



Neues Pipettiersystem: 384. Ready. Set. Pipette!

- > Der nächste Level: Eppendorf Conical Tubes 25 mL
- > NGS-Probenvorbereitung: Warum Automation sich lohnt
- > Digitalisieren Sie Ihre -80°C -Schätze

Application Notes

Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen · Produktion von kortikalen Neurosphäroiden aus hiPSCs im DASbox® Mini Bioreactor System · etc.





Liebe Leserschaft,

Wie gerne pipettieren Sie in 384-Well-Platten? Wir haben in einigen Laboren nachgefragt. Die einhellige Meinung lautete: Manuelles Pipettieren in solchen Formaten ist zeitaufwändig und umständlich. Sitzen die Spitzen? Schaffe ich es, fehlerfrei zu arbeiten? Kann ich mich ausreichend auf die 384 winzigen Wells konzentrieren? Vergessen Sie diese Sorgen; ab sofort wird manuelles Pipettieren in 384-Well-Platten zum Kinderspiel. Mit unserem neuen Pipettiersystem brauchen Sie nur noch eine Minute, um eine 384-Well-Platte mühelos, sicher und reproduzierbar zu befüllen! Lesen Sie mehr auf den Seiten 4–6.

Neues aus der Welt der Eppendorf Tubes®: Die vor einiger Zeit mit großem Erfolg eingeführten Eppendorf Tubes 5.0 mL gibt es jetzt auch in Ambra für lichtempfindliche Proben sowie als DNA- und Protein-LoBind-Variante für größtmögliche Probenrückgewinnung. Und auch bei konischen Gefäßen schlagen wir ein neues Kapitel auf: Die neuen Eppendorf Conical Tubes 25 mL überbrücken die Lücke zwischen den klassischen 15 mL und 50 mL Gefäßen. Wahlweise mit Schraub- oder innovativem patentierten Schnappdeckel erhältlich, bieten die Eppendorf Conical Tubes 25 mL handfeste Vorteile wie z.B. effektive Kontaminationsvermeidung, exzellentes Bakterienwachstum, weniger Plastikabfall und platzsparende Lagerung. Mehr auf Seite 8.

Manchmal sind es die kleinen Dinge, die die größte Wirkung zeigen! Probieren Sie unser neues Bioprozess-Zubehör einfach aus und erfreuen Sie sich an der vereinfachten Handhabung (S. 13).

Weitere Berichte und vier Application Notes zu unterschiedlichsten Themen runden dieses Heft ab.

Wir hoffen, es gefällt Ihnen!

Ihr Eppendorf BioNews-Team

Impressum

Herausgeber

Eppendorf AG, Barkhausenweg 1,
22339 Hamburg, Deutschland
Telefon: + 49 40 53 801-0
Fax: + 49 40 53 801-556
E-Mail: bionews@epppendorf.de
www.epppendorf.com/bionews

Redaktionsteam

Berit Hoff (Projektleitung), Dr. Hanaë
König, Dr. Tanja Musiol, Natascha Weiß

Gestaltung

Holger Paulsen Grafik-Design, Hamburg

Druck

Gebr. Klüppel & Rompel in Hamburg
GmbH, Hamburg

Bildnachweis

Alle Bilder Eppendorf AG. Ausnahmen:
Application Note S. 4, Abb. 2A: TissUse
GmbH; Application Note S. 8, Abb. 1:
Embryotools; S. 24: Science/AAAS

Kontakt

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Henlein-Str. 2
50389 Wesseling-Berzdorf
Tel. 01803-255911
(0,09 €/min aus dem Festnetz,
Mobilfunk max. 0,42 €/min)
E-Mail: vertrieb@epppendorf.de

Vertrieb Schweiz

Vaudaux-Eppendorf AG
Im Kirschgarten 30
4124 Schönenbuch/Basel
Tel. (061) 4821414
E-Mail: epppendorf@epppendorf.ch

Vertrieb Österreich

Eppendorf Austria GmbH
Ignaz-Köck-Straße 10
1210 Wien
Tel. (01) 8901364-0
E-Mail: office@epppendorf.at

Hinweise

Ihre Beiträge sind willkommen. Für unverlangt eingesandte Manuskripte wird keine Verantwortung übernommen. Die Einführung von Produkten kann in verschiedenen Märkten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen. Wir beraten Sie gern.

Irrtum und technische Änderungen vorbehalten.

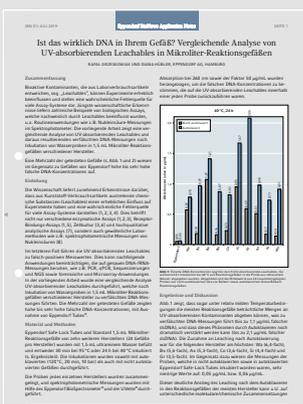
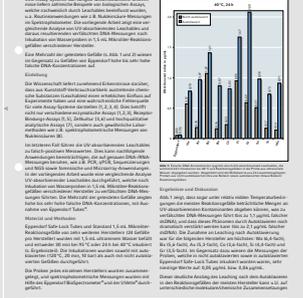
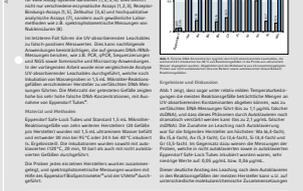
Alle Rechte vorbehalten,
einschließlich der Grafiken und Bilder.
Markenhinweise auf Seite 14.

© Copyright Eppendorf AG, Juli 2019.
Klimaneutral gedruckt in Deutschland.



IM BLICKPUNKT	Neues Pipettiersystem: 384. Ready. Set. Pipette!	4–5
LABORPRAxis	NGS-Probenvorbereitung: 5 Punkte warum Automation sich lohnt	10–11
	Digitalisieren Sie Ihre –80°C-Schätze!	12
	Kleines Zubehör – große Wirkung	13
INNOVATION	Kreativität und Liebe zum kleinsten technischen Detail	6
	Eppendorf Conical Tubes 25 mL	8
NAHAUFNAHME	Flüssigkeitszugabe in den Bioreaktor	13
NEWS/TIPPS	Ergonomie: Ihre Bedürfnisse stets im Fokus	5
	So gelingt Ihnen die perfekte Mischung	7
	Inside Cell Culture Newsletter für Profis	7
	Neuigkeiten bei den 5.0 mL Gefäßen	8
	Erweitertes Anwendungsspektrum für große Benchtop-Zentrifugen	9
	Eppendorf-Preisträger 2018/2019: Johannes Kohl & Georg Winter	14
SERVICE	Markenhinweise	14
	Gewinnspiel: Neues Pipettiersystem zu gewinnen	15

Eppendorf BioNews Application Notes

	<p>RAFAL GRZESKOWIAK, DIANA HÜBLER</p> <p>Ist das wirklich DNA in Ihrem Gefäß? Vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen</p> <p style="text-align: right;">1–2</p>
	<p>ULRIKE RASCHE</p> <p>Produktion von kortikalen Neurosphäroiden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen im DASbox® Mini Bioreactor System</p> <p style="text-align: right;">3–4</p>
	<p>DUTT WAY WONG, JENNY LAU, YEE MIN KHOR, ARORA PHANG</p> <p>Mastercycler® Thermocycler: Sparen Sie Zeit und Geld bei der PCR</p> <p style="text-align: right;">5–6</p>
	<p>NUNO COSTA-BORGES, ENRIC MESTRES, IVETTE VANRELL, MARIA GARCÍA, GLORIA CALDERÓN, SANDRA STOBRAWA</p> <p>ICSI bei der Maus mit dem Eppendorf PiezoXpert®: Steigerung der Überlebensraten von Oozyten nach der Injektion</p> <p style="text-align: right;">7–8</p>

SAMIRA SCHROEDER, EPPENDORF AG

Neues Pipettiersystem: 384. Ready. Set. Pipette!

Wie gerne pipettieren Sie in 384-Well-Platten? Wir haben Anwender im Labor gefragt. Manuelles Pipettieren in solchen Formaten ist zeitaufwändig und umständlich. Sitzen die Spitzen? Schaffe ich es, fehlerfrei zu arbeiten? Kann ich mich ausreichend auf die 384 winzigen Wells konzentrieren? Erfahren Sie hier, wie einfach und effizient manuelles Pipettieren in 384-Well-Platten sein kann! Eine Minute reicht. Mühelos. Sicher und reproduzierbar.

Versetzt pipettieren mit 8- und 12-Kanalpipetten? Es geht auch einfacher

Wenn der Durchsatz steigt und die Probenvolumina kleiner werden, sind entsprechend effiziente Lösungen gefragt. Häufig fällt die Entscheidung, von 96- auf 384-Well-Platten zu wechseln, nicht leicht. Kein Wunder, denn das sogenannte „versetzte Pipettieren“ mit 8- und 12-Kanalpipetten ist umständlich und fehleranfällig. Wollen Sie Ihren Durchsatz steigern, automatisierte Prozesse etablieren oder suchen Sie ein Backup-System für Ihre Automation?

Mit dem neuen für 384-Well-Platten optimierten manuellen Pipettiersystem von Eppendorf hat Ihre Suche ein Ende.

384 Wells in nur einer Minute befüllen

Das neue System basiert auf den neuen Eppendorf Research® plus (mechanisch) und Eppendorf Xplorer® plus (elektronisch) 16- und 24-Kanalpipetten in den Volumina 20 µL und 100 µL (Abb. 1). So können Sie je nach persönlicher Vorliebe entweder ein System zum Verarbeiten von Reihen (24 Kanäle) oder Spalten (16 Kanäle) verwenden (Abb. 2).

In jedem Fall erhöhen Sie die Reproduzierbarkeit Ihrer Ergebnisse, da 16 oder sogar 24 Reaktionen zeitgleich gestartet werden können. Testanwender haben uns berichtet, dass selbst wenig geübte Anwender mit diesen Mehrkanalpipetten eine ganze 384-Well-Platte spielend leicht befüllen konnten – innerhalb nur einer Minute!

Schluss mit Spitzen, die nicht verlässlich sitzen

Zum neuen System gehören außerdem die perfekt für die Konen der neuen Mehrkanalpipetten und das 384-Well-Format optimierten Pipettenspitzen



Abb. 1: NEU! 24- und 16-Kanalpipetten und epT.I.P.S. 384

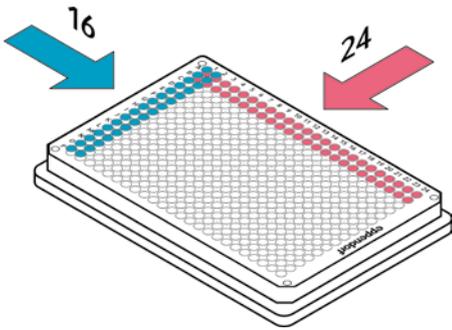


Abb. 2: Pipettieren Sie ganze Reihen (24 Kanäle) oder Spalten (16 Kanäle) in einem Schritt

epT.I.P.S.® 384 und ep Dualfilter T.I.P.S.® 384. Die innovative „SOFTattach“-Technologie (Abb. 3) ermöglicht nicht nur einen außergewöhnlich zuverlässigen Spitzensitz, sondern es konnten gleichzeitig die Aufsteckkräfte um weitere 40% pro Konus reduziert werden.

Diesen technologischen Spagat, größte Sicherheit bei minimalstem Einsatz von Bedienkräften zu bieten, konnten die Entwickler bei Eppendorf durch Kreativität und viel Liebe zum kleinsten technischen Detail meistern.

Mehr dazu in unserem Beitrag auf Seite 6.

Verlässliche Koaxialität für einen kinderleichten Probentransfer

So klein die einzelnen Wells einer 384-Well-Platte sind, so schmal und fein sind auch die neuen Spitzen.

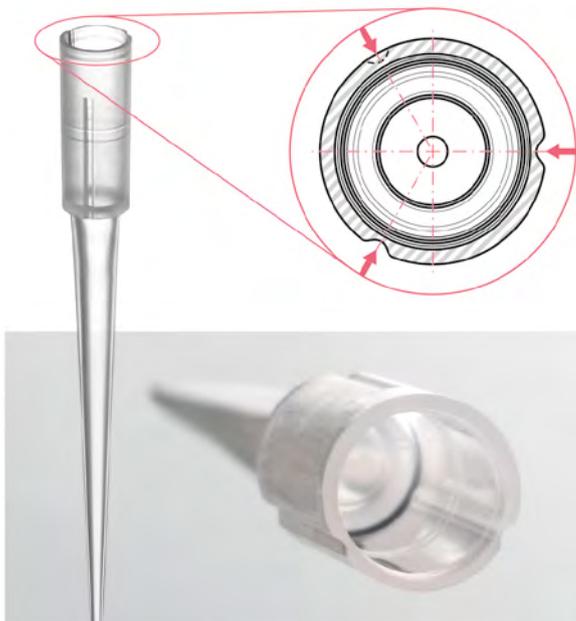


Abb. 3: Innovation – epT.I.P.S. 384 mit SOFTattach-Technologie

Damit Flüssigkeiten einwandfrei über bis zu 24 Wells gleichzeitig manövriert werden können, wurden die Spitzen zusätzlich mit einer optimalen Länge und einer bemerkenswerten Koaxialität entwickelt. Testkunden lobten: „Form und Ausrichtung der Pipettenspitzen sind optimal an die besonderen Herausforderungen beim Arbeiten mit 384-Well-Platten angepasst“.

SOFTattach-Technologie: Innovation für einen dauerhaft verlässlichen Spitzensitz

Mit den epT.I.P.S. 384 gibt es erstmalig Pipettenspitzen mit elastischen Verformungsnuten. Die hierdurch erzielte Elastizität erlaubt, dass die Spitzen sich beim Aufstecken im Bereich des Konus ausdehnen – und zwar gerade so viel, wie nötig ist, um einen verlässlichen Spitzensitz mit minimalstem Kraftaufwand zu ermöglichen.

Unsere Testkunden haben bestätigt, dass mit diesem System nun sogar das sichere Dispensieren über mehrere Platten hinweg möglich ist, ohne dass sich Spitzen lockern. Und das ohne Verwendung von Dichtungsringen!

Mehr Information

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Internetseite www.eppendorf.com/ready-set-pipette und melden sich dort bei Interesse für eine Produktdemo an.

