

# *Eesti koolinoorte 57. bioloogiaolümpiaad*

## *Immunoloogia praktikum*

---



Eesnimi: .....

Perekonnanimi: .....

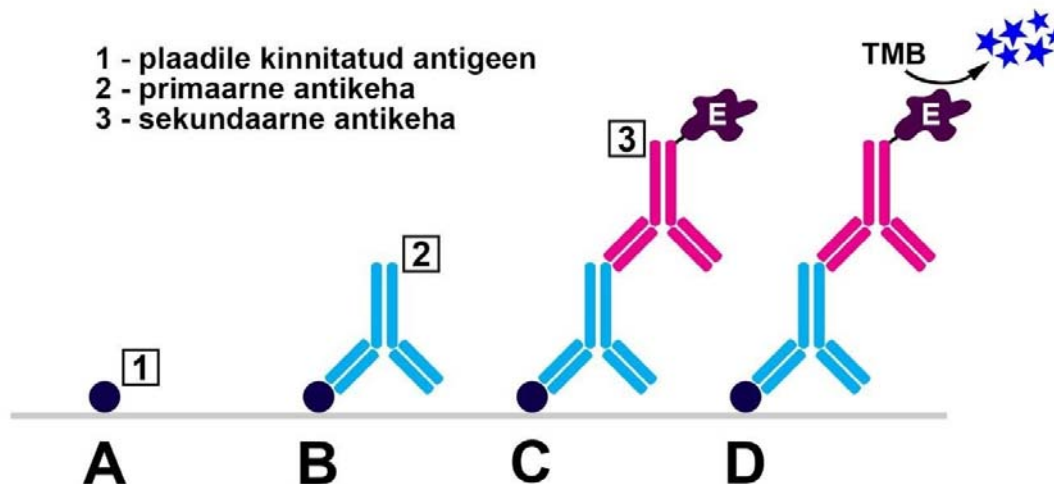
Juhendajad: Rudolf Bichele, Hanna Ainelo, Andres Ainelo

Tungivalt soovituslik on **alustada kohe** praktilise tööga. Töö jooksul on mitmeid ootepause, mille käigus saab olema aega tutvuda teoriaga ning lahendada ülesandeid.

Hübridoomid on kunstlikult valmistatud rakuliinid, mille eesmärk on toota suurtes kogustes täpselt ühesuguseid, nn monoklonaalseid antikehasid. Selle tarbeks süstitakse hiirele või mõnele muule katseloomale verre seda antigeeni, mille vastaseid antikehasid soovitakse tootma hakata. Selle tagajärjel käivitub loomal antud antigeeni vastane immuunvastus ning sealhulgas tekivad immuunvastuse käigus spetsiifilisi antikehasid tootvad B lümfotsüüdid. B lümfotsüüdid eraldatakse looma organismist ja liidetakse kokku müeloomi (üks verevähi tüüpidest) rakkudega, et saada B lümfotsüütide ja müeloomirakkude hübriidid – hübriidoomid. Taolised rakud on võimelised piiramatult arv kordi jagunema ning hea õnne korral jäävad tootma seda antikeha, mida tootsid algselt looma organismist eraldatud lümfotsüüdid. Edasi eraldatakse üksikud rakud, millest igaühel kasvatatakse järglaskond (tekitatakse nn rakuliin). Tulemuseks on rakkude partiid, millest igaüks on alguse saanud vaid ühest hübriidoomi rakust – monoklonaalsed rakuliinid. Kui need rakud toodavad antikehasid, siis kindla rakuliini rakud toodavad täpselt ühte ja sama antikeha, kuna on kõik ühe raku järglaskond. Taolisi antikehasid nimetataksegi monoklonaalseteks antikehadeks ja nendel on väga palju rakendusi nii kliinilises meditsiinis kui laboratoorsetes testides ja analüüsides.

Oma töös analüüsivad sa täna kuute erinevat monoklonaalset rakuliini, mis on saadud hiire immuniseerimisel inimese c-Myc valguga. Sinu töö eesmärk on tuvastada, millised rakkude kloonid on võimelised tootma meid huvitavat antikeha, kas kõik rakkude kloonid teevad seda sama edukalt või on mõni rakkude kloon teistest parem, et seda oleks edaspidi võimalik hakata kasvatama antikeha tööstuslikuks tootmiseks.

