

Applications

Note 203 | Dezember 2008

Technical Report

Eppendorf Polypropylen Microplates – Höchste Sensitivität bei Fluoreszenzmessungen in schwarzen Platten

Natascha Weiß¹, Sophie Freitag², Wolf Wente²

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

Zusammenfassung

Schwarze Mikrottestplatten werden vor allem für Fluoreszenzassays verwendet, da sie Hintergrundsignale reduzieren, „Crosstalk“ zwischen den Wells verhindern und damit für die Analyse geringster Stoffmengen geeignet sind. In diesem Technical Report wird die schwarze Eppendorf Microplate 96/V mit Mikrottestplatten verschiedener Hersteller anhand der Quantifizierung von dsDNA in einem PicoGreen® Assay verglichen. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass der in der Eppendorf Microplate durchgeführte Assay die beste Sensitivität und Präzision aufweist. Auch bei geringster DNA-Konzentration werden noch zuverlässige Daten erzeugt. Die Eppendorf Microplates eignen sich daher hervorragend für den Einsatz in Fluoreszenzassays.

Einleitung

Biochemische Assays werden inzwischen standardmäßig im Plattenformat durchgeführt, da eine große Anzahl an Proben gleichzeitig verarbeitet werden kann. Weiterhin werden durch die zunehmende Miniaturisierung die Menge an benötigtem Probenmaterial und der Verbrauch von Reagenzien reduziert. Mikrottestplatten sind in vielen Varianten erhältlich. Sie bestehen aus unterschiedlichen Materialien (z. B. Polystyrol, Polypropylen), weisen unterschiedliche Bodenformen auf (F-Boden, V-Boden, U-Boden) und sind neben transparenten Platten auch in weißer oder schwarzer Pigmentierung verfügbar. Die Wahl der geeigneten Platte hängt von der Art der Reaktion und Detektion (z. B. Fluoreszenz, Lumineszenz, Absorption, Radioaktivität) im Assay ab.

Eppendorf bietet mit den Microplates eine Erweiterung der Eppendorf Plates Produktfamilie. Sie stellen die Ergänzung der Deepwell Plates dar und sind zusätzlich in verschiedenen Bodenformen erhältlich. Zusätzlich werden auch Microplates mit schwarzen und weißen Wells angeboten, die vor allem für Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzmessungen geeignet sind (Abb. 1). Sie bestehen aus Polypropylen, welches gegenüber Polystyrol eine hohe Chemikalien- und Temperaturbeständigkeit aufweist sowie eine deutlich geringere Bindung von Nukleinsäuren und Proteinen zeigt. Die Platten sind durch das sorgfältig ausgesuchte Material und die hochwertige Verarbeitung darauf ausgelegt, dass sie eine geringe Autofluoreszenz aufweisen und damit zur hohen Sensitivität von Assays beitragen.

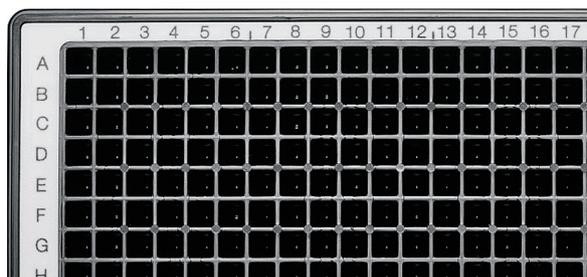
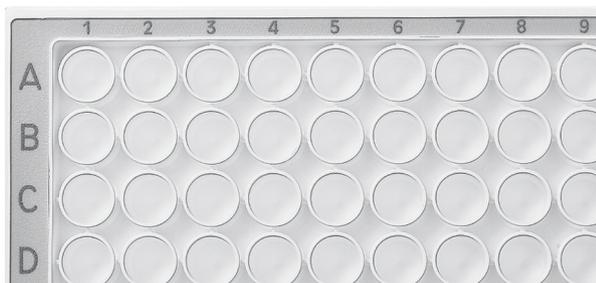


