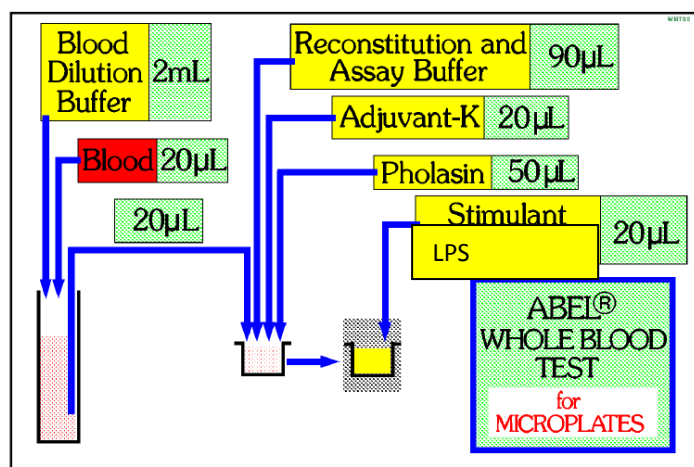


## Ptačí imunologie

1. Odběr krve z křídla (*vena cutanea ulnaris*) – slepice domácí (*Gallus gallus*), heparin 50U/ml, krevní roztěr (jaderné červené krvinky, bílé krvinky, fotodokumentace Olympus BX43 + kamera Infinity 2, Quick Photo Micro software).
2. Oxidační vzplanutí plné krve luminometricky s použitím dvou luminoforů – luminol (50x ředěná plná krev), Pholasin (1000x ředěná plná krev).
3. Oddělení krevní plasmy centrifugací (1500ot./10 min.), plasma jako blank pro vzorky plné krve.
4. Postup luminol (2x vzorek, 2x blank): Naředění plné krve v HBSS – 780  $\mu$ l HBSS + 20  $\mu$ l krve.

Naředěná krev ( $\mu$ l)	Luminol v borátovém pufru ( $\mu$ l)	Aktivátor - LPS ( $\mu$ l)
200	25	25

5. Postup Pholasin(2x vzorek, 2x blank):



Aktivátor přidán injektorem v pátém cyklu!

6. Stanovení aktivity komplementu (celková/alternativní cesta aktivace komplementu) luminometricky pomocí bioluminiscenční *E. coli* K12:

### Postup

- A. Do dvojice se připraví 2 zkumavky s HIS (heat inactivated serum):  
pro celkovou aktivitu komplementu: 80  $\mu$ l HIS + 120  $\mu$ l PBS (poměr 2 : 3)  
pro alternativní cestu: 80  $\mu$ l HIS + 40  $\mu$ l PBS + 80  $\mu$ l zásobního EGTA (poměr 2 : 1 : 2)
2. Do dvojice si připravíte 2 zkumavky pro vyšetřované sérum:  
pro celkovou aktivitu komplementu: 80  $\mu$ l plasmy + 120  $\mu$ l PBS (poměr 2 : 3)

pro alternativní cestu: 80  $\mu$ l plasmy + 40  $\mu$ l PBS + 80  $\mu$ l zásobního EGTA (poměr 2 : 1 : 2)

3. Pipetovat na desku v pořadí dle následujícího schématu (zleva doprava – viz poslední řádek):

		[ $\mu$ l]				Suspenze bakterií
		Paralelky	Vzorek	HIS	HIS s EGTA	
Celková aktivita	Blank K	1	-	50	-	50
	K 1	1	10	40	-	50
	K 2	1	20	30	-	50
	K 3	1	40	10	-	50
Alternativní dráha	Blank A	1	-	-	50	50
	A 1	1	10	-	40	50
	A 2	1	20	-	30	50
	A 3	1	40	-	10	50
<i>pořadí pipetování na destičku:</i>			1.	2.	3.	4.