

Applications

Note 129 | April 2006

Eppendorf MixMate – Nachweis kontrollierten Mischens ohne Deckelbenetzung mit Hilfe eines PCR-basierten Schachbrettmuster-Assays

Caroline Osterhoff¹, Philip Müller² und Lars Borrmann¹

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

Abstract

Der Eppendorf MixMate wurde entwickelt, um kleine Volumina von 5 µl–2 ml in Mikrotestplatten oder kleinen Reaktionsgefäßen schnell und kontrolliert zu mischen. Die Ergebnisse des hier zum Nachweis des kontrollierten Mischens durchgeführten Schachbrettmuster-Assays belegen, dass es auch bei hohen Mischgeschwindigkeiten und langer Mischdauer zu keiner Kreuzkontamination zwischen den Wells einer PCR-Platte kommt, selbst wenn diese offen, d.h. ohne Versiegelung der Wells, mit dem MixMate gemischt wird. Damit verbessert die innovative ^{2D}Mix-Control Technologie des MixMate die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen und spart Zeit für nicht mehr erforderliches Herunterzentrifugieren von verspritzter Flüssigkeit im Anschluss an das Mischen.

Einleitung

Die rasant fortschreitende technologische Entwicklung hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass im Labor mit immer kleineren Volumina gearbeitet werden kann. Wo gestern noch 0,5 ml PCR-Gefäße benutzt wurden, sind heute 96-Well oder 384-Well PCR-Platten im Einsatz. Wo vor wenigen Jahren noch 10 ml Gefäße für Bakterienkulturen verwendet wurden, sind heute Deepwell-Platten gang und gäbe. Diese neuen Formate mit ihren geometrischen Besonderheiten und die immer kleiner werdenden Reaktionsvolumina stellen allerdings ganz spezielle Anforderungen an effizientes Durchmischen, denen die herkömmlichen Mischer nicht vollständig gerecht werden (1). Neueste Experimente haben gezeigt, dass zum effizienten Mischen kleiner Volumina und in kleinen Gefäßen nicht ausschließlich die Mischgeschwindigkeit entscheidend ist. Vielmehr verlangt der perfekte Mischvorgang ein optimiertes Zusammenspiel von Parametern wie Geschwindigkeit, Art der Mischbewegung (z.B. kreisförmig), Mischradius und Laufruhe. Diese neuesten Erkenntnisse zum Mischen kleiner Volumina sind bei der Entwicklung des Eppendorf MixMate berücksichtigt worden. Unter dem Begriff „^{2D}Mix-Control“ (Abb. 1) werden dabei alle Eigenschaften des MixMate zusammengefasst, die zum schnellen und kontrollierten Durchmischen auch kleinster Volumina beitragen. Die optimierten Eigenschaften des MixMate wirken sich dabei auf die folgenden 3 Kategorien aus:

1) Erzeugung von ausreichend Mischenergie: Durch die kreisförmige Mischbewegung des MixMate mit hoher Mischgeschwindigkeit (max. 3000 rpm) und einem relativ großen Mischradius (1,5 mm) wird, analog zur g-Zahl

bei Zentrifugen, ausreichend Mischenergie erzeugt, um selbst kleinste Volumina effizient zu durchmischen.

- 2) Minimierung des Verlustes von Mischenergie: Bei der Entwicklung des MixMate wurde speziell auf die Reduzierung der Eigenvibration geachtet. Die maximale Laufruhe des MixMate in Verbindung mit dessen sicherer Standfestigkeit gewährleisten, dass sämtliche Mischenergie für das Mischen zur Verfügung steht und nicht durch Übertragung von Vibrationen an Gerät oder Umgebung verloren geht.
- 3) Kontrollierte Energieübertragung vom Gerät auf die Probe: Durch die Minimierung von Vertikalbewegungen wird eine planare, 2-dimensionale (2D) Mischbewegung ermöglicht. Dies, in Verbindung mit der sicheren Platten-/Gefäßaufnahme, verhindert unkontrollierte, chaotische Bewegungen der Probenflüssigkeit und ermöglicht den sicheren Halt aller Formate auch bei hohen Mischfrequenzen.



