

Laboratorní přístrojová technika

- Co najdeme v laboratoři?
 - Přístroje pro obecné použití
 - centrifugy, třepačky, pipety, biohazard boxy
- Trocha teorie o DNA a PCR
 - Analytické přístroje a příprava vzorků
 - elektroforézy gelové a kapilární, sekvenátory, termocyclery
- Přístroje pro analýzu DNA
- Spektrofotometry
- Sekvenátor DNA – Beckman Coulter CEQ8000

Centrifugy

- Co je to centrifuga?
 - Rotační zařízení pro separaci frakcí látek o různé hmotnosti
- Aplikace
 - chemie, biochemie – rychlejší usazování pelety na dno zkumavky
 - jaderné inženýrství – oddělování izotopů uranu
 - odstředivka na prádlo :-)
- Rozdělení podle rychlosti rotace, resp. dosažitelného g
 - při rotaci rychlejší než cca 20 000 ot/min hovoříme o ultracentrifugách, současné běžně prodávané centrifugy dosahují rychlosti až 130 000 ot/min (až 800 000 g !; podle typu použitého rotoru)

- Malé laboratorní centrifugy
 - nastavitelné otáčky, čas
 - různé typy rotorů
 - malé, levné, lehce přemístitelné



- Stolní centrifugy
 - vyšší rozsah nastavitelných otáček (cca do 15 000)
 - mohou být chlazené
 - nutno instalovat ve vodorovné poloze
 - umožňují uložit uživatelské programy
 - lze použít více druhů zkumavek



Z pohledu technika...

- Malé centrifugy (např Biosan..)
 - napájení externím adaptérem 12V/500mA
 - pohon – ss motorek, PWM modulace
 - řízení RISC mikroprocesor PIC16F84 :-)
 - display – 2*16 znaků maticový
 - Servis? - výměna některého ze 3 funkčních bloků – řídicí deska, display, motor
- Stolní centrifugy
 - napájení 230V
 - motor střídavý, inteligentní řízení, umožňuje aktivní brždění
 - řízení průmyslovým mikroprocesorem
 - Servis? - opět výměna funkčních celků, kontrola funkce čidel

- Ultracentrifugy

- až 130 000 otáček
- stolní/sálové
- rotor musí být v úplné rovině
- vakuovaný chamber



- úhlový rotor



- swing-out rotor

Z pohledu technika...

- Při instalaci kontrolovat vodorovnost stroje – speciální rotor
- Motor je mazán olejem – opatrná manipulace, kontrola hladiny
- Chamber chlazený peltiery – nutný dobrý kontakt
 - U běžných centrifug je chlazení řešeno kompresorem – klasická „lednice“
- Kontrola těsnění – v chamberu je při provozu vysoké vakuum (desítky částic na kubickou stopu)
 - Vzduch by při vysoké rychlosti rotace způsobil ohřev rotoru a vzorků, brždění rotoru
-

Když se utrhne rotor...



Třepačky, vortexy atd.

- od malých stolních přístrojů po temperované boxy o obsahu stovek litrů





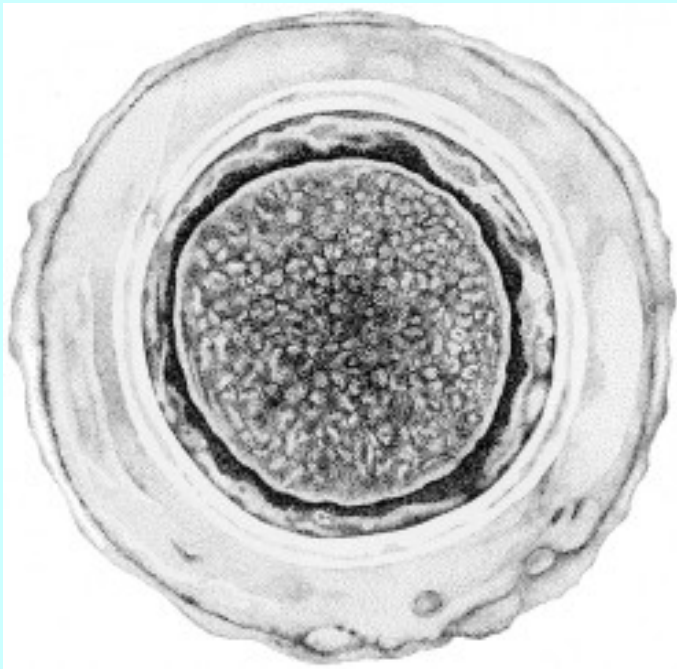
Biohazard boxy

- slouží pro manipulaci s biologicky nebezpečnými látkami
 - sterilizace pomocí UV lamp
 - laminární proudění vzduchu, HEPA filtry



DNA a PCR

Lidé jsou tvořeni z buněk



Struktura buňky

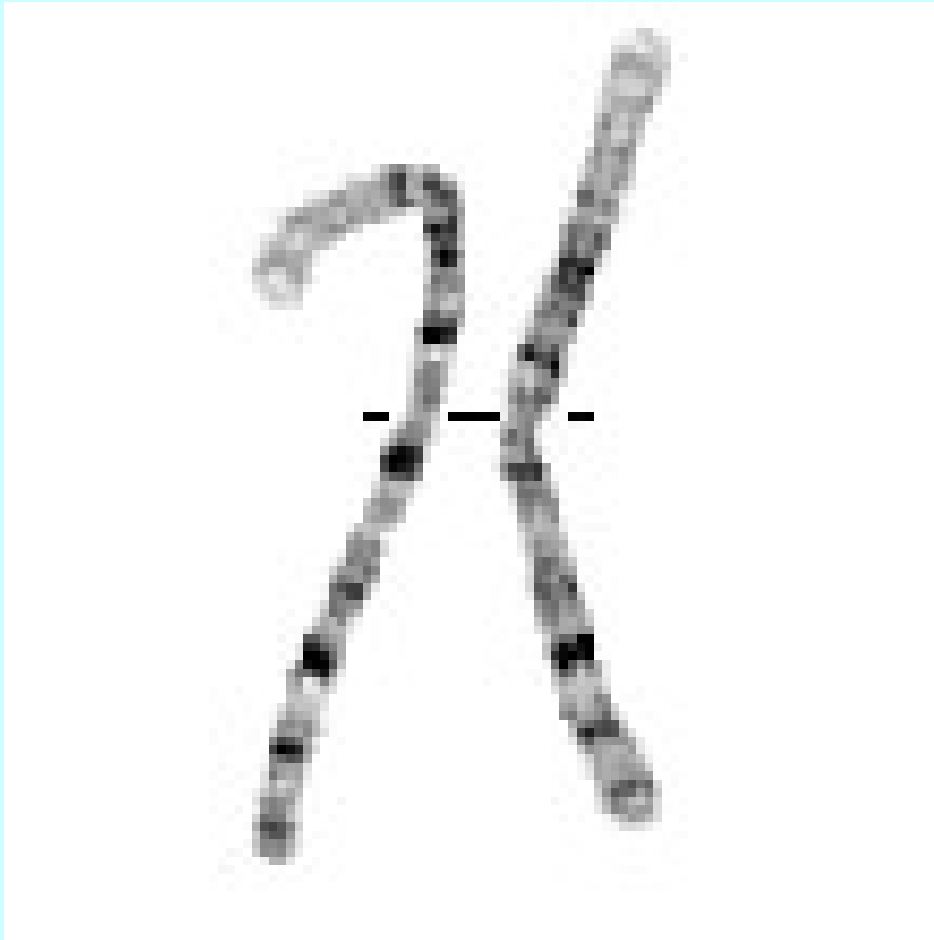


Fotografie buněk

Buňky obsahují chromosomy

- Chromosomy jsou genetický materiál - DNA
- DNA je skladiště informací pomocí kterých jsme vytvořeni
- Při dělení buněk se kopírují také chromosomy a takto si předávají uloženou informaci

Chromosomy

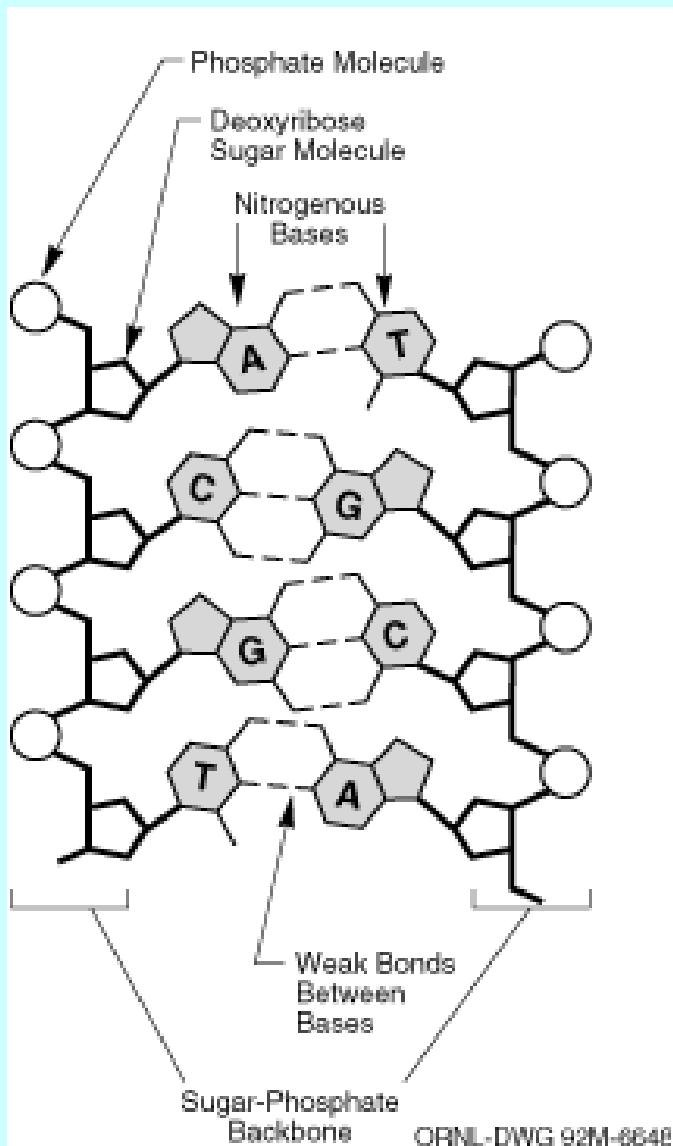


- Obrázek chromosomu
- Vytvořen dvěma spirálami DNA obtočenými kolem sebe

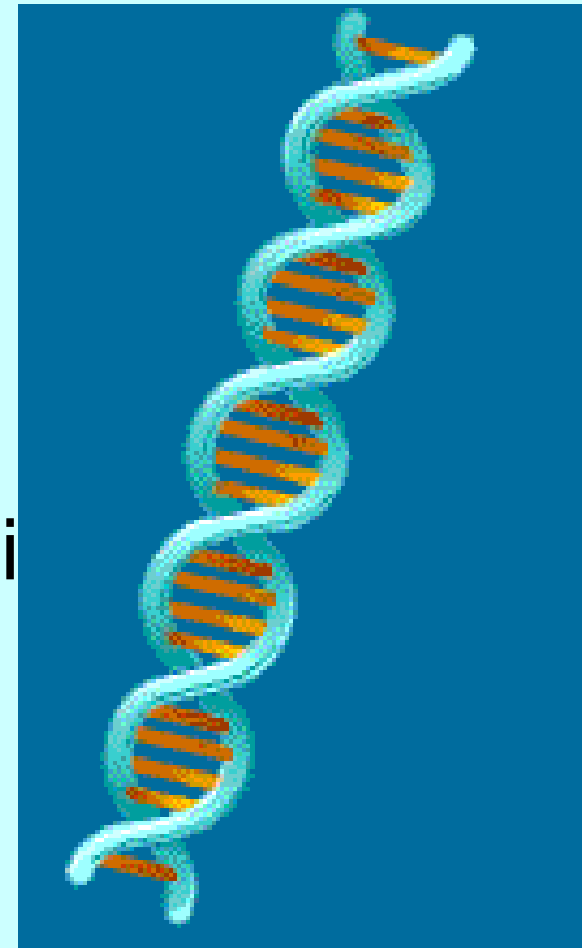
Co je DNA?

- Deoxyribonucleic Acid
- Čtyři chemické struktury (báze), A,C,G,T
- Spojeny cukr-fosfátovým můstkem
- Dvě vlákna spojena bázemi
 - A~T.....2 x H₂ bonds
 - G~C.....3 x H₂ bonds

Co je DNA?



- Dvě vlákna spojena H_2 vazbami
- Běžně se vyskytuje ve dvojité šroubovici



Co je DNA?

- Funkce
 - Přímá produkce proteinů, jež určují funkci buňky
 - Předávání dědičných informací z generace na generaci – kopírování sama sebe

Co je DNA?

