



Pipety
Końcówki
Techniki

Ocena
Wybór
Techniki

Osiągaj lepsze wyniki

Skrócony podręcznik dobrego pipetowania

METTLER TOLEDO



Spis treści

1. Wstęp	5
2. Planowanie projektu, przebieg prac i wybór	6
Planowanie projektu i przebieg prac	6
Analiza przebiegu prac	5
Optymalizacja przebiegu prac	8
Wymagania co do zakresu objętości i wydajności analizy próbek	8
Wymagania co do formatu pojemnika na próbki/odczynniki	11
Szczególne wymagania co do próbek/oznaczania	12
3. Wybór odpowiedniej pipety	16
Pipety z poduszką powietrzną	17
Pipety wyporowe	17
Optymalizacja przebiegu prac	18
Wymagania co do zakresu objętości i wydajności analizy próbek	18
Elektroniczne pipety jednokanałowe	20
Pipety wielokanałowe	21
Systemy pipetowania o dużej wydajności	22
Pipety specjalne	23
Pipety wyporowe	23
Pipety powtarzalne	24
Sterowniki pipet	25
Dozowniki butelkowe	26
4. Wybieranie odpowiedniej końcówki: konstrukcja, jakość i dopasowanie	28
Konstrukcja końcówki	28
Jakość końcówki	29
Uszczelnienie końcówki pipety	30
System odrzucania końcówek LTS™ LiteTouch™	30
Wybór końcówek	32
Końcówki specjalne do szczególnych aplikacji	32

Spis treści

5. Techniki pipetowania	34
Optymalny zakres objętości	35
Głębokość zanurzenia końcówki	36
Zasysanie pod właściwym kątem	37
Zachowywanie spójności	38
Spójne dozowanie próbek	39
Wstępne płukanie końcówek	40
Unikanie wahań temperatury	41
Spójne ustawienia mikrometra	42
Jakie ryzyko towarzyszy Twojemu pipetowaniu?	44

1. Wstęp

Celem programu Good Pipetting Practice (Dobra Praktyka Pipetowania) jest udzielanie badaczom pomocy w dokonywaniu kompetentnego wyboru urządzeń, właściwego pipetowania, ergonomicznych technik, kalibracji i rutynowej obsługi, aby uzyskiwane wyniki były najlepsze z możliwych.

Pipetowanie, czyli odmierzenie i przeniesienie cieczy o małych objętościach, rzędu mikro- i mililitrów, jest zapewne najczęściej wykonywaną operacją w laboratoriach badawczych. Zdolność do wykonania tego zadania w sposób szybki i precyzyjny stanowi bezwzględny wymóg, od którego zależy pomyślność prac laboratoryjnych. Do większości prac laboratoryjnych używane są nowoczesne pipety z poduszką powietrzną ze względu na ich liczne zalety — to idealny przyrząd do skutecznego dozowania małych ilości cieczy. Nowoczesne wysokiej jakości pipety i końcówki umożliwiają uzyskanie wysokiej wydajności, a tym samym zaoszczędzenie roboczogodzin.

2. Planowanie projektu, przebieg prac i wybór

Planowanie projektu i przebieg prac

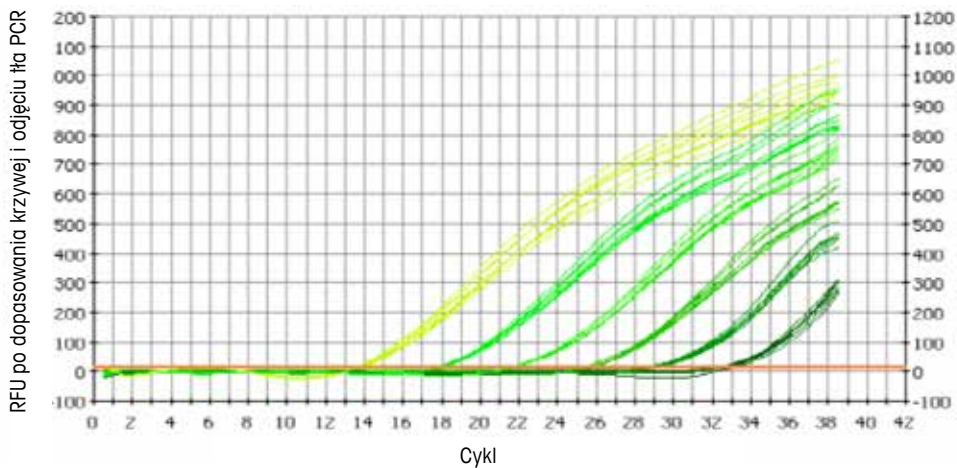
W przypadku większości nowych projektów warto zastosować pełny proces planowania, w którym wszystkie etapy przebiegu prac zostają przeanalizowane pod kątem maksymalnej efektywności i pozyskiwania danych. Z perspektywy postępowania z cieczeniami wymaga to znajomości początkowego typu próbki, wymaganej analizy punktu końcowego oraz wydajności analizy próbek. Te z kolei wskażą odpowiednie techniki oraz wymagane formaty pojemników do postępowania z cieczeniami (próbówki, płytki itd.). To następnie określi optymalne narzędzia w danym przebiegu prac. W każdym przypadku pipetowania pipeta, towarzysząca jej końcówka oraz technika operatorska muszą być traktowane jak jeden system, który ma dostarczać dokładnie odmierzoną wymaganą objętość cieczy. Wybór odpowiedniej pipety i końcówki, a następnie używanie najbardziej efektywnej techniki stanowią integralną część procesów opracowywania i wdrażania dowolnego projektu lub eksperymentu.

Analiza przebiegu prac

Pierwszy etap procesu polega na rozpoznaniu wszystkich etapów w przebiegu eksperymentu — od wyodrębnienia próbki na początku po wytworzenie danych na końcu. W grę będą wchodzić wszystkie etapy przygotowawcze na potrzeby przebiegu prac, np. przygotowanie buforów lub mieszanin wzorcowych. Następnie należy ustalić, jak duża zmienność jest do przyjęcia, aby eksperyment mógł dostarczyć dobrych danych. Niektóre aplikacje i niektóre etapy są wrażliwsze na zmienność warunków eksperymentu niż inne, na przykład dowolny eksperyment obejmujący wzmocnienie, m.in. qPCR, może być bardzo wrażliwy na zmienność, natomiast prosty etap przygotowania bufora już nie. Nieoptymalny wybór pipety i końcówki oraz zła technika pipetowania mogą być głównym źródłem zmienności warunków eksperymentu. Nieoptymalne pipetowanie może poważnie pogorszyć np. eksperymenty zależne od krzywej wzorcowej uzyskanej w toku seryjnego rozcieńczania wzorców.

Analiza przebiegu prac

- Rozpoznanie maksymalnej tolerancji zmienności warunków eksperymentu.
- Rozpoznanie aplikacji i etapów, które najpewniej będą źródłem zmienności:
 - qPCR,
 - rozcieńczenia seryjne.



