

Laboratorní technika

Pro experimentální práci v laboratoři je nutné znát a osvojit si celou řadu postupů a základních laboratorních technik tak, aby prováděné experimenty byly nejenom přesné a snadno opakovatelné, ale také bezpečné pro výzkumníka i jeho okolí. Cílem této úlohy tedy bude seznámit se se základními a nejběžněji používanými laboratorními metodami a přístroji jako je např. práce s automatickou pipetou a analytickými vahami, měření a úprava pH roztoků či centrifugace.

Bezpečnost práce v chemické laboratoři

1. Provádějte pouze práce podle pokynů vyučujícího a pracovního návodu.
2. V laboratoři nikdy nejezte, nepijte a nekuřte. Po skončení práce si důkladně umyjte ruce.
3. K jídlu a pití (mimo laboratoř) nepoužívejte nikdy chemické sklo.
4. Tašky a oblečení uložte do skříní mimo laboratoř.
5. Při práci v laboratoři vždy noste pracovní plášť a vhodnou obuv.
6. Neprovádějte samovolné opravy nebo úpravy na elektrické instalaci a přístrojích.
7. Při práci s látkami uvolňujícími nebezpečné plyny pracujeme v digestoři.
8. Chemikálie nikdy nezkoušejte ústy a neinhaluje výpary.
9. Nikdy nepipetujte ústy.
10. Při práci se žíravinami a jinými nebezpečnými látkami si chraňte obličej a oči ochranným štítem, ruce gumovými rukavicemi.
11. Na pracovišti udržujte pořádek a čistotu. Dbejte, abyste vnější stěny nádob nebo pracovní místo nepotřísnili chemikáliemi.
12. Koncentrované kyseliny a zásady ředte tak, že kyselinu nebo zásadu nalijete tenkým proudem po tyčince do vody za současného míchání.
13. Při provádění pokusů ve zkumavkách držíme ústí zkumavky odvrácené od obličeje svého i spolupracovníků.
14. Při práci s hořlavinami nesmí být v blízkosti otevřený oheň.
15. Zvýšenou pozornost věnujte hlavně manipulaci s hořlavinami I. třídy, které mají teplotu vzplanutí do 21 °C (aceton, ether, methanol, ethanol, benzín, benzen a toluen).
16. Pokud vypukne požár, je každý povinen pokusit se ho zdolat vlastními silami (hasicím přístrojem, improvizovanými hasicími prostředky). Je nutno dále vypnout elektrický proud a pokusit se odstranit z okolí požáru hořlavé látky (zejména kapaliny) a nádoby se stlačenými plyny. Nelze-li požár zvládnout vlastními silami, je nutné neprodleně volat hasiče (tel. číslo 150).
17. Střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do nádob zvlášť k tomu určených.
18. Zbytky jedů a organických rozpouštědel likvidujte podle pokynů vyučujícího.
19. Při práci s etherem dbejte úzkostlivě na bezpečnostní opatření (možnost vznícení i od horkých součástí).
20. V případě nehody okamžitě informujte vyučujícího a poskytněte první pomoc. Vedoucímu cvičení je třeba hlásit i každé nepatrné poranění, bolesti hlavy, hučení v uších apod. Ve všech případech je nutno sepsat protokol o poranění pro případ pozdějších komplikací.
21. Po skončení práce v laboratoři po sobě řádně umyjte veškeré použité nádoby a uklidte pracovní místo.

Laboratorní sklo a plasty

Laboratorní sklo je termín označující veškeré skleněné předměty a nádoby, které se používají v chemické laboratoři. Laboratorní sklo je vysoce chemicky odolné, nicméně je křehké, a proto je nutné s ním pracovat s opatrností. Naprasklé či odštípnuté sklo může být velmi nebezpečné. V laboratoři pracujeme často také s pomůckami z porcelánu, jako jsou např. třecí misky a tloučky nebo váženky, které jsou mechanicky i chemicky odolné, nicméně jsou náchylné k tříštění (zejména při prudkých změnách teploty). Laboratorní plasty je souhrnný název pro veškeré plastové pomůcky a nádoby používané v laboratoři. Jedná se např. o špičky, mikrozkuřavky, destičky, stojánky, krabičky, serologické pipety, Petriho misky, kyvety, stojany, kádinky, atd. Některé plasty (např. špičky, mikrozkuřavky, Petriho misky) jsou používány jednorázově, kdy jsou po použití vyhozeny do určených nádob a jiné (stojánky, kádinky) jsou, po řádném umytí, používány opakovaně.

