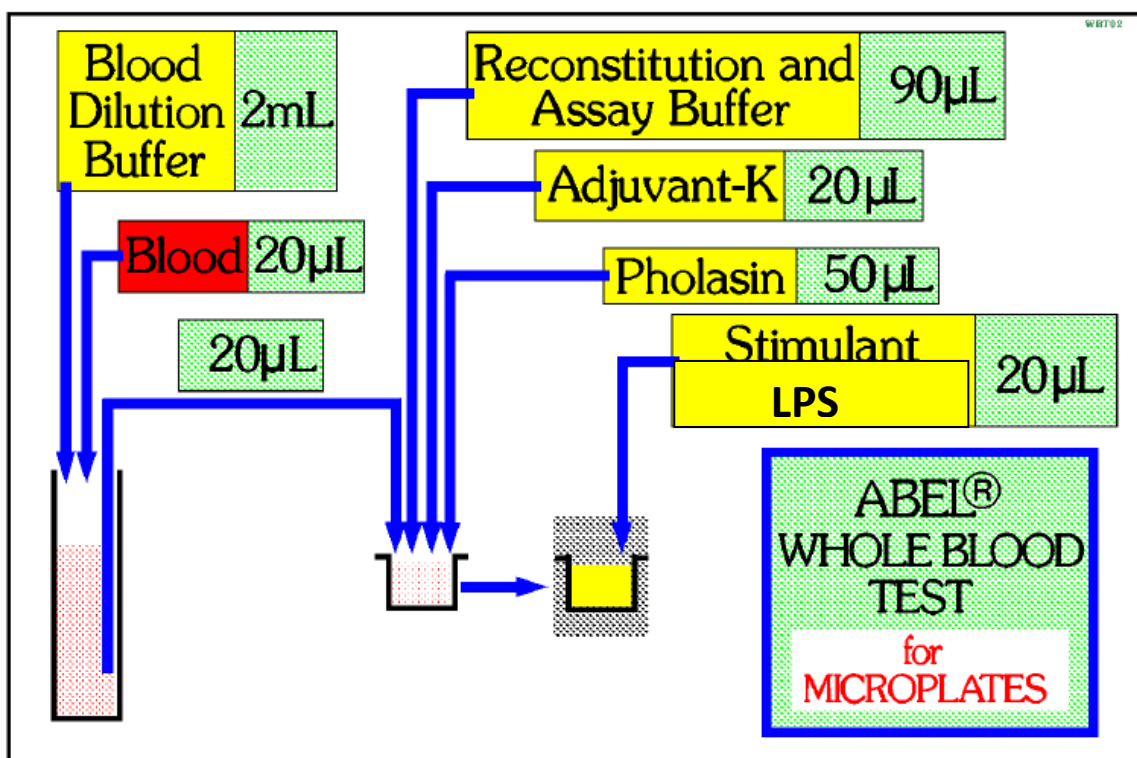


Ptačí imunologie

1. Odběr krve z křídla (*vena cutanea ulnaris*) – slepice domácí (*Gallus gallus*), heparin 50U/ml, krevní roztěr (jaderné červené krvinky, bílé krvinky, obarvení krevních roztěrů – kit Leukodif, 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).

Oddělení krevní plasmy centrifugací (1500ot./10 min.).

Postup Pholasin (2x vzorek, 2x blank – plasma ředěná stejně jako krev):



Luminometr vytemperovaný na 37°C! Aktivátor přidaný těsně před měřením nebo injektorem v pátém cyklu! Reakce je rychlá, celkové měření jen 5 minut, poté nasadit luminol.

Postup luminol (2x vzorek, 2x blank): Naředění plné krve v HBSS – 780 µl HBSS + 20 µl krve.

Naředěná krev (µl)	Luminol v borátovém pufru (µl)	Aktivátor - LPS (µl)
200	25	25

Luminometr vytemperovaný na 37°C! Měření kinetiky 60 minut.

3. Stanovení aktivity komplementu (celková/alternativní cesta aktivace komplementu) luminometricky pomocí bioluminiscenční *E. coli* K12 (100 tis./jamku):

Postup

A. Do dvojice se připraví 2 zkumavky s HIS (heat inactivated serum):

pro celkovou aktivitu komplementu: 80 μ l HIS + 120 μ l PBS (poměr 2 : 3)

pro alternativní cestu: 80 μ l HIS + 40 μ l PBS + 80 μ l zásobního EGTA (poměr 2 : 1 : 2)

2. Do dvojice si připravíte 2 zkumavky pro vyšetřované sérum:

pro celkovou aktivitu komplementu: 80 μ l plasmy + 120 μ l PBS (poměr 2 : 3)

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

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

		[μ 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.