Optymalizacja przebiegu prac

Wymagania co do zakresu objętości i wydajności analizy próbek

Często prace zaczyna się od kilku cieczy o stosunkowo dużych objętościach (np. przygotowanie buforów, nakładanie komórek na płytki itd.), kiedy to przenosi się 5 bądź 10 mL, kładąc na ogół mniejszy nacisk na dokładność. Niemniej w stosowanej na końcu technice wykrywania w grę mogą wchodzić tylko małe objętości i wtedy potrzebne może być dokładniejsze odmierzanie objętości. Należy odpowiednio wyważyć, co jest istotniejsze — szybkość czy dokładność/precyzja — ponieważ różne narzędzia do dużych objętości mają różne możliwości. Przy wyborze pipety o właściwej objętości zalecane jest kierowanie się wytyczną, według której zakres roboczy należy szacować tak, aby stanowił 35–100% całkowitej wskazywanej objętości. Na przykład użyteczny zakres roboczy pipety o pojemności 1000 μL wynosi 350–1000 μL . Mimo że dla pipety o tej objętości minimum wg specyfikacji może wynosić 100 μL , a do tego możliwa jest regulacja nawet do 0 μL , zalecane jest używanie 350 μL jako minimum, co wynika z techniki stosowanej przez użytkownika. Precyzyjniejsza technika pipetowania wymagana jest do objętości mniejszych niż 35% zakresu pipet. Używanie w pracy nieodpowiedniego zakresu dowolnego przyrządu pogorszy dokładność/precyzję.

Typ pipety	Model	Stal pojemność	Maks. pojemność	Dokładność 10%	Precyzja 10%	Dokładność 50%	Precyzja 50%	Dokładność 100%	Precyzja 100%
Pipeta wyporowa	MR-10	0,5 µL	10 µL	9%	3%	2%	0,60%	1,50%	0,60%
	MR-250	50 µL	250 µL	3%	0,60%	1,70%	0,30%	1%	0,20%
	MR-1000	100 µL	1000 µL	3%	1,60%	1%	0,50%	0,80%	0,40%

Pipeta z poduszką powietrzną	L-10XLS	0,5 µL	10 µL	2,50%	1,20%	1,50%	0,60%	1%	0,40%
	L-200XLS	20 µL	200 µL	2,50%	1%	0,80%	0,25%	0,80%	0,15%
	L-1000XLS	100 µL	1000 µL	3%	0,60%	0,80%	0,20%	0,80%	0,15%

Dokładność i precyzja

Dokładność to zdolność pipety do dozowania cieczy w ilości jak najbliższej wartości wskazywanej przez ustawienie objętości.

Typowa dokładność pipet z poduszką powietrzną wg specyfikacji wynosi około 1% w przypadku pipet o znamionowych ustawieniach objętości większych niż 35%. W przypadku ustawień objętości pipety wynoszących 10% lub mniej dokładność wg specyfikacji może być nawet 3-krotnie niższa.

Precyzja to zdolność pipety do dozowania podobnych ilości cieczy w sposób odtwarzalny. Typowa precyzja pipet z poduszką powietrzną wg specyfikacji wynosi mniej więcej od 1/3 do 1/4 wartości dokładności. Precyzję często wyraża się jako powtarzalność lub odtwarzalność próbek, a także jako odchylenie standardowe.

Pipety niektórych typów lepiej od innych nadają się do określonego typu próbek. Na przykład do lepkich próbek należy używać innej techniki lub innego modelu pipety, aby w eksperymentach uzyskać dobrą dokładność i precyzję. Więcej informacji zawiera poniższa tabela:

Typ roztworu próbki		Zakres objętości	Sugerowany roztwór	
			Systemy ręczne	Systemy elektron
Lepki, rozpuszczalnik organiczny, warunki skrajne	Duże objętości próbek	20–50 mL	AutoRep S	AutoRep E
Nielepki, wodny, warunki otoczenia		20–50 mL	AutoRep S	Pipet-X
Lepki, rozpuszczalnik organiczny, warunki skrajne		1–20 mL	AutoRep S	AutoRep E
Nielepki, wodny, warunki otoczenia		1–20 mL	Pipet-Lite XLS, AutoRep S	Pipet-X, E4 XLS
Lepkie ciecze, rozpuszczalniki organiczne, warunki skrajne	Średnie objętości próbek	200–1000 µL	Pos-D, AutoRep S	AutoRep E
Nielepki, wodny, warunki otoczenia		200–1000 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Lepki, rozpuszczalnik organiczny, warunki skrajne	Małe objętości próbek	10–200 µL	Pos-D	
Nielepki, wodny, warunki otoczenia		10–200 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Lepki, rozpuszczalnik organiczny, warunki skrajne	Mikroobjętości próbek	<10 µL	Pos-D	
Nielepki, wodny, warunki otoczenia		<10 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS

Jeśli liczba próbek do analizy jest dostatecznie wysoka, to do celów przygotowania próbek i/lub analizy korzystna może być zmiana formatu pojemników z probówek na płytki, ponieważ wtedy używanie pipet wielokanałowych przyspieszy przebieg prac.

Jeśli do analizy używane są płytki 96- lub 384-komorowe, korzystne może być użycie systemu do pipetowania 96-kanałowego, co oszczędzi czas i obniży ryzyko błędów.

Wymagania co do formatu pojemnika na próbki/ odczynniki

Zastosowanie płytek 96-komorowych może wymagać przenoszenia wielu próbek lub odczynników z probówek do płytek lub odwrotnie, a niekiedy przenoszenia między płytkami o różnych formatach (z 24-komorowych do 96-komorowych). Pipety wielokanałowe o regulowanym rozstawie kanałów mogą skrócić czas zmiany formatu nawet o 85%, ponieważ umożliwiają przeniesienie nawet 8 próbek jednocześnie, np. przeniesienie próbki docelowej z zestawu probówek bez określonego formatu do sformatowanej (z odstępami 9 mm) płytki 96-komorowej wymaga tylko prostego zassania próbki z niesformatowanej płytki.



Pipety wielokanałowe o regulowanym rozstawie kanałów

Pomagają w jednoczesnym przenoszeniu wielu próbek:

- z probówek do płytek (i odwrotnie),
- między różnymi płytkami (24/48/96-komorowymi).

Szczególne wymagania co do próbek/oznaczania

Do złożonego lub powtarzanego pipetowania warto używać pipet elektronicznych, ponieważ umożliwiają wielokrotne jednakowe dozowanie i można je zaprogramować odpowiednio do określonych protokołów pipetowania. Co więcej, pipety elektroniczne dostarczają danych o większej spójności niż pipety ręczne, ponieważ mikroprocesor eliminuje ryzyko błędu człowieka i zmienność ruchu tłoka. Jest to zauważalne zwłaszcza w przypadku danych wymagających rozcieńczeń seryjnych, kiedy to błędy pipetowania mogą się kumulować, oraz w przypadku aplikacji wymagających amplifikacji, na przykład qPCR.

Każdy rodzaj oznaczania i próbki ma specyficzne cechy, z którymi mogą się wiązać trudności. Na przykład w aplikacjach genomiki zawsze należy używać końcówek z filtrem w celu ograniczenia do minimum skutków, jakie mogłyby zaistnieć w razie zanieczyszczenia DNA próbki lub pipety. Filtry zatrzymują aerozole z próbki zanieczyszczające trzonek, a następnie zanieczyszczające kolejne próbki. Filtry przyczyniają się także do ochrony przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym, substancjami korozyjnymi i osadami soli.

