

Applications

Note 218 | November 2009

Technical Report

Eppendorf epT.I.P.S.[®] LoRetention – Vergleich von „low retention“ Pipettenspitzen durch einfache und schnelle Absorptionsmessungen mit dem Eppendorf BioPhotometer[™] plus

Natascha Weiß¹, Foong Teng Lu², Arun Kumar³

¹Eppendorf AG Hamburg, Deutschland, ²Eppendorf Asia Pacific Headquarter, Kuala Lumpur, Malaysia

³Eppendorf North America, Hauppauge, NY, USA

Zusammenfassung

Detergenzienlösungen besitzen im Vergleich zu Wasser veränderte Benetzungseigenschaften. Dadurch bleibt beim Dosieren solcher Lösungen vielfach ein fast unsichtbarer Film auf der Pipettenspitze zurück. Der Einsatz von sogenannten „low retention“ Spitzen kann hilfreich sein, um diesen Effekt zu minimieren. Mit einem einfachen Testsystem (Absorptionsmessungen im Eppendorf BioPhotometer plus) wurden die Eigenschaften im Ablaufverhalten von unterschiedlichen „low retention“ Pipettenspitzen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Eppendorf ep.T.I.P.S.[®] LoRetention im Vergleich mit Spitzen anderer Hersteller die kleinsten verbleibenden Flüssigkeitsmengen sowie die höchste Dosierpräzision aufwiesen.

Einleitung

Detergenzienlösungen haben im Vergleich zu Wasser eine geringere Oberflächenspannung. Auf Plastikmaterialien wie Polypropylen perlen solche Lösungen daher nicht ab, sondern führen zu einer Benetzung. So bleibt nach dem Dosieren ein Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche der Pipettenspitze zurück. Da im Labor verwendete Lösungen mit Detergenzien (z. B. Enzymlösungen) in der Regel durchsichtig und ungefärbt sind, ist der in der Spitze verbleibende Film kaum sichtbar. Das führt dazu, dass weder der Verlust von Probenmaterial noch die mangelnde Richtigkeit und Präzision beim Pipettieren sofort wahrgenommen werden.

Durch die Verwendung von gefärbten Lösungen können in der Pipettenspitze verbliebene Tropfen oder Flüssigkeitsfilme besser sichtbar gemacht werden. Unterschiede zwischen verschiedenen Arten von

Pipettenspitzen sind so nach dem Pipettieren häufig schon mit dem bloßen Auge erkennbar und helfen zu beurteilen, ob der verwendete Spitzentyp für eine bestimmte Lösung geeignet ist. Feinere Unterschiede zwischen den Spitzen lassen sich durch Absorptionsmessungen mit einem Photometer feststellen. Durch Mehrfachmessungen kann mit dieser Methode zusätzlich die Präzision der Dosierungen dargestellt werden.

In diesem Technical Report wurden Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention mit Standard Eppendorf epT.I.P.S. sowie „low retention“ Spitzen anderer Hersteller mittels eines Absorptionstest im BioPhotometer plus verglichen. Diese Versuche zeigen auf, wie die Eigenschaften von Pipettenspitzen beim Einsatz detergenzhaltiger Lösungen auf einfache Weise sichtbar gemacht und quantifiziert werden können.

Material und Methoden

Für den Test wurden sterile Standard Eppendorf Dualfilter T.I.P.S. und Eppendorf Dualfilter T.I.P.S. LoRetention sowie sieben „low retention“ Spitzen anderer Hersteller der Größe 200 µL verwendet. Pipettiert wurde mit der elektronischen Pipette Eppendorf Research pro 20-300 µL.