Tipp: Übrigens erhalten Sie bei Eppendorf auch 384-Well-Platten. Mehr Info unter www.eppendorf.com/plates

Tipp

Ergonomie: Ihre Bedürfnisse stets im Fokus

Vor Jahren hat Eppendorf zur Förderung der Gesundheit das PhysioCare Concept® eingeführt. Basierend auf diesem Konzept behalten wir die Bedürfnisse von Wissenschaftlern stets im Blick und fordern den Status quo bestehender Laborgeräte kontinuierlich heraus.

Mit dem neuen System für 384-Well-Platten hat Eppendorf bewährte Techniken um wichtige Innovationen erweitert.

Dazu wurden die von Eppendorf-Pipetten bekannten und bewährten Produkteigenschaften **verfederter Spitzenkonus** und **SOFTject** um die vollkommen neue Spitzentechnologie **SOFTattach** ergänzt (siehe Text links).

Die Kombination dieser drei besonderen Eigenschaften gewährleistet größtmögliche Anwendersicherheit und Ergonomie beim Pipettieren:

- > Spitzenaufnahme – zuverlässig und reproduzierbar
- > Spitzenabwurf – angenehm leicht
- > Reduzierter Kraftaufwand
- > Perfekte Koaxialität

Mehr über das PhysioCare Concept auf www.eppendorf.com/physiocare



BERRIT HOFF, EPPENDORF AG

Kreativität und Liebe zum kleinsten technischen Detail

384. Ready. Set. Pipette! Dieser Slogan für das neue Pipettiersystem ist ab sofort Programm. Mit dem neuen System aus Mehrkanalpipetten und neuen Pipettenspitzen lassen sich die kleinen, feinen Wells von 384-Well-Platten effizient, ergonomisch und sicher bearbeiten. Lesen Sie hier, mit welcher Kreativität und Liebe zum Detail ein technisch besonders anspruchsvolles Projekt umgesetzt wurde.

Manuelles Pipettieren in 384-Well-Platten galt bisher als mühsame und wenig beliebte Aufgabe. „Das wissen wir sowohl von Kundenseite als auch von unserer eigenen Tätigkeit im Labor“, erklärt Dr. Samira Schroeder (Global Marketing Manager Liquid Handling). „Auch das versetzte Pipettieren mit einer 8- oder 12-Kanalpipette ist kein Vergnügen und mit einem hohen Fehlerisiko behaftet. Andererseits ist der Trend zu kleineren Probenolumina und höherem Durchsatz nicht von der Hand zu weisen.“

Was lag daher näher, als ein System zu entwickeln, mit dem man – je nach Vorliebe – ganze Reihen oder Spalten mit 24 oder 16 Wells in nur einem Durchgang schnell und einfach befüllen kann?

„Das neue System besteht aus 16- und 24-Kanalpipetten und maßgeschneiderten Pipettenspitzen, den epT.I.P.S. 384[®]“, erläutert Kunststoffspezialistin und Entwicklerin Hanna Rethwisch. „Unser erklärtes Ziel bei der Entwicklung der neuen Pipettenspitzen war es, die Aufsteckkräfte je Konus um 40% zu reduzieren, um ein 16- oder 24-Kanalsystem für den Anwender optimal handhabbar und damit attraktiv zu gestalten.“



Von links nach rechts: Dr. Samira Schroeder, Hanna Rethwisch und Maren Leonhardt

Die Aufsteckkräfte zu reduzieren und gleichzeitig einen sicheren Spitzensitz zu realisieren, sei eine der Herausforderungen gewesen. „Je elastischer eine Pipettenspitze ist, umso besser ist ihr Sitz. Die Lösung, die Hanna Rethwisch gemeinsam mit den Spritzgießexperten und Formbauern der Eppendorf Polymere GmbH, unserem Kunststoffwerk, erarbeitet hat, beruht auf elastischen Verformungsnuten“, so Samira Schroeder. „Dies ist eine wirklich innovative Technologie, deren Kundennutzen wir durch den Namenszusatz ‚SOFTattach‘ hervorheben.“

Mit den epT.I.P.S. 384 wurde eines der bisher anspruchsvollsten Pipettenspitzen-Projekte erfolgreich umgesetzt. Hanna Rethwisch: „Die Spritzgießexperten bei der Eppendorf Polymere haben einmal mehr ihre außerordentliche technische Kompetenz unter Beweis gestellt und auch für die Spitzegeometrie wichtige Impulse gegeben. Mit den neuen epT.I.P.S. 384 Pipettenspitze mit 20 µL haben die Kollegen in meinen Augen sogar ein kleines Meisterwerk vollbracht“.

„Diese Pipettenspitze hat eine lang ausgezogene Spitze, eine hervorragende Koaxialität und eine geringe Wandstärke im Bereich der Austrittsöffnung“, erläutert Entwicklerin Maren Leonhardt. „Die Spitze ist weniger starr, was die Beladung von Gelen erleichtert. Man kommt gut in die sehr kleinen Geltaschen hinein und zerstört diese nicht. Auch bei der Wandabgabe in Platten-Wells erfolgt nur eine minimale Kraftübertragung auf den Konus, d. h. die Spitzen sitzen weiterhin fest.“

Fazit

„Durch Teamarbeit und ständigen Austausch mit unseren Spritzgießspezialisten und den Pipettenentwicklern haben wir unser Ziel erreicht“, freuen sich die Kolleginnen.

Mit dem neuen Pipettiersystem und bereits vorhandenen Geräten bietet Eppendorf seinen Kunden eine Komplettlösung für die Bearbeitung von 384-Well-Platten – einschließlich Zentrifugation, Temperieren und Mischen sowie PCR.

JAN-HENDRIK BEBERMEIER, EPPENDORF AG

So gelingt Ihnen die perfekte Mischung

Bei Eppendorf finden Sie eine große Auswahl an hochwertigen, robusten und verlässlichen Temperier- und Mischgeräten. Dabei bleiben wir nie stehen, sondern passen Geräte und Zubehör Ihren steigenden bzw. sich wandelnden Anforderungen an, für mehr Durchsatz und Flexibilität in Ihrem Labor.



Vermissen Sie eine zweite Inkubationstemperatur auf Ihrem Eppendorf ThermoMixer®?

Der neue Eppendorf SmartExtender™ ist ein einfach zu nutzendes Inkubationstool und eine tolle Ergänzung zu Ihrem Eppendorf ThermoMixer® C, ThermoMixer F oder Eppendorf ThermoStat™ C. Sein besonderer Clou: Er kann parallel zu jedem Eppendorf SmartBlock™ für die Inkubation von 1,5 mL Gefäßen genutzt werden.

- > Bis zu 12 x 1,5mL Gefäße für höheren Durchsatz und höhere Flexibilität
- > Aktives Heizen im Temperaturbereich von Raumtemperatur + 3°C bis 110°C
- > Heizfunktion unabhängig vom Smart-Block
- > Firmware-Update erforderlich; erhältlich auf www.eppendorf.com/software-downloads

www.eppendorf.com/thermomixer



Schluss mit uneinheitlichen Mischergebnissen!

Der MixMate® ist ein besonders komfortables und flexibles High-Speed-Gerät für anspruchsvollste Mischvorgänge. Mit 2ndMix-Control-Technologie für kontrolliertes Mischen und reproduzierbare Mischergebnisse in Sekunden. Die Anti-Spill-Technologie sorgt für kontrollierte Mischbewegungen ohne Deckelbenetzung und Kreuzkontamination.

Bestellen Sie den MixMate als Grundgerät mit dem Gefäßhalter Ihrer Wahl!

Hohe Gefäßflexibilität

- > 5+1 Möglichkeiten zu mischen: 5 Gefäßhalter für Gefäße von 0,2 mL bis 50 mL + 1 integrierte „Vortex“-Funktion
- > Sie besitzen schon einen MixMate? Erweitern Sie seine Leistung mit den neuesten Gefäßhaltern* für 8 x 5/15 mL und 4 x 25/50 mL.

*Direkt einsetzbar, ohne Software-Update

Tipp

Inside Cell Culture Newsletter für Profis

Sie sind erfahren im Umgang mit Zellkulturen und möchten Ihr Wissen stetig erweitern? Oder benötigen Sie neue Wissensimpulse für Ihre Tätigkeit in Lehre und Weiterbildung? Dann ist unser neuer „Eppendorf Inside Cell Culture“-Newsletter genau das Richtige für Sie.

Erhalten Sie regelmäßig Informationen über:

- > Tipps und Tricks zur Verbesserung Ihrer täglichen Arbeit
- > Gratis Videos, Downloads, Poster und mehr
- > Zugang zu Lehr-Webinaren für Fortgeschrittene
- > Material zur Unterrichtsunterstützung
- > Aktuelle Events- und Trainingsangebote



Jetzt abonnieren!

www.eppendorf.com/ICC

BRIGITTE KLOSE, EPPENDORF AG

Eppendorf Conical Tubes 25 mL

Wenn Proben mit mehr als 15 mL, jedoch erheblich weniger Volumen als 50 mL vorbereitet, zentrifugiert, gemischt oder gelagert werden sollen, greifen Wissenschaftler zumeist auf herkömmliche konische Gefäße mit 15 mL oder 50 mL Volumen zurück. Für Abhilfe sorgen jetzt die neuen Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schraub- oder Schnappdeckel.



Mit den neuen Eppendorf Conical Tubes 25 mL erreicht das Feld der konischen Gefäße einen neuen Level. Dieser neue Gefäßtyp überbrückt die offensichtliche Lücke innerhalb der herkömmlichen Gefäße. Sein Durchmesser stimmt mit dem von 50 mL Gefäßen überein und ermöglicht, mit Hilfe entsprechender Adapter, die unkomplizierte Integration in bestehende Workflows verschiedenster Applikationen.

Geringere Höhe, größerer Nutzen

Dank der um ca. 20 % geringeren Gefäßhöhe ist die Eintauchtiefe von Pipetten deutlich geringer als bei 15 mL oder 50 mL konischen Gefäßen. So lassen sich Kontaminationen vermeiden und eine bessere Probenrückgewinnung erzielen. Zusätzlich passen die Gefäße in 3,5-Inch-Lagerungsboxen und Freezer-Racks. So wird wertvoller Lagerplatz eingespart.

Schraub- oder Schnappdeckel

Das 25 mL Gefäß gibt es mit Schraubdeckel oder mit dem patentierten* *g-safe*® Schnappdeckel, einer für konische Gefäße innovativen Deckellösung. Dieser ermöglicht einhändige Handhabung und unterstützt – insbesondere bei mehrstufigen Protokollen – eine optimierte, schnellere Probenbearbeitung. Beide Verschlussvarianten bieten eine Zentrifugationsstabilität bis 17.000 x *g*.

Eppendorf Conical Tubes 25 mL

- > Das kompakte, mittelgroße 25 mL Gefäß ermöglicht eine einfache einhändige Bedienung.
- > Exzellentes Wachstum von Bakterienkulturen; verglichen mit 15 mL Gefäßen wurden eine bessere Belüftung sowie höhere Ausbeuten an Plasmid-DNA erzielt.
- > Das Kontaminationsrisiko bei der Zell- und Gewebelyse wird durch die Handlingvorteile deutlich gemindert.
- > Insbesondere die Schnappdeckelversion ist eine sehr zweckmäßige, sichere Lösung für Zellkultur-Anwendungen und nachgelagerte Extrahierungen mittels organischer Lösungsmittel und Zentrifugation.

Mehr Informationen unter www.eppendorf.com/tubes

*EP 2 965 816 A1, EP 2 654 958 A1

News

Neuigkeiten bei den 5.0 mL Gefäßen

Ab sofort verfügbar: Das Eppendorf 5.0 mL Tube mit Schraubverschluss – ambrarfarben für lichtempfindliche Proben und als DNA LoBind- oder Protein LoBind-Variante für größtmögliche Probenrückgewinnung.



- > Das Verarbeiten lichtempfindlicher Proben in hohen, undurchsichtigen Gefäßen ist eine häufige Kontaminationsquelle. Das neue Schraubdeckelgefäß 5.0 mL, ambra eingefärbt, schützt Ihre lichtempfindlichen Proben effektiv vor energiegeladenem Licht im niederen Wellenlängenbereich und bietet gleichzeitig einen hohen Grad an Transparenz. So können Sie die Eintauchtiefe Ihrer Pipettenspitze jederzeit kontrollieren.
- > Gefäße mit DNA LoBind- und Protein LoBind-Oberflächen sind ideal für Anwendungen mit geringen Konzentrationen und wo die Probenrückgewinnung essentiell für die Assay-Resultate ist. Ein spezielles Zwei-Komponenten-Polymer schafft eine Oberfläche, die optimale Wiedergewinnungsraten garantiert sowie zu konstanteren Konzentrationen und somit zu reproduzierbareren und verlässlicheren Versuchsergebnissen führt.

Erzielen Sie beste Ergebnisse für Ihre DNA-, Protein- und lichtempfindlichen Proben.

Mehr Informationen auf www.eppendorf.com/tubes

Ist das wirklich DNA in Ihrem Gefäß? Vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen

RAFAL GRZESKOWIAK UND DIANA HÜBLER, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Bioaktive Kontaminanten, die aus Laborverbrauchsartikeln entweichen, sog. „Leachables“, können Experimente erheblich beeinflussen und stellen eine wahrscheinliche Fehlerquelle für viele Assay-Systeme dar. Jüngste wissenschaftliche Erkenntnisse liefern zahlreiche Beispiele von biologischen Assays, welche nachweislich durch Leachables beeinflusst wurden, u.a. Routineanwendungen wie z.B. Nukleinsäure-Messungen im Spektrophotometer. Die vorliegende Arbeit zeigt eine vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables und daraus resultierenden verfälschten DNA-Messungen nach Inkubation von Wasserproben in 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäßen verschiedener Hersteller.

Eine Mehrzahl der getesteten Gefäße (s. Abb. 1 und 2) wiesen im Gegensatz zu Gefäßen von Eppendorf hohe bis sehr hohe falsche DNA-Konzentrationen auf.

Einleitung

Die Wissenschaft liefert zunehmend Erkenntnisse darüber, dass aus Kunststoff-Verbrauchsartikeln austretende chemische Substanzen (Leachables) einen erheblichen Einfluss auf Experimente haben und eine wahrscheinliche Fehlerquelle für viele Assay-Systeme darstellen [1, 2, 3, 4]. Dies betrifft nicht nur verschiedene enzymatische Assays [1, 2, 3], Rezeptor-Bindungs-Assays [1, 5], Zellkultur [3, 6] und hochqualitative analytische Assays [7], sondern auch gewöhnliche Labormethoden wie z.B. spektrophotometrische Messungen von Nukleinsäuren [8].

