

# Biología Celular y Molecular Médica I

Jorge Contreras Pineda

## Práctica: El uso de las micropipetas

**OBJETIVO:** Conocer las partes y el funcionamiento de las micropipetas; adquirir destreza en la utilización de pipetas para la medición de volúmenes entre 1 y 1000  $\mu\text{L}$ .

### MATERIALES

3 juegos de micropipetas P1000, P200 y P20

Agua desionizada

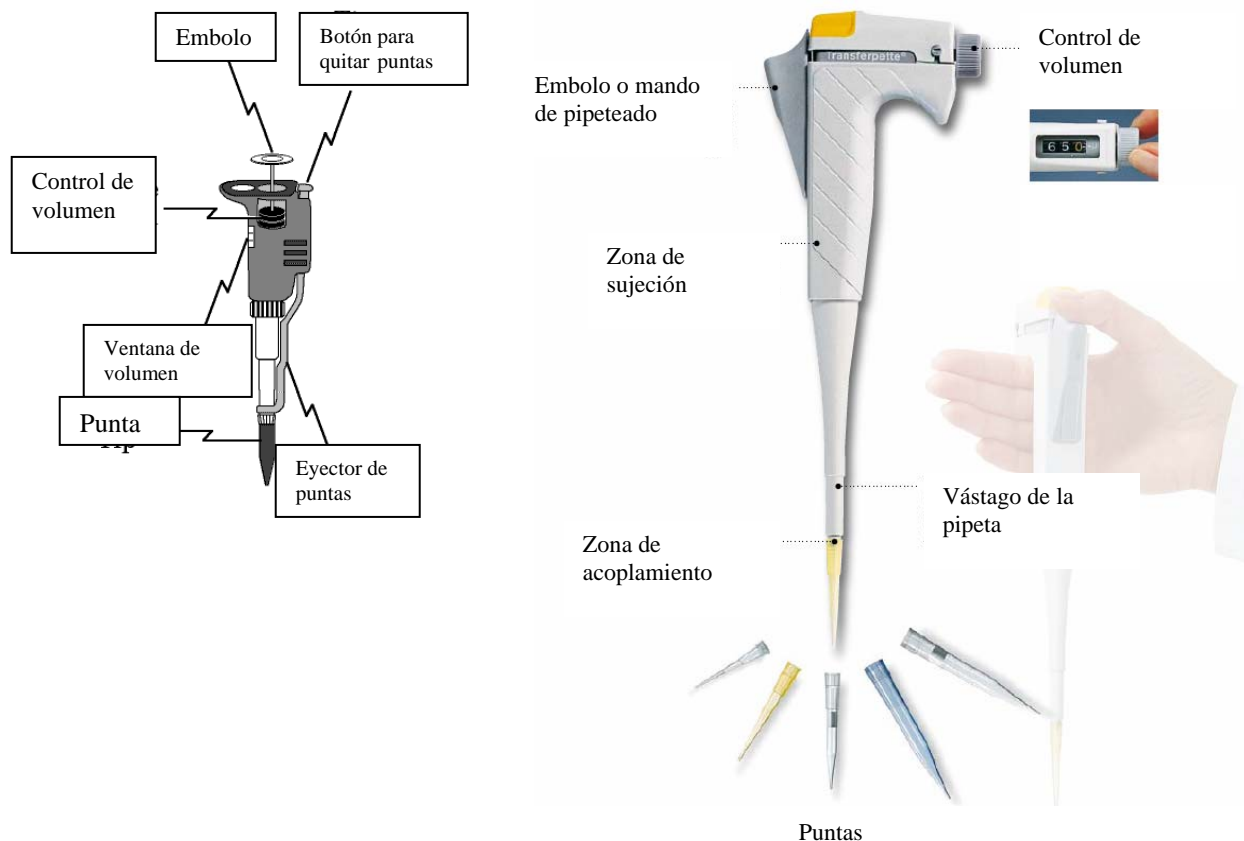
Glicerina o glicerol

Balanzas que miden 0,0001 g

Tapas de cajas de petri de plástico de 2 mL o vidrios de reloj de 5 cm de diámetro

Puntas para las micropipetas (amarillas y azules)

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS



En bioquímica, la habilidad para medir de manera exacta y reproducible y transferir volúmenes pequeños de líquidos son críticos para obtener resultados útiles. Para los volúmenes menores de 1 mL, el método más común para medir líquidos requiere el uso de un dispositivo conocido como micropipeta.

Se presenta un dibujo de dos micropipetas. Las pipetas que usa pueden no parecerse a las mostradas. Las micropipetas usadas en este laboratorio vienen en tres diferentes presentaciones.