Abbildung 1: Schwarze und weiße Eppendorf Microplate

Die Qualität eines Assays lässt sich mit Hilfe verschiedener statistischer Parameter beurteilen. Diese können auch angewendet werden, um die Qualität von Daten zu bewerten, die mit einem bestimmten Reagenz, einem Gerät oder mit den eingesetzten Mikrottestplatten erzielt werden. In diesem Fall wird der Assay ohne Probenmaterial mit Kontrollstandards durchgeführt. Hier wird ein PicoGreen Assay zur Quantifizierung von dsDNA (doppelsträngiger DNA) in der schwarzen

Eppendorf Microplate 96/V sowie 5 schwarzen Platten anderer Hersteller durchgeführt, von denen drei aus Polypropylen und zwei aus Polystyrol gefertigt sind. Aus den Messungen unterschiedlicher Standard DNA-Konzentrationen werden die Parameter Nachweisgrenze, Signal-Rausch-Verhältnis und Z-Faktor abgeleitet und die Qualität der in den verschiedenen Platten durchgeführten Assays beurteilt.

Statistische Parameter

Signal: Messwert korrigiert durch den Hintergrund.

Hintergrund: Durchschnittswerte der Negativkontrollen.

Signal-Rausch-Verhältnis: Berechnet sich aus dem Verhältnis von Signal und der Standardabweichung der Negativkontrolle. Es ist ein Maß für die relative Sicherheit, mit der ein Signal als wirkliches Signal betrachtet werden kann, d.h. sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet.

Standardabweichung und Variationskoeffizient (%CV): Beschreiben die Präzision des Assays. Die Standardabweichung gibt die Streuung der Werte um den Mittelwert an, während der Variationskoeffizient die Streuung ins Verhältnis zum Mittelwert setzt.

Nachweisgrenze (LOD), Bestimmungsgrenze (LOQ) [1]: Sind ein Maß für die Sensitivität des Assays. Die niedrigste nachweisbare Konzentration ist die LOD (limit of detection), die auf dem Mittelwert der Negativkontrolle plus der dreifachen Standardabweichung der Negativkontrolle basiert. Die LOQ (limit of quantification) ist die geringste quantifizierbare Konzentration auf Basis des Mittelwerts der Negativkontrolle plus der zehnfachen Standardabweichung der Negativkontrolle.

Z-Faktor [2]: Stellt die Qualität eines Assays dar. Für prinzipiell auswertbare Assays nimmt dieser einen dimensionslosen Wert zwischen 0 und 1 an. Werte zwischen 0,5 und 1 bedeuten, dass ein robuster Assay mit zuverlässigen Daten vorliegt, wobei Z=1 für den idealen Assay steht. Bei negativen Werten liegt ein nicht-auswertbarer Assay vor. In die Berechnung des Z-Faktors geht neben dem dynamischen Bereich auch die Streuung aller Messwerte ein.

Material und Methoden

Die in Tabelle 1 aufgeführten schwarzen Mikrottestplatten wurden eingesetzt. Neben Platten aus Polypropylen wurden auch Platten aus Polystyrol getestet, eine davon aus Material, das eine geringe Bindung von Biomolekülen aufweisen soll.

Name	Material	Bodenform
Eppendorf Microplate 96/V	Polypropylen	V-Boden
Wettbewerber N_PP	Polypropylen	V-Boden
Wettbewerber G_PP	Polypropylen	V-Boden
Wettbewerber C_PP	Polypropylen	U-Boden
Wettbewerber G_PS	Polystyrol (gering bindend)	V-Boden
Wettbewerber C_PS	Polystyrol	U-Boden

Tabelle 1: Verwendete Platten

Der Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) wurde verwendet, um verschiedene Konzentrationen von dsDNA zu quantifizieren. Dazu wurden aus einer 100 µg/ml Lösung von dsDNA (DNA liegt dem Kit bei) in mehreren Verdünnungsschritten mit 1 x TE Puffer verschiedene Standardkonzentrationen hergestellt. Je Konzentration wurden 6 Wells mit 100 µl der DNA-Lösung und 100 µl PicoGreen Reagenz (1:200 mit 1 x TE Puffer verdünnt) befüllt. In den Wells lagen danach die folgenden finalen