Im letzteren Fall führen die UV-absorbierenden Leachables zu falsch-positiven Messwerten. Dies kann nachfolgende Anwendungen beeinträchtigen, die auf genauen DNA-/RNA-Messungen beruhen, wie z.B. PCR, qPCR, Sequenzierungen und NGS sowie forensische und Microarray-Anwendungen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Analyse UV-absorbierender Leachables durchgeführt, welche nach Inkubation von Wasserproben in 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäßen verschiedener Hersteller zu verfälschten DNA-Messungen führten. Die Mehrzahl der getesteten Gefäße zeigten hohe bis sehr hohe falsche DNA-Konzentrationen, mit Ausnahme von Eppendorf Tubes®.

Material und Methoden

Eppendorf Safe-Lock Tubes und Standard 1,5 mL Mikroliter-Reaktionsgefäße von zehn weiteren Herstellern (24 Gefäße pro Hersteller) wurden mit 1,5 mL ultrareinem Wasser befüllt und entweder 30 min bei 95°C oder 24 h bei 40°C inkubiert (s. Ergebnisteil). Die Inkubationen wurden sowohl mit autoklavierten (120°C, 20 min, 10 bar) als auch mit nicht autoklavierten Gefäßen durchgeführt.

Die Proben jedes einzelnen Herstellers wurden zusammengelegt, und spektrophotometrische Messungen wurden mit Hilfe des Eppendorf BioSpectrometer® und der UVette® durchgeführt.

Absorption bei 260 nm sowie der Faktor 50 µg/mL wurden herangezogen, um die falschen DNA-Konzentrationen zu bestimmen, die auf die UV-absorbierenden Leachables innerhalb einer jeden Probe zurückzuführen waren.

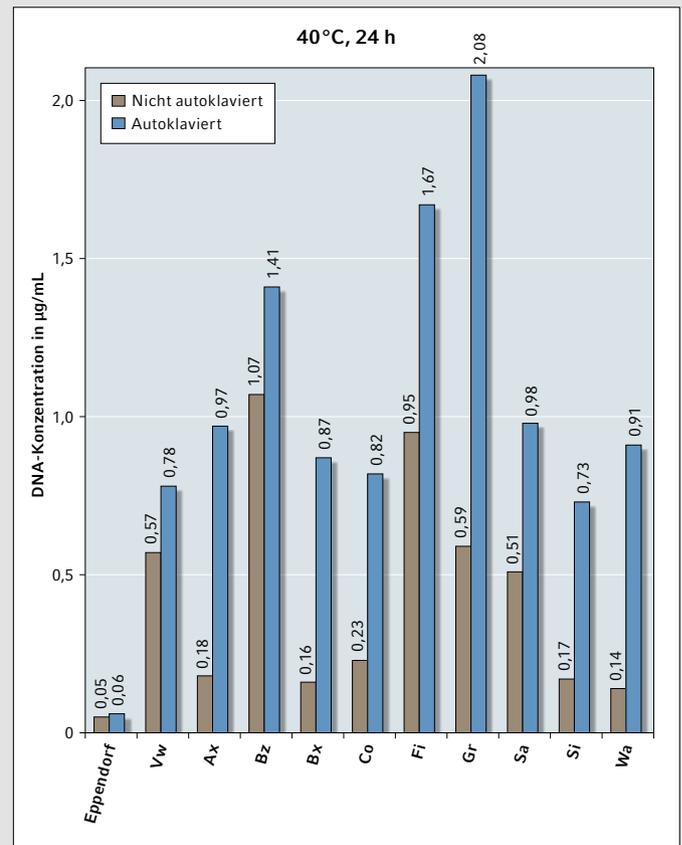


Abb. 1: Falsche DNA-Konzentration (µg/mL) durch UV-absorbierende Leachables, die während 24 h Inkubation bei 40°C aus Reaktionsgefäßen in die Probe aus ultrareinem Wasser abgegeben wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 24 zusammengelegten Proben aus nicht autoklavierten (braune Balken) sowie autoklavierten (blaue Balken) Reaktionsgefäßen.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt, dass sogar unter relativ milden Temperaturbedingungen die meisten Reaktionsgefäße beträchtliche Mengen an UV-absorbierenden Kontaminanten abgeben können, was zu verfälschten DNA-Messungen führt (bis zu 1,1 µg/mL falscher dsDNA), und dass dieses Phänomen durch Autoklavieren noch dramatisch verstärkt werden kann (bis zu 2,1 µg/mL falscher dsDNA). Die Zunahme an Leaching nach Autoklavierung war für die folgenden Hersteller am höchsten: Wa (6,4-fach), Bx (5,6-fach), Ax (5,3-fach), Co (3,6-fach), Si (4,4-fach) und Gr (3,5-fach). Im Gegensatz dazu wiesen die Messungen der Proben, welche in nicht autoklavierten sowie in autoklavierten Eppendorf Safe-Lock Tubes inkubiert worden waren, sehr niedrige Werte auf: 0,05 µg/mL bzw. 0,06 µg/mL.

Dieser deutliche Anstieg des Leaching nach dem Autoklavieren in den Reaktionsgefäßen der meisten Hersteller kann u.U. auf unterschiedliche molekulare/chemische Zusammensetzungen

Ist das wirklich DNA in Ihrem Gefäß? Vergleichende Analyse von UV-absorbierenden Leachables in Mikroliter-Reaktionsgefäßen

der eingesetzten Polymere zurückzuführen sein, welche anfälliger gegenüber Veränderungen oder Beschädigungen während des Autoklavivorganges sind. Dies führt sodann zu erhöhter Freisetzung von Nebenprodukten der Polymerisation und/oder Zusatzstoffen, die bei der Produktion eingesetzt werden. Eppendorf Tubes werden aus hochreinem Polypropylen gefertigt, und weder Weichmacher noch Gleitmittel oder Biocide werden der Produktion beigemischt.

Bisher wurden noch keine umfassenden Studien zum Einfluss des Autoklavierens auf das Leaching veröffentlicht. Da es sich beim Autoklavieren jedoch um eine sehr gängige Methode handelt, sollten deren Auswirkungen auf Experimente im Rahmen der normalen Laborroutine sorgfältiger bedacht werden.

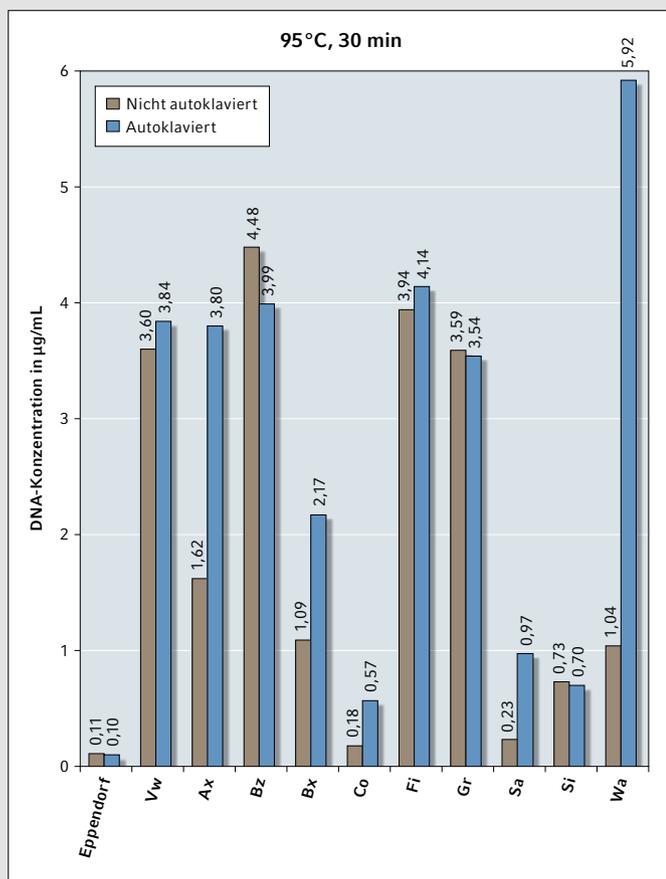


Abb. 2: Falsche DNA-Konzentration (µg/mL) durch UV-absorbierende Leachables, die während 30 min Inkubation bei 95 °C aus Reaktionsgefäßen in die Probe aus ultrareinem Wasser abgegeben wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 24 zusammengelegten Proben aus nicht autoklavierten (braune Balken) sowie autoklavierten (blaue Balken) Reaktionsgefäßen.

Wie in Abb. 2 dargestellt, stiegen die durchschnittlichen Werte der nachgewiesenen UV-absorbierenden Leachables weiter an, wenn die Wasserproben für 30 min bei 95 °C inkubiert wurden. Sogar innerhalb dieser kurzen Zeit war der durchschnittliche Leaching-Level (sowohl für autoklavierte als auch nicht autoklaverte Gefäße) beträchtlich und erreichte Werte bis zu 2,51 µg/mL falscher dsDNA, im Vergleich zu einem Durchschnittswert von 0,79 µg/mL falscher dsDNA nach Inkubation über 24 h bei 40 °C (3,17-facher Anstieg).

Dies weist darauf hin, dass die Temperatur einen kritischen Faktor für das Leaching darstellt, was auch aus früheren Berichten hervorgeht [8]. Ähnlich den Inkubationen bei niedrigeren Temperaturen wurden die weitaus niedrigsten Werte für die in Eppendorf Safe-Lock Tubes inkubierten Wasserproben ermittelt (Abb. 2). Hierdurch lässt sich das Risiko von Artefakten durch Leachables sowie von verfälschten Messwerten für Nukleinsäuren signifikant reduzieren.

Fazit

Insgesamt zeigte die Mehrzahl der getesteten Gefäße hohe bis sehr hohe Werte von UV-absorbierenden Leachables in Wasserproben, welche bei 40 °C bzw. 95 °C inkubiert worden waren. Zusätzlich wurden die Leachables-Werte durch den Autoklavivorgang erheblich erhöht. UV-absorbierende Leachables führten nachweislich zu falsch-positiven Messwerten, was möglicherweise nachfolgende Anwendungen beeinträchtigt, die auf genauen DNA-/RNA-Messungen beruhen, wie z.B. PCR, qPCR, Sequenzierungen und NGS sowie forensische und Microarray-Anwendungen. Unter sämtlichen experimentellen Bedingungen und unabhängig vom Autoklavivorgang wiesen Eppendorf Tubes gleichbleibend niedrige Leaching-Werte auf und reduzieren somit das Risiko von falschen spektrophotometrischen Messwerten signifikant.

Literatur

- [1] McDonald GR, Hudson AL, Dunn SM, You H, Baker GB, Whittall RM, Martin JW, Jha A, Edmondson DE, Holt A. Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware. *Science* 2008; 322(5903):917.
- [2] McDonald GR, Kozuska JL, Holt A. Bioactive Leachates from Lab Plastics. *G.I.T. Laboratory Journal* 2009; 9-10: 2-4.
- [3] Olivieri A, Degenhardt OS, McDonald GR, Narang D, Paulsen IM, Kozuska JL, Holt A. On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(6):697-703.
- [4] Grzeskowiak R, Gerke N. Leachables: Minimizing the Influence of Plastic Consumables on the Laboratory Workflows. *White Paper 026*; www.eppendorf.com/wp26
- [5] Watson J, Greenough EB, Leet JE, Ford MJ, Drexler DM, Belcastro JV, Herbst JJ, Chatterjee M, Banks M. Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen* 2009; 14(5):566-72.
- [6] Lee TW, Tumanov S, Villas-Bôas SG, Montgomery JM, Birch NP. Chemicals eluting from disposable plastic syringes and syringe filters alter neurite growth, axogenesis and the microtubule cytoskeleton in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2015; 133(1):53-65.
- [7] Schauer KL, et al. Mass Spectrometry Contamination from Tinuvin 770, a Common Additive in Laboratory Plastics. *Journal of Biomolecular Techniques* July 2013; 24(2):57-61.
- [8] Lewis LK, Robson M, Vecherkina Y, Ji C, Beall G. Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes. *Biotechniques* 2010; 48(4):297-302.

Produktion von kortikalen Neurosphäroiden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen im DASbox® Mini Bioreactor System

ULRIKE RASCHE, EPPENDORF AG BIOPROCESS CENTER, JÜLICH

Einleitung

In der wissenschaftlichen Gemeinschaft besteht ein großes Interesse an der Verwendung von aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) abgeleiteten neuralen Zellen, um grundlegende Mechanismen der Gehirnentwicklung, neuronale Funktionen und medikamentös bedingte Effekte zu untersuchen. *In vitro* erzeugte Gehirn-Organoiden stellen ein vielversprechendes Modell dar, da sie einen bemerkenswerten Reifungsgrad aufweisen und bis zu 20 Monate in Kultur gehalten werden können [1].

Viele etablierte Protokolle für die Produktion von Organoiden unter statischen Bedingungen erfordern einen enormen Aufwand an manueller Laborarbeit, was ihre Skalierbarkeit einschränkt. Zusätzlich besteht zwischen individuellen Organoiden eine ausgeprägte Heterogenität, was auf stochastische Effekte während der ursprünglichen Entstehung der Organoiden zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Faktoren sind die gegenwärtigen Organoid-Technologien für die Entwicklung von standardisierten Modellen oder Assays nur bedingt geeignet. Die Kultivierung in Rührkessel-Bioreaktoren

ermöglicht die strenge Kontrolle von Prozessparametern und verbessert somit die Homogenität der neuronalen sphäroiden Kulturen [2, 3].

Sie ermöglicht ebenfalls eine Maßstabsvergrößerung, um ausreichende Zellzahlen für neuartige pharmakologische Test-Systeme, wie z.B. Multi-Organ-Chip-Systeme, zu produzieren [4]. In dieser Arbeit zeigen Forscher der TissUse GmbH (Berlin) das Potenzial von gerührten Bioreaktoren zur Herstellung von aus hiPSCs abgeleiteten Neurosphäroiden auf. Sie erzielten 2×10^8 Zellen in einem einzigen DASbox Mini Bioreactor. Ergebnisse aus drei unabhängigen Bioprozessen veranschaulichen die Reproduzierbarkeit ihres Protokolls für die neuronale Differenzierung.

Material und Methoden

Die Forscher bei TissUse® haben ein DASbox Mini Bioreactor System (Abb. 1) für die Kultivierung der hiPSC-Sphäroide sowie die neuronale Differenzierung verwendet. Die Kultur wurde mit $2,5 \times 10^5$ StemUse101 Einzelzellen/mL angeimpft.

