



TRANSFERY KAPALIN V PODMÍNKÁCH LABORATORNÍ PRAXE METODY A ŘEŠENÍ OBTÍŽÍ



2014

**TRANSFERY KAPALIN
V PODMÍNKÁCH LABORATORNÍ PRAXE**
Metody a řešení obtíží
AUTORSKÝ KOLEKTIV

Ing. Jana Heřmanská
RNDr. Milan Řezka
Ing. Markéta Jeřábková
Mgr. Jana Baránková Ph.D.
prof. Ing. René Kizek, Ph.D.
doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.
Mgr. Olga Kryštofová, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

ISBN 978-80-7375-961-2

**Konference byla podpořena
výzkumnými projekty**



CZ.1.07/2.3.00/20.0148

**MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE V OBLASTI
„IN VIVO“ ZOBRAZOVACÍCH TECHNIK**



Konferenci organizovali

eppendorf

Eppendorf Czech and Slovakia s.r.o.

Kolovratská 1476
251 01 Říčany u Prahy
Česká republika

Telefon: +420 323 605 454
Fax: +420 323 605 454
E-Mail: eppendorf@eppendorf.cz
Web: www.eppendorf.cz

Obsah

Program.....	6
Úvod.....	7
Základní principy pipetování.....	9
Víte co se uvolňuje z Vašich zkumavek a ovlivňuje Vaše měření?	
Všechn plastový spotřební materiál není vyroben stejně!.....	14
Zásady kalibrace, čištění a údržby pipet a dávkovačů.....	17
Flexibilní pipetovací automat.....	24

Program

TRANSFERY KAPALIN V PODMÍNKÁCH LABORATORNÍ PRAXE – Metody a řešení obtíží

8:00 – 8:30	Úvod , organizační záležitosti, seznámení s programem
8:30 – 9:15	Pipette clinics - přesnost ve své dokonalosti Základní principy pipetování-pipeta, špička pipety, druhy kapalin a jejich vlastnosti, vlivy prostředí (teplota a vlhkost vzduchu) lidský faktor
9:15 – 10:00	Faktory ovlivňující pipetování, pipety Pipety na principu vzduchového sloupce, reverzní pipeting
10:00 – 10:45	Ergonomie – její cíle a oblasti
10:45 – 11:30	Automatizovaný systém pipetování-eP Motion
11:30 – 12:15	Prezentace typů přístrojů, seznámení se s metodou Positive Displacement
12:15 – 13:00	Lunch break
13:00 – 13:45	Správná technika pipetování ,práce s různými typy kapalin (včetně praktických ukázek)
13:45 – 14:30	Kontaminace spotřebních plastů Plasty jako spotřební materiál. Jak ovlivňují chemikálie používané při jejich výrobě
14:30 – 15:15	Kvalita a stupně čistoty – průřez nabídky, zahájení pokusu
15:15 – 16:00	Prezentace výsledků provedeného pokusu na čistotu spotřebního materiálu
16:00 – 16:30	Diskuse, závěr

Úvod

TRANSFERY KAPALIN V PODMÍNKÁCH LABORATORNÍ PRAXE -Metody a řešení obtíží

Abstrakt

Uvolňování nežádoucích substancí při procesech zahřívání, lyzačních či homogenizačních fázích a centrifugaci, teorie a praxe správného pipetování a automatické pipetovací a izolační systémy.

Anotace/Annotation

V roce 1963 Eppendorf uvedl do laboratoří první plastové zkumavky a tím vytvořil standard, který je doposud využíván ve výzkumných i diagnostických laboratořích. Dr. Holt a jeho skupina publikovali v Science v roce 2008 pojednání o ovlivnění vazby léčiva na membránový mozkový receptor látkou, která se v průběhu experimentu uvolňovala z plastových zkumavek, ve kterých stanovení probíhalo (McDonald G.R. et al: Science, 322,917, (2008)). Od té doby se stále více pracovníků zajímá o to, jaký plastový spotřební materiál používají při svých experimentech. Eppendorf používá výrobní techniky, které eliminují aditiva, která se ukázala být škodlivá pro řadu aplikací.

Plastový spotřební materiál se může významně lišit v:

- použitím materiálu a procesu výroby
- čistotě
- mechanických vlastnostech, chování při centrifugaci, zahřívání

Výrobci běžně přidávají chemikálie během procesu výroby zkumavek, špiček a destiček, aby dosáhli požadovaných vlastností výrobků anebo výrobu zlevnili či zrychlili. Některá aditiva jsou pro výrobu nepostradatelná, jiná jsou postradatelná a ukázalo se, že některá z postradatelných aditiv mají vliv na určité experimenty a mohou být zdrojem chyb v různých stanoveních. Nežádoucí substance se mohou uvolňovat do vzorků převážně při zahřívání (PCR, inkubace), v lyzačních či homogenizačních fázích, při centrifugaci nebo při použití ultrazvuku.

Program automatického pipetování a dávkování umožňuje efektivně a reprodukovatelně zorganizovat práci v laboratoři. Přístroje eP Motion Eppendorf navíc dokáží zvládnout nejen práci s kapalinami, nýbrž lze s nimi i izolovat například proteiny a nukleové kyseliny, inkubovat

vzorky a také provádět také návaznou metodu PCR. Pohodlný a intuitivní SW s názvem eP Blue, který je neustále vyvíjen, vytváří příjemné uživatelské prostředí. Automaty používají speciální špičky o objemu 50 μ l, 300 μ l a 1000 μ l a to včetně špiček s filtrem. Eppendorf nabízí komplexní řešení instalace přístrojů včetně instruktáže programování, řešení aplikačních problémů a výstupu a vyhodnocení dat. Součástí prezentace je její praktická část na přístroji eP Motion 5075 umístěném na pracovišti Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty MENDELU.