Abb. 1: Symbol für die ^{2D}Mix-Control Technologie

Dabei ermöglichen insbesondere das planare Mischen ohne Vertikalbewegung, die extreme Laufruhe und die hohe Standfestigkeit des MixMate, die Bewegung der Flüssigkeit innerhalb der Gefäße zu kontrollieren. Diese kontrollierte Mischbewegung (Anti-Spill-Technologie) verhindert bei Standard-Laboranwendungen Deckelbenetzung oder Überschwappen von Flüssigkeit, wodurch sich zeitraubende Zentrifugationsschritte nach dem Mischen erübrigen und Kreuzkontaminationen zwischen einzelnen Wells verhindert werden.

Die im Rahmen dieser Application Note durchgeführten Versuche dienen dem experimentellen Nachweis des kontrollierten Mischens. Um zu untersuchen, ob es durch das Mischen mit dem MixMate zu Kreuzkontaminationen zwischen den verschiedenen Wells einer Platte kommt, wurde ein sogenannter Schachbrettmuster-Assay (2) durchgeführt. Dazu wurden zu 50 µl PCR-Ansätzen in einer 96-Well PCR-Platte abwechselnd Template-DNA oder H₂O als Negativkontrolle hinzugegeben und die PCR-Platte anschließend ohne Versiegelung der Wells für 10 min mit dem MixMate bei der empfohlenen Mischgeschwindigkeit von 1650 rpm (entsprechend der vorprogrammierten Direktwahltaaste des MixMate für 96-Well PCR-Platten: *PCR96/0.5*) gemischt. Im Anschluss an die danach durchgeführte PCR erfolgte der Nachweis der PCR-Produkte im Agarosegel, um mögliche Kreuzkontaminationen zu detektieren.

Material und Methoden

PCR-Setup „Schachbrettmuster-Assay“ 50 µl hot start PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation eines 535 bp Fragmentes des humanen β -Globin-Gens (HBB), bestehend aus Eppendorf HotMasterMix sowie jeweils 0,2 µM Primer (sense: GGTGGCCAATCTACTCCCAGG; antisense: GCTCACTCA GTGTGGCAAAG), wurden in Eppendorf twin.tec PCR-Platten 96 pipettiert. Zum Nachweis möglicher Kreuzkontaminationen wurde in die Wells, wie in Abbildung 2 dargestellt, alternierend entweder genomische DNA (Endkonzentration 1ng/µl, Roche, Penzberg, Deutschland) oder H₂O als Negativkontrolle pipettiert.

Mischen der PCR-Ansätze Zum Nachweis, dass der MixMate die Proben kontrolliert und ohne Deckelbenetzung mischen kann, wurde der fertig pipettierte Schachbrettmuster-Assay **ohne** Versiegelung (d.h. mit offenen Wells) für 10 min bei 1650 rpm (Direktwahltaaste *PCR 96/0.5*) gemischt. Erst anschließend wurden die Platten für die Amplifikation mit einem selbstklebenden PCR-Film (Eppendorf) abgedichtet.

PCR-Amplifikation und Nachweis Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) nach folgendem Temperaturprofil: Initiale Denaturierung für 2 min bei 94 °C, 30 Zyklen à 30 sec 94 °C, 30 sec 60 °C und 30 sec 65 °C. Nach Zugabe von

6 µl 10x DNA Gel Loading Buffer (Eppendorf) je Well wurden die Ansätze für 5 sec im MixMate bei 1650 rpm vollständig durchmischt. Ein Zehntel Volumen der Versuchsansätze wurde anschließend in einem 0,9% Agarosegel mittels Ethidiumbromidfärbung und DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter, BioCat, Heidelberg, Deutschland) qualitativ analysiert.

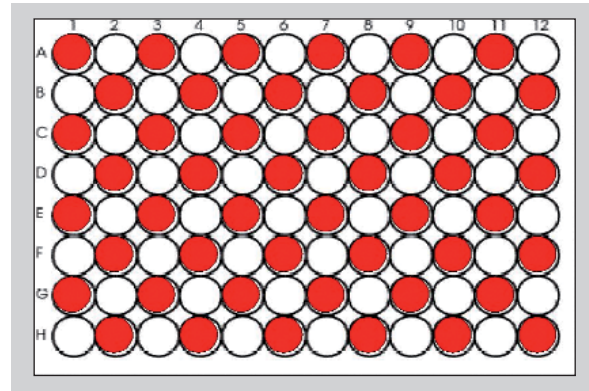


Abb. 2: Pipettierschema des Schachbrettmuster-Assays: In die Wells einer 96-Well PCR-Platte wurden abwechselnd Template DNA (rot) oder Wasser für die Negativkontrollen (weiss) zugegeben.

