

## Puntali a bassa ritenzione



#05

Nota applicativa

#01

Confronto prestazionale tra Micropipette con puntali a bassa ritenzione di diversi produttori

#02

#03

#04

## Riassunto

Accuratezza e precisione del pipettaggio sono i fattori chiave per il successo degli esperimenti in laboratorio. Le migliori prestazioni di pipettaggio sono ottenibili se la pipetta e il puntale sono perfettamente compatibili e se viene utilizzato un buon puntale per il liquido da trasferire.

Nel pipettaggio i liquidi a bassa tensione superficiale (ad esempio detergenti) tendono a lasciare un film di liquido sulla superficie interna dei puntali standard in polipropilene, provocando pipettaggi inaccurati e non coerenti, nonché perdite dei campioni costosi dovute alla riduzione di volume.

Sono state utilizzate varie tecnologie per modificare i puntali standard per pipette, in modo da ovviare a questo inconveniente. Nelle presenti note applicative è descritto un confronto fra i puntali a bassa ritenzione provenienti da diversi produttori, effettuando dei test con liquidi che contengono detergenti. I risultati evidenziano che quando si tratta del pipettaggio di liquidi a bassa tensione superficiale, i puntali a bassa ritenzione Sartorius garantiscono un recupero pressoché completo del campione. Messa a confronto con altri puntali a bassa ritenzione provenienti da altri produttori, i puntali Sartorius hanno dato i migliori risultati quanto al recupero di campioni e alla resistenza chimica.

## Introduzione

In molte applicazioni nell'ambito della biologia molecolare l'altissima sensibilità dei metodi di rivelazione impone che i pipettaggi siano effettuati con estrema affidabilità e riproducibilità. Nei metodi di analisi del DNA e delle proteine i reattivi e/o i campioni spesso contengono detergenti. Il pipettaggio di queste soluzioni detergenti può essere problematico con i puntali standard. A causa delle differenze di energia superficiale fra il campione e il puntale in plastica, un residuo di liquido spesso rimane nel puntale. Questo film, a volte invisibile, sulla superficie interna del puntale provoca imprecisioni di pipettaggio, nonché perdite di preziosi campioni e di costosi reattivi.

Sartorius ha utilizzato una tecnologia avanzata per produrre puntali a bassa ritenzione con una superficie non solo estremamente idrofobica ma anche durevole. Queste

caratteristiche permettono agli utenti di ridurre sostanzialmente la quantità del residuo rimasto nel puntale quando si tratta della manipolazione di detergenti o di altri liquidi a bassa tensione superficiale. Una migliore riproducibilità del pipettaggio è un grande vantaggio soprattutto nelle applicazioni sensibili, come ad esempio quelle basate sulla PCR, anche in tempo reale.

Nelle presenti note applicative:

1. sono confrontati vari puntali di pipetta a bassa ritenzione, pipettando soluzioni detergenti usate comunemente nei laboratori di biologia molecolare;
2. sono presentati i risultati del test in cui sono state confrontate le resistenze chimiche dei puntali a bassa ritenzione provenienti da vari produttori.

