

Metody vědecké práce

Základy práce v laboratoři

RNDr. Alena Vaculová, Ph.D.

26.9.2006

Laboratoř

- Principal investigators
 - Postdocs
 - Ph.D. students
 - Undergraduate students
 - Technicians
-
- Hodně lidí v různých fázích profesního vzdělání, různých zájmů – pro hladký chod laboratoře je proto nutné, aby všichni dodržovali určitá pravidla a chovali se zodpovědně – aby laboratoř nejen dobře prosperovala a dosahovala dobrých výsledků, ale taky jednoduše proto, aby se všem v ní dobře (spolu)pracovalo

Chod laboratoře

- Seznamte se s chodem laboratoře (kdo za co zodpovídá, uložení chemikálií, provoz/údržba přístrojů, mytí skla, příprava materiálu, roztoků, médií, vedení laboratorních sešitů, provoz ve sterilním, radioaktivním, nebezpečném prostředí, práce s GMO, objednávání chemikálií...)
- Seznamte se s přístroji – praktická ukázka, prostudování manuálu – před měřením nutno znát, jak a na jakém principu přístroj funguje!
- Udržujte pořádek a čistotu (sdílení prostoru, chemikálií, přístrojů, materiálů, ale i rizik - ohleduplnost!!)

Bezpečná práce v laboratoři

- **Dodržujte zásady bezpečnosti práce:**
 - Ochranný oděv, přezůvky, (rukavice, brýle, štít, rouška, respirátor, dozimetr...)
 - Čtěte „Material Safety Data Sheets or MSDS“
 - This information contains the chemical name, CAS#, health hazard data, including first aid treatment, physical data, fire and explosion hazard data, reactivity data, spill or leak procedures, and any special precautions needed when handling this chemical. A file containing MSDS information on the hazardous substances should be kept in the lab. In addition, MSDS information can be accessed on World Wide Web. You are strongly urged to make use of this information prior to using a new chemical and certainly in the case of any accidental exposure or spill. The instructor/lab manager must be notified immediately in the case of an accident involving any potentially hazardous reagents.

Bezpečná práce v laboratoři

- Potenciálně nebezpečné chemikálie pečlivě, zřetelně a viditelně označte
- Expirované a nepotřebné chemikálie či vzorky vyřadte a zlikvidujte předepsaným způsobem
- Čistěte pravidelně pracovní plochu a pomůcky (čisté pipety, nádoby..)
- Dbejte na pravidelnou kalibraci a údržbu přístrojů

Práce v laboratoři

- **Spotřebujete-li materiál či chemikálii, nahlaste to neprodleně zodpovědné osobě, která zajistí dodávku nového (pokud to neuděláte sami)!**
- **Přemýšlejte a zodpovědně plánujte předem, které věci budete potřebovat pro provedení Vašich experimentů – a zajistěte si je předem (některé firmy mají dlouhé dodací lhůty!)**

Práce v laboratoři

- **Pečlivě označujte všechny své vzorky, zkumavky, láhve s roztoky, krabičky...**
 - Datum, číslo experimentu, specifikace vzorku, jméno
 - Koncentrace a složení roztoku - přesně!, pH, datum přípravy, kdo a kdy připravil, zda je či není roztok sterilní, na co je určený...
 - Komu patří krabička, co obsahuje, datum uložení vzorku...
- A skladujte vzorky za správných podmínek (teplota - RT, 37°C, 4°C, -20°C, -80°C, tekutý dusík, tma/světlo, vlhkost, atd.)!**
- Ved'te si seznam takto uložených věcí, pravidelně jej aktualizujte!**

