prebačena u Petrijeve zdjelice gdje su se u E3 mediju nastavila razvijati na 28 °C uz izmjenu ciklusa svjetla (14 sati) i tame (10 sati) (Slika 1.). Svakih 24 sata (do 120. sata) izdvojeno je 25-30 embrija koji su pohranjeni na suho u tubicama od 1,5 mL u frižideru na -80 °C.



Slika 1. Mikroskopska slika embrija prilikom prikupljanja

3.2.2. Priprema lizata embrija i određivanje koncentracije

U tubice od 1,5 mL u kojima su pohranjeni embriji različitih razvojnih stadija dodano je 100 μ L RIPA pufera (60 μ L minimalno) uz proteazne i fosfatazne inhibitore. Svi uzorci su, kako bi se pospješila liza, inkubirani pola sata na ledu uz mućkanje na orbitalnoj mućkalici. Uzorak embrija starih 120 sati od 24.01.2022. je prije inkubacije na ledu dodatno homogeniziran jednu minutu tučkom. Svi uzorci su centrifugirani 20 minuta pri 4 °C na 10 000 g. Izdvojeni su supernatanti kojima je, prije pohrane na -80 °C određena koncentracija proteina.

Za određivanje koncentracije proteina potrebno je odrediti baždarnu krivulju pomoću

pripremljenog standarda BSA poznate koncentracije 10 mg/ml otopljenom u puferu u kojem je otopljen i uzorak. Potrebno je napraviti seriju razrjeđenja standarda od 5, 2.5, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019 i 0 mg/ml te se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbanacija. Ukoliko je uzorak razrijeđen 20 puta važno je da se pufer u koji se stavljaju pripremljena razrjeđenja razrijedi 20 puta. Iz izmjerene apsorbanacije i poznate koncentracije standarda konstruira se kalibracijska krivulja, koeficijenti iz jednadžbe pravca računaju se iz ovisnosti kvocijenta 595/540 i koncentracije BSA. Prije mjerenja koncentracije proteina potrebno je uzorak razrijediti 20 puta s mQ vodom (2 μ L uzorka + 38 μ L mQ) te Bradford reagens zagrijati na sobnu temperaturu. 20 μ L uzorka pomiješa se s 200 μ L reagensa u prozirnoj pločici s 96 jamica te se inkubira tri minute na sobnoj temperaturi. ApSORBANCIJA se mjeri na valnim duljinama od 595 i 450 nm te se pomoću kalibracijske krivulje iz dobivene apSORBANCIJE očita vrijednost koncentracije.

3.2.3. Priprema gelova za SDS elektroforezu

Prije sastavljanja gel kasete potrebno je očistiti sve dijelove sa 70 %-tnim etanolom, kako bi se uklonile sve nečistoće, jer prisutni interferenti ometaju polimerizaciju gela. Tanka staklena pločica prsloni se na vanjsku odstoju pločicu te se zajedno postavljaju u okvir za lijevanje na način da se tanja pločica nalazi ispred odstojne. Pločice se postavljaju na gumu, koja sprječava da gel iscure prije nego što polimerizira, u stalku za lijevanje te se učvrste s bočnih strana vratašcima i opružnom polugom na vrhu. Pripremljeni su gelovi za razdvajanje u koncentracijama od 5 % i 18 % te su izlijevani na način da se postigne gradijent gelova što nam omogućava razdvajanje proteina različitih veličina. Reagensi koji se koriste u pripremi moraju biti na sobnoj temperaturi. Prilikom pripreme uvijek se prvo dodaje demineralizirana voda zato što su ostale tvari koncentrirane. Priprema gela radi se u digestoru zbog otrovnih para. Za dobivanje poliakrilamidnog gela od 5 % korišteno je 6.93 ml vode, 2 ml akrilamida, 3 ml pufera za razdvajanje, 60 μ l 10 % APS-a i 8 μ l Temed-a, dok smo za koncentraciju od 18 % koristili 1.73 ml vode, 7.2 ml akrilamida, 3 ml pufera za razdvajanje, 8 μ l Temed-a i 60 μ l 10 % APS-a. Za pripremu gela za sabijanje dodano je 5.14 ml vode, 0.8 ml akrilamida, 2 ml pufera za sabijanje, 16 μ l Temed-a i 40 μ l 10 % APSA-a. S količinom pripremljenih gelova za razdvajanje i sabijanje mogu se izliti 4 gela. APS započinje polimerizaciju gela i dodaje se posljednji prije izlijevanja zbog čega je važno da je svježe pripremljen kako bi polimerizacija bila uspješna. Nakon pripreme gela, pipetom se uvlači u pipetu 2,4 ml otopine 5 % gela i 2,5 ml 18 % gela te se pipeta nagne

pod kutom i uvlače se dva mjehurića zraka kako bi došlo do miješanja gelova u pipeti. Nakon toga pipeta se prisloni na pločice u gel kaseti i laganim pomicanjem lijevo i desno izljevaju se gradijent gel do 1,5 cm od vrha pločice. Na gel se dodaje 150 μ l izopropanola koji će stvoriti ravnu crtu na površini gela, ukloniti prisutne mjehuriće zraka i spriječiti kontakt sa zrakom (kisik inhibira polimerizaciju). Slijedi polimerizacija koja traje 45 minuta. Nakon polimerizacije, gel se ispiru s vodom tri do četiri puta kako bi se uklonio izopropanol s površine te se kapljice vode pokupe s papirom. Izopropanol ometa polimerizaciju gela za sabijanje pa ga je potrebno ukloniti prije izlivanja gela za sabijanje u koji se na kraju umetne češljic. Za polimerizaciju gela za sabijanje također je potrebno 45 minuta.

3.2.4. Priprema uzoraka

Ukupni volumen uzoraka iznosi 15 μ l. Uzeti su lizati embrija ribe zebrice starosti od 24 sata, 48 sati, 72 sata, 96 sati i 120 sati pripremljeni 14.1.2022. te uzorak embrija od 96 sati pripremljen 17.1.2022. i od 120 sati pripremljen 24.1.2022. Za pozitivnu kontrolu koristili smo homogenate jetre, testisa te humanu bubrežnu embrionalnu staničnu liniju (FlpIn/Mock) (Tablica 2.). Oznaka hpf je skraćeno od hours post fertilization.

