

VÝPOČTY

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 (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?
- **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 ependorfek (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?
- **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)

- 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)

- 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?
- **Zásoba zkumavek vydrží na 5,78 roku.**

Výpočty (1d)

- $10\text{mg} = 10\,000\text{ug}$
- Koncentraci 1000ug/ml získáme přidavkem 10ml DMSO .
- $10\text{ml} = 10\,000\text{ul}/45\text{ul}=222,22$
- $1000\text{ul}\dots\dots 1000\text{ug DHR 123}$
- $45\text{ul}\dots\dots\dots 45\text{ug DHR123}$ a ty dáme do 500ul
- ve 30ul pak je $30 \times 45 / 500 = 2,7\text{ugDHR}$ 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.
- 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 (2b)

- $100\% \dots\dots\dots 10,0 \times 10^6$
- $95\% \dots\dots\dots = 10,0 \times 10^6 \times 95/100 = 9,5 \times 10^6$
- 5 stim + 1 nestim, na každou 3 jamky = $6 \times 3 = 18 + 2$ jamky navíc - budu potřebovat 20 jamek po 200 000bb., tj $20 \times 200\ 000 = 4\ 000\ 000\text{bb} = 4 \times 10^6$.
- $9,5 \times 10^6 \dots\dots\dots 1000\text{ul}$
- $4 \times 10^6 \dots\dots\dots = 4 \times 1000 / 9,5 = 421\text{ul}$
- 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 (3a)

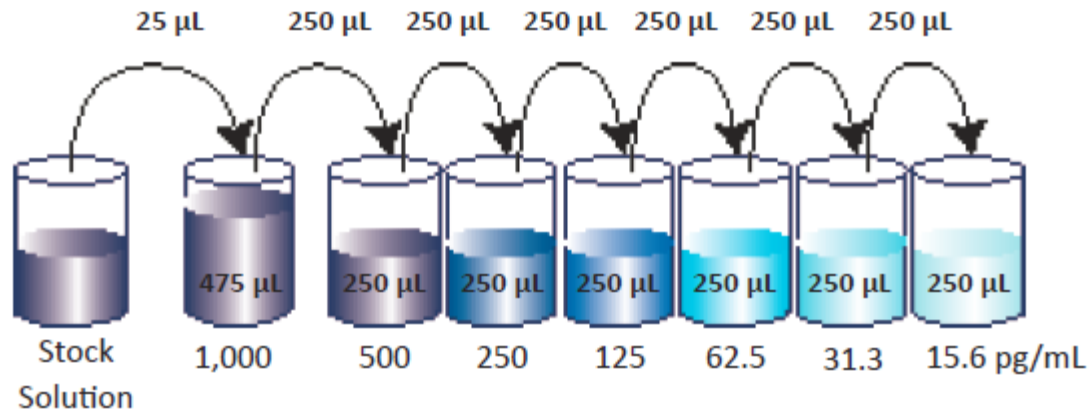
- Anti-CD28 se používá jako kostimulační protilátka při stimulacích T-lymfocytů
- Pro stanovení produkce IFN- γ , budeme stimulovat 10 pacientů a 10 kontrol, pro každou osobu budeme potřebovat 2 jamky po 200 000 buňkách ve 200ul média
- Pro stimulaci použijte koncentraci 2ug/ml
- Zásobní roztok má koncentraci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

Výpočty (3a)

- 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: 40jamek*0,4 = 16ul zásobního roztoku anti-CD28
- Ideální je pipetovat např. 5ul na jamku, tj. potřebuji celkem 5x 40jamek= 200ul Pracovní roztok si tedy připravím: 16ul zásobního roztoku anti-CD28 + 184ul média = 200ul

Ředění – kalibrační řady

- Dvojková/geometrická řada



- Ředění 1:1
 - Neředěný vzorek
 - Nebo 1 + 1 ?

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

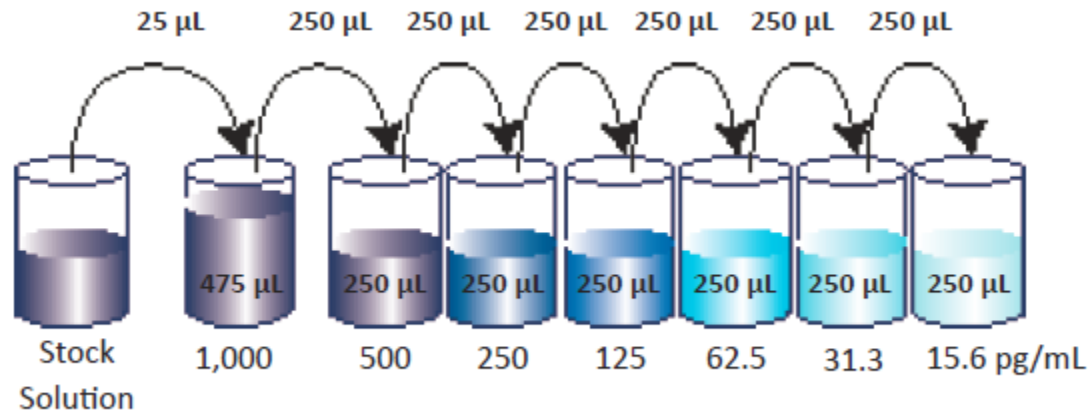
- Set na stanovení IL-8 obsahuje 60ul základního standardu o koncentraci 20ng/ml. Kalibrátor je určen pro dvě desky
- Popište přípravu celkem 7 kalibrátorů získaných dvojkovým ředěním (geometrická řada), spotřeba každého kalibrátoru do reakce bude 200 μ l - pipetuje se 100ul kalibrátoru na jamku, jamky 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 (4b)

- 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.**

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.**
- Jak budete ředit dále?



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**
 - 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 (5b)

- 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

Leukocytární subpopulace

- LEUKOCYTY
 - Granulocyty
 - Monocyty
 - Lymfocyty
 - B lymfocyty (CD19+)
 - NK buňky (CD16+CD56+)
 - NKT buňky (CD3+CD16+CD56+)
 - T lymfocyty (CD3+)
 - » CD4 T lymfocyty (CD3+CD4+)
 - » CD8 T lymfocyty (CD3+CD8+)

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?

Výpočty

- 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.**