Řešení příkladu anti-CD28 ředění:

Vstupní údaje:

* 10 kontrolních osob a 10 pacientů = 20 osob
* Na každou osobu jsou třeba 2 jamky v mikrotitrační destičce – dohromady 2 krát 20 = 40 jamek
* Jedna jamka má objem 200ul (200 tis buněk v jamce je pro tento výpočet nepotřebný údaj)
* Zásobní koncentrace anti-CD28 = 1 mg/ml = 1000 ug v 1000 ul 🡪 1ug = 1ul

Výpočet:

1. Potřebujeme koncentraci 2 ug/ml (v 1000 ul jsou obsaženy 2 ug CD28 🡪 objemem 1000ul roztoku lze naplnit celkem 5 jamek o objemu 200ul (1000/200=5) 🡪 tedy v jedné jamce je obsaženo 2ug/5=0,4ug CD28)
2. Jamek bude třeba 40 🡪 40 krát 0,4 ug CD28 = 16 ug CD28 (a jelikož 1ug CD28 je roven 1ul CD28 (koncentrace 1mg/ml), tak **16ug CD28 = 16 ul CD28**)

Prakticky je třeba si uvědomit, že aby bylo možné buňky pipetovat do jamek o známém množství (např 200tis/jamka), musí být naředěny v určitém objemu čistého média a část vzorku je využita na spočítání koncentrace. Tento výpočet ale není součástí této úlohy, takže koncentraci buněk neřešíme.

Obvykle se postupuje tak, že připravenou buněčnou suspenzi (v čistém médiu) pipetujeme v množství 195 ul do jamky (ve 195 ul média je obsaženo 200 tis buněk). Zbývajících 5 ul, které do 200 chybí, doplníme právě připraveným roztokem anti-CD28.

Takže

1. Na jednu jamku zbývá objem 5 ul, který má doplnit námi připravený roztok CD28 – jamek je 40 – násobíme 5 🡪 na 40 jamek je třeba 200 ul naředěné CD28 (40 krát 5)
2. V kroku 2 jsme spočítali, že celkem potřebujeme 16ug (= 16ul zásobní CD28) – výpočet je velmi jednoduchý – 16ul CD28 + x ul média = 200ul roztoku 🡪 tedy 200 – 16 = 184ul média.

Závěr: Smícháme 16ul zásobní CD28 se 184ul média a získáme tak 200ul směsi anti-CD28 v koncentraci 2ug/ml. Tato směs vystačí přesně na 40 jamek za předpokladu, že do jedné budeme pipetovat 5ul.

Pozn. Proč pracujeme právě s 5ul? 🡪 Je na nás jaký objem anti-CD28 si na jamku zvolíme. Důležité je dodržet konečný objem 200ul v jamce – pracujeme pouze s poměry buněčné suspenze a roztoku anti-CD28. Samozřejmě se můžeme rozhodnout, že 5ul se nám pipetovat nechce a více se nám líbí pipetovat 180ul buněk a 20ul anti CD28 – v takovém případě si musíme upravit koncentraci buněk (není součást tohoto příkladu) i koncentraci anti-CD28

**Řešení příkladu proto může mít více cest:**

Modelová situace – laborantka ztratila 5ul pipetu a v laboratoři nám zbyla jen pipeta na objem 10 ul. Co s tím?

Budeme muset pipetovat 190 ul buněk a k tomu přidat 10 ul naředěné CD28 na jamku – v tom případě by výpočet vypadal takto:

10ul naředěné CD28 na jamku – 40 jamek krát 10ul = 400 ul

Objem anti-CD28 zůstává stále stejný (16ul) – jediné, co se mění, je objem ředícího média 🡪 takže 400 – 16 = 384 ul média.

Závěr:

Pipetujeme 190ul buněk a 10ul připravené anti-CD28 (16ul anti-CD28 + 384ul média).

*Poznámky k zápočtovému testu.*

*Pokud by někdo měl počítat tuto úlohu, v zápočtovém příkladu budete mít uvedeno, jaký objem buněk a anti-CD28 máte pipetovat. Nebude třeba si vymýšlet své vlastní poměry ☺*

*Co se výpočtů ředění týče, upozorňuji na všem dobře známé zmatky v ředění:*

*1:10 (je to 1díl + 10 dílů jako v biochemii, nebo 1+9 dílů jako v mikrobiologii nebo imunologii?) 🡪 Ředění závisí na konkrétní metodě, vždy je třeba si přečíst leták od výrobce, kde je toto jasně specifikováno)*

***V zápočtovém příkladu bude jasně uvedeno, jaký způsob ředění máte použít. Pokud by měl přesto někdo pochybnosti, neváhejte se obrátit na učitele.***

*Imunofluorescence obvykle využívá ředění, které je typické pro biochemii (tedy ta varianta, kde 1:10 znamená 1+10).*