Pipety elektroniczne mogą przynieść korzyści w przypadku:

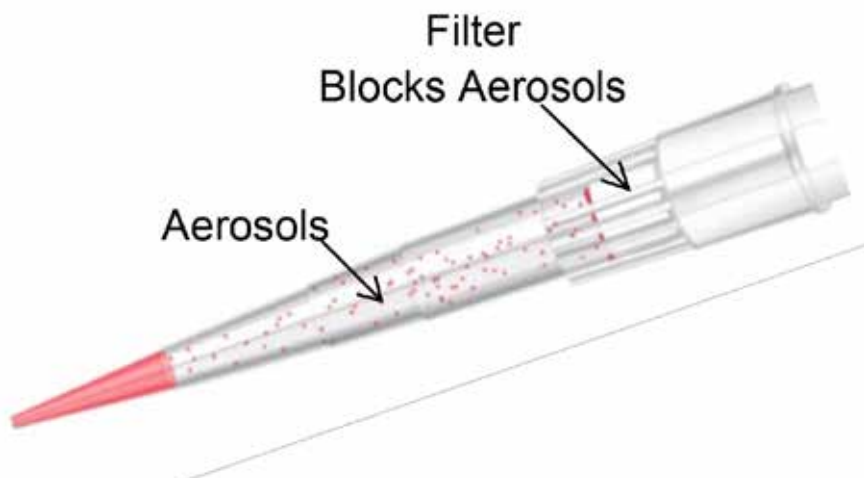
- złożonych lub powtarzalnych protokołów,
- aplikacji wymagających wysokiego stopnia dokładności i precyzji (np. qPCR).



Po wyborze zakresu objętości i typów pipet następnym etapem procesu jest ustalenie właściwych końcówek do wszystkich przewidzianych aplikacji. Końcówki na ogół wykonane są z polipropylenu i mimo że są chemicznie obojętne i odporne na wiele rozpuszczalników, należy wziąć pod uwagę ukryte czynniki związane z samym polipropylenem. O zasadniczych cechach produktu decydują rozmaite żywice polipropylenowe, przy czym w toku produkcji producenci mogą stosować liczne dodatki, które zmieniają niektóre procesy produkcyjne. Niektóre z tych dodatków mogą być ługowane z finalnego produktu i w rezultacie wpływać na wyniki eksperymentów. Aby temu potencjalnemu problemowi zaradzić, zalecany jest zakup końcówek kwalifikowanych jako wolne od różnorodnych substancji ługowalnych, pilnując, aby dostawca udostępnił dokument stanowiący dowód wrażliwości w testach na wszelkie substancje ługowalne i zanieczyszczenia. Jako zanieczyszczenia przykładowo można wymienić DNA i pirogeny, które będą obecne, jeśli proces wytwarzania i pakowania nie zachodzi w środowisku pomieszczenia czystego. Istnieje wiele organizacji zajmujących się kształtkami i opakowaniami, wytwarzających produkty w zakładach, które nie podlegają pełnej kontroli. Dobry zakład produkcyjny dba, aby wszyscy pracownicy mieli na sobie kompletny strój, nakrycie głowy, maski i rękawice oraz aby w środowisku pracy obecne było jedynie powietrze przefiltrowane w celu zapobieżenia zanieczyszczeniu środowiska przez włosy lub owady. Tak jak poprzednio, certyfikaty, które potwierdzają przetestowanie tych materiałów, powinny przedstawiać proces testowania oraz wrażliwość oznaczania — certyfikaty, w których jedynie stwierdza się, że produkt jest wolny od określonego zanieczyszczenia, a nie określa się metody wykrywania ani czułości wykrywania, nie dostarczają żadnych informacji ani zapewnienia jakości.

Wyjątkowa aplikacja

- Końcówki z filtrem służą do minimalizacji skutków wywołanych przez zanieczyszczenie DNA lub przeniesienie materiału z innej próbki.
- Końcówki z filtrem chronią też łok przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym, substancjami korozyjnymi i osadami soli.



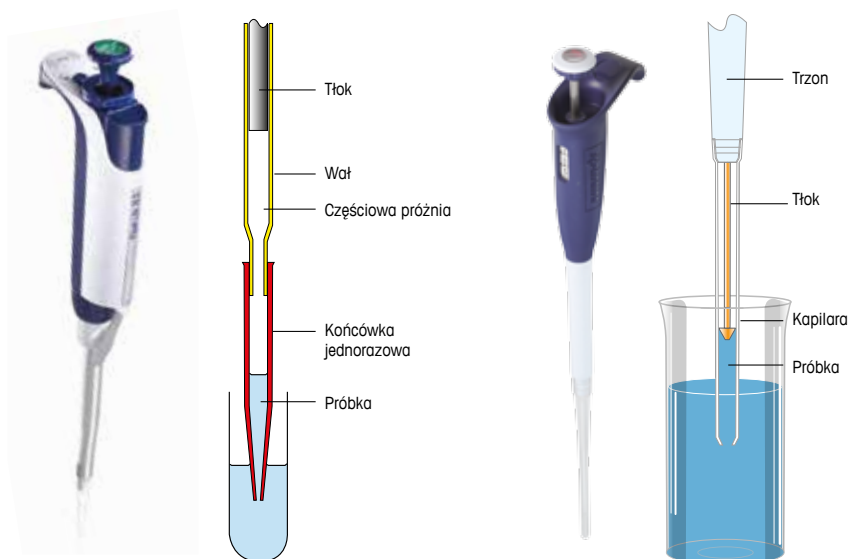
Kolejną kwestią w przypadku końcówek jest dostępność określonych objętości wymaganych w przypadku różnych wybranych pipet, a następnie końcówek specjalnych, które mogą być wymagane w danej aplikacji, np. końcówki z filtrem do aplikacji genomiki. Na koniec odpowiedni rozmiar opakowania zapewni wygodę, dostarczając liczbę końcówek, która wystarczy na dany okres.

W przypadku szeregu różnych objętości do pipetowania potrzebna może być pewna starannie zaplanowana liczba pipet ręcznych, które pozwolą utrzymać się w wymaganych zakresach objętości i uniknąć wielokrotnych zmian objętości.



3. Wybór odpowiedniej pipety

Dostępnych jest wiele narzędzi do pipetowania umożliwiających uzyskiwanie optymalnych rezultatów i większej wydajności, a jednocześnie zapewniających dodatkowe korzyści, takie jak większa ergonomia i lepsza funkcjonalność w danej aplikacji. Istnieją dwa główne typy mikropipet: z poduszką powietrzną i wyporowe (z wyporem bezpośrednim). W obu typach o objętości dozowanej cieczy decyduje średnica tłoka i skok tłoka.



