

# Eesti koolinoorte 49. bioloogiaolümpiaad

## Rakubioloogia praktiline töö

---



Eesnimi : .....

Perekonnanimi : .....

Kool : .....

Klass : .....

Rühm : .....

### Immuunfluorestsentsmikroskoopia

#### 1. Leia laual oma töövahendid:

- 2 Petri tassi, mille põhjas on Ø 12mm katteklaas fikseeritud rakkudega puhverlahuses
- Pintsetid
- Pipetikomplekt (sinine pipett 100-1000µl, kollane pipett 10-100µl)
- 3 plastikkarpi pipetiotsikutega
- Alusklaas
- 50ml tuub 25ml puhverlahusega PBS (Phosphate buffered saline- 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)
- Tühi 50ml tuub jäätmete kogumiseks
- 1,5ml tuub primaarse antikeha lahusega (lahus **A**)
- 1,5ml tuub negatiivse kontrolli antikeha (hiire immunoglobuliinide segu) lahusega (lahus **NK**)
- 1,5ml tuub fluorokroomiga seotud sekundaarse antikehaga (lahus **B**)
- 1,5ml tuub DAPI lahusega sekundaarse antikeha lahjendamiseks (lahus **C**)
- 1,5ml tuub glütserooliga Tris puhvrts (pH 9,2) sulundamiseks (lahus **D**)

#### 2. Rakkude inkubeerimine primaarse antikeha ja negatiivse kontrolli lahusega 15 min.

i) Võta 1ml pipett (sinine) ja aseta sellele otsa sinine otsik. Kontrolli, et pipetil oleks ette keeratud number 1000 (st 1000µl)

ii) Pane valmis ka 10-100 µl pipett (kollane) ja aseta sellele otsa kollane otsik. Kontrolli, et pipetil oleks ette keeratud number 050 (st 50µl).

iii) Võta üks Petri tass ja eemalda sinise pipetiga klaasi kattev puhver ja tühjenda pipetiotsik tühja 50ml tuubi. Eemalda kogu puhver.

iv) Kontrolli, et klaas oleks parafilmi peal, mitte tassi ääres. Kui vaja, lükka klaas pintsettidega tassi keskele.

**NB! Ära lase klaasi ära kuivada!**

v) Pipeteeri kollase pipetiga klaasi peale 50µl **lahust A**. Vaata, et kogu klaas oleks kaetud.

vi) Vaheta kollase pipeti otsik. Kasutatud otsik viska kollasesse jäätmenõusse.

vii) Võta teine Petri tass ja kirjuta selle kaanele **NK**.

viii) Eemalda tassist puhver, nagu punktis iii).

ix) Pipeteeri kollase pipetiga klaasi peale 50µl **lahust NK**. Vaata, et kogu klaas oleks kaetud.

## **2. Klaaside pesemine PBS lahusega 3x**

i) Pipeteeri sinise pipetiga mõlemale tassile (vastu äärt, mitte otse klaasile) 3ml PBS lahust. Võid tasse kergelt loksutada.

ii) Ca 1 min pärast eemalda puhver esmalt ühel tassil ja pärast pipeti otsiku vahetamist teisel tassil.

iii) Vaheta otsikut. Korda etappe i) ja ii) 2x. Jäta viimane puhver esialgu rakkudele peale.

## **3. Sekundaarse antikeha lahuse valmistamine**

i) Arvuta, mitu µl sekundaarse antikeha lahust (lahus B, konts 100µg/ml) on vaja lisada lahusesse C, kui antikeha lõppkontsentratsioon peab olema 10µg/ml ja reaktsiooni maht on 100µl?

Arvutuskäik:

Pipeteerin lahusesse C ..... µl lahust B.

ii) Võta kollane pipett ja keera sellel ette pipeteerimiseks vajalik kogus. Lisa vajalik kogus antikeha lahust (lahus B) lahusesse C.

iii) Sega vortexil

## **4. Rakkude inkubeerimine sekundaarse antikeha+ DAPI lahusega 10 min.**

i) Vaheta sinise ja kollase pipeti otsikud.

ii) Eemalda sinise pipetiga mõlematelt tassidelt puhver.

iii) Kontrolli, et klaas oleks tassi keskel

iv) Pipeteeri kollase pipetiga mõlemale klaasile 50 µl lahust C, millesse lisasid sekundaarset antikeha.

## **5. Klaaside pesemine PBS lahusega (vt etappi 2)**

## 6. Klaaside sulundamine alusklaasile glütserooliga (lahus D).

- i) Kirjuta alusklaasi äärelle oma nimi ja number.
- ii) Võta kollane pipetiotsik ja pista selle ots korraks glütserooli sisse. Tee alusklaasile 2 **pisikest** glütserooli tilka.
- iii) Eemalda sinise pipetiga puhver esimeselt tassilt. Oota, kuni klaas on natuke kuivem ja võta klaas ettevaatlikult pintsettide vahele. Aseta klaas **tagurpidi (st rakud alusklaasi poole)** glütserooli tilgale.
- iv) Talita sama negatiivse kontrolli reaktsiooni klaasiga. Tee alusklaasil negatiivse kontrolli klaasi kohale märke.