V laboratorní praxi se ukazuje, že práce s pipetami a dávkovači je často neprávem podceňována, ačkoli má zásadní vliv na správnost a přesnost prováděných pokusů. Proto společnost Eppendorf přišla s programem proškolení laboratorního personálu a seznamuje pracovníky s teorií a praxí správného pipetování. Součástí odborné přednášky je seznámení s konstrukcí pipety a zejména faktorů ovlivňující přesnost a správnost vydávaného objemu kapaliny. Důraz je kladen na



vysvětlení pojmu pozitivního displacementu a jeho příkrou odlišnost od pipet se vzduchovým polštářem s tzv. air cushion. Při rozboru práce s kapalinami odlišnými od vodných se ukazuje výhoda reverzního pipetování a v některých případech je nezbytné justování pipet. Významné problémy dělají kapaliny s vysokou tenzí par, s odlišnou hustotou a také kapaliny viskózní. Eppendorf se razantně zapojil do vývoje a výroby speciálních spotřebních plastů s minimální smáčivostí a s ultrahomofobním povrchem. Nezbytným pomocníkem proti kontaminaci infekčními agens jsou špičky s filtrem, nejnověji s dvojitým filtrem. Nedílnou součástí práce v laboratoři je i udržování zásad ergonomie a poslední, ale nikoli nejméně podstatnou částí pipetování a dávkování je údržba a servis přístrojů. V průběhu odborného semináře mají účastníci možnost si vyzkoušet demontáž pipet, provést čištění, dekontaminaci, promazání a opětovné sestrojení přístroje.

Středa 26.2.2014, od 8:00 – 16:30 h

INBIT-Biotechnologické centrum,
hlavní přednáškový sál, Kamenice 34, 625 00 Brno

Základní principy pipetování

Jana Baránková

Abstrakt

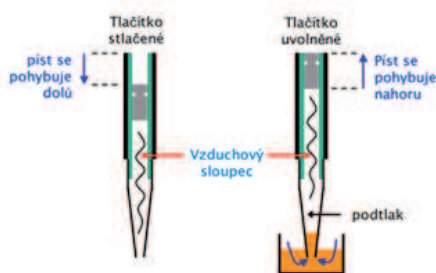
Pipetování je jednou ze základních laboratorních praktik, proto je nutné mu věnovat zvýšenou pozornost. Vedle manuálních a elektronických pipet rozeznáváme dva různé konstrukční principy - pipety se vzduchovým sloupcem a s principem „positive displacement“. Pipety se vzduchovým sloupcem jsou běžné pipety, které mají vyšší nepřesnost a nesprávnost při pipetování tzv. „problémových kapalin“. Správnou technikou můžeme tyto chyby odstranit nebo je alespoň snížit. Pipetování je dále ovlivněno správným výběrem špičky, prostředím a také lidským faktorem.

Úvod

Precizní a přesná práce s různými druhy pipet a dávkovačů je jednou ze základních chemických operací v jakékoliv laboratoři. Nejčastěji se používají pístové automatické pipety, které jsou buď nastavitelné, nebo s fixním objemem. V současné době s rostoucím množstvím vzorků přicházejí k oblíbenosti elektronické pipety, které v porovnání s manuálními mají vyšší přesnost a reprodukovatelnost výsledků, ale také pipetovací automaty díky jejich využití pro široké spektrum laboratorních metod.

Faktory ovlivňující pipetování

Mezi tyto faktory patří samotná pipeta, špička, pipetovaná kapalina, prostředí a lidský faktor. U pipety je důležitá její přesnost, pravidelné čištění a údržba. Přesnost závisí na konstrukčním principu - vzduchový sloupec (Obr. 1) vs. positive displacement nebo manuální vs. elektronický.



Obr. 1: Konstrukční princip pipet se vzduchovým sloupcem

„Vzduchový sloupec“

Vzduchový sloupec v pipetě odděluje vzorek nasávaný do plastické špičky od pístu uvnitř pipety. Pohyb pístu vytváří podtlak ve špičce, vzduchový sloupec se pohybuje jako pružina, a dochází k nasátí kapaliny do špičky. Pipety se vzduchovým sloupcem jsou kalibrovány na vodné roztoky, ostatní problematické kapaliny (viskózní, těkavé, s vysokou/nízkou hustotou) se pipetují s chybou způsobenou rozdílným chováním vzduchového sloupce v závislosti

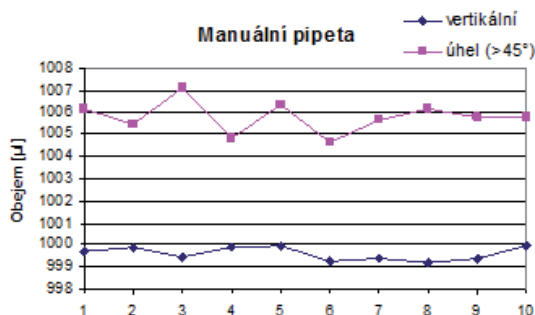
na kapalině. Tuto chybu můžeme minimalizovat např. reverzním pipetováním (těkavé, viskózní a pěnové kapaliny), předvlhčením špičky (těkavé kapaliny, Obr. 2), pomalou rychlostí pipetování (viskózní kapaliny), použitím speciálních špiček s nízkou smáčivostí (detergentní kapaliny) nebo justováním pipety (kapaliny s vysokou/nízkou hustotou), (Tab. 1).