Komunikace v laboratoři

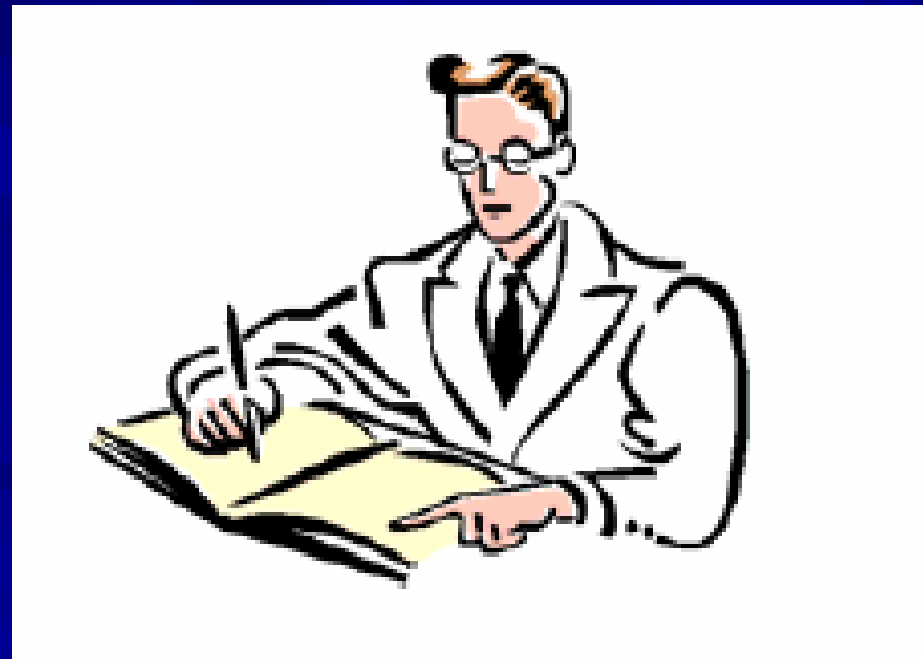
- **Nebojte se zeptat svého školitele, postdoka, staršího studenta!**
- **Nikdy jen mechanicky neopakujte pracovní postupy, aniž byste stále věděli, co zrovna reálně děláte!**
- **Pravidelně se účastněte seminářů laboratoře!**
- **Navštěvujte (nejen) přednášky, které se vztahují k Vašemu tématu práce, nebojte se diskutovat**
- **Účastněte se aktivně „laboratorního života“ 😊**

Komunikace se školitelem, vedoucím práce

- **Bud'te aktivní, účastněte se pravidelných konzultací, noste průběžně dílčí výsledky, diskutujte je – ušetříte tak spoustu času, může-li Vám poradit zkušenější, využijte toho**
- **Vnášejte nové nápady a přístupy do své práce, najděte si v ní svoji „niku“**
- **Bud'te samostatní a iniciativní**

Podrobná dokumentace práce v laboratoři

- Ved'te se pravidelné a srozumitelné poznámky dokumentující Vaši práci v laboratoři!!!!
 - Laboratorní sešit (LS)



LS – základní info



- Pevná vazba, pevné desky, označení, jméno
- Číslované strany (pořádek, odkazy)...
- Psát perem, ne tužkou (voděodolnost, trvalost)
- Nevytrhávat listy, negumovat, jen škrtat
- Správně a poctivě vedený laboratorní sešit je naprosto nezbytnou a samozřejmou věcí pro dobrého vědce - „laboratory notebooks are not written for today, but for the future“

LS – co má obsahovat?

- **Podrobná dokumentace Vaší práce v laboratoři**
- **Nutno psát srozumitelně, čitelně a mít na mysli, že data musí být reprodukovatelná, zopakovatelná druhou nezávislou osobou, tj. musíte uvést všechny detaily, které jsou nutné pro přesné provedení daného experimentu**



teoretická příprava na experimentální práci

- Studium literatury a orientace v dané problematice je naprosto nutným předpokladem pro správné naplánování experimentu
- Vyhledávání literatury a literární rešerše (viz následující přednáška!)
- při studiu literatury si poznamenat citace příslušných literárních zdrojů – pozdější zpětné dohledávání nejen že zdržuje, ale také se nemusí podařit 😊
- Zapsat si, na základě čeho jste se rozhodli pro provedení příslušného experimentu, jaká jsou východiska, na co (koho) navazujete a co je cílem, jakou hypotézu se chystáte ověřit

teoretická příprava na experimentální práci

- Sumarizujte své nápady, myšlenky, předpokládané cíle a plánovanou strategii
- Odpovězte si předem na otázky:
 - Jak je nutné naplánovat experiment, abych došel/došla k odpovědi na hledanou otázku?
 - Proč je třeba postupovat právě tímto způsobem?
 - Na základě jakých/kterých údajů jsem se rozhodl(a) pokračovat tímto způsobem?
 - Jaký výsledek očekávám a proč?