Rysunek 1: Pipeta z poduszką powietrzną i wyporowa

Pipety z poduszką powietrzną

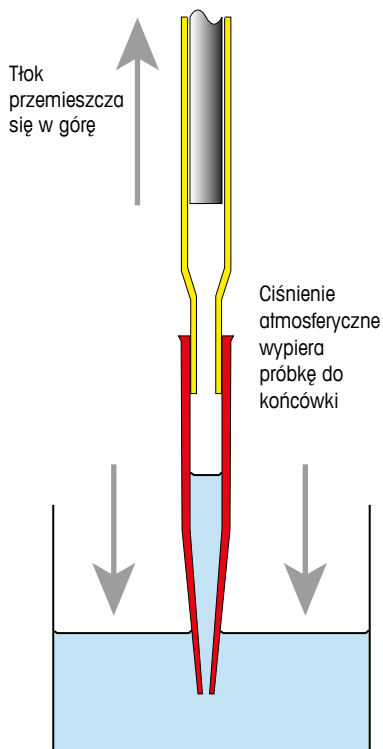
- Niezwykle dokładne w przypadku roztworów wodnych
- Ekonomiczne

Pipety z poduszką powietrzną są najczęściej używanymi przyrządami do pipetowania spotykanymi w laboratoriach. Operowanie tymi pipetami polega na umieszczeniu czubka końcówki w próbce cieczy, a następnie zwolnieniu przycisku trzpienia. Gdy tłok pipety przemieszcza się w górę korpusu pipety, powstaje częściowa próżnia, w wyniku czego próbka cieczy przemieszcza się w końcówce do góry, aż do wypełnienia pustki o wybranej objętości powstałej pod wpływem częściowej próżni.

Pipety wyporowe

- Niezwykle dokładne w przypadku większości roztworów
- Zalecane do cieczy lepkich, gęstych, lotnych lub korozyjnych

Chociaż pipety wyporowe nie są aż tak popularne jako pipety z poduszką powietrzną, często można je spotkać wśród laboratoryjnego sprzętu. W pipetach tych do wytwarzania fizycznej pustki o wybranej objętości służy jednorazowy zestaw złożony z tłoka i kapilary. Tłok bezpośrednio styka się z próbką, a kiedy zostaje przemieszczony do góry, próbka zostaje wciągnięta do kapilary. Pipety wyporowe zapewniają wysoką dokładność i precyzję w przypadku pipetowania roztworów wodnych, niemniej zalecane są do roztworów lepkich, gęstych, lotnych i korozyjnych. Jednorazowe kapilary i tłoki do pipet wyporowych są droższe w porównaniu z jednorazowymi końcówkami do pipet z poduszką powietrzną, dlatego pipety z poduszką powietrzną są zalecane, gdy dostarczają takich samych wyników.



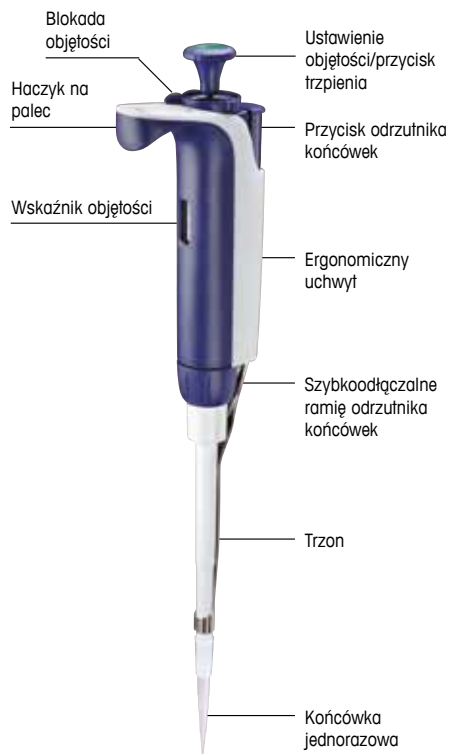
Rysunek 2:
Operowanie pipetą z poduszką powietrzną

Optimalizacja przebiegu prac

Wymagania zakresu objętości i wydajności analizy próbek

Często prace zaczyna się od kilku cieczy o stosunkowo dużych objętościach (np. przygotowanie buforów, nakładanie komórek na płytki itd.), kiedy to przenosi się 5 bądź 10 mL, kładąc na ogół mniejszy nacisk na dokładność. Niemniej w stosowanej na końcu technice wykrywania w grę mogą wchodzić tylko małe objętości i wtedy potrzebne może być dokładniejsze odmierzenie objętości. Należy odpowiednio wyważyć, co jest istotniejsze

— szybkość czy dokładność/precyzja — ponieważ różne narzędzia do dużych objętości mają różne możliwości. Przy wyborze pipety o właściwej objętości zalecane jest kierowanie się wytyczną, według której zakres roboczy należy szacować tak, aby stanowił 35–100% całkowitej wskazywanej objętości. Na przykład użyteczny zakres roboczy pipety o pojemności 1000 μL wynosi 350–1000 μL . Mimo że dla pipety o tej objętości minimum wg specyfikacji może wynosić 100 μL , a do tego możliwa jest regulacja nawet do 0 μL , zalecane jest używanie 350 μL jako minimum, co wynika z techniki stosowanej przez użytkownika. Precyzyjniejsza technika pipetowania wymagana jest do objętości mniejszych niż 35% zakresu pipet. Używanie w pracy nieodpowiedniego zakresu dowolnego przyrządu pogorszy dokładność/precyzję.



Rysunek 3:
Pipeta ręczna



Rysunek 4: Pipeta elektroniczna

Elektroniczne pipety jednokanałowe

Pipety elektroniczne dostępne są od połowy lat 80. XX w. W elektronicznych pipetach z poduszką powietrzną zasysanie i dozowanie odbywają się pod kontrolą mikroprocesora, a inicjowane są naciśnięciem wyzwalacza (spustu), nie trzeba więc naciskać ani zwalniać przycisku trzpienia kciukiem. Większość użytkowników, używając pipety elektronicznej, pobiera i dozuje próbki w sposób bardziej spójny, uzyskując lepszą dokładność i powtarzalność. Praktycznie zostaje wyeliminowana jakakolwiek zmienność wyników zależna od użytkownika. Nowoczesne pipety elektroniczne powinny być proste w obsłudze, posiadać dobry interfejs użytkownika i duży kolorowy ekran. Są wszechstronne i nadają się do wykonywania złożonych zadań z dużą dokładnością, takich jak wielokrotnie powtarzane dozowanie, miareczkowanie pod kontrolą, rozcieńczanie seryjne, pomiar nieznanych objętości próbek czy inne programowalne funkcje. W pipecie elektronicznej można łatwo zaprogramować powtarzalny ruch tłoka w celu mieszania dwóch roztworów w końcówce. Za pomocą pipet elektronicznych z regulatorami szybkości zasysania i dozowania można pipetować rozmaite ciecze. Największe szybkości doskonale nadają się do pipetowania próbek roztworów wodnych, a szybkości mniejsze — do próbek lepkich, pieniających się lub wrażliwych na siły ścinające.

