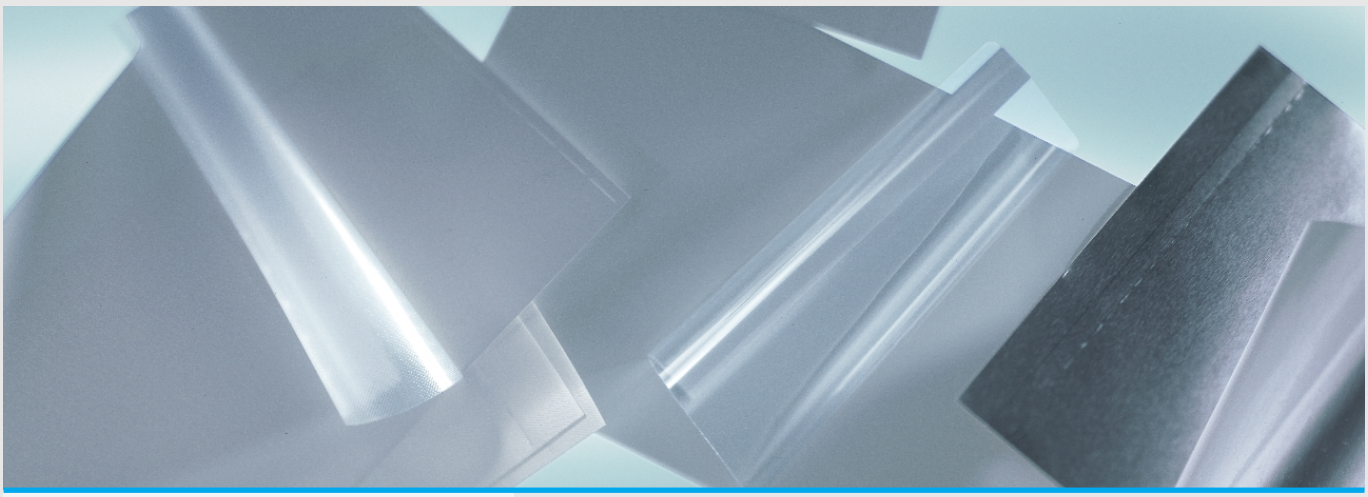
forum

Nr. 5, Oktober 2003

Technical Notes and Applications for Laboratory Work



Inhalt

1. EASYseal™
   Die Polyester-Folie für den alltäglichen Laborbedarf
2. SILVERseal™
   Hitzebeständige, durchstechbare Aluminiumfolie für PCR und Probenlagerung
3. VIEWseal™
   Hitzebeständige, hoch transparente Folie für präzise optische Messungen (Fluoreszenz, Realtime PCR)
4. POWERseal™
   Hitzebeständige, durchstechbare Folie für die PCR
5. BREATHseal™
   Atmungsaktive Folie für Anzucht von Bakterien, Hefen und Zellen in Microplatten
6. Bestellinformation

Neue Abdeckfolien für Microplatten und ihre Anwendungsgebiete in der Molekularbiologie und Zellkultur

Dicht verschlossene Microplatten sind eine grundlegende Voraussetzung für deren Anwendung in der Molekularbiologie, dem Hochdurchsatz-Screening oder der Zellkultur. Derzeit sind drei verschiedene Verschlussmethoden üblich:

1. Das Heißversiegeln von Microplatten;
2. Das Verschließen von Microplatten mit CapMats;
3. Das Verschließen von Microplatten mit Klebefolien;

Das Heißversiegeln ist insbesondere beim Verschließen von Polypropylen Lagerplatten bei der Wirkstofflagerung im Hochdurchsatz Screening die am weitesten verbreitete Methode. Das Heißversiegeln hat den Nachteil, dass die Microplatten durch den Versiegelungsprozess letztendlich zerstört und die Proben in den Näpfchen erhitzt werden. Heißversiegeln kann für Zellen oder temperaturempfindliche Proben kritisch sein. Des weiteren ist für das Heißversiegeln die Anschaffung eines, für kleinere Arbeitsgruppen wenig lohnenden, Gerätes notwendig.

CapMats zum Abdecken von Microplatten sind ebenfalls ausgesprochen populär, insbesondere bei molekularbiologischen Anwendungen wie zum Beispiel der PCR. Das Wiederverwenden von CapMats ist weit verbreitet, birgt aber das Risiko einer Kreuzkontaminationen durch Verschleppung von Probenmaterial.