DNA-Konzentrationen vor: 25 ng/ml, 10 ng/ml, 2,5 ng/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 12,5 pg/ml. Als Negativkontrolle wurden 100 µl TE-Puffer und 100 µl PicoGreen Reagenz pipettiert. Die Platte wurde 3 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Fluoreszenzsignale im Safire²™ (Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 520 nm gemessen. Die Daten wurden anschließend mit einem Tabellenkalkulationsprogramm verarbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

Aus den Messdaten wurden die folgenden statistischen Parameter ermittelt: Variationskoeffizient (%CV), Nachweisgrenze (LOD), Signal-Rausch-Verhältnis, Z-Faktor (Abb. 3-6). Diese wurden zum Vergleich der Assays in den unterschiedlichen Platten herangezogen, um die Qualität der Platten zu beurteilen.

Die Linearität der Methode, die den Zusammenhang zwischen Konzentration und gemessenem Signal zeigt, wurde mittels linearer Regression aus dem Mittelwert der 6 Replikate für die Eppendorf Microplate bestimmt. Sie ist bei einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9998$ über den gesamten Messbereich belegt (Abbildung 2).

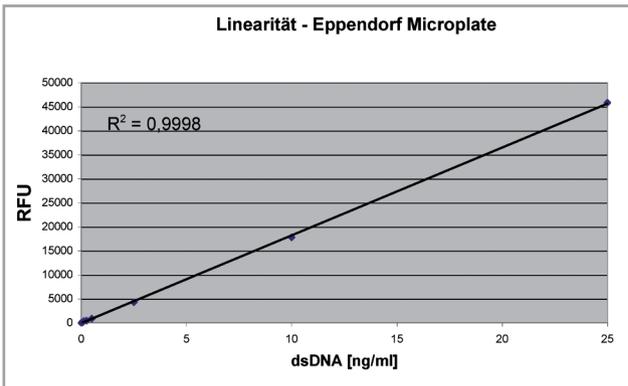


Abbildung 2: Linearität der Ergebnisse für die Eppendorf Microplate 96/V im Messbereich von 12,5 pg/ml bis 25 ng/ml dsDNA

Die Variationskoeffizienten der Mehrfachbestimmungen sagen etwas über die Präzision aus, mit der in der Platte gemessen werden kann. Hierzu wurden für die gemessenen Konzentrationen 12,5 pg/ml bis 25 ng/ml dsDNA sowie der Negativkontrolle die Variationskoeffizienten berechnet und gemittelt. Die Abbildung 3 zeigt, dass die Eppendorf Microplate den niedrigsten Variationskoeffizienten aufweist und damit über den gesamten Messbereich im Vergleich zu den anderen getesteten Platten die beste Präzision zeigt.

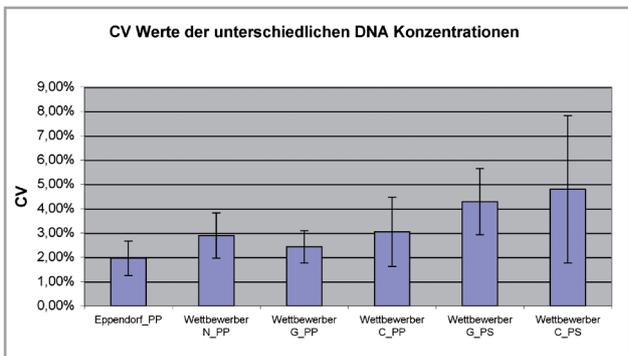


Abbildung 3: Mittelwert der Variationskoeffizienten für den Messbereich 0 ng/ml, 12,5 pg/ml - 25 ng/ml dsDNA inklusive der Standardabweichung bei den verschiedenen Mikrotestplatten.