Je velice důležité udržovat chemické nádobí (sklo, plasty, porcelán, ale i ostatní předměty) čisté. Po použití se musí nádobí důkladně umýt, jinak hrozí kontaminace prováděných experimentů chemikáliemi či biologickými agens. Laboratorní nádobí a pomůcky se umývají hned, jak je to možné, aby se ve výlevkách nehromadily a nedošlo k jejich poškození či rozbití. Hrubé nečistoty se z nádobí odstraňují mechanicky kartáčem, houbičkou či pískem, případně se nechají odmočit. Chemické nádobí čistíme teplou vodou se saponátem, který poté důkladně omyjeme. Popisky lihovou fixou odstraníme pomocí denaturovaného ethanolu naneseného na kousek buničiny. Veškeré použité nádobí je po umytí nutné opláchnout ještě deionizovanou vodou. Deionizovaná voda je voda, která je chemicky čistá (deminalizovaná) na úrovni destilované vody, ale místo destilace je vyráběna pomocí kombinace několika separačních technik (filtry, iontoměniče, adsorbenty, membránové filtry, případně reverzní osmóza) k odstranění všech kontaminantů. V laboratořích Katedry biofyziky je zpravidla vedle kohoutků na teplou a studenou vodu z vodovodního řádu umístěn ještě zvláštní kohoutek právě s deionizovanou vodou (obr. 1). Umyté nádobí dáme poté usušit na sušáků umístěné vedle výlevky.



Obr. 1 Kohoutky na studenou a teplou vodu z vodovodního řádu a kohoutek na deionizovanou vodu.

Vážení

V laboratoři jsou obecně používány dva druhy vah – analytické a technické (označované také jako předvážky). Tyto dva typy vah se liší přesností a maximální hmotností, kterou na nich lze navážit (váživostí). Údaje o váživosti a přesnosti vah bývají zpravidla uvedeny přímo na vahách. Pro oba typy vah platí, že nikdy nedáváme vážené chemikálie přímo na vážící miskou, ale používáme k tomuto účelu váženky (obr. 2). Po skončení vážení použijeme k očištění vah štětec a ethanolem či dezinfekčním roztokem otřeme stůl.



Obr. 2 Váženky

Předvážky mají přesnost vážení nižší než váhy analytické a váživost naopak vyšší. Předvážky na obr. 3 mají přesnost vážení 100 mg a váživost 500 g. Analytické váhy mají přesnost vážení vyšší než předvážky a váživost naopak nižší. Analytické váhy na obr. 4 mají přesnost vážení 1 mg a váživost 220 g. S analytickými vahami pracujeme opatrně, nikam je nepresouváme, nepřenášíme a zavíráme posuvná dvířka.



Obr. 3 Předvážky



Obr. 4 Analytické váhy

Pufry a úprava pH

Pufry (tlumivé roztoky), jsou roztoky slabých kyselin a jejich solí či slabých solí a jejich zásad, které po přidání další soli či kyseliny neumožní změnu pH roztoku. Běžně používaných pufřů je celá řada a výběr vhodného pufru je zpravidla založen na hodnotě pH, kterou potřebujeme udržet. Způsobů namíchání pufru je několik, v závislosti na konkrétním pufru. Předpřipravený pufr (tzn. s naváženými a rozpuštěnými chemikáliemi) doplníme do cca 80 % celkového objemu a poté upravíme pH na požadovanou hodnotu za použití pH metru a malého množství kyseliny nebo zásady. Zda použít kyselinu (HCl) nebo zásadu (NaOH či KOH) závisí na hodnotě pH, které chceme dosáhnout a na výchozím pH, které roztok má. Součástí návodu k přípravě pufru je někdy uvedeno také, kterou konkrétní chemikálií je nutné pH upravit. V blízkosti pH metru jsou umístěny lahvičky s předem připravenými roztoky určenými právě k úpravě pH. Přístroj na měření pH (pH metr) měří pH potenciometricky pomocí skleněné elektrody, která je tvořena skleněnou trubičkou zakončenou responzivní skleněnou membránou ve tvaru baňky. Uvnitř elektrody je standardní vnitřní roztok, ve kterém je ponořena Ag-Cl elektroda. Skleněná elektroda pH metru je v případě, že není používána, uchovávána v roztoku 3M KCl. Po použití pH metru je nutné vždy zkontrolovat ponoření elektrody v tomto roztoku – elektroda nesmí vyschnout! V blízkosti pH metru je zpravidla umístěna také magnetická míchačka umožňující míchání roztoku během upravování pH. Skleněná elektroda je velmi křehká, je proto nutné dbát na to, aby během míchání nedošlo ke kontaktu elektrody s magnetickým míchadlem. Přístroj je také nutné pravidelně kalibrovat za pomoci k tomu určených kalibračních roztoků.