## 7. Reaktsiooni vaatamine fluorestsentsmikroskoobis

### ÜLESANDED :

Küsimustele 1 ja 2 vasta **oma preparaadi** immuunfluorestsentsreaktsiooni järgi. Tõmba õigetele vastusele ring ümber.

1.

Millised rakustruktuurid on värvunud?

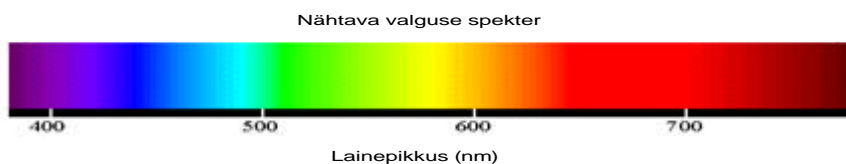
- a) ribosoomid
- b) tsütoplasmavõrgustik
- c) mitokondrid
- d) rakutuum
- e) Golgi kompleks ja endosomaalsed vesiikulid
- f) rakumembraan
- g) tsütosoolis lahustunud valk
- h) signaalpeptiid
- i) tsütoskelett

2.

Millist sekundaarset antikeha on immuunreaktsiooniks kasutatud, arvestades, et primaarse antikehana on kasutatud inimese valgu vastast hiire antikeha? Tähistage õige vastus ringiga ümber valitus vastuse tähe.

*Reaktsiooni teostamisel on kasutatud sekundaarseid antikehi, mis on seotud väga püsivate Alexa Fluor fluorokroomidega. NB! Arvesta ka fluorokroomi emissiooniga (vt joonist 1).*

- a) Inimese antikehade vastane hiire antikeha Alexa Fluor 488
- b) Inimese antikehade vastane hiire antikeha Alexa Fluor 647
- c) Inimese antikehade vastane hiire antikeha Alexa Fluor 430
- d) Hiire antikehade vastane kitse antikeha Alexa Fluor 594
- e) Küüliku antikehade vastane kitse antikeha Alexa Fluor 430
- f) Hiire antikehade vastane eesli antikeha Alexa Fluor 647
- g) Hiire antikehade vastane eesli antikeha Alexa Fluor 488
- h) Küüliku antikehade vastane eesli antikeha Alexa Fluor 488
- i) Küüliku antikehade vastane kana antikeha Alexa Fluor 594
- j) Küüliku antikehade vastane kana antikeha Alexa Fluor 488
- k) Küüliku antikehade vastane kana antikeha Alexa Fluor 647
- l) Hiire antikehade vastane inimese antikeha Alexa Fluor 430



Joonis 1

### 3.

Sa kavatsed rakus immuunfluorestsentsmikroskoopia abil detekteerida korraga kahte valku- valku nr 1 ja valku nr 2. Vali järgnevate antikehade seast mõlema valgu detekteerimiseks sobivad primaarsed ja nendele vastavad sobivad sekundaarsed antikehad, et moodustada toimiv süsteem. *NB! Välista antikehade ristreaktsiooni võimalus!*

#### Valk1 vastased antikehad:

- a) Valk1 vastane hiire antikeha
- b) Valk1 vastane küüliku antikeha
- c) Valk1 vastane kitse antikeha

#### Valk2 vastased antikehad:

- d) Valk2 vastane hiire antikeha
- e) Valk2 vastane kitse antikeha

#### Sekundaarsed antikehad:

- f) hiire antikehade vastane kitse antikeha Alexa Fluor 594
- g) küüliku antikehade vastane kitse antikeha Alexa Fluor 594
- h) küüliku antikehade vastane kitse antikeha Alexa Fluor 488

Vastus (kirjuta tabelisse vastavad tähed) :

	<b>Primaarne antikeha</b>	<b>Sekundaarne antikeha</b>
<b>Valk1</b>		
<b>Valk2</b>		

4.

Rakke inkubeeritakse primaarse antikehaga, mille lõppkontsentratsioon on  $4\mu\text{g/ml}$ .  
Seejärel valmistatakse sekundaarse antikeha lahus 1:200 algkontsentratsioonist  $2\text{mg/ml}$ .  
On teada, et vastava sekundaarse antikeha molekuli külge on konjugeeritud 6 fluorokroomi molekuli.

- a) Arvuta primaarsete ja sekundaarsete antikehade molekulaarne suhe
- b) Arvuta primaarsete antikehade ja fluorokroomi molekulide molekulaarne suhe

Vastus:

a)

b)