

Applications

Note 192 | Juli 2008

Technical Report

Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention – Bestimmung der Restfeuchte in Pipettenspitzen nach dem Pipettieren detergenezhaltiger Lösungen

Natascha Weiß¹, Dagmar Bracht² und Maice Ramm¹

¹Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; ²Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung

Beim Pipettieren von detergenezhaltigen Flüssigkeiten bleibt aus physikalischen Gründen stets ein Flüssigkeitsfilm auf Pipettenspitzen aus Standardmaterial zurück. Dieser ist je nach Art der Anwendung und der Handhabung unterschiedlich stark ausgeprägt. Durch diesen Effekt geht zum einen wertvolles Material verloren und zum anderen kann die Präzision des Dosierens leiden. Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass die Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention nach Einsatz entsprechender Lösungen eine stark reduzierte Restfeuchte aufweisen. Dadurch ist der Materialverlust minimal und die Präzision der Pipettierungen sehr hoch.

Einleitung

Die Präzision und Richtigkeit beim Pipettieren von Flüssigkeiten bildet die Grundlage für aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse. Gerade im molekularbiologischen Bereich kommen immer sensitivere Methoden zum Einsatz, die ein genaues Dosieren auch sehr kleiner Volumina notwendig machen.

Wichtige Einflussfaktoren auf die Genauigkeit eines Dosiersystems stellen Design, Material und Fertigung sowie auch die perfekte Abstimmung von Gerät und dazugehörigen Einmalartikeln dar. Nicht zu vernachlässigen ist ferner die Wahl des am besten geeigneten Systems und der richtigen Technik für die jeweilige Anwendung [1, 2, 3]. Beispielsweise sollte für sehr viskose Lösungen oder Lösungen mit einem hohen Dampfdruck eher ein Direktverdrängersystem als eine Kolbenhubpipette gewählt werden. Alternativ kommt auch die Technik des reversen Pipettierens in Betracht. Ein weiteres Phänomen tritt bei der Verwendung detergenezhaltiger Lösungen auf. Diese weisen eine im Vergleich zu

Wasser verminderte Oberflächenspannung auf, welche zur Benetzung von Polypropylenoberflächen führt. Aus diesem Grund bleibt nach Abgabe von Flüssigkeit aus einer konventionellen Pipettenspitze ein Film auf dessen Oberfläche zurück, der je nach Art der Lösung, Anwender, Abgabegeschwindigkeit und Qualität der Pipettenspitze unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Zusätzlich zu der beeinträchtigten Richtigkeit und Präzision wird die Handhabung häufig durch Schaumbildung erschwert.

In der Molekularbiologie sind Detergenzien in vielen Enzymlösungen (z. B. Restriktionsenzyme, Polymerasen, PCR Mastermixe) und in Lösungen zur Präparation von Probenmaterial wie Nukleinsäuren und Proteinen enthalten. Neben einem Einfluss auf die Homogenität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist gerade bei Enzymlösungen zu bedenken, dass mit jeder benutzten Pipettenspitze auch teures Reagenz ohne Nutzen verbraucht wird.

Einleitung

Für diese Anwendungen wurden die Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention entwickelt. Die aus hochreinem Polypropylen bestehenden Spitzen werden durch ein neuartiges Plasmaverfahren hydrophober gemacht. Dadurch wird der so genannte „low retention“ Effekt erzielt, der bewirkt, dass auch Flüssigkeiten mit geringer Oberflächenspannung keinen Flüssigkeitsfilm mehr ausbilden und so eine genaue und präzise Dosierung möglich wird (Abb. 1). Wichtig ist, dass die Tips nicht silikonisiert sind oder eine ähnliche Beschichtung aufweisen, die sich ablösen und mit der Probe interferieren kann.

In diesem Technical Report wird die nach einem Pipettierschritt verbleibende Restflüssigkeit in verschiedenen Pipettenspitzen bestimmt. Dafür werden in der Molekularbiologie typische Detergenzienlösungen eingesetzt. Verglichen werden Eppendorf epT.I.P.S. Standard und LoRetention sowie „low retention“ Spitzen von drei weiteren Herstellern.

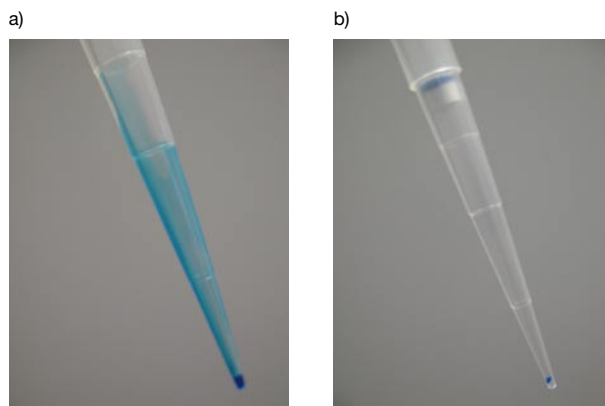


Abbildung 1: Pipettenspitzen nach Aufnahme und Abgabe einer detergentenhaltigen Farblösung
a) Standard Spitze
b) Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention

Material und Methoden

Für die Experimente wurden Eppendorf epT.I.P.S. Standard und LoRetention der Größen 200 µl und 10 µl eingesetzt. Zusätzlich wurden „low retention“ Spitzen im 200 µl Format von 3 weiteren Herstellern und im 10 µl Format von 2 Herstellern getestet.