teoretická příprava na experimentální práci

- Je třeba plánovat experimenty velmi uvážlivě:
 - Je vynaložené úsilí/finanční prostředky adekvátní očekávanému výsledku?
 - Neopublikovali už jiní to, co se chystám provést? Bude získaný výsledek nový/zajímavý/publikovatelný?
 - Chystám se použít vhodný model, vhodné chemikálie, vhodnou koncentraci určité látky, za vhodných podmínek?
 - Chystám se použít odpovídající metodu? Mám správný protokol?
 - Přemýšlel(a) jsem nad interpretovatelností výsledků?
 - Nacházím pro své výsledky praktické využití? Má tato práce praktický smysl?
 - Provádím experiment v dostatečném rozsahu?
 - Mám možnost experiment zopakovat tak/tolikrát, aby se dalo použít statistické zhodnocení?
 - Koho budou zajímat výsledky mé práce?
 - Mám dostatek finančních prostředků pro dokončení práce daného rozsahu?

LS - protokol

- Úvodní info
- Teoretické předpoklady, hypotéza
- Materiál a metody
- Vlastní provedení
- Výsledky
- Diskuse a závěry



Úvodní informace

- Datum experimentu
- Název experimentu – informativní!!
 - Ne! „experiment 1“
 - Ale např. Transfekce plazmidu X do buněk Y“...

•Cíl experimentu a základní informace o něm

Na co navazuje, na co má odpovědět – proč jej dělám, příp. co připravujeme, z čeho vycházíme – vložit citace, myšlenky, odkaz na zdroj informací...*, zda se jedná o opakování předchozího experimentu a kolikáté, zda je proveden stejně nebo jsou nějaké změny a jaké...

Zdroje informací – uvést v LS

- Literatura – knihy, časopisy (citace!)
- Internet (www adresy)
- Přednášky (poznámenat jméno přednášejícího, datum, název přednášky a místo konání)
- Diskuse se školitelem, s kolegy (s kým, kdy, kde), lab meeting discussions
- E-mailová korespondence
- Vlastní nápady

Materiál a metody

- Použité roztoky a jejich přesné složení (aby dle zápisu bylo možné roztok přesně namíchat)
- Experimentální model – živočichové, mikroorganismy – přesná specifikace, latinský název, kmen...; buněčné linie – název, typ, původ, klon, číslo pasáže...
- Chemikálie, kity, protilátky – jejich přesné specifikace
 - Katalogové číslo, firma, typ, lot, zdroj, čistota, koncentrace, ředění, hmotnost...)
 - Např.: anti-PARP-antibody, Santa Cruz, sc-7150, rabbit polyclonal antibody, 113/89 kDa, 1:500

Materiál a metody

- Příprava zásobních roztoků, pracovních roztoků, finální ředění
 - Přesné kalkulace, hodnoty, výpočet – M_r , V , konstanty...
 - (bez takových poznámek nebudete schopni v případě potřeby dohledat chybu, nevyjde-li experiment, příp. budou-li se významně lišit jednotlivá opakování stejného experimentu)
 - Citace, kdo položku použil, příp. od koho jste ji dostali (je možné požádat laboratoř o zaslání chemikálie či jiného materiálu, pak nutno je citovat a uvést zdroj v publikaci!)

Materiál a metody

- **Dbát na precizní provedení experimentu, dodržení všech experimentálních postupů, přesné pipetování, měření, hodnocení..**
- **Nezapomnět na správné kontroly – pozitivní kontrola, negativní kontrola, kontrola, která obsahuje vše kromě studované látky – např. rozpouštědlo této látky...**

Materiál a metody

- Poznamenat si do protokolu jakékoli odchylky od předepsaného experimentálního schematu (i ty mohou hrát velkou roli na získaném výsledku, oceníme v případě, že se experiment nezdařil a my hledáme důvod proč)
 - Např. něco jsme zapomněli napipetovat, pipetovali jsme nepřesně, nedodrželi inkubační čas, špatně zcentrifugovali, udělali chybu ve výpočtu... nemělo by se stát, ale když nastane, poznamenat a brát v úvahu, příště znovu zopakovat a správně)
- I když v tu chvíli se zdá vše jasné, za pár dní si tuto informaci již nemusíme pamatovat, hlavně v případě, kdy provádíme za sebou více podobných experimentů...)
- Právě proto si LS píšeme, abychom zde zpětně našli detailní informace! To je účelem této dokumentace!