Obr.5 pH metr a magnetická míchačka

Centrifugace

Centrifugace je jednou z nejběžnějších technik používaných v laboratořích. Využívá odstředivé síly k oddělení částic o různé hustotě, velikosti a tvaru. V laboratoři se můžeme běžně setkat s různými typy centrifug. Některé centrifugy mají vyměnitelné rotory, kdy je rotor zvolen na základě nádoby, kterou chceme k centrifugaci použít (mikrozkumavky, destičky, zkumavky) a nastavitelné i další parametry (relativní centrifugační síla, počet otáček za minutu či teplota) (obr. 6). Jiné centrifugy mají pevně zabudovaný rotor a fixní počet otáček (obr. 7).



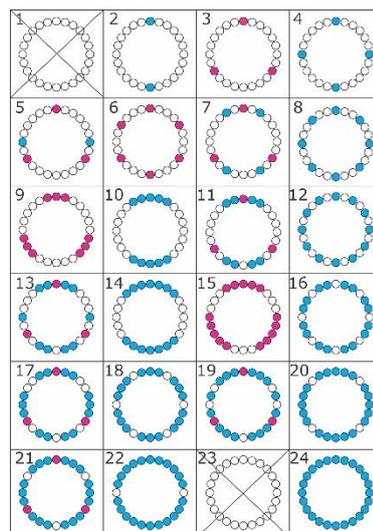
Obr. 6 Stolní centrifuga s nastavitelnými parametry a vyměnitelnými rotory



Obr. 7 Malá stolní centrifuga s fixními parametry a rotorem

Během centrifugace působí na částice **centrifugační síla (F)**, která se počítá ze vzorce: $F = m \cdot r \cdot \omega^2$, kde m je hmota částic, r je poloměr rotoru (tj. vzdálenost dna centrifugační zkumavky od osy otáčení) a ω je úhlová rychlost ($\omega = 2 \cdot \pi \cdot n$, kde n je frekvence otáček). Součin $r \cdot \omega^2$ [$m \cdot s^{-2}$] odpovídá centrifugačnímu zrychlení. Pro praktické použití je zavedena veličina **relativní centrifugační síla (RCF = $1,118 \cdot r \cdot N^2 \cdot 10^{-5}$** , kde N je počet otáček za minutu), která udává kolikrát je vyvolané centrifugační zrychlení vyšší než tíhové zrychlení. RCF se udává v násobcích g a je bezrozměrná. Při nastavování parametrů centrifugace je na centrifuze možné zvolit hodnotu právě relativní centrifugační síly (označováno jako **rcf** či **g**) či počet otáček za minutu (**rpm**). Z uvedených vzorců je však patrné, že pro správnou charakterizaci centrifugace údaj **rpm** není dostačující, jelikož je závislý na poloměru rotoru a tedy se liší v závislosti na použitém rotoru.

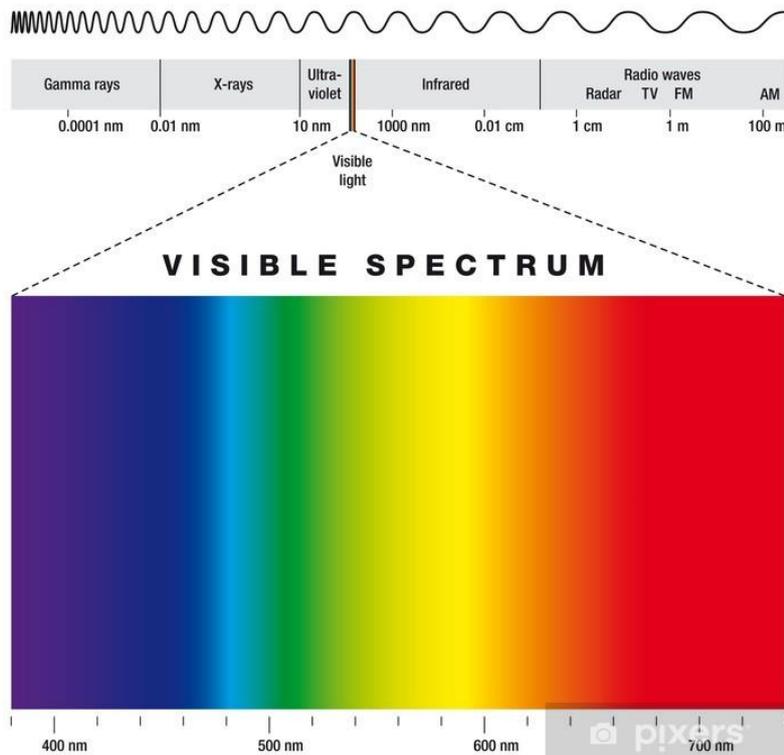
Pro správnou funkci centrifugy je nutné centrifugované nádoby se vzorky před samotnou centrifugací vyvážit. Na obr. 8 je vzor pro vyvážení centrifugy s rotorem pro 24 mikrozkuumavek.