Um die Nachteile des Heißversiegelns bzw. der CapMats zu umgehen, ist die Verwendung von Klebefolien eine interessante Alternative. Klebefolien sind einfach anzuwenden und

HUBERLAB.
committed to science

greiner bio-one

aufgrund deren Einsatz als Einwegartikel ist das Kreuz-Kontaminations-Risiko minimiert. Fünf verschiedene Abdeckfolien, welche aufgrund des verwendeten Klebstoffes in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden können, werden von Greiner Bio-One angeboten (Abb. 1).

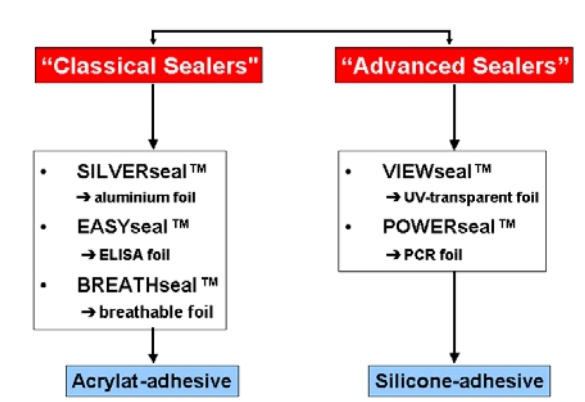


Abb. 1: Zuordnung der Klebefolien

Klassische Abdeckfolien wie zum Beispiel EASYseal™, SILVERseal™ und BREATHseal™ sind mit einem Acrylatkleber beschichtet. „Advanced Sealer" wie VIEWseal™ und POWERseal™ sind mit einem drucksensitiven Silikonkleber beschichtet. Der Silikonkleber haftet nur dann, wenn Druck auf die Folienoberfläche ausgeübt wird. Die Abdeckfolien lassen sich somit gut verarbeiten auch wenn bei einer Anwendung Handschuhe getragen werden müssen (Folie haftet nicht an den Handschuhen). Substanzen in Pulverform und weit verbreitete Modelltiere wie *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* kleben ebenfalls nicht an mit VIEWseal™ oder POWERseal™ verschlossenen Gefäßen.

Technische Eigenschaften der Abdeckfolien

1. Klebekraft / Verdunstung

Je besser eine Abdeckfolie auf einer Microplatte haftet, desto dichter ist die Microplatte verschlossen. Die Haftung der fünf Folien wurde exemplarisch mit 96 Well Microplatten ermittelt (Abb. 2). Die Haftung der Folien wird durch die Kraft in Newton pro mm (N/mm), die aufgebracht werden muss, um eine Folie von einer Microplatte abzuziehen, charakterisiert. Die beiden mit Silikonkleber beschichteten Abdeckfolien VIEWseal™ und POWERseal™ zeigen die größte Klebekraft, gefolgt von der klassischen Aluminiumfolie SILVERseal™. Mit der Klebekraft einhergehend ist die geringe Verdunstungsrate in mit VIEWseal™, POWERseal™ oder SILVERseal™ verschlossenen Microplatten (Abb. 3).

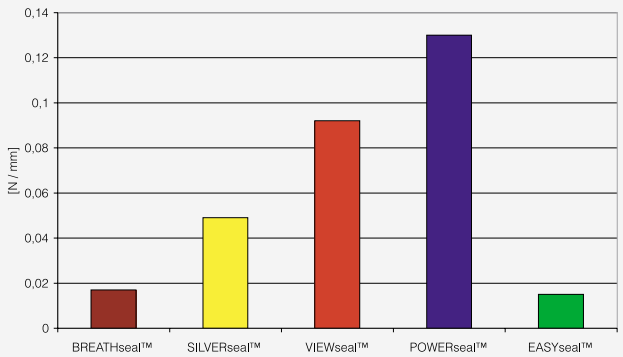


Abb. 2: Ablösekraft [N/mm] verschiedener Abdeckfolien auf 96 Well Polypropylen Microplatten

