

PřF: Bi1044 Úvod do studia specializace Mikrobiologie
CVIČENÍ 6:
Pipetování, příprava roztoků, pufry

Pavel Dvořák, Ph.D.

Laboratoř bioinženýrství mikroorganismů, Oddělení mikrobiologie, Ústav experimentální biologie,
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 62500 Brno, Česká republika.

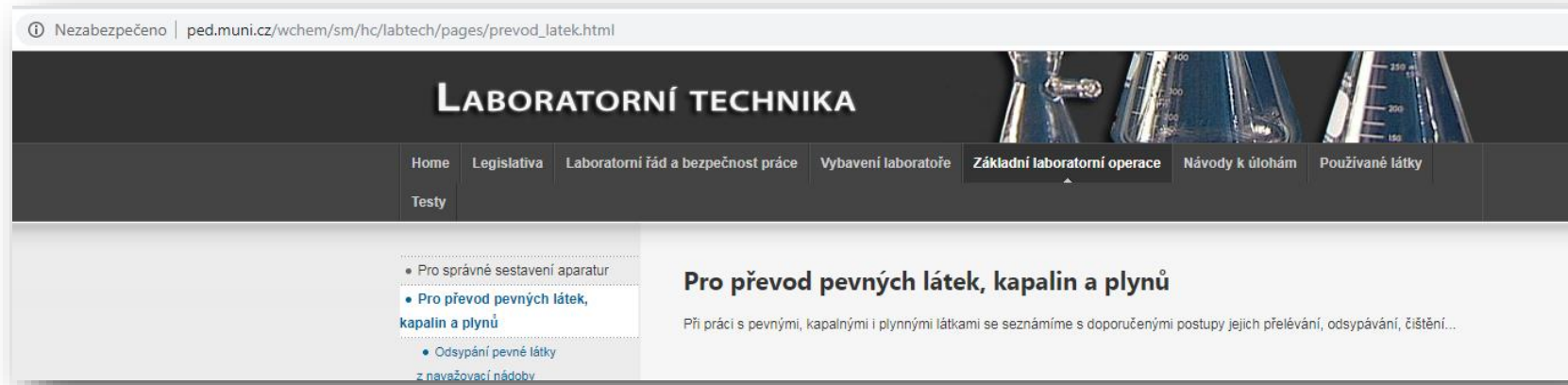


CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Manipulace s kapalinami: typy pipet, pipetování
- 2) Příprava roztoků, výpočet koncentrací
- 3) Pufry a jejich příprava

1) MANIPULACE S KAPALINAMI: DOPORUČENÉ ZDROJE

<http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/>



<https://www.gilson.com/guide-to-pipetting>

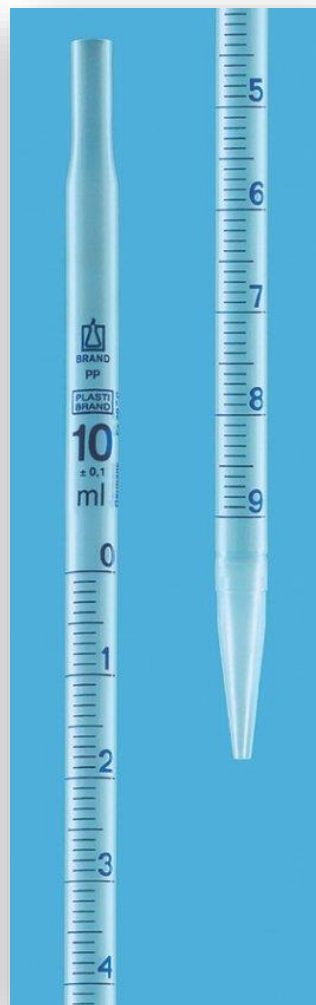
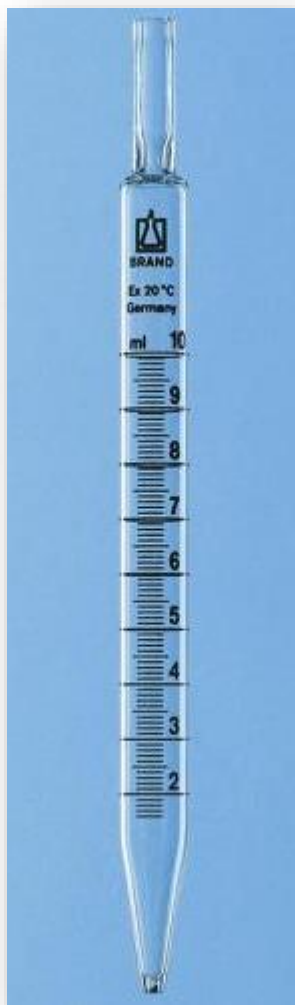
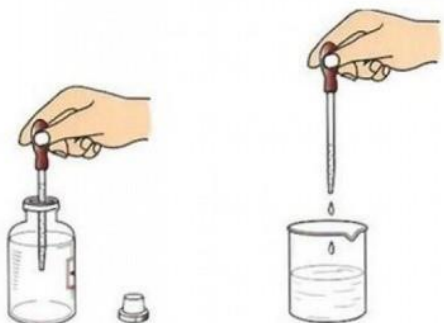
MANIPULACE S KAPALINAMI: LAHVE A KÁDINKY