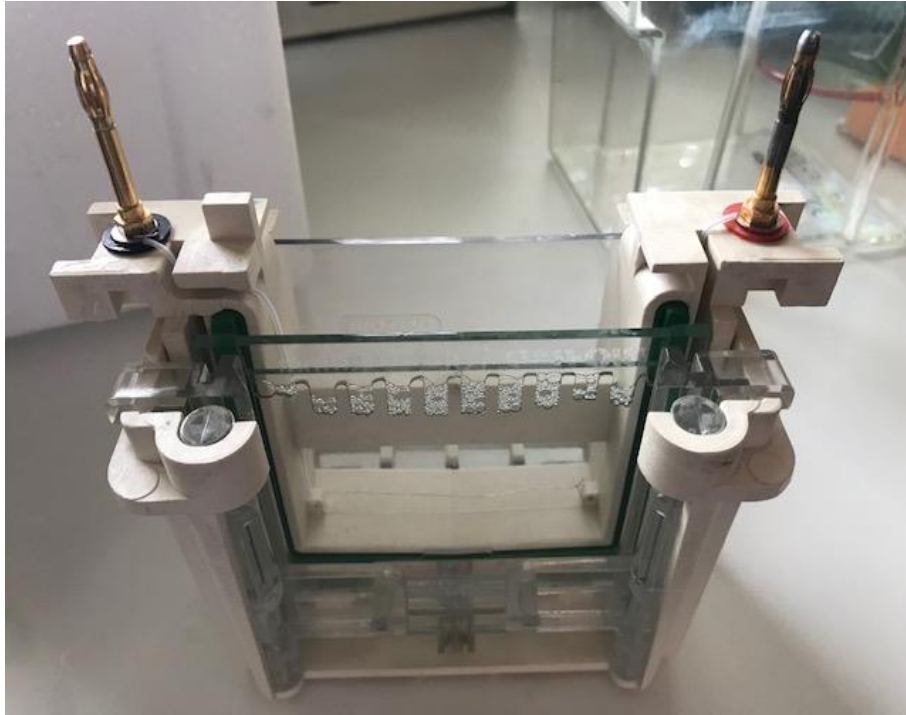
Tablica 2. Podaci o pripremljenim uzorcima

Uzorci		c (mg/ml)	V uzorka (μ L)	V TBS (μ L)	
24 hpf	03.01.2022.	6,6	3	8,25	Za 20 μ g
48h hpf	14.01.2022.	8,7	2,3	8,95	Za 20 μ g
72 hpf	14.01.2022.	9,2	2,2	9,05	Za 20 μ g
96 hpf	14.01.2022.	7,1	2,8	8,45	Za 20 μ g
120 hpf	24.01.2022.	3,0	6,7	4,55	Za 20 μ g
Jetra	04.04.2022.	2,0	5	6,25	Za 10 μ g
Testis	04.04.2022.	1,1	9,1	2,15	Za 10 μ g
FlpIn/ Mock	27.01.2022.	7,3	0,7	10,5	Za 5 μ g

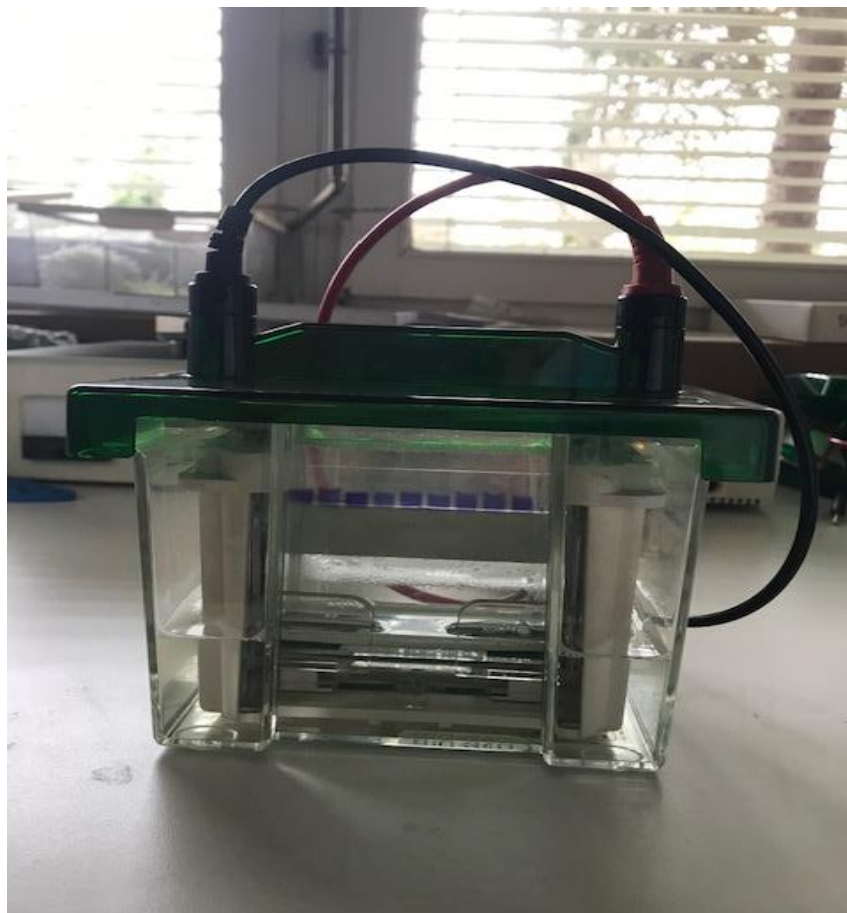
U tubicu od 1,5 ml dodan je određeni volumen uzorka, 3 μ l loading pufera, 0,75 μ l β -merkaptotetanol te volumen TBS-a potreban da volumen uzorka iznosi 15 μ l. Tubica se blago protresa udarcima prsta kako bi uzorak bio homogeniziran. Pripremljeni uzorci centrifugiraju se i inkubiraju 5 minuta na 95 °C.

3.2.5. Slaganje modula za elektroforezu

Nakon polimerizacije gela, gel kasete se izdvoji iz okvira za lijevanje i postavlja se na elektrodu na način da je manja pločica okrenuta prema unutarnjoj strani. Gel kasete s elektrodom smješta se u clamping frame uz pritisak prema dolje i zatvaranje vratašca na okviru. Sastavljena gel kasete stavlja se u kadu koja se nadopuni do označene razine running puferom (Slika 2.). Pomoću pipete, pripremljeni uzorci unose se u jažice koje je oblikovao češljic prilikom polimerizacije gela. Važno je da se kadička ne miče prije nego što se spoji na struju jer uzorci mogu izlaziti van iz jažica. Uređaj za elektroforezu priključi se na struju 20 minuta, 80 V kako bi uzorci u tom vremenu prošli gel za sabijanje i posložili se u jednu ravnu liniju (Slika 3.). Pojava mjehurića ukazuje na protok struje. Nakon što su proteini u jednoj horizontalnoj crti, struja se pojača na 100 do 120 V u vremenu od sat i pol kako bi uzorci prošli u gel za razdvajanje i tamo se razdvojili. Ukoliko središnja crta zaostaje, struju je potrebno ubrzati, a ukoliko je sredina brža struja se smanji da bi se svi proteini razdvajali jednako. Nakon završetka elektroforeze struja se isključi i uređaj se rastavlja. Gel za sabijanje se odstrani, a gel za razdvajanje je važno označiti kako bi odredili orijentaciju. Rez je načinjen u gornjem kutu gdje se nalazi marker.



