Rag KO nebo ne,

* WY gen
* Buňky které mají dvě alfy, v knock-outu lze vyloučit
* Vnáší šum a nejistotu
* Nevíme, zda budou mít třeba obě mhc, např některé OT-I teoreticky má reakci i na mhc II

Monoklonální myši, flip flop mice

Průnik dat – klonotyp, co může být v cd8 a cd4, mají stejný receptor

Vb5 – OT-I TCR beta, víc cd8 než cd4, v čase ty cd4 klesají, bias

Nepárové sekvenování, bulk

Sekvenční data ke crispr/cas9 upravený receptor, co už je vyselektovaný, fixovaný jeden receptor, druhý změnili

Experiment

* Sort cd4 a cd8 z periferie a thymus (vyhraněnost v thymu bude menší?)
* Bulk seq na alfy
* Čím víc v buňkách se bude ta sekvence opakovat, tím víc to znamená buněk, cDNA, lze se pak podívat na klonotyp (pokud jsou klonované jinak v DNA, ale ak mají stejný a chování mají stejný, tak víme, že to jsou dvě separátní buňky)
* Zjistit si, kdo je má na starosti
* Některé sekvence hodně zakorvenzované, ne všechny alfy budou párovat s betou
* Dělat knihovnu každé myši separé nebo zpoolovat – nejde nám o specifické myši, ale chtěli bychom určit
* Kity pro alfa a beta seq bulk
* Z 10 mil buněk je 1 mikrogram RNA
* Zda sekvenovat i betu, která je k ničemu – custom primery na alfu a na tu betu ne
* Nabarvit orgány na cd4 a cd8 a pak to vysortovat, pak stočí a vizualizuje RNA, trizol (fenolová báze, pro lýzu, přidá se chloroform), stočí a supernatant RNA, dá se to na kolonky, dá se zamrazit
* Příprava knihoven – dělala jen Verča
* Pracovat v PCR boxu