## **TIPOS DE MICROPIPETAS**

Los tipos: P1000, P200, y P20.

P1000 es útil para volúmenes de 200 hasta 1000  $\mu\text{L}$

P200 es útil para volúmenes de 20 hasta 200  $\mu\text{L}$ .

P20 es útil para volúmenes de 0.5 hasta 20  $\mu\text{L}$ .

Asegúrese que está usando la micropipeta correcta para el volumen que necesita. También, asegúrese que la micropipeta está realmente lista para el volumen que necesita revisando la “ventana de volumen”, y, si es necesario, cambiando el volumen mediante el “dispositivo” del control o mando del volumen hasta que la micropipeta corrija el volumen (la micropipeta no lee su mente; varias personas usarán las pipetas, no siempre se encontrará como usted la necesita).

No Trate de colocar la micropipeta para volúmenes mayores que el máximo, o para volúmenes menores del cero, esto descalibrará y dañará la micropipeta.

Toda micropipeta utiliza puntas desechables (no utilice la pipeta sin usar la punta apropiada, hacer esto contaminará la micropipeta y la puede dañar).

No utilizar la micropipeta con líquidos que atacan el polipropileno.

No utilizar líquidos que estén emitiendo vapores.

La temperatura de los líquidos debe estar entre 15 y 40 °C.

Al poner la punta, asegúrese que la punta sea del tipo correcto y que esta correctamente ajustada.

Generalmente para P1000 las puntas son azules, para P200 son amarillas y para P20 pueden ser amarillas o blancas.

## **MANEJO DE LA MICROPIPETA**

### **Llenado de la pipeta**

Colocar el pulgar sobre el mando o émbolo de pipeteado.

Oprimir el émbolo. Cuando el émbolo se presiona sentirá un punto de resistencia. Éste es el primer “alto” o “tope”. Si continúa presionando encontrará un punto donde el émbolo ya no se mueve hacia abajo, este corresponde al segundo “alto” o “tope”.

Oprimir el émbolo hasta el primer tope y colocar la punta dentro del líquido hasta una profundidad de 2 a 3 mm. De una manera lenta y controlada, disminuya la presión del émbolo para permitir que se desplace hacia arriba. No suelte el émbolo abruptamente, al permitirlo causará que el líquido pueda salpicar dentro de la punta produciendo volúmenes inexactos y generando contaminación de la pipeta. Una vez el émbolo se haya desplazado hasta arriba mantenga la micropipeta en el líquido durante un segundo, esto evita que se aspire aire en la parte final.

### **Expulsión de la muestra**

Llevar la micropipeta al envase en el cuál quiere añadir el líquido. Se apoya la punta en la pared del recipiente sin evitar la salida de la muestra. Oprima el émbolo hasta el primer tope y luego hasta el segundo tope. Haga este procedimiento a una velocidad moderada, hacerlo muy rápido hará que queden gotas de muestra en la punta. Si observa cuidadosamente, entonces notará que al oprimir hasta el segundo alto se expelle todo el líquido de la punta.

Lo anterior es cierto para la mayoría de soluciones acuosas, excepto para las soluciones de alta viscosidad. Para solventes orgánicos o para soluciones conteniendo grandes cantidades de proteína (plasma y suero), es difícil sacar todo el líquido de la punta. En estos casos, es mejor pipetear una vez la solución expeliéndola y luego llevando hacia arriba el líquido a medir en un segundo tiempo. Para soluciones de alta viscosidad el llenado y la expulsión deben ser más lentas.

Si es usada inadecuadamente, la micropipeta transferirá volúmenes inexactos.

La micropipeta puede perder su calibración. Comprobar la calibración de la pipeta es un procedimiento simple que puede ahorrar tiempo considerable, energía, y reactivos. En esta práctica aprenderá a usar la micropipeta de tamaños diversos medir su exactitud, precisión y calibración.

## **PROCEDIMIENTO**

Para cada micropipeta revisar el porcentaje de exactitud (**E%**) y el coeficiente de variación (**CV%**) en todo el rango usando al menos dos volúmenes diferentes; por

ejemplo: Para la micropipeta P1000 revisar los volúmenes de 300  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ . Para P200 revisar los volúmenes de 60 y 200  $\mu\text{L}$ . Para P20 revisar 3 y 10  $\mu\text{L}$ .