Slika 2. Postavljanje gel kasete na elektrodu



Slika 3. Sastavljeni modul za elektroforezu priključen na struju

3.2.6. Transfer proteina s gela na membranu

Potrebno je odrezati 4 filter papira u veličini gela i jednu membranu. Prilikom ovog istraživanja korištena je PVDF membrana. Membranu je potrebno aktivirati na način da je stavljena u metanol 1 do 2 minute. Transfer kasete stavlja se u posudu s transfer puferom pri čemu je crna strana orijentirana prema dolje, a bijela prema gore. Između crne i bijele plohe stavljeno je redom: spužvica, 2 filter papira, membrana, gel, ponovno 2 filter papira nakon čega je pomoću valjka potrebno ukloniti prisutne mjehuriće. Na kraju dolazi ponovno spužvica te se kasete stisne i stavlja u kadu s transfer puferom. Potrebno je pothladiti transfer pufer kako bi transfer s gela na membranu bio uspješan. Transfer sendvič priključi se na struju od 100 V u vremenu od sat vremena i 15 minuta. Nakon završenog transfera gel koji je korišten stavlja se u posudicu s Coomassie bojom te se stavlja na mućkalicu u trajanju od sat vremena. Ovo nam služi kao provjera koliko je transfer bio uspješan jer će zaostali proteini na gelu biti obojani u plavo. Membrana se nakon transfera reže na dva dijela, na mjestu između 25 i 37 kDa, kako bi bila izložena dvama primarnim antitijelima. Prvi dio membrane izložen je vezanju antitijela za protein EXOSC10/RRP6 egzonukleazu koja sudjeluje u kontroli kvalitete RNA u fazi transkripcije, molekulske mase 100 kDa. Vezanje antitijela dokazuje prisutnost proteina u zebnici i u kojim razvojnim stadijima embrija se javlja. Drugo antitijelo kojem se izlaže membrana je Histon 2B, molekulske mase oko 15 kDa i to je tzv. kontrola punjenja koja pokazuje jesu li različiti uzorci jednako nanoseni na membranu. Ako je uzorak dobar, histoni su prisutni u svim stanicama i dobar su pokazatelj količine uzorka. Ako se uzorak u nekom slučaju raspao on neće biti vidljiv u kontrolnoj zoni jer se primarno antitijelo neće vezati.

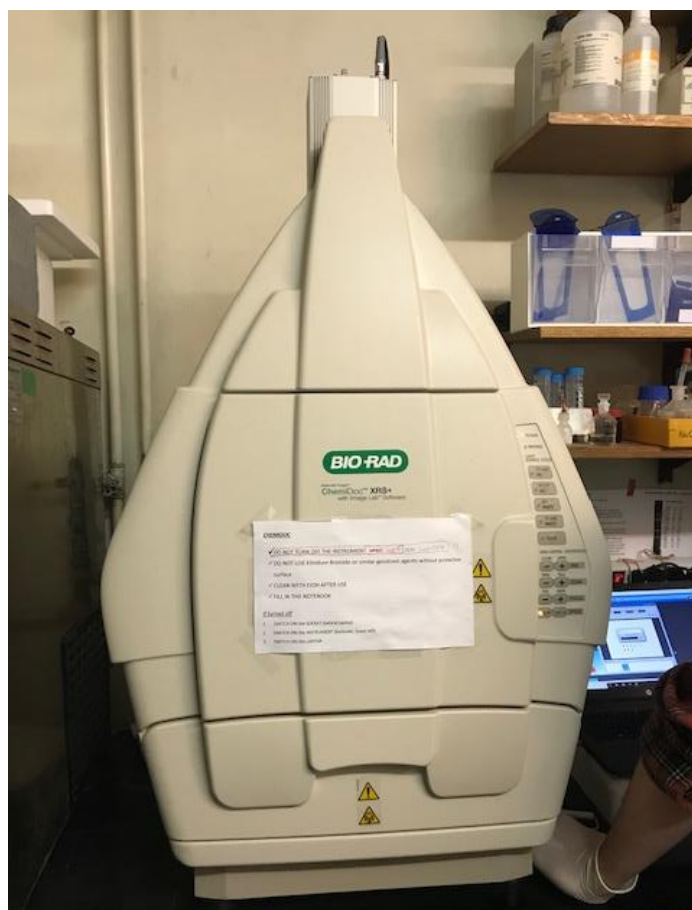
3.2.7. Blokiranje membrane i inkubacija s antitijelima

Blokiranje je primarno usmjereno na sprječavanje nespecifičnog vezanja i primarnog i sekundarnog antitijela na membranu. Blokiranjem membrane prije vezanja antitijela, vezna mjesta na membrani bit će popunjena te će se primarno antitijelo vezati samo na ciljani protein što će rezultirati isticanjem željenih proteinskih vrpca (bandova) bez naglašene pozadine. Blokiranje se provodi proteinima obranog mlijeka ili albuminima goveđeg seruma. Membrana se umoči u obrano mlijeko i stavi na mućkalicu u trajanju od minimalno jednog sata. Nakon blokiranja potrebno je membranu isprati s TBST-om na pet minuta te slijedi inkubacija s primarnim antitijelom. Membrana s primarnim antitijelom ostavljena je preko noći u hladnoj sobi na 4 °C na mućkalici. Nakon vezanja primarnog antitijela

membrana je ponovno isprana s TBST-om 3 puta po 5 minuta. Slijedi vezanje sekundarnog antitijela. Sekundarno antitijelo veže se specifično na primarno antitijelo te ga karakterizira prisutni enzim, najčešće peroksidaza, koji služi za detekciju jer razvija luminiscentni signal. Membrana se inkubira sa sekundarnim antitijelom u 5 ml 2,5 % BSA/TBST 45 minuta. Nakon inkubacije membrana se 3 puta po 10 minuta ispiri s TBST-om u svrhu uklanjanja viška sekundarnog antitijela jer je poželjno da obojani bandovi na membrani budu što uži. Nakon toga slijedi ispiranje TBS-om 5 minuta te ispiranje demineraliziranom vodom zbog uklanjanja Tween-20 deterdženta.