Reverzní pipetování se liší od přímého tím, že nejprve se stiskne ovládací tlačítko až do druhé pozice, nasaje se kapalina a vypustí se pouze do první pozice. Ve špičce zůstane zbytek kapaliny, který se buď vrátí do zásobního roztoku, nebo se vyhodí se špičkou. Při přímém pipetování se nejprve stiskne tlačítko do první pozice, nasaje se kapalina, která se zcela vypustí stisknutím tlačítka do druhé pozice. Další chyba při pipetování může být způsobena nesprávným úhlem držení pipety při nasávání kapaliny a nezáleží, jestli byla použita pipeta manuální nebo elektronická. Dochází totiž ke snížení hydrostatického tlaku vodního sloupce uvnitř



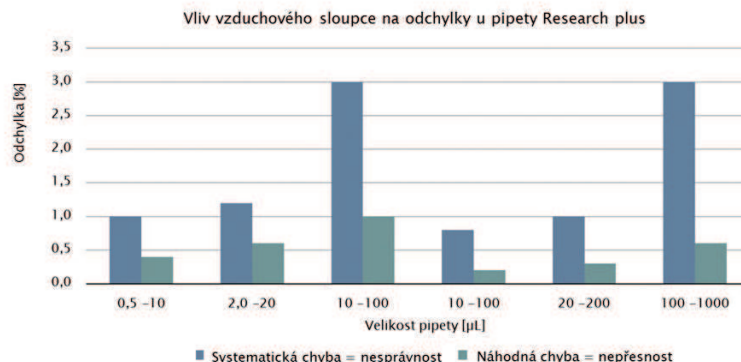
Obr. 2: Vliv předvlhčení špičky na správný objem

špičky a nasává se větší množství kapaliny, než je nastaveno (Obr. 3). Důležitým parametrem při pipetování je kvalita špičky (materiál, lisování), její správné nasazení, velikost objemu vzduchového sloupce. Je třeba správně zvolit velikost pipety



Obr. 3: Vliv úhlu držení pipety

a špičky podle množství pipetovaného objemu a zmenšit tak na minimum vzduchový sloupec (Obr. 4).



Obř. 4: Vliv vzduchového sloupce na správnost a přesnost pipetování

Systematická chyba měření (nesprávnost) udává rozdíl mezi aktuálně pipetovaným objemem a objemem nastaveným na pipetě. Náhodná chyba měření (nepřesnost, opakovatelnost) udává rozdíl mezi jednotlivými pipetovanými objemy při jednom nastavení pipety.

Dalším faktorem ovlivňujícím pipetování je prostředí (teplota, vlhkost a tlak vzduchu). Doporučuje se, aby při pipetování měly všechny složky (pipeta, špička a tekutina) stejnou teplotu. Vliv tlaku vzduchu je zanedbatelný, ale při kalibracích je ho třeba zohlednit.

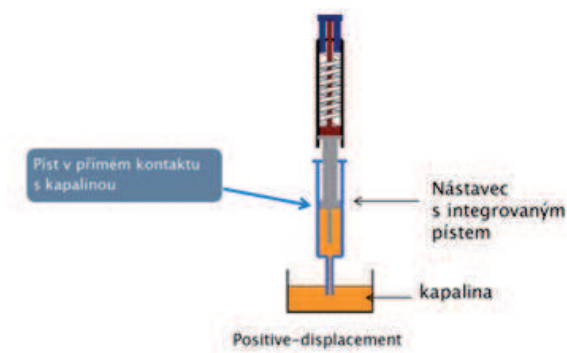
V neposlední řadě má na pipetování zásadní vliv lidský faktor - zkušenosti, zvyky, technika pipetování, napětí. Při špatné technice pipetování (velká síla při nasazování a vyhazování špiček) může docházet až ke zdravotním problémům jako je syndrom karpálního tunelu (CTS) nebo tzv. tenisový loket (RSI). Je třeba dodržovat zásady ergonomie jakožto vědy zabývající se snížením rizika zranění/onemocnění pracovníka, zvýšením jeho produktivity a zlepšením kvality pracovního života.

Pravidla správného pipetování

1. V případě práce s pipetami se vzduchovým sloupcem vyberte správnou kombinaci pipety a špičky. Čím menší špička a menší vzduchový objem, tím vyšší přesnost výsledků.
2. Při nasávání kapaliny držte pipetu ve vertikální poloze, pak ponořte špičku pouze pár milimetrů do kapaliny.
3. Předvlhčete špičku 2-3 x, zvýšíte tak správnost a přesnost výsledků.
4. Plnou špičku vytahujte z kapaliny po stěně zkumavky, abyste setřeli zbytek kapaliny na vnějším povrchu špičky.
5. Kapalina by měla být nasávána pomalu a plynule.
6. Počkejte 1-3 s, než se kapalina nasaje do špičky.
7. Při vypouštění kapaliny se dotýkejte stěny cílové zkumavky. Objemy < 10 µl vypouštějte přímo do kapaliny.

	Konstrukční princip		
	Vzduchový sloupec	Positive displacement	
Kapaliny	Reverzní pipetování	Předvlhčení	Pomalá rychlost pipetování
Těkavé	x	x	x
Viskózní	x		x
S vysokou/nízkou hustotou	Přenastavení pipety (justování)		x
Detergentní	Špičky LoRetention		x
Infekční/ radioaktivní	Špičky s filtrem - Dualfilter nebo SealMax		x
Pěňivé	x		x

Tab. 1: Přenos „problémových“ kapalin



Obr. 5: Konstrukční princip pipet s „positive displacement“

„Positive displacement“

Druhý konstrukční princip pipet „positive displacement“ (Obr. 5) je založen na přímém kontaktu pístu s kapalinou, což zajišťuje přesnější pipetování a dávkování problematických kapalin právě z důvodu absence vzduchového sloupce (Tab. 1). Integrovaný píst nástavce je přímo spojen s pístovým táhlem pipety/dávkovače. Kapalina v nástavci dosáhne pouze k hermeticky těsnícímu okraji pístu. Tyto pipety/dávkovače nevytvářejí aerosoly a jsou také vhodné pro práci v molekulární biologii (PCR...), které vyžadují práci bez tvorby aerosolů.

Literatura:

1. Kornelia Ewald: Liquid handling, Laboratory Practice; Suddeutscher Verlag GmbH, Munich 2012
2. Lochner K. H., Ballweg T., Fahrenkrog H. H.: Factors influencing the measuring accuracy of piston pipettes with air interface, Lab Med 20 (1996), č. 7/8, s. 430-440.
3. Interní prezentace a materiály firmy Eppendorf AG

Víte co se uvolňuje z Vašich zkumavek a ovlivňuje Vaše měření? Všechn plastový spotřební materiál není vyroben stejně!