Die Nachweisgrenze ist ein Kriterium, das die Sensitivität des Assays quantifiziert. Aus Abbildung 4 ist zu erkennen, dass die Grenze der Wettbewerbs-Platten ca. 4 bis 28 mal höher liegt als der Wert von 29 pg/ml dsDNA für die Eppendorf Microplate. Sogar die Bedienungsanleitung des PicoGreen Assays gibt für den Einsatz in Platten und Plattenreadern eine weitaus höhere (250 pg/ml dsDNA) Nachweisgrenze an.

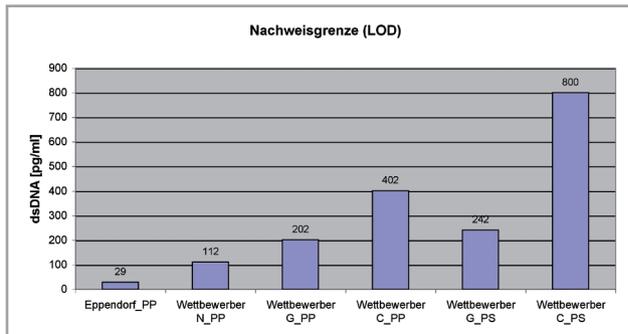


Abbildung 4: Nachweisgrenze für dsDNA in pg/ml für verschiedene Mikrotestplatten

Ein weiterer Indikator für die Qualität eines Assays ist das Signal-Rausch-Verhältnis. Je höher dieses ist, desto besser können die Daten ausgewertet werden. In Abbildung 5 ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml dsDNA dargestellt, da bei allen getesteten Platten diese Konzentration noch oberhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Eppendorf Microplate zeigt hier den höchsten Wert, d.h. das Signal hebt sich am deutlichsten vom Rauschen des Hintergrundes ab. Er liegt im Vergleich zu Wettbewerbsplatten ca. 4 bis 28-mal (bester Wettbewerber / schlechtester Wettbewerber) höher.

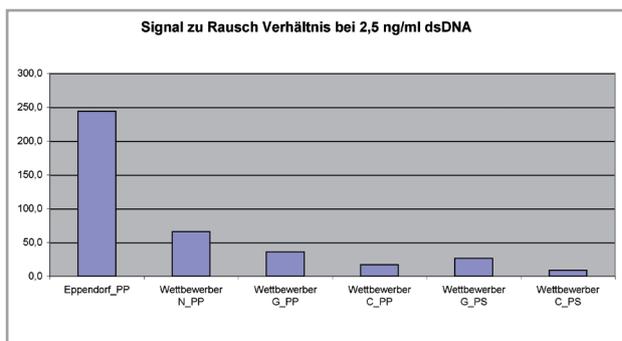


Abbildung 5: Signal-Rausch-Verhältnis bei 2,5 ng/ml dsDNA für verschiedene Mikrotestplatten

Der Z-Faktor wird für gewöhnlich bei der Evaluierung von High-Throughput-Assays eingesetzt, da er eine Aussage über die Leistungsfähigkeit des Testsystems ermöglicht. Hier wird er, wenn auch für eine vergleichsweise geringe Anzahl an Messungen, herangezogen, um die Qualität der Daten gerade im niedrigeren Konzentrationsbereich gut darstellen zu können. In der Abbildung 6 sind die Z-Faktoren für den Konzentrationsbereich bis 5 ng/ml dsDNA dargestellt, wobei nur die positiven Werte gezeigt werden, da ein Messbereich, der einen negativen Z-Faktor aufweist, nicht mehr auswertbar ist. Zusätzlich ist noch eine Hilfslinie bei einem Z-Faktor von 0,5 eingezeichnet, da Werte, die darüber liegen, einen robusten Assay kennzeichnen [2]. Dieser Parameter bestätigt, dass bei Einsatz der Eppendorf Microplate auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen noch zuverlässige Ergebnisse erzielt werden, während für die Vergleichsplatten eine deutlich höhere DNA-Konzentration erforderlich ist, um eine gleiche Qualität der Daten zu erzielen. Besonders deutlich wird hier der Unterschied zwischen Platten aus Polypropylen gegenüber Platten, die aus Polystyrol gefertigt sind.