- Jak to funguje?
 - Informace je uložena v pořadí bází v DNA – v sekvenci
 - Sekvence bází je kódem pro různé aminokyseliny (stavební kameny proteinů)
 - Rozdílné sekvence vedou k produkci různých proteinů s různou funkcí

DNA-Geny-Chromosomy

4 báze DNA

AG
GT

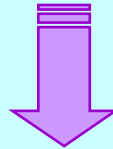


Geny

AGA TCA GAT AGA CAG



Protein



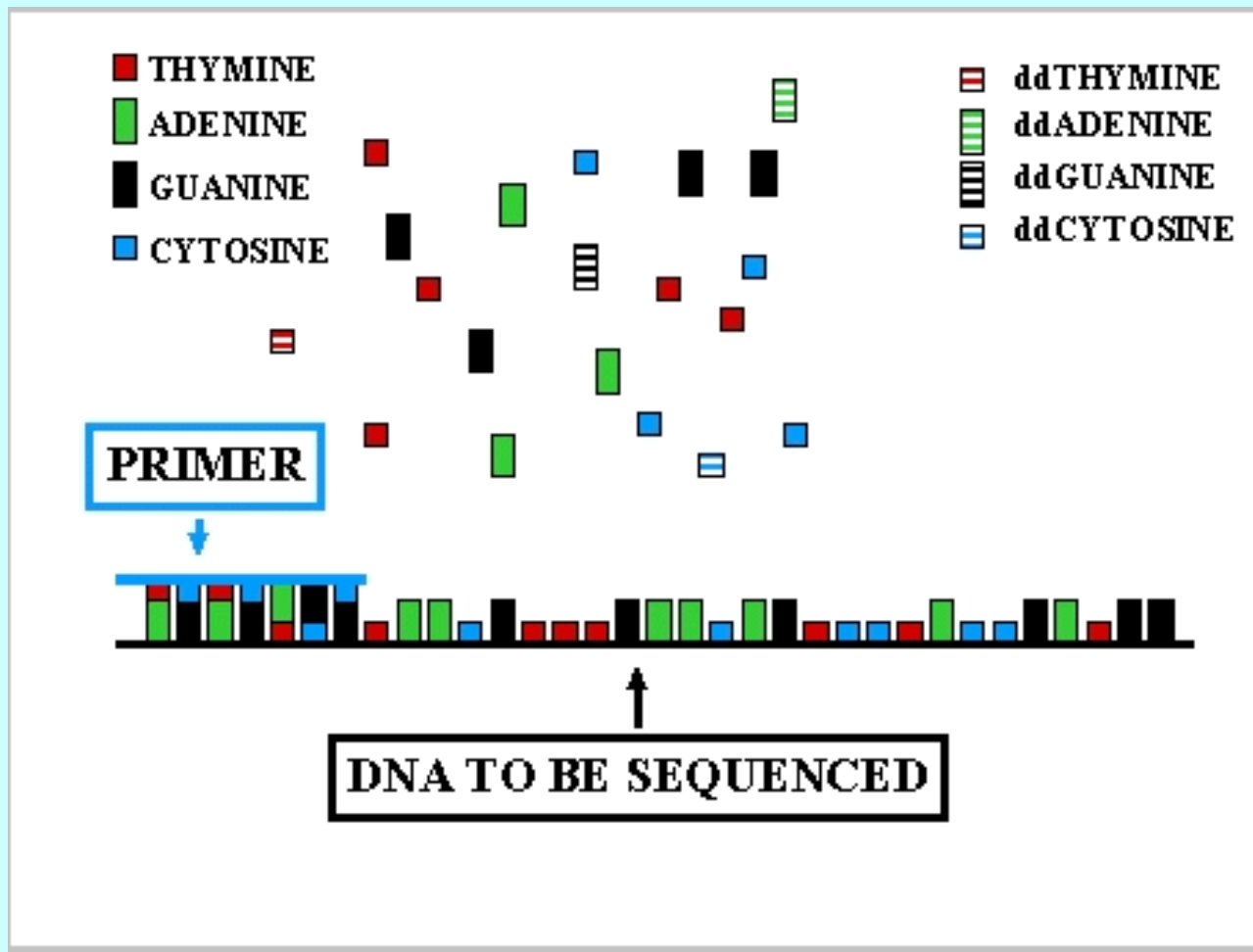
AGA TCA GAT AGA CAG CGT TCACGT TCA CCT AGA ATGTGT TTATGTTA CCC

Chromosomy – skupina genů oddělených dalšími sekvencemi DNA

Sekvenování DNA

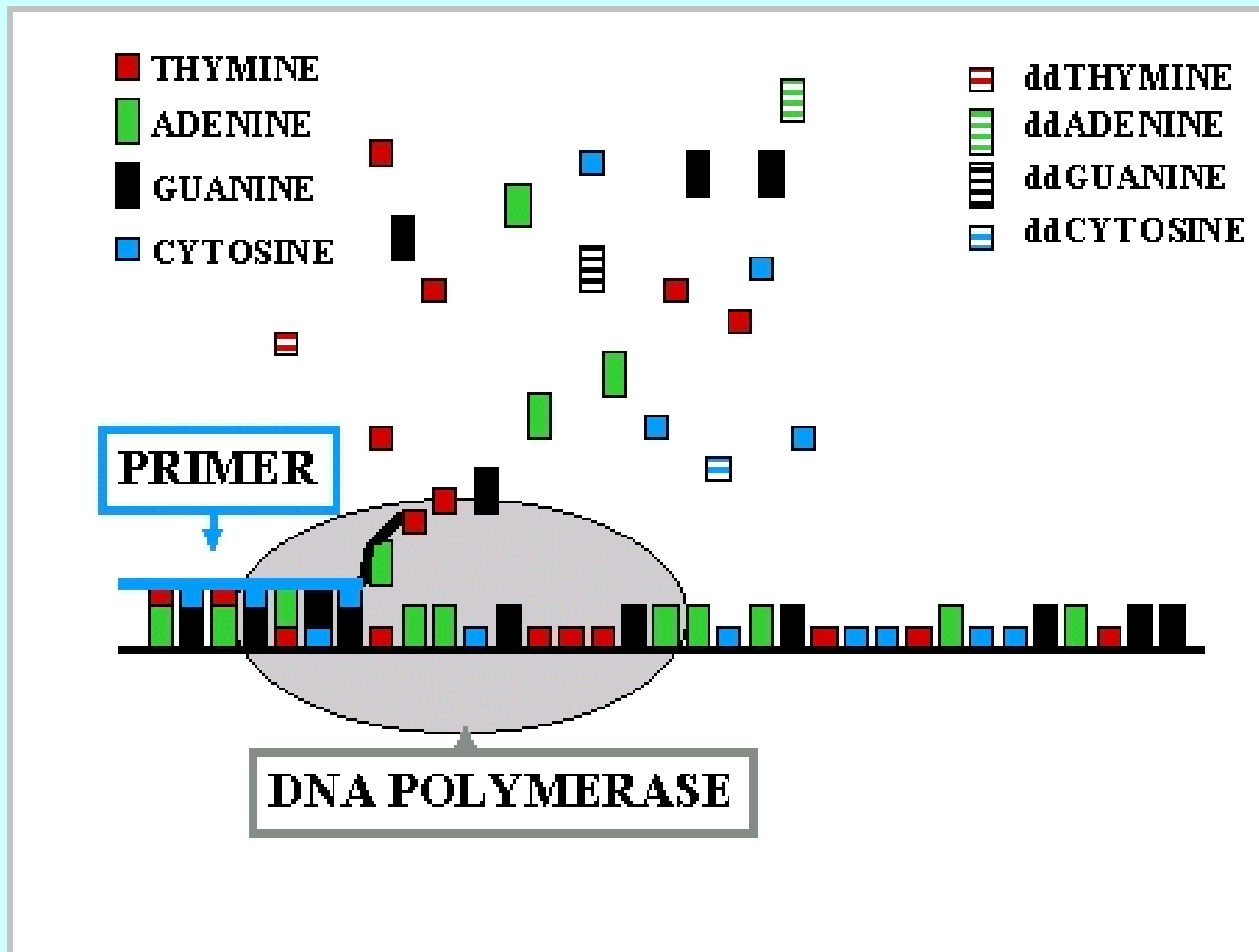
- Metoda použitá ke zjištění pořadí písmen v DNA
- Tato informace je nutná k odhalení specifických funkcí genů
- Může být použita i pro hledání chorob

Sekvenování DNA



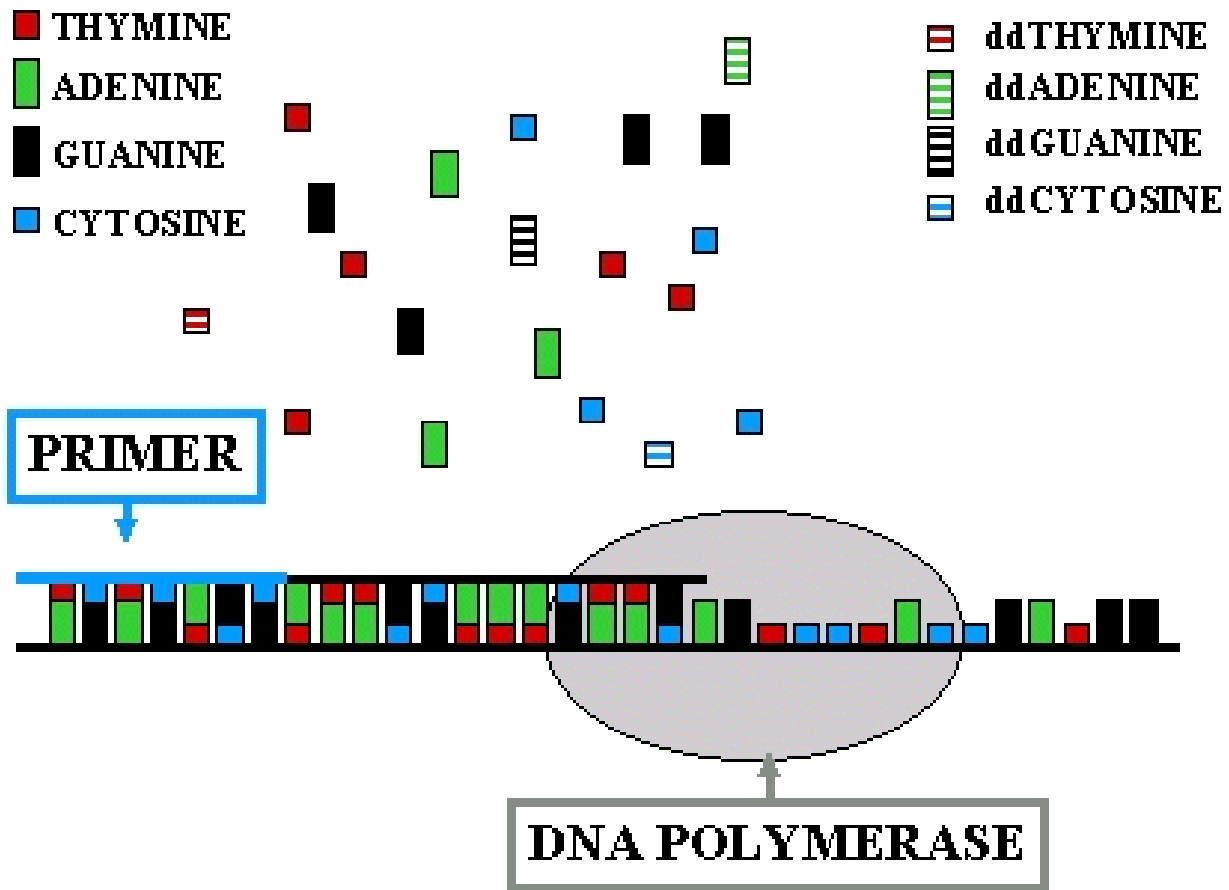
- Navazování primerů

Sekvenování DNA



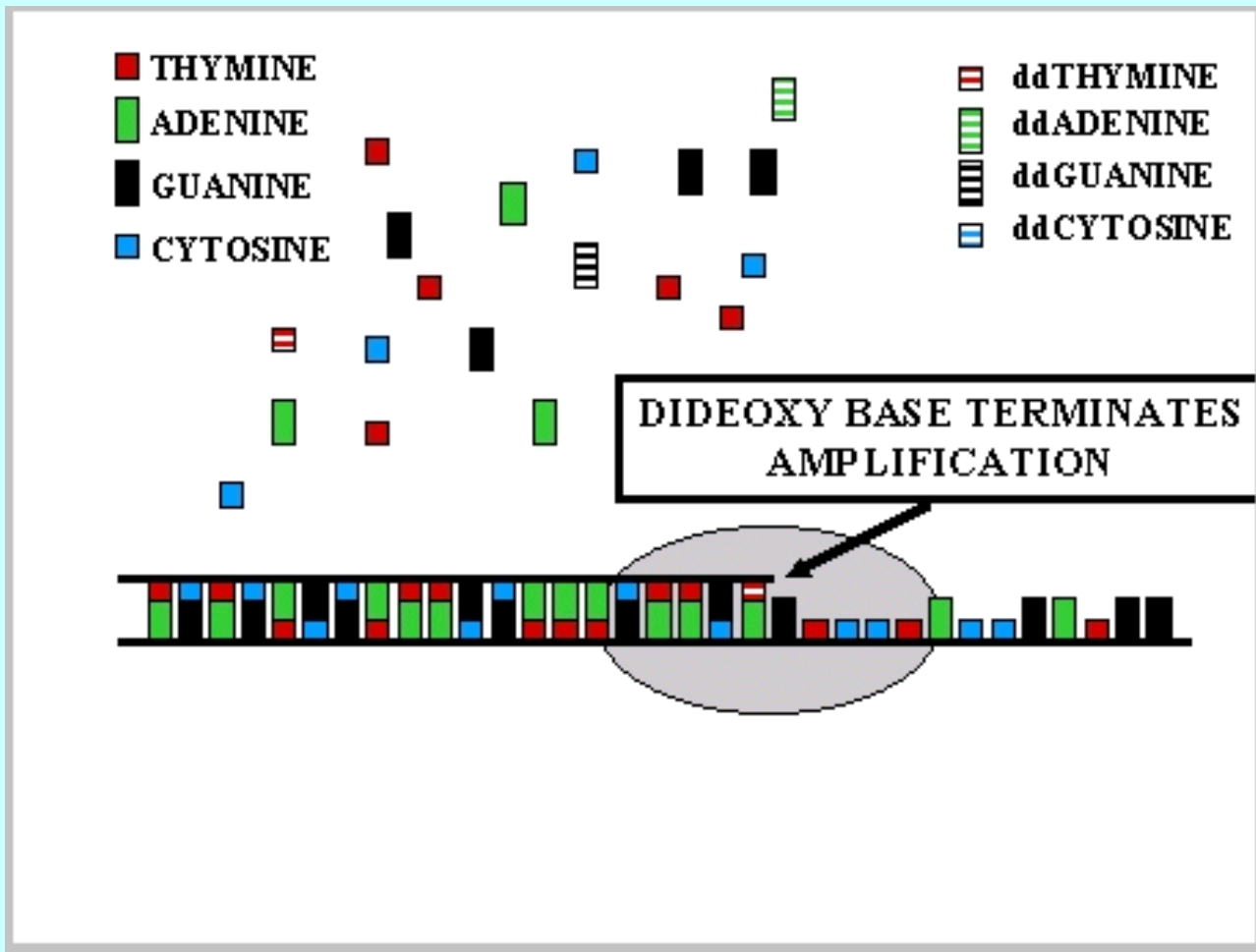
- prodloužení primeru
- začíná replikace DNA

