

Priručnik o pipetiranju

RAININ

Pipetting 360°



Pipete
Nastavci
Tehnike

Procjena
Odabir
Tehnike

Za bolje rezultate

Brzi vodič za pravilno pipetiranje

METTLER TOLEDO



Sadržaj

1. Predgovor	4
2. Planiranje projekata, tijekom rada i odabir	5
Planiranje projekata i tijekom rada	5
Analiza tijeka rada	5
Optimizacija tijeka rada	7
Raspon volumena i zahtjevi vezani uz protok uzoraka	7
Zahtjevi vezani uz format spremnika za uzorak/reagens	10
Zahtjevi vezani uz specifičan uzorak/test	11
3. Odabir odgovarajuće pipete	15
Pipete koje rade na principu istiskivanja zraka	16
Pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena	16
Optimizacija tijeka rada	17
Raspon volumena i zahtjevi vezani uz protok uzoraka	17
Elektroničke jednokanalne pipete	19
Višekanalne pipete	20
Sustavi za pipetiranje velikog protoka	21
Pipete za posebne namjene	22
Pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena.	22
Repetitivne pipete.	23
Kontroleri pipetiranja.	24
Dispenzori za boce.	25
4. Odabir odgovarajućeg nastavka: Dizajn, kvaliteta i prijanjanje	27
Dizajn nastavka	27
Kvaliteta nastavka	28
Brtva nastavka za pipetu	29
Sustav za izbacivanje nastavka LTST™ LiteTouch™	29
Odabir nastavka	31
Specijalizirani nastavci za posebne namjene	31

Sadržaj

5. Tehnike pipetiranja	34
Optimalan raspon volumena	35
Dubina uranjanja nastavka	36
Aspiracija pod ispravnim kutom	37
Održavanje dosljednosti	38
Dosljedno dispenziranje uzoraka	39
Prethodno ispiranje nastavaka	40
Sprječavanje varijacija u temperaturi	40
Dosljedne postavke mikrometra	41
Koji su vaši rizici pri pipetiranju?	44

1. Predgovor

Dobra praksa pipetiranja namijenjena je da pomogne znanstvenicima pri donošenju informiranih odluka o opremi, ispravnim tehnikama pipetiranja i ergonomskim tehnikama te o kalibraciji i rutinskom radu za postizanje najboljih rezultata.

Pipetiranje, odnosno mjerenje i prijenos malih volumena tekućina u mikrolitrima i mililitrima radnja je koja se vjerojatno najčešće izvodi u istraživačkim laboratorijima, a brzo i precizno obavljanje tog zadatka nužan je preduvjet za uspješan rad u laboratoriju. Suvremene pipete koje rade na principu istiskivanja zraka koriste se za veći dio rada u laboratoriju zbog njihovih brojnih prednosti – idealan su instrument za učinkovito doziranje malih količina tekućine. Zahvaljujući uporabi suvremenih pipeta i nastavaka velike kvalitete moguća je visoka razina produktivnosti i odgovarajuća ušteda sati rada.

2. Planiranje projekata, tijek rada i odabir

Planiranje projekata i tijek rada

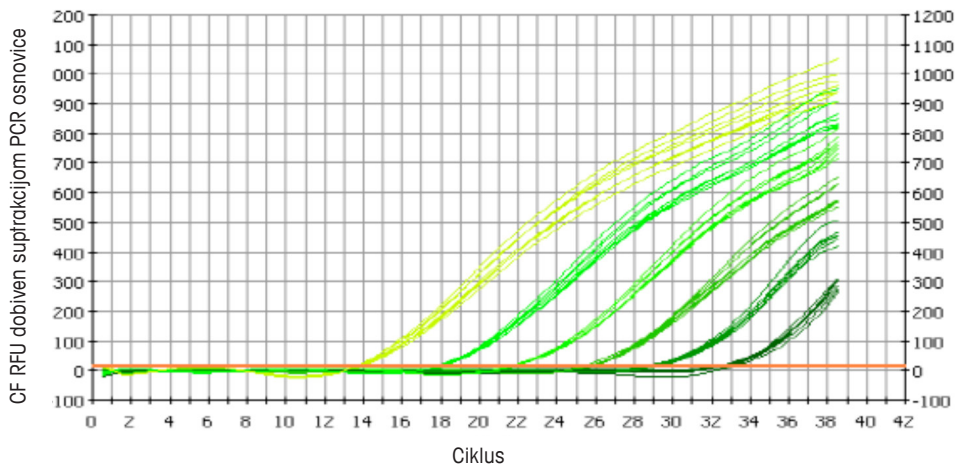
Za većinu novih projekata koristan je cjelovit postupak planiranja pri kojem se analiziraju svi koraci u tijeku rada za postizanje maksimalne učinkovitosti i za dobivanje podataka. Kada je riječ o rukovanju uzorcima, potrebno je razumijevanje vrste polaznog uzorka, potrebne krajnje analize i protoka uzoraka. U skladu s time određuju se tehnike koje će se koristiti i potrebni formati spremnika za rukovanje tekućinama (epruvete, pločice itd.). Prema tome se pak određuju optimalni alati za rukovanje tekućinama za taj tijek rada. Pri svim aktivnostima ili radnjama vezanima uz pipetiranje, pipeta, pripadajući nastavak i tehnika korisnika moraju se smatrati jednim sustavom prenošenja potrebnog volumena tekućine. Odabir ispravne pipete i nastavka te uporaba najučinkovitije tehnike sastavni su dio osmišljavanja i provođenja svih projekata ili eksperimenata.

Analiza tijeka rada

Prvi korak postupka određivanje je svih koraka uključenih u tijek rada eksperimenta, od izoliranja inicijalnog uzorka do sastavljanja konačnih podataka, a također i svih pripremljenih koraka koji olakšavaju tijek rada, npr. priprema pufera ili reakcijske smjese. Sljedeći je određivanje koliko se pogrešaka može tolerirati kako bi podaci dobiveni eksperimentom bili ispravni. Određeni načini primjene i određeni koraci mnogo su podložniji eksperimentalnim pogreškama od drugih, primjerice svi eksperimenti koji uključuju umnažanje, kao što je qPCR, mogu biti podložni pogreškama, dok jednostavna priprema pufera nije nužno podložna pogreškama. Odabir pipete i nastavka koji nije optimalan te loša tehnika pipetiranja mogu dovesti do većih eksperimentalnih pogrešaka, npr. na sve eksperimente koji ovise o standardnoj krivulji pripremljenoj serijskim razrjeđenjima standardnih otopina može značajno utjecati pipetiranje koje nije optimalno.