Die Protokolle für die initiale Ausbildung der Sphäroide sowie die neuronale Differenzierung sind in [5] näher ausgeführt.

Parameter	Gerät/Sollwert
Bioprozess System	DASbox Mini Bioreactor System
Gefäß	DASbox Mini Bioreactor; vor Beginn des Prozesses mit Silikonisiermittel Sigmacote® (Sigma-Aldrich®, USA) beschichtet, um die Zelladhäsion zu verhindern
Schütteln	8-Blatt Rührer mit 60° Winkel; 80 rpm
Temperatur	37°C
Gelöstsauerstoff (DO)	19%; durch Begasung mit 5% CO ₂ /variabler Prozentzahl von O ₂ bei 3 s/L/h aufrechterhalten
Probenentnahme	Submerser Schlauch
Zugabe von Medium	Nicht-submerser Schlauch, verbunden mit der systeminternen Pumpe
Entnahme von Medium	Submerser Schlauch, ausgestattet mit 10 µm porösem Filter, welcher mit der systemeigenen Pumpe verbunden ist. Der Filter ermöglicht die Entnahme von einzelnen Zellen, während Sphäroide im Gefäß verbleiben

Tabelle 1: Überblick über die Prozessparameter und Sollwerte

Ergebnisse

hiPSC-Sphäroide

Die hiPSCs bildeten innerhalb der ersten 24 Stunden im Bioreaktor zügig Sphäroide, welche bis zum fünften Tag in Kultur an Größe zunahm und einen durchschnittlichen Durchmesser von 136,5 µm erreichten. Nach fünf Tagen expandierten die hiPSCs um ein Fünffaches auf eine Gesamtzellzahl von $1,58 \times 10^8$ Zellen bei einer Vitalität von 86%. Die Expression von Pluripotenz-Markergenen wurde durch die 3D-Kultivierung im Bioreaktor nicht beeinträchtigt, wie anhand von Durchflusszytometrie-Messungen der hiPSC-Marker SSEA-5, TRA-1-60, SOX-2 und OCT-3/4 an den Tagen 0 und 5 der hiPSC-Sphäroidbildung im Bioreaktor gezeigt werden konnte. Der frühe Differenzierungsmarker SSEA-1 wurde zu keinem der gemessenen Zeitpunkte exprimiert.

Kortikale Neurosphäroide

Nach 5 Tagen der Sphäroid-Bildung aus einzelnen hiPSCs induzierten die Wissenschaftler die Differenzierung zu kortikalen Neurosphäroiden. Die Zusammensetzung des Fütterungsmediums wurde zu mehreren Zeitpunkten im Laufe des Differenzierungsprozesses gewechselt; das Medium wurde schrittweise mit

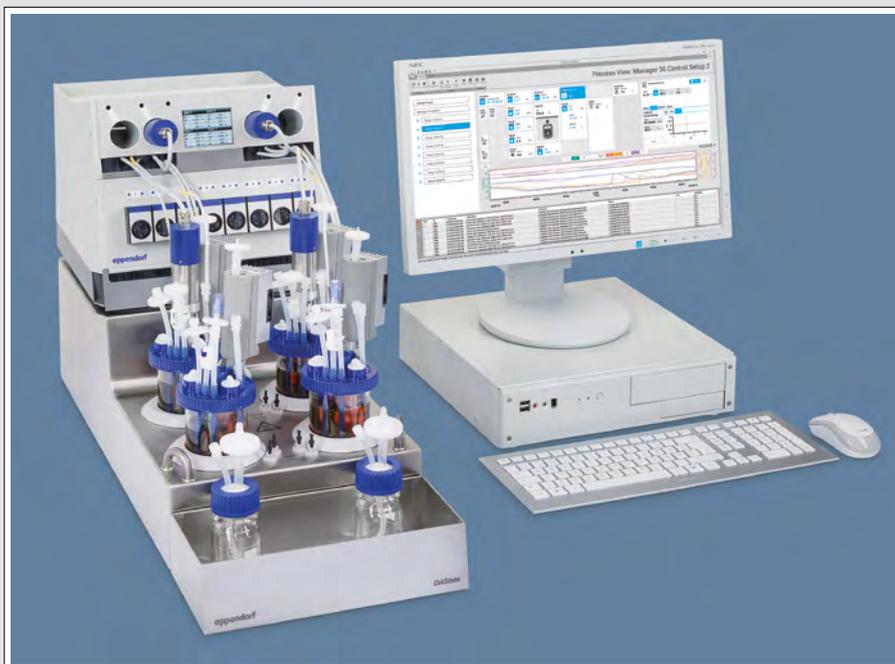


Abb. 1: DASbox Mini Bioreactor System

Produktion von kortikalen Neurosphäroiden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen im DASbox® Mini Bioreactor System

Hilfe der systemintegrierten Pumpen ausgetauscht, was zu einem sukzessiven Wechsel von neuronalem Adaptionmedium zu neuronalem Induktionsmedium und damit zu einem Auswaschen der niedermolekularen Inhibitoren führte.

Nach dieser Übergangsphase stieg die Sphäroidgröße auf einen durchschnittlichen Durchmesser von 230 µm. Nach 21 Tagen verdoppelte sich die Zellzahl auf 2×10^8 Zellen mit einer Vitalität von 82 %. Die Gesamtzahl an neuronalen Zellen in einem ausgewachsenen menschlichen Gehirn beträgt um die 100×10^9 Zellen. In seinen Multi-Organ-Chip-Systemen setzt TissUse in der Regel einen Maßstab von 1:100.000 ein, was eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro neuronalem Modell ergibt. Mit einem einzigen Lauf des Bioreaktors können somit 200 neuronale Modelle erzeugt werden, was sogar für Experimente im Großformat ausreichend wäre.

Expression von Marker-Genen

Um die Effizienz des neuronalen Induktionsprotokolls zu beurteilen, wurde am Ende der neuronalen Induktion die Veränderung der $\Delta\Delta C_T$ mRNA Menge ausgewählter Marker-Gene gegen das Haushaltsgen TBP normalisiert und mit hiPSC-Sphäroiden verglichen (Abb. 2A).

Die Pluripotenz-Marker-Gene NANOG und OCT3/4 waren herunterreguliert, während die Expression des neuronalen Stammzell-Marker-Gens Nestin (NES) in allen drei Kulturen anstieg. Die kortikalen Entwicklungsmarker OTX1, TBR1 und SATB2 waren hochreguliert, was die kortikale Identität der Sphäroide widerspiegelt [3]. Zahlreiche pan-neuronale Marker wie z.B. MAP2, TUBB3, Synaptophysin (SYP), Enolase-2 (ENO2) sowie die spezifischeren neuronalen Marker SLC6A4 (serotonergene Neuronen) und TH (dopaminerge Neuronen) waren ebenfalls hochreguliert, was auf eine Differenzierung neuronaler Stammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen hinweist.

Die Anfärbung von Kryostatschnitten offenbarte eine gleichmäßige Verteilung der für die neuronalen Stammzellmarker Nestin und PAX6 positiven Zellen, was auf eine homogene Differenzierung schließen lässt (Abb. 2B).

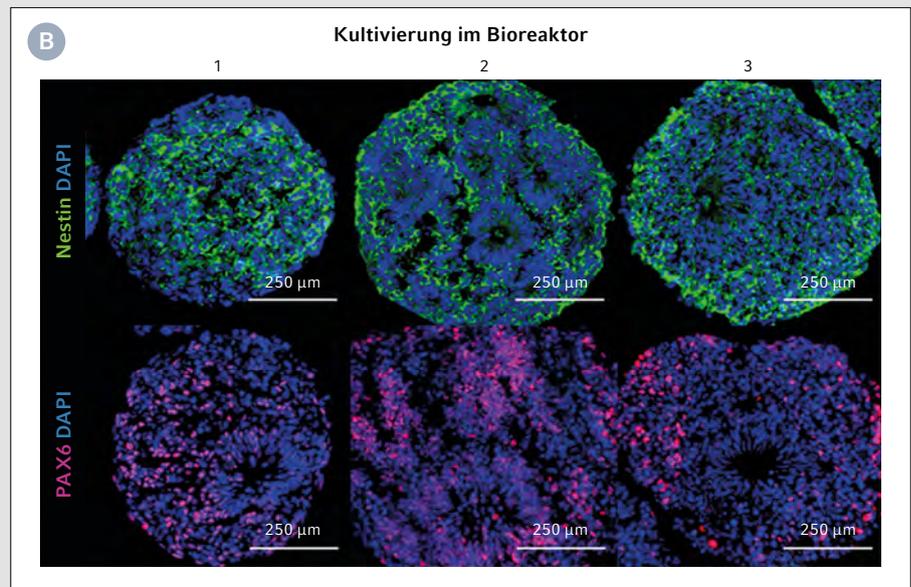
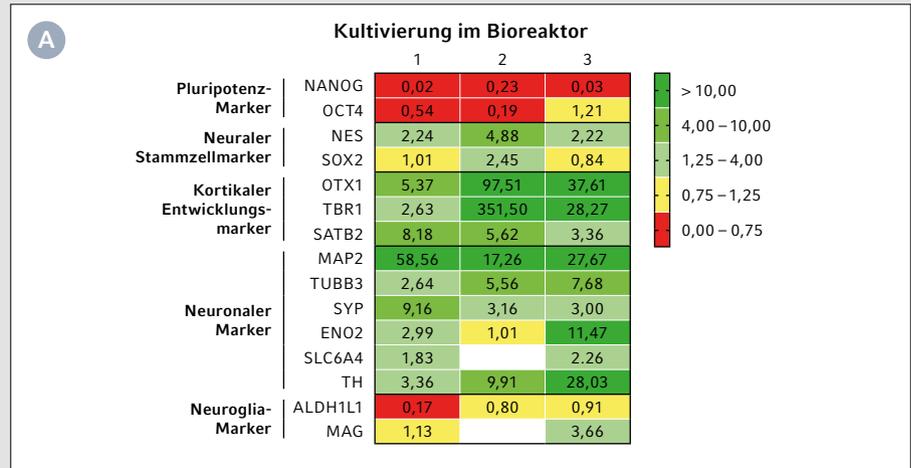


Abb. 2A: X-fache Veränderung der mRNA-Expression von Neurosphären am Endpunkt von drei unabhängigen Bioprozessen (Tag 22–32), im Vergleich zu hiPSC-Sphäroiden. Falls keine Expression in den hiPSC-Proben gemessen werden konnte, konnte keine Veränderung errechnet werden und Felder wurden leer belassen. **2B:** Expression der neuronalen Stammzellmarker PAX6 und Nestin. Maßstab: 250 µm.

Fazit

Das DASbox Mini Bioreactor System ermöglichte eine effiziente Formierung von hiPSC-Sphäroiden sowie nachfolgende neuronale Induktion. Neurosphäroide, die in drei unabhängigen Bioprozessen erzeugt worden waren, zeigten vergleichbare Expressionsmuster sowohl auf der RNA- als auch auf der Proteinebene. Die Bioreaktor-Technologie ist in der Lage, eine ausreichende Anzahl von Zellen für Anwendungen wie z.B. individualisierte Arzneimittelprüfungen in mikrophysiologischen Systemen zu erzeugen. Falls größere Zellzahlen für zukünftige Anwendungen benötigt werden, ist die Maßstabsvergrößerung durch parallele

Bedienung mehrerer Bioreaktoren oder durch Einsatz größerer Gefäße möglich.

Die vollständige Application Note können Sie unter www.eppendorf.com/appnote364 herunterladen.

Literatur

- [1] Sloan SA, et al. *Neuron*. 2017;95(4):779-790. e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.035.
- [2] Yan Y, et al. In: *Methods in Molecular Biology*. 2015:119-128. doi:10.1007/7651_2015_310.
- [3] Rigamonti A, et al. *Stem Cell Reports*. 2016; 6(6): 993-1008. doi:10.1016/j.stemcr.2016.05.010.
- [4] Marx U, et al. 2016; *Altex* 33.3: 272.
- [5] Leopold Koenig, et al. Eppendorf Application Note 364, 2018. www.eppendorf.com/appnote364

Mastercycler® Thermocycler: Sparen Sie Zeit und Geld bei der PCR

DUTT WAY WONG, JENNY LAU, YEE MIN KHOR, EPPENDORF ASIA PACIFIC REGIONAL CENTER, KUALA LUMPUR, MALAYSIA
ARORA PHANG, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Thermocycler, die auf dem Markt erhältlich sind, verfügen über unterschiedliche Temperieraten. Einer der offensichtlichen Vorteile schneller Temperieraten ist eine zügigere Durchführung der PCR und somit eine erhöhte Arbeitsproduktivität. Es sind jedoch nicht nur die Temperieraten, die eine schnellere Durchführung der PCR ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Zeit, die für eine 3-Schritt bzw. 2-Schritt PCR eines GC-reichen Templates auf fünf verschiedenen Thermocyclern benötigt wird. Es wird ebenfalls die Kostenersparnis betrachtet, die durch eine Verringerung des Volumens erzielt wird. Ein idealer Thermocycler wäre in der Lage, dem Anwender sowohl Zeit (schnellere Durchführung der PCR) als auch Kosten (reproduzierbare Ergebnisse bei geringerem Volumen) einzusparen, indem der Aufwand für die Optimierung und auch für nachfolgende Routineläufe reduziert wird.

Die Thermocycler Mastercycler® nexus GSX1 und nexus gradient von Eppendorf waren nachweislich in der Lage, sogar schwierige Templates mit Hilfe einer breiten Auswahl von Enzymen mit hoher Geschwindigkeit und hoher Reproduzierbarkeit bei geringem Kostenaufwand zu amplifizieren.

Einleitung

Der wissenschaftliche Fortschritt hat dazu geführt, dass eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) heutzutage sowohl mit geringerem Zeitaufwand als auch preiswerter durchgeführt werden kann. Die Gradientenfunktion hat das Austesten verschiedenener Temperaturen in einem einzelnen PCR-Lauf ermöglicht.

Thermocycler mit immer höheren Temperieraten werden sukzessive in den Markt eingeführt. „Fast PCR“-Verbrauchsmaterialien und -Reagenzien verkürzen den Lauf einer PCR immer mehr. Bei bestimmten schwierigen Anwendungen sind diese Weiterentwicklungen jedoch nicht immer problemlos umsetzbar, da sie mit drastisch höheren Kosten verbunden sind.