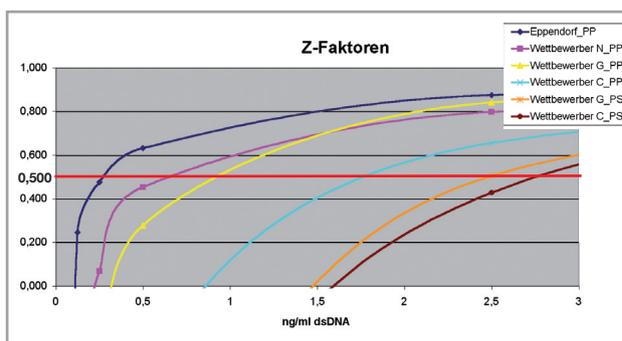


Abbildung 6: Z-Faktoren für Eppendorf Microplate sowie fünf Platten anderer Hersteller. Die rote Linie kennzeichnet den Z-Faktor von 0,5, der den Grenzbereich für robuste Assays darstellt.

Fazit

Die Ergebnisse belegen, dass die schwarze Eppendorf Microplate 96/V bei Verwendung des PicoGreen Assays im Vergleich zu Platten anderer Hersteller die beste Leistungsfähigkeit aufweist. Die Daten sind über den gesamten Messbereich sehr homogen und die Sensitivität erreicht einen weitaus besseren Wert als der, der vom Hersteller des Kits angegeben wird. Insbesondere Platten aus Polystyrol weisen dagegen deutlich schlechtere Ergebnisse auf, was möglicherweise auf die höhere Bindungsaffinität von DNA-Molekülen an dieses Material

zurückgeführt werden kann. Eine der beiden Polystyrol-Platten, die laut Herstellerangaben eine geringe Bindung von Biomolekülen aufweisen soll, zeigt trotzdem eine kaum bessere Qualität der Daten.

Durch den optimierten Produktionsprozess und die Verwendung sorgfältig ausgesuchter Materialien sind die Eppendorf Microplates sehr hochwertig und eignen sich besonders gut für Fluoreszenzassays. Selbst geringe Probenkonzentrationen können mit diesen Platten zuverlässig quantifiziert werden.

Referenzen

- [1] Mocak J, Bond AM, Mitchell S, Scollary G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltametric and stripping techniques. *IUPAC, Pure Appl Chem* 1997, 69: 297-328.
- [2] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4 (2):67-73.

Bestellinformationen

Eppendorf Microplates*, 80 Platten (5 Beutel à 16)				
Bezeichnung	Qualität	Wellfarbe	Umrandungsfarbe	Bestell-Nr.
Microplate 96/F	PCR clean Steril	Klar	Weiß	0030 601.106
				0030 602.102
Microplate 96/U	PCR clean Steril	Klar	Weiß	0030 601.203
				0030 602.200
Microplate 96/U	PCR clean	Schwarz	Weiß	0030 601.807
Microplate 96/U	PCR clean	Weiß	Grau	0030 601.572
Microplate 96/V	PCR clean Steril	Klar	Weiß	0030 601.300
				0030 602.307
Microplate 96/V	PCR clean	Schwarz	Weiß	0030 601.904
				0030 601.670
Microplate 384/F	PCR clean Steril	Klar	Weiß	0030 621.107
				0030 622.103
Microplate 384/V	PCR clean Steril DNA LoBind, PCR clean Protein LoBind, PCR clean	Klar	Weiß	0030 621.301
				0030 622.308
				0030 623.304
				0030 624.300
Microplate 384/V	PCR clean	Schwarz	Weiß	0030 621.905
Microplate 384/V	PCR clean	Weiß	Grau	0030 621.670

*Alle Microplates sind auf Anfrage mit Barcode erhältlich.

Safire² ist eine geschützte Marke der Tecan Group Ltd.

Quant-iT ist eine geschützte Marke von Molecular Probes, Inc.

PicoGreen ist eine eingetragene Marke von Molecular Probes, Inc.

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