MANIPULACE S KAPALINAMI: STŘIČKY A KAPÁTKA (PASTEURKY)



MANIPULACE S KAPALINAMI: SKLENĚNÉ PIPETY



MANIPULACE S KAPALINAMI: MIKROPIPETETY – MECHANICKÉ A DIGITÁLNÍ

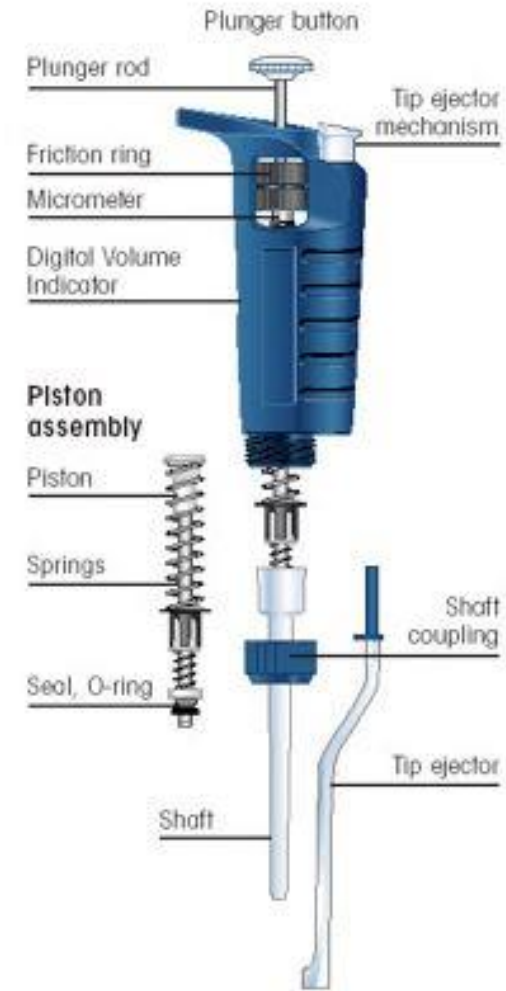


MANIPULACE S KAPALINAMI: PIPETOVACÍ ROBOT