Bestimmte PCR-Amplifikationen von GC-reichen Templates, wie z.B. die Promotor-Region eines Gens, erfordern aufgrund der Ausbildung von Sekundärstrukturen höhere Schmelztemperaturen. Die erforderlichen höheren Denaturierungs- und Annealingtemperaturen schränken die mit höheren Temperieraten verbundenen Vorteile ein, da die Hitze in die Probenflüssigkeit übertragen werden muss. Aus diesem Grund wird eine Zeitersparnis bei dieser Anwendung in der Regel durch die Kombination der Annealing- und Extensionsschritte erzielt (auch 2-Schritt PCR genannt). Dies reduziert die Zeit, die für den Übergang zwischen den einzelnen Schritten aufgebracht werden muss, da die Temperaturen näher beieinanderliegen. Glücklicherweise sind Temperieraten nicht allein für eine schnellere Durchführung der PCR verantwortlich. Eine effiziente Kontrolle von Aufheizen und Abkühlen wirkt sich sowohl auf die Laufzeit als auch auf die Leistungsfähigkeit des Thermocyclers aus, was für zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse von wesentlicher Bedeutung ist.

Ziel dieser Studie ist, die Amplifikationseffizienz verschiedener Thermocycler bei der Amplifikation von GC-reichen Templates zu untersuchen.

Material

Wir haben die Unterschiede zwischen 3-Schritt und 2-Schritt PCR des BAIP3-Gens auf fünf Thermocyclern (Tabelle 1) in Bezug auf Amplifikationseffizienz, Reproduzierbarkeit, Kosten der PCR-Reagenzien und Gesamtlaufzeit miteinander verglichen.

Thermocycler	Max. Block-Heizrate
Mastercycler® nexus GSX1 (Eppendorf)	5°C/s
Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf)	3°C/s
Veriti® Fast (Applied Biosystems®)	5°C/s
SimpliAmp™ (Life Technologies®)	4°C/s
T100 (Bio-Rad®)	4°C/s

Tabelle 1: Liste der Thermocycler in dieser Studie

Zeitersparnis

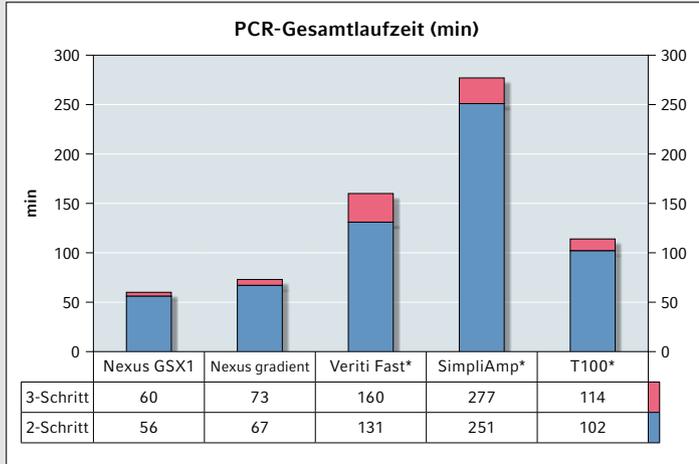
GC-reiche Primer haben die Eigenschaft, dass sie unspezifisch an das Template binden, was nicht selten dazu führt, dass bei einigen Temperaturen mehrere Produkte entstehen. Aus diesem Grund ist eine Gradientenfunktion in einem Thermocycler wichtig, um verschiedene Temperaturen in einem einzigen Lauf zu testen. Verschiedene Thermocycler verwenden hierzu unterschiedliche Gradiententechnologien oder -formate (8 horizontale Reihen oder 12 vertikale Spalten auf einem 96-Well-Block).

Eppendorf-Thermocycler nutzen die Strategie der 12 vertikalen Spalten, was es dem Anwender ermöglicht, 12 verschiedene Temperaturen in jedem Gradientenmodus zu testen. Hierdurch können bei der Optimierung mehr Temperaturen getestet werden und es entfällt die Notwendigkeit eines weiteren Laufes, der mit zusätzlichen Vorbereitungen und Wartezeiten verbunden wäre. Im Gegensatz dazu benötigt der SimpliAmp Cycler vier separate PCR-Läufe, um 12 verschiedene, vergleichbare Annealingtemperaturen zu erzeugen.

Zusätzlich kann die Gesamtlaufzeit der PCR reduziert werden, indem die Annealing- und die Extensionsschritte kombiniert werden. Dadurch wird die Zeit, die der Cycler benötigt, um die Temperatur beim Übergang zwischen den Schritten zu erhöhen oder zu senken, gespart. Wie erwartet wurde die 2-Schritt PCR in allen Cyclern innerhalb einer kürzeren Zeit absolviert als die 3-Schritt PCR. Allerdings hängt der Zeitunterschied zwischen den beiden Programmen stark von dem jeweiligen Cycler ab (Abb. 1). Dies kann auf verschiedenen Faktoren beruhen, z.B. darauf, wie effizient ein Cycler den Temperaturwechsel zwischen den einzelnen Schritten durchführt.

Zusätzlich kommen schnelle Laufzeiten nur dann zum Tragen, wenn die PCR die gewünschten Ergebnisse liefert, was auf bestimmte Thermocycler nicht unter allen Bedingungen zutrifft (Abb. 2A, 2B).

Mastercycler® Thermocycler: Sparen Sie Zeit und Geld bei der PCR



*Diese Thermocycler benötigen aufgrund der niedrigen Anzahl der pro Lauf zur Verfügung stehenden Gradiententemperaturen mehr als einen einzigen Lauf. Aus diesem Grund sind hier die kumulativen Zeiten aller Läufe aufgeführt, die zur Erzeugung von 12 Annealingtemperaturen erforderlich waren.

Abb. 1: Vergleich der Gesamtlaufzeiten zwischen 3-Schritt und 2-Schritt PCR

Reaktion Reagenzienkosten einzusparen. Ein Thermocycler, der mit verschiedenen Enzymen unterschiedlicher Preisklassen solide Ergebnisse liefert, minimiert die Abhängigkeit von teuren Enzymrezepturen. Wenn alle Faktoren in Betracht gezogen werden, muss das Einsparen von Ressourcen (Kosten, Zeit, Aufwand) mit der Qualität der Ergebnisse (Reproduzierbarkeit) im Einklang stehen, um eine endgültige Entscheidung über die Qualität des Thermocyclers treffen zu können.

Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass die Eppendorf-Thermocycler Mastercycler nexus GSX1 und Mastercycler nexus gradient die Amplifikation von GC-reichen Templates mit einer breiten Palette von Enzymen sogar bei kleinem Reaktionsvolumen zuverlässig unterstützen. Gleichzeitig bieten die Mastercycler, abhängig vom Lauf, die Flexibilität, zwischen 3-Schritt und 2-Schritt Protokollen zu wählen. Somit stellen sie die idealen Thermocycler dar, wenn es darum geht, dem Anwender bei der Optimierung sowie bei nachfolgenden Routineläufen sowohl Zeit (schnellere Durchführung der PCR) als auch Kosten (reproduzierbare Ergebnisse bei geringerem Volumen) einzusparen.

**Gekürzte Darstellung. Die vollständige Application Note steht unter www.eppendorf.com/appnote392 zur Verfügung.

Mit allen Enzymen und PCR-Strategien benötigten der Mastercycler nexus GSX1 und der Mastercycler nexus gradient die geringste Zeit, um eine PCR erfolgreich durchzuführen. Dies steigert nicht nur die Produktivität eines Labors, indem der Thermocycler häufiger pro Tag eingesetzt werden kann; ebenso vereinfacht sich die gemeinsame Nutzung eines Gerätes durch mehrere Anwender eines Labors.

Kostensparnis

Reagenzienkosten können reduziert werden, indem weniger spezialisierte, preiswertere Reagenzien zusammen mit allgemein gebräuchlichen Zusatzstoffen (z.B. DMSO) eingesetzt werden. Auch kann ein geringeres Reaktionsvolumen eingesetzt werden.

Diese Studie zeigte, dass ausschließlich mit dem Mastercycler nexus GSX1 und dem Mastercycler nexus gradient mit allen drei eingesetzten Enzymen eine erfolgreiche Amplifikation erzielt werden konnte, sogar wenn das Volumen auf 5 µL reduziert wurde (Abb. 2A, 2B).

Für viele andere Cycler haben wir gelegentlich Ausfälle bei den Amplifikationen beobachtet. Diese konnten, insbesondere bei Reaktionsvolumina von 5 µL, auf hohe Verdunstungsraten zurückgeführt werden, die einen teilweisen oder vollständigen Verlust des Reaktionsmixes zur Folge hatten.

Ein Thermocycler, welcher in der Lage ist, in einem geringen Reaktionsvolumen reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen, ermöglicht es dem Anwender, pro

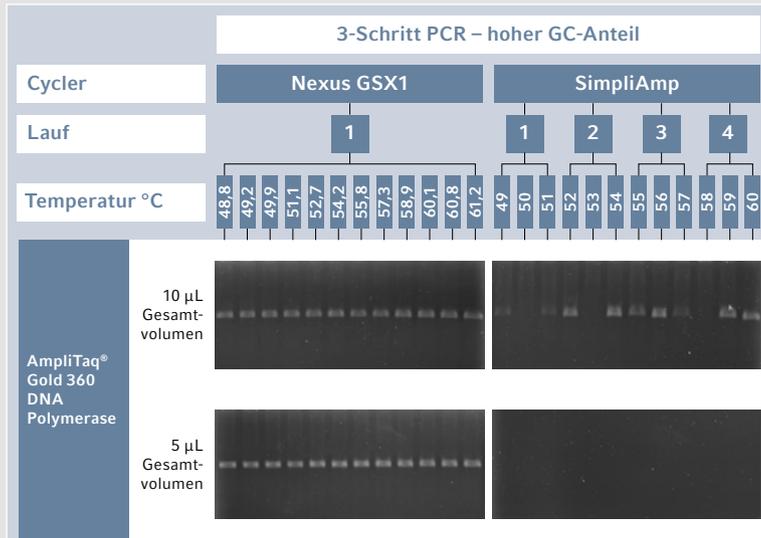


Abb. 2A: Amplifikation von BAIP3 mit Hilfe der 3-Schritt PCR**

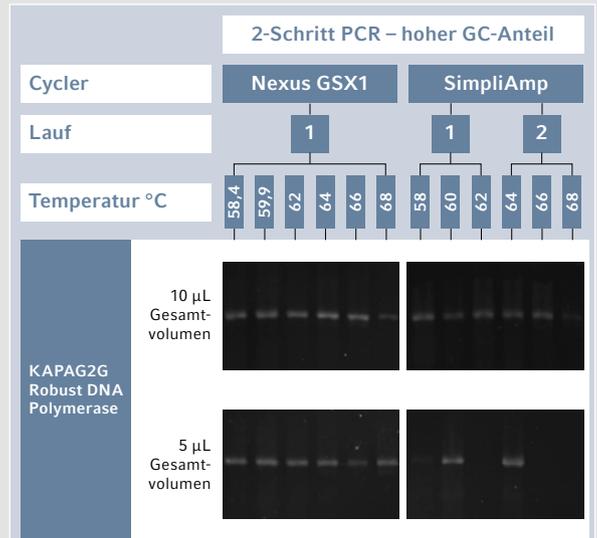


Abb. 2B: Amplifikation von BAIP3 mit Hilfe der 2-Schritt PCR**

ICSI bei der Maus mit dem Eppendorf PiezoXpert®: Steigerung der Überlebensraten von Oozyten nach der Injektion

NUNO COSTA-BORGES, ENRIC MESTRES, IVETTE VANRELL, MARIA GARCÍA, GLORIA CALDERÓN, EMBRYOTOOLS SL, BARCELONA, SPANIEN
SANDRA STOBRAWA, EPPENDORF AG, HAMBURG

Einleitung

Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) stellt eine effiziente Methode dar, die erfolgreich zur Befruchtung von Metaphase II (MII) Oozyten eingesetzt wird. Während die konventionelle ICSI-Technik, die auf der Injektion von Spermien in Oozyten mit Hilfe einer abgechrägten spitzen Mikrokapillare beruht, beim Menschen erfolgreich etabliert wurde, hat sich diese Methode bei der Maus als äußerst diffizil erwiesen. Dies lässt sich hauptsächlich auf die Empfindlichkeit der Maus-Oozyte zurückführen, die im Vergleich zur menschlichen Eizelle eine geringere Viskosität des Zytoplasmas und ein extrem elastisches Oolemma aufweist. Aus diesem Grund übersteigen die Überlebensraten von Maus-Oozyten nach konventioneller ICSI selten 50 %. Um diese niedrigen Überlebensraten zu überwinden, wurde die piezo-unterstützte Mikromanipulationsmethode etabliert, bei der die Mikrokapillare mit stumpfem Tip-Ende über kurze präzise Elektroimpulse vorwärtsgetrieben wird, was eine effiziente Penetration der Membranen ermöglicht [1, 2].

Dieser Vorgang ist weniger traumatisch als die konventionelle ICSI, und es wurden höhere Überlebensraten berichtet. Dennoch bereitet in vielen Laboren diese technisch aufwändige Methode Schwierigkeiten. Neben allgemeinen Faktoren (wie z.B. Raumtemperatur, Medium, usw.) kann die Injektionstechnik selbst zum beobachteten Fehlen an konstanten Ergebnissen der Überlebensraten beitragen. Nachfolgend wird ein modifiziertes piezo-unterstütztes ICSI-Verfahren unter Zuhilfenahme des Eppendorf PiezoXpert beschrieben, welches sogar relativ unerfahrenen Anwendern ermöglicht, die Überlebensraten bei Mäusen auf nahezu 100 % anzuheben.

Material und Methoden

Vorbereitung des Mikromanipulationsaufbaus

Es wird eine ICSI-Mikromanipulationsarbeitsstation (z.B. 2 TransferMan® 4r, 2 CellTram® 4r Air/Oil, Eppendorf) benötigt, die eine Handhabung der Mikro-

kapillaren zur Fixierung der Oozyte als auch zur Spermieninjektion erlaubt.

Eine Mikromanipulationsschale wird mit kleinen Tröpfchen von Manipulationsmedium (z.B. HEPES-gepuffert und mit 5 µg/mL Cytochalasin B versetzt) als auch mit einem Tröpfchen von 10% (v/v) PVP zur Isolierung der Spermienköpfe vorbereitet. Die ICSI-Mikrokapillaren, die in der piezo-unterstützten Mikromanipulation eingesetzt werden, sind üblicherweise mit einem langen, stumpfendigen Tip (Piezo Drill Tip ICSI Kapillare, Eppendorf) ausgestattet und werden mit Fluorinert (FC-40, Sigma-Aldrich®, USA) befüllt. Die zu wählenden Parameter für die Piezo-Impulse (Intensität, Geschwindigkeit und Anzahl der Pulse) sind in der Regel von individuellen Laborbedingungen abhängig und sollten daher für jedes Experiment optimiert und justiert werden.