Markéta Jeřábková

Abstrakt

Plastový spotřební materiál používaný v laboratořích při různých měřeních se může značně lišit kvalitou. Látky (leachables) uvolňující se z nekvalitních plastů mohou být zdrojem chyb v experimentech a stanoveních v nich probíhajících. Eppendorf vyrábí „chytrý“ spotřební materiál pro různé laboratorní potřeby.

Úvod

Plast nás neustále obklopuje v našem každodenním životě doma i v laboratoři. Látky uvolňující se z plastů, které jsou používány běžně v domácnosti, mají prokazatelný vliv na lidské zdraví a byly nalezeny v krvi, moči a mateřském mléce u běžné populace. Ftaláty, Bisfenol A a další látky uvolňující se z plastů poškozují životní prostředí. Roste množství důkazů, které ukazují, jak tyto látky působí na endokrinní soustavu a mohou tak změnit nebo přerušit vnitrobuněčnou signalizaci a ovlivnit fyziologii. Mohou mít tyto látky vliv i na reakce odehrávající se v laboratořích uvnitř zkumavek při měřeních v běžných biochemických nebo vědeckých laboratořích?

V roce 1963 Eppendorf uvedl do laboratoří první plastové mikrozku-
mavky a tím stvořil standard, který je doposud používán ve výzkumných i diagnostických laboratořích.

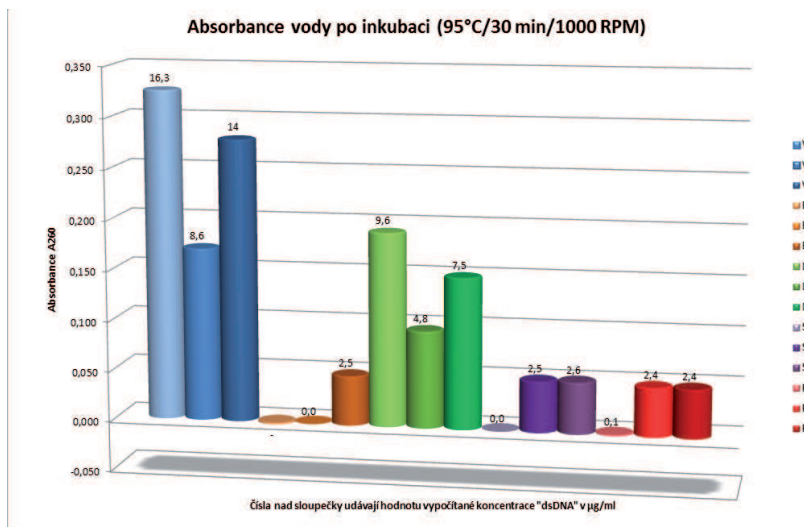
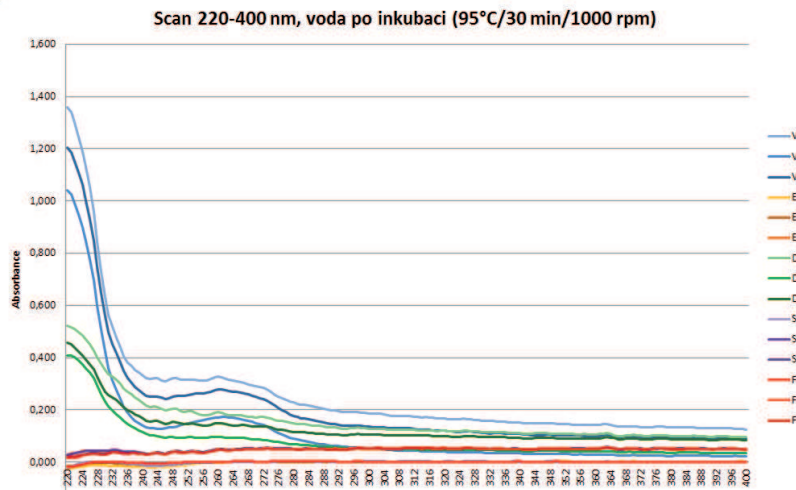
Dr. Holt a jeho skupina publikovali v Science v roce 2008 pojednání o ovlivnění vazby léčiva na membránový mozkový receptor látkou,

kteřá se v průběhu experimentu uvolňovala z plastových zkumavek, ve kterých stanovení probíhalo (McDonald G.R. et al.: Science, 322,917 (2008)). Od té doby se stále více pracovníků laboratoří zajímá o to, jaký plastový spotřební materiál používají při svých experimentech.



Zleva: Reid McDonald, Dr. Janna Kozuska, Dr. Andy Holt; University of Alberta

Výrobci běžně přidávají chemikálie během procesu výroby, aby dosáhli požadovaných vlastností výrobků anebo výrobu zlevnili či zrychlili. Některá aditiva jsou pro výrobu nepostradatelná. Ukázalo se, že některá z postradatelných aditiv mohou být zdrojem chyb v různých stanoveních.



Výrobce Eppendorf používá výrobní techniky, které eliminují ta aditiva, která se ukázala být škodlivá pro řadu aplikací.

- V žádném kroku výroby nejsou použita mazadla, uvolňovací činidla, plastifikátory, biocidy.
- Každá šarže výrobků je testována na kvalitu i čistotu. Eppendorf dokládá ke každé šarži svých výrobků certifikát obsahu aditiv a použitých materiálů.
- Výroba je automatizovaná, v čistých podmínkách, čímž je dosaženo eliminace lidských zásahů jako možného zdroje kontaminace.

Měření absorpance vody inkubované ve zkumavkách různých výrobců:

Zkumavky různých výrobců (v tripletu) s 200 µl vody (Molecular Biology Grade) byly inkubovány 30 min při 95°C při třepání 1000 rpm (ThermoMixer Eppendorf). Poté bylo 100 µl přeneseno do plastové kyvety (UVette Eppendorf) a byla změřena absorpance při 260 nm a scan od 200 - 350 nm u každého vzorku s použitím spektrofotometru BioSpectrometer basic (Eppendorf). U každého vzorku byla z naměřené absorpance při 260 nm vypočítána koncentrace DNA (µg/ml). Test provedli pracovníci Eppendorf Czech and Slovakia na jednom ze seminářů se zákazníky. Použité zkumavky lze běžně zakoupit na trhu v České republice.

