

Applications

Note 016 | Januar 2008

Technical Report

Einsatz des Concentrator plus in einem Sequenzierlabor

*Otto Knobloch, Sequence Laboratories Göttingen GmbH, DNA-Service-Labor,
Hannah-Vogt-Str. 1, 37085 Göttingen*

Zusammenfassung

Dieser Technical Report beschreibt Arbeitsabläufe in einem Auftragssequenzierlabor, darunter die Konzentrierung von DNA-Proben, die Entfernung von Alkoholresten, das Aliquotieren von Enzymen und die Nutzung eines Exsikkators, unter Verwendung des Concentrator plus.

Es wird gezeigt, dass der Concentrator plus einfach in der Handhabung ist und eine Konzentrierung der Proben schnell und sanft erreicht wird. Durch die Einstellung optimaler Bedingungen im Hinblick auf den Dampfdruck des Lösungsmittels und der Empfindlichkeit der Probe gegenüber der Temperatur kann zeitsparend und ohne Probenverlust gearbeitet werden.

Einleitung

Der Concentrator plus von Eppendorf wurde für die Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren und Proteinen entwickelt. Damit eignet sich der Concentrator plus besonders für ein Auftragssequenzierlabor mit hohem Durchsatz, da häufig Kunden-DNA bearbeitet werden muss, die für eine Standard-Sequenzierung in einer zu geringen Konzentration vorliegt. Eine Aufkonzentrierung der Probe mit anderen Methoden – wie beispielsweise einer Ethanol-Fällung – ist sehr viel zeitaufwendiger und kann zu Probenverlusten und damit zu einer zu geringen DNA-Menge führen, die keine einwandfreie Sequenzierung mehr zulässt. Wichtig bei der Trocknung von DNA-Proben ist das richtige Maß der Trocknung: Ist der Feuchtigkeitsgehalt der Probe zu gering, so lässt sich die DNA nur noch sehr schwer resuspendieren, was zu Zeitverlusten führen kann.

In dieser Application Note wird ein Erfahrungsbericht mit dem Concentrator plus in einem Sequenzierlabor vorgestellt. Dabei wird deutlich, dass der Concentrator sich nicht nur für die Aufkonzentrierung von DNA-Proben eignet, sondern auch zum Entfernen von Alkoholresten und zum Aliquotieren von Enzymen. Ebenso ist er als Exsikkator auch für größere Gefäße einsetzbar.



eppendorf

Methoden und Ergebnisse

In der Regel werden Sequenzierungsreaktionen in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Um diese optimal in den Rotoren des Concentrators bearbeiten zu können, werden die gleichen Adapter genutzt, die auch in den Zentrifugenrotoren Verwendung finden (Eppendorf Adapter für 0,2 ml PCR-Gefäße, s. Bestellinformationen).

1. Konzentrierung von DNA-Proben

Wird nach der Durchführung eines Cycle-Sequencings und einer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel kein einwandfreies Ergebnis mit einer Probe erhalten, so liegt dies häufig an einer zu geringen Konzentration der DNA-Probe. Statt die Proben nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung zu fällen und in einem geeigneten geringeren Volumen zu lösen, wodurch Probenverluste vorprogrammiert sind, erfolgt die Aufkonzentrierung der Proben mit Hilfe des Concentrator plus bei einer Temperatur von 60 °C mit der Funktion V-AQ. Mit diesen Parametern ist es möglich, in einer Zeit von nur 30 min eine in Wasser gelöste DNA-Probe von 150 µl auf 10 µl einzuengen, ohne dass die DNA in ihrer Sequenzierbarkeit beeinträchtigt wird. Die gleichen Versuchsbedingungen werden für eine Aufkonzentrierung von Primern gewählt, die für eine Sequenzierung eingesetzt werden.

Erfolgt die Aufkonzentrierung von sensibleren Proben (wie z.B. Proteinen), so ist die Anwendung einer geringeren Temperatur unter entsprechender Verlängerung der Konzentrierungsdauer problemlos möglich.