Generell erfordert die Penetration der Zona Pellucida einen stärkeren Piezo-Impuls (z.B. Intensität: 10–40, Geschwindigkeit: 5–7, Puls: ∞, im Kanal A des PiezoXpert einzustellen), wohingegen das elastische Oolemma mit einem sanfteren Impuls (z.B. Intensität: 1–10, Geschwindigkeit: 1–7, Puls: 1, im Kanal B einzustellen) behandelt werden sollte.

Die Immobilisierung der Spermien durch Trennung zwischen Kopf und Schwanz wird mit stärkeren Piezo-Impulsen erzielt (z.B. Intensität: 10–40; Geschwindigkeit: 5–10, Puls: ∞).

Aufbereitung des biologischen Materials

Maus MII Oozyten und Maus-Spermien werden, wie bereits an anderer Stelle beschrieben, gewonnen und vorbereitet [4]. Ausgereifte Oozyten werden in die Tröpfchen mit Manipulationsmedium überführt und für mindestens 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor das ICSI-Verfahren eingeleitet wird. Zum Zwecke der Isolierung der Spermienköpfe sollten die Spermien in das PVP-Tröpfchen überführt werden. Ein einzelnes bewegliches Spermium sollte ausgewählt werden und mit dem Schwanz voraus in die Mikrokapillare aufgenommen werden.

Das Spermium wird dann so positioniert, dass der Hals gerade an der Öffnung der Kapillare zum Erliegen kommt, um mit Hilfe einiger starker Piezo-Impulse den Kopf vom Schwanz abzutrennen.

Modifizierte piezo-unterstützte ICSI mit Aspiration des Zytoplasmas zur Minimierung von Lyse

Nachdem die Spermienköpfe in die ICSI-Kapillare aufgesammelt wurden, werden sowohl die Halte- als auch die ICSI-Kapillare in die Richtung eines Tröpfchens mit Oozyten bewegt. Eine Oozyte wird sodann fest an der Haltekapillare fixiert, und der Fokus des inversen Mikroskops wird an der äquatorialen Ebene der Oozyte ausgerichtet. Die Mikroinjektionskapillare, welche mit dem Spermienkopf beladen ist, wird dann in dieselbe Fokusebene gebracht (Abb. 1A).

Darauffolgend wird die Zona Pellucida mit Hilfe stärkerer Piezo-Impulse des Kanals A des PiezoXpert penetriert (Abb. 1B–C).

Ein Spermienkopf wird sodann nahe des Tip-Endes der ICSI-Kapillare positioniert. Die ICSI-Kapillare wird dann in die Oozyte bis fast zum gegenüberliegenden Ende der Oozyte nahe der Haltepipette hineingedrückt, was zu einer tiefen Einbuchtung in der Oozyte führt (Abb. 1D–E).

Zu diesem Zeitpunkt wird eine geringe Saugkraft in die ICSI-Kapillare übertragen, und ein einzelner sanfter Piezo-Impuls wird ausgelöst (in Kanal B eingestellt), um das elastische Oolemma zu durchbrechen. Der Spermienkopf wird dann vorsichtig in das Zytoplasma der Oozyte abgegeben (Abb. 1F).

Nachfolgend wird die Spitze der ICSI-Kapillare schnell aus der Oozyte zurückgezogen; gleichzeitig wird am rechten Ende der Einbuchtung ein wenig Oolemma in das Tip-Ende der Kapillare eingesaugt (Abb. 1G).

Durch das gleichzeitige Zurückziehen der Mikropipette und Aspirieren ist es möglich, das entstandene Loch im Oolemma zu schließen (Abb. 1H–I).

ICSI bei der Maus mit dem Eppendorf PiezoXpert®: Steigerung der Überlebensraten von Oozyten nach der Injektion

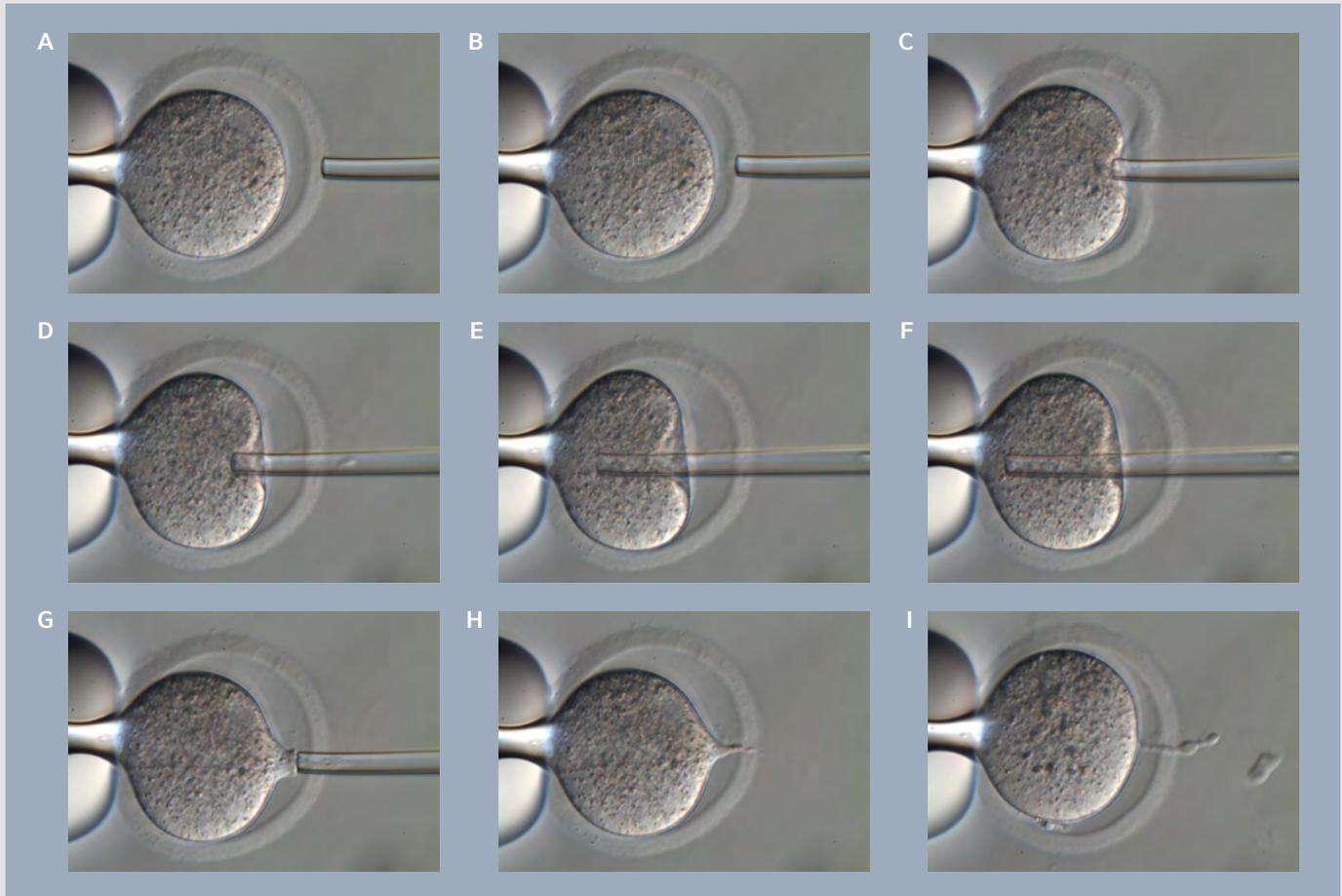


Abb. 1: Piezo-unterstützte Maus-ICSI mit Hilfe der modifizierten Technik.

(A–C) Die äquatoriale Ebene der Oozyte und die Piezo ICSI-Kapillare sind im mikroskopischen Fokus ausgerichtet. Ein stärkerer Piezo-Impuls wirkt auf die ICSI-Kapillare ein, um die Zona Pellucida zu penetrieren. (D–F) Die mit dem Spermienkopf beladene ICSI-Kapillare wird sodann tief in die Oozyte bewegt. Minimale Saugkraft wird auf die ICSI-Kapillare ausgeübt, mit einem einzigen sanften Piezo-Impuls wird das Oolemma penetriert, und das Spermium wird in das Zytoplasma entlassen. (G–I) Beim Herausziehen der ICSI-Kapillare aus der injizierten Oozyte wird ganz am rechten Ende der Einbuchtung eine kurze Saugkraft in der Kapillare angelegt. Dies sorgt für eine Schließung des penetrierten Oolemmas.

Die injizierten Oozyten müssen nachfolgend sorgfältig im Kulturmediumtröpfchen gewaschen werden, um Rückstände des HEPES-Puffers und des Cytochalasin B, welche sich im Manipulationsmedium befinden, zu eliminieren. Sodann können die injizierten Oozyten unter entsprechenden Bedingungen kultiviert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Die hier beschriebene Methode wurde aus der ursprünglichen von Professor Yanagimachi entwickelten Technik [1] adaptiert, mit der Absicht, das Risiko einer auf die piezo-unterstützten Maus-ICSI folgenden Zell-Lyse zu verringern. Die Penetration des Oolemmas sollte mit Hilfe eines sanften Piezo-Impulses durchgeführt werden, welcher gerade noch eine erfolgreiche Durchbohrung

erzielt, die Zelle jedoch nicht durch laterale Schwingungen belastet. Die Schließung des Oolemmas durch kurzes Ansaugen dieser penetrierten Zellregion in die ICSI-Kapillare beim Verlassen der Oozyte minimiert das Risiko einer Zell-Lyse. Es wird empfohlen, diesen Vorgang in einem mit Cytochalasin B versetzten Manipulationsmedium durchzuführen, da diese Substanz die Mikrofilamente zerstört, was die Oozytenmembran entspannt und somit eine schnelle Heilung der Membran nach der Injektion des Spermiums in das Zytoplasma ermöglicht. Mit ein wenig Übung sowie optimalem Versuchsaufbau und unter idealen experimentellen Bedingungen ist zu erwarten, dass diese Methode die Überlebensrate der injizierten Oozyten auf nahezu 100% anzuheben vermag. Die Wirksamkeit eines Piezo-Drills ist nützlich – nicht nur

beim ICSI-Verfahren, sondern ebenso im Rahmen von anderen äußerst anspruchsvollen Mikroinjektions-Anwendungen, wie z.B. dem somatischen Zellkerntransfer oder der Injektion von hochkonzentrierten CRISPR-Komplexen [2, 3].

Literatur

- [1] Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52, 709–720 (1995).
- [2] Yoshida N, Perry AC. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc.* 2007; 2(2):296–304.
- [3] Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 2014; 9(8): 1956–68
- [4] Nagy A, Gerstenstein M, Vintersten K, Behringer B. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

FLORIAN BUNDIS, EPPENDORF AG

Erweitertes Anwendungsspektrum für große Benchtop-Zentrifugen

Bisher war die Verwendung der beliebten 250-mL-Flaschen auf Ausschwingrotoren mit einer maximalen Beschleunigung von etwas mehr als 5.000 x g und einer Kapazität von vier Flaschen je Lauf beschränkt. Im neuen Festwinkelrotor FA-6x250 lassen sich nunmehr sechs 250-mL-Flaschen bei mehr als 15.000 x g zentrifugieren. Das Anwendungsspektrum der großen gekühlten Benchtop-Systeme Centrifuge 5910 R und Centrifuge 5920 R von Eppendorf wird hierdurch deutlich erweitert.



Festwinkelrotor mit hoher Kapazität für ein weites Anwendungsspektrum mit max. Beschleunigung von 15,054 x g (10,100 rpm)

Beide Zentrifugen bieten ein umfangreiches Programm aus Festwinkel- und Ausschwingrotoren für Gefäße von 0,5 mL bis 1.000 mL. Sie stehen damit in vielen Workflows für unzählige Anwendungen zur Verfügung.

Zellernten in Flaschen bis 1.000 mL, DNA- und RNA-Isolierungen auch im großen Maßstab sowie Ficoll®-Gradienten für die

Lymphozyten- und Monozyten-Aufreinigung sind nur einige der vielen Einsatzgebiete.

Für die beliebten 250-mL-Flaschen hat Eppendorf nun den Festwinkelrotor FA-6x250 mit hoher Kapazität vorgestellt. Dieser Rotor erweitert das Anwendungsspektrum der großen, gekühlten Benchtop-Zentrifugen. Dies umfasst das Abernten von Bakterien, Algen und Hefen sowie von Säugerzellen in Gefäßen bis 250 mL. Ein weiterer Einsatzbereich ist die Extraktion von Plasmid-DNA und die Klärung von Lysaten nach dem Zellaufschluss.

Weniger Rotorenwechsel

Mit einer großen Auswahl von zwölf unterschiedlichen Adaptern werden umständliche Rotorenwechsel innerhalb eines Workflows auf ein Minimum reduziert. Eine Vielzahl von Gefäßtypen mit unterschiedlichsten Volumina kann nach einem einfachen Adaptertausch problemlos verwendet werden. Neben den üblichen konischen 15 mL- und 50 mL-Röhrchen schließt dies auch Blutentnahmeröhrchen, Oak Ridge-Zentrifugenröhrchen und Gefäße für die Durchflusszytometrie (FACS) mit ein. Das vereinfacht die Handhabung erheblich und spart kostbare Zeit.

Mehr Informationen unter www.eppendorf.com/next-benchmark



Große Auswahl von zwölf unterschiedlichen Adaptern für eine Vielzahl an Gefäßtypen unterschiedlichster Volumina

HANAË KÖNIG, EPPENDORF AG

NGS-Probenvorbereitung: 5 Punkte warum Automation sich lohnt

Die Hochdurchsatzsequenzierung, auch Next-Generation Sequencing (NGS) genannt, ist eine häufig genutzte Laboranwendung. Sie generiert in relativ kurzer Zeit große Mengen an Sequenzinformationen über DNA oder RNA aus dem unterschiedlichsten Probenmaterial. Die Probenvorbereitung kann je nach Methode bis zu mehreren Tagen dauern und besteht aus vielen Einzelschritten, die hohe Konzentration und viel Pipettiererfahrung erfordern. Lesen Sie hier über fünf wichtige Punkte bei der manuellen NGS-Probenvorbereitung und warum es sich lohnen kann, den gesamten Prozess mit Hilfe eines Pipettierautomaten wie der epMotion® 5073m NGS zu standardisieren.