3.2.8. Detekcija

Potrebno je luminol zagrijati na sobnu temperaturu te ga pomiješati s oksidirajućim sredstvom u omjeru 1:1, 1 ml tako dobivene smjese je dovoljan za jednu membranu. Membrana se stavlja na sloj folije te se smjesa reagensa nanese na membranu i laganim pokretima valjkom raspodjeli po membrani. Membranu se s reagensom inkubira 5 minuta kako bi došlo do reakcije cijepanja luminola peroksidazom što je signal za detekciju. Nakon proteklog vremena uklanja se višak reagensa pomoću papira te se uzima nova folija kojom se membrana omota s obje strane kako ne bi došlo do otparivanja luminola ukoliko snimanje traje sat vremena ili duže. Membrana je pripremljena za detekciju u uređaju koji se naziva Chemidoc (Slika 4.), a koji snima kemiluminiscenciju. Uređaj ima software Image lab koji omogućuje različita mjerenja. Može se podesiti da snima određeno vrijeme membranu i da, ovisno o potrebi, u neko određeno vrijeme daje novu sliku. Ukoliko se na membrani nalazi malo proteina ili se primarno antitijelo slabo veže na njih, potrebno je duže vremena da instrument uhvati signal. Također, ako se snimanje membrane odvija predugo, oni proteini koji u početku nisu bili naglašeni, kroz proteklo vrijeme postat će naglašeni te neće biti vidljiva razlika u signalu između proteina, zbog toga je potrebno odrediti optimalno vrijeme snimanja. U softwreu se odabere start page, nakon toga new, gel imaging i na kraju blot. Prva slika koju uređaj daje poslikana je kolorimetrijski, kako bi se zabilježili markeri na membrani. Nakon prve slike membranu se ne smije pomicati jer sljedeće slike se preslikavaju na prvu sliku. Slijedi snimanje kemiluminiscencije. Prilikom prvog snimanja potrebno je staviti snimanje 1 slike svakih 10 sekundi kako bi se procijenio intenzitet signala.



Slika 4. Uređaj za detekciju kemiluminiscentnog signala na membrani

4. REZULTATI I RASPRAVA

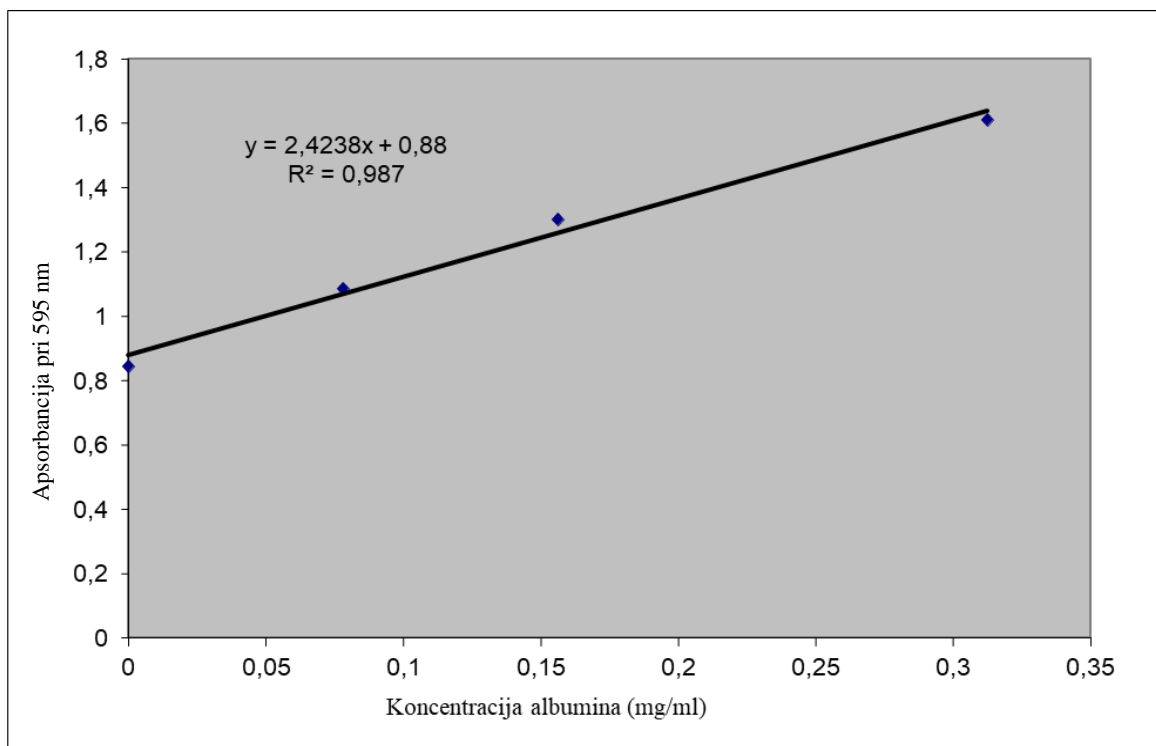
Istraživanje je provedeno u svrhu ispitivanja ekspresije proteina EXOSC10 u razvojnim stadijima embrija ribe zebrice: od 24 sata nakon oplodnje do 120 sati nakon oplodnje.

Prijašnjim istraživanjem, koje je 2019. provela Oreški, utvrđena je ekspresija EXOSC10 kod zebrice na razini transkripta i proteina u jetri, gonadama, mozgu i oku. U embrionalnim razvojnim stadijima praćena je samo ekspresija na razini transkripta. Pokazano je da je ekspresija najjače izražena u razdoblju od 1 do 6 sati nakon oplodnje nakon čega slijedi postupno smanjenje do 24 sata nakon oplodnje te konstantna razina ekspresija sve do 120 sati nakon oplodnje.

Temeljem ovih nalaza pretpostavili smo da će signal za protein EXOSC10 biti vidljiv i podjednako intenzivan u svim promatranim razvojnim stadijima (vremenski intervali razvoja od 24, 48, 72, 96 i 120 sati nakon oplodnje).

