

# Applications

Note 180 | Oktober 2010

## Technical Report

### Eppendorf LoBind®: Bewertung der Proteinrückgewinnung in Eppendorf Protein LoBind Tubes und Plates

Natascha Weiß<sup>1</sup>, Wolf Wente<sup>2</sup> und Philip Müller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; <sup>2</sup>Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Deutschland

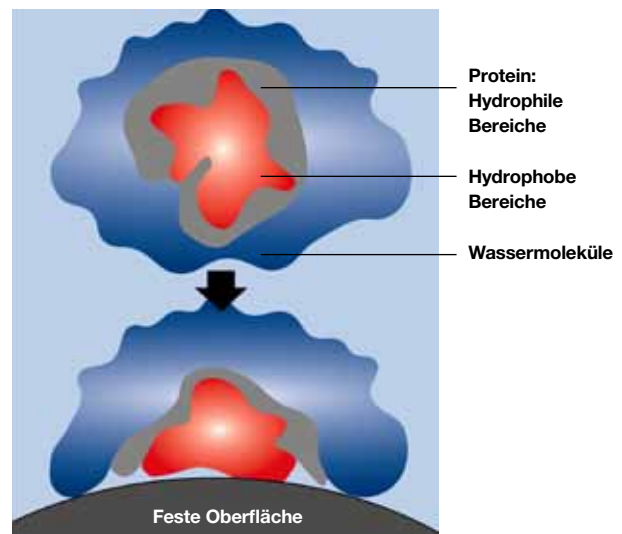
#### Zusammenfassung

Eppendorf LoBind Einmalartikel wurden speziell dafür entwickelt, Probenverluste durch Adsorption an die Gefäßwände zu minimieren. In den hier beschriebenen Experimenten wird nachgewiesen, dass durch Einsatz von Protein LoBind Produkten bis zu 80 % mehr Probe zurückgewonnen wird als nach Verwendung von Gefäßen aus Standardmaterial. Zusätzlich wurde die Rückgewinnungsrate von Eppendorf LoBind Gefäßen mit „low binding“ Gefäßen anderer Hersteller verglichen. Eppendorf LoBind Gefäße zeigten selbst nach 96 h Inkubation noch eine Rückgewinnung von 90 % im hier angewendeten Test. Es wird gezeigt, dass in nachfolgenden Analysen wie z. B. MALDI-TOF bessere Ergebnisse erzielt werden. Die Eppendorf Protein LoBind Tubes und Deepwell Plates sind somit hervorragend für Anwendungen mit Proteinen, Peptiden und Viren geeignet, insbesondere, wenn mit geringen Probenmengen gearbeitet wird.

#### Einleitung

Die Aufbereitung und Lagerung von Probenmaterial (z. B. Zellen und Gewebe sowie DNA, RNA und Proteine) stellen häufig die Grundlage für erfolgreiche Experimente dar. Neben der Reinheit der Probe ist dabei auch die Wiedergewinnung nach der Verarbeitung wichtig. Wenn biologische Proben schwer zu isolieren oder aufwändig bzw. teuer in der Herstellung sind, wird häufig mit sehr geringen Mengen bzw. Konzentrationen gearbeitet. Gerade in diesen Fällen sind Verluste kritisch, denn sie können dazu führen, dass Analysen keine oder keine eindeutigen Ergebnisse zeigen. Auch der Kostenfaktor darf, z. B. bei Einsatz teurer Reagenzien, nicht unterschätzt werden. Für diese Anwendungen ist es vorteilhaft, Produkte zu verwenden, deren Oberflächen so optimiert sind, dass biologische Proben nur mit geringer Affinität binden.

Eine besondere Herausforderung stellt in diesem Zusammenhang das Arbeiten mit Proteinen dar. Proteine weisen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche auf, wobei die letzteren bei globulären Proteinen in wässriger Lösung für gewöhnlich im Inneren der Proteinstruktur angeordnet sind.



**Abbildung 1:** Darstellung eines globulären Proteins in wässriger Lösung, dessen hydrophobe Ketten unter Veränderung der Proteinstruktur an eine feste Oberfläche binden.

## Einleitung

Bei Kontakt mit festen Oberflächen kann sich die dreidimensionale Struktur der Proteine so verändern, dass die hydrophoben Regionen nach außen treten und mit den hydrophoben Bereichen der Oberfläche in Kontakt treten [1, 2] (siehe Abb. 1). Als Resultat denaturieren die Proteine an der Oberfläche, wodurch wertvolles Probenmaterial verloren geht oder, wenn es sich um Enzymlösungen handelt, deren Aktivität reduziert wird. Die Auswirkungen auf die Probenmenge sind umso größer, je geringer die eingesetzte Proteinkonzentration ist.

