




Metody sledování imunity bezobratlých

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Imunita bezobratlých

- (immune priming)
- Vrozená (inátní) imunita
- Rychlá, nespecifická

- Buněčná – fagocytóza, nodulace, enkapsulace
- Humorální – AMP, PO, koagulace
- Signální dráhy - Toll, Imd, JAK/STAT



IX. Úloha – Stanovení aktivity enzymu fenoloxidázy

Princip

- **Fenoloxidáza (PO)** - přítomna v hemolymfě a hemocytech (**profenoloxidáza**)
- Aktivace - např. lipopolysacharid nebo **zymosan**
- **Metanol** mění konformaci profenoloxidázy a uvolňuje aktivní místo enzymu pro vstup **substrátu**
- Substráty fenoloxidázy - tyrozin a další fenolické látky (**DOPA**), které jsou přeměňovány až na pigment **melanin**
- Fenylthiomočovina (**PTU**) využívána pro inhibici melanizace
- Stanovení PO spočívá ve sledování přeměny substrátového roztoku na barevné produkty
- Měříme spektrofotometricky (tmavnutí vzorku je přímo úměrné aktivitě PO)

Chemikálie a roztoky

- fosfátový pufr (**PBS**; 10 mM; pH 7,0)
- substrátový roztok **DOPA** (3,4-dihydroxyfenylalanin; 3 mg/ml fosfátového pufru)
- roztok fenylthiomočoviny (**PTU**) ve fosfátovém pufru
- suspenze **zymosanu** o koncentraci 5 mg/ml fosfátového pufru
- **metanol**
- Vzorek - hemolymfa hmyzu (*Galleria mellonella*)

Přístroje a pomůcky

- 96-jamkové mikrotitrační destičky
- spektrofotometr

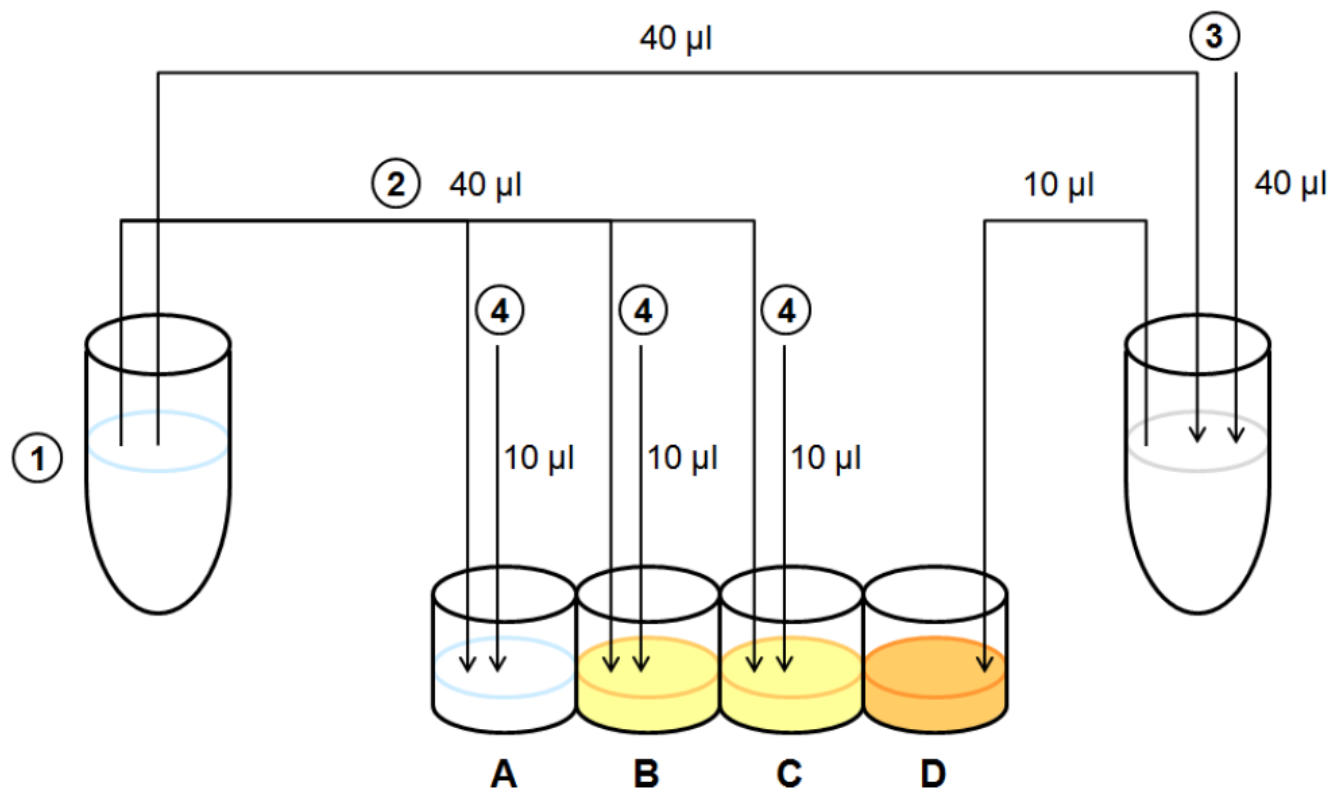
Postup

1. Ve zkumavce si připravíme směs hemolymfy s fosfátovým pufrům (ředění hemolymfy 1:10):
 - 20 μ l hemolymfy + 180 μ l pufru \rightarrow mírně promícháme otočením zkumavky
2. Po 40 μ l ředěné hemolymfy napipetujeme do třech jamek (A-C) na mikrotitrační destičce.
3. Další 40 μ l směsi hemolymfa-pufr přeneseme do nové zkumavky, ve které máme připraveno 40 μ l metanolu. Směs důkladně promícháme a 10 μ l z ní napipetujeme do čtvrté jamky (D) na mikrotitrační destičce.

