

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 $2\text{ug}/5=0,4\text{ug}$ CD28)
- 2) Jamka 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

- 3) Na jednu jamku zbývá objem 5 ul, který má doplnit námi připravený roztok CD28 – jamka je 40 – násobíme 5 → na 40 jamek je třeba 200 ul naředěné CD28 (40 krát 5)
- 4) 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 součástí 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).