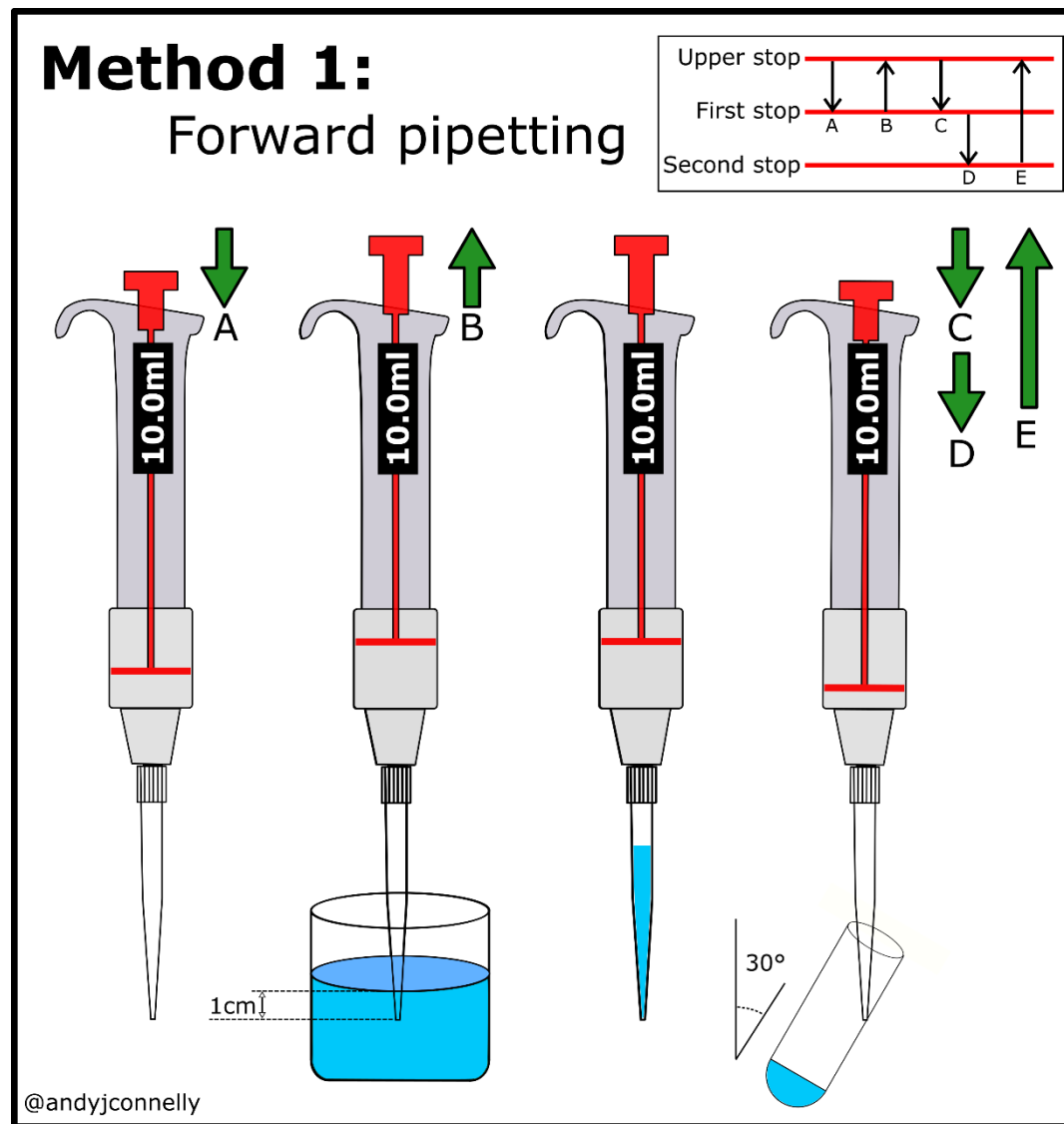
MANIPULACE S KAPALINAMI: MIKROPIPETETY – ŠPIČKY



MIKROPIPETA: ROZBORKA A SBORKA



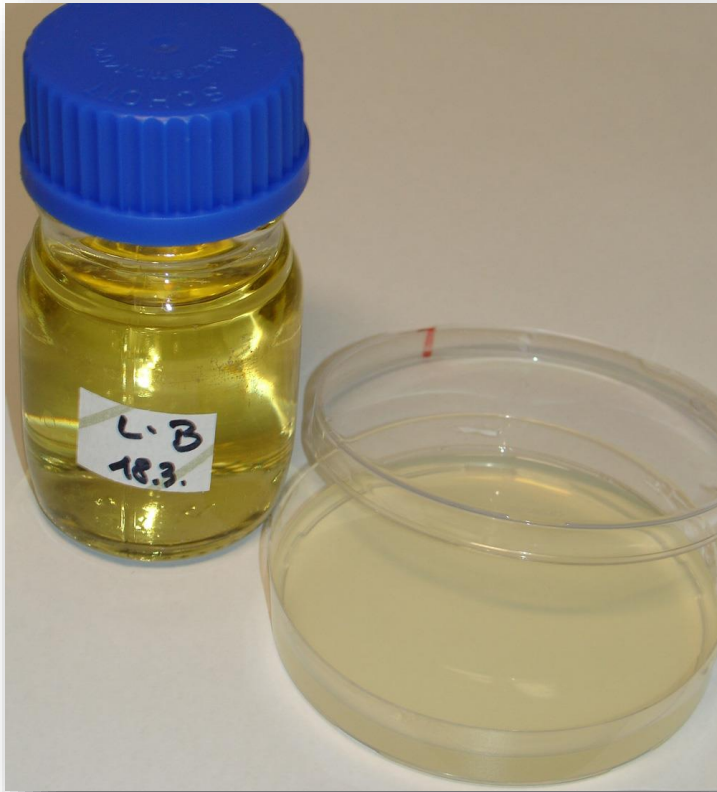
MIKROPIPETA: SPRÁVNÝ POSTUP PŘI PIPETOVÁNÍ