Analiza tijeka rada

- Određivanje maksimalne tolerancije za eksperimentalne pogreške
- Određivanje načina primjene i koraka s najvećom mogućnosti pogrešaka
 - qPCR
 - Serijska razrjeđenja



Optimizacija tijeka rada

Raspon volumena i zahtjevi vezani uz protok uzoraka

Tijek rada često uključuje početak rada s nekoliko tekućina relativno velikih volumena (npr. priprema pufera, nasadivanje stanica itd.) gdje prenošenje 5 ili 10 ml s manjim naglaskom na točnost može biti uobičajeno. Međutim, konačna tehnika otkrivanja može koristiti samo male volumene i stoga će možda biti potrebna veća točnost za prenošenje volumena.

Potrebe za brzinom i točnosti/preciznosti moraju biti uravnotežene jer različiti alati za velike volumene imaju različite mogućnosti. Preporučena smjernica za odabir ispravne pipete za volumen služi za procjenu radnog raspona između 35 i 100 % ukupnog naznačenog volumena. Primjerice, pipeta od 1000 μL ima radni raspon između 350 i 1000 μL . Iako minimalne specifikacije mogu biti 100 μL na toj pipeti za volumen, a instrument se može podesiti na 0 μL , preporuka za uporabu 350 μL kao minimum temelji se na korisničkoj tehnici. Preciznija tehnika pipetiranja potrebna je za volumene ispod raspona od 35 % za pipete. Rad pri neprikladnom rasponu instrumenta ugrožit će točnost/preciznost.

Vrste pipeta	Model	Min. kapacitet	Maks. kapacitet	Točnost 10 %	Preciznost 10 %	Točnost 50 %	Preciznost 50 %	Točnost 100 %	Preciznost 100 %
Pipeta koja radi na principu pozitivnog istisnog volumena	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 koja radi na principu istiskivanja zraka	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 %

Točnost i preciznost

Točnost je sposobnost pipete da dispencira količinu tekućine volumena što sličnijeg onom određenom postavkom volumena. Uobičajena specifikacija točnosti za pipete koje rade na principu istiskivanja zraka iznosi približno 1 % za pipete čije su postavke nazivnog volumena veće od 35 %. Za pipete s postavkom volumena od 10 % ili manje, te specifikacije mogu biti do 3 puta manje točne.

Preciznost označava sposobnost pipete da dispencira slične, ponovljive uzorke tekućine. Uobičajena specifikacija preciznosti za pipete koje rade na principu istiskivanja zraka iznosi otprilike 1/3 ili 1/4 specifikacije točnosti. Preciznost se često naziva ponovljivošću ili ponovljivošću uzorka te također standardnim odstupanjem.

Određene vrste pipeta bolje su prilagođene od drugih za različite vrste uzoraka. Na primjer, za viskozne uzorke potrebne su drugačije tehnike ili modeli pipeta kako bi se ostvarila dobra preciznost i točnost prilikom izvođenja eksperimenta. U tablici u nastavku možete pronaći više informacija:

Vrsta otopine uzorka		Raspon volumena	Preporučena otopina	
			Ručni sustavi	Elektronički sustavi
Viskozna, organsko otapalo, ekstremna temperatura	Uzorci velikog volumena	20–50 mL	AutoRep S	AutoRep E
Neviskozna, vodena, sobna temperatura		20–50 mL	AutoRep S	Pipet-X
Viskozna, organsko otapalo, ekstremna temperatura		1–20 mL	AutoRep S	AutoRep E
Neviskozna, vodena, sobna temperatura		1–20 mL	Pipet-Lite XLS, AutoRep S	Pipet-X, E4 XLS
Viskozna, organsko otapalo, ekstremna temperatura	Uzorci srednjeg volumena	200–1000 µL	Pos-D, AutoRep S	AutoRep E
Neviskozna, vodena, sobna temperatura		200–1000 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Viskozna, organsko otapalo, ekstremna temperatura	Uzorci malog volumena	10–200 µL	Pos-D	
Neviskozna, vodena, sobna temperatura		10–200 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Viskozna, organsko otapalo, ekstremna temperatura	Uzorci mikro volumena	<10 µL	Pos-D	
Neviskozna, vodena, sobna temperatura		<10 µL	Pipet-Lite XLS	E4 XLS

Ako je broj uzoraka za analizu dovoljno velik, dobra je ideja koristiti pločice umjesto epruveta za pripremu i/ili analizu uzoraka i u tom će slučaju upotreba višekanalnih pipeta ubrzati tijek rada.

U slučaju analize više pločica s 96 ili 384 jažica, dobra je ideja koristiti rješenje za pipetiranje s 96 kanala čime se štedi vrijeme i smanjuje mogućnost pogrešaka.

Zahtjevi vezani uz format spremnika za uzorak/reagens

Prilikom uporabe pločica s 96 jažica možda će biti potrebno prenošenje više uzoraka ili reagensa iz epruveta u pločice i obrnuto, a nekad je potrebno prenošenje između različitih formata pločica (iz pločice s 24 jažice u onu s 96 jažica). Višekanalne pipete s podesivim razmakom omogućuju smanjenje vremena promjene formata za do 85 % jer istovremeno možete prenositi do 8 uzoraka, npr. za pomicanje ciljnog uzorka iz neformiranog kompleta epruveta u formiranu pločicu s 96 jažica (sa središtima od 9 mm) potrebna je samo jednostavna aspiracija uzorka iz neformirane pločice.



Višekanalne pipete s podesivim razmakom

Pomažu pri istovremenom prenošenju više uzoraka

- Iz epruveta u pločice (i obrnuto)
- Između različitih pločica (s 24/48/96 jažica)

Zahtjevi vezani uz specifičan uzorak/analizu

Za složeno ili ponavljajuće pipetiranje mogle bi biti korisne elektroničke pipete koje se mogu koristiti za ponavljajuće dispenziranje i mogu se programirati za posebne protokole pipetiranja. Osim toga, podaci dobiveni uporabom elektroničkih pipeta dosljedniji su od onih dobivenih uporabom ručnih pipeta jer mikroprocesor isključuje mogućnost ljudske pogreške i pogreške pri pomicanju klipa. To je osobito uočljivo kod dobivanja podataka za koje su potrebna serijska razrjeđenja, pri čemu se pogreške u pipetiranju mogu kombinirati te s primjenama za koje je potrebno umnažanje, kao što je qPCR.

Svaka analiza i svaki uzorak ima jedinstvena svojstva koja mogu predstavljati izazov. Na primjer, za primjene u genomici uvijek treba koristiti nastavke s filtrom kako bi se smanjio učinak kontaminacije uzorka ili pipete DNK-om. Filtri sprječavaju da aerosoli iz uzorka kontaminiraju držak, a time i sljedeće uzorke. Filtri također pomažu pri zaštiti od mikrobiološke kontaminacije, korozivnih tvari i naslaga soli.

