

## Die Reproduzierbarkeit von Verdünnungsreihen erhöhen

Michael Beier\*

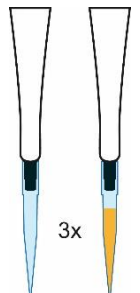
### Zusammenfassung

Das Pipettieren von Verdünnungsreihen kann schwierig sein, weil es zeitaufwändig und dadurch insbesondere in 384-Well-Platten fehleranfällig ist. Vorausgesetzt, die Pipetten sind ordnungsgemäß gewartet und kalibriert, hat der menschliche Einfluss die größte Auswirkung auf die Pipettierergebnisse. Das Beachten eines guten Pipettierverfahrens hilft, die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit zu verbessern. In diesem Artikel fokussieren wir uns auf eine Auswahl guter Pipettier Techniken, die die größte Chance bieten, die Reproduzierbarkeit von Verdünnungsreihen zu erhöhen und beizubehalten. Das Mischen ist der Schlüssel der Verdünnungsprotokolle. In diesem Artikel diskutieren wir zusätzlich verschiedene Mischparameter, die Ihnen helfen, eine homogene Probe zu erhalten. Eine Prozessautomatisation bietet viele Vorteile im Maximieren der Einheitlichkeit von Verdünnungstest. Wir legen dar, welche Eigenschaften ein automatisiertes Pipettiersystem haben sollte, um eine hohe Reproduzierbarkeit von Verdünnungsreihen zu garantieren, und stellen den VIAFLO ASSIST vor – ein Produkt, das für diese Aufgabe konstruiert wurde.

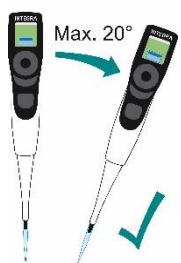
### Einführung in eine gute Pipettierpraxis

Eine gute Anleitung für Pipettierverfahren deckt die Basistechniken ab, um sicherzustellen, dass die Pipetten auf optimale und reproduzierbare Art verwendet werden.

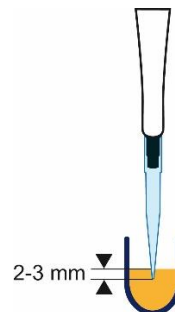
Bevor Sie Ihren Test vorbereiten, sollten Sie ihre Pipettenspitzen vorbenetzen. Dazu wird das maximale Volumen 2-3mal aufgenommen und abgegeben. Dieser Vorgang gleicht nicht nur die Temperaturunterschiede zwischen der Flüssigkeit und den Spitzen aus, sondern befeuchtet auch den Luftraum innerhalb der Pipetten und der Spitze. Wird das Vorbenetzen nicht beachtet, können die ersten Dispensate ein geringeres Volumen enthalten und sich dadurch Übertragungsfehler in die folgenden Verdünnungsschritte einschleichen.



Das Flüssigkeitsvolumen in der Spitze wird auch vom Neigungswinkel der Pipette beeinflusst, mit dem sie in die Flüssigkeit getaucht wird.



Es ist wichtig, Ihre Pipette während der gesamten Verdünnungen in einem konstanten Winkel von maximal 20° zu halten.



Zum Aufnehmen des gewünschten Volumens tauchen Sie die Pipettenspitze etwas unter der Flüssigkeitsoberfläche ein. Zu tiefes Eintauchen der Spitze erhöht das Risiko, dass Flüssigkeitstropfen an der Außenseite der Spitze hängen bleiben.

Leider werden in der Realität die Regeln einer guten Pipettierpraxis selbst von dem gewissenhaftesten Laborpersonal nicht immer beachtet. Insbesondere wenn es müde oder in Eile ist, wird die Technik uneinheitlich. Zusätzlich steigt das Risiko der Übertragungsfehler. In einer 96- oder 384-Well-Platte kann eine Reihe leicht ausgelassen werden, vor allem, wenn mit farblosen Flüssigkeiten hantiert wird. Schnell kann eine gesamte Platte ruiniert sein und es muss von vorne begonnen werden. Es überrascht daher nicht, dass verschiedene Benutzer, die dieselbe Pipette benutzen, in Abhängigkeit von ihrem Ausbildungsstand, ihrer Erfahrung und ihrer Arbeitsdauer verschiedene Pipettierergebnisse erzielen.