MIKROPIPETA: NĚKOLIK ZÁSAD SPRÁVNÉHO PIPETOVÁNÍ

- 1) Tekutinu pipetou nabírejte i vypouštějte pozvolna. Zamezíte tak vniknutí tekutiny do pipety.
- 2) Při nabírání tekutiny držte špičku dostatečně pod hladinou.
- 3) Při pipetování různých regencií **špičky vždy vyměňujte – předcházejte kontaminacím!**
- 4) Sledujte okometricky podle rysek na špičce, zda pipeta nabírá očekávaný objem.
- 5) **Držte pipetu svisle, vždy špičkou dolů!**
- 6) Při pipetování volatilních rozpouštědel používejte speciální špičky nebo nejprve několikrát naberte a vypusťte špičkou požadovaný objem (v pipetě se tak vytvoří trvalejší podtlak, který lépe udrží solvent ve špičce)

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ



2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

Hmotnostní zlomek je dán podílem hmotnosti určité látky a hmotnosti celé směsi.

Je dán vzorcem: $w = m_a/m_s$

Hmotnostní procento je hmotnostní zlomek vyjádřený procentem,

například: $w = 0.11 = 11 \%$

Příklad:

Směs o hmotnosti **70 g** obsahuje **20 %** určité látky. Vypočítejte její hmotnost.

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

Objemový zlomek je dán podílem objemu určité látky v objemu celé směsi.

Je dán vzorcem: $\varphi = V_a/V_s$

Objemové procento je objemový zlomek vyjádřený procentem,
například: $\varphi = 0.20 = 20 \text{ obj. \%}$

Příklad:

Roztok isopropanolu o objemu 40 cm^3 jsme připravili zředěním 8 cm^3 absolutního isopropanolu. Vypočítejte koncentraci roztoku v objemových %.

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

Koncentrace roztoků

Co znamená, že roztok glukózy je: 20 %-ní (w/w) weight per weight

20 %-ní (w/v) weight per volume

Co znamená, že víno má 10 %-ní obsah alkoholu (v/v) volume per volume

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

Termíny a vzorce k zopakování:

Molární hmotnost

$$M_m = m / n$$

Látkové množství

$$n = m / M_m$$

Molární koncentrace

$$c = n / V$$

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

Ředění roztoků:

$$n = n$$

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

2) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ, VÝPOČET KONCENTRACÍ

- A)** 20 ml 10 % roztoku NaCl ředíte 4x. Jaký je finální objem ředěného roztoku?
- B)** Máte 1 M roztok síranu hořečnatého. Jaký objem tohoto roztoku přidáte do 25 ml minimálního média, které má mít finální koncentraci MgSO_4 2 mM?
- C)** Máte 1,5 ml koncentrované buněčné suspence bakterie *Escherichia coli* s absorbancí $A_{600} = 8$. Kolik média přidáte, abyste získali suspenzi s $A_{600} = 1$.
- D)** Máte k dispozici purifikovanou DNA o koncentraci 100 μM . Do 50 μl PCR reakce potřebujete přidat DNA 10 pmol DNA. Kolik zásobního roztoku přidáte?

3) PUFRY A JEJICH PŘÍPRAVA

Pufr (z německého Puffer, „nárazník“ či tlumivý roztok) je **konjugovaný pár kyseliny a nebo zásady a jejich soli, který je schopný udržovat v jistém rozmezí stabilní pH po přidání kyseliny či zásady do systému**. Pufry jsou obvykle směsi slabých kyselin a jejich solí, nebo směsi slabých bází a jejich solí.



