

Applications

Note 131 | April 2006

Eppendorf MixMate – Resuspendieren von Bakterienpellets in Deepwell-Platten (96- und 384-Well) und Reaktionsgefäßen

Caroline Osterhoff¹, Philip Müller² und Lars Borrmann¹

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

Zusammenfassung

Der MixMate ist speziell entwickelt worden, um kleine Volumina in Platten (bis 384-Well) und Reaktionsgefäßen (bis 2,0 ml) zu mischen. Der Anwendungsbereich für einen solchen Mischer erstreckt sich dabei primär auf das Durchmischen von flüssigem Probenmaterial. Aber auch das Resuspendieren von festen Zellpellets stellt im Bereich der Molekularbiologie, beispielsweise im Rahmen der Nukleinsäureisolierung und Proteinpräparation, einen wichtigen und häufig angewendeten Arbeitsschritt dar.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Performance des MixMate in Bezug auf das Resuspendieren von Bakterienpellets in unterschiedlichen Platten- und Gefäßformaten genauer zu untersuchen. Die durchgeführten Versuche zeigen, dass mit Hilfe des Eppendorf MixMate Bakterienpellets sowohl in 384er- und 96er-Deepwell-Platten (DWP) als auch in 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäßen in unter 1 Minute und ohne Deckelbenetzung gelöst werden können. Dabei konnten mit einer einzigen Einstellung (1 min, 2.000 rpm) alle Versuchsansätze mit dem MixMate vollständig resuspendiert werden.

Einleitung

Als integraler Bestandteil von Methoden wie beispielsweise der Isolierung von Plasmid-DNA oder rekombinanter Proteine stellt das Resuspendieren von Bakterienpellets eine der häufigsten Anwendungen in der modernen Molekularbiologie dar. Ein vollständiges und gleichmäßiges Lösen des Pellets ist dabei eine wichtige Voraussetzung für die optimale Ausbeute der zu isolierenden Moleküle.

Das Resuspendieren der Pellets gestaltete sich allerdings häufig mühsam und zeitaufwändig. Beispielsweise müssen Gefäße teilweise einzeln gevortext werden, für einige Mischer sind die kompakten Bakterienpellets nur schwer zu lösen und bei anderen kommt es durch unkontrollierte Mischbewegungen zur Benetzung des Gefäßdeckels und damit zu einem erhöhten Kontaminationsrisiko. Darüber hinaus sind viele Plattenmischer nicht in der Lage, Bakterienpellets in 96- und 384-Well-Platten zu resuspendieren. Im Gegensatz dazu bietet der Eppendorf MixMate durch seine ^{2D}Mix-Control-Technologie und die Gefäßhalter die Möglichkeit sowohl Platten (auch 384-Well-Platten;

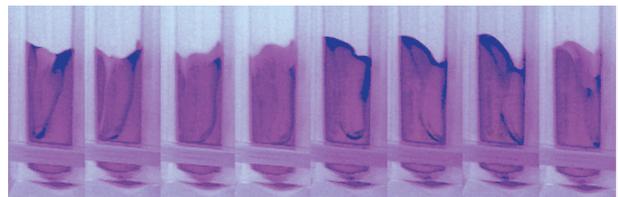


Abbildung 1: Momentaufnahmen der Mischbewegung in einer Eppendorf Plate® Deepwell 384/200 mit dem Eppendorf MixMate. Dargestellt ist ein mit 50 µl Wasser (mit Farbstoff Ponceau 4R) befülltes Well der Platte bei 2.000 rpm Mischgeschwindigkeit. Dank der ^{2D}Mix-Control-Technologie kommt es zu einer effektiven Mischbewegung, bei der sich die Flüssigkeit auf einer kontrollierten Kreisbahn bewegt.

Abb. 1) als auch Reaktionsgefäße schnell (1) und ohne Deckelbenetzung oder Kreuzkontamination (2) zu mischen. Um die Mischeigenschaften des Eppendorf MixMate in Bezug auf das Resuspendieren von Bakterienpellets genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Bakterienkulturen in 96 und 384 Deepwell-Platten und 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäßen pelletiert und anschließend mit dem MixMate in Puffer wieder resuspendiert.