Etika experimentální práce

- Nikdy nezkreslovat výsledky, nedělat předčasné závěry, vždy mít dostatečně přesvědčivě zopakovaná data, pečlivě zhodnocená, zkontrolovaná
- Jakákoli manipulace s daty nejenže je neetická a nepřípustná, ale navíc se nikdy nevyplácí – zkreslené výsledky nelze zopakovat, nelze na ně navazovat v další práci, neboť další experimenty prostě nebudou „zapadat do schematu“, zkušená vědecká komunita stejně dříve nebo později podvody či manipulace odhalí
- I negativní výsledek je výsledek
- V případě, že se porouchá přístroj, příp. způsobíte nějakou škodu, nahlase to, nenechávejte nevyřešeno

Experimentální postup, provedení

- Přesný postup provedení – zaznamenat všechny koncentrace, objemy, inkubační doby a podmínky, použité přístroje, kity, pomůcky, kdo prováděl experiment nebo asistoval...
 - Je dobré si vést zvláštní složku/sešit/knihu s návody k jednotlivým laboratorním metodám a jejich principy

výsledky

- Zapsat všechny (i dílčí) výsledky, pozorování, způsob hodnocení výsledku, použitý přístroj, kdo hodnotil, za jakých podmínek, s využitím jakého software
- Přiložit získané výstupy – hodnoty z počítače, fotografie, grafy, schemata, scanované obrázky gelů, membrány, tabulky...
- Přesně označené názvy vzorků, koncentrace, délky trvání experimentu...
- Fungovaly kontroly (pozitivní...)?
- Napsat si, kde jsou v PC uloženy výsledky a pod jakým názvem

Diskuse a závěry

- **Nejdůležitější část protokolu, nikdy nevynechávat!**
- **Shrnout, jak experiment vyšel a proč, zda jsme úvodní hypotézu potvrdili nebo vyvrátili, čeho jsme dosáhli a jak lze na to navázat**
- **V případě nezdaru diskutovat a zapsat si, které body pravděpodobně byly zdrojem obtíží, příčinou nezdaru – a zaměřit se na ně příště – optimalizovat design experimentu**
- **Diskutovat získané výsledky s kolegy**
- **Konfrontace s literaturou**
- **Nikdy neodkládat analýzu výsledků, včasné odhalení případných chyb ušetří čas i peníze a pomůže včas dobře zhodnotit a usměrnit navržený postup řešení**

Praktické rady

- Zapisovat denně, paralelně při práci, nebo na konci dne
- Nepsat si poznámky po papírcích, kouscích filtračních papírů či papírových ubrouscích, mějte s sebou vždy Váš LS a ved'te si průběžné záznamy – postupem času je velmi oceníte!
- „Your laboratory note book is your friend. Be proud of your work and present it with pride.“

Praktické rady

- Pravidelně čtěte a udržujte si aktuální přehled minimálně v rámci svého oboru studia, svého tématu práce
- Důkladně prostudujte každou metodu, kterou chcete použít, abyste dobře znali její princip, možnosti, ale i omezení; abyste dokázali správně naplánovat experiment a interpretovat získané výsledky
- Nezapomínejte na diskuse se svými kolegy, spolupráce ve vědě je nesmírně důležitá; nezůstávejte osamoceni a uzavření do svého „badání“ 😊

Data v PC

- Data v elektronické podobě – pravidelně zálohujte! Není nic horšího než ztráta dat před odevzdáním bakalářské/diplomové práce ☹
- Názvy souborů – systematické, informativní, smysluplné
- Hierarchie, třídění do složek, logických celků

Data v PC

- Nezapomeňte v každém souboru u číselných údajů a výsledků vždy mít názvy vzorků (ne pouze čísla 1-X), číslo experimentu a datum hodnocení
- Používáte-li více počítačů, mějte systém v zálohování dat, aktuálních souborech – ne např. různé verze na různých počítačích a pak nevědět, která je ta poslední....