Obr. 8 Návod na vyvážení centrifugy

Absorpční spektrofotometrie

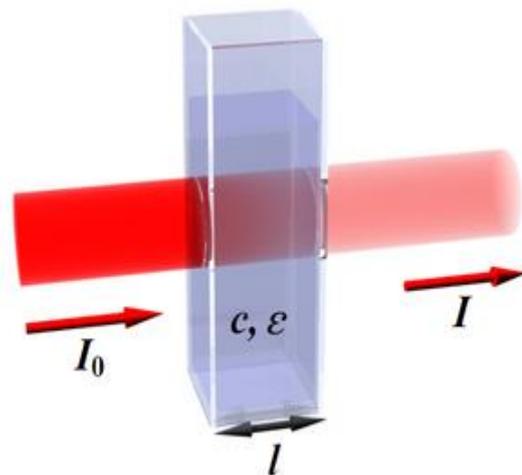
Spektrofotometrie je velmi často užívanou metodou umožňující zjištění koncentrace látek, které jsou samy o sobě barevné nebo reagují za tvorby barevného produktu. Vidíme-li 2 roztoky stejné látky o různé intenzitě zbarvení, automaticky předpokládáme, že tmavší z roztoků je koncentrovanější, což je vlastně podstatou spektrofotometrie. Pokud víme, kolik světla roztoky prochází, můžeme zjistit, jakou mají koncentraci. Množství procházejícího světla můžeme analyzovat spektrofotometrem na principu absorpční spektrofotometrie.



Obr.9 Světelné spektrum

Absorpční spektrofotometrie v UV oblasti měří absorpci světla od 200 do 380 nm (bezbarvé látky) a ve viditelné oblasti (VIS; lidským okem) od 380 nm do 800 nm (barevné látky). Světlo je elektromagnetické záření (vlnění) charakterizované vlnovou délkou a frekvencí, která určuje jeho barvu (odlišnou frekvenci vnímáme jako odlišnou barvu; světlo s vyšší frekvencí je modřejší a naopak světlo s nižší frekvencí je červenější). Z praktického hlediska je ale vhodnější měřit vlnovou délku světla než jeho frekvenci, kdy platí, že vlnová délka je nepřímo úměrná frekvenci (čím delší je vlnová délka, tím nižší frekvence).

Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace roztoku je měřeno, kolik světla projde daným roztokem, který je umístěn ve skleněné či plastové kyvetě. Pokud roztok část světla absorbuje, je intenzita světla paprsku, který do roztoku vstupuje (I_0) vyšší než intenzita světelného paprsku, který z roztoku vychází (I). Tento poměr je dán **transmitancí** (propustností; $T = I/I_0$; obr. 10). Čím vyšší bude koncentrace roztoku, tím větší šanci má procházející foton, že bude absorbován. Zároveň, máme-li 2 roztoky téže látky o stejné koncentraci a jeden umístíme do delší kyvety než druhý, budou se tyto dva lišit pouze v délce dráhy, kterou musí foton roztokem projít. Pokud svítíme světlem stejné intenzity na obě kyvety, delší kyvetou světlo prochází déle než užší. Čím déle foton prochází, tím větší má šanci, že bude absorbován. Absorpce fotonu tedy roste s rostoucí koncentrací i délkou dráhy. Transmitance roztoku je tedy závislá na: 1) koncentraci roztoku 2) délce dráhy (tzn. šířce použité kyvety) a 3) vlastnostech absorbujícího roztoku.



