

Úloha č. 7

NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

Teorie:

Imunofluorescence je metoda založená na vizualizaci reakce antigen-protilátka protilátkou označenou fluorescenční barvičkou. Je považována za zlatý standard pro stanovení autoprotilátek. Nejčastěji používanými substráty jsou: buněčná linie Hep2 (buňky nazofaryngeálního karcinomu), prvok *Critidium lucilliae*, lidské neutrofilní leukocyty, řez opičích jícnu, krysí ledviny+krysí žaludek+játra. Nejčastěji používaným fluorochromem je FITC (fluoresceinizothiokyanát) jež při vlnové délce 490 nm emituje charakteristické zelené světlo.

Provedení:

1. PŘÍPRAVA VYŠETŘOVANÝCH VZORKŮ

- sérum (zamražené sérum pacienta) naředit v PBS 1:81 (10 μ l séra 800 μ l PBS)

2. PŘÍPRAVA SKEL

- skla nechat vytemperovat

3. APLIKACE VZORKŮ

- napipetovat na řez 25 μ l naředěného séra na pomocný nosič (každé okénko)

4. INKUBACE

- Překlopit na nosič sklíčko s buňkami 30 min při laboratorní teplotě

5. PŘÍPRAVA KONJUGÁTU

- USOL - k lyofilizovanému konjugátu přidat destilovanou vodu dle návodu výrobce (1 nebo 2 ml)
- nechat dobře rozpustit
- **1 ml** z ampulky + **8 ml PBS** + **0,250ml** ředěné **Evans Blue** (lze připravit i poloviční dávku)

6. OPLACH

- skla spláchnout proudem **PBS**, nechat prát v PBS 5 min
- opatrně otřít zadní stranu a hrany skla

7. APLIKACE KONJUGÁTU

- aplikovat 20 μ l naředěného **konjugátu**

8. INKUBACE

- 30 min při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce

9. OPLACH

- skla spláchnout proudem **PBS**, nechat prát v **PBS 5 min**
- opatrně otřít zadní stranu a hrany skla

10. FIXACE

- na jednotlivé okénka nakapat malé kapičky glycerinu
- opatrně přiložit reakční sklíčko

11. ODEČÍTÁNÍ

- fluorescenční mikroskop při zvětšení 40x