Pipety wielokanałowe

Pipety wielokanałowe doskonale nadają się do aplikacji wymagających wysokiej wydajności, m.in. do testów ELISA z płytkami 96-komorowymi oraz do procesów PCR do syntezy DNA. Pipety wielokanałowe o zaawansowanej konstrukcji, takie jak lekkie modele 8- i 12-kanałowe firmy Rainin, są ergonomiczne oraz umożliwiają szybkie i bezpieczne napełnianie końcówek, a przy tym zapewniają spójne pobieranie próbek we wszystkich kanałach. Modele o regulowanym rozstawie kanałów umożliwiają użytkownikowi ustawianie odstępów między końcówkami w celu dozowania próbek pobranych z płytek 96-komorowych do stojaków probówkowych lub do płytek 24-komorowych. Pipety wielokanałowe i pipety o regulowanym rozstawie kanałów dostępne są jako ręczne i elektroniczne i w szerokim zakresie objętości.



Rysunek 5: Pipety wielokanałowe

Systemy pipetowania o dużej wydajności

Systemy pipetowania, które zasysają i dozują próbki w 96 komorach jednocześnie, doskonale nadają się do szybkiego i sprawnego wykonywania prac, w których używane są płytki wielokomorowe. Do niedawna drogie systemy robotowe były jedynym środkiem umożliwiającym pipetowanie 96-komorowe, czyli na całej płytce. Jednak Rainin Liquidator 96 — w pełni ręczny stołowy system pipetowania, nie wymagający zasilania elektrycznego, programowania ani szkolenia operatora — upraszcza i usprawnia pipetowanie 96-komorowe i 384-komorowe, a przy tym można go używać w laboratorium lub w terenie.



Rysunek 6:
Stołowy system pipetowania Liquidator

Pipety specjalne

Pipety innego typu (lub inne urządzenia do przenoszenia cieczy) są mniej popularne niż pipety z poduszką powietrzną, ale osoby prowadzące badania często chętniej je wybierają ze względu na ich szczególną konstrukcję i zastosowanie.

Pipety wyporowe

Rainin Pos-D stanowi przykład ręcznej pipety wyporowej. W pipetach tych do wytwarzania fizycznej pustki o wybranej objętości służy jednorazowy zestaw złożony z tłoka i kapilary. Tłok wchodzi w kontakt z próbką, a kiedy zostaje przemieszczony do góry, próbka zostaje wciągnięta do kapilary. Pipety te w sposób całkowity zapobiegają zanieczyszczeniu krzyżowemu pipety przez próbkę, ponieważ do każdej próbki używany jest nowy tłok. Cecha ta sprawia, że doskonale nadają się do procesów PCR i innych krytycznych aplikacji. Pipety wyporowe zalecane są do roztworów lepkich, gęstych, lotnych i korozyjnych.



Rysunek 7:
Pipeta wyporowa



Pipety powtarzalne

Pipety powtarzalne — wyposażone w końcówkę strzykawkową i wbudowany tłok — działają na zasadzie bezpośredniego wyporu. Są przeznaczone do pobierania próbki cieczy o dużej objętości, a następnie dozowania jej w postaci wielu równych alikwot. Dostępne są w wersji elektronicznej i ręcznej. Używane są z jednorazowymi końcówkami strzykawkowymi o rozmaitej objętości.

Rysunek 8:
Pipety powtarzalne: elektroniczna (po lewej) i ręczna

Sterowniki pipet

Sterowniki pipet — używane głównie do dużych objętości (25–100 μL) — to urządzenia elektroniczne lub ręczne, które zapewniają siłę ssącą do szklanych lub plastikowych pipet serologicznych. Pipetę mocuje się do miękkiego stożka, po czym użytkownik naciska przycisk na sterowniku pipety, aby wytworzyć częściową próżnię wewnątrz szklanej lub plastikowej pipety. W miejsce częściowej próżni zostaje wprowadzona ciecz wyparta przez ciśnienie atmosferyczne. Po przeniesieniu do innego naczynia ciecz dozuje się przez naciskanie drugiego spustu lub grawitacyjnie. Najprostsze wersje wyposażone są w miękką, sprężystą gruszkę. Ściskając ją ręcznie i zwalniając uścisk, można wytwarzać i kontrolować częściową próżnię.



Rysunek 9:
Elektroniczny sterownik pipety

Dozowniki butelkowe

Niektóre ciecze laboratoryjne ze swej natury (np. ciecze korozyjne lub toksyczne) najlepiej pozostawić na swoim miejscu pod okapami wyciągowymi lub w komorach bezpieczeństwa. Do przenoszenia stosunkowo niewielkich ilości takich cieczy przydaje się dozownik butelkowy. Dozownik działa na skutek pompowania. Nowsze wersje zapewniają dokładne i bezpieczne podawanie „niebezpiecznych” cieczy o objętościach do 50 mL.



Rysunek 10: Dozownik butelkowy



4. Wybieranie odpowiedniej końcówki: konstrukcja, jakość i dopasowanie

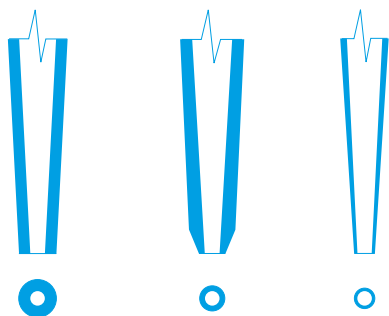
Pipetę i końcówkę zalecaną przez jej producenta najlepiej traktować jako system, a nie dwa osobne komponenty. Końcówki pipet reklamowane jako przeznaczone do wszystkich pipet często wykazują niedostatki pod względem dopasowania lub konstrukcji, ponieważ z założenia mają pasować do rozmaitych modeli pipet. Wybierając końcówki pipet, należy kierować się ich konstrukcją, jakością i dopasowaniem.

Konstrukcja końcówki

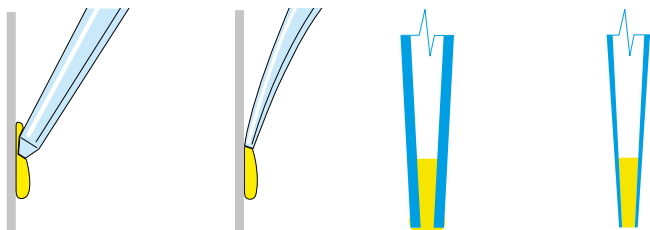
Końcówki pipet o najbardziej zaawansowanej konstrukcji to elastyczne, cienkościennie końcówki z małym otworem wylotowym. W przypadku pipetowania małych objętości, poniżej 20 μL , końcówki Rainin FinePoint™ zapewniają lepszą dokładność o precyzję w stosunku do końcówek standardowych, które mają grubsze ścianki lub fazowane czubki.

Końcówki FinePoint są bardziej elastyczne niż większość końcówek standardowych. Sprawiają, że próbka cieczy może wypływać przy dowolnym kącie końcówki, co zapewnia kompletne wydanie próbki. To znaczy, że dużo mniej próbki pozostaje na końcówce w porównaniu z końcówkami o grubych ściankach lub fazowanych czubkach.