Diese wurde eingesetzt, um einen manuellen Einfluss beim Pipettieren, z. B. durch unterschiedliche Pipettiergeschwindigkeiten, auszuschließen und dadurch eine höchstmögliche Reproduzierbarkeit des Versuchs und der Ergebnisse zu erzielen [1]. Die Pipette wurde entsprechend der Bedienungsanleitung programmiert [2]. Die Programme mit den eingestellten Optionen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Zuerst wurden mit Standard Eppendorf Dualfilter T.I.P.S. 100 µL destilliertes Wasser in eine UVette vorgelegt (Programm 1) und damit der Leerwert (Blank) im BioPhotometer plus bestimmt. Mit einer zu testenden Pipettenspitze wurden dann 100 µL der gefärbten Detergenzienlösung aufgenommen und in dasselbe Gefäß durch Abgabe an die Gefäßwand zurück pipettiert (Programm 2). Um ein automatisches Ansaugen der Flüssigkeit von der Gefäßwand zu vermeiden, wurde folgende, einer manuellen Pipette entsprechende Abgabetechnik mit der Research pro durchgeführt:

Tabelle 1: Programmierung der Eppendorf Research pro zur Durchführung der Experimente

Programm 1:

- Vorlegen von 100 µL Wasser in die UVette
- Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit: Höchste
- Option: Standard (vergleichbar einer manuellen Pipette)

Programm 2:

- Aufnahme und Abgabe von 100 µL Detergenzlösung
- Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit: Geringste
- Option: Standard (vergleichbar einer manuellen Pipette)

Programm 3:

- Einspülen der Flüssigkeitsreste in Wasser in der UVette (100 µL)
- Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit: Geringste
- Option: Rinse (RNS) = dreimaliges Einspülen und Mischen

Als Testflüssigkeit wurde eine mit Brilliantblau FCF gefärbte 0,1 % Triton® X-100 Lösung verwendet. Die Absorptionsmessungen erfolgten im Eppendorf BioPhotometer plus mit Hilfe der Eppendorf UVette® (UV-transparente Einmalküvetten). Dazu wurde die Methode „absorbance“ bei 595 nm ausgewählt [3], einer Wellenlänge, bei der der Farbstoff im neutralen bis basischen pH-Bereich gut absorbiert.

Der Auslöseknopf wurde bei Abgabe der Detergenzlösung gedrückt gehalten und erst nach Entfernen der Spitze aus der Lösung losgelassen [2] (Tabelle 2). Anschließend wurden die Flüssigkeitsreste mit dem in der UVette vorliegenden Wasser aus der Pipettenspitze in die UVette eingespült (Programm 3).

Die UVette wurde mit einer Schichtdicke von 10 mm im BioPhotometer plus gemessen. Die Extinktion spiegelt die Menge der in der Spitze verbliebenen restlichen Detergenzlösung wieder. Für jeden Spitzentyp wurden 10 Messwerte erhoben und daraus der Durchschnittswert sowie die Standardabweichung berechnet.

Tabelle 2: Hinweise zur Durchführung der Pipettierversuche

Zu beachten:

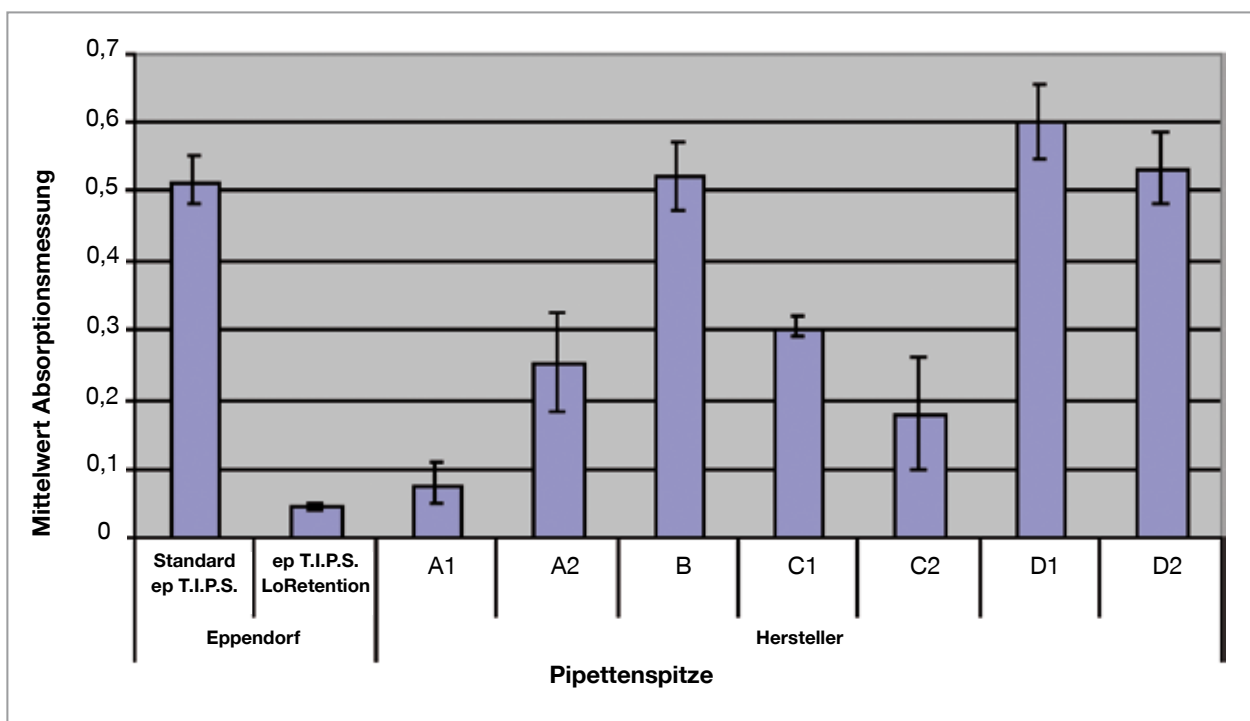
- Die Spitze während der Aufnahme nur wenige mm eintauchen.
- Die Flüssigkeit an der Gefäßwand wieder abgeben.
- Den Auslöseknopf der Pipette erst nach vollständiger Abgabe und Entfernen der Spitze aus dem Gefäß loslassen, um zu vermeiden, dass wieder Lösung angesaugt wird.
- Luftblasen in der UVette vermeiden.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 1 ist das Ergebnis der Absorptionsmessungen dargestellt. Je höher die Extinktion, desto größer war die Menge an verbliebener Restflüssigkeit in den jeweiligen Pipettenspitzen. Die epT.I.P.S. LoRetention zeigten die geringsten Extinktionswerte und die niedrigsten Standardabweichungen. Hier blieben nur minimale Reste an Lösung zurück bei gleichzeitig sehr hoher Reproduzierbarkeit. Alle anderen getesteten „low retention“ Spitzen wiesen deutlich höhere Extinktionswerte, d.h. mehr

Restflüssigkeit, auf. Bei Spitze A1 liegt die Extinktion um den Faktor 1,7 so hoch, während die Spitze D1 sogar den 13-fachen Wert zeigt. Die Spitzen B, D1 und D2 bewegen sich auf einem ähnlichen Niveau wie die Eppendorf Standard epT.I.P.S., d.h. Spitzen ohne „low retention“ Eigenschaften. Somit wiesen sie in diesen Versuchen keine Vorteile beim Pipettieren von Detergenzienlösungen gegenüber Standardspitzen auf.

Abbildung 1: Darstellung der am BioPhotometer plus gemessenen Extinktion pro Spitzentyp als Mittelwert aus 10 Bestimmungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.



Eine besonders hohe Standardabweichung ist bei den Spitzen A2 und C2 bei relativ geringer Absorption zu erkennen. Hier wich die Restflüssigkeit in den einzelnen Spitzen zum Teil stark voneinander ab. Dieser Effekt war schon mit bloßem Auge sichtbar. Bedeutende Unterschiede in den einzelnen Spitzen können eine relevante Fehlerquelle beim Pipettieren darstellen.

