

Automatické pipety

Podle způsobu ovládání rozlišujeme **automatické pipety** manuální a elektronické. U **manuálních** pipet se pístem pohybuje palcem ruky pomocí ovládacího tlačítka. Správnost a přesnost pipetování je výrazně ovlivněna zkušenostmi a zručností pracovníka. V případě **elektronických** pipet pístem pohybuje elektromotor. Oproti manuálním nabízí navíc naprogramování způsobu pipetování. Podle povahy kapaliny lze zvolit i různou rychlost pohybu pístu při nasávání a vytlačování kapaliny.

Na tělo pipety (též *pipetor*) se nasazuje jednorázová špička. Pipetovaná kapalina přichází do kontaktu pouze s touto špičkou.

Automatické pipety lze podle principu jejich práce rozdělit na dva základní typy:

▪ „Air displacement“ pipety

Tento typ pipet využívá principu tzv. vzduchového polštáře. Mezi pístem a kapalinou zůstává vždy určitý objem vzduchu. Objem kapaliny nasátý pipetorem do špičky se od objemu vzduchu, nasátého nebo vytlačeného pístem, může mírně lišit v závislosti na hustotě a viskozitě pipetované kapaliny, smáčivosti povrchu špičky pipetovanou kapalinou, teplotě a atmosférickém tlaku a dalších vlivech. Pipetor proto musí být pravidelně kalibrován a seřizován.

Pipety tohoto typu rozlišujeme dle provedení jako **jednokanálové** (určené pro pipetování jednoho objemu dané kapaliny v čase) nebo jako **vícekanálové** (nejčastěji osmi nebo dvanáctikanálové) určené pro současné pipetování stejného objemu dané kapaliny do více jamek v mikrotitrační destičce. Každý kanál u vícekanálových pipet má svůj vlastní píst, proto není nutné využít všech kanálů najednou (je možné připojit méně než 8, resp. 12 špiček).

Automatické pipety jsou konstruovány buď pro jeden **fixní** objem nebo jsou **nastavitelné** na více objemů. Změna nastavení objemu je možná v určitém rozmezí (např. 10–100 µl) pomocí nastavovacího šroubu nebo knoflíku.

▪ „Positive displacement“ pipetory

Tento typ pipet nasává kapalinu do špičky přímo bez vytvoření vzduchového polštáře, tj. píst je v přímém kontaktu s odměřovanou kapalinou. Kapalina nasátá do špičky (bez vzduchové bubliny) se vypustí ven najednou (typ stříkačky) nebo po krocích ve stejném objemu (tzv. krokovací pipeta, angl. *stepper*). Tento typ pipetorů je výhodné používat pro vysoce viskózní nebo těkavé kapaliny, anebo pro opakující se pipetování.

Způsoby použití pipetoru



Výchozí poloha



1. poloha



2. poloha

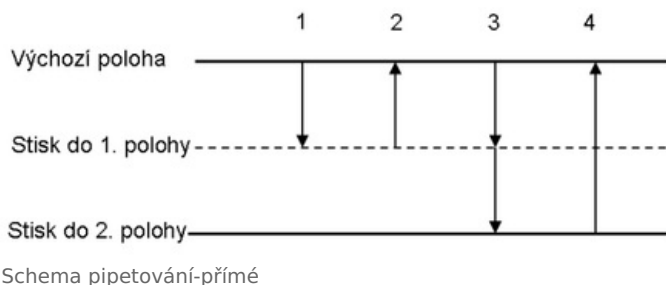
Přímé pipetování

Jde o nejčastěji používanou techniku pipetování. Při přímém pipetování se do špičky nasaje přesně nastavený objem a v dalším kroku se ze špičky kompletně vytlačí do zvolené nádoby. Protože určité množství kapaliny zůstává na vnitřním povrchu špičky jako tenký film, je třeba před pipetováním špičku smočít odměřovanou kapalinou. Přímá technika pipetování se používá pro odměřování většiny vodných roztoků, pufrů, zředěných kyselin a zásad.

Postup

1. Nasadte na dávkovač špičku. Stiskněte tlačítko ovladače do první polohy (nutno překonat malý odpor při stisku tlačítka).
2. Ponořte špičku dávkovače asi 2–3 mm pod hladinu roztoku. Pomalu povolujte stisknuté tlačítko ovladače za současného nasátí vzorku do špičky.