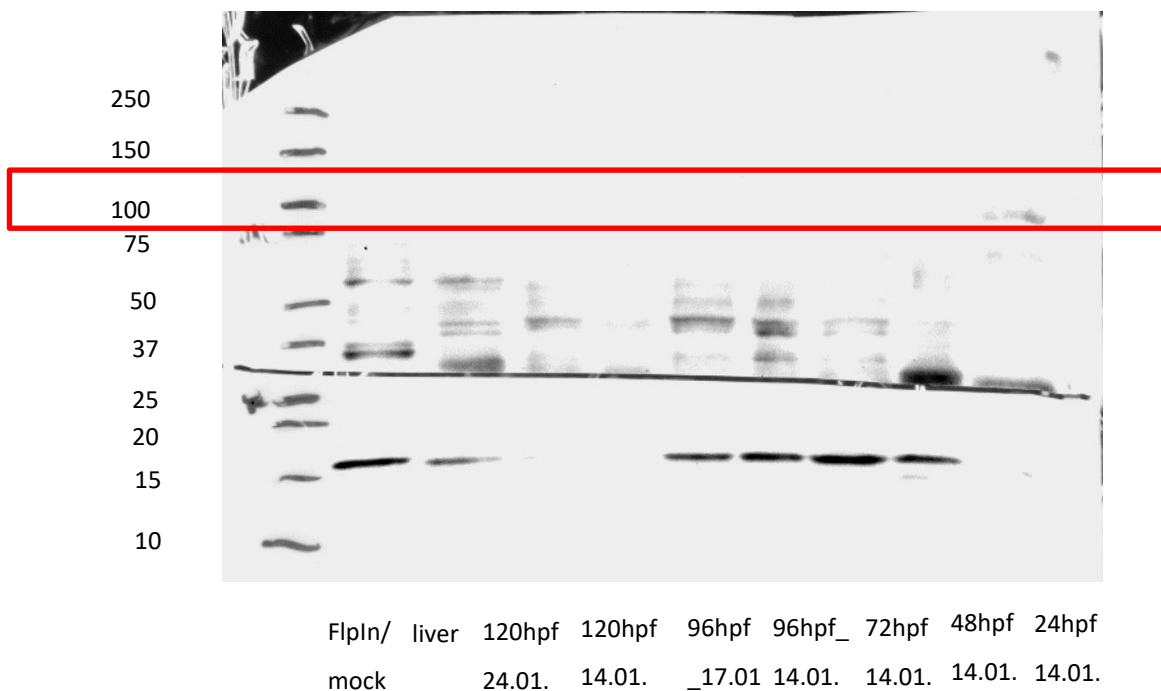
Uzorci embrija su prikupljeni tokom pet dana, svakih 24 sata te je za svaki razvojni stadij uzeto po 25 do 30 embrija. Prikupljeni embriji pohranjivani su na -80 °C do pripreme lizata uzoraka.

Konstruirali smo baždarnu krivulju (Slika 5.) ovisnosti apsorbancije i koncentracije proteinskog standarda te metodom po Bradfordu pripremljenim lizatima izmjerili koncentraciju proteina (Tablica 2.), nakon čega smo lizate pohranili na -80 °C do određivanja ekspresije EXOSC10 proteina Western blot metodom imunodetekcije.

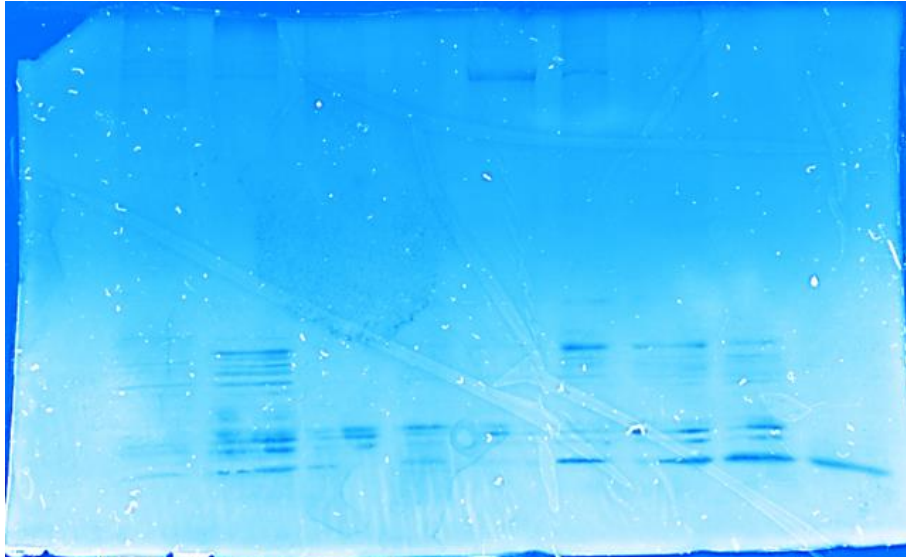


Slika 5. Graf ovisnosti apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm o koncentraciji albumina (Bovine serum albumin)

Prvi eksperiment smo proveli 25. ožujka 2022. Uzorci su pripremljeni kako je opisano u odjeljku 3.2.4. te nanoseni na gel u količini od 20 μg , izuzev pozitivnih kontrola (humana bubrežna stanična linija FlpIn/Mock i jetra) koji su nanoseni u količini od 10 μg . Za razdvajanje proteina korišten je poliakrilamidni gradijent gel od 5-18 %. Elektroforeza se prvo provodila 20 minuta pri 80 V te 120 V u trajanju od 60 minuta. Transfer proteina s gela na PVDF membranu odvijao se 75 minuta pri 100V.