<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>

Useful pH Range



3) PUFRY A JEJICH PŘÍPRAVA

Běžné využití v laboratoři:

- Zajištění vhodného prostředí pro manipulaci s celými buňkami mikroorganismů
(Phosphate Buffer Saline, **PBS**)
- Stabilizace pH pro biotechnologické konverze s celými buňkami (**fosfátový pufr**)
- Měření aktivit enzymů v podmínkách *in vitro* (**PIPES, HEPES, fosfátový pufr, Tris base**)
- Manipulace s nukleovými kyselinami, elektroforetické pufrы - (Tris-EDTA **TE pufr**, Tris-acetát-EDTA **TAE pufr**, Tris-borát-EDTA **TBE pufr**)

3) ZAJIŠTĚNÍ VHODNÉHO PROSTŘEDÍ PRO MANIPULACI S CELÝMI BUŇKAMI

PBS (Phosphate Buffer Saline)

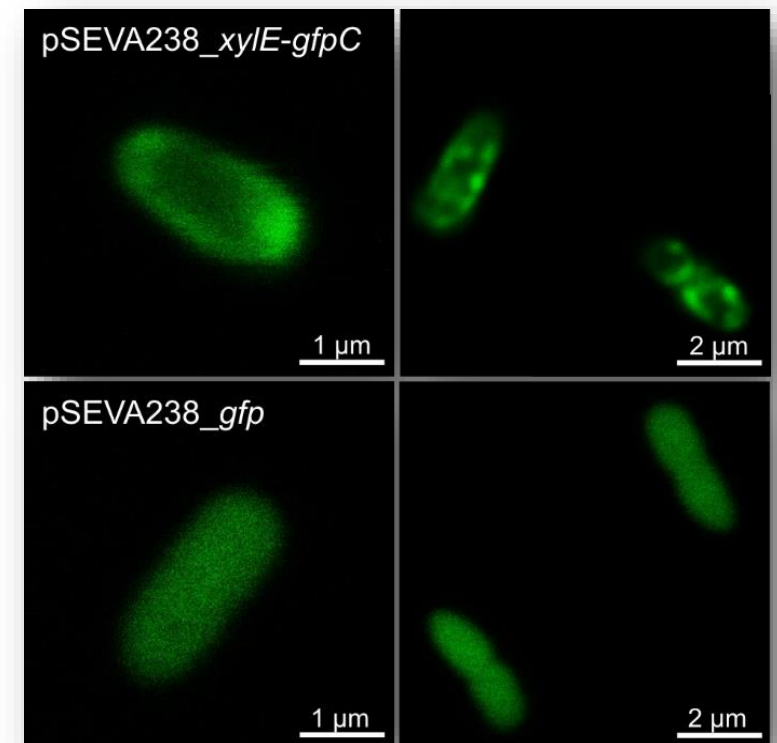
Izotonický roztok, netoxický pro většinu buněk, s menší pufrovací kapacitou