Sekvenování DNA



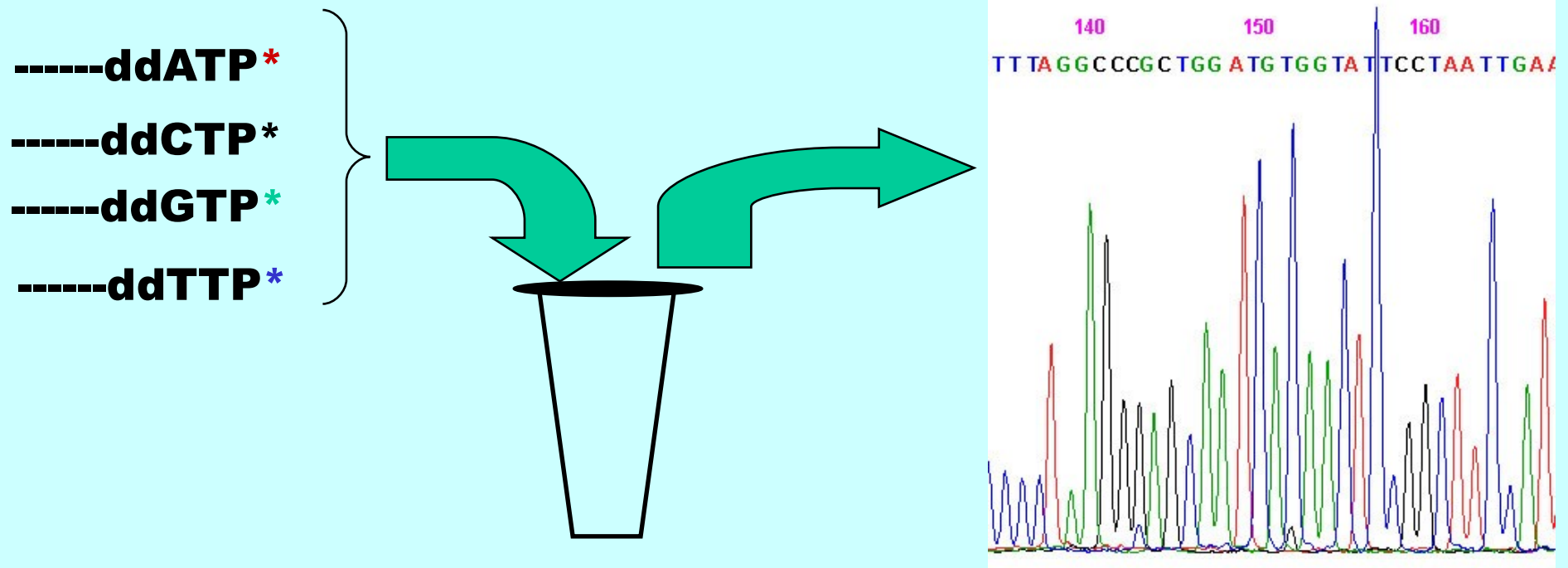
- prodloužení primeru
- replikace pokračuje

Sekvenování DNA



- ukončení
- replikace končí

Sekvenování DNA



- Čtyřbarevná fluorescence

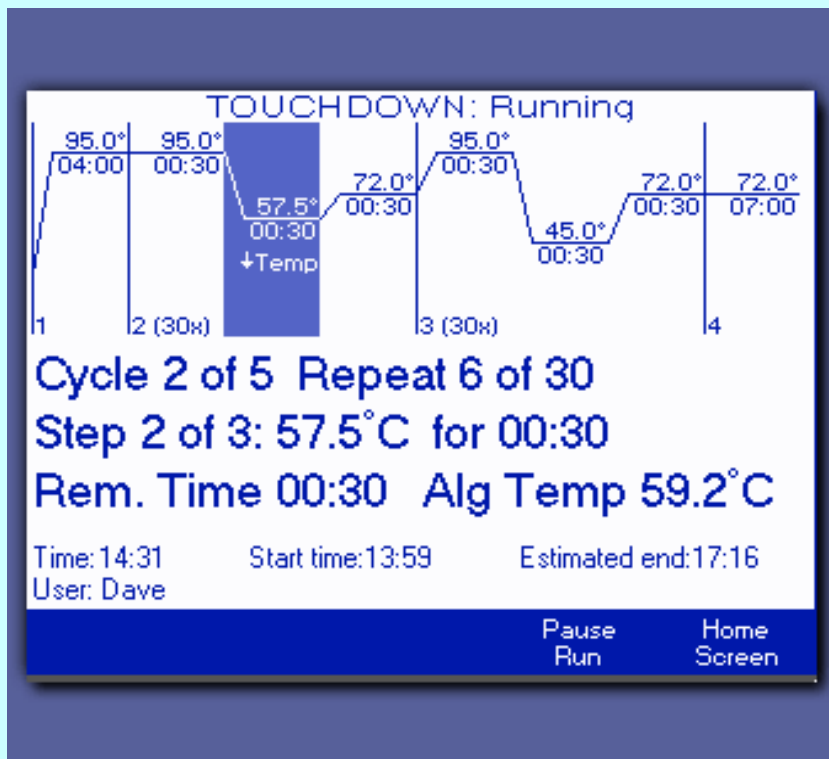
PCR

- PCR – Polymerase Chain Reaction
 - příprava vzorků DNA před sekvenováním



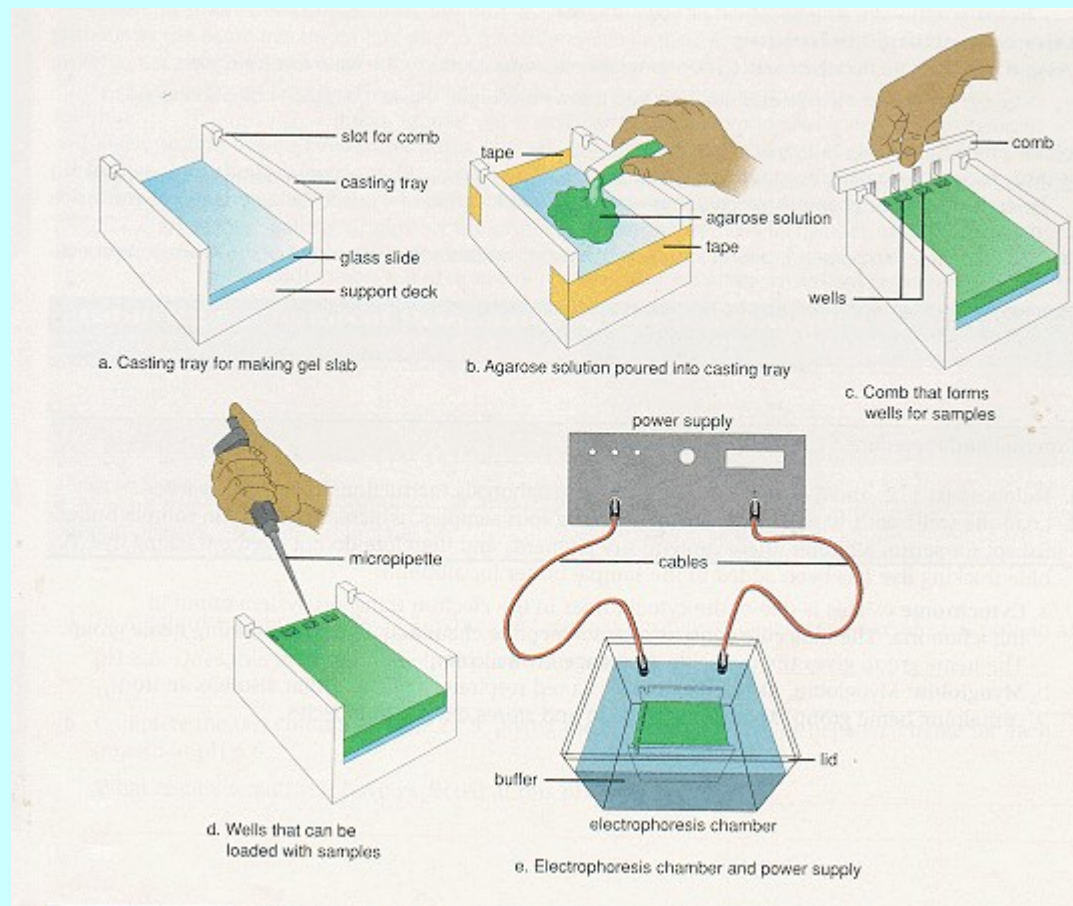
Přístroje pro PCR

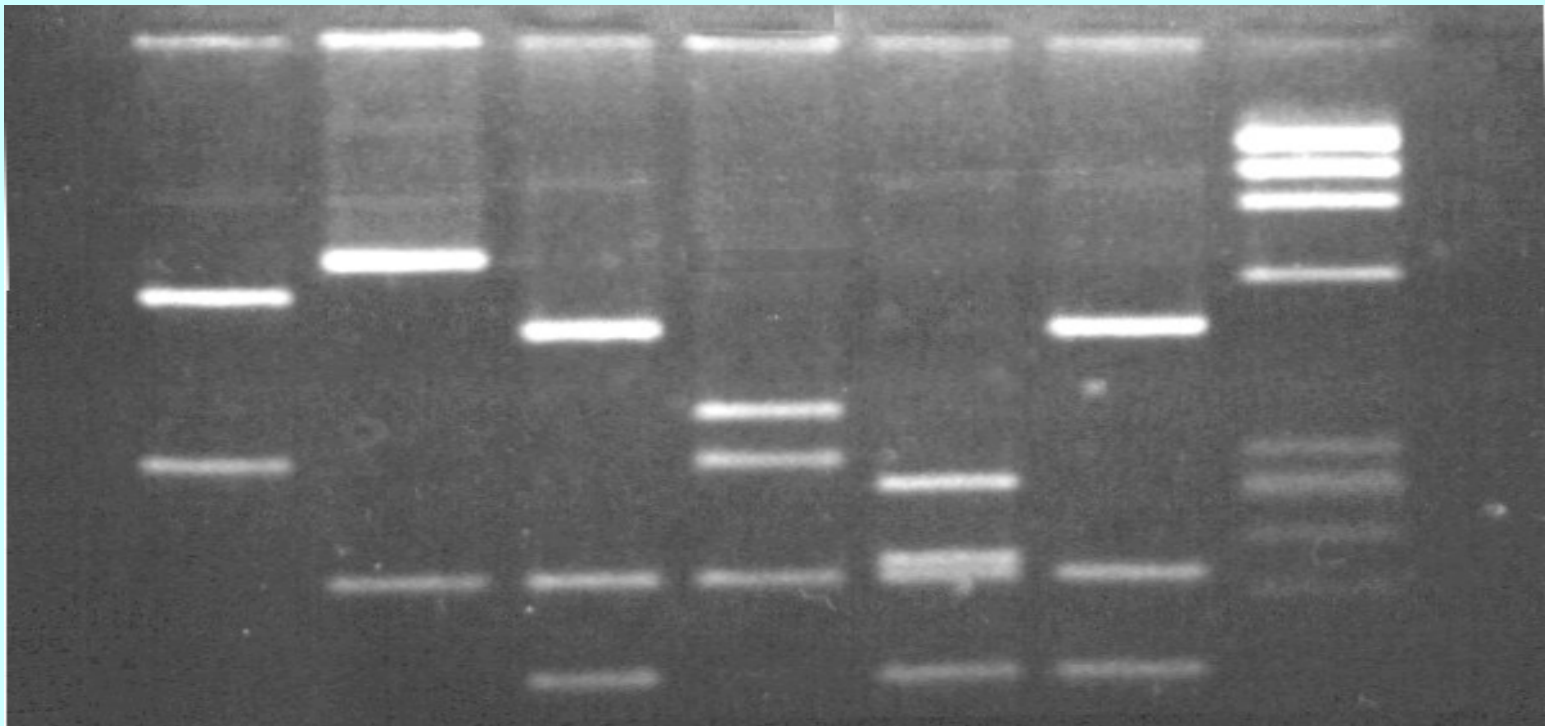
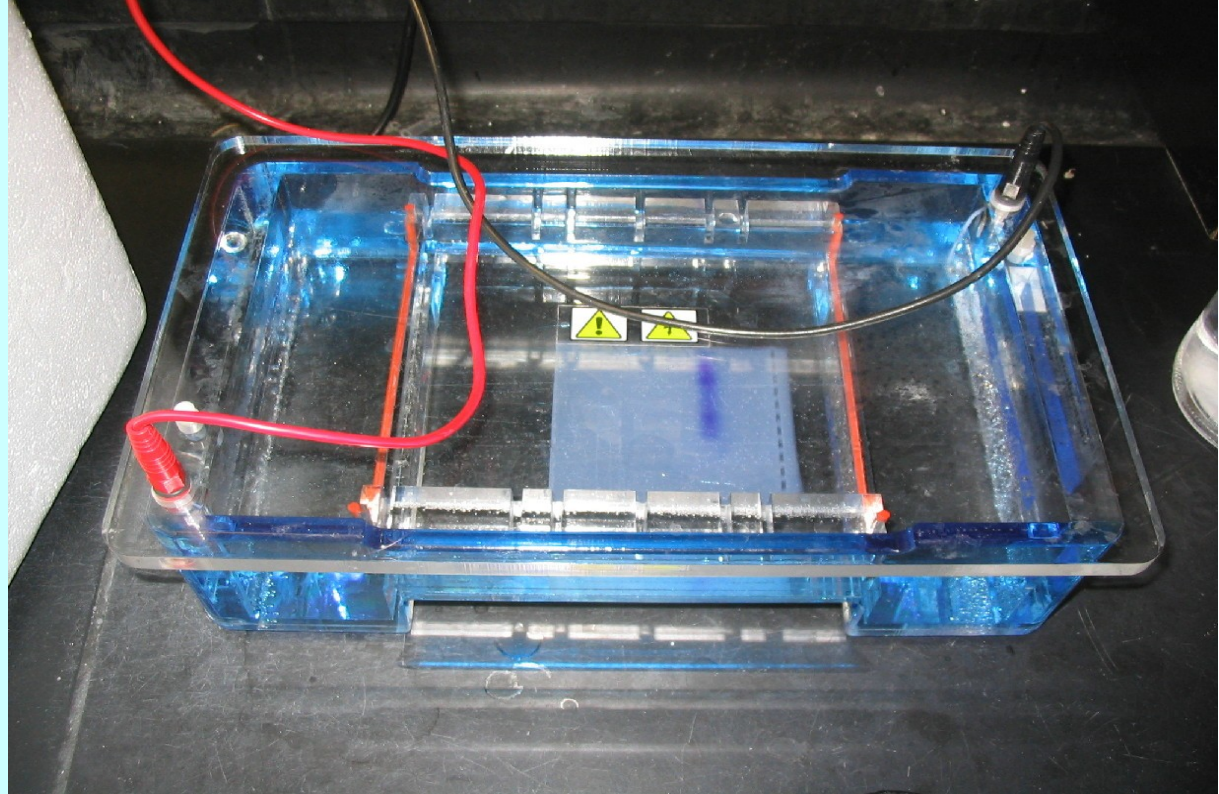
- Termocyclery – zařízení pro amplifikaci DNA
- Báze – řídí Alpha bloky, interface, zdroje...
- Alpha bloky