Różnice w konstrukcji końcówek mają wpływ na działanie, dokładność i precyzję. Niemniej jednak, gdy pipety używane są prawidłowo, będą działać z gwarantowaną sprawnością oraz właściwymi dokładnością i precyzją, pod warunkiem stosowania końcówek zalecanych przez producenta.



Rysunek 11:
Końcówka grubościenna (po lewej), końcówka fazowana (pośrodku) oraz końcówka Rainin FinePoint (po prawej)



Rysunek 12: Dozowanie (po lewej) i retencja (po prawej) próbki w przypadku końcówki fazowanej i FinePoint

Jakość końcówki

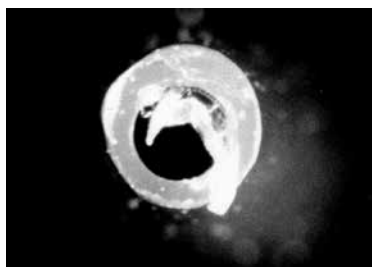
Najpoważniejsze wady jakościowe występują przy otworze wylotowym, czyli na czubku końcówki, gdzie mają największy wpływ na zasysanie i dozowanie. Na rysunku 13 przedstawiono cztery czubki końcówek w powiększeniu.

Wypływka to resztki tworzywa sztucznego pozostała po procesie formowania wewnątrz końcówki lub na obrzeżu otworu.

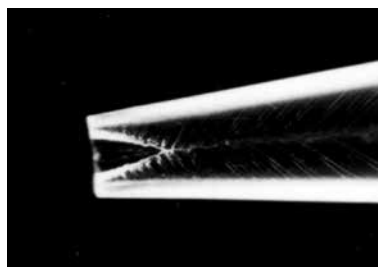
Wady formowania i **wady koncentryczności** wynikają z niewłaściwego opalania kołków formujących otwór po wtrysku tworzywa sztucznego do formy. Wszystkie te wady powodują utratę części próbki podczas pipetowania. Wysokiej jakości proces produkcyjny pozwoli do minimum ograniczyć występowanie wad końcówek oraz błędów będących ich następstwem.



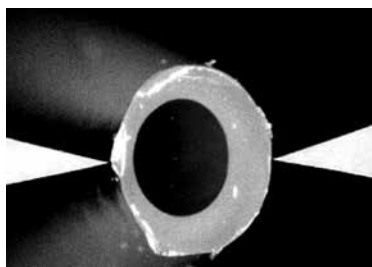
Wysokiej jakości otwór wylotowy



Wypływka na otworze wylotowym



Wada formowania



Wada koncentryczności

Rysunek 13: Otwory wylotowe końcówek odpowiadające dobrej końcówce i trzem rodzajom wad

Uszczelnienie końcówki pipety

Większość końcówek stożkowych ma taką budowę, aby pasowała do pipety dowolnej marki. W ich przypadku uszczelnienie między wnętrzem końcówki a zewnętrzną powierzchnią trzonka pipety jest duże, aby możliwe było mocowanie jak najszerszego asortymentu pipet. Nie ma żadnego mechanizmu, który sygnalizowałby moment, w którym końcówka o uniwersalnym dopasowaniu jest prawidłowo uszczelniona. Dlatego na ogół użytkownik musi siłą wprowadzić trzonek pipety do końcówki, aby zapewnić należyte uszczelnienie.

Ponieważ angażowane jest przy tym całe przedramię, względnie łatwo jest zastosować zbyt dużą siłę przy mocowaniu końcówek. Skutkiem tego na ogół jest konieczność użycia odpowiednio dużej siły w celu odrzucenia końcówki. Konkludując: siła wymagana do zamocowania i odrzucenia końcówki o uniwersalnym dopasowaniu może zwiększyć ryzyko urazów typu RSI (powstałych wskutek powtarzanego wysiłku), zwłaszcza w przypadku długotrwałego posługiwania się pipetą.

System odrzucania końcówek LTS™ LifeTouch™

Znając kwestie ergonomii i siły związane z mocowaniem i odrzucaniem końcówek oraz inne problemy z uszczelnieniem końcówek (zwłaszcza w pipetach wielokanałowych), firma Rainin opracowała nową konstrukcję końcówek o nazwie LifeTouch™ System, w skrócie LTS™, aby radykalnie poprawić dopasowanie między końcówkami pipet a trzonkami. LTS sprawia, że do wprowadzania trzonka pipety i odrzucania końcówek wymagana jest dużo mniejsza siła.

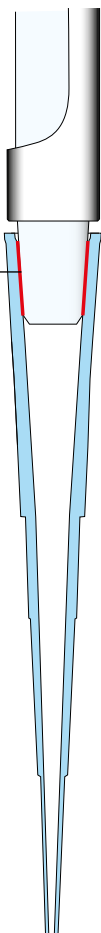
Na zmniejszenie siły niezbędnej do odrzucania końcówek wpływają razem następujące dwie cechy systemu LTS:

- Mała powierzchnia uszczelnienia sprawia, że końcówki bardzo łatwo zostają uszczelnione.
- Ogranicznik utworzony przez schodek wewnątrz końcówki zapobiega siłowemu wciśnięciu trzonka do końcówki.

Powierzchnia uszczelnienia została tak opracowana, aby zapewniała dobrą stateczność poprzeczną, dzięki czemu zapobiega wypadaniu końcówki podczas użytkowania.

Uniwersalny

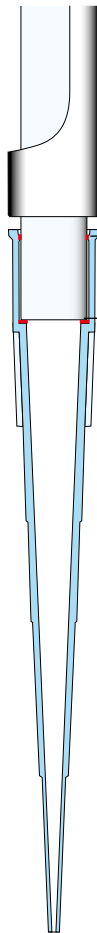
Duża powierzchnia
uszczelnienia



LTS (LifeTouch System)

Niewielkie
uszczelnienie

Punkt
zatrzymania



Rysunek 14: Systemy mocowania końcówek: uniwersalny (stożkowy) i LTS (cylindryczny)

Wybór końcówek

W skrócie: aby zapewnić płynny, stały przepływ próbki oraz niższe ryzyko zanieczyszczenia próbki, przy wyborze końcówek pipet warto wziąć pod uwagę:

Materiał końcówki. Końcówki powinny być wykonane z materiału o bardzo małej retencji, na przykład pierwotnego polipropylenu, który nie zawiera dodatków, barwników ani materiałów z recyklingu.

Konstrukcja końcówki. Grubość ścianek, elastyczność, rozmiar otworu wylotowego i wykończenie powierzchni to ważne czynniki, decydujące o dopasowaniu pipety i przepływie cieczy do końcówki i z końcówki.

Jakość końcówki. Czy końcówki wytwarzane są w pomieszczeniu czystym? Czy można prześledzić pochodzenie poszczególnych partii? Czy końcówki nie mają dodatków ani wad, które mogłyby spowodować utratę części próbki i błąd?

Końcówki specjalne do szczególnych aplikacji

Istnieje kilka „niestandardowych” typów końcówek, które przydają się do specjalnych aplikacji i przebiegów prac.

Końcówki Rainin Gel-Well™ są przeznaczone specjalnie do nakładania warstw żeli. Dostępne są w wersjach z czubkami płaskimi i okrągłymi o bardzo małych otworach wylotowych.

