

Úloha č. 10

Burst test (test oxidačního vzplanutí)Teorie:

Test je využíván ke kvantitativnímu vyhodnocení oxidačního vzplanutí u granulocytů a monocytů v heparinované plné krvi.

Fagocytující buňky se stimulují opsonizovanými *E. Coli*, fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) nebo PMA (phorbol-myristát-acetát). Dochází k oxidačnímu vzplanutí, při kterém se tvoří peroxidy, hydroxylové radikály, superoxidové anionty, které oxidují membránově permeabilní fluorogenní substrát DHR 123 (dihydrorhodamin 123) na zeleně fluoreskující rhodamin 123. Počet (procento) zeleně fluoreskujících granulocytů a monocytů sledujeme na průtokovém cytometru.

Provedení:

1. Plnou krev odebranou do heparinu rozpipetovat po **100µl** do **4 zkušev**.
2. Všechny zkuševy dát na **5 min** do **ledové lázně**.
3. Připravit roztok PMA – k **16µl** rozmraženého PMA přidat **270µl PBS** pro Burst test.
4. K vychlazené krvi ve čtyřech zkuševkách pipetovat:
 - a. zk.č.1 – **20µl PBS** pro Burst test
 - b. zk.č.2 – **20µl** rozmraženého alikvoty *E. Coli*
 - c. zk.č.3 – **20µl fMLP**
 - d. zk.č.4 – **20µl PMA**
5. Promíchat.
6. Všechny zkuševy inkubovat **10min** ve vodní lázni při **37°C**.
7. Naředit **DHR** – Nechat rozmraznout zkuševku s **45µl DHR**, přidat **450µl PBS** pro BT, důkladně promíchat na Vortexu.
8. Dát **vychladit PBS** tak, aby byl ledový, ale ne zmrzlý.
9. Po ukončení inkubace přidat ke všem zkuševkám **30µl** naředěného **DHR**. Důkladně promíchat na Vortexu. Nechat inkubovat **10min** ve vodní lázni **při 37°C**.
10. Přidat ke každé zkuševce **2ml ledového** PBS pro BT. Centrifugovat **2000ot/5min**.
11. Slít supernatant, sediment rozmíchat na Vortexu a lyzovat na lyzátoru.
12. Do odečtení uchovávat v ledničce.
13. Odečíst na průtokovém cytometru.

Ref. rozmezí:

Aktivace pomocí	<i>E. Coli</i> u	<u>granulocytů:</u>	80%
		monocytů:	40%
	fMLP u	<u>granulocytů:</u>	<10%
		monocytů:	<10%
	PMA u	<u>granulocytů:</u>	>95%