Elektroforézy gelové

- elektroforéza je zařízení pro vizualizaci fragmentů DNA na základě jejich hmotnosti a náboje
- základem je agarosový gel, na který jsou umístěny vzorky DNA a aplikováno elektrické pole

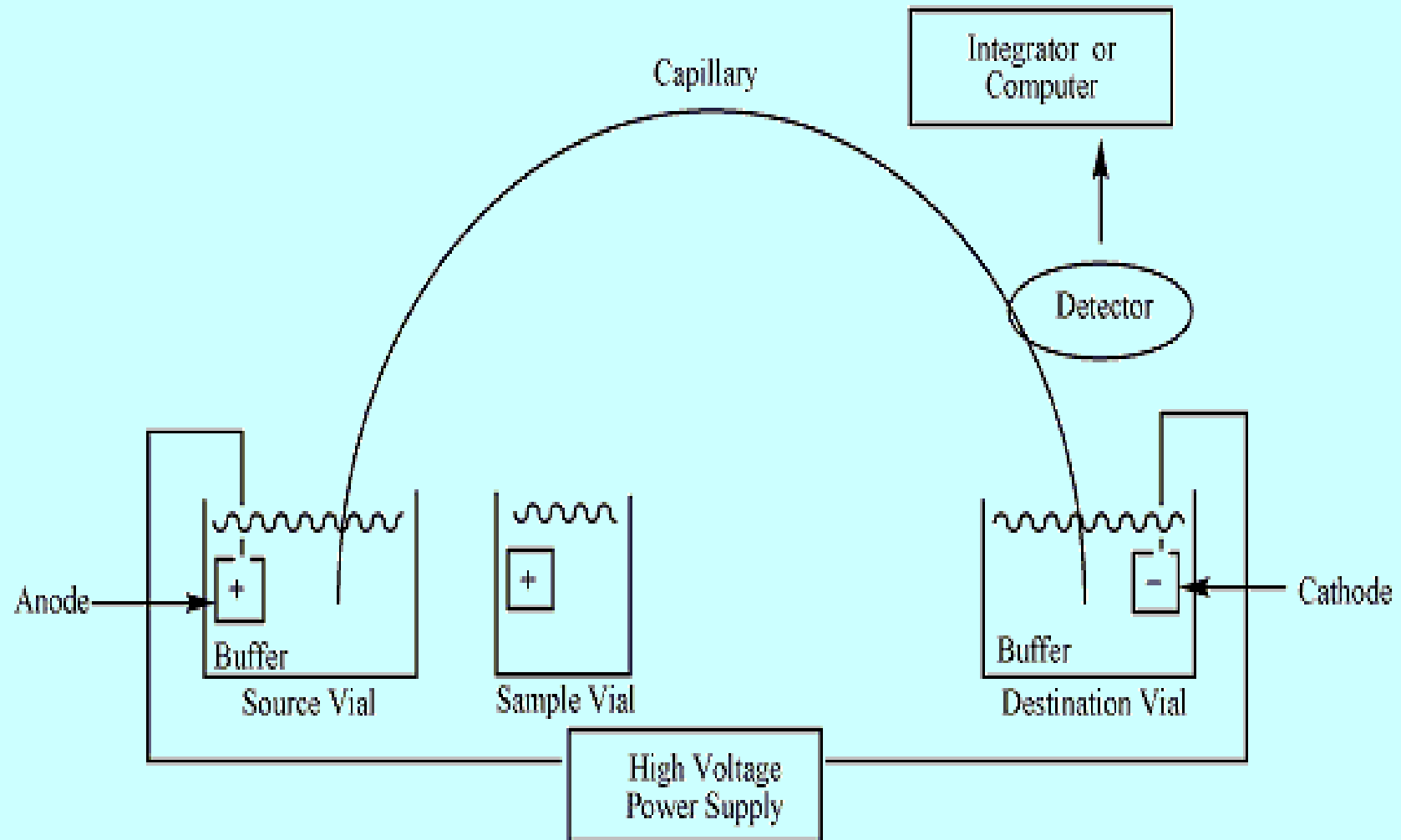




Kapilární elektroforéza

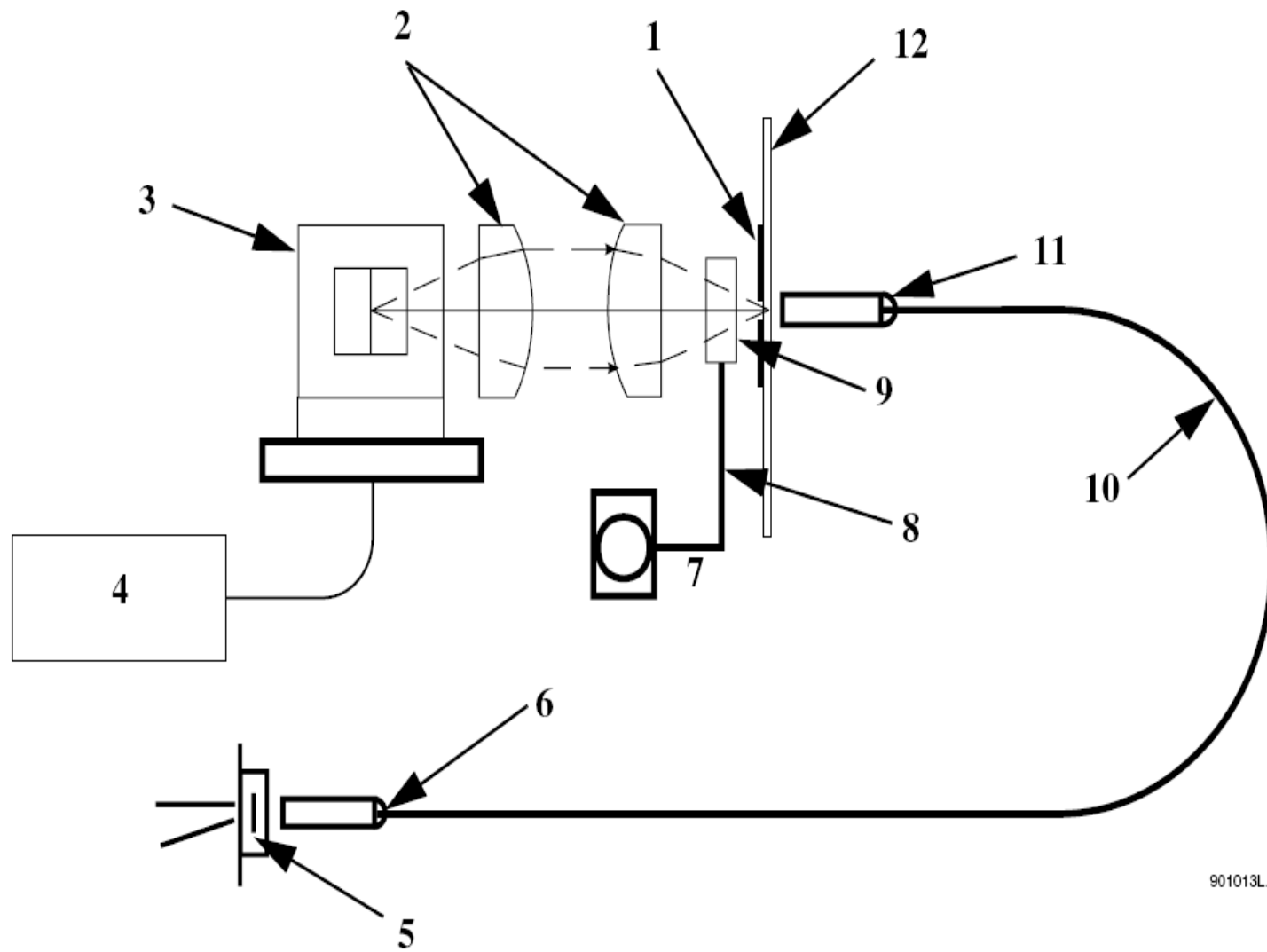
- Separace iontů na základě jejich elektroforetické mobility při přiložení vysokého napětí
 - použitelné pro obrovské množství látek
 - v principu velmi jednoduché
 - existuje mnoho druhů separace – námět spíše pro chemiky
 - různé typy detektorů
 - UV-Vis detektor
 - LIF – Laser + diode
 - DAD – Diode Array Detector
 - Každý detektor je použitelný pro jiné látky – např. UV má vysokou energii – mohl by způsobit rozpad vzorků – použijeme DAD + Vis.

Kapilární elektroforéza



- ProteomeLab PA800
 - automatizovaný systém pro charakterizaci proteinů (nejen) založený na principu kapilární elektroforézy

