Měření přesných objemů v biologii

Při přípravě roztoků, reagenčních směsí apod. musíme v biologii zvládnout techniku správného odměřování kapalin.

Odměrné sklo pro tento účel tvoří především skleněné pipety, odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, případně různé typy baněk. Při titracích se k odměřování objemů používají byrety.

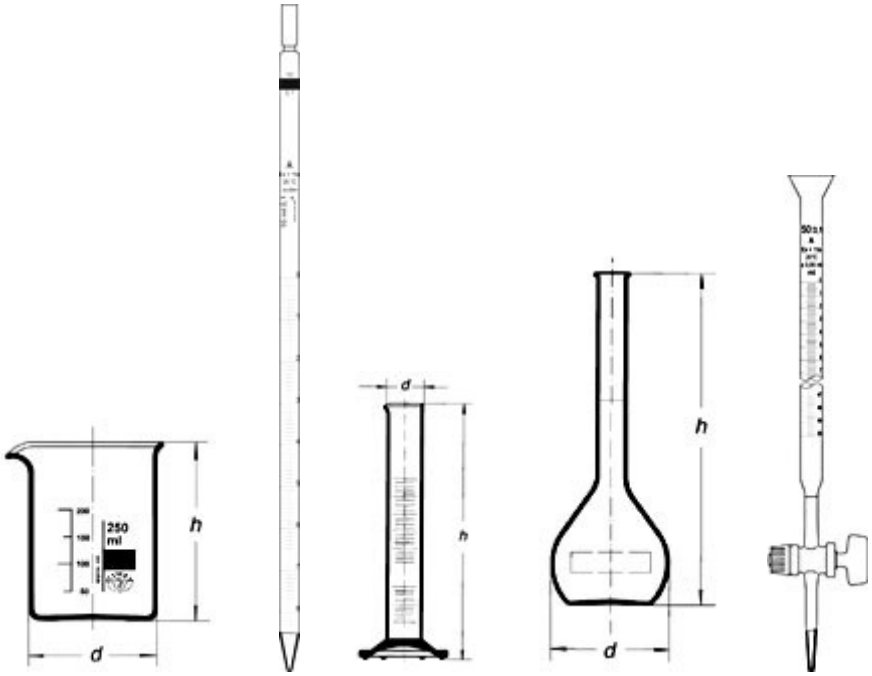
Pro přípravu přesných roztoků nesmíme nikdy odměřovat objemy v kádince ani v odměrném válci! Stupnice na kádince slouží pouze k odhadu pracovních objemů, odměrné válce slouží pouze k dávkování kapalin, kde není striktní požadavek na přesnost.

Správný postup při přípravě roztoku pevné látky v kapalině je následující:

použije se odměrná baňka pro příslušný objem. Navážka sypké rozpustné látky se vpraví do odměrné baňky: buď se nasype přímo z lodičky, nebo se spláchne rozpouštědlen za pomocí střičky a nálevky, nebo se rozpustí v pomocné kádince v malém množství rozpouštědla a vlije do odměrné baňky. Následně se odměrná baňka doplní rozpouštědlem po rysku.

Postup, kdy se k navážce přilije daný objem odměřený ve válci nebo kádince nelze pro přípravu přesných roztoků v žádném případě použít!

Příklady odměrného skla:



Kádinka Skleněná pipeta Odměrný válec Odměrná baňka Byreta

Mikrozkumavka typu Eppendorf (hovorově tzv. ependorfka nebo epina).
Tyto plastové zkumavky v objemech 0,5ml, 1,5 ml a 2 ml s víčkem se v biologii velmi často používají pro uchovávání malých objemů vzorků mražením nebo při pokojové teplotě a také pro reakce v malých objemech.

