

LABORATORNÍ MINIMUM (doplněk k lab_guidelines_OFIZ_2021_v1.pdf)

Lékárnička:

- Za přepážkou v 1. patře lze najít skříňku první pomoci "First Aid Kit", po levé straně; nebo v suterénu, laboratoř 1S25 (Žákovská lab)
- Jídlo ani pití nenosit za přepážky do laboratoří
- V případě akutního nebezpečí nebo při havárii (požár, únik chemikálií, elektrického zkratu...) volejte 2929 z pevné linky v kuchyňce ("Respiriu")

Odpady:

- třídíme biologický materiál, plasty, sklo (skleněné pipety), alobal a papír
- laboratorní odpad vyhazujte do košů s červeným pytlkem
- veškeré použité sklo se po oplachu odkládá do košíku na chodbě vč. alobalu (recyklujeme) - technici odnesou
- falkony 15 ml a 50 ml se po použití umývají a nechají oschnout na odkapávači (falkony, ve kterých se pracovalo s patientskými vzorky, se ihned po použití vyhazují vypláchnuté Savem)
- pokud pracujete s agarem či agarózou, nikdy je po použití nevylévejte do dřezu, nechte to vychladnout a poté to vylejte či vysypte do koše na laboratorní odpad
- pracovní místo je potřeba po sobě vždy uklízet a je na zodpovědnosti každého studenta dodržovat pořádek (odnášení špinavého materiálu, ubrousky, alobal, vylité/pokapané plochy/přístroje, použité falkonky, krabičky od špiček, mističky, rukavice etc...)
- poslední student v laboratoři při odchodu zkontroluje jestli jsou všechny **přístroje vypnuté** a nezůstane nic běžet přes noc (centrifuga, vortex, magnetická míchačka, termobloček, váhy, světlo v chladovce, v Laboratoři s tkáňovými kulturami zkontrolovat vypnuté FlowBoxy, vodní lázeň, mikroskopy)

Chemikálie:

- "suché" chemikálie skladujeme ve skříni pod ledovačem (WB room)
- "tekuté" chemikálie jsou ve skříni pod digestoří (WB room)
- sklad chemikálií v suterénu, vstup jen s techniky či další pověřenou osobou
- Pomůcky pro navažování chemikálií v horním šuplíku pod ledovačem
- Po navažování chemikálií se vše musí umýt (váha, pracovní místo), navážky a lžíce opláchnout pomocí dH₂O

Umývárka:

- je přístupna pro studenty v momentě kdy něco akutně chybí, ale je nutné být předem seznámen s chodem umývárky a kde najdou "sterilní" x "čistý" materiál, PBS, mQ H₂O, sterile dH₂O, gelatine
- **obsluha myčky, autoklávů a sušiček je pouze v režii zaškoleného personálu!!**

Rukavice:

- Zásobní krabice s rukavicemi jsou ve skříni na chodbě
- Speciální odolnější rukavice do špinavé části WB místnosti jsou ve skříni v levé části stolu špinavé části WB místnosti. Tyto rukavice se používají výhradně ve WB roomu - ve "špinavé části"

Používané druhy Etanolu:

- 70% Ethanol: k dispozici v každé laboratoři u každého pracovního místa/Flowboxu, k dezinfekci materiálu, rukavic...
- Zásobní 70% Ethanol: 5l kanystr u umyvadla v Benchovně/Tkářovkách (zadní část)
- Denaturovaný Ethanol (96% Ethanol + 1% Lékařského benzínu) naléváme do destilované vody dH₂O k přípravě 70% EtOH ve stříčkách
- Absolutní etanol p.a. (uchovávaný v tmavě hnědých 1000 ml lahvách, je k dispozici v Benchroomu i WB roomu, využívá se k experimentům, přípravě pufrů, vzorků...)