Selleks kasutatakse immunoensüümanalüüsi (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) – meetodit, mis võimaldab väga kõrge tundlikkusega tuvastada valke. Tuvastamine töötab tänu ensüümidele, mis katalüüsivad substraadist värvilise produkti teket ning on kovalentselt seotud huvipakkuvat molekuli äratundva antikehaga (vt joonis). Oma katses üritad sa tuvastada, kas erinevad rakuliinid on võimelised tootma meile vajalikku primaarset antikeha.



### Vajalikud vahendid

Antigeeniga kaetud testriba (2x8 auguga) Pesulahus

(PBS + 0,05% Tween-20) (30 mL) Proovid:

Negatiivne kontroll (tähistatud -) (120 µL)

Positiivne kontroll (tähistatud +) (220 µL)

Uuritavad proovid kuuest erinevast rakuliinist (tähistatud A, B, C, D, E, F) (kõiki 120 µL)

Sekundaarse antikeha lahus (1:2000 goat- $\alpha$ -mouse Ig-HRP) (1,5 mL)

TMB substraat (1,5 mL)

1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 mL)

Pipetid + otsikud

Salvrätid

### Töö käik

1. Võta testriba horisontaalselt enda ette ja märgi ülemine rida A ning alumine rida B (vahet ei ole, kumma rea valid ülemiseks ja kumma alumiseks)
2. Pipeteeri aukudesse A1-A8 ning B1-B6 100µL pesulahust (siin ja edaspidi ei ole pesulahuse pealekandmisel vaja otsikut pärast iga pipeteerimisliigutust vahetada, sest pipeteerid sama lahust). **Kui sa ei ole varem automaatpipetti kasutanud või tunnend end ebakindlalt, siis pöördu viimasel lehel oleva pipeteerimisjuhendi poole.**
3. Vala pesulahus kraanikaussi ühe järsu liigutusega ning löö plaat vastu salvrätti laua peale kuivaks.
4. Järgnevalt sega plaadi peal valmis lahjenduste seeria kaliiberrea jaoks.
  - 4.1. Pipeteeri aukudesse A3-A8 100 µL 0,5% BSA lahust
  - 4.2. Lisa auku A2 200 µL positiivse kontrolli lahust (+)
  - 4.3. Võta sama otsikuga august A2 ära 100 µL positiivse kontrolli lahust ning kanna see üle järgmisesse auku (A3). Sega lahus läbi, tõmmates seda paar korda pipeti sisse ja uuesti välja lastes. Väldi õhu sissetõmbamist ja mullide teket.
  - 4.4. Otsikut eemaldamata võta läbisegatud lahusest (A3) 100 µL, kanna üle järgmisesse auku (A4), sega läbi ja kanna sealt omakorda 100 µL järgmisesse auku (A5). Korda lahjendamise protseduuri kuni jõuad auguni A8. Sega lahus läbi ja eemalda sealt 100 µL (tühjenda otsik kraanikaussi).

5. Kanna puhtaid otsikuid kasutades ülejäänud kontrollproovid ja uuritavad proovid testribale vastavalt allolevale skeemile. Kõiki proove lisa 100  $\mu\text{L}$ .

-	+	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
A	B	C	D	E	F	(tühi)	(tühi)

6. Lase plaadil seista laua peal 20 minutit.  
 7. Eemalda plaadilt proovid (kraanikaussi), löö plaat kuivaks ja pese kasutuses olevaid auke 4 korda 200  $\mu\text{L}$  pesulahusega.  
 8. Pärast viimast pesu löö plaat salvrätile kuivaks ja lisa aukudele A1-A8 ning B1-B6 100  $\mu\text{L}$  sekundaarse antikeha lahust.  
 9. Lase plaadil seista laua peal 20 minutit.  
 10. Vala ära sekundaarse antikeha lahus (kraanikaussi), löö plaat kuivaks ja pese kasutuses olevaid auke 4 korda 200  $\mu\text{L}$  pesulahusega.  
 11. Pärast viimast pesu löö plaat salvrätile kuivaks ja lisa aukudesse A1-A8 ning B1-B6 100  $\mu\text{L}$  lahust TMB.  
 12. Lase plaadil seista laua peal 15 minutit. Sekundaarse antikeha küljes olev ensüüm hakkab TMB substraati lagundama, mille tulemusena tekib sinist värvi produkt. Mida kauem lasta reaktsioonil toimuda, seda intensiivsemaks muutub värv.  
 13. Lisa kasutuses olevatesse aukudesse 100  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lahust, et reaktsioon peatada.