Diese Experimente wurden ebenfalls mit einer manuellen Pipette durchgeführt. Durch eine sehr kontrollierte und langsame Abgabegeschwindigkeit können die Probenreste in der Pipettenspitze noch weiter reduziert werden, allerdings variieren die Werte stärker, da der Faktor „Mensch“ eine zusätzliche mögliche Fehlerquelle darstellt. Auch hier wiesen die epT.I.P.S. LoRetention die niedrigsten Extinktionswerte auf (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Absorptionsmessungen mit dem BioPhotometer plus Unterschiede im Ablaufverhalten von Pipettenspitzen sehr gut sichtbar gemacht werden können. Vielfach waren diese auch mit bloßem Auge in der Spitze zu erkennen. Durch die Zehnfachbestimmung lässt sich feststellen, in wie weit Spitzen eines Typs (z. B. aus einer Spitzenbox) homogene Eigenschaften aufweisen. Damit liegt ein sehr schnelles und einfach durchzuführendes Testsystem vor. Zu beachten ist, dass dieser Versuchsaufbau nicht zur Kalibrierung von Dosiersystemen nach EN ISO 8655 geeignet ist [4].

Fazit

Es wurde ein Test demonstriert, mit dem sehr einfach und schnell festgestellt werden kann, ob und in welchem Ausmaß farbige Lösungen in einer Pipettenspitze zurückbleiben. Damit lässt sich prüfen, ob ein bestimmter Spizentyp für die zu verwendende Lösung geeignet ist. Die hier durchgeführten Experimente belegen, wie auch schon an anderer Stelle gezeigt [5], dass die Eppendorf

epT.I.P.S. LoRetention im Vergleich zu „low retention“ Spitzen anderer Hersteller die geringsten Benetzungswerte und damit ein besonders gutes Ablaufverhalten aufweisen. Anspruchsvolle Versuche können durch den geringen Probenverlust und die hohe Homogenität dieser Spitzen bei Verwendung mit detergenzhaltigen Lösungen reproduzierbar und zuverlässig durchgeführt werden.

Literatur

- [1] Application Note 92: Vergleich des Pipettierverhaltens der elektronischen Pipette Eppendorf Research pro und der manuellen Pipette Eppendorf Research mittels eines Enzym-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA) (www.eppendorf.de)
- [2] Bedienungsanleitung Research pro (www.eppendorf.de)
- [3] Bedienungsanleitung BioPhotometer plus (www.eppendorf.de)
- [4] Eppendorf SOP - Standardanweisung für Pipetten (www.eppendorf.de)
- [5] Application Note 192: Eppendorf epT.I.P.S. LoRetention – Bestimmung der Restfeuchte in Pipettenspitzen nach dem Pipettieren detergenzhaltiger Lösungen (www.eppendorf.de)

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestell-Nr.
ep Dualfilter LoRetention, PCR clean, steril und Pyrogen-frei (10 Racks à 96 Tips = 960 Tips)	
0,1 – 10 µL S	0030 077.610
0,5 – 20 µL L	0030 077.628
2 - 100 µL	0030 077.644
20 – 300 µL	0030 077.636
50 - 1000 µL	0030 077.652
epT.I.P.S. LoRetention Reloads, PCR clean (10 Trays à 96 Tips = 960 Tips)	
0,1 – 10 µL S	0030 072.006
0,5 – 20 µL L	0030 072.014
2 - 200 µL	0030 072.022
50 - 1000 µL	0030 072.030
epT.I.P.S. LoRetention Reloads, Eppendorf Qualität (10 Trays à 96 Tips = 960 Tips)	
0,1 – 10 µL S	0030 072.049
0,5 – 20 µL L	0030 072.057
2 - 200 µL	0030 072.065
50 - 1000 µL	0030 072.073
BioPhotometer plus, 230 V / 50-60 Hz	6132 000.008
UVette , Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, zertifiziert RNase-, DNA- und proteinfrei, 80 Stück	0030 106.300
UVette routine pack , Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box, 200 Stück	0030 106.318
Eppendorf Research pro , 20-300 µL, Einkanalpipette mit Ladeadapter	4860 000.038

Triton® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Union Carbide Corporation.

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 GmbH · Österreich · Tel: +43 1 290 1756-0 · Fax: +43 1 290 1756-20 · 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

(*9 Cent/Min. aus dem deutschen Festnetz)