

**49-ая Эстонская Школьная
биологическая олимпиада
Практическая работа по цитологии**



Имя :

Фамилия :

Школа :

Класс :

Группа :

Иммунофлуоресцентная микроскопия

1. Найди на столе свои рабочие инструменты:

- 2 чашки Петри, на дне которых пробирка Ø 12мм с фиксированными клетками в растворе буфера
- Пинцеты
- Набор пипеток (синяя пипетка 100-1000µл, желтая – 10-100µл)
- 3 пластиковых коробки с наконечниками для пипеток
- Предметное стекло
- 50мл пробирка с 25 мл раствора фосфатно - солевого буфера (PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)
- Пустая 50мл пробирка для сбора отходов
- 1,5мл пробирка с раствором первичного антитела (раствор **A**)
- 1,5мл пробирка с раствором антител (смесь иммуноглобулинов мышей) негативного контроля (раствор **НК**)
- 1,5мл пробирка с раствором вторичных антител связанных с флуорохромом (раствор **B**)
- 1,5мл пробирка с раствором DAPI чтобы разбавлять вторичные антитела (раствор **C**)
- 1,5мл пробирка с глицерином в Tris буфере (pH 9,2) для склеивания (раствор **D**)

2. Инкубация клеток с растворами первичных антител и негативного контроля 15 минут.

- i) Возьми 1мл пипетку (синяя) и надень на нее синий наконечник. Проверь чтобы на пипетке было накручено число 1000 (это значит 1000 µл)
- ii) Приготовь также желтую пипетку с желтым наконечником и проследи, чтобы на пипетке было число 050 (это значит 50 µл).
- iii) Возьми одну чашку Петри и удали синей пипеткой покрывающий стекло буфер. Отходы сливай в 50 мл пробирку. Удали весь буфер.
- iv) Проследи, чтобы стекло было на парафильме, а не у края чашки. Если надо, передвинь пинцетом стекло на центр.
NB! Не давай стеклу высохнуть!
- v) Отпипетируй 50 µл раствора **A** желтой пипеткой. Проследи, чтобы все стекло было покрыто раствором.
- vi) Смени наконечник пипетки. Использованный наконечник выбрось в желтый сосуд для отходов.
- vii) Возьми вторую чашку Петри и на ее крышке напиши **НК**.
- viii) Удали из чашки буфер как пункте iii.
- ix) Отпипетируй 50 µл раствора **НК**. Проследи, чтобы все стекло было покрыто раствором.

2. 3х кратное промывание стекла раствором PBS

- i) Отпипетируй синей пипеткой на чашку (на край чашки, не на стекло) 3 мл PBS раствора. Чашки можно слегка потрясти.
- ii) Приблизительно через минуту удали буфер сначала с одной чашки, а затем после смены наконечника – со второй.
- iii) Смени наконечник на пипетке. Повтори этапы i и ii 2 раза. Последний буфер не удаляй.

3. Приготовление раствора вторичных антител

- i) Рассчитай, сколько μl раствора вторичных антител (раствор В, конц. $100\mu\text{г}/\text{мл}$) нужно добавить в раствор С, если конечная концентрация антител должна быть $10\mu\text{г}/\text{мл}$ и объем реакции $100\mu\text{l}$?

Ход вычислений:

Отпипетировал в раствор С..... μl раствора В.

- ii) Возьми желтую пипетку и накрути на ней нужное для пипетирования количество. Добавь нужное количество раствора антител (раствор В) в раствор С.
- iii) Смешай на вортексе

4. Инкубация клеток 10 минут с раствором вторичных антител и DAPI.

- i) Поменяй наконечники на желтой и синей пипетках.
- ii) Удали буфер с обеих чашек синей пипеткой.
- iii) Проследи, чтобы стекло было в центре чашки
- iv) Отпипетируй в обе чашки желтой пипеткой $50\mu\text{l}$ раствора С, в который добавлены вторичные антитела.

5. Промывание стекла раствором PBS (см этап 2)

6. Склеивание стекла с предметным стеклом с глицерином (раствор D).