## Materiali e metodi

### Materiali

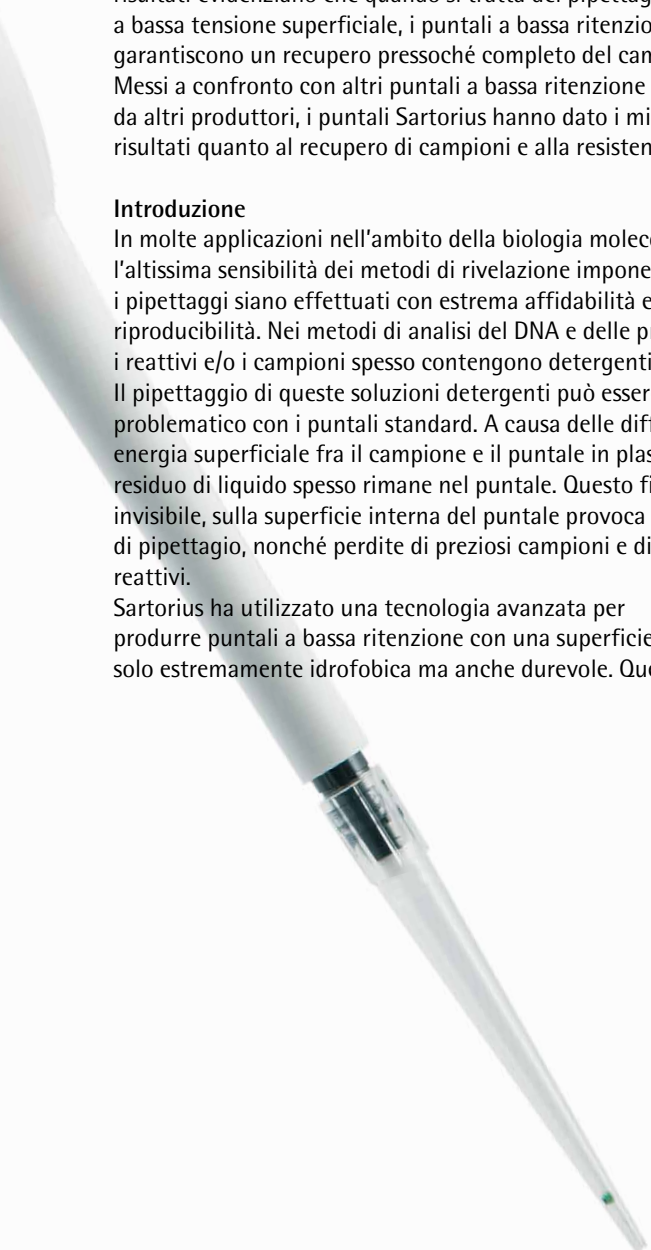
- Puntali Optifit e SafetySpace™ Sartorius, sia standard che a bassa ritenzione: 120 µl, 200 µl, 350 µl, 1000 µl;
- pipette elettroniche Picus Sartorius: 5–120 µl, 10–300 µl, 50–1000 µl, con velocità di aspirazione 4 e velocità di dispensazione 1 (la più lenta);
- pipette meccaniche mLINE® Sartorius 20–200 µl, 100–1000 µl;
- soluzioni detergenti: Triton X-100 allo 0,1%, Tween 20 al 10%, SDS al 10%, buffer PCR 10X colorato (contiene detergenti, reagente di densità e coloranti di tracciamento);
- altre sostanze chimiche: isopropanolo, acetonitrile, DMF (dimetilformammide);
- colorante alimentare verde;
- puntali a bassa ritenzione di cinque altri produttori;
- microbilancia MC5 e bilancia analitica BP211D, ambedue Sartorius;
- spettrofotometro per micropiastre a 96 pozzetti (Biotek).

### Metodo gravimetrico

Il residuo di liquido, rimasto nel puntale dopo la dispensazione, è stato misurato con il metodo gravimetrico. Un piccolo recipiente di vetro riempito di soluzione di prova è stato posto sulla bilancia, che poi è stata azzerata. Successivamente, dal recipiente è stato aspirato il volume desiderato di soluzione di prova, che poi è stato scaricato nello stesso recipiente di prima, dopodiché è stato annotato il valore indicato dalla bilancia che esprime la quantità del liquido rimasto nel puntale. Questi passi sono stati ripetuti con ciascuna delle sopraccitate soluzioni detergenti.

### Test di assorbanza

Nel test di assorbanza è stata usata una soluzione di prova (colorata di verde con colorante alimentare sciolto in acqua distillata) al fine di determinare il liquido rimasto nel puntale di pipetta dopo la dispensazione. Per aspirare la soluzione di prova verde dal recipiente è stato applicato il massimo volume nominale del puntale testato. Il liquido poi è stato scaricato nello stesso recipiente di prima e il puntale è stato risciacquato riempiendolo cinque volte con un volume di acqua distillata pari al volume massimo del puntale. Successivamente, l'assorbanza della soluzione è stata misurata con uno spettrofotometro (405 nm) e i risultati sono stati messi a confronto con la soluzione di riferimento. L'assorbanza della soluzione di risciacquo del puntale è in correlazione diretta con la quantità del residuo nel puntale.