Material und Methoden

150 ml LB-Medium (Roth, Karlsruhe) wurden mit einem *E.coli* K12 Bakterienstamm (DH5 α) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C angezogen. Entsprechend der in Tabelle 1 beschriebenen Angaben wurde die Bakteriensuspension auf die verschiedenen Platten- und Gefäßformate verteilt und diese anschließend in der Eppendorf Centrifuge 5417 C (Reaktionsgefäße) oder der Eppendorf Centrifuge 5804 R mit Rotor A-2-DWP (Deepwell-Platten) pelletiert. Die Zentrifugationsparameter (Tab. 1) entsprachen dabei in der Literatur beschriebenen Standardwerten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde zu den Bakterienpellets Resuspendierungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) hinzugegeben (100 μ l in

1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße; 150 μ l bei 96er DWP; 30 μ l bei 384er DWP). Deepwell-Platten wurden anschließend direkt in die Universalaufnahme des MixMate eingesetzt und die Reaktionsgefäße mit Hilfe des Gefäßhalters 1,5/2,0 ml gemischt. Eine optische Überprüfung auf ein vollständig resuspendiertes Pellet erfolgte nach 15 sec, 30 sec, 45 sec, 1 min, 2 min und 5 min. Zusätzlich zum Eppendorf MixMate wurde der Thermomixer comfort (Eppendorf) mit den Wechselblöcken 1,5 ml, 2,0 ml und MTP sowie ein weiterer Plattenschüttler (Wettbewerber A, siehe auch Referenz 1) getestet. Sofern nicht genauer spezifiziert, wurden die Versuche bei maximaler Mischgeschwindigkeit durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Resuspendieren von Bakterienpellets in Reaktionsgefäßen und Deepwell-Platten mit dem Eppendorf MixMate und 2 Vergleichsgeräten. Die benötigten Zeiten bis zur vollständigen Pellet-Resuspendierung sind aufgeführt und farbcodiert dargestellt (grün = Pellets resuspendiert; rot = Pellet nach 5 min noch nicht resuspendiert).

	 <p>1,5 ml Reaktionsgefäße</p>	 <p>2,0 ml Reaktionsgefäße</p>	 <p>96er Deepwell-Platten</p>	 <p>384er Deepwell-Platten (Max. Volumen: 200 μl)</p>	 <p>384er Deepwell-Platten (Max. Volumen: 400 μl)</p>
	<p>Testbedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> · 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube · 1,5 ml ÜN-Kultur · Pelletieren: 30 sec bei 16.000 x g · 100 μl Resuspendierungspuffer 	<p>Testbedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> · 2,0 ml Eppendorf Safe-Lock Tube · 2,0 ml ÜN-Kultur · Pelletieren: 30 sec bei 16.000 x g · 100 μl Resuspendierungspuffer 	<p>Testbedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> · Eppendorf Plate Deepwell 96/2000 · 1,25 ml ÜN-Kultur · Pelletieren: 5 min bei 1.900 x g · 150 μl Resuspendierungspuffer 	<p>Testbedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> · Eppendorf Plate Deepwell 384/200 μl · 200 μl ÜN-Kultur · Pelletieren: 5 min bei 2.200 x g · 30 μl Resuspendierungspuffer 	<p>Testbedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> · Deepwell Plate 384/400 μl · 300 μl ÜN-Kultur · Pelletieren: 5 min bei 2.200 x g · 30 μl Resuspendierungspuffer
 <p>MixMate</p>	<p>45–60 sec 2.000 rpm</p>	<p>30 sec 2.000 rpm</p>	<p>30 sec 2.000 rpm</p>	<p>45–60 sec 2.000 rpm</p>	<p>45–60 sec 2.000 rpm</p>
 <p>Thermomixer comfort</p>	<p>3 min 1.400 rpm</p>	<p>2 min 1.400 rpm</p>	<p>30 sec 1.400 rpm</p>	<p>nicht resuspendiert</p>	<p>nicht resuspendiert</p>
<p>Wettbewerber A*</p>	<p>Mischen von Reaktionsgefäßen nicht möglich</p>	<p>Mischen von Reaktionsgefäßen nicht möglich</p>	<p>nicht resuspendiert</p>	<p>nicht resuspendiert</p>	<p>nicht resuspendiert</p>

*Nähere Spezifikationen finden Sie in der Application Note 130

Die im Rahmen dieser Application Note durchgeführten Versuche zeigen, dass der MixMate Bakterienpellets schnell und ohne Deckelbenetzung resuspendiert. Das Mischergebnis ist dabei unabhängig von der Art des verwendeten Gefäßes; sowohl in Reaktionsgefäßen 1,5 ml und 2,0 ml als auch in 96er- und 384er-Deepwell-Platten werden die Pellets in unter 1 Minute gelöst (Tab. 1). Generell zeigte sich, dass mit einer einzigen Einstellung (1 min, 2.000 rpm) alle Versuchsansätze mit dem MixMate vollständig resuspendiert werden konnten.