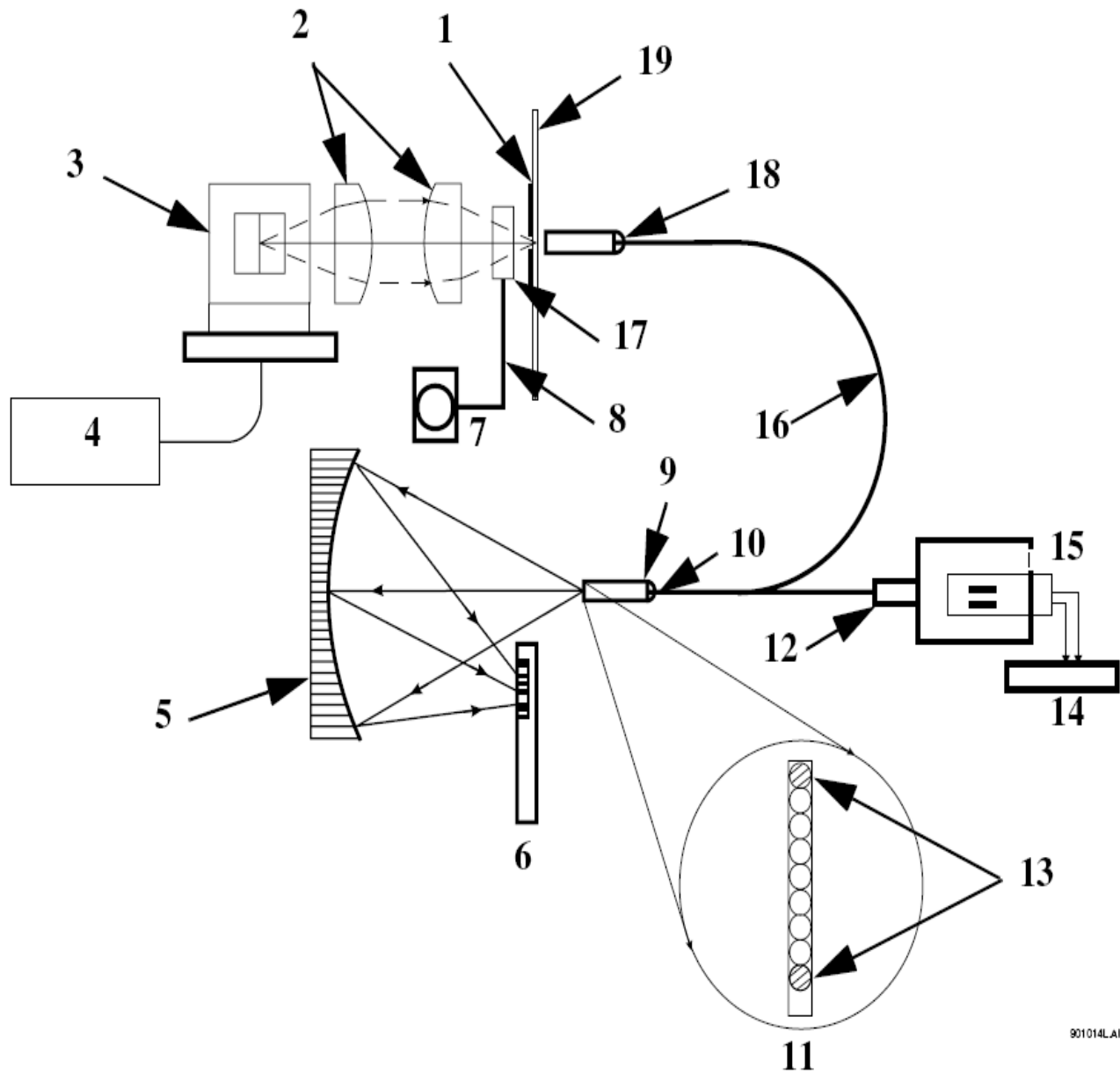


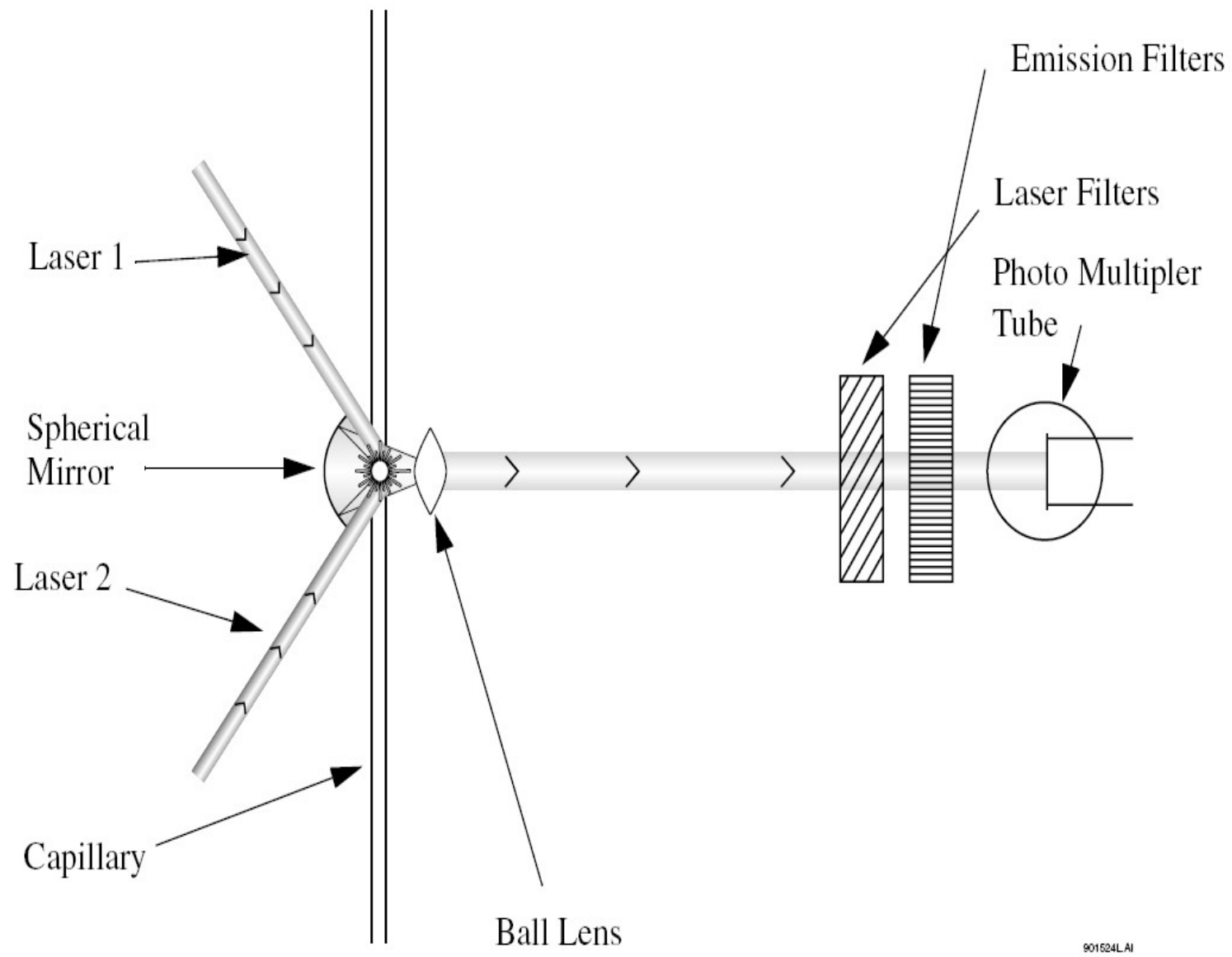


901013L.AI

- 1. Capillary Aperture
- 2. Fused Silica Lenses
- 3. Deuterium Lamp
- 4. Lamp Power Supply
- 5. Photodiode
- 6. Fiber Optic Connection

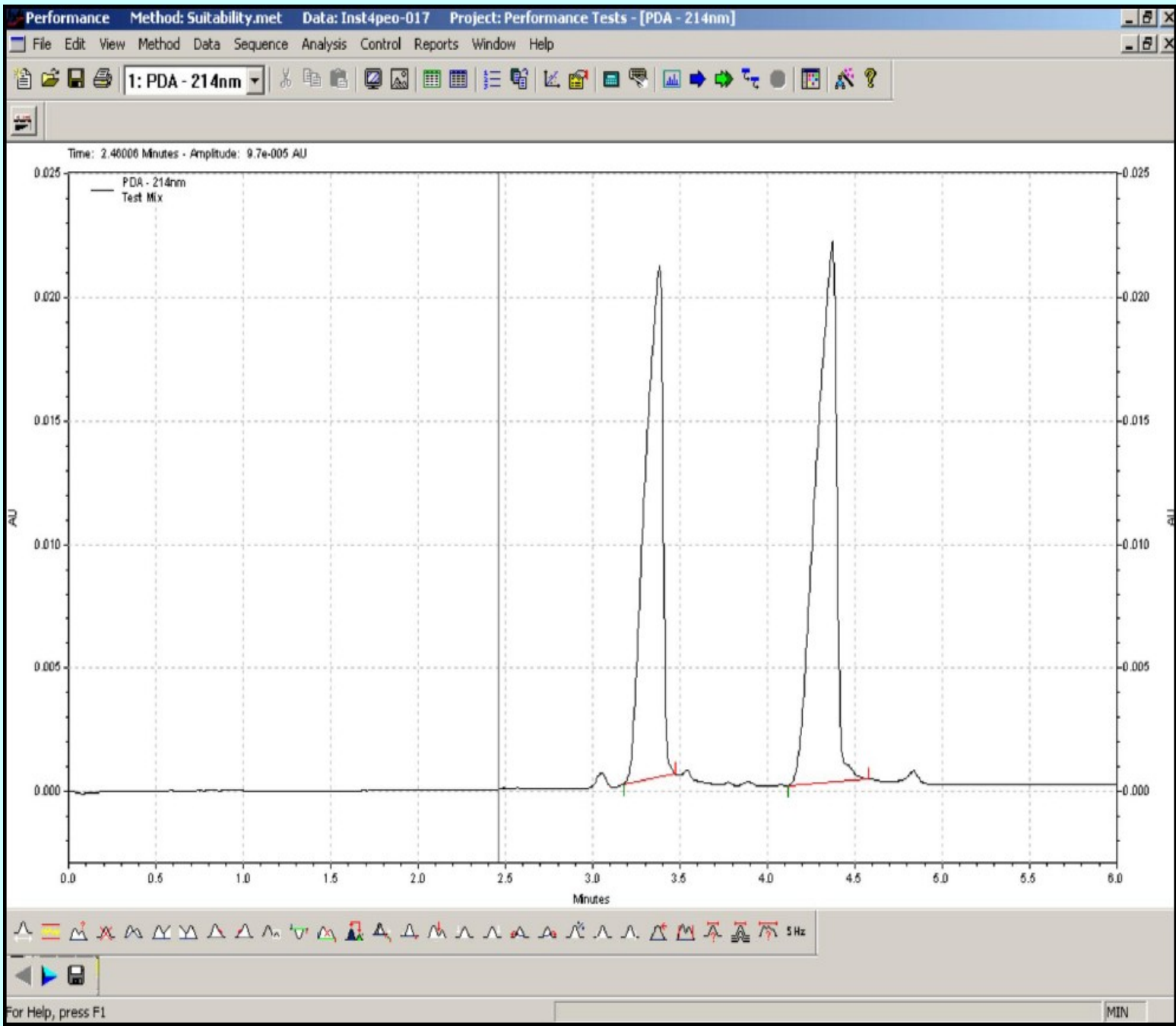
- 7. Motor
- 8. Position Filter Wheel
- 9. Filter Position (e.g. 214 nm)
- 10. Fiber Optic Cable
- 11. Fiber Optic Connector
- 12. Capillary





901524LAI

Figure 9: LIF Optical System



Sekvenátory DNA

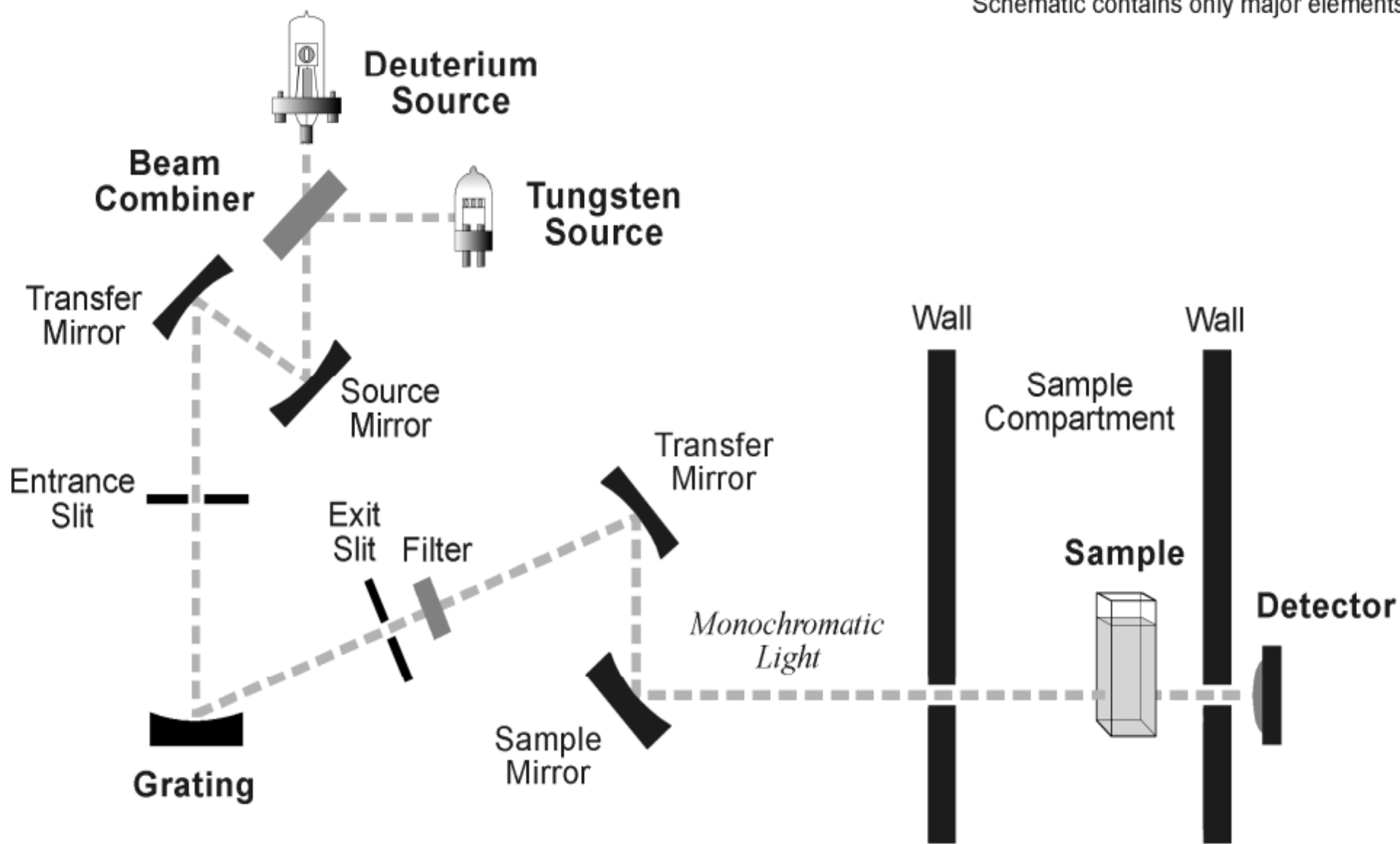
- Přístroje pro získávání sekvencí písmen (bází) v DNA
 - fungují na principu kapilární elektroforézy
- Jedna nebo více kapilár (typicky 8)
- Excitace pomocí dvou laserů o vhodných vlnových délkách
- Použitelné i pro fragmentační analýzu
 - sekvenace pouze vybraných částí DNA
- ..více v druhé části

Spektrofotometry

- Spektrofotometr je přístroj k měření spekter optického záření a zaznamenávající poměr intenzity záření absorbovaného měřeným vzorkem k intenzitě referenčního (etalonového) záření v závislosti na vlnové délce záření dopadajícího na vzorek.
- Vzorky o objemu mililitrů po mikrolitry
- Zjišťování složení roztoků, vlastností povrchů optických prvků
- Výstupem je většinou graf znázorňující absorbanci daného vzorku v závislosti na vlnové délce
- I₀..referenční intenzita, I..intenzita po průchodu světla vzorkem

$$A_{\lambda} = \log_{10}(I_0/I)$$

Schematic contains only major elements.