Shrnutí

1. Všichni výrobci nevyrobí plastový spotřební materiál stejně. Stejně produkty různých výrobců vykazují velké rozdíly v kvalitě a čistotě.
2. Chemikálie, které někteří výrobci používají při výrobě, mohou negativně ovlivňovat určité experimenty a mohou být zdrojem chyb v různých stanoveních.
3. Eppendorf používá výrobní techniky, které eliminují aditiva, která se ukázala být škodlivá pro řadu aplikací. V žádném kroku výroby Eppendorf zkumavek, destiček a špiček nejsou použita mazadla, uvolňovací činidla, plastifikátory, biocidy, což značně snižuje nebezpečí ovlivnění experimentů.
4. „Chytrý“ spotřební materiál Eppendorf je vytvořen tak aby pomohl vylepšit výsledky a také udělat každodenní rutinu v laboratoři rychlejší, bezpečnější a jednodušší.
5. Výsledky mohou být velmi závislé na použití určitého spotřebního materiálu v průběhu experimentu.

Více informací na:

- www.eppendorf.com/consumables
- www.youtube.com/watch?v=w5T9ygefSx0

Literatura:

- Holt et. al., G.I.T. Laboratory Journal 9-10/2009
- Holt et. al., Poster Neuroscience 2010, „GABAA receptor sensitivity to contaminants which leach from plastics“

Zásady kalibrace, čištění a údržby pipet a dávkovačů

Milan Řezka

Abstrakt

Pipety a dávkovače Eppendorff vyžadují v rámci dodržení limitů na přesnost a správnost trvalou pozornost. Bez pravidelného čištění, kalibrace a oprav se nelze obejít. Jak často provádět tyto úkony závisí na míře používání pipet a dávkovačů v laboratoři, na počtu pracovníků, kteří s nimi pracují. Dále je také potřeba zmínit i používání agresivních chemikálií a také návyky laborantů při práci s přístroji. Předmětem přednášky jsou pasáže zabývající se dekontaminací a čištěním pipet a dávkovačů, pravidelnou údržbou a čištěním a také kalibrací a justováním přístrojů.

1. Dekontaminace a čištění pipet a dávkovačů

Chemická odolnost pipet Eppendorff

Kontaktní díly pipet jsou vyrobeny z polypropylenu (PP), polyvinylidenfluoridu (PVDF), vyhazovač u modelu Research plus je vyroben z polyetherimidu (PEI).

Pipety a dávkovače Eppendorff jsou vysoce chemicky odolné proti běžným chemikáliím, přesto v případě pochybností kontaktujte obchodního zástupce společnosti Eppendorff za účelem vyřešení problémů.

Dekontaminace pipet na vzduchovém principu

Vodné roztoky

Pipety jsou kalibrovány ve výrobě destilovanou odplyněnou vodou a proto pipetováním vodných roztoků je dosažena nejvyšší přesnost.

Provedení dekontaminace-pipetu demontovat, kontaminované díly destilovanou vodou omýt, v sušičce při maximální teplotě 60° sušit,

píst lehce promazat speciálním silikonovým plastickým mazivem, možno autoklávovat modely Reference i Research plus celé, spodní i dolní díl.

Anorganické kyseliny

Při častém pipetování koncentrovaných kyselin se doporučuje kritické díly oplachovat destilovanou vodou. Při pipetování těchto kyselin používejte špičky s filtrem.

Dekontaminace-originální použité díly z Eppendorffu jsou odolné vůči kyselinám, zejména keramický a z Fortronu (speciální plast) vyrobený píst. Aerosoly kyselin mohou přesto vniknout do dolního dílu pipety a kontaminují ho. Opatření jestejné jako u vodných roztoků- doporučuje se použít špičky s filtrem.

Hydroxidy

Při častém pipetování koncentrovaných louhů se doporučuje opláchnout dolní díl pipety destilovanou vodou. Používejte špičky s filtrem!

Dekontaminace- pipeta i píst je odolný vůči působení louhů. Aerosoly louhů mohou přesto vniknout do dolního dílu a kontaminují ho. Opatření stejné jako u vodných roztoků.

Potenciálně infekční roztoky

K zamezení kontaminace nutno používat špičky s filtrem. Alternativou je používat přístroje na bázi pozitivního displacementu.

Dekontaminace- provádějte autoklavování při 121 °C, 20 minut všech kontaminovaných dílů, u modelů Reference a Research plus celou pipetu, při demontáži je počítat se šroubením či použít rychloupínač (bajonetové propojení), vložit do běžného laboratorního čistícího prostředku, potom dobře osprchovat destilovanou vodou a v sušičce sušit při teplotě do 60 °C.

Buněčné kultury

Pro sterilní práce je doporučeno použití špiček s filtrem.

Dekontaminace- stejné jako u potenciálně infekčních kapalin.

Organická rozpouštědla

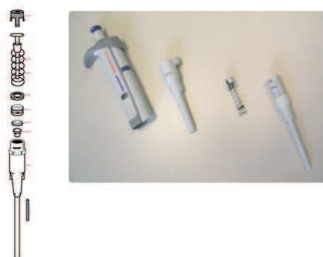
Hustota těchto kapalin je rozdílná od vodných roztoků, proto se doporučuje justovat pipetu. Pipetování musí být velmi plynulé (kvůli vyššímu tlaku par a změněné zvlhčovací schopnosti). Po ukončení pokusu se doporučuje pipetu demontovat a odvzdušnit.

Dekontaminace- po použití je nutno pipetu demontovat, kontaminované díly vložit do detergentu. Potom přístroj velmi dobře opláchněte destilovanou vodou a vysušte v sušičce při teplotě 60 °C anebo přes noc při RT.