Ergebnisse

Zum Nachweis der Anti-Spill-Technologie des Eppendorf MixMate wurden vor der Amplifikation schachbrettmusterartig pipettierten PCR-Ansätze mit und ohne Template-DNA in einer 96-Well PCR-Platte gemischt, ohne die Wells vorher zu verschließen. Obwohl der MixMate für das vollständige Durchmischen von PCR-Ansätzen lediglich wenige Sekunden benötigt, wurden zur Demonstration des kontrollierten Mischens die Platten ohne Versiegelung für 10 min bei 1650 rpm gemischt.

Wie in Abbildung 3 deutlich zu erkennen, kommt es durch das Mischen ohne Verschluss der Platte, trotz des relativ großen PCR Volumens von 50 µl, zu keiner Kreuzkontamination, bzw. zu keinem falsch-positiven PCR-Signal bei den Negativkontrollen (Ansätze ohne Template DNA). Im Vorfeld durchgeführte Versuche zur Sensitivität des verwendeten PCR-Systems zeigten, dass eine Kreuzkontamination mit weniger als 0,5 µl ausreicht, um zu einer deutlich sichtbaren PCR Bande zu führen (Daten nicht abgebildet).

Um das kontrollierte Mischen weiter zu verdeutlichen, wurde die Mischbewegung im Zeitraffer fotografiert (Abb. 4). Wie diese Zeitrafferaufnahmen zeigen, kommt es zu einer kreisförmigen Mischbewegung, ohne unkontrollierte, chaotische Bewegungen.

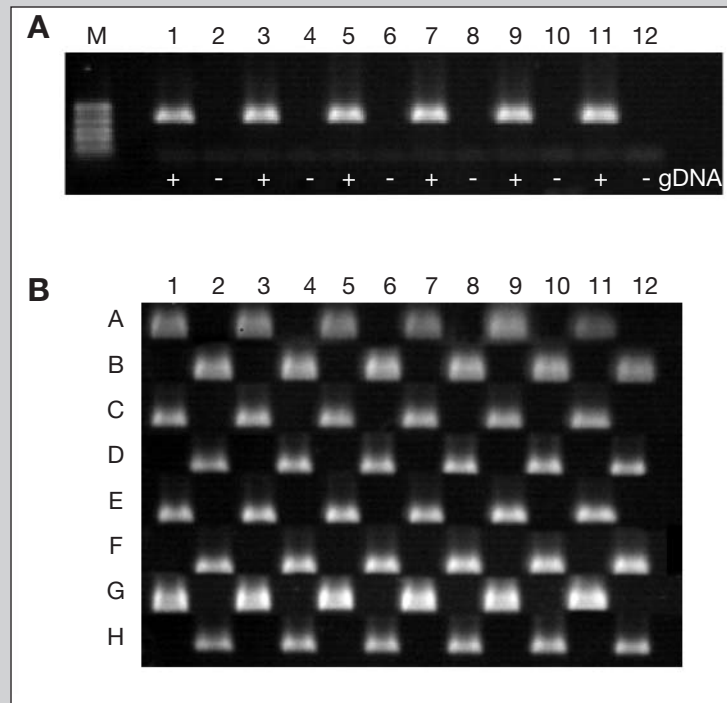


Abb. 3: Amplifikation von 535 bp Fragmenten des humanen β -Globin-Gens (HBB). 50 μ l PCR-Ansätze wurden in einer 96-Well PCR-Platte, wie in Abbildung 1 dargestellt, alternierend mit (+) und ohne (-) Template DNA pipettiert und anschließend ohne Versiegelung für 10 min bei 1650 rpm mit dem MixMate gemischt. Für die eigentliche Amplifikation wurden die Platten danach mit einer Klebefolie verschlossen. Trotz des offenen Mischens mit dem MixMate ist in keiner der Negativkontrollen eine Kreuzkontamination zu beobachten.

- A:** Darstellung der 12 gelelektrophoretisch aufgetrennten Reaktionsprodukte der Reihe C der 96-Well PCR-Platte.
B: Darstellung aller 96 Reaktionsprodukte. Zur besseren Darstellung wurden die PCR-Signale der einzelnen Gelbilder ausgeschnitten und entsprechend des Platten-Layouts zusammengefügt.