Skládání špiček:

- v Benchovně – všechny prázdné krabičky se nosí do benchovny dozadu k umyvadlu kde služba plní prázdné krabičky, náhradní špičky jsou ve skříni pod umyvadlem, pokud nejsou tam, tak další jsou ve skříni na chodbě, technici pak doplněné krabičky odnesou na sterilizaci
- ve WB místnosti – doplňuje se pouze a jenom ve špinavé části WB místnosti, krabičky se nikam neodnáší (kontaminace chemikáliemi) a špičky se zde nesterilizují

Nejčastěji používané pufrы:

Příprava gelu pro gelovou elektroforézu:

- Před přípravou gelu je si potřeba připravit vaničku o potřebném objemu pomocí plastové vaničky a lepicí pásky.
 - Malý gel (70ml):
 - 70ml TAE
 - Agarose for DNA gel electrophoresis (skříň pod ledovačem, množství dle požadované koncentrace) – rozpustit opatrně v mikrovlnce dokud se agaróza nerozpustí (umístěte pod nádobu v mikrovlnce aspoň 2 ubrousky, aby se mikrovlnka nezašpinila)
 - Provádějte v digestoři: přidat cca 4 µl Ethidiumbromidu (EtBr; v lednici 112/6), vylít do vaničky, přidat hřebínek, nechat asi 20 min tuhnout
 - Velký gel (150ml):

- 150ml TAE

- Agarose for DNA gel electrophoresis (skříň pod ledovačem, množství dle požadované koncentrace)- rozpustit opatrně v mikrovlnce (umístěte pod nádobu v mikrovlnce aspoň 2 ubrousky, aby se mikrovlnka nezašpinila)

- Provádějte v digestoři: přidat cca 8 μ l Ethidiumbromidu (EtBr; v lednici 122/6), vylít do vaničky, přidat hřebínek, nechat asi 20 min tuhnout

- Před gelovou elektroforézou zkontrolujte, zda je ve vaničce dostatek TAE pufru.

Po přípravě gelu vše po sobě umyjte teplou vodou a poté dH₂O, ať na ničem nezůstane gel.

Po elektroforéze se gely vyhazují do speciálního kanistru (žlutý kanistr s červeným víkem).

1x TAE pufr (1l):

- 20ml zásobního 50x koncentrovaného TAE pufru

- doplnit dH₂O po horní rysku.

- míchá se ve špinavé části WB místnosti

Příprava 10x running/transfer pufru (1l):

- 144g Glycinu

- 30,3g Tris

- Při přesouvání většího množství chemikálií do lahve používejte skleněnou nálevku

- doplnit dH₂O po rysku

- Do lahve umístěte následně magnetické míchadlo a nechte to míchat na magnetickém míchadle, dokud se vše úplně nerozpustí.

Příprava running pufru (kanistr 10l):

- 1l 10x Running

- 50ml 20% SDS

- doplnit na 10l dH₂O

Příprava wash pufru (10l):

- 50ml 2M Tris pH 7,6

- 200ml 5M NaCl

- 80ml 10% Tween

- doplnit dH₂O do 10l

Příprava 20% SDS (500 ml):

- 100g SDS
- Při přesouvání většího množství chemikálií do lahve používejte skleněnou nálevku
- Doplňte dH₂O po rysku.
- Do lahve umístěte následně magnetické míchadlo a nechte to míchat na magnetickém míchadle při teplotě 60 °C, dokud se vše úplně nerozpustí.
- Doporučuji míchat přes noc (ale vypnout zahřívání!!)

Roztok pro vodní lázeň:

- 5ml AquaClean roztoku (lahvička v šuplíku pod centrifugou v tkáňovkách; fotosenzitivní roztok - uchovává se ve tmě)
- doplnit 1l dH₂O (do nachystané 1l sterilní lahve)

Příprava 5M NaCl (0,5 L):

- 2,5 x 58,44g
- Při přesouvání většího množství chemikálií do lahve používejte skleněnou nálevku.
- doplnit dH₂O po rysku
- Do lahve umístěte následně magnetické míchadlo a nechte to míchat na magnetickém míchadle, dokud se vše úplně nerozpustí.

Příprava LB (1000 ml):

- 25g LB powder (skříň pod ledovačem ve WB room)
- Doplňit po rysku dH₂O
- > sterilizuje se v autoklávu
- Popište lahev druhem roztoku a datem přípravy!

Příprava LB agaru (1000 ml):

- 25 g LB powder
- 12 g Agar (Agar Agar; Penta).
- Následně doplňte d H₂O po vrchní rysku.