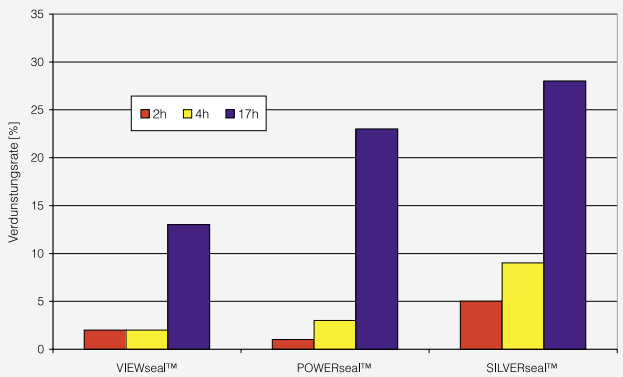


Abb. 3: Verdunstungsrate in über Nacht bei 60 °C in mit Wasser befüllten und Abdeckfolien verschlossenen 96 Well Polypropylen Microplatten

2. Optische Eigenschaften von VIEWseal™, POWERseal™ und EASYseal™

VIEWseal™ unterscheidet sich von POWERseal™ und EASYseal® durch eine außergewöhnlich hohe Transparenz (Abb. 4), auch im kürzeren Wellenlängenbereich (<400 nm). Die Transparenz, die geringe Eigenfluoreszenz sowie die Eigenschaft Licht gering zu polarisieren, bewirken, dass VIEWseal™ besonders gut für sensitive optische

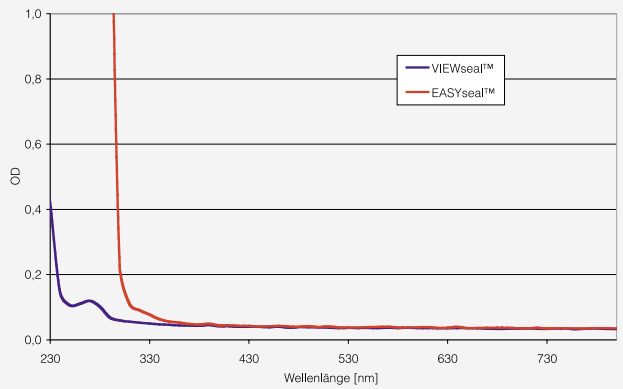


Abb. 4: Licht-Absorption von VIEW und EASYseal™

Detektionssysteme (Real Time PCR Geräte / Fluoreszenzreader im Hochdurchsatz Screening) geeignet ist. Zu messende Signale werden durch eine hohe Autofluoreszenz oder Lichtabsorption der Abdeckfolie nicht verfälscht (Abb. 5, Abb. 6).

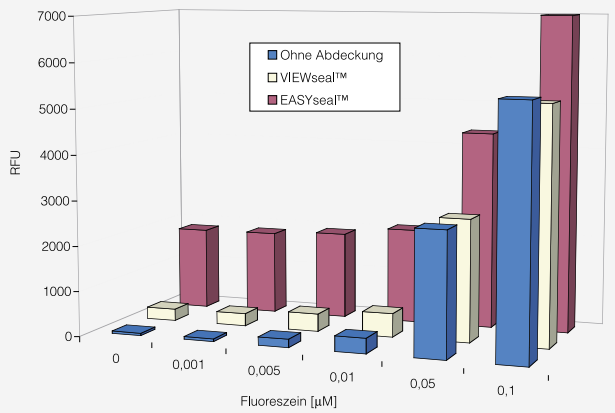


Abb. 5: Messung verschiedener Fluoreszenzkonzentrationen in unverschlossenen, mit VIEWseal™ und EASYseal™ verschlossenen Microplatten

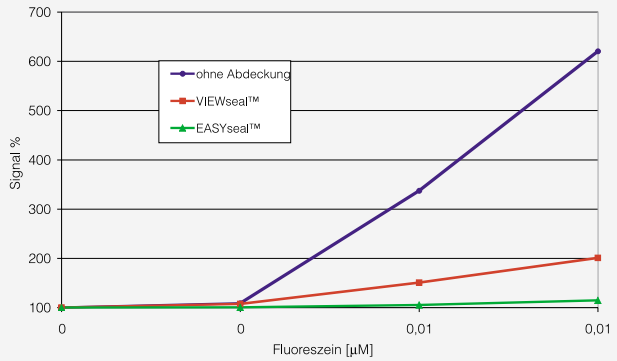


Abb. 6: Messung verschiedener Fluoreszenzkonzentrationen in unverschlossenen, mit VIEWseal™ und EASYseal™ verschlossenen Microplatten

Ein weiteres Anwendungsgebiet für VIEWseal™ ist die Abdeckung von Microplatten für die Proteinkristallisation (Abb. 7). Die einzelnen Kompartimente der Microplatte in denen die Kristallbildung stattfindet sind zuverlässig und dicht verschlossen. Aufgrund der optischen Eigenschaften von VIEWseal™ ist die Detektion von entstehenden Kristallen gewährleistet und die Kristalle lassen sich, da die Folie erschütterungsfrei von der Platte abgezogen werden kann, gut ernten.