2. Entfernung von Alkoholresten in der DNA-Probe

Wenn sich resuspendierte Proben mit einer Standard-Sequenzierreaktion nicht sequenzieren lassen, kann dies unter anderem in einer Kontamination der Probe mit Ethanol begründet sein. Die Alkoholreste, die aufgrund der Fällung und des Waschens der Pellets in den DNA-Proben vorliegen, können bei einer Temperatur von 60 °C und Wahl der Funktion V-AL innerhalb von 4 min entfernt werden.

3. Aliquotieren von Enzymen

Soll eine kleine Menge Enzym (z.B. RNase) in eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen aliquotiert werden, so wäre das jeweilige Abwiegen der einzelnen Mengen zu zeitaufwendig. Um Aliquots mit jeweils 1 mg Enzym herzustellen, werden 100 mg Enzym in 1 ml Flüssigkeit (z.B. Wasser) gelöst und mit einer Eppendorf Multipette plus zu je 10 µl in 96 Standard-Reaktionsgefäße aliquotiert. Das vollständige Eindampfen der 10 µl Enzymlösung erfolgt bei einer Temperatur von 45 °C und Wahl der Funktion V-AQ innerhalb von 5 min.

4. Nutzung der Exsikkatorfunktion

Bei der Aufarbeitung von großen Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) erfolgt die Ethanol-Fällung und Zentrifugation zur Gewinnung der DNA in 25 ml bzw. 50 ml-Gefäßen. Sollte keiner der angebotenen Sonderrotore zur Aufnahme der 50 ml-Gefäße geeignet sein, so können Reste von Ethanol und Wasser auch mit Hilfe der Exsikkatorfunktion entfernt werden. Dazu werden die Röhrchen mit Parafilm® verschlossen, Löcher in den Film gestochen und die Gefäße – nach Entnahme des Rotors – in einem Ständer (z. B. Styroporring) direkt in den Kessel transferiert. Nach Anlegen des Vakuums sind die Proben nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Wahl der Funktion D-AL frei von Alkoholresten und besitzen den idealen Trocknungsgrad zur Resuspendierung.

Schlussfolgerung

Wie die oben genannten Methoden zeigen, ist der Concentrator plus extrem vielseitig und zeitsparend einsetzbar. Dem hohen Durchsatz in einem professionellen Sequenzierlabor wird der Concentrator durch den gleichzeitigen Einsatz von 2 Festwinkelrotoren im Sandwichbetrieb gerecht, wodurch 144 bzw. 96 Proben (0,5 ml bzw. 1,5 ml-Gefäße) aufgearbeitet werden können. Da die Rotoren ohne Werkzeug gewechselt und ohne zusätzliche Befestigung betrieben werden können, wird zusätzlich wertvolle Zeit gespart.

Die verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Sonderfunktionen bieten flexible, auf die jeweilige Probe und das Lösungsmittel optimal abgestimmte Reaktionsbedingungen und machen den Concentrator plus zusammen mit seiner hohen Probenkapazität zu einem unverzichtbaren Bestandteil unserer täglichen Arbeit.