- i) Напиши на крае предметного стекла свое и номер
- ii) Возьми желтый наконечник и окуни его в глицерин. Оставь на предметном стекле две **маленьких** капли.
- iii) Удали синей пипеткой буфер с первой чашки. Подожди, пока чашка немного подсохнет и аккуратно возьми пинцетом стекло. Положи стекло обратной стороной (**значит клетками в сторону предметного стекла**) на каплю глицерина.
- iv) Прodelай то же самое со стеклом реакции негативного контроля. Сделай на предметном стекле пометку «негативный контроль».

7. Наблюдение реакции под флуоресцентным микроскопом

ЗАДАНИЯ:

На вопросы 1 и 2 ответь, исходя из иммунофлуоресцентной реакции своего препарата. Обведи в кружок правильный ответ.

1.

Какие клеточные структуры окрашены?

- a) рибосомы
- b) цитоплазматическая сеть
- c) митохондрии
- d) клеточное ядро
- e) комплекс Гольджи и эндосомальные везикулы
- f) клеточная мембрана
- g) растворенный в цитозоле белок
- h) сигнальный пептид
- i) цитоскелет

2.

Какое вторичное антитело использовали в иммунной реакции, учитывая, что первичное антитело было антитело мышей против белка человека? Обведи в кружок букву напротив правильного ответа.

Для осуществления реакции использовали вторичные антитела, которые связаны с очень устойчивым флуорохромами Alexa Fluor. NB! Учитывай также эмиссию флуорохрома (см рисунок 1).

- a) Антитело мыши Alexa Fluor 488 против антител человека
- b) Антитело мыши Alexa Fluor 647 против антител человека
- c) Антитело мыши Alexa Fluor 430 против антител человека
- d) Антитело козы Alexa Fluor 594 против антител мыши
- e) Антитело козы Alexa Fluor 430 против антител кролика
- f) Антитело осла Alexa Fluor 647 против антител мыши
- g) Антитело осла Alexa Fluor 488 против антител мыши
- h) Антитело осла Alexa Fluor 488 против антител кролика
- i) Антитело курицы Alexa Fluor 594 против антител кролика
- j) Антитело курицы Alexa Fluor 488 против антител кролика
- k) Антитело курицы Alexa Fluor 647 против антител кролика
- l) Антитело человека Alexa Fluor 430 против антител мыши

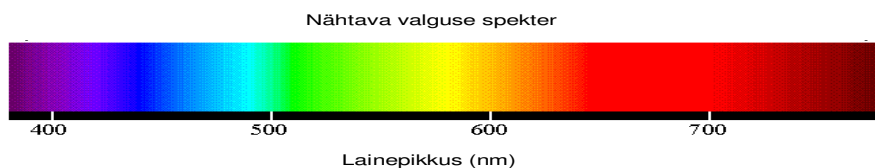


Рисунок 1

3.

Ты намереваешься определить разом два белка (N° 1 и N° 2) в клетке при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии. Выбери из следующих первичные антитела для обоих белков и соответствующие им вторичные антитела, чтобы система работала. *NB! Избегай возможности перекрестной реакции!*

Антитела против белка 1:

- a) Антитело мыши против белка 1
- b) Антитело кролика против белка 1
- c) Антитело козы против белка 1

Антитела против белка 2:

- d) Антитело мыши против белка 2
- e) Антитело козы против белка 2

Вторичные антитела:

- f) Антитело козы Alexa Fluor 594 против антител мыши
- g) Антитело козы Alexa Fluor 594 против антител кролика
- h) Антитело козы Alexa Fluor 488 против антител кролика

Ответ (напиши в таблицу соответствующие буквы) :

	Первичное антитело	Вторичное антитело
Белок1		
Белок2		

4.

Клетки инкубируются с первичным антителом, конечная концентрация которого $4\mu\text{g/ml}$. Затем изготавливается раствор вторичного антитела $1/200$ от начальной концентрации 2mg/ml . Известно, что к соответствующей молекуле вторичного антитела присоединено 6 молекул флуорохрома. Rakke inkubeeritakse primaarse antikehaga, mille lõppkontsentratsioon on $4\mu\text{g/ml}$. Seejärel valmistatakse sekundaarse antikeha lahus $1:200$ algkontsentratsioonist 2mg/ml . On teada, et vastava sekundaarse antikeha molekuli külge on konjugeeritud 6 fluorokroomi molekuli.

- a) Вычислит молекулярное соотношение первичного и вторичного антител
- b) Вычислит молекулярное соотношение молекул первичного антитела и флуорохрома

Ответ:

a)

b)