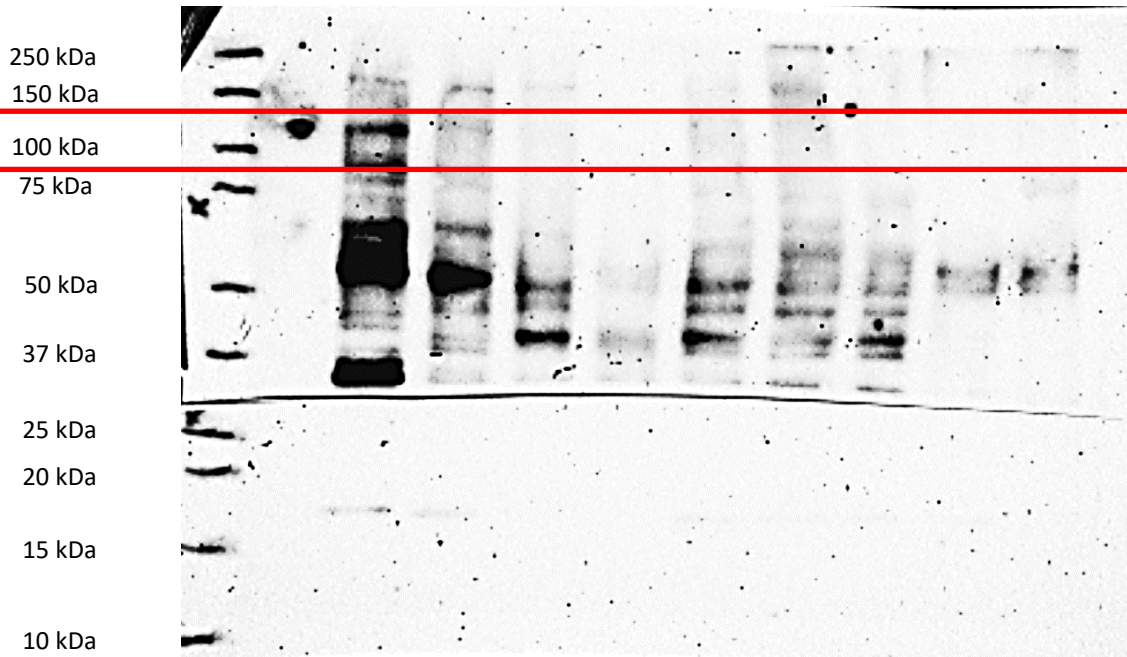


Slika 6. Rezultati Western blot metode provedene 25.03.2022. Uzorci, mase 20 μ g, i pozitivne kontrole, mase 10 μ g, prethodno su razdvajani u gradijent gelu 5-18%. Na području membrane od 10 do 25 kDa vezano je antitijelo za Histon 2B, a na području membrane od 37 do 250 kDa antitijelo za EXOSC10. S lijeve strane membrane vidljivi su standardi prema kojima se određuje molekulska masa proteina. Na slici je naznačeno područje očekivanih vrpca od 100 kDa. Slika je snimljena uređajem Chemidoc, u trajanju od 30 minuta.



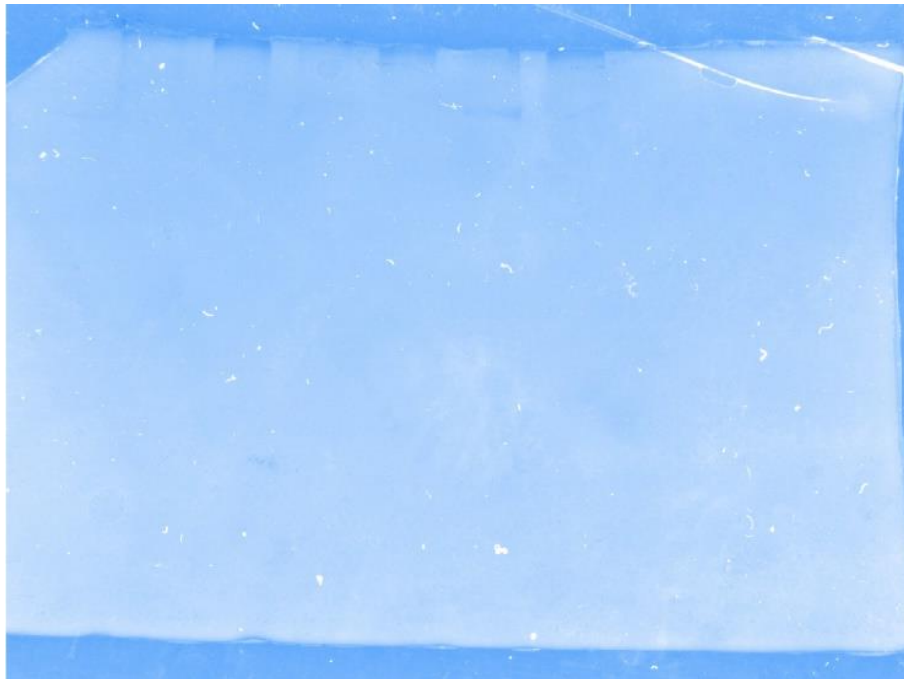
Slika 7. Slika gela obojanog Coomassie bojom nakon transfera proteina, 25.03.2022.

Transfer proteina s gela na membranu nije bio uspješan, što se može zaključiti po tome što prilikom detekcije membrane nije vidljiv signal pozitivnih kontrola (bubrežna stanična linija i jetra) kod kojih je poznata prisutnost traženog proteina EXOSC10 (Slika 6.). Također, na gelu obojanom Coomassie bojom je vidljivo dosta zaostalih proteina nakon transfera (Slika 7.). Mogući razlog neuspjelog transfera je pregrijavanje zbog nedovoljno ohlađenog transfer pufera. Na membrani se, jedino u uzorku embrija starih 24 sata, može uočiti tražena vrpca molekulske mase 100 kDa što je očekivana molekulska masa proteina EXOSC10, no signal nije vidljiv u ostalim uzorcima (Slika 6.). U rasponu od 10 do 25 kDa (slika 6.) na membranu se veže antitijelo za Histon 2B koji služi kao kontrola punjenja, odnosno pokazuje je li uzorak nanesen u jednakim količinama. Kod uzorka 120 hpf (24.01.2022.) i 120 hpf (14.01.2022.) nije vidljiv signal rasponu od 10 do 25 kDa, a mogući razlog je raspad lizata uzorka.



FlpIn/mo	liver	120hpf	120hpf	96hpf	96hpf1	72hpf	48hpf	24hpf
ck		24.01.	14.01.	17.01.	4.01.	14.01.	14.01.	14.01.

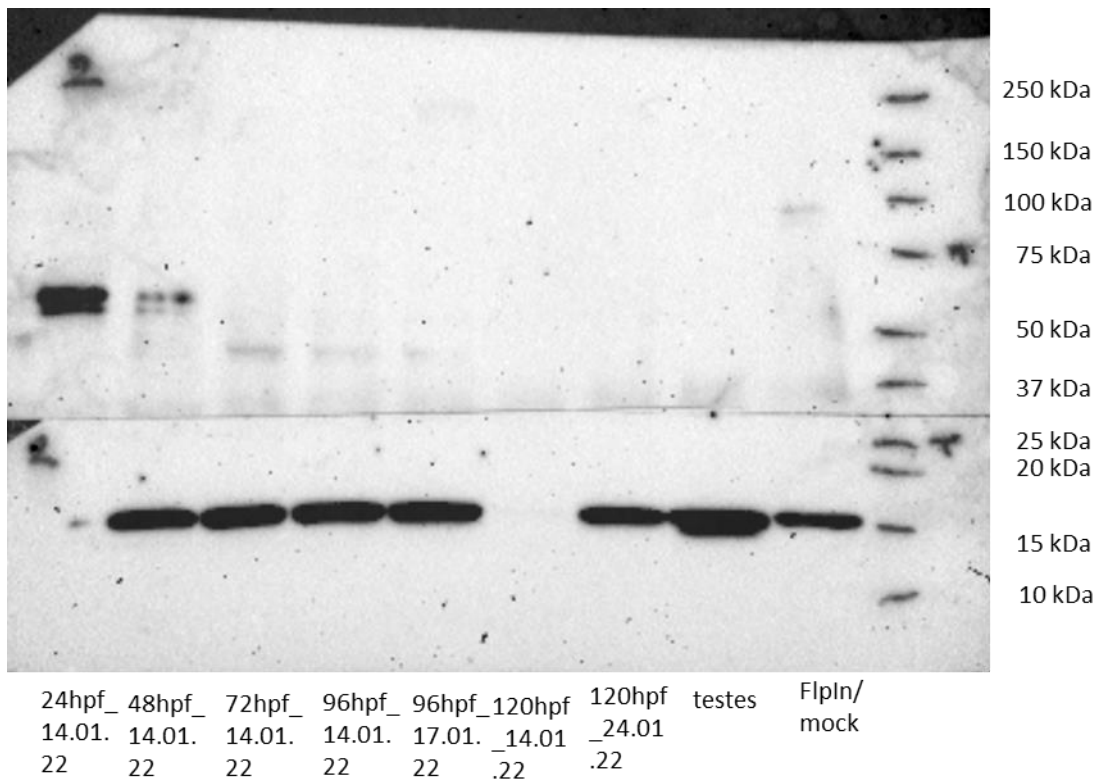
Slika 8. Rezultati Western blot metode provedene 31.03.2022 Uzorci, mase 20 μg , i pozitivne kontrole, mase 10 μg , prethodno su razdvajani u gradijent gelu 5-18%. Na području membrane od 10 do 25 kDa vezano je antitijelo za Histon 2B, a na području membrane od 37 do 250 kDa antitijelo za EXOSC10. Slika je snimljena uređajem Chemidoc, u trajanju od 60 minuta.