Obr. 10

Tyto vztahy popisuje **Lambert-Beerův zákon**: $T = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$

kde: **T** = transmittance; **ϵ** = molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) charakterizující míru absorpce látky při určité vlnové délce v roztoku o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v kyvetě o délce 1 cm; **c** = koncentrace rozpuštěné látky ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); **l** = tloušťka absorbující vrstvy (délka kyvety; cm).

Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že transmittance je exponenciálně závislá na koncentraci roztoku. Pro vyjádření závislosti absorpce záření na koncentraci absorpční složky byla zavedena bezrozměrná veličina **absorbance (A)**; je vhodné vztah koncentrace a absorpce logaritmovat, čímž se z exponenciální závislosti stane lineární), kdy **$A = -\log T$** a tedy **$A = \epsilon \cdot c \cdot l$**

Absorbance a transmittance jsou tedy v inverzním vztahu – čím více roztok světlo absorbuje, tím méně ho propouští. Transmittance nabývá hodnot od 0 (nepropustný vzorek) do 1 (zcela propustný vzorek). Absorbance nabývá hodnot od 0 (vzorek neabsorbuje) do ∞ (absorbuje veškeré záření dané vlnové délky). Pro praktické měření mají však z hlediska jeho přesnosti význam jen hodnoty absorbance nepřekračující hodnotu 1.

Použitá literatura:

Kol. autorů (2021) Laboratorní technika. Katedra biochemie PŘF UPOL

Káš J, Kodíček M, Valentová O (2006) Laboratorní techniky biochemie. VŠCHT, ISBN 80-7080-586-2

Subhanová I (2022/2023) Spektrofotometrie; Praktické cvičení z lékařské biochemie. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK

Experiment č. 1

Příprava pufru A používaného pro izolaci chloroplastů

1. Navažte požadované množství chemikálií za použití předvážek a analytických vah.
2. Chemikálie rozpusťte v deionizované vodě za použití magnetické míchačky.
3. Vzniklý roztok doplňte vodou přibližně do 400 ml.
4. Pomocí pH metru změřte pH roztoku a upravte ho na hodnotu 7,2.
5. Roztok doplňte deionizovanou vodou do 500 ml.

Složení pufru A, pH 7,2	
	na 500 ml pufru:
sacharóza	68,4 g
HEPES	4,2 g
NaCl	11,68 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4 g
Na-Asc	0,5 g
BSA	1,0 g

Experiment č. 2

Pasážování nádorových buněk

Experiment č. 3

Extrakce chlorofylu *a+b* z listu ječmene a stanovení jeho koncentrace

1. Z listů ječmene oddělíme segment, který obkreslíme na průhlednou folii nebo zvážíme.
2. Segment nastříháme na malé kousky do třecí misky, přidáme malé množství 80% acetonu a špetku MgCO₃ (váže buněčné kyseliny a zabraňuje přeměně chlorofylů na feofytiny), důkladně rozetřeme tloučkem, opakovaně vypláchneme 80% acetonem a slijeme do popsané mikrozkušavky (celkové množství acetonu: 1 – 2 ml).
3. Mikrozkušavky vložíme do centrifugy a centrifugujeme při 6000 g po dobu 10 minut (při 4 °C).
4. Po centrifugaci slijeme supernatant do skleněných zkumavek se stupnicí a na spektrofotometru změříme jeho absorbanci při vlnových délkách 646,8; 663,2 a 750 nm v jednocentimetrové kyvetě.
5. Supernatant případně zředíme tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4 – 0,8 a zapíšeme si přesný objem supernatantu.
6. Z naměřených hodnot absorbancí (A) vypočítáme podle následující rovnice obsah chlorofylů *a* a *b* v extraktu podle Lichtenthalera (1987):

$$\text{Chl } (a+b) = 7,15 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

kde $A_{663,2}$; $A_{646,8}$; A_{750} jsou hodnoty absorbance pigmentového extraktu v příslušných vlnových délkách (663,2 nm; 646,8 nm a 750 nm).

7. Získanou hodnotu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] vynásobíme celkovým objemem extraktu [ml] a podělíme hodnotou listové plochy [cm^2] nebo hmotností [mg] – dostaneme hodnotu obsahu chlorofylu na plochu [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$] nebo na hmotnost [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$] v jednotlivých listových segmentech.