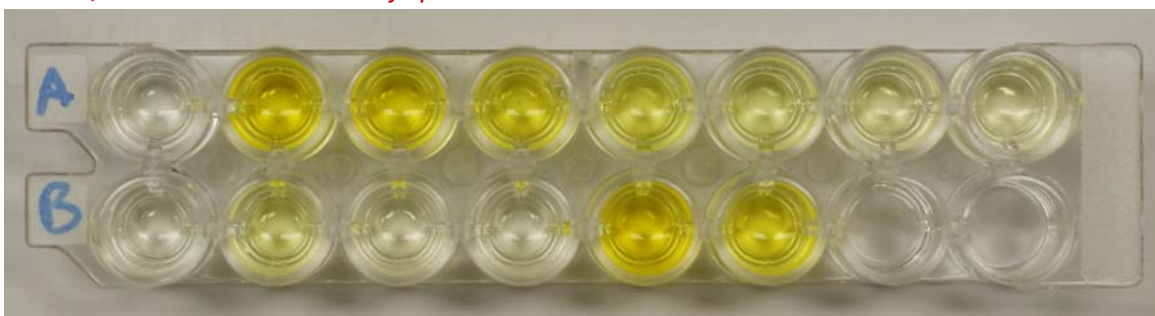
## Ülesanne 1.

### Küsimus 1.1.

Lähtuvalt oma positiivsest ja negatiivsest kontrollist, hinda uuritavates proovides toimunud värvusreaktsiooni intensiivsust („0“ = värvusreaktsiooni ei toimunud; „+“ = nõrk värvusreaktsioon; „++“ = keskmise tugevusega värvusreaktsioon; „+++“ = kõige intensiivsem värvusreaktsioon).

A	B	C	D	E	F
0	+	0	0	+++	++

*Hinnati, kas tabel vastab võistleja plaadil esinevatele värvusreaktsioonidele.*



Plaadil hinnati:  
värvusreaktsiooni esinemist;

positiivse ja negatiivse kontrolli mittevärvumist-värvumist;

lahjendusreas värvuse järkjärgulist lahjenemist;

3 uuritava proovi värvumist, 3 mittevärvumist;

B-proovi kõige nõrgemat värvumist;

F-proovi nõrgemat värvumist võrreldes E-ga

#### Küsimus 1.2.

Oma tulemuste põhjal hinda, millist rakuliini/milliseid rakuliine oleks kõige mõttekam edaspidi kasutada antikehade tööstuslikuks tootmiseks (kirjuta allolevasse lahtrisse vastav täht/vastavad tähed ja põhjenda oma valikut)

Antikehade edaspidiseks tootmiseks on mõttekas kasutada rakuliini/rakuliine     E    .

Põhjendus: **Rakuliini E analüüsil on värvusreaktsioon kõige tugevam, mis tähendab, et see rakuliin toodab kõige efektiivsemalt antikehi**

Kui värvusreaktsiooni ei esinenud, siis arutle, mis võis olla selle põhjuseks (kui katse õnnestus ja värvusreaktsioon esines, siis jätta see väli tühjaks)

**ÄRA VISKA OMA TESTRIBA ÄRA!**

#### Ülesanne 2.

Oletame, et sa tahad välja töötada uut HIV diagnoosi panemiseks mõeldud ELISA testi, mis võimaldaks määrata inimese vereproovist, kas tal on välja kujunenud HIV vastane immuunvastus. Analüüs peaks töötama sarnase loogika alusel, nagu sinu poolt tehtud katse. Allolevas loetelus on toodud erinevad antigeenid, antikehad, ensüümid ja ensüümi substraadid, mis on sinule saadaval.

Antigeen	
A	HIV genoomne RNA

B	Inimese HIV-vastased antikehad
C	HIV ümbrise glükoproteiinid (pinnavalgud)
D	Pöördtranskriptaas
E	T-rakkude pinnal olevad CD4 valgud
<b>Primaarne antikeha</b>	
F	Inimese veres olevad HIV vastased antikehad
G	Hiires toodetud inimese antikehade vastased antikehad
H	Kitse toodetud HIV pinnavalkude vastased antikehad
I	Hiires toodetud HIV genoomse RNA vastased antikehad
J	Küülikus toodetud inimese T-lümfotsüütide vastased antikehad
<b>Sekundaarne antikeha</b>	
K	Hiires toodetud hiire antikehade vastased antikehad
L	Kitse toodetud inimese antikehade vastased antikehad
M	Hiires toodetud küüliku antikehade vastased antikehad
N	Inimese seerumis olevad HIV vastased antikehad
O	Hiires toodetud kitse antikehade vastased antikehad
<b>Sekundaarse antikeha küljes olev ensüüm</b>	
P	RuBisCO
R	Amülaas
S	Lipaas
T	Beeta-galaktosidaas
U	Pepsiin
<b>Substraat</b>	
V	CuSO <sub>4</sub> (annab lahusele sinise värvuse)
W	PNPP ( <i>p</i> -nitrofenüülfosfaat, pärast töötlust fosfataasidega värvub kollaselt)
X	Etiidumbromiid (DNA-ga seondudes helendab oranžilt UV valguses)
Y	CO <sub>2</sub> (vees dissotseerudes muudab lahuse pH taset, mida on võimalik tuvastada indikaatoriga)
Z	ONPG (galaktoosi sünteetiline analoog, lõikamisel annab kollast värvi)

