

Applications

Note 105 | December 2004

Technical Report

Kontaminationsfreie Dosierung in PCR-Platten mit der epMotion 5070 und 5075

Renate Fröndt, Eppendorf AG, Hamburg

Einleitung

Man unterscheidet streng genommen Kontamination und Verschleppung. Die Verschleppung ist definiert als die Beeinflussung einer Probe B durch die vorangegangene Probe A. Verschleppung kann stets nur von A nach B erfolgen, und somit tritt Verschleppung nur beim Transport von Flüssigkeiten auf, und zwar bei allen Teilen, die mit wechselnden Flüssigkeiten in Berührung kommen. Die Verschleppung kann sich auf ein Einzelteil eines z.B. Analysenautomaten oder auf ein ganzes Fließsystem beziehen.

Eine Kontamination ist im Gegensatz zur Verschleppung, eine Verunreinigung durch von außen hereingetragene Materialien (Flüssigkeitsspritzer, feste Teilchen und Gase). Bei der Kontamination wird sowohl Probe A von Probe B als auch Probe B von Probe A beeinflusst.

Um den Grad der Kontamination zu bestimmen, gibt es sowohl quantitative als auch qualitative Methoden. Ein bekanntes qualitatives Verfahren in der Molekularbiologie ist eine schachbrettartige Pipettierung auf einer 96 bzw. 384 well Platte mit PCR-Reagenzien, dabei bleiben die Wells in der unmittelbaren Umgebung frei von Probenmaterial (DNA) und sind nur mit Wasser befüllt. Nach Ablauf der PCR Reaktionen und der Gelelektrophorese wird beurteilt, ob eine Kontamination von Well zu Well stattgefunden hat. Ein quantitatives Verfahren, ist die Pipettierung von demineralisiertem Wasser und Lithiumchlorid-Lösung im Schachbrettmuster auf einer 96 oder 384 Well Platte mit einer gesättigten Lithiumchloridlösung und anschließender flammenphotometrischer

Lithium-Messung. Dieses Verfahren ist ein anerkanntes Verfahren und wird z.B. zum Überprüfen von Pipettenspitzen als Qualitätskontrollmaßnahme eingesetzt. Mit diesem Verfahren kann eine quantitative Aussage hinsichtlich möglicher Kontamination getroffen werden, da ein Nachweis bis zu 0.1 nl (= 6,1 ng Li) möglich ist. Die Nachweisgrenze bei der flammenphotometrischen Messung der Li-Emission liegt nach Specker und Kaiser¹ bei 1 ng Li/ml (=1 ppb Li). Ein sehr stabiles Signal wird ab ca. 5 ng Li/ml und höher erzielt. Lithium ist im Gegensatz zu Natrium und Kalium, die ebenfalls in dieser Konzentration nachweisbar wären, kaum als zufällige Kontamination zu erwarten. Man kann also ziemlich sicher sein, dass ein Li-Signal in den nur mit Wasser befüllten Wells durch einen Satellitentropfen – bei der Abgabe der Li-Lösung oder beim Transport der Li-Lösung zu den anderen

Wells – hervorgerufen sein muss. Um eine möglichst eindeutige Aussage über die Kontamination bei Pipettierungen zu bekommen, bietet sich das oben beschriebene Verfahren mit Lithiumchlorid an, da es weniger störanfällig als das biologische Verfahren einer PCR-Reaktion ist. Vielfältige Störungen in Form von verunreinigten Proben oder Reagenzien oder fehlerhaften Cyclern usw. können eine PCR-Reaktion wesentlich beeinträchtigen. Diese Störungen können bei der Lithiumchlorid-Pipettierung keinen Einfluß nehmen und verfälschen die Ergebnisse nicht.

Material und Methoden

Um die Kontamination beim Dosieren in PCR-Platten auf der epMotion 5070 oder 5075 zu überprüfen setzt man die nachfolgend beschriebene Methode ein:

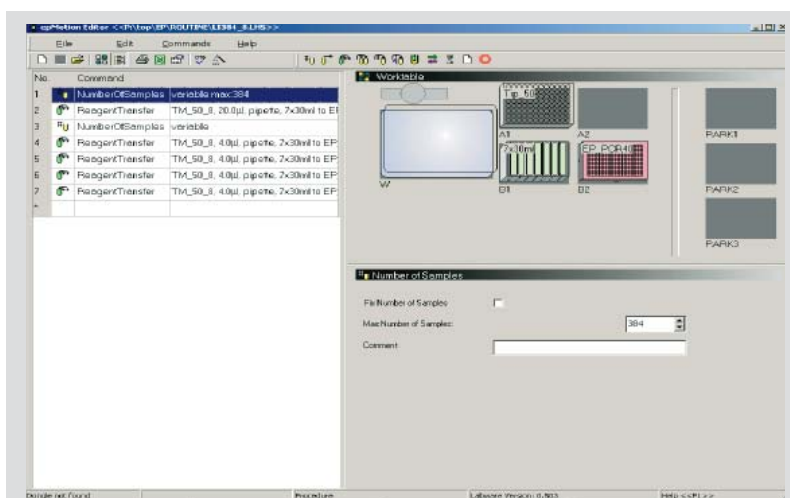


Bild 1: Worktable setup (Screenshot vom epMotion Editor); Pos. A1 50 µl tips; Pos. B1 7x30 ml Reservoirs im Tub Holder; Pos. B2 384 well Eppendorf twin.tec PCR Platte; W = Abfallbehälter

Soll eine Überprüfung der möglichen Kontamination für glyzerinhaltige Lösungen erfolgen, so wählt man die fast gesättigte LiCl-Lösung mit 375 g LiCl/l als Stammlösung. Dies entspricht einem Lithiumgehalt von 61 mg/ml (oder 61.000.000 ng Li/ml = 61 ng Li/nl). Die fast gesättigte LiCl-Lösung (mit einer Dichte von ca. 1,2 g/ml) ist in ihrem Dosierverhalten einer 40 – 60%igen Glyzerinlösung ähnlich. Soll die Überprüfung eher für die Dosierung eines wässrigen Mediums gelten, so wird obige Stammlösung 1 + 9 verdünnt (1:10) eingesetzt. Dies entspricht 6.100.000 ng Li/ml (= 6,1 ng Li/nl). Als Verdünnungsreagenz wird demineralisiertes Wasser eingesetzt.