Neben speziellen Ansätzen im medizinisch/pharmazeutischen Bereich, bei denen die Bindung von Proteinen an Oberflächen wie Polypropylen eine Rolle spielt [3, 4, 5], werden folgende Methoden bei der Arbeit mit Proteinen und Peptiden im Labor eingesetzt, um die Adsorption von Probenmaterial zu reduzieren:

- 1) Die Verwendung von beschichteten (z. B. silikonisierten) Gefäßen. Es besteht hier jedoch das Risiko, dass sich Bestandteile der Beschichtung lösen und mit der Probe interferieren sowie Folgeanwendungen beeinflussen.
- 2) Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe von BSA, welches vorrangig an die Gefäßoberfläche bindet und somit die Proteinprobe schützt. Die dabei verwendeten

hohen Konzentrationen an BSA beeinträchtigen allerdings unter anderem die Präzision der Pipettierungen und können ebenfalls Folgeanwendungen behindern.

Eppendorf verfolgt daher den Ansatz, Verbrauchsmaterialien mit proteinabweisenden Oberflächeneigenschaften herzustellen, ohne dass diese eine kontaminierende Beschichtung aufweisen. Die Reaktionsgefäße und Deepwell-Platten in Eppendorf Protein LoBind Qualität bestehen aus hochwertigem Polypropylen und werden in einem speziellen Verfahren produziert. Dadurch wird die Bindung von Protein an die Gefäßwand minimiert, so dass nahezu die gesamte Probe für die Analyse zur Verfügung steht.

In den folgenden Experimenten werden die Eppendorf Deepwell Plates in Protein LoBind Qualität mit Deepwell-Platten anderer Hersteller bezüglich der Wiederfindungsrate von Proteinen verglichen. Desweiteren wird die Wiederengewinnung von Proteinen aus Eppendorf LoBind Tubes und „low binding“ Gefäßen anderer Hersteller untersucht. Ein weiterer Versuch verdeutlicht anhand einer massenspektrometrischen Folgeanwendung, wie sich unterschiedliche Rückgewinnungsraten von Proteinen auswirken können.

## Material und Methoden

### Bestimmung der Wiederfindungsrate von Protein über Fluoreszenzmessung

Die Bindung von Proteinen an Polypropylen wurde mittels Fluorescein-markiertem BSA getestet. Für den Test mit Platten wurden die Eppendorf Deepwell Plates 96/1000 µL und 384/200 µL eingesetzt sowie Wettbewerbsprodukte des entsprechenden Formats. Jeweils vier Wells der Platten wurden mit Proteinlösung (Fluorescein-BSA, 1 µg/mL) befüllt und für 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Gefäßtests wurden jeweils drei 1,5 mL Eppendorf LoBind Tubes sowie 4 bzw. 5 Wettbewerbsprodukte des Formats 1,5 oder 1,7 mL verwendet und einmal für 24 h und in einem zweiten Ansatz für 96 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation

wurden Proben aus jeweils zwei Wells einer Platte bzw. aus allen Gefäßen entnommen und in eine schwarze 96-Well Flachboden-Platte überführt. Gemessen wurden die Proben aus den Platten im Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek) und die Proben aus den Tubes im Safire<sup>2</sup> (Tecan).

### MALDI-TOF Analyse von Peptiden

1,3 µg/mL (10 pmol) und 130 ng/mL (1 pmol) des Peptids Angiotensin I wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und für eine Woche zum einen in Protein LoBind Gefäßen und zum anderen in Standard Gefäßen im Kühlschrank gelagert. Danach wurden MALDI-TOF Spektren von jeweils 1 µL Probe aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Die ersten beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Protein-Inkubationsversuche in Deepwell-Platten. Es ist zu erkennen, dass in den Eppendorf Deepwell Plates Protein LoBind (Abb. 2 und 3) wesentlich weniger Protein an die Gefäßwände adsorbiert als in Platten anderer Hersteller aus Standardmaterial. Beispielsweise beträgt der Probenverlust nach 24 h Lagerung in den Eppendorf Deepwell Plates 96/1000 µL weniger als 5 %, während er in der Wettbewerbsplatte bei mehr als 85 % liegt.

