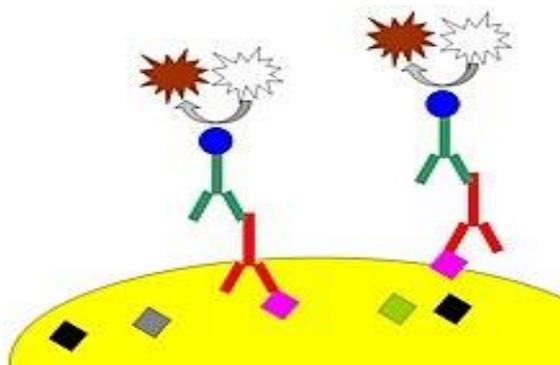




Биология для школьников 7 – 11 класса (заочный тур) Задача 9. Как покрасить клетки антителами?



Для исследования морфологии клеток, внутриклеточной локализации белков и белковых комплексов используются различные методы специфического флуоресцентного окрашивания, из которых самым селективным и высокочувствительным является метод иммунохимического (или иммуногистохимического) окрашивания. В основе данного метода лежит инкубация предварительно фиксированных клеток или срезов тканей с раствором антитела к белку или белковому комплексу, который необходимо визуализировать. В простом случае это – антитело (так называемое первичное антитело, ПА), конъюгированное с выбранным флуоресцентным зондом (низкомолекулярным красителем, который светится в определенном спектральном диапазоне при воздействии светом нужных длин волн). В более сложном случае первичное антитело не несет флуоресцентный зонд, а исследуемый препарат после обработки первичным антителом тщательно отмывается и дополнительно инкубируется с раствором другого антитела (так называемым вторичным антителом, ВА), которое уже связано с флуоресцентным зондом. После отмывки препарата от растворов антител флуоресценция будет наблюдаться только от тех белков, с которыми связалось первичное антитело, а на нем – флуоресцентно-меченое вторичное антитело.

В настоящее время существует множество фирм, которые производят самые разные первичные и вторичные антитела, при этом, по запросу, они могут конъюгировать вторичные или первичные антитела с любыми флуоресцентными зондами. Самое главное – это правильно выбрать антитела и правильно провести окрашивание, чтобы избежать неизбирательного связывания первичных антител с “ненужными” белками или липидами. Получение первичных антител – более трудоемкая и дорогостоящая процедура, чем получение вторичных. Белок, к которому надо получить ПА, добавляют к В-лимфоцитам одного клона, полученному из крови так называемого животного-хозяина. Животным-хозяином могут быть мышь, кролик, альпака, морская свинка, осел, коза и др. В-лимфоциты в ответ на добавленный чужеродный белок синтезируют антитела, которые потом выделяются и очищаются. Это и есть первичные антитела. Следующая стадия – получить вторичные антитела на ПА. Для оптимизации их производства фирмы получают вторичные антитела не на конкретный белок-первичное антитело (слишком много разных ВА нужно было бы получить, учитывая самые разнообразные исследования), а на любые иммуноглобулины (антитела) того животного-хозяина, В-лимфоциты которого производили первичные антитела. Очень важно, чтобы вторичные антитела были получены от лимфоцитов животного не того вида, клетки или ткани которого исследуются при помощи иммунохимического окрашивания!

Представьте, что Вы работаете в лаборатории клеточной нейробиологии и исследуете особенности распределения белков в астроцитах – клетках глии, окружающих нейроны, обеспечивающих их питательными веществами и способствующих синаптической передаче между нейронами. Ваш объект – культура дифференцированных астроцитов мыши. Вам надо изучить распределение в плазматической мембране астроцитов двух ион-транспортных белков – глутаматного транспортера Glt-1 и Na/Ca-обменника NCX – и сопоставить их распределения друг с другом и с распределением цитоплазматического белка GFAP – глиального фибриллярного кислого белка. Таким образом, Вам надо окрасить культуру астроцитов первичными и вторичными антителами ко всем трем типам исследуемых белков. В каталоге биотехнологической фирмы Вы нашли следующие первичные и вторичные антитела:

Первичные антитела:

ПА-GFAP (первичные антитела к белку GFAP), полученные из лимфоцитов козы;

ПА-GFAP, полученные из лимфоцитов альпаки;

ПА-GFAP, полученные из лимфоцитов осла;

ПА-GFAP, полученные из лимфоцитов кролика.

ПА-GLT-1 (первичные антитела к глутаматному транспортеру), полученные из лимфоцитов козы;

ПА-GLT-1, полученные из лимфоцитов альпаки;

ПА-GLT-1, полученные из лимфоцитов морской свинки;

ПА-GLT-1, полученные из лимфоцитов кролика.

ПА-NCX (первичные антитела к Na/Ca-обменнику), полученные из лимфоцитов козы;

ПА-NCX (первичные антитела к Na/Ca-обменнику), полученные из лимфоцитов альпаки;

ПА-NCX (первичные антитела к Na/Ca-обменнику), полученные из лимфоцитов быка;

ПА-NCX (первичные антитела к Na/Ca-обменнику), полученные из лимфоцитов кролика.

Фирма продает следующие вторичные антитела:

ВА, полученные из лимфоцитов осла на иммуноглобулины козы,

ВА, полученные из лимфоцитов козы на иммуноглобулины мыши,

ВА, полученные из лимфоцитов альпаки на иммуноглобулины человека,

ВА, полученные из лимфоцитов альпаки на иммуноглобулины морской свинки,

ВА, полученные из лимфоцитов осла на иммуноглобулины альпаки,

ВА, полученные из лимфоцитов морской свинки на иммуноглобулины кролика,

ВА, полученные из лимфоцитов осла на иммуноглобулины кролика.

После того, как заказчик выбирает нужные ему первичные и вторичные антитела, фирма-производитель советует подходящие флуоресцентные зонды, чтобы конъюгировать их со вторичными антителами и сделать окрашивание исследуемого препарата всеми тремя парами антител и исследовать распределение в астроцитах белков GFAP, GLT-1, NCX.

1. Напишите пары первичных и вторичных антител, которые Вы выберете для того, чтобы обеспечить селективное связывание первичных антител с исследуемыми белками GFAP, GLT-1, NCX, а затем – селективное связывание вторичного антитела с первичным антителом. Помните, что каждое первичное антитело должно реагировать с белками одного типа: GFAP, GLT-1 или NCX, а вторичное антитело должно связываться только с одним из трех используемых антител. Обоснуйте Ваш выбор. **(6 баллов, по 2 балла за правильную пару).**
2. Как Вы считаете, как нужно подбирать флуоресцентные зонды, которые будут конъюгированы со вторичными антителами, чтобы на одной культуре астроцитов исследовать распределение белков GFAP, GLT-1, NCX в астроцитах? **(2 балла)**
3. В некоторых случаях антитела связывают с наночастицами. Как Вы думаете, для чего? **(1 балл)**
4. Какие еще применения антител в биомедицинских исследованиях Вы знаете? **(1 балл)**

Всего – 10 баллов