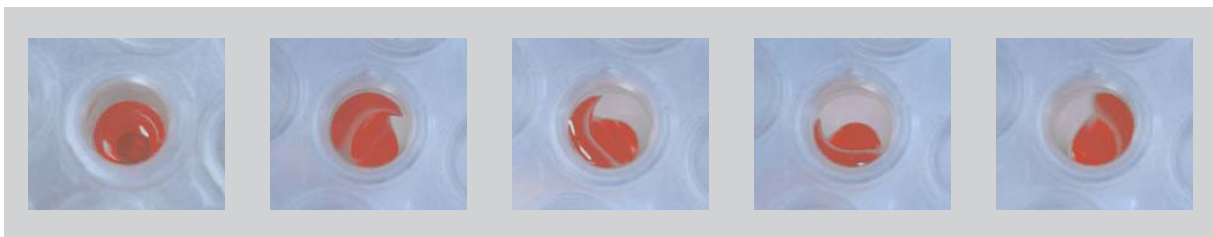


Abb. 4: Zeitrafferaufnahmen der kontrollierten Mischbewegung des Eppendorf MixMate. Dargestellt ist ein mit 75 μ l Wasser (mit Farbstoff Ponceau 4R) befülltes Well einer Eppendorf twin.tec PCR Plate 96, skirted ohne Mischen (linkes Bild) und bei 1650 rpm Mischgeschwindigkeit (4 Zeitrafferaufnahmen). Die ^{2D}Mix-Control-Technologie bewirkt kontrolliertes Mischen ohne chaotische Bewegungen, bei der sich die Flüssigkeit streng auf einer orbitalen Kreisbahn bewegt.

Diskussion

Die in dieser Application Note präsentierten Daten zeigen, dass der MixMate in der Lage ist, die Mischbewegung von Flüssigkeiten zu kontrollieren, so dass unkontrolliertes Verspritzen und die Kontamination von angrenzenden Wells verhindert wird. Das hat den Vorteil gegenüber herkömmlichen Mischern, dass Proben nach dem Mischen nicht mehr herunterzentrifugiert werden müssen und dadurch Arbeitsschritte und somit Zeit gespart werden. Auch bei PCR-Anwendungen, bei denen sehr häufig die PCR-Ansätze durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt werden, kann durch die Benutzung des MixMate Zeit gespart, der zusätzliche Verbrauch von Pipettenspitzen reduziert und das Kontaminationsrisiko durch Aerosolbildung beim Pipettieren vermieden werden. Die innovative ^{2D}Mix-Control Technologie ermöglicht damit reproduzierbare Ergebnisse, wie es z. B. beim PCR-Setup, dem Resuspendieren von Pellets, beim Reportergergen-Assay, Luciferase-Assay und ELISA-Assay,

sowie bei kolorimetrischer Proteinquantifizierung notwendig ist.

Obwohl es mit dem MixMate möglich ist, die Mischbewegung zu kontrollieren, ist das Risiko einer möglichen Deckelbenetzung jedoch grundsätzlich auch abhängig von Faktoren wie beispielsweise Gefäßeometrie, Mischgeschwindigkeit, Füllvolumen und dem verwendeten Probenmaterial. Um bei dieser Vielzahl von Variablen das Einstellen der optimalen Mischparameter zu erleichtern, verfügt der MixMate über fünf Direktwahltasten, deren vorprogrammierte Parameter bei den Standardanwendungen in verschiedenen Platten- und Gefäßformaten das schnelle und kontrollierte Mischen garantieren.

Alles in allem bietet der Eppendorf MixMate auf Grund der Möglichkeit des kontrollierten und sekundenschnellen Durchmischens auch anspruchsvoller Probenmaterialien bis hin zu 96- und 384-Well Platten höchste Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen und spart Zeit für nicht mehr benötigte Zentrifugationsschritte.

Literatur

1. Osterhoff C, Mueller P, Borrmann L. Comparison of mixing performance in 96- and 384-well plates of Eppendorf MixMate and competitor devices. Eppendorf Application Note 130, 2006.
2. Apostel F. Automated PCR setup in the 384-well format without cross-contamination with the Liquid Handling Workstation epMotion 5070. *Eppendorf BioNews* 2003; 20:9-10.

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestellnummer
MixMate inkl. 3 Gefäßhalter: PCR 96, 0.5 ml, 1.5/2.0 ml, 230 V, 50–60 Hz	5353 000.014
twin.tec PCR Plate 96, skirted (Wells farblos), 25 Stück, Farblos	0030 128.648
twin.tec PCR Plate 96, semi-skirted (Wells farblos), 25 Stück, Farblos	0030 128.575
PCR Film (selbstklebend), 100 Stück	0030 127.480

eppendorf
In touch with life