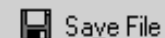
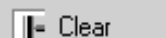
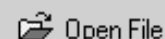


Wavelength Scan

<Default Method>



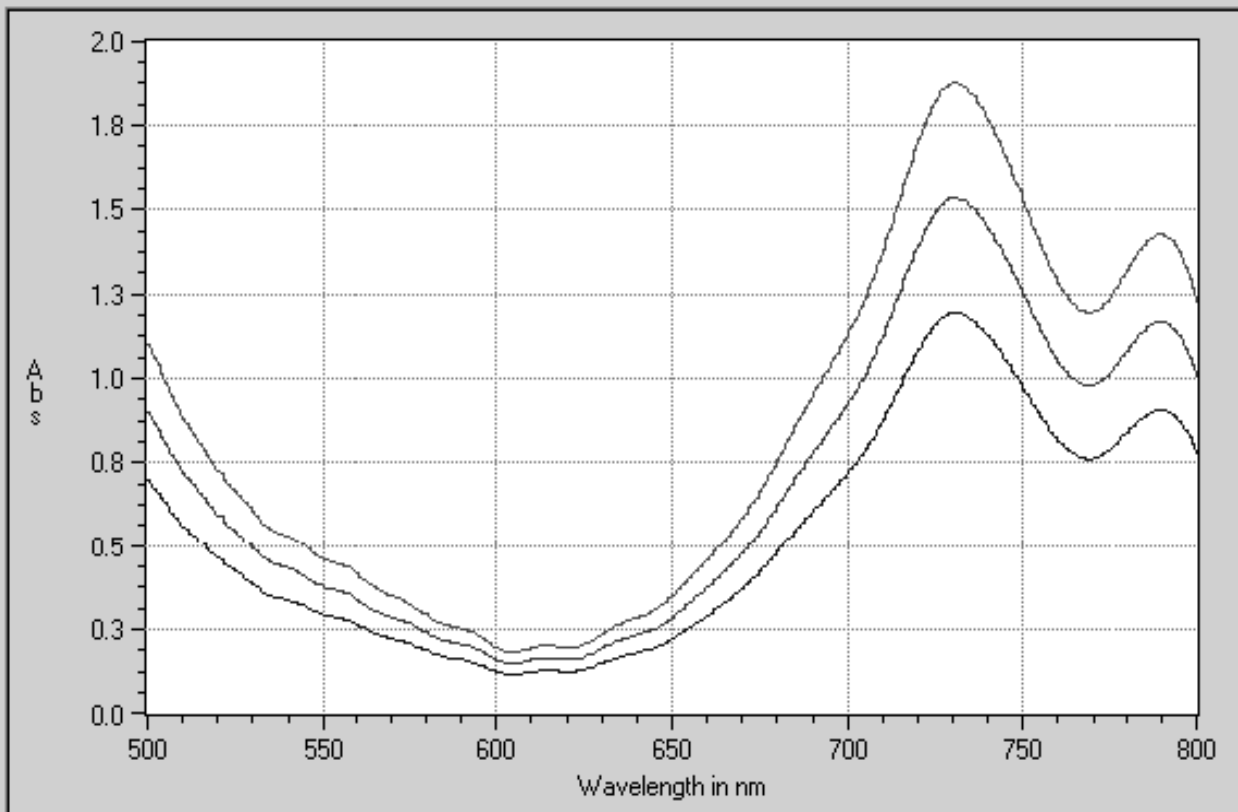
Scan



Method Parameter	Value
Sampling Device	Holder
Holder Type	Single Cell
Number of Cells	1
Scan Mode	Abs
Start Wavelength	500.0 nm
End Wavelength	800.0 nm
Wavelength Interval	2.0 nm
Scan Speed	2400 nm/min
Auto Print	No
Auto Save	No
Filename Prefix	Default

File Mode Function Axis Help

Scanning



DU 800
UV/Visible Spectrophotometer

<Generic User>

Last Blanked at 12:04 PM

UV Lamp On for 53 sec

Visible

UV

Single Cell Holder

Scan	Position	Use	Name	Description
1	1	<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 1-1	
2	1	<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 2-1	
3	1	<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 3-1	
		<input type="checkbox"/>		

Ready.

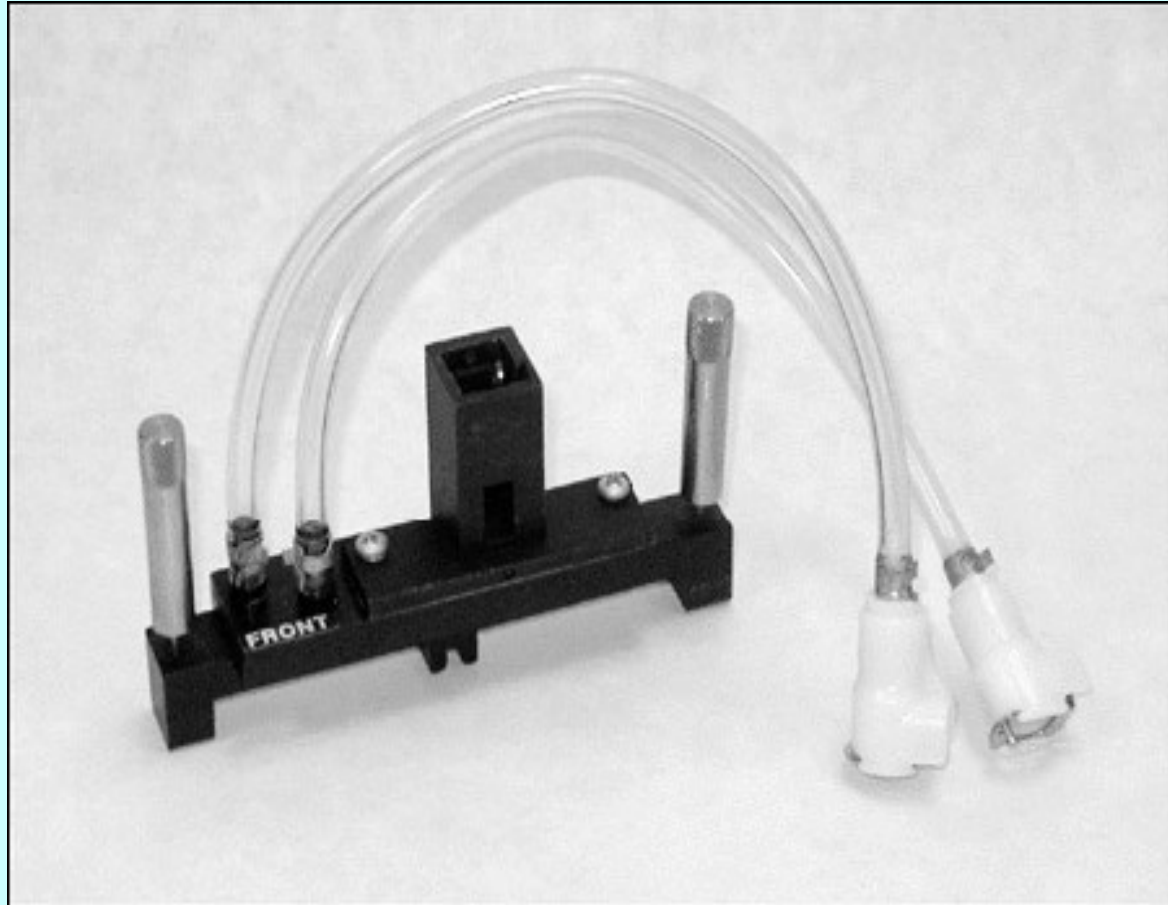
Cell Match OFF

800.0 nm

0.308 Abs

24.8 C

13 Nov 2000 11:59 AM

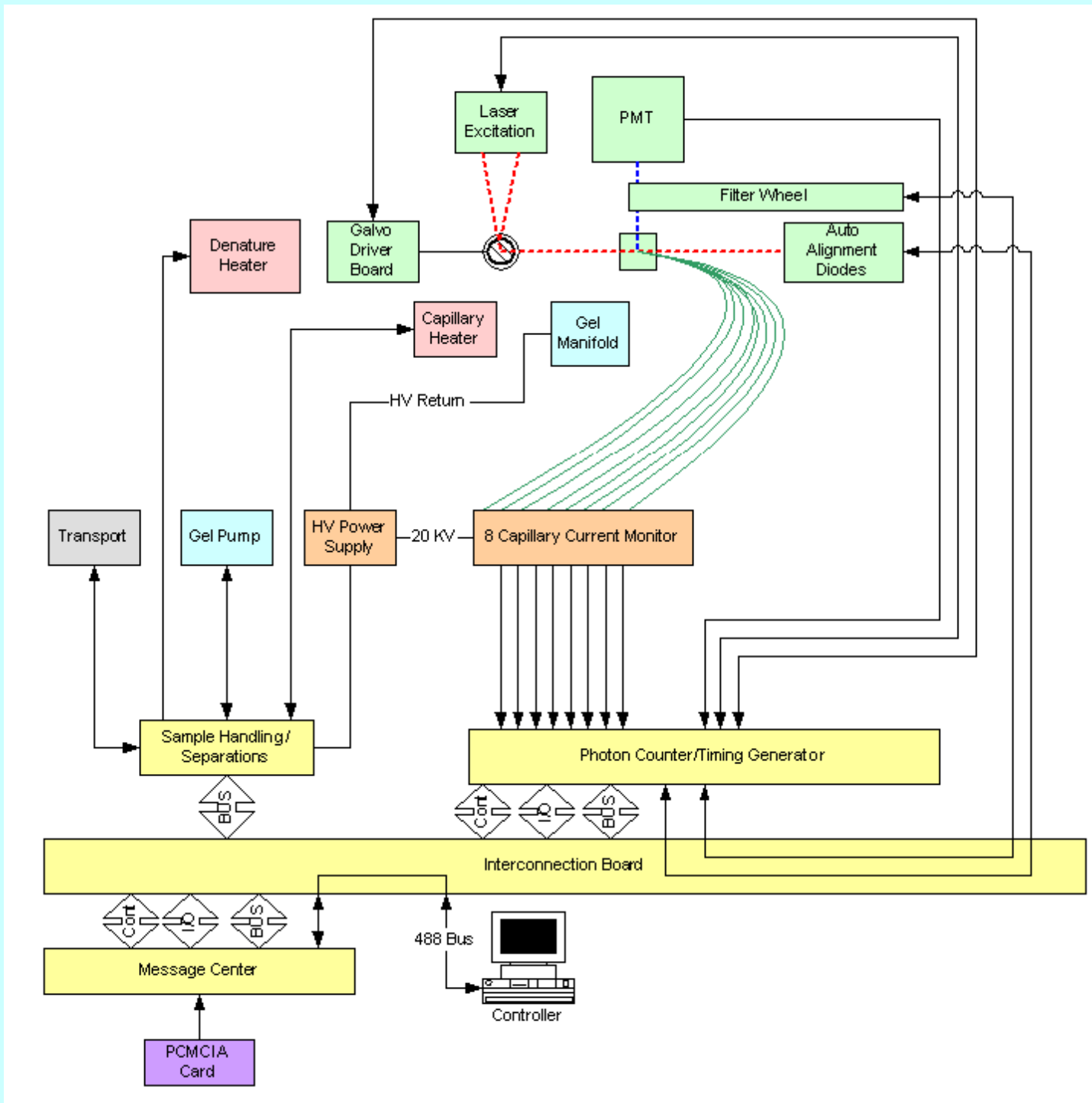




CEQ 8000

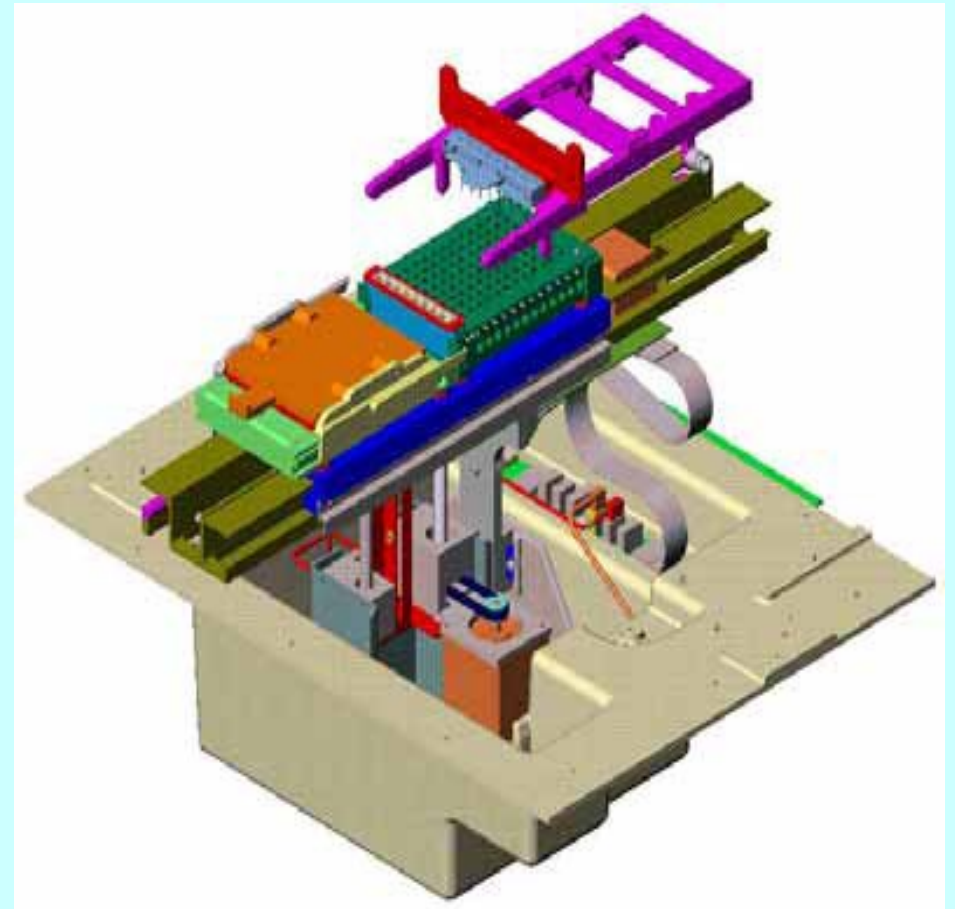
- Příklad pro sekvenování DNA
- 8 kapilár – možnost až 96 sekvenací při jednom běhu bez zásahu obsluhy



