Cíl: Zjistit, zda sekvence v alfách daných T cells jsou jak v CD4, tak CD8, sledujeme překryv v

Normalizovat input z hlediska toho kolik se tam buněk dá

Bulk seq z thymu a lymph nodes, sortujeme single CD4 a CD8

Z toho RNA – trizol a pak microkit

12 kitů na 12 reakcí, 3 myši, vysortuje, udělá se RNA, zchecknout rained index ve facility – měl by být větší než 8, mělo by to dát přesnější koncentraci než nanodrop

Vysortovat buňky a dát je do Trizolu a do mrazáku (cca 5 hodin)

Jiný den vyizolovat RNA (cca 2 hodiny)

Jiný den dát na RNA agilent

Knihovny – hlavně pracovat čistě (asi jeden den)

Zda ty knihovny mají správnou velikost

PCR amplifikace

Flow box u Aurory, uklidit a mít rukavice

Překryvy vidět v sekvencích

Z thymu single positive max milion

Purifikace nečím – facility bude mít

Miluška z bioinf labu

Kity na sekvenování – knihovna na TCRalfa, zkontrolovat, jaké máme, zeptat se Verči, kde je kit, jak vypadá protokol, na kolik je tam reakcí, na čem se to sekvenuje – zda to bude na MySeq, kolik RNA je ten vstup

Zkušební sort a Aurora příští týden – chceme říct, zda budeme brát milion nebo půl milionu, bereme jen lymph nodes (jak periferie, tak mesenterické)

U thymu nás zajímají maturované single positivní buňky

Panely na barvení

Thymus:

* TCRb+ – pomůže nám získat maturované buňky, nemusíme dávat dump channel
* CD4+/-
* CD8a+/-
* Via-
* CD24- dump, marker nezralých buněk

Lymph nodes:

* TCRb+
* CD4-/+
* CD8-/+
* Via-
* CD44low vezmeme ty, co jsou low, vypadá to jako mikrofon
* B220-CD19-

Na legit sort pak týden 18.-22.

1 mikrogram na 10 milionů buněk

Enrichment v thymu positivní teoreticky, musel by se dělat na kuličkách, negativní enrichment na CD24

Gating

Via-> B220-CD19-TCRb+