Automatické pipety:
V biologii se velmi často požívají tzv. automatické pipety a vyměnitelnými jednorázovými plastovými špičkami. Existují typy s fixním nebo nastavitelným objemem, dále kromě jednoduchých také tzv. multikanálové pipety pro 8 nebo 12 špiček. Tyto multikanálové pipety slouží pro urychlení pipetování na tzv. mikrotitrační desky, které mají 8 řad po 12 jamkách, přičemž jamka má objem 300 mikrolitrů. Tyto mikrotitrační desky jsou v biologii široce využívány pro různá stanovení, neboť poskytují velmi mnoho možností jak uspořádat vzorky, a tedy i celý design pokusu.
Postup práce s automatickými pipetami je následující:

Automatická pipeta slouží k manipulaci s řádově mikrolitrovými objemy zpravidla zředěných roztoků (hustota přibližně okolo hustoty vody). Vzdáleně připomíná injekční stříkačku upravenou k manipulaci s velmi malými objemy. Použití těchto pipet je možné jen s tzv. jednorázovými špičkami, které slouží ke kontaktu s roztokem. ***Samotná pipeta by se NIKDY neměla dostat do přímého kontaktu s pracovním roztokem***. Automatické pipety jsou kalibrované na vylití, což znamená, že v pipetě může zůstat minimální objem kapaliny. Nesnažte se jej za každou cenu z pipety dostat, hovoří se o tzv. mrtvém objemu.

V praxi se běžně používají automatické pipety s rozsahem od 0,1 µl po 5 000 µl, přičemž obsahově různé pipety se označují různými barvami:

- 0,1 – 10 µl se označují bílým pruhem
- 5 – 200 µl žlutým pruhem
- 100 – 1000 µl modrým pruhem

Toto barevné označení usnadňuje také výběr špiček (jsou dostupné ve více objemech) a většina špiček odpovídá svou barvou barevnému označení pipety. Při práci si musíme zvolit pipetu s adekvátním rozsahem a špičku, která odpovídá obsahu pipety a která je schopna pojmout maximální objem dané pipety.

Automatická pipeta se ovládá pomocí tlačítka pístu. Pro přesnou práci s automatickými pipetami je třeba dodržovat následující **zásady**:

- automatické pipety se používají jen pokud je nasazená adekvátní plastová špička
- je-li ve špičce nějaká kapalina držte pipetu svisle, nepokládejte ji na stůl (kapalina by mohla natéci dovnitř pipety a znehodnotila by ji)
- pohyb pístu musí být plynulý a pomalý, zvláště při práci s viskózními roztoky (s větší hustotou)

- při pipetování roztoků s vysokou viskozitou nebo povrchovým napětím nižším než má voda se na vnitřní stěně špičky vytvoří vrstva roztoku. Při vypouštění tekutiny ze špičky tato vrstva ulpívá na její vnitřní stěně a tak by mohla vzniknout chyba. Protože množství roztoku, který ulpí ve špičce, je při opakovaném pipetování víceméně konstantní, je možné této chybě zabránit tím, že se vrstva roztoku vytvoří ještě před vlastním pipetováním: do špičky se nasaje roztok a vypustí se zpět do původní nádoby. Poté začneme vlastní pipetování. Všechna následující pipetování pak budou mít stejnou přesnost a reprodukcibilitu
- pracovní roztoky je nutno vytemperovat na pokojovou teplotu. Při odměřování roztoků, jejichž teplota se liší od teploty místnosti, se před vlastním pipetováním doporučuje špičku opakovaně propláchnout roztokem (3-5x).
- špičku nasaďte na pipetu a dobře ji utěsněte mírným pootočením.
- špičku ponořte do přenášeného roztoku vždy jen na 2-3 mm a vyndávejte ji tažením po stěně zkumavky, aby neadherovala nadbytečná kapalina.
- roztok vypouštějte po stěně zkumavky, nejlépe několik milimetrů nad hladinou

Pozn. Smočení špičky pipetovanou kapalinou před vlastním pipetováním zvyšuje přesnost pipetování, ovšem většinou se vynechává kvůli úspoře času.