Punkt 1: Präzision und Genauigkeit

Präzision und Genauigkeit hängen bei mechanischen Pipetten maßgeblich vom Benutzer ab. Eine korrekte Pipettiertechnik ist die Voraussetzung für verlässliche Ergebnisse. Da eine entsprechende Schulung in der Ausbildung von Laborpersonal meist nicht stattfindet, lautet die Devise in der Regel „Learning by doing“. Eine akkurate Durchführung jedes Flüssigkeitstransfers sowie die richtigen Umgebungsbedingungen sind jedoch essentiell, um die maximale Präzision und Genauigkeit der Dosierung zu gewährleisten. Hierzu gehört, dass die manuelle Pipette bei der Flüssigkeitsaufnahme vertikal und maximal 3 mm tief

in die Flüssigkeit eintaucht. Vor der Flüssigkeitsaufnahme soll die Pipettenspitze von innen vorbefeuchtet werden. Die Flüssigkeitsabgabe erfolgt im Idealfall in einem Winkel von 45 Grad. Die ständige Einhaltung dieser Vorschriften ist in der Hektik des Laboralltags allerdings oft nicht möglich bzw. sehr anstrengend und zeitraubend.

Im Gegensatz dazu sind standardisierte Flüssigkeitstransfers mithilfe eines Pipettierautomaten so voreingestellt, dass konstant die optimale Präzision und Genauigkeit erreicht wird, selbst wenn verschiedene Flüssigkeitstypen transferiert werden.

Anders als beim manuellen Pipettieren muss man sich selbst beim Pipettieren sogenannter „schwieriger“ Flüssigkeiten wie Ethanol oder PCR Mastermix keine Sorgen um eine saubere Pipettiertechnik machen.

Punkt 2: Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von Resultaten ist die entscheidende Stellgröße für die Aussagekraft von Laborergebnissen. Dies gilt nicht nur für Forschungs- und Entwicklungslabore, sondern insbesondere für die Biotech- und Pharmabranche. Ob ein Versuchsansatz mindestens ein zweites Mal mit dem gleichen Ergebnis aufwarten kann, muss demonstriert werden, und genau das ist leider häufig sehr schwierig. Jeder Laborant kann ein Lied davon singen, dass komplexe Experimente oft nur von einem Mitarbeiter reproduziert werden können. Aber auch dieser kann je nach Tagesform bei dem Versuch, ein Ergebnis zu reproduzieren, scheitern. Zwar können Gründe wie z.B. Qualitätsschwankungen bei Reagenzienchargen eine Rolle spielen, es ist jedoch bekannt, dass die individuelle Gefühlslage die Konzentrationsfähigkeit und körperliche Leistungsfähigkeit stark beeinflusst.

Was passiert also, wenn die für ein bestimmtes Experiment zuständige Person ausfällt, ob durch Urlaub, Krankheit oder Jobwechsel? Nicht selten muss das Experiment dann neu etabliert werden – mit einem beträchtlichen Mehraufwand an Zeit und Arbeit.



Resultate, die von einem Pipettierautomaten unterstützt wurden, sind hingegen einfacher zu reproduzieren. Die Leistung und Qualität von automatisierten Prozessen bleibt konstant, egal zu welcher Tages- oder Nachtzeit gearbeitet wird. Werden Pipettierautomaten für Routineaufgaben eingesetzt, können diese von mehreren Mitarbeitern genutzt werden, wobei die Pipettiervorgänge immer auf die gleiche Weise durchgeführt werden.

Auch bei starker Arbeitsbelastung von Labormitarbeitern kann auf gute Ergebnisse vertraut werden, da der Pipettierautomat Aufgaben übernimmt, die hohe Konzentration und zahlreiche Pipettierschritte erfordern. Der Einsatz eines Pipettierautomaten entlastet Labormitarbeiter und führt gleichzeitig zu schnellerem Erfolg, wenn Resultate reproduziert werden müssen.

Punkt 3: Dokumentation und Sicherheit

Das Führen von Laborbüchern, das Reservieren von Geräten sowie das Archivieren von Audit-relevanten Dokumenten ist lästig, jedoch unumgänglich, besonders in regulierten Laboren. Durch elektronische Laborbücher und die Vernetzung von Laborgeräten können viele Dokumentationsschritte stark vereinfacht werden. Logbücher und Protokolle können automatisch gespeichert und Experimenten zugeordnet werden. Nicht zuletzt ermöglichen neue Softwarelösungen, wie z.B. VisioNize®, die Vernetzung von Laborgeräten untereinander und die Fernüber-

wachung über ein mobiles Endgerät. So können Benachrichtigungen über Laufzeiten, Fehlermeldungen und die Beendigung des Experiments per Mail zugestellt werden. Besonders wenn sich nicht alle Geräte im selben Raum befinden, ermöglicht ein solches System entspannteres Arbeiten, und Labormitarbeiter können sich voll auf andere Aufgaben konzentrieren. Der Pipettierautomat kann einen Großteil der lästigen Dokumentation des Experiments übernehmen und schafft somit auch zeitliche Freiräume im Laboralltag.

Punkt 4: „Walk-away-Zeit“

Die manuelle Erstellung von DNA-Bibliotheken ist sehr arbeitsaufwendig und dauert Stunden bis hin zu mehreren Tagen, wobei natürlich auch Inkubationszeiten enthalten sind. Während solcher Inkubationszeiten kann man sich anderen Aufgaben widmen. Dies setzt eine sorgfältige Tagesplanung voraus. Besonders erfahrene Labormitarbeiter schachteln die einzelnen Tätigkeiten zeitlich optimal ineinander, um möglichst viele Arbeitsschritte in möglichst geringer Zeit abzuarbeiten.

Überlässt man die Erstellung von DNA-Bibliotheken einem Gerät, gewinnt man mehr Walk-away-Zeit und somit mehr Flexibilität für die tägliche Arbeitsplanung. Mitarbeiter können sich auf neue Aufgaben konzentrieren, während der Pipettierautomat mehrere Schritte oder den gesamten Ablauf übernimmt.

Punkt 5: Verletzungsgefahr

Gefahrenquellen im Labor umfassen nicht nur Gefahrenstoffe oder scharfe Gegenstände. Auch die permanente Dauerbelastung einzelner Muskelgruppen beim Pipettieren kann zu Verletzungen, chronischen Schäden und sogar zur Arbeitsunfähigkeit führen.

Gerade das Pipettieren mit mechanischen Pipetten ist eine der häufigsten Ursachen für chronische Erkrankungen wie z.B. Karpaltunnel- oder RSI*-Syndrom. Damit verbundene Symptome wie Schmerzen in Nacken, Schulter, Unterarm oder Hand, Kraftverlust in der Hand oder Taubheitsgefühle sind die Folgen langer Pipettierserien und der Dauerbelastung des Daumenbeugers, der Unterarm- sowie der Oberarmmuskulatur.

Das Tückische ist, dass die Symptome oft erst nach Jahren auftreten und dann schwierig zu bekämpfen sind. Daher ist die Vorbeugung eine der besten Methoden, um Erkrankungen durch Überbelastung zu verhindern. Wenn sinnvoll und möglich, ist es angeraten, entweder elektronische Pipetten zu nutzen oder – bei häufig wiederkehrenden Arbeiten – auf einen Pipettierautomaten umzusteigen.

*Repetitive Strain Injury

Fazit

Wiederkehrende Pipettierarbeiten oder langwierige Pipettierserien einem Pipettierautomaten zu überlassen, bringt vielfältige Vorteile, die den Mitarbeiter entlasten sowie Sicherheit und Verlässlichkeit bieten.

Ergebnisse werden präziser und reproduzierbarer, und Experimente müssen weniger oft wiederholt werden. Diese Punkte freuen nicht nur den Laborleiter, sondern auch den Forscher selbst. Darüber hinaus steigt die Vergleichbarkeit unter Experimenten, und die Dokumentation von Arbeitsabläufen wird erleichtert. Da schlägt dann auch das Herz des Qualitätsmanagers höher.

Weitere Informationen auf

www.ependorf.com/automation



JAN-HENDRIK BEBERMEIER, EPPENDORF AG

Digitalisieren Sie Ihre –80 °C-Schätze!

Über viele Jahre hinweg sammeln Sie Hunderte und Tausende von Proben. Proben, die das Ergebnis jahrelanger harter Arbeit sind. Proben von hohem Wert. Bei –80 °C gelagerte Proben sollten daher sicher und wiederauffindbar gelagert sowie gut lesbar beschriftet und gepflegt sein. Lesen Sie hier, wie Sie stets den Überblick über Inhalt und Leistung Ihres Freezers behalten.



Haben Sie jemals den Wert der Proben in Ihrem Ultratiefkühlschrank berechnet oder überschlagen, wie viele Stunden, Tage, Wochen und Monate Sie im Labor verbracht haben, um diese Proben herzustellen?

Mehr als 50.000 Proben passen in große Ultratiefkühlgeräte. Der Wert jeder einzelnen Probe ist unterschiedlich – vom einfachen Puffer bis hin zu hochwertigen Zellextrakten, teuren Enzymen oder sehr seltenem Probenmaterial. Bei durchschnittlich 10 € pro Ampulle erreicht der Gesamtwert bereits 500.000 €, d.h. Ihr Freezer ist eine wahre Schatzkammer!

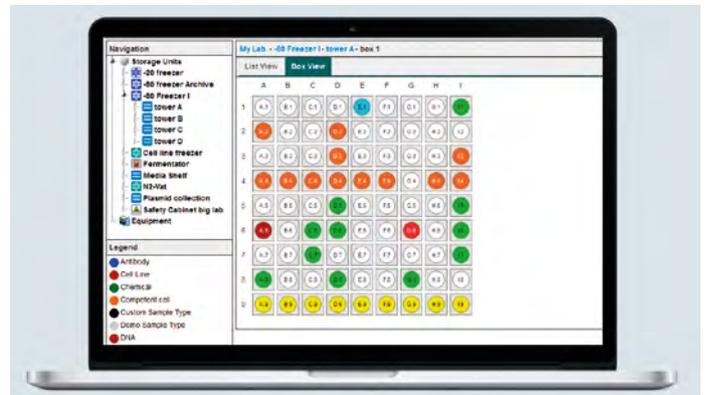
Sicherheit für Ihre gefrorenen hochwertigen Proben

Mit dem VisioNize®-Überwachungskonzept für Ultratiefkühlgeräte wie z.B. CryoCube® F740hi und CryoCube hiw können Sie die Freezerleistung jederzeit überprüfen. Alle Temperaturdaten und Ereignisse werden im Freezer-Steuergerät von VisioNize gespeichert.

Um Ihre wertvollen Proben sicher, einfach auffindbar und zugänglich zu lagern, ist eine sorgfältige Kennzeichnung nötig. Gedruckte Etiketten auf Proben können entweder Klarschrift, einen Bar- oder QR-Code oder beides enthalten. Eine intelligente Probenkennzeichnung ist letztendlich entscheidend für die sichere Identifizierung und für sichere Ergebnisse.

Die genaue Kennzeichnung der Proben und die sachgerechte Lagerung in Lagerungsboxen sind nur der Anfang. Über den Inhalt Ihres Ultratiefkühlschranks müssen Sie genaue Aufzeichnungen führen. Viele Wissenschaftler verwenden immer noch Tabellenkalkulationssoftware oder sogar papierbasierte Listen, um den Überblick zu behalten. Das funktioniert zwar, birgt jedoch Risiken durch menschliches Versagen, Beschädigung und Fehllagerung.

In Anlehnung an das PhysioCare® Concept für ergonomische und sorgenfreie Arbeitsbedingungen empfehlen wir die Verwendung eines intuitiven und zuverlässigen Probenmanagement-Tools. Softwarelösungen wie eLABInventory machen Ihr Laborleben komfortabler und effizienter.



Informationen und Wissen leicht auffindbar

Endlose Arbeitsstunden von Ingenieuren, Chemikern, Molekularbiologen, Biotechnologie-Experten und vielen mehr fließen in die Entwicklung von Eppendorf-Produkten. So entsteht ein unschätzbare Fundus an Wissen und Erfahrung zu Liquid Handling, Cell Handling und Sample Handling, den wir auf www.eppendorf.com/handling-solutions gerne mit Ihnen teilen. Jetzt frisch erweitert um Beiträge zur Probenlagerung bei –80 °C.

ULRIKE RASCHE, EPPENDORF AG BIOPROCESS CENTER, JÜLICH

Kleines Zubehör – große Wirkung

Seit Jahren setzen Bioprozess-Spezialisten das parallele DASbox® Mini Bioreactor System erfolgreich in der Prozessentwicklung ein, und sie schätzen seine Vielseitigkeit. Eppendorf möchte das Leben seiner Anwender erleichtern und nimmt Kunden-Feedback sehr ernst. So entstand das neueste, intensiv getestete Zubehör, das Ihnen ein verbessertes Nutzungserlebnis bieten soll.

Bei einem Bioprozess werden Flüssigkeiten in den Bioreaktor gepumpt, um z.B. den pH-Wert des Mediums einzustellen oder die Kultur zu füttern. Allein um Säure und Base zur pH-Kontrolle, Nährlösung und ein Anti-Schaum-Mittel einzupumpen, werden pro Gefäß vier Dosierleitungen benötigt. Mit mehreren Bioreaktoren im Parallelbetrieb vervielfacht sich diese Anzahl. Das Resultat ist ein Gewirr aus Dosierleitungen – wir nennen es Spaghetti-Syndrom.

Schluss mit dem Spaghetti-Syndrom

Kleine Zubehörteile, wie die neuen Kabeldriller zur Führung von Dosierleitungen, schaffen Abhilfe (Abb. 1).



Abb. 1: Führung der Dosierleitungen mit Hilfe von Kabeldrillern

An der Unterseite mit Klebeband versehen, werden diese einfach an der DASbox Grundeinheit befestigt. Kabeldriller werden mit jedem neuen DASbox Mini Bioreactor System mitgeliefert und sind auch separat erhältlich, um vorhandene Systeme nachzurüsten.