Slika 9. Slika gela obojanog Coomassie bojom nakon transfera proteina, 31.03.2022.

Drugi eksperiment smo proveli 31. ožujka 2022. Razdvajanje proteina u gradijent gelu od 5-18 % odvijalo se 20 minuta pri 80 V te 80 minuta pri 100 V. Prilikom transfera proteina (75 minuta, 100 V) s gela na membranu također je došlo do pregrijavanja. U području kontrole punjenja (Histon 2B protein, molekulske mase 18 kDa), u rasponu od 10 do 25 kDa vrpca koja bi trebala biti na oko 18 kDa se jedva nazire i to samo u uzorcima bubrežne stanične linije i jetre (Slika 8.). Mogući razlog tome je što je antitijelo za Histon 2B korišteno više puta, pa je vjerojatno došlo do raspada. U rasponu od 37 do 250 kDa nije dobiven traženi signal za protein EXOSC10 u svim uzorcima. Na području ispod 50 kDa uočeno je dosta nespecifičnih vrpca koje upućuju na raspad proteina pri čemu dolazi do stvaranja širokih vrpca pri manjim molekulskim masama od očekivanih. Osim raspada proteina, pregrijavanje prilikom transfera također je utjecalo na dobivene signale.

Treći eksperiment je proveden 5.04.2022. Postupak je ponovljen s istim parametrima i uvjetima kao i prethodni, jedino je umjesto uzorka jetre nanesen uzorak testisa. Transfer proteina s gela na membranu prošao je bez zagrijavanja. Razrjeđenje EXOSC10 antitijela svježe je bilo pripremljeno. Na membrani je vidljivo da nema signala u području od 10 do 25 kDa kod uzoraka 24 hpf i 120 hpf (14.01.2022.) što upućuje na mogućnost raspada navedenih uzoraka (Slika 10.) te moguću lošu homogenizaciju. EXOSC10 specifični signal se naslućuje jedino u bubrežnoj staničnoj liniji. U svim ostalim uzorcima izostaje specifična vrpca. Postoji mogućnost da je došlo do neravnomjernog raspoređivanja luminola po membrani prije detekcije.

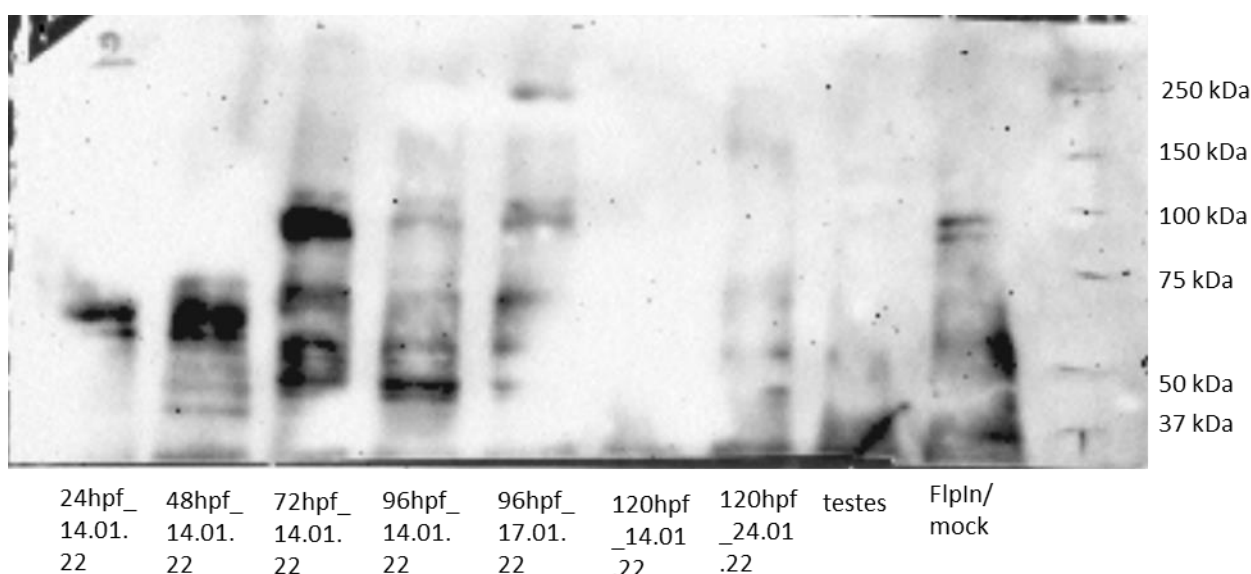


Slika 10. Rezultati Western blot metode provedene 05.04.2022. Uzorci, mase 20 μg , i pozitivne kontrole, mase 10 μg (testes) i 5 μg (mock), prethodno su razdvajani u gradijent gelu 5-18%. Na području membrane od 10 do 25 kDa vezano je antitijelo za Histon 2B, a na području membrane od 37 do 250 kDa antitijelo za EXOSC10. Slika je snimljena uređajem Chemidoc, u trajanju od 50 minuta.



Slika 11. Slika gela obojanog Coomassie bojom nakon transfera proteina, 05.04.2022.

Četvrti eksperiment je proveden 13. svibnja 2022. Kako bi provjerili potencijalni problem s detekcijom, s membrane od 5. travnja 2022. je skinuto vezano primarno antitijelo te je postupak ponovljen s novim vezanjem primarnog i sekundarnog antitijela. Na membrani su vidljivi specifični signali kod 72 hpf, 96 hpf i pozitivnoj kontroli bubrežnoj staničnoj liniji, no nisu vidljivi kod 24 hpf, 48 hpf, 120 hpf i testisu (Slika 12.). Mogući razlog je ponovno nedostatna količina luminola koji nije bio ravnomjerno raspoređen po membrani.



