

**VÝPOČTY**

# Burst test výpočty

- 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

- 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

- Zásobní roztok připravíme přidáním 10ml DMSO
- Zásobní roztok je třeba rozplnit po 45 ul a zamrazit na  $-80^{\circ}\text{C}$
- Kolik zamrazovacích zkumavek si musí laborant(ka) připravit a popsat?

# Počet ependorfek

- Zásobní roztok připravíme přidáním 10ml DMSO
- Zásobní roztok je třeba rozplnit do po 45 ul a zamrazit na  $-80^{\circ}\text{C}$
- Kolik zamrazovacích zkumavek si musí laborant(ka) připravit a popsat?
- **Laborant(ka) si musí připravit 222 zamrazovacích zkumavek**

# Koncentrace

- 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

- 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

- 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 222 alikvotů DHR123?



# Čas

- 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 222 alikvotů DHR123?
- **Zásoba alikvotů DHR123 vydrží na 5,78 roku.**

# Výpočty

- $10\text{mg} = 10\,000\mu\text{g}$
- Koncentraci  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  získáme přidavkem  $10\text{ml}$  DMSO.
- $10\text{ml} = 10\,000\mu\text{l}/45\mu\text{l} = 222,22$
- $1000\mu\text{l} \dots 1000\mu\text{g}$  DHR 123
- $45\mu\text{l} \dots 45\mu\text{g}$  DHR123 a ty dáme do  $500\mu\text{l}$
- ve  $30\mu\text{l}$  pak je  $30 \times 45 / 500 = 2,7\mu\text{g}$  DHR v jedné zkumavce
- Jeden pacient  $4 \times 30\mu\text{l} = 120\mu\text{l}$
- Zásobní roztok  $500\mu\text{l} / 120 = 4,1$
- 160 pacientů za rok:  $160 / 4 = 40$  – na rok budu potřebovat 40 zkumavek
- Mám zásobu 222 alikvotů DHR123 / 40 zkumavek potřebuji na rok tj. zásobu mám na 5,7 roku

# Příprava buněčné suspenze pro proliferaci

- Pro test proliferace lymfocytů bylo zapotřebí izolovat PBMC z plné krve
- Při izolaci bylo získáno  $10 \times 10^6$  PBMC, přičemž bylo živých 95% izolovaných buněk. Buněčná suspenze byla v 1ml média.
- Buňky budou stimulovány 5 různými stimulancii, 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.
- Z buněčné suspenze připravte potřebné množství pracovního roztoku s buňkami, tak aby jeho koncentrace byla 1milion na ml.
- Poznámka – médium je velice drahé a je třeba s ním šetřit!

# Výpočty

- 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  $20 \times 200\ 000 = 4\ 000\ 000\text{bb} = 4 \times 10^6$  .
- $9,5 \times 10^6$  .....1000ul
- $4 \times 10^6$  .....= $4 \times 1000 / 9,5 = 421\text{ul}$
- 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

- Anti-CD28 se používá jako kostimulační protilátka při stimulacích T-lymfocytů
- Pro stanovení produkce IFN- $\gamma$ , budeme stimulovat 10 pacientů a 10 kontrol, pro každou osobu budeme potřebovat 2 jamky po 200 000 buňkách ve 200ul média
- Pro stimulaci použijte koncentraci 2ug/ml
- Zásobní roztok má koncentraci 1mg/ml
- Jak budete postupovat při přípravě pracovního roztoku? (jamka obsahuje 195ul média s buňkami, do 200ul **doplníme 5ul přidaného stimulantia**)

# Výpočty

- 10 pac + 10 kontrol=20, každý 2 jamky, tj celkem 40jamek, v každé je 200ul
- Koncentrace anti-CD28: 1mg/ml, tj.
- 1000ug/1000ul
- Požadovaná koncentrace je 2ug/ 1000ul, tj do 200ul potřebuji 0,4ug
- Příprava zásobního roztoku:  $40\text{jamek} * 0,4 = 16\text{ul}$  zásobního roztoku anti-CD28
- Ideální je pipetovat např. 5ul na jamku, tj. potřebuji celkem  $5 * 40\text{jamek} = 200\text{ul}$  Pracovní roztok si tedy připravím: 16ul zásobního roztoku anti-CD28 + 184ul média = 200ul