Radioaktivní látky

K zabránění kontaminace slouží jednoznačně použití špiček s filtrem. Alternativa- použijte přístroj na principu pozitivního displacementu.

Dekontaminace- pipetu demontujte a kontaminované díly vložte do komplexního roztoku nebo do speciálních čistících roztoků. Potom přístroj velice dobře omyjte destilovanou vodou! Potom přístroj velmi dobře opláchněte destilovanou vodou a vysušte v sušičce při teplotě 60 °C anebo přes noc při RT.



Obr. 6: Schéma demontáže pipety Research plus 20-200 µl

Proteiny / nukleové kyseliny

K zabránění kontaminace doporučujeme použít špičky s filtrem. Jako alternativu možno použít přístroj na principu pozitivního displacementu.

Dekontaminace

Proteiny: pipetu demontovat kontaminované součásti opláchnout detergenty. Potom přístroj velmi dobře opláchněte destilovanou vodou a vysušte v sušičce při teplotě 60 °C anebo přes noc při RT.

Nukleové kyseliny: Dekontaminovat roztokem Glycin/HCl-pufru (pH 2), a vařit 10 minut (tím zlikvidujete v agarózových gelech obsaženou DNA. Potom důkladně omýt destilovanou vodou, předpisově sušit - viz popis výše.

Dekontaminace pomocí UV záření

Pipety Eppendorf jsou vyrobeny z plastu, který je vysoce odolný proti UV záření. Mohou být ponechány bez obav v inkubačních místnos-

tech anebo v boxech s UV zářením. Nepochází k ovlivnění kvality jak povrchů, tak funkce pipet a dávkovačů. Dekontaminaci pomocí UV záření provádíme tak, že použijeme 30 W rtuťovou trubici v oblasti záření 254 nm. Optimální vzdálenost pipet od lampy je zhruba 60 centimetrů.

Čištění pipet a dávkovačů

Všechny díly pipet lze čistit mýdlovými roztoky nebo také izopropanolem, pokud z návodu na použití nevyplývá jejich zákaz. Poté musí být všechny součásti dolního dílu opláchnuty destilovanou vodou. Montáž zásadně provádějte až po důkladném osušení.

U manuálních mechanických pipet by měly být po provedeném čištění lehce promazány písty! (speciální silikonové mazivo)

2. Praktické poznatky s prací s pipetami a dávkovači

Hledání chyb a odstranění neshod

Pipeta kape, netěsní	
chybí špička, nevhodná velikost špičky	použít originální špičku, řádně ji upevněte
poškrabaný dolní konus pipety	vyměňte konus
těsnění dolního konusu vadné	vyměňte konus
píst pokryt zbytky rozpouštědel a vzorků	píst očistěte a promažte, vložte nové těsnění
poškozený píst	píst a těsnění vyměňte
poškozené těsnění pístu	těsnění vyměňte a promažte píst

Pipeta jde ztuhla, namáhavá práce	
nečistý, silně drhnoucí píst	píst očistěte a promažte
těsnění protéká, je poškozeno od par reagensů	demontovat pipetu, vyměňte těsnění
píst zřetelně poškozen	píst a těsnění vyměňte

Nepřesný objem	
odchylné podmínky	pipetu při nasávání držte ve svislé poloze!
pipeta netěsní	zkouška těsnosti nebo píst a těsnění očistit
pipeta není justovaná	provedte justování

Příčiny zvýšených hodnot nepřesnosti (náhodná odchylka) a nesprávnosti (systematická odchylka)		
Pipeta je při nasávání šikmo (30°)	max. chyba=nepřesnost +0,5%	pipetu dejte kolmo!
Nevhodná špička	nepřesnost >0,4%	použijte špičky EPPE
Hustota media ($\delta=1,1\text{g/cm}^3$)	nepřesnost -0,4%	provedte justování
Rozdíl teploty vzorku a pipety	nepřesnost -5,4%	teplotu pipety a vzorku vyrovnat

3. Kalibrace pipet a dávkovačů

Přezkoušení přesnosti a správnosti systému pipeta plus špička Gravimetrické stanovení

Přesný popis je uveden v SOP manuálu Eppendorf.

Obecné zásady gravimetrického stanovení:

- ochrana proti úbytku vlhkosti-vodních par, zajistěte si speciální kryt vah=vlhkostní past
- zajistěte odstranění průvanu a také zamezte přímému osvitlu sluncem a přímému zdroji tepla
- mediem je destilovaná 2x odplyněná deionizovaná voda
- stálá teplota místnosti, vody a pipety mezi 15 °C a 30 °C +/-0,5 °C
- relativní vlhkost 60-90%

k stanovenému objemu	1-50 μl	nad 50 μl
citlivost analytických vah	1×10^{-6} g	1×10^{-4} g
velikost zkumavky	6 ml	20 ml
teploměr do místnosti s citlivostí	0,1 °C	0,1 °C
teploměr do vzorku s citlivostí	0,1 °C	0,1 °C

Doporučené váhy: Sartorius, Mettler, Ohaus, AnD.

Denní kontrola pipety-zkouška pipety na těsnost

Zcela jednoduše lze pipetu s nasátým jmenovitým objemem v poloze vertikální ponechat 15 vteřin. Pipetu ponechejte v klidu. Meniskus kapaliny v ústí špičky je nutno pozorovat. Jestliže se objeví kapka, pipeta netěsní. U pipet nad 10 μl objemu následuje poměrně jednoduchý další test. K tomu slouží 20cm průhledné hadičky z plastu. Po nasátí kapaliny z hadičky se pozoruje eventuální pohyb menisku v hadičce. Ten nesmí po dobu 1 minuty klesnout. Pokud ano, je pipeta netěsná a musíte ji nechat opravit

Průměr hadičky :
 pro pipetu 10-100 μl0,5-1,0 mm
 100-500 μl1,5-2,0 mm
 >500 μl5,0 mm

Denní kontrola pipety-pokračování

Denně provádějte takzvaný funkční test-vizuální kontrolu všech částí pipety, zejména zda není pipeta poškozena. Při jakémkoli zjištění pipetu odstavte, překontrolujte funkčnost a proveďte údržbu či odešlete pipetu na provedení odborné opravy. Pipetu ani dávkovač nepoužívejte, hrozí nebezpečí kontamina-

ce a vytváření větších chyb při práci.