Końcówki szerokootworowe są przeznaczone do operowania delikatnymi próbkami, na przykład całymi komórkami lub DNA o dużej masie molekularnej. Końcówki te zalecane są także w przypadku pipetowania roztworów soli lub zawiesin komórkowych, ponieważ ułatwiają pobieranie próbek i zapobiegają rozpadowi komórek.

Końcówki niskoretencyjne zawierają specjalnie spreparowane superhydrofobowe polimery, które umożliwiają takie dozowanie nadzwyczaj „kleistych” próbek, na przykład białek, aby w całości wydostały się z czubka końcówki i żadna część próbki nie pozostała w końcówce.

Końcówki Rainin ShaftGard™ chronią trzonek pipety i odrzutnik końcówek przed przypadkowym zanieczyszczeniem dzięki zamknięciu tych elementów wewnątrz końcówki. Końcówek ShaftGard można używać w wąskich probówkach lub głębokich komorach bez ryzyka, że jakkolwiek część pipety dotknie ścianek naczynia.

Końcówki wydłużone są węższe i dłuższe niż inne końcówki o równoważnej objętości. Mała średnica i długość 102 mm umożliwiają sięgnięcie tymi końcówkami dna wąskich probówek i głębokich komór tak, że żadna część pipety ani odrzutnika końcówek nie dotknie ścianek naczynia.

Końcówki z filtrem służą do eliminacji zanieczyszczeń krzyżowych pipety bądź zanieczyszczeń pochodzących od aerozoli, bez wywoływania jakiegokolwiek zauważalnej różnicy w działaniu pipety. Używanie końcówek z filtrem jest zalecane w przypadku pipetowania roztworów lotnych, ponieważ zapobiegają przedostawaniu się potencjalnie korozyjnych oparów do trzonka pipety oraz uszkodzeniu tłoka.

Końcówki kapilarno-tłokowe są przeznaczone do pipet wyporowych. Najskuteczniejsze są w przypadku roztworów niewodnych, które są gęste, lepkie lub lotne, lub w przypadku pipetowania zimnych albo ciepłych roztworów wodnych.

Końcówki do przygotowywania próbek. Końcówki do przygotowywania próbek z żywicą umieszczoną w wąskim czubku końcówki są dostępne od niedawna. Konstrukcja końcówek Rainin PureSpeed „z żywicą w środku” oferuje wygodne, niedrogie i półautomatyczne oczyszczanie biomolekuł, odsalanie lub używanie w aplikacjach wymiany jonowej.



Rysunek 13: (Od lewej do prawej) Gel-Well, ShaftGard, szerokootworowa, niskorefencyjna, wydłużona, z filtrem, kapilarno-tłokowa



Rysunek 14: Końcówka Rainin PureSpeed do przygotowywania próbek

5. Techniki pipetowania

Prawidłowa ocena aplikacji oraz oparty na niej wybór przyrządów będą mieć znaczący wpływ na wyniki badań. Nie są to jedyne aspekty, jakie badacze powinni wziąć pod uwagę, chcąc uzyskiwać jak najlepsze wyniki badań. Na wyniki badań będą mieć znaczący wpływ także inne czynniki, takie jak poprawna technika pipetowania oraz przyrządy bądź otoczenie. Dokładność i precyzja mają w badaniach naukowych zasadnicze znaczenie. W związku z tym na kolejnych stronach podajemy zwięzłe omówienie różnych zagadnień dotyczących technik pipetowania. Czy wiesz, że stosując te techniki, możesz zwiększyć dokładność i precyzję nawet o 5%?

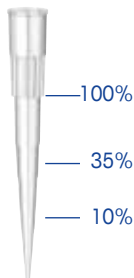
Optymalny zakres objętości

Normalny zakres roboczy większości pipet wynosi 10–100% objętości znamionowej. Mimo że taki zakres traktowany jest jako roboczy, parametry pipet zmieniają się wraz z obniżaniem ustawienia objętości.

Według specyfikacji dokładność 100-mikrolitrowej pipety wynosi $\pm 0,8\%$ w zakresie 50–100% pojemności znamionowej. Jeśli ustawienie objętości zostanie jeszcze obniżone do 10 μL (czyli 10% pojemności znamionowej), niedokładność będzie 3-krotnie większa, czyli wyniesie 2,5–3%.

Dlatego optymalna objętość, która zapewnia największą dokładność i precyzję, wynosi z reguły 35–100% pojemności znamionowej. Należy starać się unikać ustawiania objętości pipety poniżej 10% ustawienia maksymalnego, a w zamian do mniejszych objętości stosować pipetę o mniejszej pojemności.

Zakres względem objętości



Pipetowanie z ustawieniem obniżonym do 10% może pogorszyć dokładność nawet o 3%.

Głębokość zanurzenia końcówki

Właściwa głębokość zanurzenia końcówki może poprawić dokładność nawet o 5%, co jest ważne zwłaszcza w przypadku pipet do mikroobjętości. Końcówka powinna być zanurzona na 1–2 mm w przypadku pipet do mikroobjętości oraz na 6–10 mm w przypadku pipet do dużych objętości, zależnie od rozmiaru końcówki. Jeśli końcówka zostanie zbyt głęboko zanurzona, objętość gazu w końcówce zmniejszy się pod wpływem ciśnienia, co spowoduje, że zassana zostanie zbyt duża ilość cieczy. Wyniki może zaburzyć także pozostanie cieczy na powierzchni końcówki. Jeśli końcówka nie zostanie zanurzona dostatecznie głęboko, może zostać wciągnięte powietrze, czego skutkiem będą pęcherzyki powietrza. W obu przypadkach efektem będzie niedokładnie odmierzona objętość.

Głębokość zanurzenia końcówki



1–10 μL : 1–2 mm

10–200 μL : 2–3 mm

200–2000 μL : 3–6 mm

Właściwa głębokość zanurzenia końcówki może poprawić dokładność nawet o 5%, należy zatem przestrzegać zalecanych głębokości, jak pokazano na rysunku (gdy $>2000 \mu\text{L}$, zanurzyc na głębokość 6–10 mm).

Zasysanie pod właściwym kątem

Końcówka pipety powinna być zanurzona w próbce pod kątem jak najbliższym 90° , tak aby jej odchylenie od pionu nie przekraczało 20° .

W przypadku pipet do mikroobjętości trzymanie ich w pozycji maksymalnie zbliżonej do pionowej może poprawić dokładność nawet o 2,5%.

Jeśli odchylenie jest większe niż 20° , skutkiem mogą być niedokładne pomiary. Do końcówki zostaje wtedy zassana zbyt duża ilość cieczy, co przekłada się na niedokładność odmierzenia.

Kąt zanurzenia



Kąt prawidłowy



Kąt nieprawidłowy

Zanurzenie pod kątem 60° może sprawić, że ciecz zostanie zassana w ilości nawet o 0,7% większej od zamierzonej.

Zachowywanie spójności

Utrzymywanie stałego rytmu i szybkości pipetowania przyczyni się do uzyskania optymalnych, bardziej powtarzalnych wyników. Zachowując stały rytm i szybkość, można poprawić dokładność nawet o 5%.