Bei Verwendung der Touch-Vortex Funktion des MixMate (Mischfrequenz 3.500 rpm) konnten Pellets in 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäßen bereits nach 10–20 sec vollständig resuspendiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Allerdings kann es im Gegensatz zum Mischen der Gefäße im Gefäßhalter hierbei aber zur Deckelbenetzung und

somit zu einem erhöhten Kontaminationsrisiko kommen. Außerdem ist es mit den Gefäßhaltern des MixMate möglich bis zu 24 Gefäße gleichzeitig zu mischen, weshalb bei etwas höherer Probenanzahl der Zeitvorteil des manuellen Vortexen schnell ausgeglichen wird.

Auch für den Thermomixer comfort zeigt sich, dass dieser für das Resuspendieren von Bakterienpellets in 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäßen sowie 96er-Deepwell-Platten sehr gut verwendet werden kann. Da dieser aber primär für die Temperierung von Proben während Langzeitinkubationen entwickelt wurde, sind bis zum vollständigen Lösen des Pellets etwas längere Mischzeiten erforderlich. Auf Grund der im Vergleich zum MixMate etwas geringeren Mischleistung eignet sich dieser nicht für das Resuspendieren in 384-Well-Platten.

Durch die ^{2D}Mix-Control Technologie ermöglicht der MixMate das schnelle und vollständige Resuspendieren von Bakterienpellets ohne Deckelbenetzung in weniger als 1 Minute sowohl in Standard Reaktionsgefäßen als auch in 96- und 384-Well-Platten. Dadurch ergeben sich für den Anwender folgende Vorteile:

- Zeitersparnis durch schnelles Resuspendieren in unter 1 Minute.
- Zeitersparnis durch gleichzeitiges Resuspendieren von bis zu 24 Reaktionsgefäßen in den Gefäßhaltern des MixMate.
- Verringertes Kontaminationsrisiko durch kontrolliertes Mischen ohne Deckelbenetzung, ein Abzentrifugieren nach dem Lösen des Pellets ist nicht mehr notwendig.
- Im Gegensatz zum manuellen Resuspendieren mittels Pipettieren ergibt sich eine Kostenersparnis, da keine zusätzlichen Pipettenspitzen verbraucht werden.
- Erhöhte Reproduzierbarkeit – insbesondere mit Deepwell-Platten, da alle Wells gleichmäßig gemischt werden.
- Flexibler Anwendungsbereich – Gerät für das Mischen von Platten und Reaktionsgefäßen mit integrierter Vortex-Funktion.

Literatur

- [1] Osterhoff C, Mueller P, Borrmann L. Comparison of mixing performance in 96- and 384-well plates of Eppendorf MixMate and competitor devices. *Eppendorf Application Note 130*, 2006.
- [2] Osterhoff C, Mueller P, Borrmann L. Eppendorf MixMate – Nachweis kontrollierten Mischens ohne Deckelbenetzung mit Hilfe eines PCR-basierten Schachbrettmuster-Assays. *Eppendorf Application Note 129*, 2006.

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestellnummer
MixMate, inkl. 3 Gefäßhalter: PCR 96, 0,5 ml, 1,5/2,0 ml, 230 V, 50–60 Hz	5353 000.014
Safe-Lock Tube 1,5 ml, farblos, 1.000 Stk	0030 120.086
Safe-Lock Tube 2,0 ml, farblos, 1.000 Stk	0030 120.094
Eppendorf Plate® Deepwell 96/2.000 µl, Standard Qualität, blauer Rahmen, 20 Platten (5 Beutel à 4)	0030 501.349
Eppendorf Plate® Deepwell 384/200 µl, Standard Qualität, blauer Rahmen, 40 Platten (5 Beutel à 8)	0030 521.145
Thermomixer comfort, ohne Wechselblock, 230 V, 50–60 Hz	5355 000.011
Wechselblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße, inkl. IsoRack und IsoPack 0°C	5360 000.011
Wechselblock für 2,0 ml Reaktionsgefäße, inkl. IsoRack und IsoPack 0°C	5362 000.019
Wechselblock für MTPs und Deepwell-Platten, mit Deckel	5363 000.012

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH . Tel. +49 2232 418-0 . Fax +49 2232 418-155 . E-Mail: vertrieb@eppendorf.de . Internet: www.eppendorf.de
 Vaudaux-Eppendorf AG . Tel. +41 61 482 1414 . Fax +41 61 482 1419 . E-Mail: vaudaux@vaudaux.ch . Internet: www.eppendorf.com
 Eppendorf AG c/o Schott Austria . Tel. +43 1 29017560 . Fax +43 1 290175620 . E-Mail: gilch.p@eppendorf.de . Internet: www.eppendorf.com

Application Support

Tel. +49 1803 666 789 · E-Mail: support@eppendorf.com