

Cvičení č. 2

Výpočty

Mgr. JULIE ŠTÍCHOVÁ

Ředění

- Nařed'te 96% ethanol na 35%.
- K dispozici máte 1ml koncentrovaného ethanolu.

Burst test výpočty (1a)

Pro stanovení oxidačního vzplanutí je zapotřebí chemikálie dihydrorhodamin 123

Výrobce ho dodává v 10mg balení

Látka se rozpouští v DMSO

Jak připravíte zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml?

Burst test výpočty -výsledek

Pro stanovení oxidačního vzplanutí je zapotřebí chemikálie dihydrorhodamin 123

Výrobce ho dodává v 10mg balení

Látka se rozpouští v DMSO

Jak připravíte zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml?

Zásobní roztok připravíme přidáním 10ml DMSO

Počet zamrazovacích zkumavek (1b)

Zásobní roztok připravíme přidáním 10ml DMSO

Zásobní roztok je třeba rozplnit do po 45 ul a zamrazit na -80°C

Kolik zamrazovacích zkumavek si musí laborant(ka) připravit a popsat?

Počet zamrazovacích zkumavek -výsledek

Zásobní roztok připravíme přidáním 10ml DMSO

Zásobní roztok je třeba rozplnit do po 45 ul a zamrazit na -80°C

Kolik zamrazovacích zkumavek si musí laborant(ka) připravit a popsat?

Laborant(ka) si musí připravit 222 zamrazovacích zkumavek

Koncentrace (1c)

Pro vlastní stanovení se používá 45ul zamrazeného roztoku dihydrorhodaminu 123 (DHR123), ke kterému se přidá 455ul roztoku PBS.

Z tohoto zásobního pracovního roztoku se dává do 1 zkumavky 30ul.

Kolik DHR 123 je v jedné zkumavce?

Koncentrace (1c) - výsledek

Pro vlastní stanovení se používá 45ul zamrazeného roztoku dihydrorhodaminu 123 (DHR123), ke kterému se přidá 455ul roztoku PBS.

Z tohoto zásobního pracovního roztoku se dává do 1 zkumavky 30ul.

Kolik DHR 123 je v jedné zkumavce?

V jedné zkumavce je 2,7ug DHR123.

Čas (1d)

Na jeden Burst test pro jednoho pacienta je zapotřebí 4 zkumavky

45ug DHR123 se naředí na 500ul

Do každé zkumavky se přidává 30ul naředěného DHR

Za rok se testem na Burst test vyšetří průměrně 160 pacientů.

Na jak dlouho vydrží zásoba DHR123 v mrazáku – 222 zkumavek?

Čas (1d) - výsledek

10mg = 10 000ug

Koncentraci 1000ug/ml získáme přidavkem 10ml DMSO.

10ml = 10 000ul/45ul=222,22

1000ul.....1000ug DHR 123

45ul.....45ug DHR123 a ty dáme do 500ul

ve 30ul pak je $30 \times 45 / 500 = 2,7$ ugDHR v jedné zkumavce

Jeden pacient $4 \times 30 \text{ul} = 120 \text{ul}$

Zásobní roztok $500 \text{ul} / 120 = 4,1$

160 pacientů za rok: $160 / 4 = 40$ – na rok budu potřebovat 40 zkumavek

Mám zásobu 222 zkumavek /40zkumavek potřebuji na rok tj. zásobu mám na **5,7 roku**

Příprava buněčné suspenze pro proliferaci (2a)

Pro test proliferace lymfocytů bylo zapotřebí izolovat PBMC z plné krve

Při izolaci bylo získáno 10×10^6 PBMC, přičemž bylo živých 95% izolovaných buněk. Buněčná suspenze byla v 1ml média (= zásobní koncentrace, pro test počítáme pouze se živými buňkami)

Počet jamek: buňky budou stimulovány 5 různými stimulacii, dále bude zapotřebí ještě nestimulovaná kontrola. Pro každou stimulaci se použijí tři jamky, tj bude se pracovat v tripletech + 2 jamky jako rezerva

Na jednu jamku připadne 200 000 buněk a ty budou ve 200ul média (= pracovní koncentrace - 1 milion/ml).