Postup

4. Podle charakteristiky měření přidáme do jamek na mikrotitrační destičce:

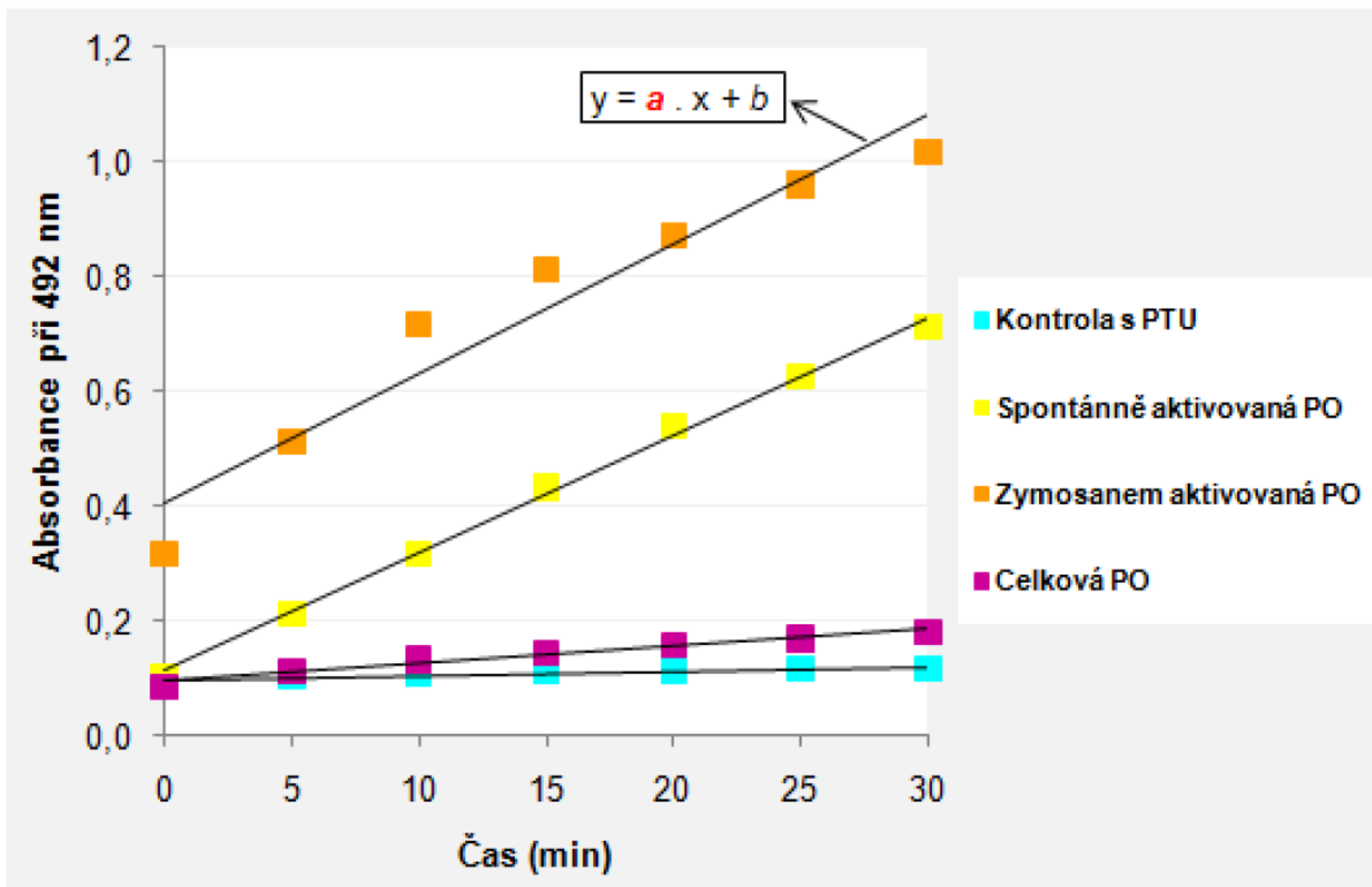
- | | |
|---|------------------------------|
| A) negativní kontrola: | 10 μ l roztoku PTU |
| B) měření hladiny spontánně aktivované PO: | 10 μ l fosfátového pufru |
| C) měření hladiny PO po aktivaci zymosanem: | 10 μ l roztoku zymosanu |
| D) měření celkové hladiny PO (pPO): | nic nepřidáváme |



Postup

5. Těsně před měřením přidáme ke vzorkům roztok DOPA: do jamek A-C pipetujeme 150 μl DOPA a do jamky D 190 μl DOPA, tak aby výsledný objem ve všech jamkách byl 200 μl .
6. V pětiminutových intervalech měříme absorbanci vzorků při 492 nm po dobu 30 min.

Výstup



Výstup

- **Graf závislosti absorbance na čase**
 - kontrola
 - spontánně aktivovaná PO
 - zymosanem aktivovaná PO
 - celková PO

- **Tabulka**

Aktivita PO	A_{492}/min	$A_{492}/\text{min}/\mu\text{l}$
Kontrola		
Spontánně aktivovaná PO		
Zymosanem aktivovaná PO		
Celková PO		