

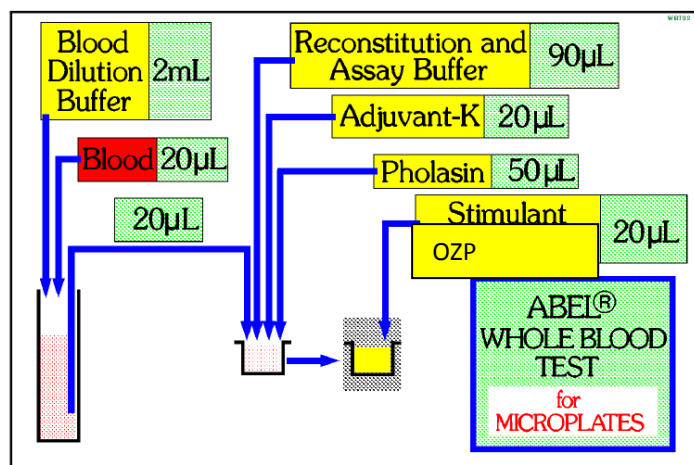
## Rybí imunologie

1. Odběr kožního mukusu – karas obecný (*Carassius carassius*), důkaz antibakteriální aktivity lysozymu – zónová difúze v agaróze s *Micrococcus luteus*.
2. Odběr krve z kaudální cévy – karas obecný (*Carassius carassius*), heparin 50U/ml, krevní roztěr (jaderné červené krvinky, bílé krvinky, fotodokumentace Olympus BX43 + kamera Infinity 2, Quick Photo Micro software).
3. **Oxidační vzplanutí plné krve luminometricky** s použitím dvou luminoforů – luminol (50x ředěná plná krev), Pholasin (1000x ředěná plná krev).

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 - OZP ( $\mu$ l)
200	25	25

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



4. Oddělení krevní plasmy centrifugací (1500ot./10 min.), plasma jako blank pro vzorky plné krve.
5. **Stanovení activity komplementu** (celková/alternativní cesta aktivace komplementu) luminometricky pomocí bioluminiscenční *E. coli* K12:

Postup

- 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)

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

[ $\mu$ l]

		Paralelky	Vzorek	HIS	HIS s EGTA	Suspenze bakterií
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.

## 6. Imunoturbidimetrie

Jedná se o tzv. zákalovou metodu. Zákal je tvořen imunokomplexy vzniklými interakcí specifických protilátek s antigenem. Koncentrace antigenu je přímo úměrná intenzitě zakalení. Měří se úbytek intenzity světla, které prošlo květou. Zdrojem světla bývá dioda. Detektor je umístěn přímo naproti zdroji světla.

Princip metody spočívá v reakci C3 složky se specifickou protilátkou proti C3. Vznikající imunokomplexy způsobují zákal, který je přímo úměrný koncentraci C3 ve vzorku. Reakční schéma vyjadřuje tab. č. 2.

Schéma reakce:

	vzorek	standard	blank
standard	-	4 $\mu$ l	-
vzorek	4 $\mu$ l	-	-
destilovaná voda	-	-	4 $\mu$ l
činidlo 1	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l
<b>promíchání, inkubace 5 min při 37 °C; odečet absorbance (A1) při 340 nm</b>			
činidlo 2	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>promíchání, inkubace 5 min při 37 °C; odečet absorbance (A2) při 340 nm</b>			

**Vyhodnocení:** Získaná data byla vyhodnotit v programu MS Excel z rovnice regrese, získané z kalibrační křivky sestavené z řady standardů o známé koncentraci