Behalten Sie den Überblick

Für den optimalen Überblick über die Dosierleitungen haben wir die Kenn-

zeichnung der Leitungen verbessert. Die neuen Etiketten werden per Kabelbinder an den Dosierleitungen fixiert. Da beide Enden beschriftet werden, lässt sich der Verlauf jeder Dosierleitung einfach nachverfolgen und dem richtigen Pumpenkopf zuordnen (Abb. 2). Mit neuen DASbox Systemen gelieferte C-Flex Dosierleitungen sind vorbeschriftet. Zur individuellen Kennzeichnung bieten wir die Etiketten auch separat an.

Gut gesichert

Während der Reinigung (s. Kasten) werden die Dosierleitungen mit einer Abfallflasche verbunden. Damit diese nicht umkippt, stattdessen wir den DASbox Flaschenhalter jetzt mit einer Federklemme aus. Ein Upgrade-Kit für vorhandene Systeme ist erhältlich.



Abb. 2: Dosierleitung mit neuer Beschriftung, bestehend aus Kabelbinder, Kennschild und selbstklebendem Etikett

Nahaufnahme

Flüssigkeitszugabe in den Bioreaktor



Über die im System integrierten Pumpen befördern Dosierleitungen Flüssigkeiten in den Bioreaktor. DASGIP® Dosierleitungen bestehen aus drei miteinander verbundenen Teilen: einer Dosierleitung, welche die Vorlageflasche und die Pumpe verbindet, dem Pumpenkopf-Schlauch, der in den Pumpenkopf eingesetzt wird, und einer weiteren Dosierleitung, die die Pumpe mit dem Bioreaktor verbindet. Bevor ein Bioprozess gestartet werden kann, muss der Anwender die Sterilität aller Dosierleitungen sicherstellen. Dosierleitungen aus PTFE werden an Ort und Stelle mit Ethanol und NaOH gereinigt und danach mit sterilem Wasser gespült. Dosierleitungen aus C-Flex können autoklaviert werden und sind somit ideal für Zellkulturanwendungen.

Vorsicht: Vergewissern Sie sich stets, welche Methode der Sterilisierung für das Material Ihrer Schläuche geeignet ist.

Die Dosierleitungen können mit den Schläuchen an den Bioreaktor-Anschlüssen entweder mit Luer-Lock-Konnektoren verbunden oder verschweißt werden.

Verschweißen der Dosierleitungen

- > Verhindert eine Unterbrechung der sterilen Barriere
- > Vereinfacht die Handhabung, da es außerhalb einer Sterilbank durchgeführt werden kann
- > Schweißbares Material erforderlich
- > Schläuche, die sich nicht zur Verschweißung eignen, müssen durch schweißbare Konnektoren ergänzt werden

Laden Sie das Short Protocol 33 herunter und lesen Sie über die Verschweißung von Dosierleitungen mit schweißbaren Konnektoren.

www.eppendorf.com/sp33

CAROLYN TAUBERT UND BERRIT HOFF, EPPENDORF AG

Eppendorf-Preisträger 2018/2019: Johannes Kohl & Georg Winter



**eppendorf
& Science**
PRIZE FOR
NEURO
BIOLOGY

Johannes Kohl

Der deutsche Wissenschaftler Johannes Kohl, Ph.D. (The Francis Crick Institute, London, UK) erhielt den mit 25.000 US\$ dotierten *Eppendorf & Science Prize for Neurobiology* 2018.

Er konnte zeigen, wie eine kleine Population genetisch definierter Neuronen die motorischen, motivatorischen, hormonellen und sozialen Aspekte des elterlichen Verhaltens bei männlichen und weiblichen Mäusen steuert. Frühere Arbeiten hatten spezifische Neuronen, die sich im medialen präoptischen Bereich (MPOA) des Hypothalamus befinden, mit der Brutpflege in Verbindung gebracht. (Der Hypothalamus ist ein Teil des Gehirns, der gemeinsame Merkmale mit anderen Wirbeltieren aufweist.) Dabei war jedoch unklar geblieben, wie eine kleine Neuronengruppe ein so komplexes Sozialverhalten steuern könnte. Kohl zeigte, dass diese Neuronen einen Knotenpunkt in einem komplexen hirnweiten Brutpflege-Netzwerk bilden. Mit Bildgebungsverfahren machte er die Aktivität dieser MPOA-Neuronen bei der Brutpflege sichtbar und manipulierte ihre Funktion bei Tieren, deren Verhalten beobachtet wurde. Diese Versuche zeigten, dass MPOA-Neuronen Subpopulationen bilden, die jeweils unterschiedliche Aspekte der Brutpflege steuern.

www.eppendorf.com/prize



Georg Winter

Der mit € 20.000 dotierte *Eppendorf Award for Young European Investigators* 2019 ging an Dr. Georg Winter vom CeMM-Forschungszentrum für Molekulare Medizin in Wien, Österreich.

Er erhielt den Preis für seine Pionierarbeit, in der er eine Methode zum gezielten Abbau von Proteinen via heterobifunktionellen chemischen Verbindungen entwickelt hat. Diese chemischen Wirkstoffe rekrutieren Ubiquitin E3 Ligasen zu therapeutisch relevanten Zielproteinen, wo sie folglich den Abbau dieser Zielproteine mittels des Ubiquitin-Proteasom Systems induzieren. Dieses leistungsstarke System ermöglicht den Zugang zu Proteinen, die mit konventionellen pharmakologischen Methoden nicht erschließbar sind, und somit neue Behandlungsstrategien. Vielversprechende Resultate wurden sowohl in Zellkulturmodellen, als auch *in vivo* Modellen erzielt. Seine Arbeit hat für großes Aufsehen in der pharmazeutischen Industrie gesorgt, spiegelt sich in etlichen Patenten wieder und ist ein vielversprechender Ausgangspunkt für neue Therapien von Krebs und anderen schlecht therapierbaren Krankheiten.

www.eppendorf.com/award

Markenhinweise

Amazon® is a registered trademark of Amazon Technologies, Inc., USA. AmpliTaq® is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., USA. Applied Biosystems® and Veriti® are registered trademarks of Applied Biosystems LLC, USA. Bio-Rad® is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc., USA. Ficol® is a registered trademark of GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden. Life Technologies® is a registered trademark of Life Technologies Corp., USA. SigmaCote® and Sigma-Aldrich® are registered trademarks of Merck KGaA, Germany. TissUse® is a registered trademark of TissUse GmbH, Germany. Fluorinert™ is a trademark of 3M Company, USA. SimpliAmp™ is a trademark of Life Technologies Corp., USA.

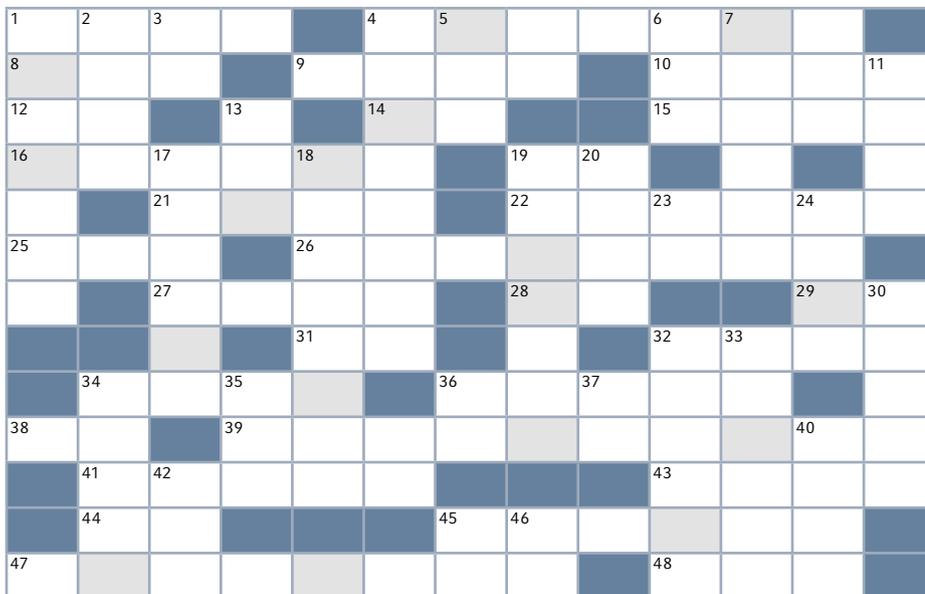
Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, CellTram®, CryoCube®, epMotion®, Eppendorf BioSpectrometer®, Eppendorf PiezoXpert®, Eppendorf Research®, Eppendorf ThermoMixer®, Eppendorf Tubes®, Eppendorf Xplorer®, epPoints®, epT.I.P.S.®, g-Safe®, Mastercycler®, MixMate®, PhysioCare Concept®, TransferMan®, UVette®, and VisioNize® are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. BioFlo® is a registered trademark of Eppendorf, Inc., USA. Eppendorf SmartBlock™, Eppendorf ThermoStat™, New Brunswick™, and SmartExtender™ are trademarks of Eppendorf AG, Germany. DASbox® and DASGIP® are registered trademarks of DASGIP Information and Process Technology GmbH, Germany. U.S. Design Patents are listed on <https://corporate.eppendorf.com/en/trademarks-patents/>

Neues Pipettiersystem zu gewinnen

Die Lösung des Jubiläums-Preisrätsels aus BioNews Nr. 49 lautete „VisioNize System“. Über je eine personalisierte Pipette freuen sich die fünf Hauptgewinner Julie Challant (Frankreich), Steven Murfitt (Großbritannien), Silke Frenz (Deutschland), Dhanesh Appu (Indien) und Thomas Giersch (Australien).

Viel Glück bei unserem neuen Rätsel!

Bringen Sie alle Buchstaben in den grau hinterlegten Feldern in die korrekte Reihenfolge und schicken Sie uns die richtige Antwort bis zum **31. Oktober 2019**.



WAAGERECHT

- 1 Wut, Ärger
- 4 Anzuchten von Mikroorganismen oder Zellen in Nährmedium (Engl.)
- 8 Meldung, die einen Fehler anzeigt (Abk.)
- 9 384 davon zu befüllen ist jetzt einfacher und schneller als je zuvor
- 10 Liebt Kermit, den Frosch (Namensteil)
- 12 Vervollständigt DC
- 14 Größte und gleichzeitig Hauptstadt ist Vilnius (ISO-Länderkürzel)
- 15 Mamma Mia, die werden immer noch gespielt
- 16 Nachname von Coco
- 19 Berühmt für Käse, Schokolade, Uhren und mehr (ISO-Länderkürzel)
- 21 Schriftliche Botschaft, Wortgefüge
- 22 Eizelle
- 25 Wohnstelle, Platz
- 26 Überführung, Übertragung

- 27 ... jacta est!
- 28 Da geht's um PCs, Telekommunikation und mehr (Abk.)
- 29 In diesem nordischen Inselstaat zahlt man mit ISK (ISO-Länderkürzel)
- 31 1 Millionstel Millimeter (Abk.)
- 32 Kleinstes Teilchen eines chemischen Elements
- 34 Binnenstaat in Zentralafrika (engl. Schreibweise)
- 36 Oberbegriff für Spaghetti etc.
- 38 Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
- 39 Regelmäßiger Infobrief
- 41 Einleitung zu einem Musikstück
- 43 L' ..., c'est moi!
- 44 Franz. Artikel (bestimmt, maskulin)
- 45 Reagiert auf Signale
- 47 Sprachgewandt, ausdruckstark
- 48 Tagesordnungspunkt

SENKRECHT

- 1 Behältnis, in dem z.B. Bioprozesse ablaufen (Engl.)
- 2 Marmordenkmal in London
- 3 Auch als „Hellas“ bekannt (ISO-Länderkürzel)
- 4 Unterstützt Ihre manuelle Mikroinjektion
- 5 Dieser Freezer kühlt ultra-tief (engl. Abk.)
- 6 Weibliche Darstellerin in Pulp Fiction (Vorname)
- 7 Steakart
- 11 Japanischer Reiswein
- 13 The ... and Only
- 17 Ergänzt „soft“ zu einer neuen Spitzentechnologie
- 18 Der ist einfach smart
- 19 Englische Silhouette gängiger Laborgefäße

- 20 Englischer Wirt oder Gastgeber
- 23 Chem. Symbol für ein in Kalifornien entdecktes chemisches Element
- 24 Dreiergruppe
- 30 Clever, geschickt, pffiffig
- 32 Ärztliche Bescheinigung
- 33 Körperschmuck
- 34 Aufforderung zu relaxen (engl.)
- 35 Staatenbildendes Insekt (engl.)
- 36 Postskriptum: thermoplastischer Kunststoff (Abk.)
- 37 Heimatland von 15 waagerecht (ISO-Länderkürzel)
- 40 Kumpel von Doc Holliday (Nachname)
- 42 Griechische Vorsilbe für „neu“
- 45 Dakar ist Regierungssitz dieses Landes (ISO-Länderkürzel)
- 46 Außerirdischer

Einfach eine E-Mail an bionews@eppendorf.de senden oder online teilnehmen unter www.eppendorf.com/bn-service.

Unter allen richtigen Einsendungen verlosen wir wieder attraktive Preise. Die Gewinner werden schriftlich benachrichtigt. Eine Barauszahlung ist nicht möglich. Der Rechtsweg ist ausgeschlossen. Eppendorf-Mitarbeiter und deren Angehörige dürfen nicht teilnehmen. Die Gewinner der ersten drei Preise werden in Ausgabe 53 veröffentlicht.

1. bis 3. Preis:

Je 1 Eppendorf Research® plus 16- oder 24-Kanalpipette Ihrer Wahl

4. bis 6. Preis:

je 1 Amazon® Gutschein im Wert von 50,00 Euro

7. bis 15. Preis:

je 400 Bonus epPoints®

(Registrierung bei epPoints erforderlich)

Lösungshinweis für das Gewinnspiel BioNews Nr. 51:

D E U U

Einsendeschluss für das Gewinnspiel: **31. Oktober 2019**. Online teilnehmen unter www.eppendorf.com/bn-service oder das Lösungswort per E-Mail an bionews@eppendorf.de senden!

SOMETIMES THE GRASS REALLY IS GREENER SOMEPLACE NEW.

 Find your next job at [ScienceCareers.org](https://www.sciencecareers.org)

There's scientific proof that when you're happy with what you do, you're better at what you do. Access career opportunities, see who's hiring and take advantage of our proprietary career-search tools. Get tailored job alerts, post your resume and manage your applications all in one place. Start here: [sciencecareers.org](https://www.sciencecareers.org)

ScienceCareers

FROM THE JOURNAL SCIENCE  AAAS