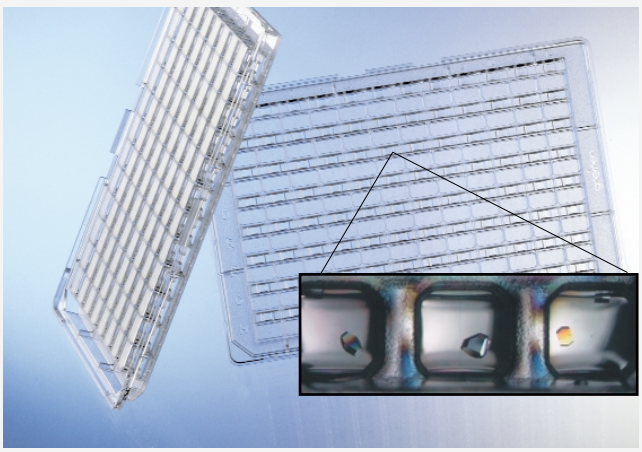


Abb. 7: Detektion von Proteinkristallen in einer mit VIEWseal™ abgedeckten 96 Well Proteinkristallisationsplatte (CrystalQuick™)

POWERseal™ zeichnet sich durch eine strukturierte, durchstechbare Oberfläche aus und ist besonders gut für die klassische PCR geeignet.

EASYseal™ ist eine ideale Alternative zu Polystyrol-Abdeckplatten und schützt zuverlässig vor Kontaminationen, zum Beispiel während den Inkubationsschritten bei ELISA-Tests.

3. Anwendung der verschiedenen Abdeckfolien in der PCR

Die Abdeckfolien VIEWseal™, POWERseal™ und SILVERseal™ sind für die PCR einsetzbar. Sie sind hitzebeständig bis 110°C sowie kältetolerant bis -80°C. Bei einem Vergleich der Ausbeute, der Fragment-Größen sowie der Anzahl falscher Banden, zwischen PCR Produkten aus Einzelgefäßen und PCR Produkten aus mit Abdeckfolie verschlossenen 96 Well Polypropylen PCR Microplatten ergaben sich keine Unterschiede.

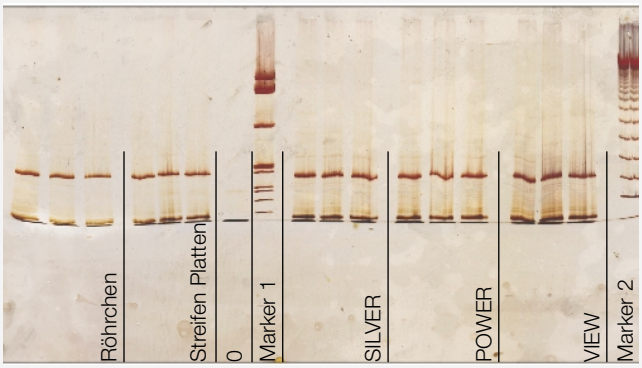


Abb. 8: Vergleich von PCR Produkten aus klassischen Reaktionsgefäßen (Tubes / Strips) mit PCR Produkten aus mit Abdeckfolie verschlossenen 96 Well Polypropylen Microplatten

4. Anwendung von BREATHseal™ zur Anzucht von Bakterien, Hefen und Zellen

Bei vielen Forschungsprojekten in der Molekularbiologie werden Bakterien, Hefen oder Zellen in Einzelgefäßen wie Reagenzgläsern, Erlenmeyerkolben oder 50 ml Zentrifugationsröhrchen kultiviert. Ziel ist meist die Isolation von genomischer DNA oder Plasmid-DNA für die Sequenzierung beziehungsweise Isolation eines exprimierten Proteins für die Kristallographie.