**Küsimus 2.1.**

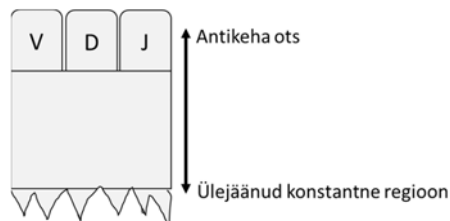
Vali eelpool toodud loetelust sobilik kombinatsioon, mis vastaks korrektselt kasutatavale antigeenile, primaarsele antikehale, sekundaarsele antikehale, sekundaarse antikeha külge seotud ensüümile ja sobilikule ensüümi substraadile. Kirjuta igasse lahtrisse vastav täht.

Antigeen	Primaarne antikeha	Sekundaarne antikeha	Ensüüm	Substraat
<b>C</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>Z</b>

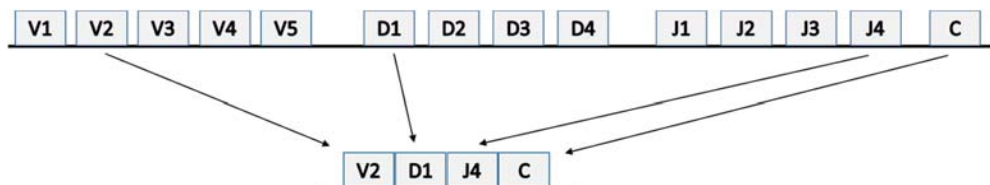
### Ülesanne 3.

Keha immuunrakud on võimelised tootma antikehasid väga erinevate antigeenide vastu. Lai antikehade repertuaar saavutatakse muuhulgas protsessiga, mida nimetatakse VDJ-rekombinatsiooniks.

Antikeha varieeruv osa, millega võõrosakesi ära tuntakse, koosneb lihtsustatult võttes kolmest osast: V, D ja J, mis paiknevad antikeha otsas skemaatiliselt järgnevalt:

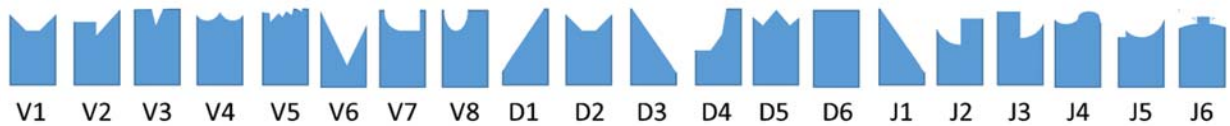


Raku genoomis on mitmeid koopiaid nii V, D, kui J segmente kodeerivaid DNA lõike. Erinevatelt lõikudelt kodeeritud valgu osad on erineva ruumilise kujuga, mis määrab ka antikeha spetsiifilisuse. Kombineerides erinevaid V, D ja J segmente on võimalik genereerida erineva kujuga antikeha otsi, mis tunnevad ära erinevaid antigeene. Antikeha tootmiseks rekombineeritakse B-rakus üheks antikeha geeniks kokku üks V, üks D ja üks J-segment, millele järgneb kõigil antikehadel samasugune konstantne regioon.



#### Küsimus 3.1.

Alljärgnevalt on skemaatiliselt kujutatud EBOlaviiirus oma pinnavalkudega ning tema peremeesorganismi võimalikud erineva ruumilise kujuga V, D ja J-segendid. Missugune V-D-J kombinatsioon oleks vajalik EBOlaviiiruse kahjutuks tegemiseks?