Elektroničke pipete korisne su za:

- Složene ili ponavljajuće protokole
- Primjene za koje je potrebna visoka razina točnosti i preciznosti (npr. qPCR)

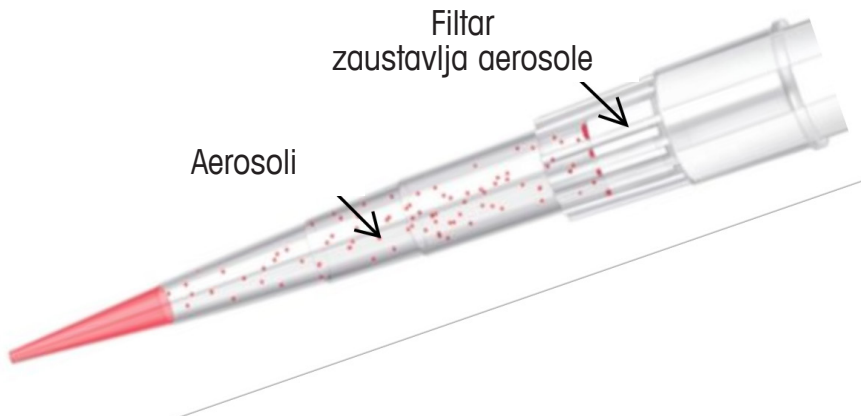


Nakon odabira raspona volumena i vrsta pipeta, sljedeći korak postupka je određivanje odgovarajućih nastavaka za sve primjene.

Nastavci su obično proizvedeni od polipropilena i iako su inertni i otporni na mnoga otapala, treba razmotriti skrivene čimbenike u polipropilenu. Razne polipropilenske smole raspolažu ključnim svojstvima potrebnima proizvođaču i u proizvodni se postupak mogu uključiti razni aditivi koji utječu na neke proizvodne procese. Neki od tih aditiva mogu se otopiti iz konačnog proizvoda i tako utjecati na rezultate eksperimenata. Kako bi se spriječio taj potencijalni problem, preporuča se kupnja nastavaka za koje je potvrđeno da ne sadrže različite topljive tvari, pri čemu treba voditi računa da dobavljač osigura evidentirane dokaze o ispitivanju osjetljivosti za sve topljive tvari i strana tijela. Primjeri stranih tijela uključuju DNK i pirogene koji će biti prisutni ako se postupak proizvodnje i pakiranja ne odvija u čistoj prostoriji. Postoji mnogo organizacija za proizvodnju kalupa i ambalaže od potrošnih materijala koje proizvode u objektima koji nisu u potpunosti pod kontrolom. U dobrom proizvodnom pogonu svi radnici nose radne ogrtače, kape, maske, rukavice te rade u okruženju s filtriranim zrakom čime se sprječava kontaminacija kosom ili kukcima. Ponavljamo, na certifikatima kojima se potvrđuje ispitivanje tih materijala trebao bi se navesti postupak ispitivanja i osjetljivost analize – certifikati na kojima se samo navodi da u proizvodu nema određenog stranog tijela, a nije navedena metoda otkrivanja ili osjetljivost otkrivanja ne daju potrebne informacije niti ne osiguravaju kvalitetu.

Jedinstvena primjena

- Koristite nastavke s filtrom kako bi se smanjio učinak kontaminacije DNK-om ili prenošenje DNK-a
- Nastavci s filtrom također štite klip od mikrobiološke kontaminacije, korozivnih tvari i naslaga soli

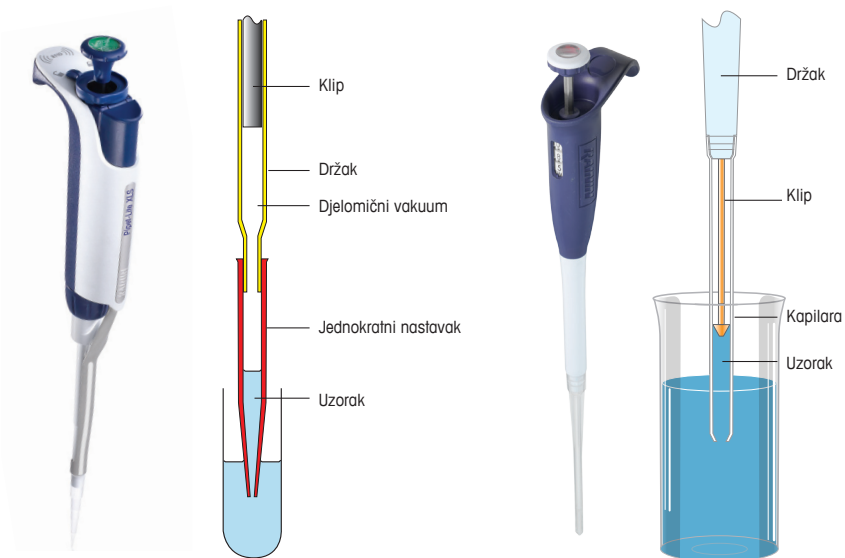


Sljedeće što treba uzeti u obzir vezano uz nastavke su specifični volumeni potrebni za razne odabrane pipete te nastavci za posebne namjene potrebni za određene primjene, npr. nastavci s filtrom za primjene u genomici. Naposljetku, veličina pakiranja treba biti praktična kako bi količina nastavaka bila dovoljna za određeno vremensko razdoblje.

Za pipetiranje uzoraka različitih volumena možda će trebati pažljivo isplanirati broj ručnih pipeta kako bi se postigao potreban raspon volumena i kako bi se izbjegle ponavljajuće izmjene volumena.

3. Odabir odgovarajuće pipete

Postoji mnogo dostupnih alata za pipetiranje za postizanje optimalnih rezultata i veće produktivnosti koji istovremeno pružaju dodatne prednosti kao što su bolje ergonomske značajke i bolja funkcionalnost za određenu primjenu. Postoje dvije glavne vrste mikropipeta: pipete koje rade na principu istiskivanja zraka i pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena. U obje vrste volumen dispencirane tekućine određuje se prema promjeru klipa i duljini hoda klipa.



Slika 1. Pipete koje rade na principu istiskivanja zraka i pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena

Pipete koje rade na principu istiskivanja zraka

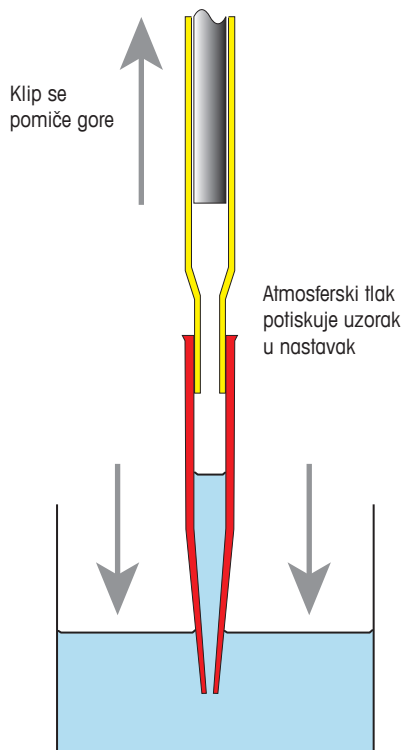
- Iznimno točne za vodene otopine
- Isplative

Pipete koje rade na principu istiskivanja zraka najčešći su instrumenti za pipetiranje u laboratoriju. Te pipete rade na principu uranjanja vrha nastavka u tekući uzorak i otpuštanja gumba klipa. Nastaje djelomični vakuum kada se klip pipete pomiče prema gore u trup pipete i tekući uzorak se penje nastavkom i puni prazninu odabranog volumena koju je uzrokovao djelomični vakuum.

Pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena

- Iznimno točne za većinu otopina
- Preporučuju se za viskozne, guste, nestabilne i korozivne otopine

Iako nisu ni približno tako uobičajene kao pipete koje rade na principu istiskivanja zraka, pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena često se mogu naći u laboratorijima. Takve pipete imaju jednokratni klip i kapilarni sustav za stvaranje fizičke praznine odabranog volumena. Klip je u izravnom kontaktu s uzorkom i kada se klip pomakne prema gore, uzorak se usisava u kapilaru. Pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena vrlo su točne i precizne prilikom pipetiranja vodenih otopina, no preporučuju se za uporabu s viskoznim, gustim, nestabilnim i korozivnim otopinama. Jednokratne kapilare i klipovi koji se koriste s pipetama koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena skuplji su u usporedbi s jednokratnim nastavcima pipeta koje rade na principu istiskivanja zraka, tako da se pipete koje rade na principu istiskivanja zraka preporučuju u slučaju kada će njihovom uporabom ostvariti isti rezultati.



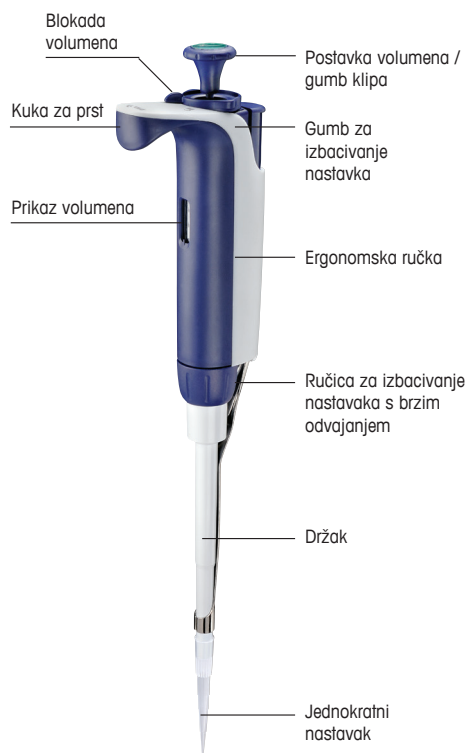
Slika 2.
Rad pipete koja radi na principu istiskivanja zraka

Optimizacija tijekom rada

Raspon volumena i zahtjevi vezani uz protok uzoraka

Tijek rada često uključuje početak rada s nekoliko tekućina relativno velikih volumena (npr. priprema pufera, nasadiivanje stanica itd.) gdje prenošenje 5 ili 10 ml s manjim naglaskom na točnost može biti uobičajeno. Međutim, konačna tehnika otkrivanja može koristiti samo male volumene i stoga će možda biti potrebna veća točnost za prenošenje volumena.

Potrebe za brzinom i točnosti/preciznosti moraju biti uravnotežene jer različiti alati za velike volumene imaju različite mogućnosti. Preporučena smjernica za odabir ispravne pipete za volumen služi za procjenu radnog raspona između 35 i 100 % ukupnog naznačenog volumena. Primjerice, pipeta od 1000 μL ima radni raspon između 350 i 1000 μL . Iako minimalne specifikacije mogu biti 100 μL na toj pipeti za volumen, a instrument se može podesiti na 0 μL , preporuka za uporabu 350 μL kao minimum temelji se na korisničkoj tehnici. Preciznija tehnika pipetiranja potrebna je za volumene ispod raspona od 35 % za pipete. Rad pri neprikladnom rasponu instrumenta ugrožit će točnost/preciznost.



Slika 3.
Ručna pipeta



Slika 4. Elektronička pipeta

Elektroničke jednokanalne pipete

Elektroničke pipete dostupne su od sredine 80-ih godina prošlog stoljeća. Kod električnih pipeta koje rade na principu istiskivanja zraka, aspiraciju i dispenciranje kontrolira mikroprocesor i pokreću se pritiskom okidača umjesto pritiskanjem ili otpuštanjem gumba klipa palcem. Uporabom elektroničke pipete većina će korisnika postići dosljednije usisavanje i dispenciranje uzoraka te poboljšanu točnost i ponovljivost, gotovo uklanjajući sve pogreške od korisnika do korisnika.

Suvremene elektroničke pipete trebaju biti jednostavne za uporabu s dobrim korisničkim sučeljem i velikim zaslonom u boji. One su svestrane i korisne za precizno obavljanje složenih zadataka kao što su ponavljanje dispenciranja, kontrolirane titracije, serijska razrjeđivanja, mjerenje nepoznatih volumena uzoraka i druge programibilne funkcije. S elektroničkom pipetom možete jednostavno programirati ponovljeno pomicanje klipa za miješanje dviju otopina u nastavku. Elektroničke pipete s kontrolama brzine aspiracije i dispenciranja mogu se koristiti za pipetiranje raznovrsnih tekućina. Najveće brzine idealne su za pipetiranje tekućih uzoraka, a niže brzine za viskozne uzorke, uzorke koji se pjene ili su osjetljivi na smicanje.

Višekanalne pipete

Višekanalne pipete idealne su za pipetiranje velikog protoka, uključujući rad s pločicama s 96 jažica ELISA i PCR za sintezu DNK. Višekanalne pipete naprednog dizajna, kao što su lagani Rainin modeli s 8 i 12 kanala, ergonomski su dizajnirane, a nastavak se umeće brzo i sigurno s dosljednim usisavanjem uzorka u svim kanalima. Modeli s podesivim razmakom između kanala korisniku omogućuju podešavanje razmaka između nastavaka za dispenciranje iz pločica s 96 jažica do stalka s epruvetama ili pločica s 24 jažice. Višekanalne pipete i pipete s podesivim razmakom između kanala dostupne su u ručnoj i elektroničkoj verziji sa širokim rasponom volumena.



Slika 5. Višekanalne pipete

Sustavi za pipetiranje velikog protoka

Sustavi za pipetiranje koji aspiriraju i dispenciraju 96 jažica odjednom idealne su za brze i učinkovite tijekove rada s pločicama s više jažica. Donedavno su skupi robotizirani sustavi bili jedini način za izvođenje pipetiranja s 96 jažica ili cijele pločice. Međutim, Rainin Liquidator 96, potpuno ručni stolni sustav za pipetiranje koji ne zahtijeva struju, programiranje ili obuku korisnika, pojednostavljuje i poboljšava pipetiranje s 96 i 384 jažice i može se koristiti u laboratoriju ili na terenu.