## Test di resistenza chimica

1000 µl di solventi (isopropanolo, acetonitrile e dimetilformamide) sono stati aspirati e scaricati per 20 volte ciascuno, usando un puntale per pipetta da 1000 µl. Successivamente i puntali sono stati risciacquati tre volte con acqua distillata. L'effetto di questo trattamento sulle prestazioni dei puntali a bassa ritenzione in esame è stato analizzato con il test di assorbanza usando come soluzione di prova un liquido colorato. Il test è stato ripetuto con 6 puntali per ciascun solvente. I risultati dei puntali trattati chimicamente sono stati confrontati con quelli riscontrati su puntali standard non trattati e sui puntali a bassa ritenzione non trattati.

## Risultati

### Confronto delle quantità di liquido residuo

Le prestazioni di 5 puntali a bassa ritenzione provenienti da altri produttori sono state paragonate con puntali standard e a bassa ritenzione Sartorius, pipettando soluzioni detergenti comunemente utilizzate. Con tutti i liquidi testati, sono stati i puntali a bassa ritenzione Sartorius a trattenere la quantità più piccola di residuo (fig. 1a). Alcuni dei puntali a bassa ritenzione degli altri produttori hanno raggiunto prestazioni più modeste perfino rispetto ai puntali standard Sartorius, il che lascia intendere che ci siano notevoli differenze prestazionali fra i diversi puntali a bassa ritenzione presenti sul mercato.

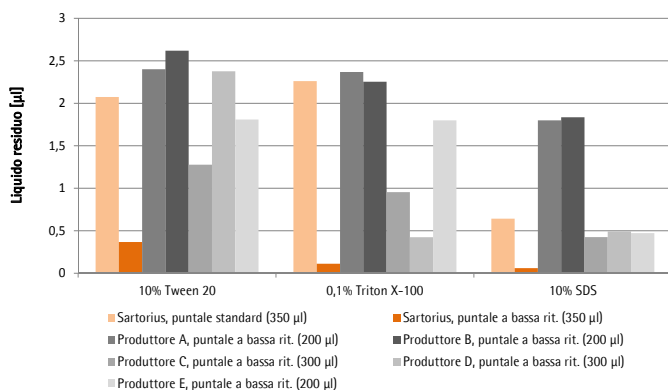


Figura 1a. Confronto delle quantità di liquido residuo

Puntali a bassa ritenzione di cinque produttori sono stati confrontati con i puntali Sartorius, sia standard che a bassa ritenzione, pipettando 200 µl dei seguenti detergenti: Tween 20 al 10%, Triton X-100 allo 0,1%, SDS al 10%. Puntali per pipetta con volume di 200 µl, 300 µl e 350 µl (misura secondo l'assortimento di ciascun produttore e la compatibilità) sono stati usati con una pipetta elettronica Picus in un range di volume da 10 a 300 µl. La quantità di liquido rimasto nel puntale è stata misurata con il metodo di analisi gravimetrica descritto nel paragrafo „Materiali e metodi“. Il test è stato ripetuto per 10 puntali di ciascun produttore.

In un altro esperimento, come soluzione di prova è stato utilizzato un buffer PCR colorato contenente detergente, per confrontare la precisione di pipettaggio dei diversi puntali a bassa ritenzione e per rilevare l'effetto del volume di pipettaggio sulla ritenzione del puntale. Come risulta dalla figura 1b, con ambedue i volumi sono stati i puntali a bassa ritenzione Sartorius a trattenere la quantità più piccola di residuo. Inoltre, si è potuto rilevare che i quantitativi di residuo rimasti nei puntali Sartorius di tipo standard erano simili a quelli verificati nei puntali a bassa ritenzione di altri produttori. Quanto alla precisione del pipettaggio, i risultati migliori sono stati quelli raggiunti usando i puntali a bassa ritenzione Sartorius, il che ribadisce la supremazia di questi puntali ad esempio negli allestimenti PCR. I dati evidenziano inoltre che, per quanto riguarda la quantità del liquido residuo, le differenze fra i puntali standard e i puntali a bassa ritenzione aumentano via via che i volumi pipettati incrementano. Ciò è dovuto al fatto che il liquido aderisce a una superficie più estesa all'interno del puntale.