1. Seleccionar la micropipeta y las puntas adecuadas.
2. Colocar la tapa de la caja de petri en la balanza y tarar a cero.
3. Tomar el volumen de agua destilada con la micropipeta y dispénselo en la tapa de la caja de petri. Registre el peso del agua añadido. La densidad del agua es 1 g/mL a 25 ° C, por lo tanto un volumen de 1 mL corresponde aproximadamente a una masa de 1 g, 300  $\mu\text{L}$  a 0.3 g, 200  $\mu\text{L}$  a 0.2 g, 60  $\mu\text{L}$  a 0.06 g, 10  $\mu\text{L}$  a 0.01 g y 3  $\mu\text{L}$  a 0.003 g.
4. Repita el procedimiento cinco veces para cada volumen.
5. Repetir todo el procedimiento para glicerol. La **densidad** del **glicerol** es de 1,2656 g/mL a 25 ° C. Calcular la masa esperada para cada volumen.

## **CALCULO DE LA EXACTITUD (E%) Y DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV%)**

### **Cálculo del volumen medio**

Los valores de las pesadas del control gravimétrico son sólo la masa del volumen dosificado. Para obtener el volumen real se debe efectuar un cálculo corrector. El cálculo corrector se realiza por multiplicación del valor medio de los valores de las pesadas (x) con el factor Z (mL/g que es lo mismo que  $\mu\text{L}/\text{mg}$ ), que toma en consideración la densidad del agua, la temperatura de control y la presión atmosférica. Z es igual a 1,0032  $\mu\text{L}/\text{mg}$ , referido a 21,5 ° C, 1013 mbar (hPa) y a la utilización de agua destilada o z es igual a 1,0029  $\mu\text{L}/\text{mg}$ , referido a 20 5 ° C y 1013 mbar (hPa). El factor Z es igual a 1/densidad.

**Valores del control a 21,5 ° C (Z = 1,0032)**

**Volumen controlado  $V_o$  ( $\mu\text{L}$ ): 200,0000**

**Valor nominal (mg) = Volumen controlado/Z**

**Valor nominal (mg): 199,3620**

**x1 =200,2000 x2=199,6000 x3= 199,4900 x4= 199,7000 x5= 199,7000**

### Valor medio

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$x_i$  = resultado de las pesadas  
 $n$  = número de pesadas

### Volumen medio

$$\bar{V} = \bar{x} \cdot z$$

$$\bar{V} = \frac{200,2 + 199,6 + 199,49 + 199,7 + 199,7}{5} \cdot 1,0032$$

$$\bar{V} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5}{5} \cdot z$$

$$\bar{V} = 199,738 \cdot 1,0032$$

$$\bar{V} = 200,3772$$

### Factor Z del agua destilada a diferentes temperaturas

Temperatura °C	Factor z ml/g
18	1,00245
18,5	1,00255
19	1,00264
19,5	1,00274
20	1,00284
20,5	1,00294
21	1,00305
21,5	1,00316
22	1,00327

Temperatura °C	Factor z ml/g
22,5	1,00338
23	1,00350
23,5	1,00362
24	1,00374
24,5	1,00386
25	1,00399
25,5	1,00412
26	1,00425

### Exactitud (E%)

$$E [\%] = \frac{\bar{V} - V_{\text{nominal}}}{V_{\text{nominal}}} \cdot 100$$

$$E [\%] = \frac{200,3772 - 200}{200} \cdot 100$$

$$E [\%] = 0,189$$

### Desviación estándar

$$S = Z \cdot \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$s = Z \cdot \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2 + (x_5 - \bar{x})^2}{4}}$$

$$s = 1,0032 \cdot \sqrt{\frac{(200,2 - 199,74)^2 + (199,6 - 199,74)^2 + (199,49 - 199,74)^2 + (199,7 - 199,74)^2 + (199,7 - 199,74)^2}{4}}$$

$$s = 1,0032 \cdot \sqrt{\frac{0,29688}{4}}$$

$$s = 0,273$$

### Coefficiente de variación

$$CV [\%] = \frac{s \cdot 100}{\bar{V}}$$

$$CV [\%] = \frac{0,273 \cdot 100}{200,3772}$$

$$CV [\%] = 0,136$$

Para el ejemplo calculado se obtiene el siguiente resultado:

Volumen controlado (μL): 200,0000

Volumen medio (μL): 200,3772

E % [%] 0,189

CV [%]	0,136	
E [%] nominal*	0,500	
CV [%] nominal*	0,200	* límites de tolerancia de las instrucciones de manejo

Si los valores calculados de exactitud (E [%]) y coeficiente de variación (CV [%]) son menores que los valores de tolerancia o iguales a éstos, entonces el aparato está en orden.

**\* Límites de tolerancia**

<b>Volumen (µL)</b>	<b>E% nominal</b>	<b>CV% nominal</b>
5-10	1	0.8
20-50	0.7	0.4
100-1000	0.5	0.2