Slika 6.
Stolni sustav za pipetiranje Liquidator

Pipete za posebne namjene

Druge vrste pipeta (ili uređaja za rukovanje tekućinama) manje su uobičajene od pipeta koje rade na principu istiskivanja zraka, ali ih znanstvenici često preferiraju zbog njihovog specifičnog dizajna i namjene.

Pipete koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena.

Rainin Pos-D primjer je ručne pipete koja radi na principu pozitivnog istisnog volumena. Takve pipete imaju sustav s jednokratnim klipom i kapilarama za stvaranje fizičke praznine odabranog volumena. Klip dolazi u izravni kontakt s uzorkom i kada se klip pomakne prema gore, uzorak se usisava u kapilaru. Ove pipete potpuno uklanjaju unakrsnu kontaminaciju pipete uzorkom jer se za svaki uzorak koristi novi klip. Zbog toga su idealne za PCR i druge kritične postupke. Pipete koje radi na principu pozitivnog istisnog volumena preporučuju se za uporabu s viskozim, gustim, nestabilnim i korozivnim otopinama.



Slika 7.
Pipeta koja radi na principu pozitivnog istisnog volumena



Repetitivne pipete.

Sa štrcaljkom i ugrađenim klipom, repetitivne pipete rade na principu pozitivnog istisnog volumena. Dizajnirane su za usisavanje velikog volumena tekućeg uzorka koji se dispencira u više jednakih alikvota. Dostupne su u elektroničkoj ili ručnoj verziji i koriste jednokratne štrcaljke sa širokim rasponom volumena.

Slika 8.
Elektronička (lijevo) i ručna repetitivna pipeta

Kontroleri pipetiranja.

Kontroleri pipetiranja su elektronički ili ručni uređaji koji omogućuju usisavanje za staklene ili plastične serološke pipete, a koriste se primarno za velike volumene (25-100 μL). Pipeta se pričvršćuje na mekani „kljun“, a korisnik pritiskom gumba na kontroleru pipetiranja stvara djelomični vakuum u staklenoj ili plastičnoj pipeti. Djelomični vakuum potiskuje tekućina pod atmosferskim tlakom. Nakon prijenosa u drugu posudu, tekućina se dispencira pritiskom na drugi okidač ili gravitacijom. Najjednostavnije verzije koriste mekanu, fleksibilnu pumpicu koja se ručno stisne i otpusti za stvaranje i kontroliranje djelomičnog vakuuma.



Slika 9.
Elektronički kontroler pipetiranja

Dispensori za boce.

Neke je laboratorijske tekućine po njihovoj naravi (npr. korozivne ili otrovne tekućine) bolje ostaviti na mjestu u digestorima ili sigurnosnim ormarima umjesto premještanja po laboratoriju. Dispenszor za boce koristan je za sigurno prenošenje relativno malih količina takvih tekućina. Dispenszor radi na principu pumpe, a novije verzije pružaju precizno i sigurno prenošenje volumena „opasnih“ tekućina do 50 ml.

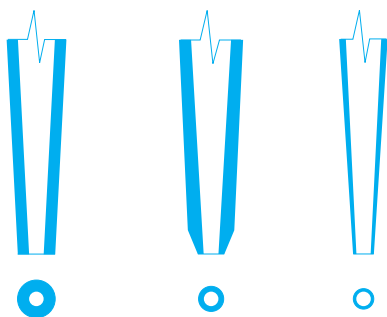


Slika 10. Dispenszor za boce

4. Odabir odgovarajućeg nastavka: Dizajn, kvaliteta i prijanjanje

Pipeta i nastavak koji preporučuje proizvođač trebaju se gledati kao sustav, a ne dvije pojedinačne komponente. Dizajn ili prijanjanje nastavaka za pipete koji se oglašavaju za uporabu sa svim pipetama često uključuju kompromise jer su namijenjeni za širok raspon modela pipeta.

Kada birate nastavke za pipete, potrebno je uzeti u obzir njihov dizajn, kvalitetu i prijanjanje.



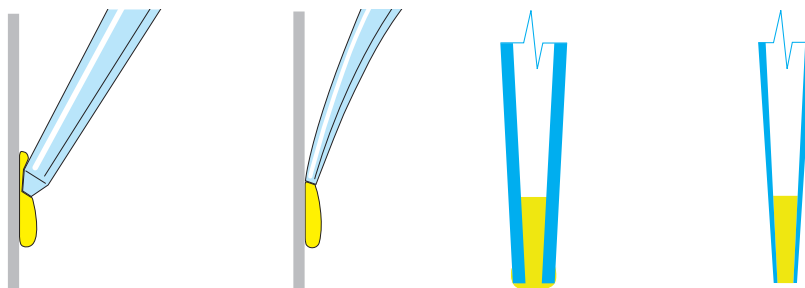
Slika 11. Nastavak s debelim stijenka (lijevo), stožasti nastavak (sredina) i nastavak Rainin FinePoint (desno)

Dizajn nastavka

Najnapredniji dizajn nastavaka za pipete je fleksibilni nastavak s tankim stijenka, uskim vrhom ili malim otvorom. Za pipetiranje malih volumena manjih od 20 μL , nastavci Rainin FinePoint™ povećavaju točnost i preciznost u odnosu na standardne nastavke s debelim stijenka ili stožaste nastavke.

Nastavci FinePoint su fleksibilniji od većine drugih standardnih nastavaka i omogućuju protok tekućeg uzorka pod bilo kojim kutom za potpuno prenošenje. Stoga se daleko manje uzorka zadržava na nastavku u usporedbi s nastavcima s debelim stijenka ili stožastim nastavcima.

Razlike u dizajnu nastavka utječu na učinkovitost, točnost i preciznost. Međutim, kada se pipete ispravno koriste, imat će zajamčenu učinkovitost, točnost i preciznost pod uvjetom da se koriste nastavci koje preporučuje proizvođač.



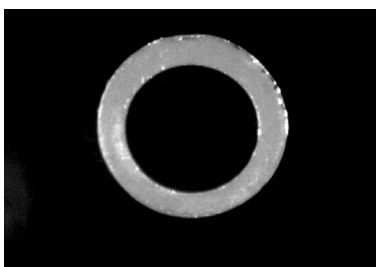
Slika 12. Dispenziranje (lijevo) i zadržavanje uzorka (desno) sa stožastim nastavkom i nastavkom FinePoint

Kvaliteta nastavka

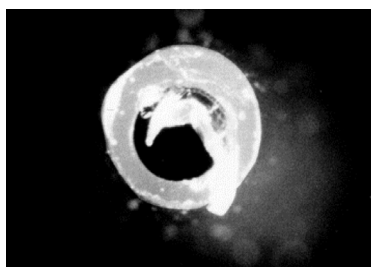
Najveći problemi s kvalitetom nastaju na otvoru ili vrhu, što najviše utječe na aspiraciju i dispenciranje uzorka. Slika 13 prikazuje četiri uvećana vrha nastavka.