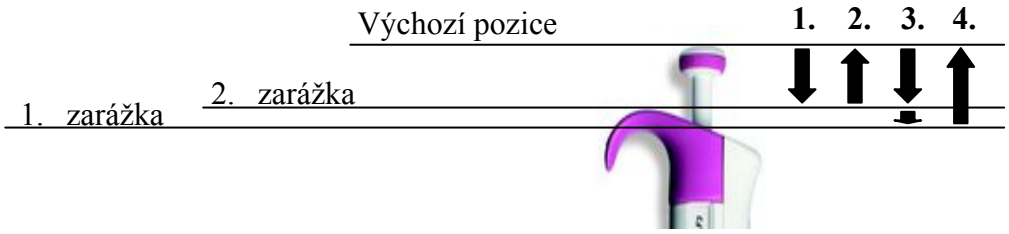
Postupy při pipetování

Výběr konkrétní pipetovací techniky závisí na typu práce a metody pro kterou ji vybíráme. Například pro viskózní a pěnící roztoky nebo při práci s velmi malými objemy se používá technika obráceného pipetování, neboť v těchto případech významně zvyšuje přesnost.

A) Přímá technika (forward pippeting)

Přímá technika je klasický a nejčastěji používaný způsob pipetování. Umožňuje rychlé a přesné odměřování zředěných roztoků.

1. Stlačte píst pipety k první zarážce.
2. Ponořte špičku těsně pod hladinu (2 – 3 mm) odměřovaného roztoku a POMALU uvolněte píst. Špička se naplní kapalinou. Počkejte asi jednu vteřinu a pak vytáhněte špičku z roztoku. Pod úhlem 10 – 45° přiložte špičku ke stěně zkumavky, do které chcete přenést měřený roztok. Jemně stlačte tlačítko pipety na první zarážku. Počkejte jednu vteřinu. Poté tlačte píst pipety na doraz, čímž dosáhnete úplného vyprázdnění špičky (*blow off*). Za stálého držení pístu vytáhněte špičku z roztoku.
3. Uvolněte tlačítko do výchozí polohy. Pokud je to nutné, vyměňte špičku a pokračujte v dalším pipetování.

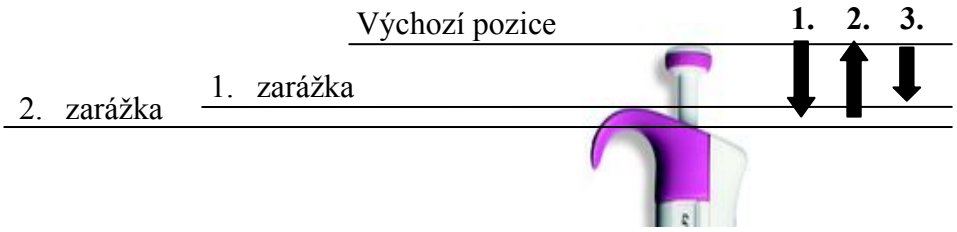


Znázornění postupu přímé techniky pipetování.

B) Obrácená technika (Reverse pippeting)

Tato technika je vhodná pro pipetování roztoků s vysokou viskozitou nebo roztoků, které snadno tvoří pěnu. Dále se tato technika doporučuje pro pipetování velmi malých objemů.

1. Stlačte píst až na druhý doraz.
2. Špičku ponořte těsně pod hladinu roztoku (2 – 3 mm) a pomalu uvolněte tlačítko. Špička se naplní tekutinou.
3. Pomalu stlačte píst na první doraz a tím vypusťte přesný objem roztoku ze špičky. Zbytek roztoku zůstává ve špičce, ten ale není součástí měřeného objemu, vyhodí se se špičkou, případně se vrátí zpět do původní nádoby.



Znázornění postupu obrácené techniky pipetování.

C) Opakovací technika (Repeat pippeting)

Jedná se o rychlý a jednoduchý způsob opakovaného odměřování stejného objemu téhož roztoku.