Běžné využití např. při promývání bakteriálních buněk před dalším použitím

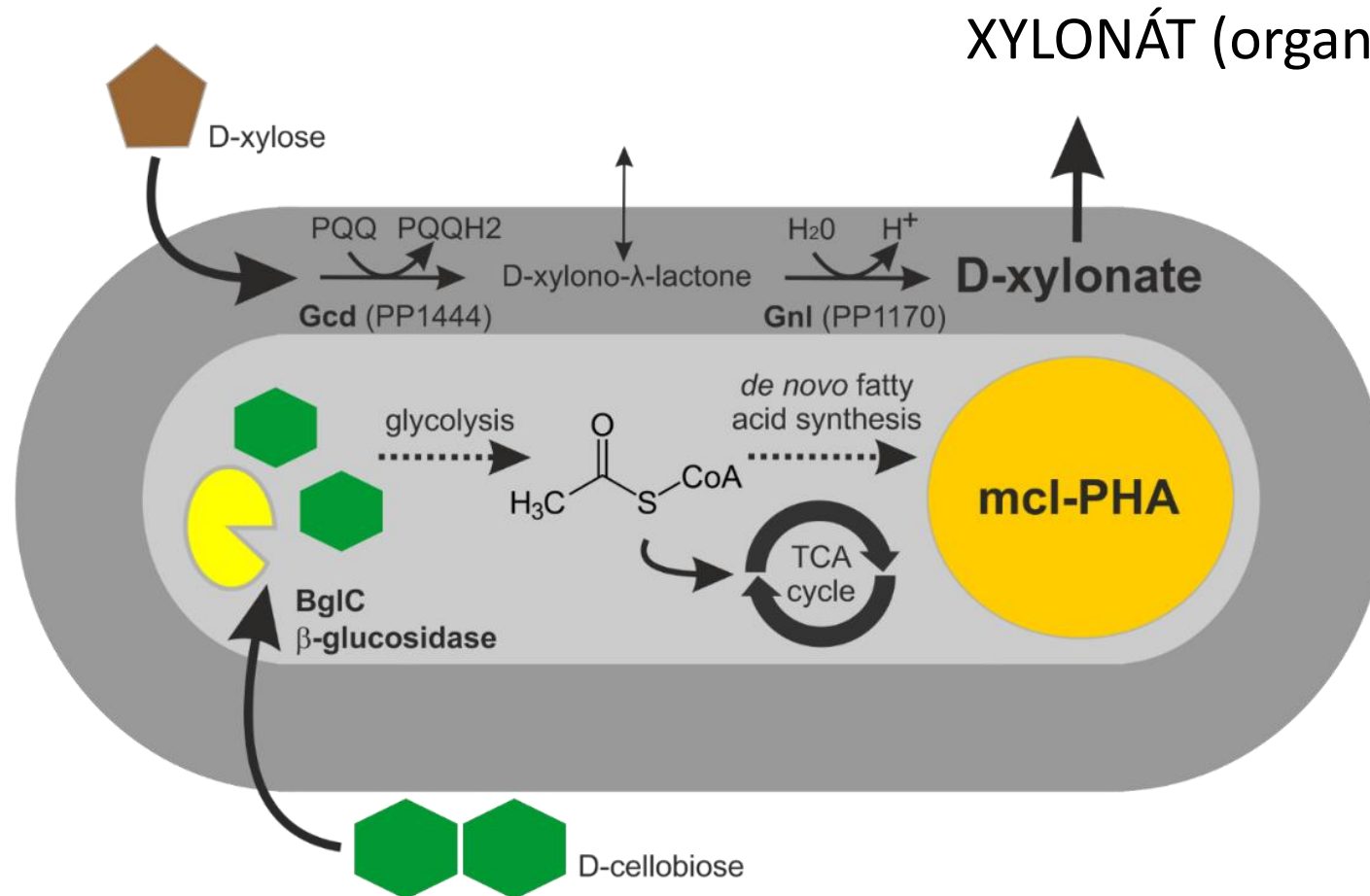
(mikroskopie, průtoková cytometrie), **pH ~ 7,4**

The most common composition of PBS (1×)

Salt	Concentration (mmol/L)	Concentration (g/L)
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
Na ₂ HPO ₄	10	1.44
KH ₂ PO ₄	1.8	0.24

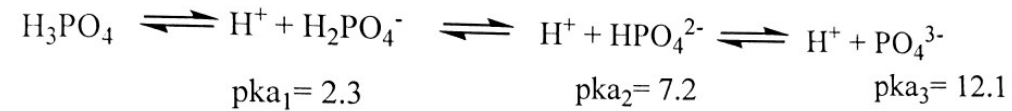


3) STABILIZACE PH PRO BIOTECHNOLOGICKÉ KONVERZE S CELÝMI BUŇKAMI



pH minimálního média = **7.0**

3) STABILIZACE PH PRO BIOTECHNOLOGICKÉ KONVERZE S CELÝMI BUŇKAMI



Preparation of 0.1 M **Potassium Phosphate** Buffer at 25°C

pH	VOLUME OF 1 M K_2HPO_4 (ml)	VOLUME OF 1 M KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

Dilute the combined 1 M stock solutions to 1 liter with distilled H_2O . pH is calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \left\{ \frac{(\text{proton acceptor})}{(\text{proton donor})} \right\}$$

where $\text{pK}' = 6.86$ at 25°C.