Orubina je plastika s unutarnje strane ili oko otvora nastavka preostala iz postupka kalupljenja.

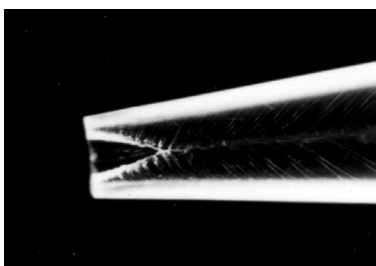
Greške pri kalupljenju i koaksijalne greške posljedica su neispravnog pečenja jezgrenih oslonaca nakon ubrizgavanja plastike. Sve takve greške dovođe do gubitka uzorka tijekom pipetiranja. Postupak proizvodnje visoke kvalitete smanjit će pojavu grešaka nastavaka i njihovih posljedica.



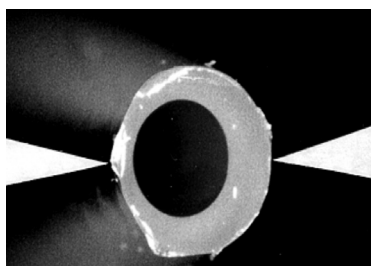
Otvor nastavka visoke kvalitete



Orubina na otvoru nastavka



Greška pri kalupljenju



Koaksijalna greška

Slika 13. Otvori nastavaka s jednim dobrim vrhom i tri vrste grešaka

Brtna nastavka za pipetu

Većina stožastih nastavaka napravljena je za umetanje na bilo koju pipetu – površina brtvljenja između unutrašnjosti nastavka i vanjskog dijela drške pipete dovoljno je velika da odgovara širokom rasponu pipeta. Ovaj relativno veliki brtveni sustav stvara više trenja između drške i brtve jer se drška pipete uglavljuje u nastavak. Nema mehanizma povratnih informacija koji bi vas upozorio kada je univerzalni nastavak ispravno zabrtvljen, za što je obično potrebno da korisnik gurne dršku pipete u nastavak kako bi se osiguralo ispravno brtvljenje.

S obzirom da se koristi cijela podlaktica, relativno je lako primijeniti preveliku silu prilikom umetanja u nastavke, za što će općenito biti potrebna odgovarajuće velika sila za izbacivanje nastavka. Konačno, sila potrebna za umetanje i izbacivanje univerzalnih nastavaka može povećati rizik od pojave ozljeda zbog učestalog naprezanja, osobito tijekom dulje uporabe pipete.

Sustav za izbacivanje nastavka LTS™ LiteTouch™

Uzimajući u obzir pitanja ergonomije i sile kod umetanja i izbacivanja nastavaka uz druge probleme vezane uz brtvljenje, Rainin je razvio novi dizajn nastavka pod nazivom LTS™ ili sustav LiteTouch™ koji znatno poboljšava prijanjanje između nastavaka i drške pipete. LTS znatno smanjuje silu potrebnu za umetanje drške pipete i za izbacivanje nastavka.

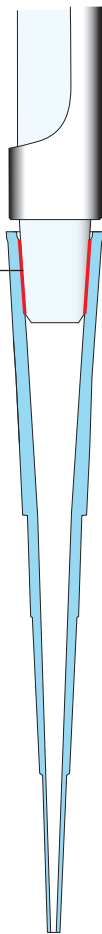
Ove dvije značajke sustava LTS rade zajedno kako bi smanjile silu potrebnu za izbacivanje nastavka.

- Mala površina omogućuje lako brtvljenje nastavka
- Zaustavni graničnik u obliku izbočenja u nastavku sprječava pretjerano umetanje drška

Dizajn površine brtvljenja pruža dobru lateralnu stabilnost, čime se sprječava ispadanje nastavka tijekom uporabe.

Univerzalni

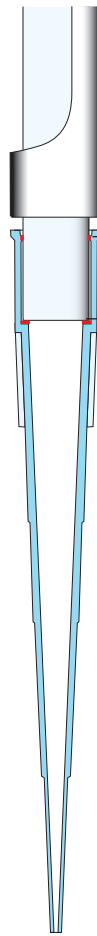
Velika površina
brtvljenja



Sustav LTS Lite Touch

Mala površina brtvljenja

Zaustavni graničnik



Slika 14. Sustavi s univerzalnim (stožastim) i LTS (cilindričnim) nastavkom

Odabir nastavka

Ukratko, da bi se osigurao nesmetan i neprekidan protok uzorka i smanjeni rizik od kontaminacije uzorka prilikom odabira nastavka za pipetiranje, važno je uzeti u obzir sljedeće:

Materijal nastavka. Nastavci bi trebali biti izrađeni od materijala vrlo niske retencije kao što je čisti polipropilen koji ne sadrži aditive, boje ili reciklirani materijal.

Dizajn nastavka. Debljina stijenke, fleksibilnost, veličina otvora i površinska obrada važni su čimbenici kod umetanja pipete i protoka tekućine u i iz nastavka.

Kvaliteta nastavka. Proizvode li se nastavci u čistoj prostoriji? Mogu li se pojedinačne šarže pratiti? Jesu li nastavci bez aditiva ili grešaka koje mogu dovesti do gubitka ili pogreške uzorka?

Specijalizirani nastavci za posebne namjene

Postoji nekoliko „nestandardnih“ vrsta nastavaka koji su korisni za specijalizirane primjene ili tijekom rada.

Nastavci Rainin Gel-Well™ posebno su dizajnirani za punjenje gelovima, a dostupni su s plosnatim ili zaobljenim otvorom vrlo malih veličina.

Nastavci sa širokim otvorom dizajnirani su za rukovanje osjetljivim uzorcima kao što su cijele stanice ili DNK velike molekularne mase. Veliki otvor smanjuje smicanje uzorka i sprječava liziranje stanica. Ovi se nastavci također preporučuju za pipetiranje slanih otopina ili suspenzija stanica za jednostavno prikupljanje uzorka i sprječavanje uništavanja stanica.

Nastavci s niskom retencijom imaju posebno pripremljene superhidrofobne polimere koji omogućuju dispenziranje iznimno „ljepljivih“ uzoraka kao što su proteini iz vrha nastavka i sprječavaju ostanak uzorka u nastavku. Takvi nastavci obično nisu potrebni za uobičajene tekuće uzorke.