Um die Kontamination an der epMotion 5070 und 5075 zu testen wird mit einer 384 PCR Platte und dem Dosierwerkzeug TS 50-1 oder TM 50-8 und den dazugehörigen ep T.I.P.S. 50 µl gearbeitet. Es wird mit den beiden Methoden Li384_1 bzw. Li384_8 gearbeitet. Beide Methoden sind im Ordner des ep-Knotens: "Routine" als vorprogrammierte Methoden zu finden.

Jedes Well wird mit 30 µl demineralisiertem Wasser und anschließend nach dem Schachbrettmuster jedes 2. Well mit 4 µl Wasser oder mit 4 µl Lithiumlösung befüllt.

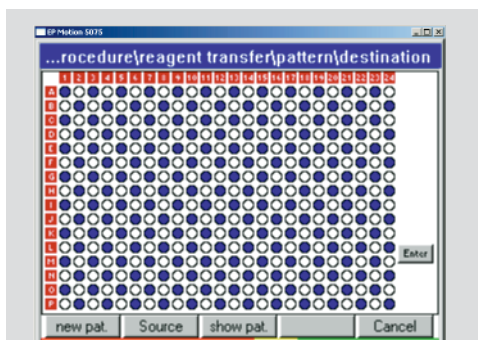


Bild 2: Schachbrettartig befüllte 384 well Eppendorf twin.tec PCR Platte

Da das zu überprüfende Well mit 30 µl demineralisiertem Wasser befüllt ist, und da zur Messung am ELEX mindestens 1 ml zur Verfügung stehen müssen, ergibt sich für den Kontaminationstropfen ein Messvolumen von 1030 µl. Gelangt nun ein Tropfen von 0,1 nl (= 6,1 ng Li) obiger Stammlösung in das mit 30 µl befüllte Well und somit in die 1030 µl zur Messung, so würde dies bei der flammenphotometrischen Messung ein stabiles Signal von ca. 6 ng Li/ml bedeuten. Bei der 1 + 9 verdünnten Stammlösung würde eine Kontamination des Wells mit ca. 0,2 nl (= 1,2 ng Li) zu einem Signal knapp über der Nachweisgrenze führen.

Messparameter am ELEX 6361:

Für die Li-Bestimmung wurde am Eppendorf Flammenphotometer ELEX der Nullpunkt mit demineralisiertem Wasser bestimmt. Als Standards wurden Lösungen mit 100, 250, 500 ng Li/ml verwendet. Die Signalverstärkung (Standard High) erfolgte mit der 500 ng Li/ml Lösung. Brenngas war Acetylen. Es wurde das serienmäßige Li-Filter 671 nm benutzt. Als Kontrollen kamen Lösungen mit 0, 2, 5, 10 ng Li/ml zum Einsatz. Zur Durchführung der Li-Bestimmung wurde das Eppendorf Flammenphotometer ELEX 6361 benutzt. Alternativ kann die Li-Bestimmung auch mit einem AAS- oder ICP-Gerätesystem mit entsprechender Empfindlichkeit erfolgen.

Flammenphotometer für die Li-Bestimmung in der klinischen Chemie sind auf Grund ihrer speziellen Messbereichsauslegung für das „Lithium drug monitoring“ für diese Kontaminationsprüfung nicht geeignet.

Ergebnisse

Bei der flammenphotometrischen Überprüfung wurden bei der Dosierung der Stammlösung vereinzelt Signale bis 2 ng Li/ml (2 ppb) erhalten. Dies entspricht einer Kontami-

nation ca. 30 pl für das betroffene Well. Vereinzelt heißt hier, dass bei der Überprüfung von 384 Wells bei 2 Wells ein Signal erhalten wurde. Dies entspricht 0,52 % aller Wells. Satellitentropfen dieser Größe stören offensichtlich keine PCR-Reaktion. Denn parallel wurde mit den gleichen Dosierparametern auch eine PCR-Reaktion getestet. Bei der Auswertung der Gelelektrophorese konnte kein Signal bzw. keine Kontamination festgestellt werden.

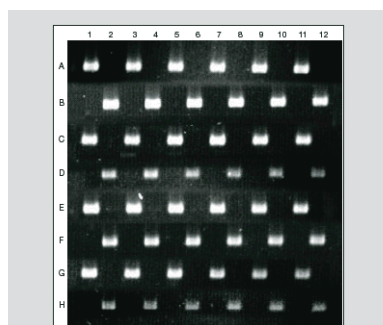


Bild 3: Darstellung der Amplifikation des humanen β -Globin-Gens über ein Viertel einer 384-Well PCR-Platte²⁾

Die sensitivste Art, eine Kontamination festzustellen ist sicher die beschriebene Lithium-Messung.

Literatur

- 1) H. Specker und H. Kaiser „Zeitschrift für Analytische Chemie“ Jg./Bd. 149; 1956
- 2) Frank Apostel, Eppendorf BioNews 20

Bestellinformationen für die epMotion und Zubehör finden Sie unter www.epmotion.com.

eppendorf
In touch with life