Mit zunehmender Automatisierung und zunehmender Zahl an zu verarbeitenden Proben werden verstärkt 96 Well MASTERBLOCK®s zum Teil auch 384 Well Microplatten für die Kultivierung der Organismen verwendet. Für eine hohe Zellausbeute, das heißt eine hohe DNA oder Proteinkonzentration ist eine optimale Versorgung der Organismen mit Nährstoffen und Sauerstoff notwendig.
Insbesondere die Versorgung mit Sauerstoff ist in mit Abdeckplatten verschlossenen Microplatten limitiert. Der Einsatz einer gasdurchlässigen Abdeckfolie wie BREATHseal™ verbessert das Zellwachstum signifikant (Abb. 9).

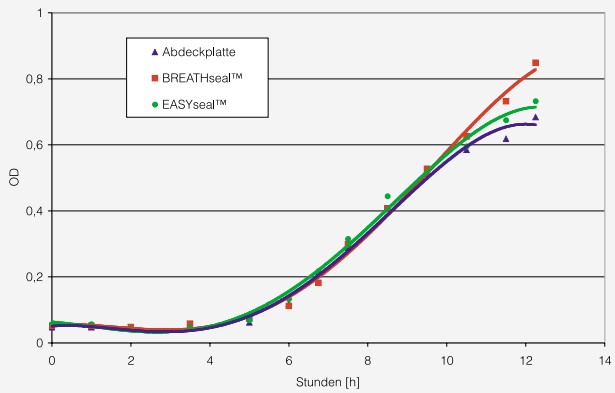


Abb. 9: Wachstum von *Escherichia coli* bei 37 °C in mit BREATHseal™, EASYseal™ und Abdeckplatten verschlossenen MASTERBLOCK®s.

BREATHseal™ ist eine gasdurchlässige, mit einem Acrylatkleber beschichtete Membran, die aus hitzeverschweißten Rayon-Fasern besteht. Die Porengröße reicht von 10 bis 50 µm (Abb. 10, nächste Seite). Durch die Schichtung der Poren wirkt die Membran wie ein Filter und gewährleistet zuverlässig den Schutz des Kulturmediums vor Luftkeimen bei gleichzeitig optimaler Sauerstoffversorgung. Eine fest haftende Abdeckfolie erleichtert zusätzlich die Verwendung eines Microplatten-Schüttlers.

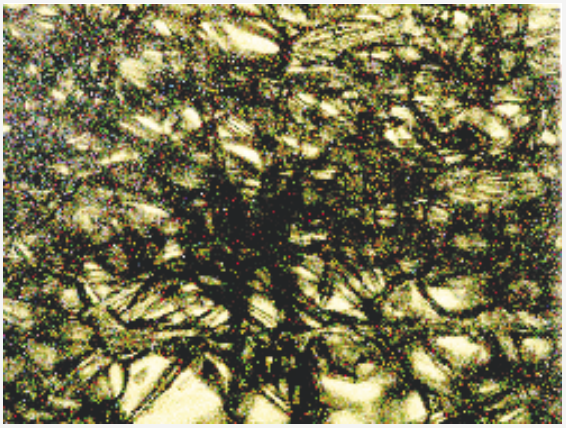


Abb. 10: Mikroskopische Aufnahme von BREATHseal™ (10fache Vergrößerung)

Obwohl kaum Flüssigkeitsbewegungen in den Näpfchen sichtbar sind ist die Zellausbeute, unabhängig von der verwendeten Abdeckung, in Microplatten die auf einem Schüttler inkubiert werden am höchsten (Abb. 11).

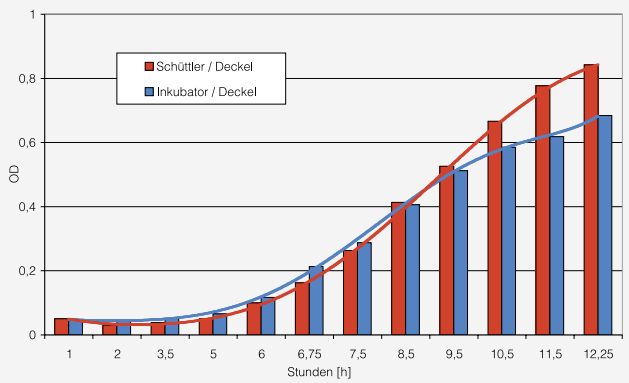


Abb. 11: Wachstum von *Escherichia Coli* in MASTERBLOCK®s.