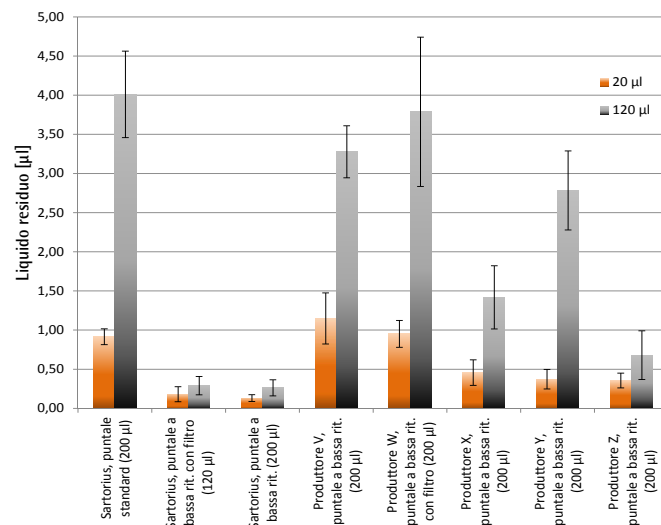


Figura 1b. Confronto delle quantità di liquido residuo e della precisione di pipettaggio, usando un buffer PCR colorato in 2 volumi diversi

Puntali a bassa ritenzione di cinque produttori sono stati confrontati con i puntali Sartorius, sia standard che a bassa ritenzione, con filtro e senza filtro. Puntali per pipetta con volume di 120 µl, 200 µl e 300 µl (misura secondo l'assortimento di ciascun produttore e relativa compatibilità) sono stati usati con la pipetta Sartorius mLINER® 20–200 µl, per aspirare e scaricare sia 20 µl che 120 µl di buffer PCR colorato. La quantità di liquido rimasto nel puntale è stata misurata con il metodo di analisi gravimetrica descritto nel paragrafo „Materiali e metodi“. Il test è stato ripetuto per 10 puntali di ciascun produttore. Le barre di errore indicano le deviazioni standard.

### Effetto della tensione superficiale

Per esaminare l'effetto della tensione superficiale del liquido sulla quantità di residuo rimasto nel puntale dopo la dispensazione, sono state utilizzate diverse concentrazioni di isopropanolo, la cui tensione superficiale è bassa (23 mN/m), v. fig. 2. L'alta concentrazione dell'isopropanolo e la bassa tensione superficiale, rendono molto più vantaggioso l'utilizzo dei puntali a bassa ritenzione altamente idrofobici rispetto ai puntali standard: infatti si sono dimostrati molto più efficaci nella minimizzazione delle perdite di reattivi e delle imprecisioni di pipettaggio. Vantaggi simili non sono stati rilevati con acqua o altre soluzioni acquose, essendo le differenze di energia superficiale maggiori fra il puntale a bassa ritenzione altamente idrofobico e l'acqua (72 mN/m).

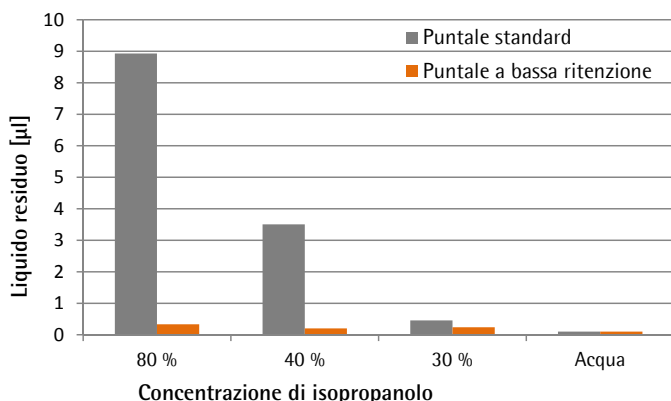


Figura 2. Effetto della tensione superficiale del liquido sulla quantità del residuo nel puntale