# Ředění kalibrátoru pro tvorbu kalibrační křivky v testu ELISA

- Set na stanovení IL-8 obsahuje 60ul základního standardu o koncentraci 20ng/ml. Kalibrátor je určen pro dvě desky
- Popište přípravu celkem 7 kalibrátorů získaných dvojkovým ředěním (geometrická řada), spotřeba každého kalibrátoru do reakce bude 200  $\mu$ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, jamky jsou v dubletech) počítejte tak, abyste měli v každé zkumavce minimálně 200ul + 50  $\mu$ 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?

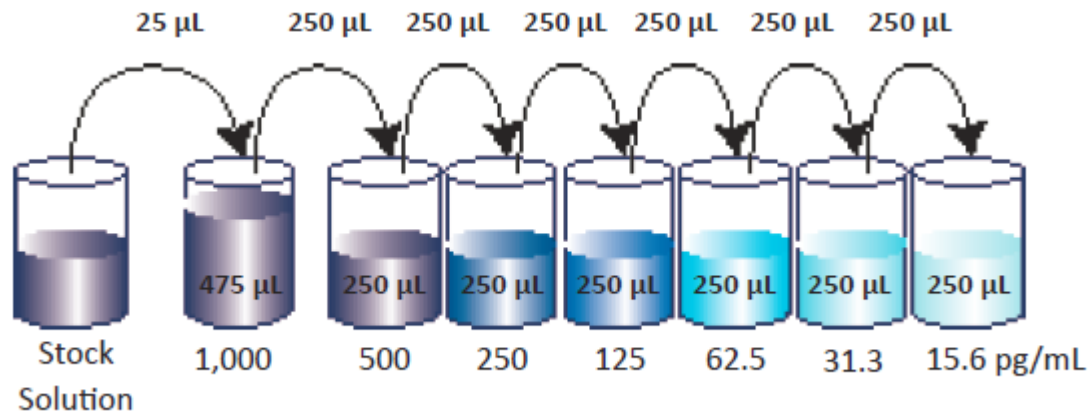
# Ředění kalibrátoru pro tvorbu kalibrační křivky v testu ELISA

- 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  $\mu$ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, j amky jsou v dubletech) počítejte tak, abyste měli v každé zkumavce minimálně 200 +50  $\mu$ l rezervní objem)
  - 1) Jak provedete první ředění daného kalibrátoru abyste získali koncentraci 1000pg/ml?
  - 2) Jak budete ředit dále?
- **Ze základního roztoku budeme pipetovat 25ul a dáme je do 475ul ředícího roztoku: Ve 25ul je 500pg (v 1000ul je 20 ng), tj pokud máme 500ug v 500ul, pak je koncentrace tohoto roztoku 1000pg/1000ul, tj. 1000pg/ml.**



# Ředění kalibrátoru pro tvorbu kalibrační křivky v testu ELISA

- 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  $\mu$ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, j amky jsou v dubletech) počítejte tak, abyste měli v každé zkumavce minimálně 200 +50  $\mu$ 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.**
- Jak budete ředit dále?



# Titrace vzorku pro nepřímou imunofluorescenci

- 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**
  - 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

- 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:  $10 \times 10^9$  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?

# Výpočty

- $10 \times 10^9$  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%.....  $10 \times 10^9$  /l**
- **20%.....  $2 \times 10^9$  /l Absolutní počet všech lymfocytů je  $2 \times 10^9$  /l.**
  
- Lymfocyty pacienta tvoří 60% T-lymfocytů, 30% B-lymfocytů a 10% NK buněk. ? Jaký je absolutní počet všech T-lymfocytů?
- **100%.....  $2 \times 10^9$  /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.**