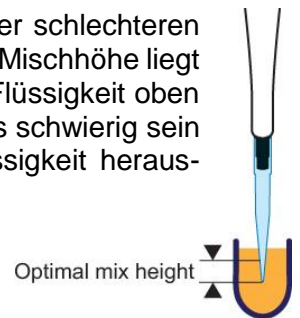
## Optimieren der Mischparameter

Das gründliche Mischen jedes Wellinhalts einer Mikroplatte ist ein wesentlicher Prozess beim Vorbereiten einer Verdünnungsreihe. Inhomogenes Mischen bringt einen signifikanten Fehler ein, der dann in den folgenden Verdünnungsschritten fortgeführt wird. Die erreichte Konzentration wird sich über die ganze Platte von der angenommen, theoretischen Konzentration unterscheiden. Daher ist es wichtig, die Mischparameter, wie die Mischhöhe, Anzahl der Mischschritte und die Mischgeschwindigkeiten, für eine bestimmte Flüssigkeit zu optimieren.

Abhängig von der Viskosität der Flüssigkeit kann es notwendig sein, die Pipettiergeschwindigkeit zu verändern. Es ist am besten, viskose Flüssigkeiten langsam zu pipettieren, damit die gesamte Flüssigkeit durch die kleine Öffnung der Pipettenspitze fließen kann.

Das Mischen mit dem Spitzenende zuunterst in einem Mikroplattenwell führt zu einer schlechteren Durchmischung, weil ungenügende Verwirbelungen erzeugt werden. Die effizienteste Mischhöhe liegt normalerweise in der Mitte der Flüssigkeitssäule eines Wells. Idealerweise wird die Flüssigkeit oben abgegeben und von der Mitte angesaugt. Dies von Hand auszuführen kann allerdings schwierig sein und Sie sollten aufpassen, die Spitzen während des Mischens nicht aus der Flüssigkeit herauszunehmen, damit keine Luft hineingezogen wird.

Die Anzahl der Mischzyklen und das Mischvolumen beeinflussen ebenfalls das Mischresultat signifikant. Eine höhere Anzahl der Mischzyklen und ein größeres Mischvolumen führen zu einer homogeneren Mischung, können aber die Testvorbereitungszeit wesentlich erhöhen.



## Wie die Automatisierung helfen kann

Es ist eine Herausforderung, all diese Faktoren für gutes Pipettieren und Mischen zu beachten, wenn man viele Verdünnungsreihen mit einer Handpipette ausführt. Angenommen, eine Verdünnungsreihe in einer 96-Well-Platte mit 5 Mischzyklen pro Reihe erfordert insgesamt 110 Kolbenbewegungen, dann besteht ein Belastungsrisiko Ihres Daumens und Handgelenks, wenn sie über einen längeren Zeitraum ausgeführt werden. Eine elektronische Pipette kann den Ablauf verbessern, weil Sie die Anzahl der Mischzyklen (einschließlich der Geschwindigkeiten) definieren können, die dann automatisch durchlaufen werden, ohne dass Sie den Kolben wiederholt herunterdrücken müssen.

Durch das Automatisieren Ihres Pipettierprozesses können Sie die Pipettier- und Mischverfahren ausklammern und dadurch einen absolut gleichbleibenden Arbeitsablauf erreichen. Ein optimales Automatisierungssystem kontrolliert den gesamten Verdünnungsprozess und lässt Sie einfach die Schlüsselparameter für Verdünnungsreihen wie Mischhöhen und Geschwindigkeiten definieren.