Eingesetzt wurden die elektrischen Pipetten Eppendorf Research® pro (200 µl und 10 µl). Diese wurden jeweils auf die langsamste Abgabegeschwindigkeit eingestellt. Der Überhub (Blow) wurde als Option ausgewählt [4]. Es wurden folgende detergentenhaltige Flüssigkeiten verwendet: 0,1 % Triton® X-100, 1 % SDS, MasterMix (2,5 x) (5-Prime). Für Triton X-100 wurde zusätzlich ein Experiment mit der manuellen Eppendorf Research® 200 µl und den entspre-

chenden Spitzen durchgeführt.

Die jeweilige Lösung wurde auf der Waage (Mettler Toledo AG 285, Mettler Toledo SAG 245 P) in einem kleinen Gefäß vorgelegt und als Nullwert genommen. Anschließend wurden 200 µl bzw. 10 µl Flüssigkeit aufgenommen und möglichst langsam wieder abgegeben. Es erfolgte eine Pause von ca. 5 Sekunden bevor eventuell nachgelaufene Flüssigkeit mittels des Überhubs (Blow) [4] ebenfalls abgegeben wurde. Die Differenz zum Ausgangsgewicht wurde notiert. Jede Messung wurde 10 x durchgeführt. Daraus wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und die Werte in einen prozentualen Verlust (Restfeuchte) umgerechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildungen 2–4 zeigen, dass die Benetzung der Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention für beide Pipettenspitzengrößen (10 µl und 200 µl) im Vergleich zu Standardspitzen und „low retention“ Spitzen anderer Hersteller am geringsten ist. Zusätzlich wird mit allen getesteten Lösungen eine sehr hohe Präzision erzielt. Grundsätzlich ist die Restfeuchte bei Verwendung der 10 µl Spitzen höher als bei den größeren 200 µl Tips, was an dem ungünstigeren Verhältnis der Oberfläche zum Volumen liegt.

Der an der Pipettenspitze verbleibende Flüssigkeitsfilm ist am stärksten beim PCR Mastermix ausgeprägt (Abb. 2). Bemerkbar macht sich dieser Effekt bei der Tatsache, dass

trotz großzügig berechneter Ansätze der Mastermix vielfach nicht oder kaum ausreicht. Das ist auf die üblicherweise in diesen Reagenzien vorhandenen Detergenzien und weitere Zusätze wie Glycerin, die zu einer höheren Viskosität führen, zurückzuführen.

Pro Pipettierschritt bleiben bei Verwendung einer 10 µl Standardspitze durchschnittlich 1,4 mg (12,6 %) und bei einem entsprechenden 200 µl Tip 5,6 mg (2,5 %) zurück. Diese Werte lassen sich durch Einsatz der LoRetention Tips auf 0,6 mg (entspricht 5,0 % in der 10 µl Spitze) bzw. 0,7 mg (entspricht 0,3 % in der 200 µl Spitze) stark reduzieren.

Ergebnisse und Diskussion

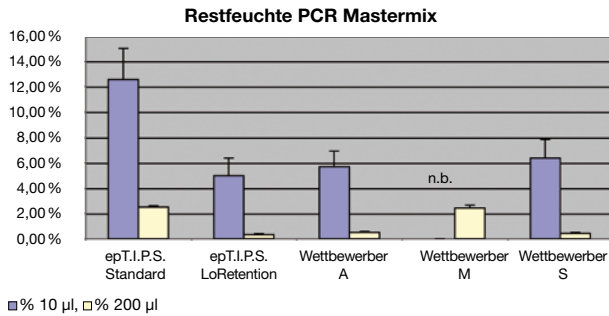


Abbildung 2: Restfeuchtebestimmung mit 10 µl und 200 µl Pipettenspitzen für PCR Mastermix unter Verwendung der elektrischen Pipette Research pro. (n.b.: Wert wurde nicht bestimmt)

Bei der 1 %igen SDS Lösung ist die Benetzung insgesamt geringer (Abb. 3). Die Eppendorf LoRetention Spitzen führen aber auch hier zu besseren Ergebnissen und verdeutlichen, mit welcher hohen Präzision die Lösung dosiert werden kann. Auf der anderen Seite weisen die „low retention“ Spitzen der anderen Hersteller zum Teil sogar eine schlechtere Performance als die Eppendorf Standardspitzen auf.