1. Stlačte píst až na druhý doraz.
2. Špičku ponořte těsně pod hladinu roztoku (2 – 3 mm) a pomalu uvolněte tlačítko. Špička se naplní tekutinou. Tuto tekutinu vypusťte a špičku naplňte znovu – tímto dojde ke smáčení stěn vnitřního povrchu špičky a všechny další pipetování budou mít stejnou chybu.
3. Pomalu stlačte píst na první doraz a tím vypusťte přesný objem roztoku ze špičky. Držte píst stále na prvním dorazu. Ve špičce zůstává zbytek roztoku, ten ale není součástí měřeného objemu.
4. Znovu ponořte špičku těsně pod hladinu původního roztoku a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí polohy. Špička se opět naplní roztokem.
5. Pokračujte v pipetování tak, že opakujete postup uvedený v bodech 3 a 4.

Znázornění postupu opakovací techniky pipetování.

D) Pipetování plné krve

Plná krev je velmi viskózní kapalina. Při jejím pipetování je lepší využít obrácenou techniku pipetování. Pipetujeme-li plnou krev nesmáčíme špičku před vlastním pipetováním a pro náběr krve používáme vždy čistou špičku. Při pipetování krve je nutné dbát opatrnosti a pipetovat pomalu, abychom se vyhnuli mechanické hemolýze.

Obrácenou technikou

1. Stlačte píst až na druhý doraz ponořte špičku pod hladinu roztoku a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice. Vyškejte 1 s než se hladina krve ve špičce ustálí.
2. Buničinou nebo tamponem otřete kapičky krve, které ulpěly na zevní stěně špičky; při tom se nesmíte dotknout ústí špičky.
3. Přiložte konec špičky na vnitřní stěnu zkumavky nad hladinu přítomné kapaliny, zmáčkněte tlačítko na první doraz, počkejte jednu vteřinu a uvolněte tlačítko do výchozí pozice.
4. Vyhoďte použitou špičku.

Přímou technikou

1. Stlačte píst na první doraz, ponořte špičku pod hladinu a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice.
2. Buničinou nebo tamponem otřete kapičky krve, které ulpěly na zevní stěně špičky; při tom se nesmíte dotknout ústí špičky.
3. Stejně jako při použití přímé techniky vypusťte krev do zkumavky s reakční směsí (přiložte konec špičky na vnitřní stěnu zkumavky, zmáčkněte tlačítko na první doraz, počkejte jednu vteřinu a pak zcela vyprázdněte špičku zmáčknutím tlačítka až na druhý doraz). Uvolněte tlačítko do výchozí pozice.
4. Nejméně třikrát propláchněte špičku reakční směsí: Stlačte tlačítko na první doraz a ponořte špičku do reakční směsi s přidanou krví. Držte tlačítko na prvním dorazu a zkontrolujte, zda je špička skutečně pod hladinou. Pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice. Špičku nechejte nadále ponořenou v reakční směsi s přidanou krví. Opět stlačte tlačítko na první doraz a pomalu je uvolněte. Tento postup opakujte dokud vnitřní stěna špičky není zcela čistá.
5. Nakonec zmáčkněte tlačítko až na druhý doraz a tím špičku úplně vyprázdněte.
6. Vyhoďte použitou špičku.

Nikdy:
Kapalina nesmí natéct do pipety, zničila by ji.
Se nesmí používat automatická pipeta bez špičky.
Se nesmí otáčet pipetu špičkou nahoru
Pokládat pipetu na stůl se špičkou a zbytkem kapaliny v ní.

Úklol č:

Podle pokynů vyučujícího si vyzkoušejte uvedené postupy při pipetování na jedné zvolené pipetě. Dále postupem přímého pipetování, který je používán nejčestěji, napipetujte určené objemy vody ze zásobní kádinky do mikrozkumavek typu Eppendorf.
Vyzkoušejte si nastavování objemů na různých typech pipet, neboť pipety jednotlivých značek (např. Biohit, Eppendorf, Finnpipette aj.) se mohou lišit mechanismem nastavování, způsobem odhazování špiček apod.

Při nácviku se snažte zapamatovat si aspoň přibližně, jakou část špičky zaujímá objem 1 ml v modré špičce, 200 mikrolitrů ve žluté špicče a 10 mikrolitrů. v nejmenší průhledné špičce. Toto povědomí vám pomůže vyhnout se řadě začátečnických chyb.