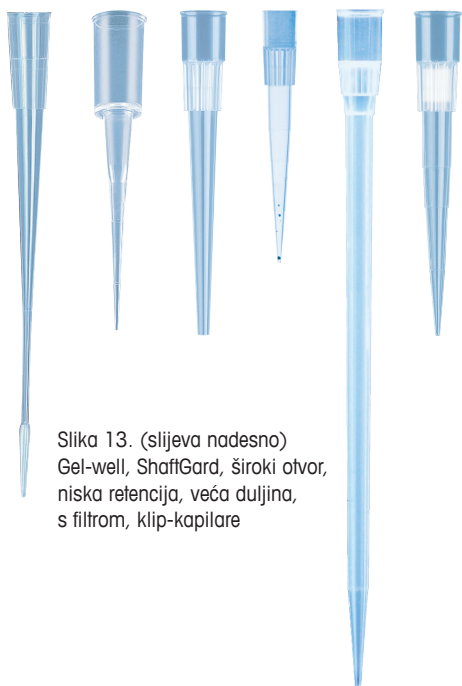
Nastavci Rainin ShaftGard™ štite držak pipete i mehanizam za izbacivanje nastavka od slučajne kontaminacije tako što se komponente zatvaraju u nastavku. Nastavci ShaftGard mogu se koristiti u uskim epruvetama ili dubokim jažicama bez opasnosti od dodirivanja stijenki posude pipetom.

Nastavci veće duljine su uže i dulje od drugih vrsta nastavaka istog volumena. Mali promjer i duljina od 102 mm omogućuju da ti nastavci dođu do dna uskih epruveta i dubokih jažica bez dodirivanja stijenki posude bilo kojim dijelom pipete ili mehanizma za izbacivanje nastavka.

Nastavci s filtrom, koji se koriste za uklanjanje unakrsne kontaminacije ili kontaminacije pipete aerosolima bez stvaranja ikakve bitne razlike u učinkovitosti pipetiranja. Uporaba nastavaka s filtrom prilikom pipetiranja nestabilnih otopina preporučuje se za sprječavanje ulaska potencijalno korozivnih para u držak pipete i oštećenja klipa.

Kapilare/klipovi su dizajnirani za uporabu s pipetama koje rade na principu pozitivnog istisnog volumena i najučinkovitije su s nevedenim otopinama koje su guste, viskozne ili nestabilne ili se koriste za pipetiranje hladnim ili toplih vodenih otopina.

Nastavci za pripremu uzoraka. Nastavci za pripremu uzoraka sa smolama ugrađenim u uski vrh nastavka nedavno su postali dostupni. Dizajn sustava Rainin Purespeed sa „smolom u nastavku“ čini ga praktičnom, povoljnom i poluautomatiziranom metodom za pročišćavanje biomolekula, desalinizaciju ili uporabu kod izmjene iona.



Slika 13. (slijeva nadesno)
Gel-well, ShaftGard, široki otvor,
niska retencija, veća duljina,
s filtrom, klip-kapilare



Slika 14.
Nastavak za pripremu uzoraka
Rainin PureSpeed

5. Tehnike pipetiranja

Ispravna procjena primjene, a time i odabir instrumenata značajno će utjecati na rezultate istraživanja. No to nisu jedini aspekti koje znanstvenici trebaju uzeti u obzir za postizanje optimalnih rezultata istraživanja. Drugi čimbenici kao što je odgovarajuća tehnika pipetiranja i instrumenti te čimbenici okruženja značajno će utjecati na rezultate istraživanja. Točnost i preciznost ključni su elementi znanstvenog istraživanja i na sljedećim stranicama možete naći kratak pregled različitih tema vezanih uz tehnike pipetiranja. Jeste li znali da se jednostavnom primjenom tih tehnika vaša točnost i preciznost može povećati za 5 %?

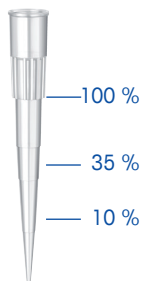
Optimalan raspon volumena

Standardni radni raspon većine pipete iznosi 10 – 100 % nazivnog volumena. Iako se to smatra radnim rasponom pipeta, specifikacije učinkovitosti mijenjaju se s manjom postavkom volumena.

Specifikacije točnosti za pipetu od 100 mikrolitara su +/- 0,8 % od 50 – 100 % nazivnog volumena. Međutim, ako smanjite postavku volumena na 10 μ l (ili 10 % nazivnog volumena), netočnost je 3 puta veća, odnosno 2,5 – 3 %.

Stoga je optimalan volumen za najveću točnost i preciznost obično 35 – 100 % nazivnog volumena. Probajte izbjeći postavljanje volumena pipeta manjeg od 10 % ukupnog volumena pipete – umjesto toga, koristite pipete manjeg volumena za manje volumene.

Volumen u odnosu na raspon



Pipetiranje ispod 10% može utjecati na točnost za čak 3 %

Dubina uranjanja nastavka

Ispravna dubina uranjanja nastavka može povećati točnost do 5 % i iznimno je bitna za pipete za mikrovolumene. Nastavak treba uroniti između 1–2 mm za pipete za mikrovolumene te 6–10 mm za pipete za velike volumene, ovisno o veličini nastavka. Ako je nastavak previše uronjen, volumen plina u nastavku se komprimira, zbog čega se previše tekućine aspirira. Tekućina koja se zadržava na površini nastavka također može iskriviti rezultate. Ako nastavak nije dovoljno uronjen, može se usisati zrak, zbog čega nastaju mjehurići zraka i netočni volumeni. Oboje dovodi do netočnog volumena.

Dubina uranjanja nastavka



1–10 μl : 1–2 mm

10–200 μl : 2–3 mm

200–2000 μl : 3–6 mm

Ispravna dubina uranjanja nastavka može povećati točnost do 5 %, stoga se pridržavajte preporučenih dubina. (>2000 μl , koristite dubinu od 6–10 mm)

Aspiracija pod ispravnim kutom

Kut uranjanja nastavka pipete u uzorak trebao bi biti što je bliže moguće 90° i ne bi trebao odstupati od tog okomitog položaja za više 20° .

Kada je riječ o pipetama za mikrovolumene, ako pripazite da je kut što bliži okomitom, točnost se može povećati za do 2,5 %.

Ako kut odstupa od toga za više od 20° , mjerenja mogu biti netočna.

To znači da će se u nastavak usisati previše tekućine i aspiracija će biti netočna.

Okomiti kut uranjanja



Ispravan kut



Neispravan kut

Kut uranjanja od 60° može dovesti do toga da aspirirate do 0,7 % više tekućine od planiranog.

Održavanje dosljednosti

Održavanje dosljednog ritma i brzine pipetiranja pomoći će vam da dobijete optimalne rezultate s većom mogućnosti ponavljanja. Uz dosljedan ritam i brzinu možete postići povećanje točnosti do 5 %.

Dosljedan ritam pipetiranja

Neka vaš ritam pipetiranja bude dosljedan od uzorka do uzorka. Izbjegavajte žurbu ili ubrzani rad i uspostavite ritam za svaki korak u ciklusu pipetiranja.

Pipete za velike volumene

Za veće volumene, obično 1 ml ili još veće, napravite stanku od oko jedne ili više sekundi nakon uzimanja uzorka dok je nastavak još uvijek u tekućini. Na taj način uzorak će se moći u potpunosti aspirirati.