- Sterilizuje se v autoklávu.
- Popište lahev druhem roztoku a datem přípravy!

Příprava ATB alikvotu (semisterilně v Benchroomu):

- Aliquoty antibiotik skladujeme na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mrazák v benchroom 113/5) v prostředním šuplíku. Zásobní (prášková) antibiotika jsou na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (113/2).
- **Ampicilin** – zásobní mícháme **25mg/ml** (nejčastěji používáme 50ml Falkonku, tj. 1250 mg Amp do 50% etanolu (čistý!!-hnědá láhev) v 50 ml falkoně.
- **Kanamycin** – zásobní mícháme **25mg/ml** (vážíme na analytických vahách do čisté 15ml falkonky a doplníme miliQ vodou dle navážky; na 15 ml je množství Kan. 375 mg). Rozaliquotujeme do 1,5 ml epinek a uložíme na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava bakteriologických misek:

- Bakteriologické misky se mohou připravovat “semisterilně” v Benchroomu, nebo ve Flowboxu (LabTechnici chystají sterilně misky s ATB do zásoby)
- LB agar je umístěn v chladové místnosti. Před přípravou je potřeba roztok kompletně rozpustit v mikrovlnce (laboratoř 115).
- Bakteriologické misky umístěny na chodbě hned za přepážkou.
- Antibiotikum přidáváme do horkého LB-agaru ve chvíli, kdy jej lze již udržet v ruce. Promícháme a lejeme na bakteriologické misky. Misky necháváme odkryté dokud agar přirozeně neztuhne (cca 10-15 minut, poté misky přiklopíme víčkem a oblepíme parafilmem. Poté se skladují dnem vzhůru v chladovce.
- **Ampicilin: 4 ml/l agaru (doba použití je 4 týdny od přípravy)**
- **Kanamycin 2 ml/l agaru (doba použití je 6 týdnů od data přípravy)**
- Nezapomeňte misky popsat druhem antibiotika (Amp, Kan) a datem přípravy.

Příprava PBS (2l, chystají technici):

- 16,4g NaCl
- 5,8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0,4g KH_2PO_4
- 0,4g KCl
- Doplnit mQ H_2O do 2 L po rysku.
- Do lahve umístěte následně magnetické míchadlo a nechte to míchat na magnetickém míchadle, dokud se vše úplně nerozpustí.

- Následně přefiltrujte přes filtrační aparaturu a rozdělte PBS do popsaných 250 ml lahví a nachystejte k vyautoklávování.

TRIS (vč. úpravy pH; většinou chystají technici):

- TRIS (powder pod ledovačem)
- Množství TRISu pro různé koncentrace napsáno na ledovači. Poté doplňte dH₂O do objemu 3/4 lahve.
- Do lahve umístěte následně magnetické míchadlo a nechte to míchat na magnetickém míchadle, dokud se vše úplně nerozpustí.
- Po rozpuštění TRISu upravte pH pomocí roztoku HCl na požadovanou hodnotu. Hodnotu pH kontrolujte digitálním pH metrem. Po zkalibrování doplňte dH₂O až skoro po rysku.
- Nechte TRIS následně přes noc míchat a další den opět zkontrolujte pH. Pokud je pH moc nízké, můžete jej dopravit pomocí NaOH.

Čištění a kalibrace pipet:

- Znečištěné filtry se vyměňují pouze u 5ml pipet
- www.youtube.com/watch?v=q0o-VBMVKio (How to disassemble, assemble, clean and grease the Eppendorf Research® plus mechanical pipette)
- Kalibrujeme pouze 200ul, 1000ul a 5000ul pipety (technici) pomocí analytických vah ve WB místnosti,
- ostatní se nechávají zkalibrovat výrobcem (eppendorf u eppendorfu a labnet pipety u KRD)

Kontrola zásob:

Je potřeba, aby si každý student a pracovník v laboratoři hlídal zásoby reagensů a potřeb, které v laboratoři využívá. Při ubývání zásob je potřeba upozornit svého školitele, technika či laboratorního manažera, aby byla nová zásoba objednána v systému Quartz.