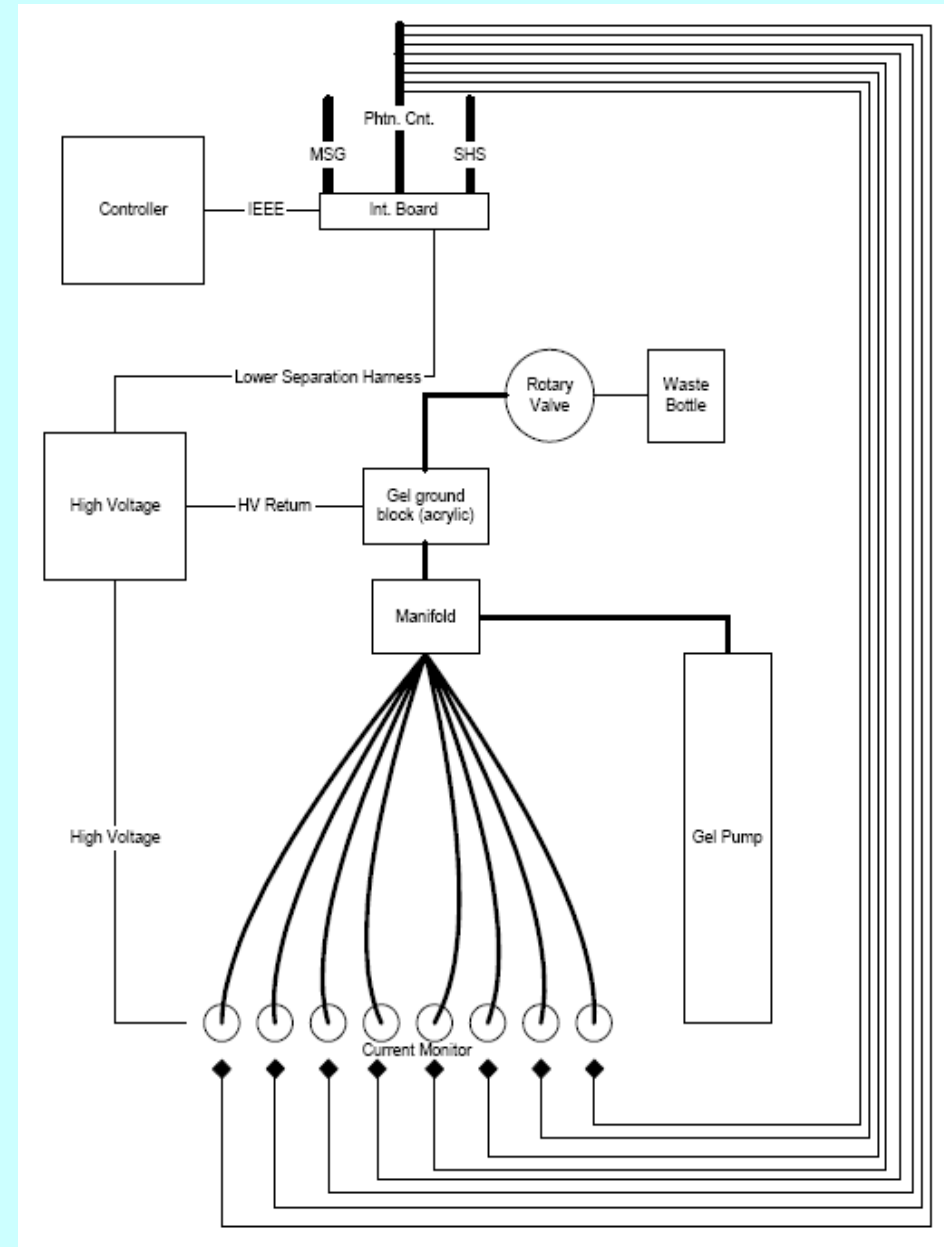
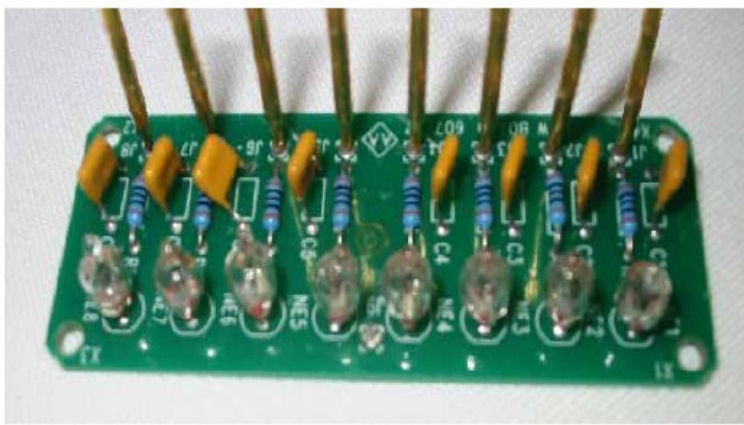
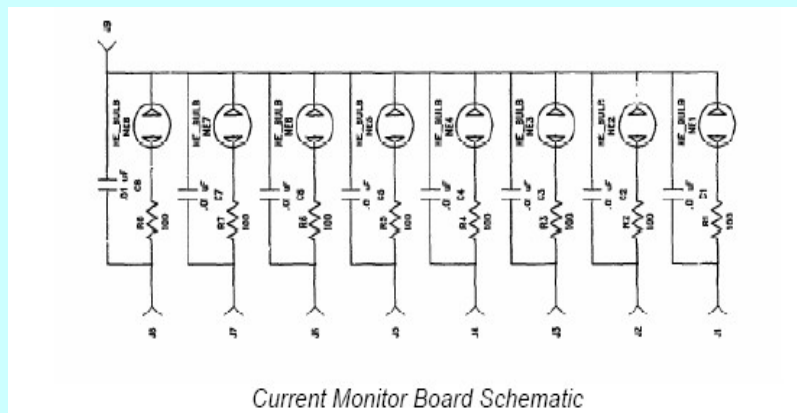
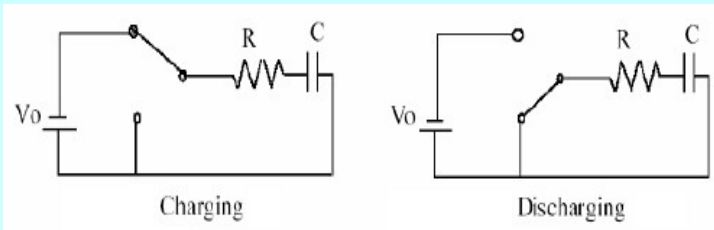


Pojezdy

- Pohyb v osách x, y, z
- Krokové motorky
- Snímače koncové polohy – optické
- Nastavení pomocí řídicího PC



- Proud kapilárami je snímán pomocí optických senzorů – optické kabely ke snímačům

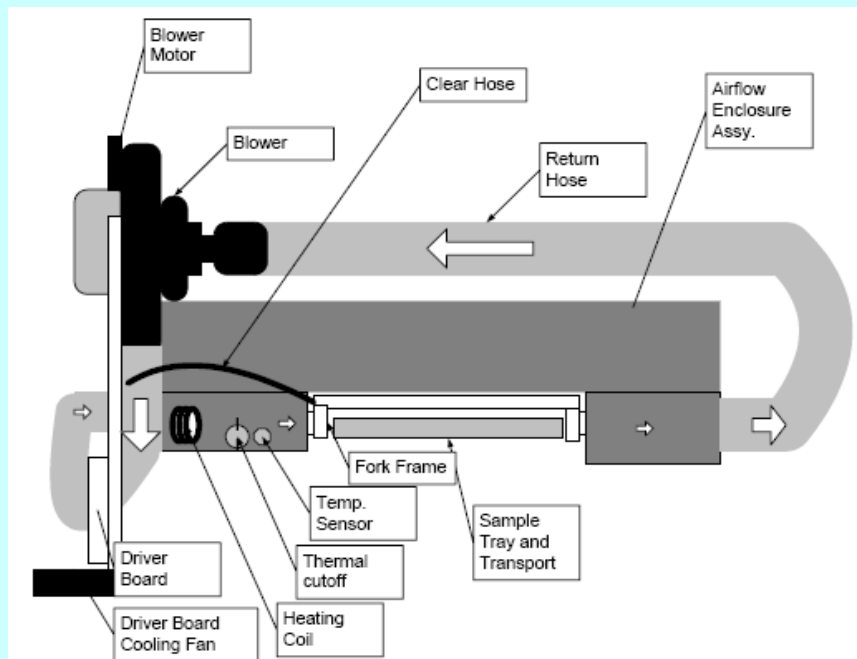
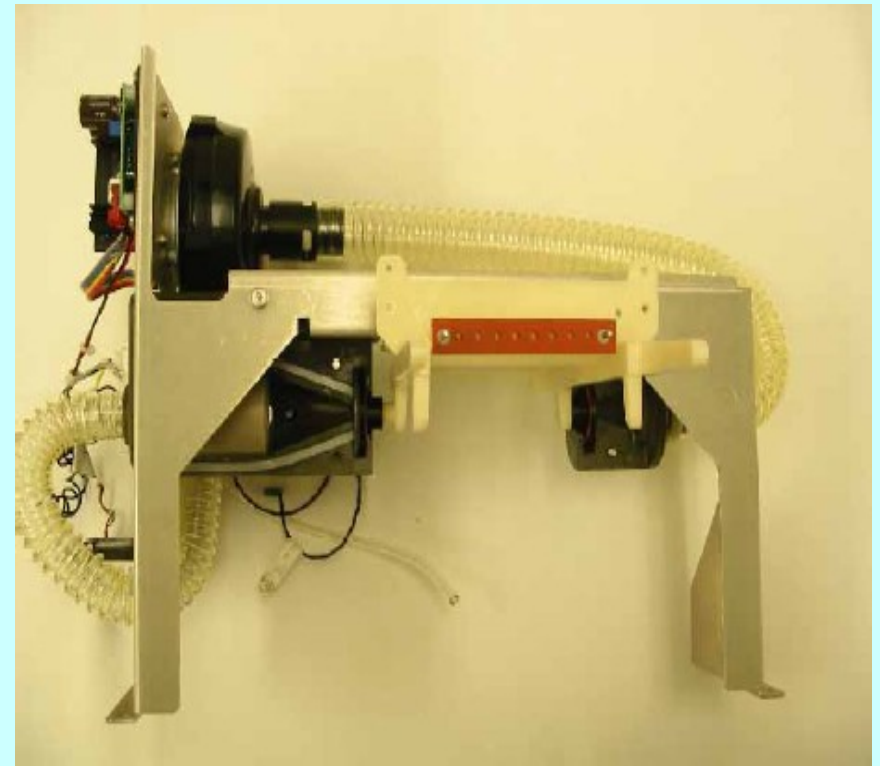