Cíl: Naředíte si buňky kultivačním médiem ze zásobní koncentrace tak, abychom jich měli dostatek pro všechny jamky v patřičném objemu 200ul/jamka.

Poznámka – médium je velice drahé a je třeba s ním šetřit!

Příprava buněčné suspenze pro proliferaci (2a) - výsledek

100%..... $10,0 \times 10^6$

95%.....= $10,0 \times 10^6 \times 95/100 = 9,5 \times 10^6$

5 stim + 1 nestim, na každou 3 jamky = $6 \times 3 = 18$ + 2 jamky navíc - budu potřebovat 20 jamek po 200 000bb., tj $20 \times 200\ 000 = 4\ 000\ 000$ bb = 4×10^6 .

$9,5 \times 10^6$ 1000ul

4×10^6 = $4 \times 1000 / 9,5 = 421$ ul

Ideální je připravit si roztok o koncentraci 1mil/ml

Tj k 421ul přidáme 3579 ul roztoku média, poté pipetujeme 200ul/jamka

Příprava roztoku anti-CD28 (3a)

Anti-CD28 protilátka se používá jako ko-stimulační protilátka při testech aktivace T-lymfocytů

Pro stanovení aktivace T-lymfocytů budeme stimulovat vzorky od 10 pacientů a 10 kontrol a pro každou osobu budeme potřebovat 2 jamky po 200 000 buňkách ve 200ul média (= 1milion/ml)

Jedna jamka již obsahuje 195ul média s buňkami a do konečného objemu 200ul potřebujeme **doplnit 5ul naředěné anti-CD28 protilátky**

Zásobní roztok anti-CD28 má koncentraci 1mg/ml

Jak budete postupovat při přípravě pracovního roztoku, když konečná koncentrace anti-CD28 v jamce po přidání k buňkám musí dosáhnout 2ug/ml?

Příprava roztoku anti-CD28 (3a)- řešení

10 pac + 10 kontrol=20, každý 2 jamky, tj celkem 40jamek, v každé bude finální objem 200ul

Koncentrace anti-CD28: 1mg/ml, tj.

1000ug/1000ul

Požadovaná koncentrace je 2ug/ 1000ul, tj do 200ul v jamce potřebuji 0,4ug anti-CD28

Příprava zásobního roztoku: $40\text{jamek} \times 0,4 = 16\text{ug}$ zásobního roztoku anti-CD28 (zás.koncentrace 1mg/ml \rightarrow 16ug = 16ul anti-CD28)

Potřebuji celkem 40 jamek po 5ul anti-CD28 každá. Pracovní roztok si tedy připravím: 16ul zásobního roztoku anti-CD28 + 184ul média = 200ul (vystačí na pipetování 40 jamek po 5ul)

Titrace vzorku pro nepřímou imunofluorescenci (5a)

Základní ředění vzorku na vyšetření ANA NIF je 1:80 (nejednoznačné vyjádření... může znamenat 1+79 nebo **1+80**). Pokud jsou ANA při tomto ředění pozitivní, ordinuje odečítající většinou titraci (ředění) vzorku.

Popište, jakým způsobem byste postupovali, (jaké objemy séra a ředícího pufru byste použili), kdybyste měli naředit vzorek séra v řadě:

1:80, 1:160 a 1:320

1:320, 1:640 s 1:1280

Minimální objem séra který se bude pipetovat je **10ul** (= 1 díl)

Spotřeba vzorku každé koncentrace na analýzu je 50 ul (počítejte s tím, aby byl v každé zkumavce rezervní objem 50ul navíc).

Titrace vzorku pro nepřímou imunofluorescenci (5a) - řešení

Ředění 1:80: 10ul séra a 800ul ředícího pufru (PBS)

Ředění 1:160 z ředění 1:80 vzít 100ul, přidat 100ul PBS

Ředění 1:320 z ředění 1:160 vzít 100ul, přidat 100ul PBS

Ředění 1:320 přímo ze séra: 5ul séra +1600ul PBS (nebo 10ul séra + 3200ul PBS – důležité je dodržet poměr)

Následné ředění 1:640: z ředění 1:320 vzít 100ul, přidat 100ul PBS

Následné ředění 1:1280: z ředění 1:640 vzít 100ul, přidat 100ul PBS

Výpočet absolutního počtu lymfocytů

Při vyšetření lymfocytárních subpopulací je kromě relativního počtu ještě zapotřebí určit absolutní počet lymfocytů a jejich subpopulací, tedy reálný počet buněk, který se nachází v 1l krve.