Slika 12. Rezultati Western blot metode nakon skidanja i ponovnog vezanja antitijela za EXOSC10 na membranu korištenu 05.04.2022., 13.05.2022. Slika je snimljena uređajem Chemidoc, u trajanju od 30 minuta.

Iz priloženih rezultata mogu se iščitati tražene vrpce molekulske mase od 100 kDa u uzorcima embrionalnih razvojnih faza zebrice 24, 72 i 96 sati nakon oplodnje. Iako je prethodno dokazana jednaka razina ekspresije transkripta *exosc10* u embrijima zebrice 24, 48, 96, 72 i 120 sati nakon fertilizacije, proteinskom ekspresijom u ovom eksperimentu nije dokazana prisutnost proteina u uzorcima 48 i 120 sati nakon fertilizacije.

S obzirom da je metoda Western Blot imunodetekcije vrlo osjetljiva, navedeni su parametri koji su mogli utjecati na krajnji rezultat eksperimenta. Lizat proteina prethodno se razdvaja

u mreži poliakrilamidnog gela te razdvajanje ovisi o porama gela. Prije polimerizacije akrilamidnog gela potrebno je ukloniti interferente s površina kako ne bi došlo do ometanja polimerizacije. Izopropanol koji se dodaje zbog uklanjanja mjehurića zraka, mora biti dobro ispran s gela za razdvajanje kako ne bi došlo do ometanja polimerizacije gela za sabijanje. Polimerizacija i veličina pora utječe na kvalitetu razdvajanja smjese proteina.

Nakon što su proteini razdvojeni u gelu, slijedi transfer proteina s gela na membranu na koji utječe temperatura pufera. Ukoliko pufer nije dovoljno hladan neće doći do potpunog transfera i neki će proteini zaostajati na gelu. U tu svrhu, gel se nakon transfera boji Coomassie bojom, kako bi se ispitala efikasnost transfera.

Prilikom vezanja primarnog antitijela na proteine membrane važno je voditi računa o svježini antitijela jer ukoliko je ono više puta reciklirano i staro, može doći do njegovog raspada. Na proteine, na koje nije vezano primarno antitijelo, neće se vezati sekundarno antitijelo te neće biti vidljivi prilikom detekcije membrane. Osim raspada vezanog antitijela može doći i do raspada proteina u uzroku koji se mogu uočiti kao nespecifične vrpce pri manjoj molekularnoj masi od tražene.

Prije detekcije membrane važno je ravnomjerno nanijeti dostatnu količinu luminola. Uz vezano sekundarno antitijelo nalazi se enzim peroksidaza koja stvara kemiluminiscentni signal cijepanjem luminola. Ukoliko luminol nije nanesen ravnomjerno, na dijelu membrane neće nastati signal i dio proteina neće biti detektiran pomoću uređaja.

Na membrani možemo uočiti dvije kontrole. Kontrola punjenja, u rasponu od 10 do 25 kDa, koja pokazuje da su različiti uzorci nanesen u jednakoj količini, a izostajanje vrpce kontrole punjenja može ukazivati na nedostatak prilikom provođenja metode, u slučaju ovog eksperimenta: raspad antitijela ili uzorka, loš transfer. Za pozitivnu kontrolu poznato je da sadrži traženi protein (bubrežna stanična linija i jetra). Pozitivna kontrola služi kao potvrda da je to traženi protein. Izostanak pozitivne kontrole upućivao je na loš transfer. Nedostatak u našem eksperimentu bio je izostanak negativne kontrole. Negativna kontrola potvrđuje da tog proteina nema, odnosno ako na membrani imamo protein određene molekularne mase i taj protein se javlja u negativnoj kontroli, onda to nije traženi protein.

U svrhu dobivanja što točnijih rezultata, potrebno je tijekom provedbe eksperimenta uvesti i pozitivnu i negativnu kontrolu, kontrolirati svježinu antitijela i uzoraka te biti precizan u izvođenju.

5. ZAKLJUČAK

1. Metodom Western blot imunodetekcije pokazali smo pomoću poliklonalnog protutijela prisutnost EXOSC10 proteina u uzorcima embrija ribe zebrice 24, 72 i 96 sati nakon fertilizacije.
2. Nismo uspjeli pokazati prisutnost EXOSC10 proteina u uzorcima embrija ribe zebrice starim 48 i 120 sati nakon fertilizacije iako je prethodno utvrđeno da je i u tim stadijima ekspresija transkripta *exosc10* na podjednakoj razini kao i kod embrija starih 24, 72 i 96 sati.
3. Metoda Western Blot imunodetekcije osjetljiva je metoda u kojoj može doći do pogreške u svakom koraku (npr: visoka temperatura rashladnog pufera, nedovoljna količina luminola, starost antitijela, interferenti koji mogu utjecati na nepravilnu polimerizaciju gela itd.) što utječe na krajnji rezultat.

6. LITERATURA

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science* **86**, 6-19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>

Milčić E (2016) Monoklonska protutijela: humanizacija i imunogenost (završni specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Mišić L (2021) Razvoj sustava za ispitivanje interakcija Mate3 proteina zebrice s okolišnim tvarima, (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Najafov A, Hoxhaj G (2017) Western blotting guru, 1. izd., Elsevier/ Academic Press, London.

Oreški L (2019) Analiza ekspresije exosc10/Exosc10 u tkivima zebrice (*Danio rerio*) i embrionalnim fazama razvoja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Oskomić M (2020) Uloga katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 u održavanju varijabilnosti stanica i stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri povišenoj temperaturi (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Ribas L, Piferrer F (2014) The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Review in Aquaculture* **6**, 209-240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>

Steitz, TA, Steitz, JA (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA (phosphoryl transfer mechanism/ribozyme/group I splicing/spliceosome/group II splicing). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 6498-6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6498>

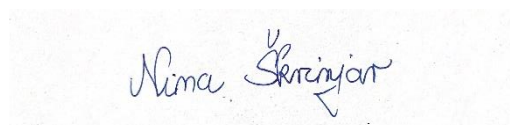
Stuparević I, Novačić A, Rahmouni AR, Fernandez A, Lamb N, Primig M (2021) Regulation of the conserved 3'-5' exoribonuclease EXOSC10/Rrp6 during cell division, development and cancer. *Biological Reviews* **96**, 1092-1113. <https://doi.org/10.1111/brv.12693>

Višić H (2017) Procjena toksičnosti onečišćenog sedimenta rijeke Save na embrije ribe

zebrice (*Danio rerio*) (rad za rektorovu nagradu), Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature reads "Nima Škrinjarić".

Vlastoručni potpis