Preparation of 0.1 M **Sodium Phosphate** Buffer at 25°C

pH	VOLUME OF 1 M Na_2HPO_4 (ml)	VOLUME OF 1 M NaH_2PO_4 (ml)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

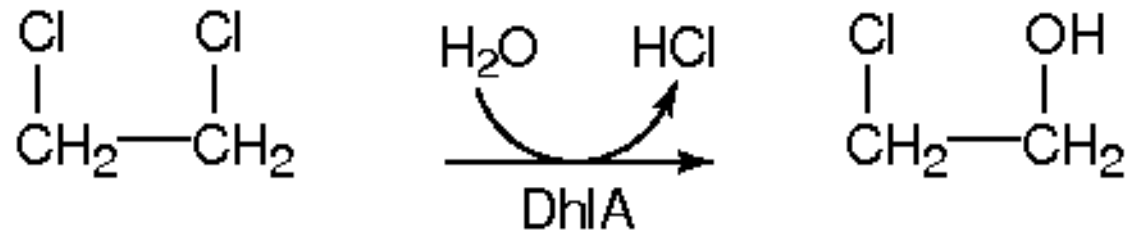
Dilute the combined 1 M stock solutions to 1 liter with distilled H_2O . pH is calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \log \left\{ \frac{(\text{proton acceptor})}{(\text{proton donor})} \right\}$$

where $\text{pK}' = 6.86$ at 25°C.

3) MĚŘENÍ AKTIVIT ENZYMŮ V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

Příklad: měření aktivity enzymu haloalkan dehalogenázy DhIA (*Xanthobacter autotrophicus*)

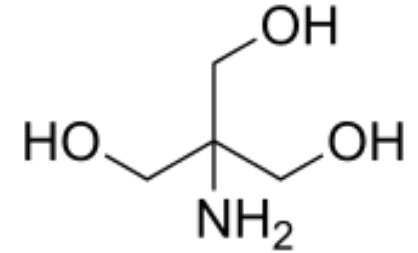


pH optimum enzymu haloalkan dehalogenázy je kolem **8.0**

3) MĚŘENÍ AKTIVIT ENZYMŮ V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

Tris base

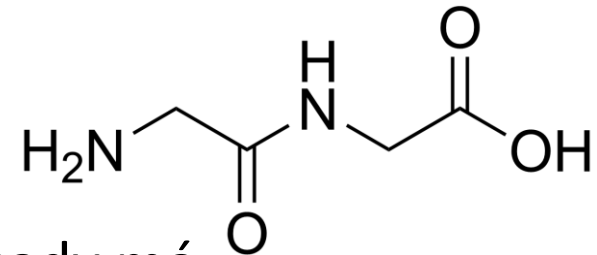
Tris, či tris(hydroxymetyl)aminometan, organická látka se vzorcem $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$



Konjugovaná Tris kyselina má pKa 8.07 (25 °C), efektivní pufrovací kapacita mezi **7.1 and 9.1** (pKa \pm 1) při pokojové teplotě. Tris inhibuje řadu enzymů!

GLY-GLY pufr (glycylglycin)

Dipeptid AA glycinu (nejjednodušší peptid), po přidání kyseliny či zásady má pufrovací kapacitu v rozmezích pH 2.5–3.8 a **7.5–8.9**, netoxický, ale slabý a málo stálý pufr



3) MANIPULACE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI

TE pufr (Tris EDTA)

10 mM Tris + 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), **pH upraveno na 8.0**

TAE (Tris acetátový) nebo TBE (Tris borátový) pufr

Nějběžnější pufr pro elektroforetickou analýzu nukleových kyselin

50 x Tris-acetátový pufr (50xTAE pufr)

- 1) Navažte a postupně rozpusťte v 800 ml destilované vody 242.2 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris Base)
- 2) Přidejte 18.612 g EDTA.
- 3) Přidejte 60.5 mL kyseliny octové.
- 3) Doplňte destilovanou vodou na objem 1 000 ml v analytické odměrné baňce.
- 4) Přelijte roztok do 1 000 ml láhve se šroubovacím uzávěrem.
- 5) Skladujte při 4 až 8 °C, při tomto způsobu skladování možno používat 12 měsíců.



2) MANIPULACE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI