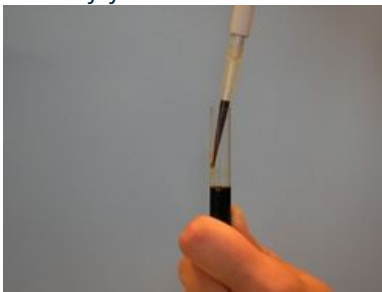
Pomalým nasátím kapaliny do špičky se omezí možný vznik turbulence, která může vyvolat vznik aerosolu a bublinek plynu, vycházejících z kapaliny. Optimální rychlost nasávání závisí na vlastnostech kapaliny (na její hustotě, tenzi par a viskozitě).



- Vždy sledujte, zda do špičky nevnikly bublinky vzduchu (např. při prudším povolení pístu ovladače nebo špatně nasazené špičky).



- Vyšší přesnosti při pipetování dosáhnete, když úplně sundáte palec z tlačítka ovladače, jakmile dosáhne výchozí polohy.
3. Pomalu vytáhněte špičku z kapaliny. Při rychlém vytažení se může ztratit část obsahu špičky. Před vytažením špičky z kapaliny počkejte, hlavně u větších pipetorů 500–5000 μl , asi 1–3 vteřiny.
 4. Při vytlačování kapaliny držte špičku v mírném úhlu proti stěně nádoby ($10\text{--}45^\circ$), těsně nad roztokem, který v ní už je, a plynule stiskněte tlačítko ovladače palcem do první polohy. Vyčkejte asi 1 vteřinu a pokračujte v rychlém stisku tlačítka ovladače až do druhé polohy (pocítíte větší odpor při stisku). Dbejte na to, aby nezůstaly kapičky kapaliny ve špičce nebo nebyly rozstříknuté na stěnách nádoby.



5. Podržte tlačítko ovladače zmáčkuté a vytáhněte špičku podél stěny nádoby ven. Nyní povolte tlačítko ovladače.

Při přímém pipetování vzniká určitá chyba tím, že na vnitřní ploše špičky zůstane velmi tenký film přenášené tekutiny. Uvedeným postupem tedy odměříme o něco menší objem, než je nastaveno na pipetě, přičemž chyba závisí především na vlastnostech pipetované kapaliny a materiálu, z něž je vyrobena špička. Uvedenou chybu lze odstranit tím, že se před pipetováním vnitřní plocha špičky smočí odměřovanou kapalinou. V praxi to znamená, že nejprve výše popsaným postupem nasajeme roztok do špičky, místo jeho odměření do cílové nádoby jej však vrátíme zpět do zásobní nádoby. V tuto chvíli je na vnitřní stěně špičky vytvořen film pipetované kapaliny, v případě bezbarvých roztoků je při správné technice okem neviditelný. Následuje odměření kapaliny přesně podle výše uvedeného postupu (pouze nenasazujeme novou špičku). Jelikož množství kapaliny, které zůstává ve špičce, je prakticky konstantní, odměříme nyní skutečně nastavený objem.

Pokud na vnější stěně špičky zůstanou kapky, je možné je otřít buničitou vatou lehkým pohybem shora dolů. Nikdy se buničinou nedotýkejte ústí špičky, odsáli byste část kapaliny, která je uvnitř.



Reverzní pipetování

Při reverzním pipetování do špičky nasajeme větší objem kapaliny, než který chceme odměřit, a v dalším kroku vytlačíme ze špičky objem nastavený na pipetě. Tento způsob pipetování poskytuje lepší výsledky při práci s viskózními nebo vysoce těkavými kapalinami, kapalinami silně smáčivými a s roztoky, které pění. Hodí se i pro odměřování velmi malých objemů. Po pipetování zůstane ve špičce vždy zbytek kapaliny, kterou lze vytlačit zpět do zásobní nádoby nebo do odpadu před vlastním odstraněním špičky.

Postup

1. Stiskněte tlačítko až do druhé polohy (pocítíte nejdříve slabý a poté větší odpor pístu při stisku tlačítka ovladače).
2. Ponořte špičku pipety asi 2–5 mm pod hladinu roztoku. Pomalu povolujte píst za současného nasátí vzorku

do špičky.