Nesmetani rad klipa

Održite dosljednu brzinu i mirnoću kada pritišćete i otpuštate gumb klipa. Nekontrolirana aspiracija može dovesti do mjehurića, prskanja, aerosola i kontaminacije drška i klipa pipete te također do manjeg volumena uzorka.

Dosljedan ritam i brzina pipetiranja



Ispravna aspiracija



Nastavak koji je aspirirao zrak

Dosljedno dispenziranje uzoraka

Možete postići najveću točnost i ponovljivost od uzorka do uzorka ako osigurate da je i posljednja kap uzorka dispenzirana i da ne prijanja za otvor. Ta je dosljednost ključna osobito kad pipetirate mikrovolumene zbog malih volumena uzoraka.

Dobrom tehnikom dispenziranja točnost se može povećati za do 1 %. Prilikom dispenziranja uzorka osigurajte da vrh nastavka dodiruje stijenkku posude, čime će se spriječiti da uzorak ostane u nastavku. Nakon dispenziranja pomicanjem vrha nastavka po stijenci posude prema gore iz otvora će izaći će sva preostala tekućina.

Dosljedno dispenziranje uzoraka



Dispenziranje uz stijenkku posude



Dispenziranje u tekućinu



Dispenziranje na površinu tekućine

Dispenzirajte u tekućinu ili na površinu tekućine.

Kada dispenzirate izravno u tekućinu ili na površinu tekućine, primijenite reverzni način pipetiranja kako ne biste uzeli uzorak nakon dispenziranja.

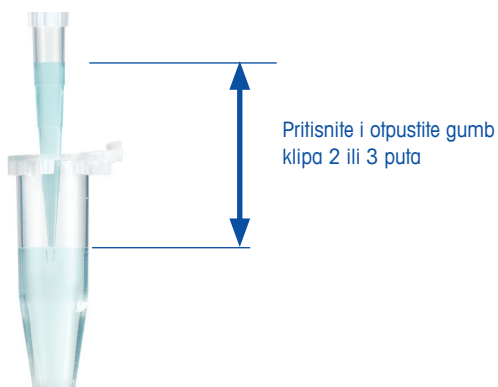
Prethodno ispiranje nastavka

Prethodnim ispiranjem nastavka dva ili tri puta sloj tekućine ostaje s unutarnje strane nastavka, zbog čega se točnost može povećati do 0,2 %. Prethodno ispiranje pomaže neutralizirati kapilarno djelovanje u pipetama za mikrovolumene, a u nastavcima za velike volumene izjednačava temperaturu zraka u nastavku s temperaturom uzorka.

Iznimke za prethodno ispiranje

Prethodno ispiranje može negativno utjecati na rezultate kada pipetirate vrlo tople i hladne otopine, kao što je otopina iz ledene kupelji ili otopina temperature veće od 37 °C, te dovodi do pogrešaka i smanjenja točnosti do 5 %.

Prethodno ispiranje nastavka



Sprječavanje varijacija u temperaturi

Stalna sobna temperatura

Idealna temperatura za pipetiranje je $21,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, jednaka temperaturi koja se koristi za kalibraciju. Izbjegavajte područja izložena propuhu ili sunčevim zrakama u kojima bi nagle promjene temperature mogle ugroziti točnost aspiracije. Pipetiranje na stalnoj temperaturi može poboljšati rezultate za 5 %.



Izdvojite vrijeme za izjednačenje temperature

Drugi važan aspekt promjena temperature jest vrijeme za izjednačenje temperature. Pipete reagiraju na razne temperature različitih uzoraka. Ako su tekućine hladne prenosi se veći volumen nego što je potrebno, a ako su tekućine tople prenosi se manji volumen od očekivanog. Osim ako nije drugačije naznačeno, izdvojite dovoljno vremena za izjednačenje temperature pipeta i tekućina prije uporabe.

Učinek prijenosa topline s ruke

Nakon dugotrajnog pipetiranja toplina ruke može zagrijati pipetu zbog čega se zrak u pipeti širi, što dovodi do netočnih rezultata.

Izbjegnite učinke prijenosa topline s ruke upotrebom kvalitetne pipete izrađene od PVDF polimera. Osim toga, između ciklusa pipetiranja nemojte držati pipetu u ruci nego je postavite na stalak.



Dosljedne postavke mikrometra

Kada mijenjate postavku volumena s veće na manju, okrenite kotačić na željenu postavku volumena. Međutim, kada mijenjate postavku od volumena s manje na veću, okrenite kotačić za odabir iznad željene postavke volumena za $1/3$ okreta. Na taj se način sprječavaju učinci mehaničke zračnosti i postiže veća točnost.



Koji su vaši rizici pri pipetiranju?

Dobra praksa pipetiranja opsežan je i prilagođen program koji određuje vama svojstvene rizike pipetiranja i daje vam informacije o načinima njihova smanjivanja. Naš pristup GPP Risk Check™ odličan je način za početak – odvojite pet minuta kako biste dobili procjenu vaših rizika pipetiranja te preporuke za njihovo minimiziranje.



GPP Good Pipetting Practice

Minimize Workflow-related Risks

GPP® Risk Check™
Boost the accuracy and reproducibility of your data by understanding workflow-related risks and how to mitigate them. Take this minutes to run through our GPP Risk Check and see where risks lie in your work and workflow.

GPP Risk Check

GPP — Good Pipetting Practice
You can improve your data quality with Good Pipetting Practice — Rainin's comprehensive, systematic approach to measuring pipetting accuracy and repeatability. GPP is grounded in Rainin's more than 40 years of expertise working side-by-side with researchers to achieve the highest levels of accuracy and precision across all applications. Apply the principles of GPP to your lab, and everyone on your team will:

- Understand the array of liquid handling instruments and options available
- Know how to optimize their workflow for each of the liquid handling steps involved
- Gain the range of pipetting skills necessary to produce reliable data
- Appreciate how ergonomics can influence data production and their own well being
- Recognize the risk associated with out-of-calibration pipettes and the risks of routine checks vs. professional services.

The 3 Good Pipetting Practice Steps

1. Evaluation
Determine your needs
Understanding your options is the first step toward achieving more reproducible results. A clear idea of your desired workflow and the level of accuracy and precision required will speed your evaluation of applicable tools and technologies.

2. Selection
Get the right tools
The characteristics of liquids you're measuring can profoundly affect pipette performance. Your time and materials are expensive, so making sure that quantities, tips and related tools are optimized for your application will save money and increase productivity.

Tvrtka METTLER TOLEDO nudi sveobuhvatni seminar o dobroj praksi pipetiranja i upravljanju rizicima kod pipetiranja. Ako ste zainteresirani, obratite se prodajnom predstavniku programa Rainin.

www.mt.com/gpp

www.mt.com/rainin

Za dodatne informacije

Mettler-Toledo AG

CH-8606 Greifensee, Švicarska

Telefon +41-44-944 22 11

Faks +41-44-944 30 60

Podložno tehničkim izmjenama

© 08/2013. Mettler-Toledo AG

Global MarCom Switzerland