5. Chemische Beständigkeit / Temperaturbeständigkeit

Die chemische Beständigkeit von Abdeckfolien ist ein wesentliches Qualitätskriterium für viele Anwendungsbereiche der Abdeckfolien.
Zur Überprüfung der chemischen Beständigkeit der Abdeckfolien wurden Polypropylen Microplatten mit verschiedenen Lösungsmitteln befüllt (Tabelle 1) und mit den verschiedenen Abdeckfolien versiegelt. Die verschlossenen Microplatten wurden gedreht, so dass die Abdeckfolien beziehungsweise der Klebstoff in direktem Kontakt zu den Lösungsmitteln waren. Die Beständigkeit der Abdeckfolien wurde durch eine visuelle Beurteilung nach einer Woche ermittelt (Tab. 1). Aufgrund der gewählten Testmethode konnte BREATHseal™ nicht mit überprüft werden, denn durch Auslaufen oder Verdunstung der Lösungsmittel (gasdurchlässige Membran) war keine eindeutige Beurteilung möglich.
Die höchste Beständigkeit wies POWERseal™ auf. Acht von zwölf getesteten Lösungsmitteln zeigten keinen Einfluss auf die der Abdeckfolie.

Die Temperaturbeständigkeit der Abdeckfolien ist in Tabelle 2 zusammengefasst. SILVERseal™, VIEWseal™ und POWERseal™ können sowohl in der PCR (Temperaturbeständig bis 110°C) als auch für die Probenlagerung (Temperaturbeständig bis -80°C) eingesetzt werden. Bei BREATHseal™ muss, insbesondere bei höheren Temperaturen, die erhöhte Verdunstungsrate berücksichtigt werden (gasdurchlässige Membranstruktur der Abdeckfolie).

Tabelle 1: Chemische Beständigkeit der Abdeckfolien

Chemikalie	EASYseal™ (#676 001)	VIEWseal™ (#676 070)	POWERseal™ (#676 080)	SILVERseal™ (#676 090)
Aceton	4	4	4	3
Acetonitril	3	3	1	1
Essigsäure 1%	1	1	1	3
Eisessig	1	3	1	3
Chloroform	4	4	4	4
DMSO	3	3	3	1
Ethanol	3	1	1	1
H_2SO_4 0,5 M	1	1	1	1
HCl 32 %	3	1	1	4
Isopropanol	3	1	1	1
Methanol	3	1	1	1
Phenol	3	3	3	3

1 = *Beständig* = nach einer Woche Inkubation keine sichtbare Veränderung der Abdeckfolie.

3 = *mäßig Beständig* = nach einer Woche optisch und physikalische Veränderungen der Abdeckfolie (Eintrübung, Einreißen beim Abziehen).

4 = *nicht beständig* = Klebstoff und Abdeckfolie wird aufgelöst, Wells undicht.

Für die Eignung der jeweiligen Abdeckfolie kann diese Tabelle grundsätzlich nur als Orientierungshilfe dienen, da das Verhalten gegen Chemikalien von der jeweiligen Anwendung abhängt. In vielen Fällen sind Praxisversuche unerlässlich.

Tabelle 2: Temperaturbeständigkeit

Produkt	Temperaturbeständigkeit
EASYseal™	-20°C bis 60°C
VIEWseal™	-80°C bis 110°C
POWERseal™	-80°C bis 110°C
SILVERseal™	-80°C bis 110°C
BREATHseal™	-80°C bis 60°C
	Verdunstungsrate 4200g H_2O/m^2 in 24 h

Für die Temperatur-Eignung der jeweiligen Abdeckfolie kann diese Tabelle grundsätzlich nur als Orientierungshilfe dienen, da das Verhalten des Produktes von der jeweiligen Anwendung abhängt. In vielen Fällen sind Praxisversuche unerlässlich.

Bestellinformation

Kat.-Nr.	Beschreibung	Stk. pro Btl./Karton
676 001	EASYseal™, transparent	100
676 070	VIEWseal™, transparent	100
676 080	POWERseal™, durchstechbar, perforiert	100
676 090	SILVERseal™, aus Aluminium	100
676 050	BREATHseal™, gasdurchlässig	50
676 051	BREATHseal™, gasdurchlässig, steril	50

Revision Oktober 2005 – Editor: Dr. Rainer Heller, Productmanager Microplates/HTS

HUBERLAB.
committed to science

greiner bio-one