Bei vielen Verdünnungsanwendungen sind für die nötige Automatisierung nicht hohe Investitionen oder ausgebildetes Personal für einen Laborautomaten oder ein vollautomatisches Liquidhandlingsystem erforderlich. Mit einem viel geringeren Preis bietet der VIAFLO ASSIST von INTEGRA die nötige Funktionalität, Geschwindigkeit und Automatisierung. Durch Einsetzen einer elektronischen VIAFLO II-Mehrkanalpipette wird der VIAFLO ASSIST zu einem zuverlässigen Pipettierassistenten, der immer die gute Pipettierpraxis beachtet und niemals müde wird. Er wird die gesamten Verdünnungsreihen von der Verteilung des Verdünnungsmittels bis hin zu den Probenverdünnungen für Sie ausführen.

Mit Worten von Lauren Anderson Dring, Forscherin und Projektleiterin bei Pulmocide *“Der VIAFLO ASSIST wurde ein integraler Bestandteil unseres Wirkstoff-Screening-Prozesses. Er wird täglich bei einem mittleren Durchsatz benutzt, um reproduzierbare, genaue Wirkstoffverdünnungen herzustellen.”*

# INTEGRA

Mit dem VIAFLO ASSIST können Sie alle wichtigen Parameter für ein effizientes Mischen der Verdünnungsreihen einstellen: Mischhöhe, Pipettiergeschwindigkeiten und die Anzahl der Mischzyklen. Ms. Dring fügt hinzu *“Der ASSIST ist vor allem deshalb nützlich, weil viele Parameter vordefiniert werden können, wie das Volumen, Pipettier- und Mischgeschwindigkeit, was uns erlaubt, eine Auswahl von Verdünnungsprotokollen zu erstellen und zu speichern, die unseren Bedürfnissen angepasst sind.”*

Zusätzlich zur Einstellung einer festen Höhe erlaubt der VIAFLO ASSIST das Verfolgen des Flüssigkeitspegels innerhalb eines Mikroplattenwells, was ein zu tiefes Eintauchen der Spitzen unnötig macht und deshalb eine potentielle Verschleppung minimiert. Um die gute Pipettierpraxis vollständig einzuhalten, kann ein Vorbenetzten entweder von Hand vor dem Programmstart durchgeführt oder in das ASSIST-Programm eingebaut werden.

## Schlussfolgerung

Die Erstellung von seriellen Verdünnungstests ist eine anspruchsvolle Aufgabe, weil sie viele Pipettierarbeitsgänge erfordert und stark abhängig von der Technik und Erfahrung des Durchführenden sind. Das Einhalten einer guten Pipettierpraxis hilft, besserer Pipettierergergebnisse zu erzielen. Wenn es allerdings ihr Ziel ist, den Prozess der Verdünnungsreihen zu rationalisieren und gleichzeitig die höchste Reproduzierbarkeit sicherzustellen, dann ist ein automatisiertes Pipettiersystem nötig.



Bildunterschrift: VIAFLO Assist automatisiert die Verdünnungsreihe in einer 96-Well-Platte

Der VIAFLO ASSIST ist eine erschwingliche automatische Pipettierplattform, mit der Verdünnungsreihen in Mikroplatten durchgeführt werden, können, das sehr leistungsfähig und dennoch benutzerfreundlich ist. Wichtige Parameter wie Pipettierhöhen und Geschwindigkeiten können präzise kontrolliert werden, was die Pipettierergergebnisse verbessert. Ebenso wird die Gesamtübereinstimmung der Pipettierungen verbessert, indem menschliche Fehler und Uneinheitlichkeiten eliminiert werden. Dies führt zu reproduzierbareren Tests und spart Zeit.

**Der Autor:** Michael Beier ist Produktmanager für das Liquidhandling bei der INTEGRA Biosciences. Er kann zwecks weiterer Informationen über [Michael.beier@integra-biosciences.com](mailto:Michael.beier@integra-biosciences.com) kontaktiert werden.