Příklad:

Počet leukocytů v krvi pacienta: 10×10^9 leukocytů/l

Z cytometrické analýzy vyplývá, že pacient má 20% lymfocytů, 10% monocytů. Kolik procent tvoří granulocyty? Jaký je absolutní počet všech lymfocytů?

Lymfocyty pacienta tvoří 60% T-lymfocytů, 30% B-lymfocytů a 10% NK buněk. ? Jaký je absolutní počet všech T-lymfocytů?

T-lymfocyty pacienta zahrnují 60% pomocných CD4+ T-lymfocytů a 40% cytotoxických CD8+ T-lymfocytů. Jaký je absolutní počet všech cytotoxických T-lymfocytů?

Výpočet absolutního počtu lymfocytů - řešení

10×10^9 leukocytů/l

Z cytometrické analýzy vyplývá, že pacient má 20% lymfocytů, 10% monocytů. Kolik procent tvoří granulocyty? $100 - (20 + 10) = 70$ Granulocyty tvoří 70% ze všech leukocytů.

Jaký je absolutní počet všech lymfocytů?

100%..... 10×10^9 /l

20%..... 2×10^9 /l Absolutní počet všech lymfocytů je 2×10^9 /l.

Lymfocyty pacienta tvoří 60% T-lymfocytů, 30% B-lymfocytů a 10% NK buněk. ? Jaký je absolutní počet všech T-lymfocytů?

100%..... 2×10^9 /l

60%..... $1,2 \times 10^9$ /l Absolutní počet všech T-lymfocytů je $1,2 \times 10^9$ /l.

T-lymfocyty pacienta zahrnují 60% pomocných CD4+ T-lymfocytů a 40% cytotoxických CD8+ T-lymfocytů. Jaký je absolutní počet všech cytotoxických T-lymfocytů?

100%..... $1,2 \times 10^9$ /l

40%..... $4,8 \times 10^8$ /l Absolutní počet všech lymfocytů je $4,8 \times 10^8$ /l.

Ředění kalibrátoru pro tvorbu kalibrační křivky v testu ELISA (4a)

Set na stanovení IL-8 obsahuje 60ul základního standardu o koncentraci 20ng/ml. Kalibrátor je určen pro **dvě desky** (=pro 2 použití v různých časech!)

Popište přípravu celkem 7 kalibrátorů získaných dvojkovým ředěním, aby zásobní standard vyšel na dvakrát.

Spotřeba každého kalibrátoru do reakce bude 200 μ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, jamky jsou v dubletech) počítejte tak, abyste měli v každé zkumavce minimálně 200ul + 50 μ l rezervní objem)

Jak provedete první ředění daného kalibrátoru abyste získali koncentraci 1000pg/ml?

Jak budete ředit dále?

Jakou koncentraci bude mít každý ze 7 připravených kalibrátorů?

Ředění kalibrátoru pro tvorbu kalibrační křivky v testu ELISA (4c)

Set na stanovení IL-8 obsahuje 60ul základního standardu o koncentraci 20ng/ml. Kalibrátor je určen pro dvě desky

Popište přípravu kalibrátorů dvojkovým ředěním (geometrická řada), spotřeba každého kalibrátoru do reakce bude 200 μ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, j amky jsou v dubletech) počítejte tak, abyste měli v každé zkumavce minimálně 200 +50 μ l rezervní objem)

Jak provedete první ředění daného kalibrátoru abyste získali koncentraci 1000pg/ml? **Ze základního roztoku budeme pipetovat 25ul a dáme je do 475ul ředícího roztoku: Ve 25ul je 500pg (v 1000ul je 20 pg), tj pokud máme 500ug v 500ul, pak je koncentrace tohoto roztoku 1000pg/1000ul, tj. 1000pg/ml.**