1000 µl di isopropanolo in diverse concentrazioni (30%, 40%, 80%) e acqua distillata sono stati aspirati e scaricati sia con puntali standard Sartorius che con puntali Optifit a bassa ritenzione Sartorius (1000 µl), usando la pipetta elettronica Picus (1000 µl) Sartorius. Le quantità di liquido rimasto nel puntale sono state misurate con il metodo di analisi gravimetrica descritto nel paragrafo „Materiali e metodi“. Il test è stato ripetuto per 10 puntali di ciascun produttore.

### Resistenza chimica dei puntali a bassa ritenzione

Diverse tecnologie sono usate per dare superfici a bassa ritenzione ai puntali delle pipette. I metodi più sicuri producono puntali con una completa copertura idrofobica e con assenza di rilasciabilità. Come risulta dalla figura 3, in termini di resistenza chimica i puntali a bassa ritenzione sottoposti al test presentano notevoli variazioni. Quanto ad alcuni puntali di altri produttori, le loro caratteristiche sotto l'aspetto della bassa ritenzione, dopo il trattamento con i solventi scelti, erano notevolmente compromesse. A prova chimica terminata, i puntali a bassa ritenzione Sartorius, invece, avevano mantenuto le loro prestazioni allo stesso livello con i puntali non sottoposti ad alcun trattamento chimico, il che permette di affermare che questi puntali sono inerti e chimicamente resistenti. Inoltre, la sterilizzazione in autoclave non ha avuto alcun effetto sulle prestazioni dei puntali a bassa ritenzione Sartorius (dati non presentati).

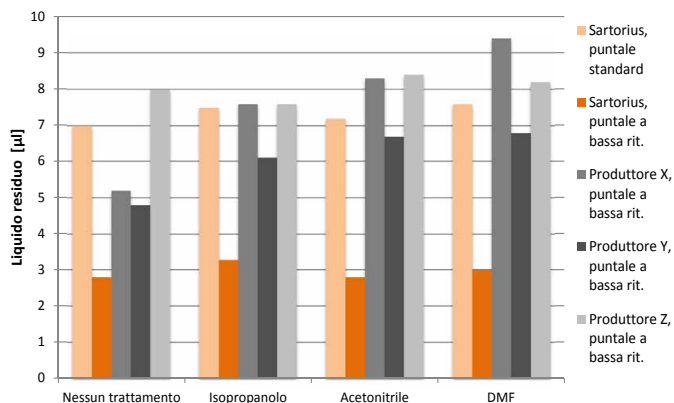


Figura 3. Confronto della resistenza chimica dei puntali a bassa ritenzione. Puntali a bassa ritenzione di tre produttori sono stati confrontati con i puntali Sartorius, sia standard che a bassa ritenzione. Il test di resistenza chimica è stato eseguito in conformità alla descrizione del paragrafo „Materiali e metodi“, usando puntali da 1000 µl con la pipetta elettronica Picus (1000 µl) Sartorius. Il test è stato ripetuto per sei puntali di ciascun produttore.

### Conclusioni

I risultati di prova dimostrano che nella manipolazione di detergenti o di altri liquidi a bassa tensione superficiale i puntali a bassa ritenzione Sartorius riducono chiaramente il liquido residuo nel puntale. I dati, inoltre, permettono di ritenere che i puntali a bassa ritenzione presenti sul mercato possano avere notevoli differenze in termini di prestazioni e tolleranza chimica. Fra i vari puntali sottoposti ai test, i puntali a bassa ritenzione Sartorius hanno garantito il miglior recupero di campioni, la migliore precisione e la migliore resistenza chimica.

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG  
Weender Landstrasse 94-108  
37075 Goettingen, Germany  
Phone +49.551.3080  
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Biohit Liquid Handling Oy  
Laippatie 1  
00880 Helsinki, Finland  
Phone +358.9.755.951  
Fax +358.9.755.95.220  
www.sartorius.com