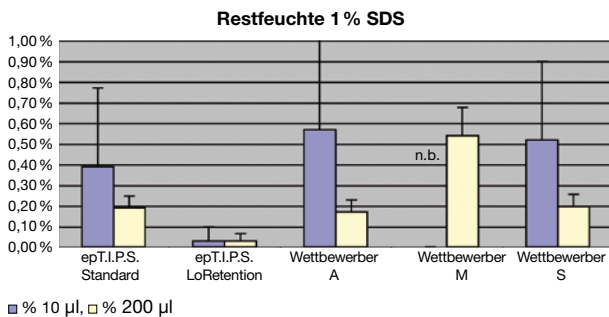


Abbildung 3: Restfeuchtebestimmung mit 10 µl und 200 µl Pipettenspitzen für 1 % SDS Lösung unter Verwendung der elektrischen Pipette Research pro. (n.b.: Wert wurde nicht bestimmt)

Fazit

Es wurde gezeigt, dass sich mit den Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention sehr gute Resultate beim Dosieren verschiedener detergentenhaltiger Lösungen ergeben. Detergenzien sind in vielen Enzymlösungen, vor allem in Polymerasen und PCR Mastermixen enthalten und werden bei der Isolierung von Nukleinsäuren und Proteinen eingesetzt. Für

Neben den Ergebnissen für Triton X-100 (0,1 %) mit der elektronischen Pipetten sind in Abbildung 4 auch Ergebnisse bei Verwendung der manuellen Research Pipette dargestellt. Die Restfeuchte ist jeweils für die epT.I.P.S. LoRetention am geringsten bei gleichzeitig sehr hoher Präzision der Werte. Zusätzlich ist ein Einfluss der verschiedenen Pipettentypen kaum erkennbar. Bei Verwendung der Standardspitzen und der anderen „low retention“ Tips ist sowohl die Restfeuchte deutlich höher als auch ein Unterschied zwischen manuellem und elektronischem Pipettieren vorhanden. Damit wird gezeigt, dass diese Variable, die sich in einer unterschiedlichen Pipettiergeschwindigkeit oder anderen Faktoren des Handlings äußern kann, einen Einfluss auf das Dosierergebnis hat. Wenn Eppendorf LoRetention Spitzen verwendet werden, wird dieser Effekt minimiert.

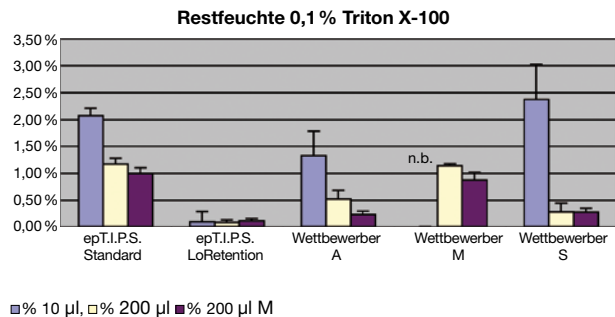


Abbildung 4: Restfeuchtebestimmung mit 10 µl und 200 µl Pipettenspitzen für 0,1 % Triton X-100 Lösung unter Verwendung der elektrischen Pipette Research pro und der manuellen Research Pipette (M). (n.b.: Wert wurde nicht bestimmt)

diese Anwendungen kommt es sehr auf hohe Pipettiergenauigkeit und Reproduzierbarkeit an. Weiterhin kann durch Einsatz der Eppendorf LoRetention Spitzen wertvolles Probenmaterial und teure Reagenzien nahezu verlustfrei pipettiert werden und somit Material effizient genutzt werden.

Literatur

- [1] Eppendorf Userguide No. 19, Liquid Handling 1 (www.eppendorf.de)
- [2] Eppendorf Userguide No. 20, Liquid Handling 2 (www.eppendorf.de)
- [3] Eppendorf Userguide No. 21, Liquid Handling 3 (www.eppendorf.de)
- [4] Bedienungsanleitung Eppendorf Research pro (www.eppendorf.de)

Bestellinformationen

Bezeichnung	Verpackung	Bestell-Nr.
epT.I.P.S. LoRetention Dualfilter, PCR clean, steril und Pyrogen-frei		
0,1 – 10 µl S	10 Racks à 96 Tips = 960 Tips	0030 077.610
0,5 – 20 µl L	10 Racks à 96 Tips = 960 Tips	0030 077.628
2 – 100 µl	10 Racks à 96 Tips = 960 Tips	0030 077.644
20 – 300 µl	10 Racks à 96 Tips = 960 Tips	0030 077.636
50 – 1000 µl	10 Racks à 96 Tips = 960 Tips	0030 077.652
epT.I.P.S. LoRetention Reloads, PCR clean		
0,1 – 10 µl S	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.006
0,5 – 20 µl L	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.014
2 – 200 µl	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.022
50 – 1000 µl	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.030
epT.I.P.S. LoRetention Reloads, Eppendorf Qualität		
0,1 – 10 µl S	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.049
0,5 – 20 µl L	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.057
2 – 200 µl	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.065
50 – 1000 µl	10 Trays à 96 Tips = 960 Tips	0030 072.073

Triton ist ein eingetragenes Warenzeichen der Union Carbide Corporation.

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Deutschland · Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: vertrieb@eppendorf.de

Eppendorf Austria · Österreich · Tel: +43 1 29017560 · Fax: +43 1 290175620 · E-mail: office@eppendorf.at

Vaudaux-Eppendorf AG · Schweiz · Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch

Application Support Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com