Stały rytm pipetowania

Kolejne próbki należy pipetować w stałym rytmie. Należy unikać pośpiechu, lecz pilnować rytmu na każdym etapie cyklu pipetowania.

Pipety o dużej pojemności

W przypadku dużych objętości — zwykle 1 ml lub większych — po pobraniu próbki należy poczekać około 1 sekundy lub dłużej z końcówką wciąż zanurzoną w cieczy. Takie postępowanie pozwoli na całkowite zassanie próbki.

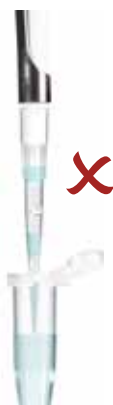
Płynny ruch trzpienia

Podczas naciskania i zwalniania trzpienia tłoka należy zachowywać stałą szybkość i płynność ruchu. Skutkiem niekontrolowanego zassania mogą być pęcherzyki powietrza, rozpryski, aerozole oraz zanieczyszczenie trzonu i tłoka pipety, a także utrata części objętości próbki.

Spójny rytm i szybkość pipetowania



Zasysanie prawidłowe



Końcówka z zassanym powietrzem

Spójne dozowanie próbek

Aby uzyskać największą dokładność i powtarzalność dla kolejnych próbek, przy dozowaniu należy dbać, aby próbka została wydana do ostatniej kropli, tak aby żadna pozostałość nie przywierała do otworu wylotowego. Ta spójność jest szczególnie ważna w przypadku pipetowania mikroobjętości, ponieważ w grę wchodzi bardzo małe objętości próbek.

Dobra technika dozowania może poprawić dokładność nawet o 1%. Dozując próbkę, należy pamiętać, aby czubek końcówki dotykał ścianek naczynia, co zapobiegnie pozostawieniu próbki w końcówce. Wyjmując końcówkę po dozowaniu, jej czubek należy przesunąć po ściance w górę naczynia, aby uwolnić ciecz, jaka mogła jeszcze pozostać przy otworze wylotowym.

Spójne dozowanie próbek



Dozowanie na ściankę naczynia



Dozowanie do cieczy



Dozowanie na powierzchnię cieczy

Należy dozować do cieczy albo na powierzchnię cieczy.

W przypadku dozowania bezpośrednio do cieczy lub na ciecz należy stosować odwrócony tryb pipetowania, aby uniknąć pobrania próbki po dozowaniu.

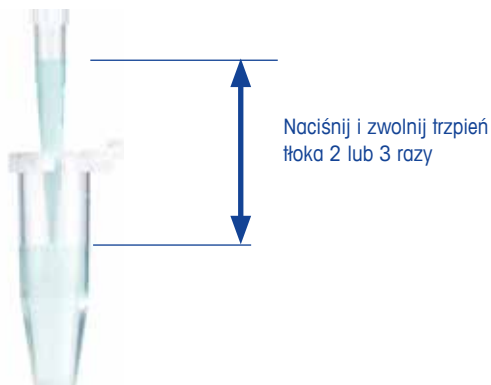
Wstępne płukanie końcówek

Dwu- lub trzykrotne wstępne płukanie końcówki powoduje powstanie warstewki cieczy na wewnętrznej powierzchni końcówki, co może przynieść poprawę dokładności sięgającą 0,2%. Wstępne płukanie pomaga zneutralizować zjawiska kapilarne w pipetach do mikroobjętości, a w przypadku pipet do dużej objętości wyrównuje temperaturę powietrza wewnątrz końcówki do temperatury próbki.

Wyjątki w stosowaniu wstępnego płukania

Wstępne płukanie może niekorzystnie wpłynąć na wyniki w przypadku pipetowania roztworów ciepłych i zimnych, na przykład z łaźni lodowej, lub roztworów o temperaturze wyższej niż 37°C, ponieważ skutkiem mogłyby być błędy sięgające 5%.

Wstępne płukanie końcówki



Unikanie wahań temperatury

Stała temperatura pomieszczenia

Idealna temperatura do pipetowania wynosi $21,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ — taka sama jak używana do kalibracji. Należy unikać miejsc, w których panują przeciągi, lub nasłonecznionych, ponieważ może w nich dochodzić do dużych i nagłych zmian temperatury, obniżających dokładność zasysania. Pipetowanie w stałej temperaturze może poprawić wyniki nawet o 5%.



Pozostawić czas na osiągnięcie równowagi

Innym ważnym aspektem dotyczącym zmienności temperatury jest czas potrzebny do osiągnięcia równowagi termicznej. Pipety reagują na różnice temperatur między różnymi próbkami. Zimne ciecze z reguły odmierzane są z nadmiarem, natomiast przy odmierzaniu cieczy ciepłych objętości mogą być mniejsze od oczekiwanych. O ile nie podano inaczej, zanim pipety i ciecze zostaną użyte, należy odczekać dostatecznie długi czas, aby ich temperatury się wyrównały.

Efekty wywoływane ciepłem ręki

Podczas długotrwałego pipetowania ciepło ręki może spowodować ogrzanie pipety, w wyniku czego powietrze w jej wewnętrznej przestrzeni rozszerzy się i doprowadzi do uzyskiwania niedokładnych wyników.

Należy zapobiegać efektom wywołwanym ciepłem ręki, używając wysokiej jakości pipet wykonanych z polimerów PVDF. Ponadto w przerwach między cyklami pipetowania pipetę należy odstawiać do stojaka, zamiast trzymać ją w ręce.



Spójne ustawienia mikrometra

Aby zmienić ustawienie objętości z wyższego na niższe, należy pokręcić kółkiem w dół do odpowiedniego wskazania objętości. Niemniej jednak, aby zmienić ustawienie objętości z niższego na wyższe, kółkiem selektora należy wykonać dodatkowo $1/3$ obrotu powyżej odpowiedniego wskazania objętości. Pozwoli to wyeliminować mechaniczny luz, co przełoży się na wyższą dokładność.





Jakie ryzyko towarzyszy pipetowaniu?

Dobra Praktyka Pipetowania to kompleksowy program dostosowany do indywidualnych potrzeb, umożliwiający określenie ryzyk związanych z konkretnymi procesami pipetowania i zapoznanie się z metodami ich ograniczania. Na początek proponujemy krótki test GPP Risk Check™ — wystarczy poświęcić 5 minut, aby otrzymać ocenę ryzyk związanych z procesem pipetowania i zalecenia umożliwiające ich zmniejszenie.



METTLER TOLEDO ma w ofercie kompleksowe szkolenia z zakresu zarządzania ryzykiem i dobrej praktyki pipetowania. Jeśli ta oferta jest dla Ciebie interesująca, prosimy o kontakt z przedstawicielem produktów Rainin.

► pl.mt.com/gpp

pl.mt.com/rainin

Więcej informacji

Mettler-Toledo AG

CH-8606 Greifensee, Switzerland

Telefon +41-44-944 22 11

Fax +41-44-944 30 60

Zastrzegamy sobie prawo do wprowadzania zmian technicznych.

© 08/2013 Mettler-Toledo AG

Global MarCom Switzerland