Fotometrický test

Přezkoušení pipet na objemy pod 1 μl není gravimetricky prakticky možné. Byl tedy vyvinut fotometrický test, který je detailně popsán v Eppendorf Application Nr.25. a je možno ho objednat

Praktické provedení kalibrace

U pipet s proměnlivým objemem se měří 3 objemy:

- jmenovitý objem -10 hodnot
- 50% jmenovitého objemu -10 hodnot
- nejmenší nastavitelný objem ale ne menší než 10% jmenovitého objemu -10 hodnot

Systematická odchylka = nesprávnost:

/A/ = odchylka středních hodnot dávkovaných objemů 10 měření od jmenovité odchylky nebo od zvoleného objemu pipety nebo dávkovače.

Náhodná odchylka= nepřesnost:

„s“ = Rozptyl dávkovaného objemu okolo střední hodnoty skutečně dávkovaného objemu. Zjistí se přepočítáním opakovaně standardní odchylky z 10 měření.

Justování pipety:



Obr. 7: Nastavení uživatelem

Justování pipety a dávkovače se děje nejčastěji z důvodů práce s kapalinami s odlišnou hustotou.

Justování pipet na jinou hustotu

Je možné přestavit pipetu na jiný objem kapaliny s odlišnou hustotou tak, aby ukazovaný jmenovitý objem odpovídal skutečnému pipetovanému objemu. Pozor- u pipety a dávkovače jsou všechny hodnoty justovány na novou hustotu natrvalo až do další změny!

Pro justování kapalin s odlišnou hustotou platí:

$$\text{Pipetovaný objem} = \frac{(\text{Střední hodnota vážení})}{(\text{hustota vážené kapaliny})} [\mu\text{l}]$$

Takto spočítaná hodnota je hodnota je požadovaná jmenovitá hodnota nastavená na počítadle variabilní nebo fixní pipety.

Tato hodnota musí být gravimetricky překontrolována. Takto justovaná pipeta vydává nastavený objem s daným údajem počítadla pouze u dané používané kapaliny.

Po provedení justování na jinou hodnotu se doporučuje zřetelně označit pipetu samolepkou - **nastaveno na jinou hustotu!!!**

Hranice chyb-podle EN ISO 8655 (Evropská norma) a DIN 12 650 (norma Eppendorf).

Podle normy EN ISO 8655 se vztahuje hranice chyby pro celý systém pipeta a špička. Ustanovení platí v celé evropské unii.

Všeobecně platí:

Rozlišujeme hranici chyby pro systematickou odchylku „/A/“ a hranici pro náhodnou odchylku „s“.

Hranice chyby pro variabilní pipetu platí pro horní hranici objemu v tabulce.

Pro vztah hranice chyby a jmenovitého objemu platí:

$$(\text{„F“ hranice chyby } [\mu\text{l}] \times 100 \%) / (\text{jmenovitý objem } [\mu\text{l}])$$

kde „ F „ je hranice chyby

Příklad:

Pro pipetu objemu 10 ml – 100 ml platí hranice chyby pro systematickou chybu +/- 0,8 ml a hranice chyby pro náhodnou odchylku platí +/- 0,3 ml při každém měření.

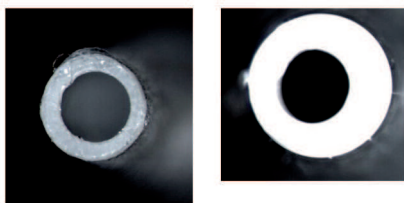
Konformita

Jisté výsledky analýzy v medicínské a vědecké praxi vyžadují preciznost při každém pracovním kroku, počínaje pipetováním a konče vyhodnocením výsledku. Čím menší je tolerance chyb každého přístroje, tím přesnější a preciznější je výsledek. K tomuto je vydáváno

osvědčení o konformitě pro pipetu a špičku. To garantuje, že v systému EN ISO 8655 uvedené hranice chyb nebudou překročeny a že zákonné předpisy budou dodrženy.

Eppendorf dodává kompletně jak pipety, tak i špičky. K pipetám Eppendorf lze sice použít i špičky jiných výrobců, ale tím také končí i platnost zásad konformity výrobků Eppendorf. **Dodržení limitů EN ISO 8655 nelze v tomto případě dosáhnout.**

Na závěr příklady detailů nevhodně požívaných špiček-zde dochází k neúměrně vysokému nebezpečí vydávání nesprávných objemů a také k úkapům na dolním konci špiček



Obr. 8: Nevhodné špičky pro přesné a správné pipetování - dolní konce špiček

Literatura:

1. Kornelia Ewald: Liquid handling , Laboratory Practice; Suddeutscher Verlag GmbH, Munich 2012
2. SOP Standard operating procedure for Eppendorf; www.eppendorf.com/SOP
3. DIN EN ISO 8655-6; International Standard for piston -operated volumetric apparatus, part.6
4. Gast U., Hartmann T.; Dispensing highly viscous liquids (Eppendorf AG 2009)
5. Directive IvD 98/79/EG

Flexibilní pipetovací automat

Jana Heřmanská

Abstrakt

Přístroje řady Eppendorf epMotion jsou flexibilní pipetovací automaty, které umožňují rychlé, přesné, reprodukovatelné pipetování a dávkování kapalin, purifikační procesy. Pipetování je možné z různých a do různých formátů od jednotlivých zkumavek až po vícejamkové destičky (96 jamek i 384 jamek), dávkování ze zásobníku do různých jamek destiček apod. Mohou být využity pro přípravu vzorků a reakcí v molekulární biologii, farmaceutickém i chemickém průmyslu a to bez chyb, které mohou být způsobeny lidským faktorem.

