



Ahoj mladý cytometriku! Cytometr je sice záludná mašinka, ale při troše odvahy a štěstí se dá ovládat.... Takže jak na to?



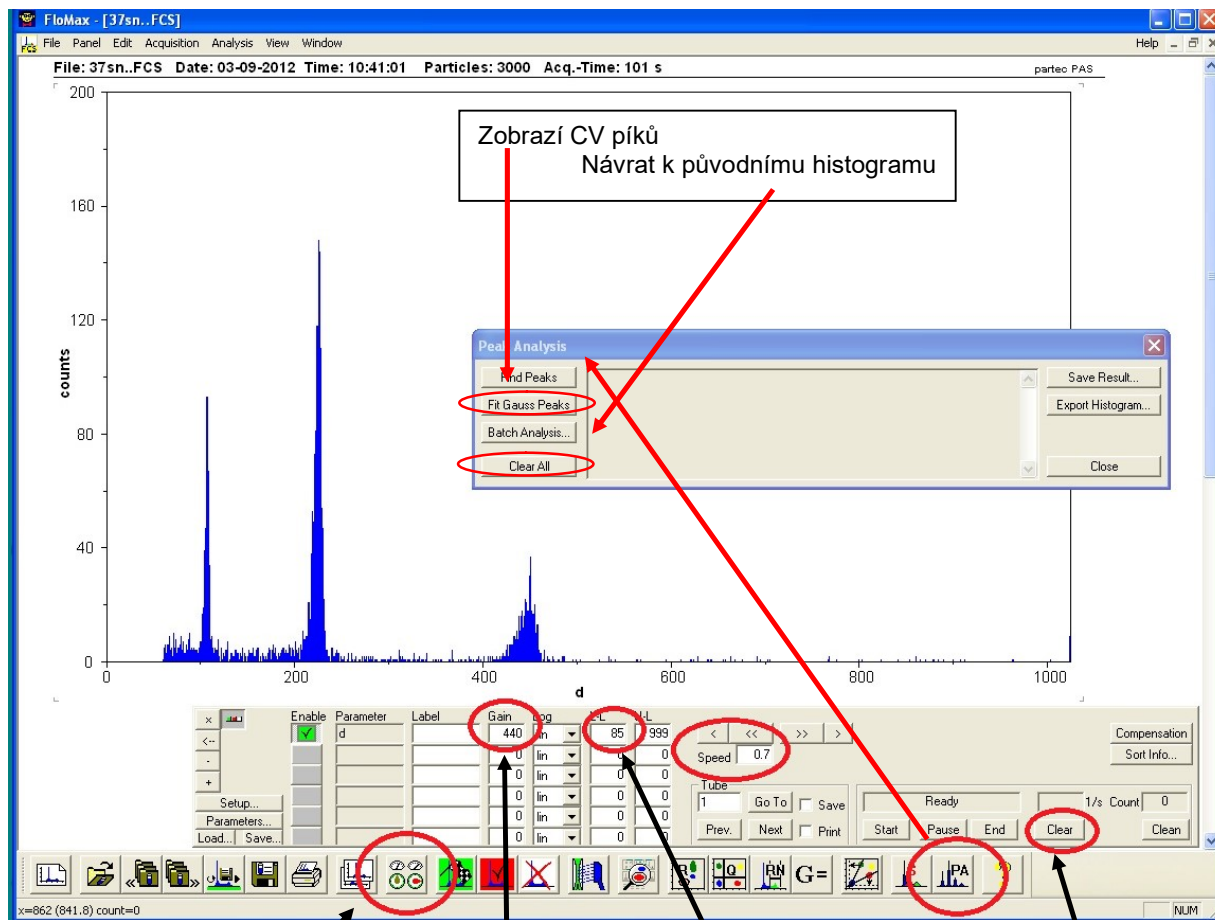
Co dělat, když přijdeš do laborcky:

1. Z mrazáku si vyndej buď **Propidium Jodid - PI** (ependorfka s červeným obsahem) a **RNázu** (ependorfka s čirým obsahem) nebo **DAPI** (ependorfka se žlutavým obsahem, s nápisem D) a nech je rozmrazat. **DAPI** se používá u velké bílé krabice (CyFlow ML) a **PI s RNázou** u malé zelené (CyFlow).
2. Nasekej si samotný standard a pár vzorků (pufr **OTTO I.** je v lednici).
3. Připrav si roztok s barvičkou v digestoři (přesné poměry i při nižším množství vzorků, tedy i při menším objemu barvičky jsou v digestoři napsané). Digestoř zapni vpravo nahoře na okraji tlačítkem OK + vypínačem pod sklem ve spodní části zapneš odtah.
 - 25 ml OTTO II (v digestoři)
 - 1ml PI (k PI se ještě přidává 1ml RNázy) / 1ml DAPI (bez RNázy)
 - 50 µl Mercaptoethanolu*Nyní pozor, pracuješ s dráždivými (PI, DAPI) a jedovatými (Mercaptoethanol) látkami, raději použij ochranné rukavice (v polici nad stolem, kde se sekají vzorky).*
4. **ZKONTROLUJ** si dostatek destilované vody v zásobní lahvi (dolej přes trychtýř s filtrem) a raději vyprázdní WASTE odpadní kanystr na zemi pod stolem, aby nepřetekl.
5. Pusť příslušný **PC a cytometr** (ML - 2 kolébky na boku a CyFlow kolébka na adaptéru vzadu, čtvercový čudlík nalevo vzadu a černý adaptér laseru vedle cytometru).
6. Až potom spusť program **Partec FloMax** (ikonka s obličejem ). V okně **FloMaxu** spusť "**budíky**" (instrument settings; ). Nyní je cytometr plně funkční.
7. Promyj cytometr 1 zkumavkou (kyvetou) destilované vody při rychlosti 10.
8. Do nasekaného standardu přidej 1 ml barvičky a nechej aspoň 30 sekund odstát.
9. **Speed - rychlost** by měla být tak vysoká, aby cytometr běžel asi 15-25 jader za sekundu (obvyčně mezi 0,1 a 2). Obarvený vzorek vstrč do cytometru (nutno silou až po **dockvantí**). Gain nastav tak, aby byl standard na nějaké jednoznačné pozici (ideálně kanál 200 -). Jestli má pík standardu CV pod 2 % (to zjistíš, když klikneš na Peak Analysis a Fit Gauss Peaks; viz obr.), tak můžeš začít měřit.
10. Když přístroj zanalyzuje 5000(PI)/3000(DAPI) jader vzorku, tak se sám zastaví. Ulož analýzu a vyjmi vzorek (přístroj se hned na to automaticky promyje) a pak vstrč nový obarvený vzorek. Někdy na čidle pro promývání ulpí **kapka** a cytometr se sám nepromyje, pak je nutné na sample port (prostor pro zkumavku) fouknout (nejlépe stlačeným **vzduchem** ve spreji - na cytometru).
11. Během analýz dávej pozor, jestli ti v zásobní lahvi **NEDOCHÁZÍ DESTILOVANÁ VODA!** Po případné výměně (zásobní voda je v kanystru na zemi, dotáhni pořádné víčko u skleněné **Sheath lahve**) projed přístroj jednou zkumavkou destilované vody rychlostí 10 a **VYLEJ ODPANÍ TEKUTINU DO UMYVADLA** blíže ke dveřím A **POŘÁDNĚ SPLÁCHNI** (u DAPI).

12. Někdy se místo "**run**" (v políčku nad start/pause/stop) během analýzy objeví "**count**". Potom přístroj nereaguje na běžné povely (změny rychlosti, gainu, oříznutí apod.) a chceš-li nastavení změnit, tak klikni na tlačítko start a objeví se zpět "run".
13. Průběžně sleduj, zda ti **nedochází barva**. Když ano, dej si včas rozmrazat zásobní ependorfky z mrazáku.
14. Před vypnutím přístroje jej **promyj plnou zkumavkou destilované** vody rychlostí 10. **Prázdnou zkumavku nech v přístroji**. V případě, že odcházíš např. na oběd, tak cytometr nech puštěný. Vypni jen laser nebo led diodu a dej přístroj promýt zkumavkou d. vody.
15. Nejdříve vypni FlowMax (neukládej změny) a pak vypni cytometr a PC.
16. Při práci udržuj čistotu a uklízej po sobě. Na závěr ořezej a doplň špičky a umyj Petriho misky. Svě vzorky nenechávej dlouhodobě v lednici (může dojít k vyhození).
17. Ani na jednom z počítačů, na kterém je připojen cytometr, si neprohližej uložené analýzy.

V PŘÍPADĚ PROBLÉMŮ TELEFONUJ NA MOBIL (NA VYŽÁDÁNÍ).

Pro destilovanou vodu se chodí s kanystry a trychtýřem s filtrem k Lence Flaškové do DNA laborky.



Gain - s hodnotou se mění pozice píku na ose x

Tato hodnota ořezává histogram od nuly do zadané hodnoty (obvykle mezi 40 - 80)

Povel **clear** smaže všechny dosud detekované částice a měření začíná od začátku. Nad tlačítkem **clean** se také zobrazuje počet detekovaných částic za sekundu.