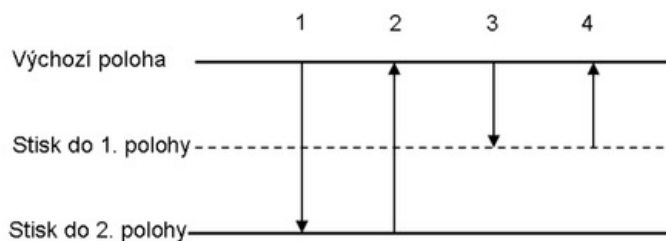
3. Pomalu vytáhněte špičku z kapaliny a odstraňte kapky ulpělé na vnější stěně špičky dotekem špičky o okraj nádoby.

4. Při vytlačování daného objemu kapaliny držte špičku v mírném úhlu proti stěně nádoby těsně nad roztokem, který v ní již je, a pomalu plynule stiskněte palcem tlačítko ovladače do první polohy.

5. Držte tlačítko ovladače zmáčkuté v této poloze a vytáhněte špičku z nádoby ven.

6. Část kapaliny, která zůstane ve špičce, vytlačte stiskem tlačítka ovladače do druhé polohy zpět do původní nádoby nebo do odpadu.

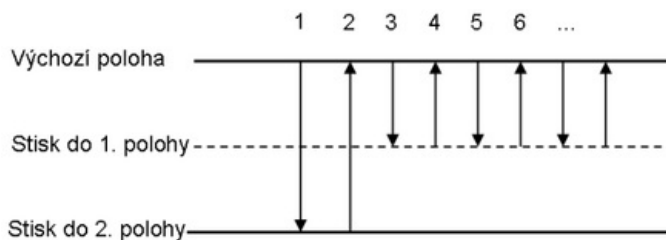
7. Podržte tlačítko ovladače zmáčkuté a vytáhněte špičku z kapaliny ven a pak povolte tlačítko ovladače.



Schema pipetování-reverzní

Opakované pipetování

Tento způsob pipetování je určen pro opakované pipetování stejného objemu, např. pro přidávání činidla do série zkumavek nebo do jamek v mikrotitrační destičce. Jedná se vlastně o opakující se reverzní pipetování. Po nasátí kapaliny do špičky se opakují kroky 2 až 4.



Schema pipetování-opakující se

Pipetování heterogenních vzorků

Technika vhodná pro pipetování heterogenních vzorků jako je krev, kdy není snadný proplach špičky před pipetováním. Podobá se přímé technice, ale špička se předem nesmáčí odměřovanou kapalinou. Namísto toho se po přenesení kapaliny opakovaně propláchne roztokem, s nímž se odměřovaná kapalina mísí.

Postup

1. Stiskněte tlačítko do první polohy a ponořte špičku dávkovače asi 2–5 mm pod hladinu roztoku.

2. Pomalu povolujte píst za současného nasávání vzorku do špičky.

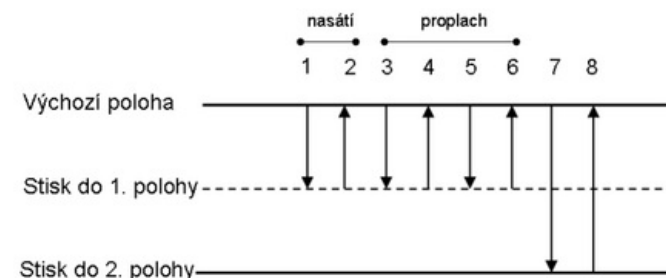
3. Pomalu vytáhněte špičku z kapaliny a odstraňte kapky roztoku ulpělé na vnější stěně špičky vytažením špičky podél stěny nádoby.

4. Ponořte špičku dávkovače **do** cílového roztoku.

5. Stiskněte ovládací tlačítko do první polohy a pak ho pomalu povolte do původní polohy. Tím dojde k nasátí roztoku do špičky. Špičku nevyndávejte z roztoku a opakujte tento krok, dokud vnitřní stěna špičky není čistá.

6. Po stěně povytáhněte špičku nad hladinu roztoku a vyprázdněte ji stiskem tlačítka ovladače do druhé polohy.

7. Podržte tlačítko ovladače zmáčkuté a vytáhněte špičku z nádoby podél stěny ven a pak povolte tlačítko ovladače.



Schema pipetování-heterogenních vzorků