Úvod

Pipetovací automat Eppendorf epMotion 5075TMX má 12 pozic, z toho jedna pozice je osazena thermomixerem s thermálním modulem, kde lze nastavit teplotu od 15 °C pod okolní teplotu až do 95 °C. Řídící jednotkou je počítač s řídicím softwarem epBlue. Tento SW se používá pro přípravu protokolů podle potřeby uživatele s možností grafického zobrazení připraveného protokolu. Automatizace dávkování kapalin různých metod např. DNA purifikace, PCR setup, ředění / promíchání, sekvenování lze připravit pro objemy v rozmezí od (1) 2 µl do 1 000 µl. Pipetování je prováděno bez kontaktu s povrchem kapaliny, výšku hladiny snímá optický senzor. Optický senzor rozeznává a kontroluje i vsazený Hardware - nejen výměnné pipetovací hlavy, ale i jednotlivé formáty zkumavek, držáky reagentů a vzorků.

Základní příslušenství

K pipetování lze používat jedno nebo 8mi kanálové pipetovací hlavy o třech objemových velikostech, jednorázových PP špiček příslušného objemu, dodávané v krabičkách nebo jako Reload systém s barevnými rámečky (objem a čistota podle zvolených aplikací). Eppendorf navázal na originální barevné značení krabiček špiček - při vkládání nedochází k záměně



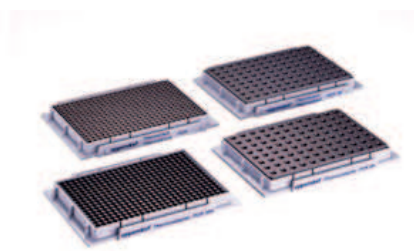
Specifikace thermomixeru

Integrovaný thermomixer může chladit, vyhřívat a mixovat vzorky v jeden okamžik najednou, včetně řízeného temperování s použitím vhodného racku. V kombinaci s gripperem (mechanickou rukou) lze

tuto pozici vhodně využívat při purifikacích na magnetických partikulích. Umístění thermomixeru je vždy na pozici A4. Frekvence míchání je 300 – 2000 rpm, amplituda 3 mm, teplotní rozmezí od 15 °C pod okolní teplotu až do 95 °C. Rychlost vyhřívání/chlazení je 5 °C/3 °C.

Kompatibilita TMX s příslušenstvím

Na TMX pozici lze pokládat a používat 96 i 384jamkové pcr destičky v thermoracku, jednotlivé zkumavky 0,5 - 2,0 ml v thermobloku, skirted 96 pcr destičky i DeepWell Plate destičky samostatně



nebo v thermobloku – zda chceme nebo nechceme využít temperace vzorků. Na dalších pozicích lze využívat i zajímavý Reservoir rack s volitelnými bloky na různě velké zkumavky. Na jednom místě tak lze využít objemy zkumavek od 0,2 ml až po 50 ml, případně 30 a 100 ml vaničky. Nabídka thermoracků, thermobloků a thermoadapterů nabízí široké využití pro celou škálu velikostí používaných spotřebních materiálů. Zajímavý je i adapter pro kapiláty na Lightcycler® .

Novinky

V současné době je nabízena nová řada Eppendorf epMotionů, u kterých došlo k inovaci a vylepšení řadou prvků. Jedná se i o rozšíření kapacity pracovních pozic u základní verze epMotion 5075l, kde je k dispozici až 15 pozic, další střední verze se 6-ti pozicemi a nejmenší 4pozicová verze. Došlo i rozšíření a doplnění o nové menší software pro zjednodušení příprav některých programů. Další novinkou je zcela nová řídicí jednotka **MultiCon**, kterou tvoří barevný dotykový monitor se zabudovaným počítačem a nebo, v případě menších 4 a 6ti pozicových variant, je řídicí jednotkou EasyCon barevný dotykový panel-tablet.

Nejmenší model **epMotion 5070** má nově možnost měnit automaticky dvě pipetovací hlavy, které mohou být umístěné na pracovní pozici v přístroji.

Novinkou jsou 6ti-pozicový **epMotionM5073** a 14ti-pozicový **epMotion5075m** pro izolace nukleových kyselin, kde je v přístroji zabudován na jedné pracovní pozici modul s thermomixerem a „prstovým“ magnetem. Ten se dá velmi šikovně využívat pro purifikace na magnetických partikulích, kdy na jedné pracovní pozici může probíhat temperování, třepání a s použitím 1,5 / 2,0 ml zkumavek za použití výsuvného prstového magnetu i separace magnetických partikulí

v roztoku. Partikule se po vsunutí magnetu separují v roztoku na vnitřní boční straně zkumavky. Ideální jsou pro použití v kombinaci s našimi novými izolačními kity. Jedná se o kity na izolaci gDNA z krve, gDNA z tkání a virální DNA/RNA. Ty jsou připraveny tak, že přístroj a kit tvoří uzavřený systém, na začátku práce se s využitím software Prep Assistant jednoduše zadají vstupní informace a protokol je připraven k použití. V případě potřeby lze protokol i upravovat a doplnit podle individuálních potřeb uživatele v řídicím software epBlue, který slouží i k přípravě jakýchkoli obecných protokolů, které si uživatel vymyslí.

Závěr

Univerzální pipetovací stanice epMotion je přístroj mnoha tváří a možností, kde si tvorbu aplikací a protokolů může uživatel tvořit podle individuálních požadavků sám.

Literatura:

Interní prezentace a materiály firmy Eppendorf AG

TRANSFERY KAPALIN V PODMÍNKÁCH LABORATORNÍ PRAXE
Metody a řešení obtíží

Autoři: Milan Řezka, Jana Heřmanská, Markéta Jeřábková,
Jana Baránková, René Kizek, Vojtěch Adam, Ondřej Zítka,
Olga Kryštofová

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00
Brno

Grafická úprava: Mgr. Michal Horák

Vydání: první 2014

Počet stran: 28

Náklad: 50 ks

ISBN 978-80-7375-961-2



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ISBN 978-80-7375-961-2