Nach dem ersten Inkubationsexperiment für 24 h in Gefäßen liegt die Wiedergewinnung von Proteinen aus Eppendorf Protein LoBind Tubes bei knapp 90 % während sich in den Gefäßen anderer Hersteller zwischen 13 % und 52 % BSA nachweisen lassen. In einem zweiten Test mit einer Inkubationszeit bis zu 96 h (Abb. 4) sollte überprüft werden, ob die verfügbare Proteinmenge nach 24 h weiter abnimmt.

Protein Rückgewinnung – Deepwell-Platten 96-Well 1000 µL

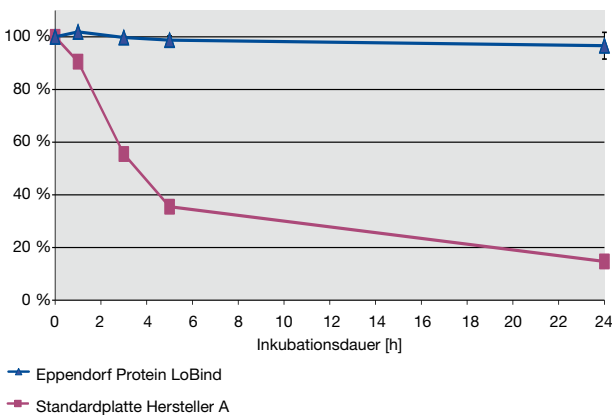


Abbildung 2: Rückgewinnungsrate von Proteinen nach Inkubation in 96-Well Deepwell-Platten mit 1000 µL Füllvolumen.

Protein Rückgewinnung – Deepwell-Platten 384-Well 200 µL

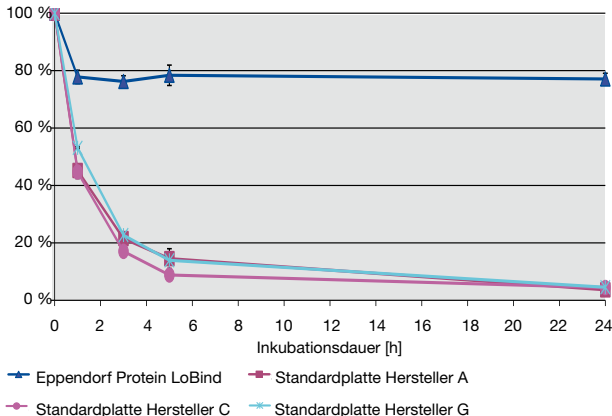


Abbildung 3: Rückgewinnungsrate von Proteinen nach Inkubation in 384-Well Deepwell-Platten mit 200 µL Füllvolumen.

Abbildung 5 zeigt, dass die Rückgewinnung aus Protein LoBind Tubes in dem Zeitraum zwischen 24 h bis 96 h relativ stabil bleibt und sich auf einem Level von über 96 % bewegt. Mögliche Bindungsstellen scheinen zu diesem Zeitpunkt schon abgesättigt zu sein. Bei den Wettbewerbergefäßen S1 und C liegt die Wiedergewinnungsrate in diesem Zeitraum um 60 %. Bei den weiteren drei getesteten „low binding“ Gefäßtypen ist der nachweisbare Proteinanteil nach 96 h auf 23 % bei Hersteller S2, 28 % bei Hersteller A und 19 % bei Hersteller F gesunken. Hier ist eine Abwärtstendenz erkennbar, die darauf hinweist, dass sich die Rückgewinnungsrate nach 96 h noch weiter reduzieren könnte. Der große Anteil an Protein, der durch die Bindung an die Gefäßoberfläche verloren geht, steht für die eigentlichen Experimente nicht mehr zur Verfügung. Durch die optimierte Oberfläche der LoBind Platten wird hingegen eine hohe Rückgewinnung der Proben erzielt, die so anschließend für Analysen eingesetzt werden können.

Protein Rückgewinnung – Tubes – 24 h

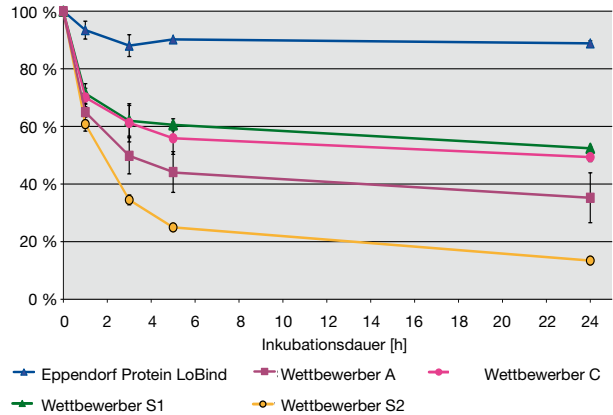


Abbildung 4: Rückgewinnungsrate von Proteinen nach Inkubation für 24 h in „low binding“ Gefäßen.

Protein Rückgewinnung – Tubes – 96 h

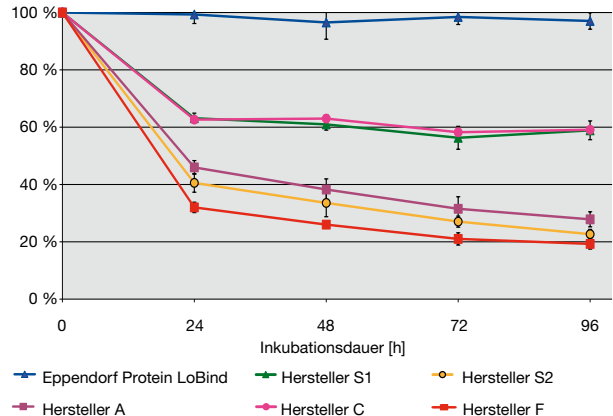
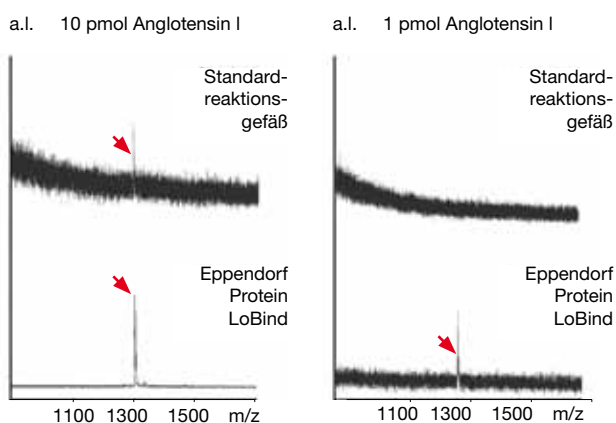


Abbildung 5: Rückgewinnungsrate von Proteinen nach Inkubation für 96 h in „low binding“ Gefäßen.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Auswirkungen von Probenverlusten auf die Analyse von Proteinen und Peptiden werden für verschiedene massenspektrometrische Nachweismethoden dargestellt, für die während der Probenvorbereitung bzw. Lagerung Eppendorf Standardgefäße und Protein LoBind Gefäße im Vergleich eingesetzt wurden [6]. In Abb. 6 ist ein Beispiel aufgeführt. Bei Einsatz eines Eppendorf Protein LoBind Tubes weist



**Abbildung 6:** MALDI-TOF Massenspektrum nach der Lagerung von zwei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen bei 4 °C. (Quelle: Dr. S. Seeber und Dr. A. Humeny, Institut für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen). Der Pfeil markiert jeweils das Signal.

die MALDI-TOF-Analyse von 10 pmol des Peptids Angiotensin I eine deutlich höhere Signalintensität auf als bei Verwendung von Gefäßen aus Standardmaterial. Wird die eingesetzte Peptidmenge auf 1 pmol reduziert, ist bei Verwendung von Standardgefäßen sogar keine Analyse mehr möglich.

Auch bei Kersten und Halder wurde der Einfluss der Gefäßoberfläche auf die Bindung von Peptiden untersucht. Die MALDI-TOF Analyse eines tryptischen Verdaus verschiedener Proteine ergibt eine höhere Sequenzabdeckung sowie ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis der Proben, die in den Eppendorf LoBind Gefäßen vorbereitet wurden, im Vergleich zu den Präparationen in konventionellen Gefäßen [7].

Die Daten zeigen, dass es sinnvoll ist, oberflächenoptimierte Gefäße einzusetzen, wenn es darum geht, kritische Probenverluste zu vermeiden. Die Eppendorf Protein LoBind Produkte sind besonders gut für diese Anwendungen geeignet. Die vorteilhaften proteinabweisenden Eigenschaften dieser Produkte zeigen sich auch bei der Aufreinigung von Viren, deren Oberfläche mit Proteinen bestückt ist. In einer wissenschaftlichen Veröffentlichung ist ein Test beschrieben, bei dem Viren in neun verschiedenen Gefäßtypen bis zu 120 h inkubiert wurden. Dabei kam es bei acht Gefäßen zu einem zum Teil erheblichen Probenverlust durch Adsorption, während die Viren nahezu vollständig aus den Eppendorf Protein LoBind Gefäßen wiedergewonnen werden konnten [8].

## Fazit

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Beschaffenheit der Gefäßoberfläche einen großen Einfluss auf die Rückgewinnung von Proteinproben hat. Der Einsatz der Eppendorf Protein LoBind Platten und Gefäße führt zu deutlich verbesserten Wiederfindungsraten, insbesondere wenn nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial zur

Verfügung stehen. So können Analysen, die bei Einsatz von herkömmlichen Reaktionsgefäßen keine Ergebnisse erzielen, erfolgreich durchgeführt werden. Darüber hinaus führt die effiziente Nutzung von wertvollem Probenmaterial zur Zeit- und Kostenersparnis im Labor.

## Literatur

- [1] Andrade JD. Principles of protein adsorption. In Andrade JD (eds). Surface and interfacial aspects of biomedical polymers Vol. 2. New York: Plenum Press: 1985; 1–80.
- [2] Norde W, Haynes CA. *ACS Symposium Series* 1995; 602:26–40.
- [3] Johnston TP. *PDA J Pharm Sci Technol* 1996; 50 (4): 238–245.
- [4] Duncan MR, Lee JM, Warchol MP. *Int J Pharm* 1995; 120:179–188.
- [5] Ding YS, Qin C, Rabinow BE. *Med Plastics Biomate Mag* 1996 July: 42.
- [6] Eppendorf Tubes – Allgemeine technische Daten – Applikationshinweise für LoBind Tubes (Bestell-Nr. 0012 566.093-04/0706).
- [7] Kersten M, Halder T. *Bioscience Technology* September 2004.
- [8] Triliski EI, Lenhoff AM. *Journal of Chromatography* 2007; 1142:2–13.

**Bestellinformationen**

<b>Eppendorf Deepwell Plate Protein LoBind</b>			
<b>Bezeichnung</b>	<b>Farbe</b>	<b>Verpackung</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
<b>Deepwell Plate 384/200 µL</b>			
Normalpackung	weiß	40 Platten (5 Beutel à 8)	0030 524.101
Großpackung	weiß	120 Platten (10 Beutel à 12)	0030 528.107
<b>Deepwell Plate 96/500 µL</b>			
Normalpackung	weiß	40 Platten (5 Beutel à 8)	0030 504.100
	gelb	40 Platten (5 Beutel à 8)	0030 504.119
Großpackung	weiß	120 Platten (10 Beutel à 12)	0030 508.106
<b>Deepwell Plate 96/1000 µL</b>			
Normalpackung	weiß	20 Platten (5 Beutel à 4)	0030 504.208
	gelb	20 Platten (5 Beutel à 4)	0030 504.216
Großpackung	weiß	80 Platten (10 Beutel à 8)	0030 508.203
<b>Deepwell Plate 96/2000 µL</b>			
Normalpackung	weiß	20 Platten (5 Beutel à 4)	0030 504.305

<b>Eppendorf Safe-Lock Tubes Protein LoBind</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
<b>Protein LoBind Tubes</b>	
PCR clean, 2 Beutel à 50 = 100 Stück	
0,5 mL	0030 108.094
1,5 mL	0030 108.116
2,5 mL	0030 108.132



Your local distributor: [www.eppendorf.com/worldwide](http://www.eppendorf.com/worldwide)

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland

Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: [vertrieb@eppendorf.de](mailto:vertrieb@eppendorf.de) · [www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de)

Eppendorf Austria GmbH · Ignaz Köck Straße 10 · 1210 Wien · Österreich

Tel: +43 1 89013 64-0 · Fax: +43 1 890 13 64-20 · E-mail: [office@eppendorf.at](mailto:office@eppendorf.at) · [www.eppendorf.at](http://www.eppendorf.at)

Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz

Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: [vaudaux@vaudaux.ch](mailto:vaudaux@vaudaux.ch) · [www.eppendorf.ch](http://www.eppendorf.ch)

**Application Support** Tel: +49 1803 666 789 (Preis je nach Tarif im Ausland; 9 ct/min aus dem dt. Festnetz; Mobilfunkhöchstpreis 42 ct/min)

E-mail: [support@eppendorf.com](mailto:support@eppendorf.com)