Vastus: V1- D3- J2

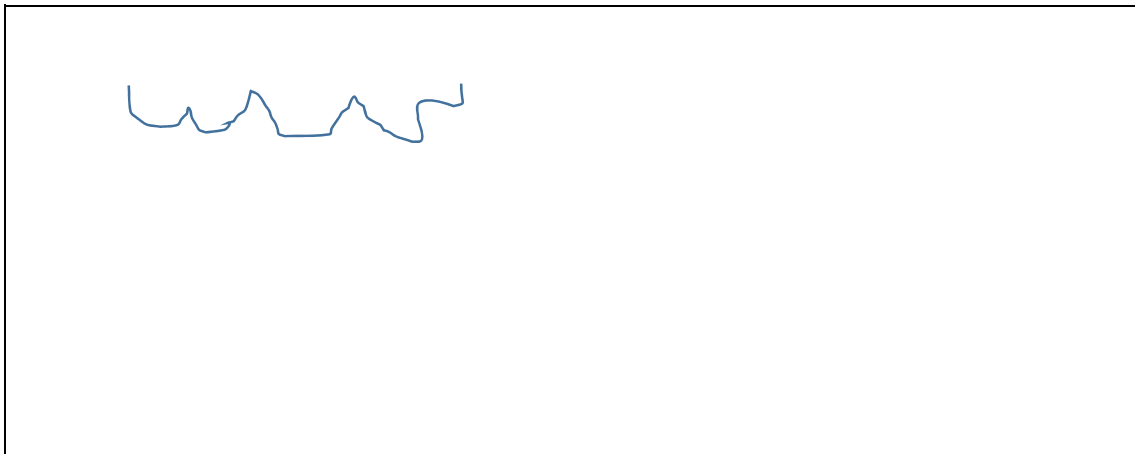
### Küsimus 3.2.

Arvuta, millise tõenäosusega tekib rekombinatsioonil just selline antikeha, mis on võimeline kahjutuks tegema EBOlaviiirust?

Vastus:  $1/8 * 1/6 * 1/6 = 1/288 = 0,0035 = 0,35\%$

### Küsimus 3.3.

Joonista, millise antigeeni tunneks ära antikeha V4-D2-J2! Kasuta joonise tegemiseks alltoodud ruumi.



## Automaatpipeti kasutamise õpetus

Automaatpipetiga saab täpselt pipeteerida enda valitud mahtu vedelikku. Igal automaatpipetil on peal mahuvahemik, milles seda reguleerida saab. Vahemik on antud mikrolitrites. Mahtu reguleeritakse pipeti ülemise nupu otsas olevat ratast keerates. Valitud maht on näha aknakeses. Kriipsukesega on eraldatud kas mikrolitri komakoht (kõige alumine number) või milliliiter (kõige ülemine number). Näiteks: „100|0“ = 100,0 µl, kuid kui esimene number on kriipsu taga, siis „1|000“ = 1000 µl = 1 ml. Samamoodi „10|00“ = 10,00 µl. Pipettidele on alati peale märgitud ruumalavahemik, mida sellega on võimalik pipeteerida. **Ole hoolas ja ära kunagi keera pipetti selle mõõtevahemikust välja! Võid pipeti rikkuda!**

**Pipetti kasutatakse alati koos vastava pipetiotsikuga:** kuni 1 ml võimaldavale pipetile sinised, väiksematele kollased. Otsiku võtmiseks suru pipett lihtsalt otse karbis oleva otsiku külge. Pärast pipeteerimist vajuta pipetinupu juures olevale klahvile, et otsik prüginoorusse lasta. Ära otsikut käega puutu! **Laboriassistendid jälgivad selle punkti täitmist eriti rangelt! Ilma otsikuta reostad pipeti!**

Otsik on ühekordseks kasutamiseks, eriti kui kasutad seda mingi alglahuse võtmiseks. Kui näiteks võtad ühe otsikuga valguproovi, pipeteerid selle testribale ja seejärel sama otsikuga uut proovi tõstad, saastad sa oma teise proovi ja su edasise töö täpsus kannatab.

Pipeteerimiseks kasuta nuppu pipeti otsas. Nupp liigub alla kahes järgus: esmalt kuni mõõdupunktini ja siis juba raskemalt edasi tühjendamispunktini. Valitud ruumala sisse võtmiseks vajuta nupp kõigepealt mõõdupunktini alla, pane otsik vedelikku ja lase nupp sujuvalt üles. Vedeliku välja laskmiseks teise tuubi vajuta nupp sujuvalt täiesti alla. Mõõdupunktist üle vajutamine tühjendab otsiku täielikult.