Bestellinformationen Rotoren

Bezeichnung	Bestellnummer
Rotor F-45-72-8 , 72 Plätze für 0,5 ml Reaktionsgefäße	5490 034.007
Rotor F-45-70-11 , 70 Plätze für 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße	5490 032.004
Rotor F-45-48-11 , 48 Plätze für 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße	5490 030.001
Rotor A-2-VC , inkl. 2 Gehänge, für 2 Microtest Plates oder PCR-Platten	5490 045.009
Rotor F 45-24-12 , 24 Plätze für 6,0/8,0 ml Rundbodengefäße (12 mm Ø x 67-100 mm)	5490 036.000
Rotor F-50-8-16 , 8 Plätze für 15,0/20,0 ml Rundbodengefäße (16 mm Ø x 105 - 120 mm)	5490 041.003
Rotor F-50-8-18 , 8 Plätze für 15,0/20,0 ml Rundbodengefäße (18 mm Ø x 105-128 mm)	5490 042.000
Rotor F-45-8-17 , 8 Plätze für 15 ml Falcon®-Gefäße (17 mm Ø x 118 - 123 mm)	5490 038.002
Rotor F-40-36-12 , 36 Plätze für 1,5 ml Flachbodengefäße (12 mm Ø x 33 mm)	5490 040.007
Rotor F-45-36-15 , 36 Plätze für 3,0/5,0 ml Flachbodengefäße (15 mm Ø x 45 - 48 mm)	5490 035.003
Rotor F-45-16-20 , 16 Plätze für 6,5/10,0 ml Flachbodengefäße (20 mm Ø x 42-55 mm)	5490 043.006
Rotor F-40-18-19 , 18 Plätze für 10,0 ml Flachbodengefäße (19 mm Ø x 66 mm)	5490 037.006
Rotor F-45-12-31 , 12 Plätze für 20,0 ml Flachbodengefäße (31 mm Ø x 55 mm)	5490 044.002
Rotor F-35-8-24 , 8 Plätze für 25,0 ml Flachbodengefäße (24 mm Ø x 86 - 90 mm)	5490 039.009

Bestellinformationen Systeme und anderes Zubehör

Bezeichnung	Bestellnummer
Concentrator plus , Gesamtsystem mit integrierter Membranpumpe und 48 x 1,5/ 2,0 ml, Festwinkelrotor, 230 V, 50/60 Hz	5305 000.215
Concentrator plus , Gesamtsystem mit integrierter Membranpumpe, mit Anschluss für Geltrockner, 230 V, 50/60 Hz, ohne Rotor	5305 000.614
Concentrator plus, Gesamtsystem mit integrierter Membranpumpe, ohne Rotor	5305 000.410
Concentrator plus , Einzelgerät (zum Gesamtsystem nachrüstbar), mit 48 x 1,5/2,0 ml Festwinkelrotor, 230 V, 50/60 Hz	5305 000.010
Distanzstück für den gleichzeitigen Betrieb von 2 Rotoren (für F-45-72-8 und F-45-48-11)	5301 316.005
Adapter für 0,2 ml Reaktionsgefäße für den Rotor F-45-48-11 (Satz à 6 Stück)	5425 715.005
Adapter für 0,2 ml Reaktionsgefäße für den Rotor F-45-72-8 (Satz à 6 Stück)	5425 723.008
Adapter für 0,5 ml Reaktionsgefäße für den Rotor F-45-48-11 (Satz à 6 Stück)	5425 716.001
Arbeitsplatte für 96 x 0,2 ml PCR Gefäße, 5er bzw. 8er PCR-Streifen und Platten ohne Rahmen, Satz à 10 Stück	0030 124.235
Rahmen für Arbeitsplatte (Kombination = Rack) , Satz à 5 Stück	0030 124.243
Adapter , CombiSlide® Adapter für Objektträger, Einsatz im A-2-VC (Satz à 2 Stück)	5825 706.005

Parafilm ist eine eingetragene Marke der Firma Pechiney Plastic Packaging Inc, Neenah, WI, USA
Falcon ist eine eingetragene Marke der Firma Becton Dickinson

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Tel. +49 2232 418-0 · Fax +49 2232 418-155 · E-Mail: vertrieb@eppendorf.de · Internet: www.eppendorf.de
Vaudaux-Eppendorf AG · Tel. +41 61 482 1414 · Fax +41 61 482 1419 · E-Mail: vaudaux@vaudaux.ch · Internet: www.eppendorf.com
Eppendorf AG c/o Schott Austria · Tel. +43 1 29017560 · Fax +43 1 290175620 · E-Mail: gilch.p@eppendorf.de · Internet: www.eppendorf.com

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