Zdroje napětí

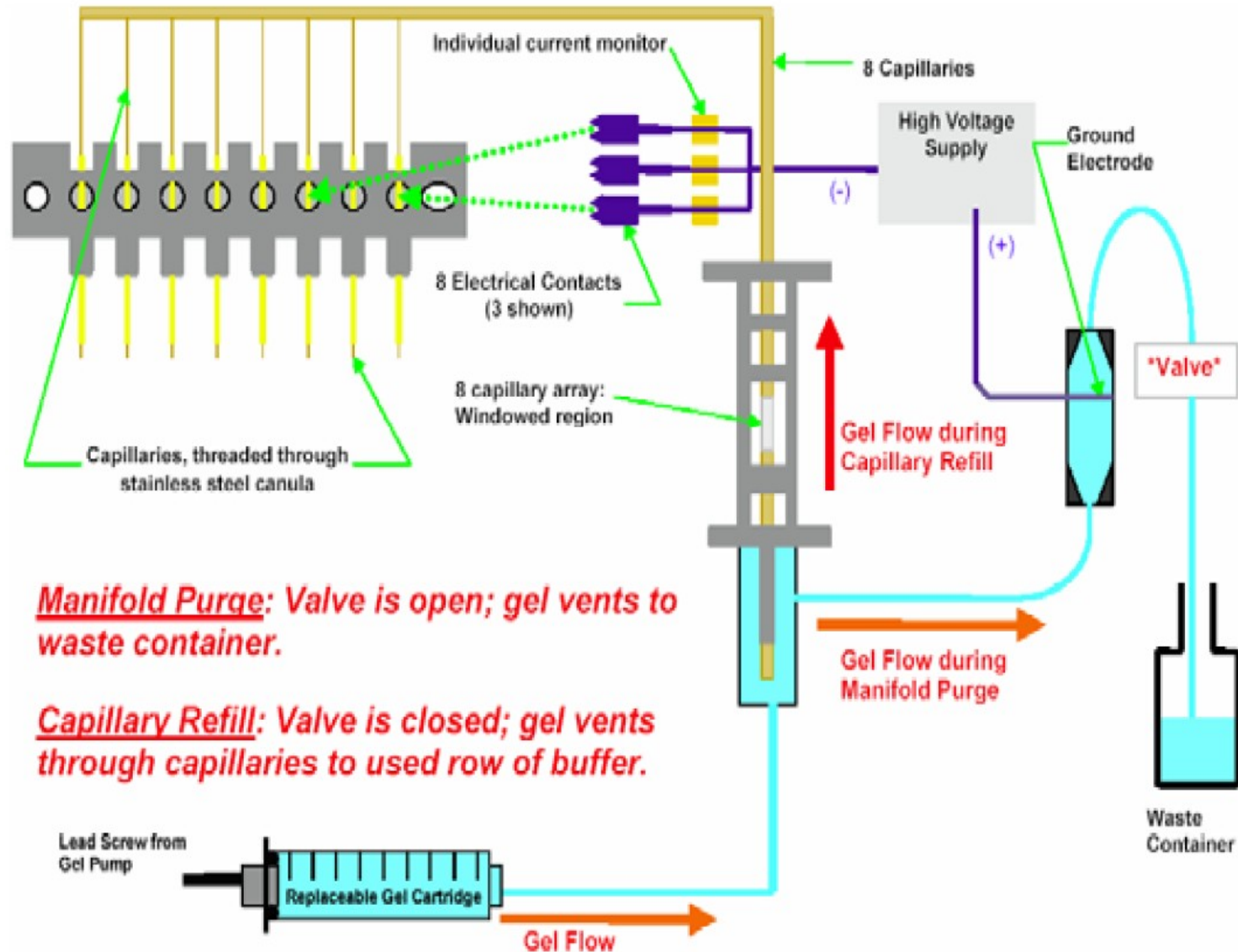
- VN zdroj: 0-24kV, proud desítky mA
- NN zdroj: 5V a 24V
- Samostatné systémy, buď fungují, nebo se vymění

Denaturační jednotka

- Denaturace slouží k roztržení šroubovice DNA před samotným sekvenováním
- Teplota 85-90 st C
- Ventilátor a topná spirála řízeny PID regulátorem

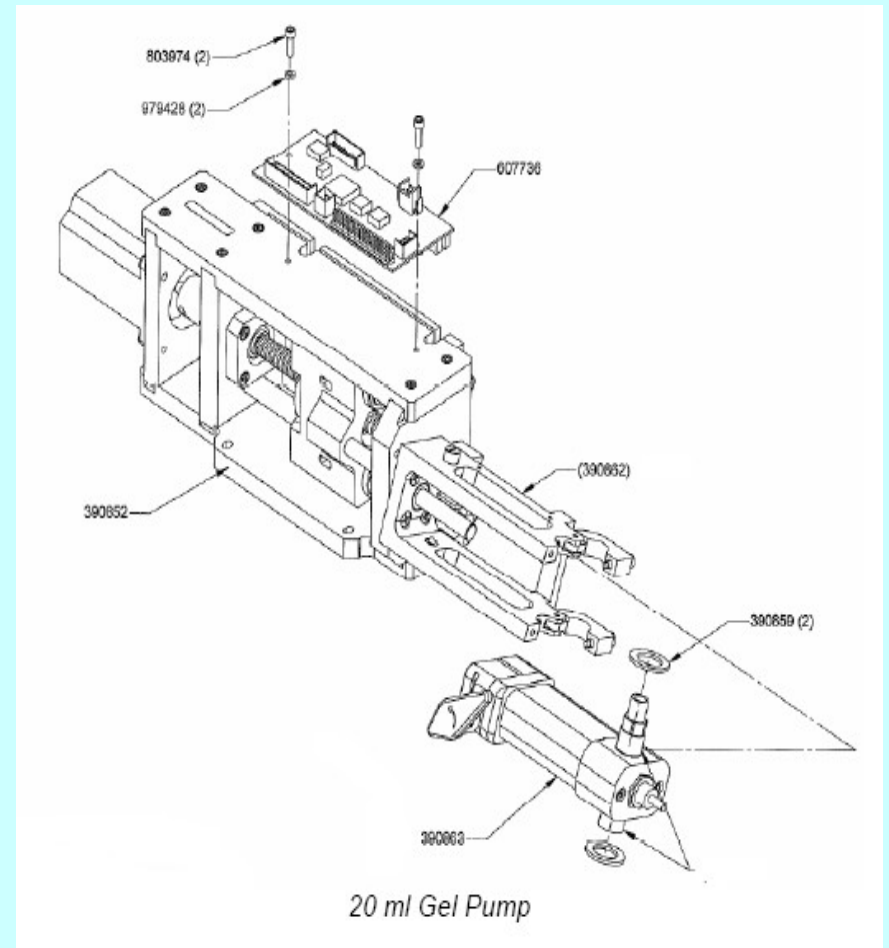


Gel



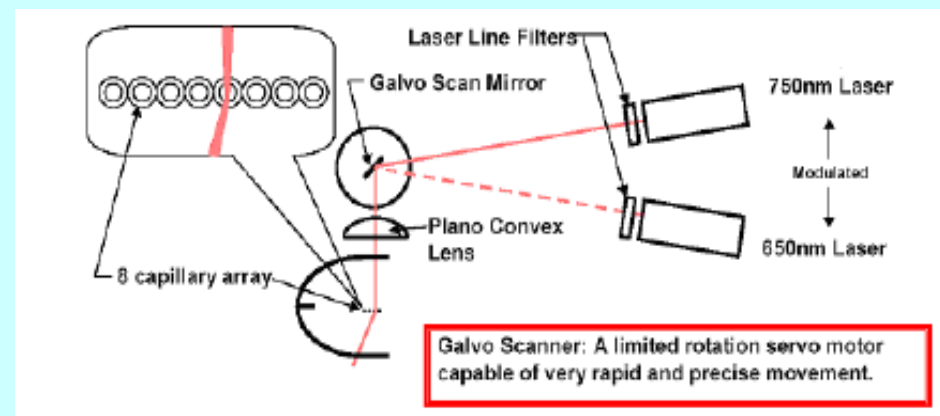
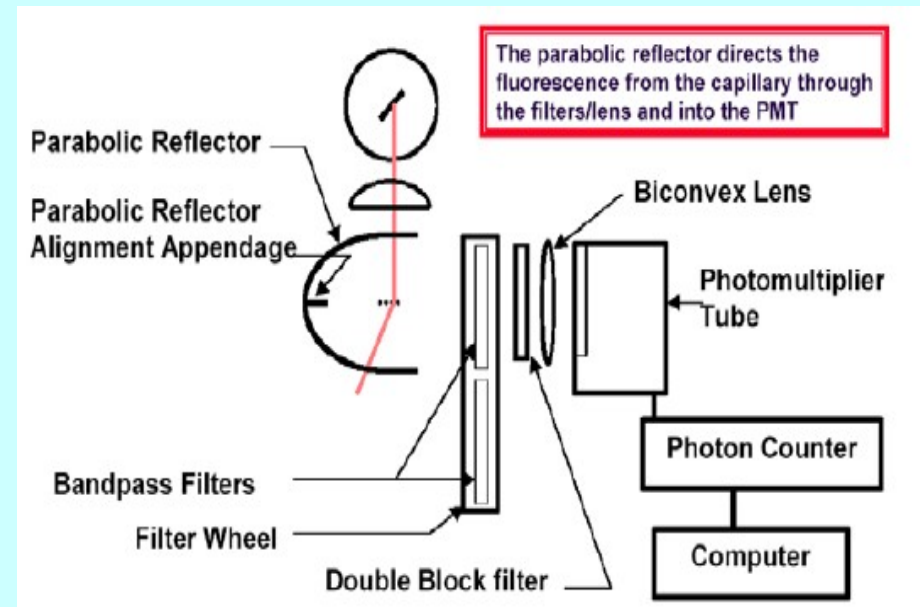
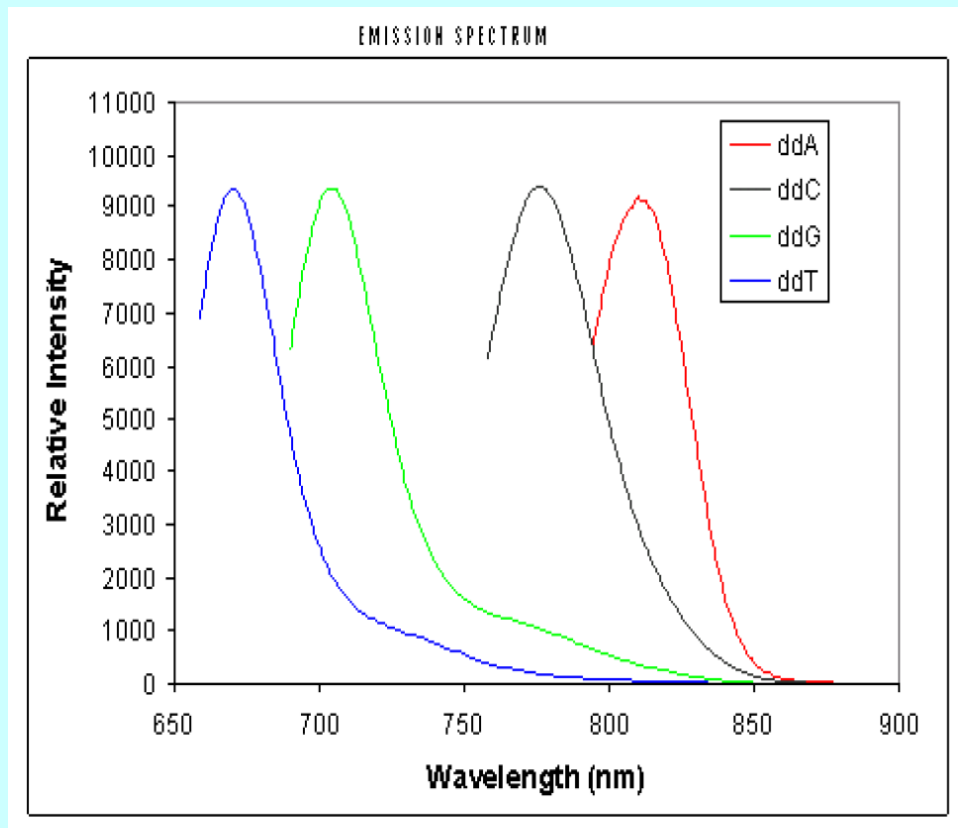
Gelová pumpa

- Přesné dávkování gelu do systému
- Krokový motor, podle tlaku a polohy pístu zjistí množství gelu v kartriži
- Vyvine tlak 0 - 800 psi s přesností 1 psi (1atm = 14psi)
- Objem gelu 20 ml stačí na 96 reakcí

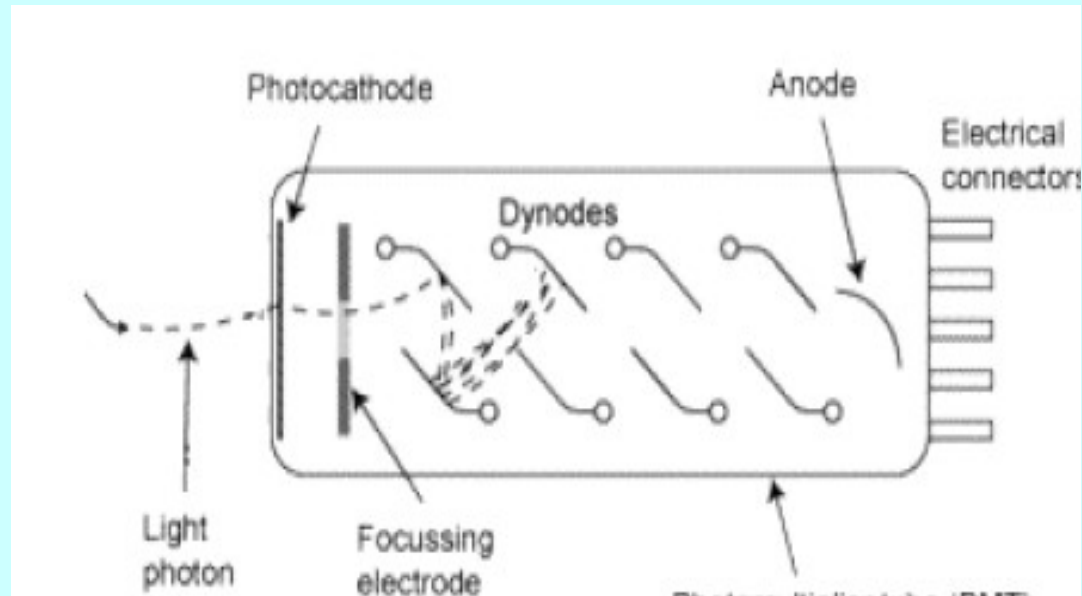


Optika

- Excitace obarvených bází DNA pomocí dvou laserů
- Detekce fotonásobičem



Co to je?



Další drobnosti

- Bezpečnostní prvky
 - Hallovy sondy na krytech
 - Automatické vypnutí VN při otevření přístroje

-