



Pipette
Puntali
Tecniche

Valutazione
Selezione
Tecniche

Ottenere risultati migliori
con la buona pratica di pipettaggio



Sommario

1 Prefazione	4
2. Pianificazione, flusso di lavoro e selezione	6
Pianificazione del progetto e flusso di lavoro	6
Analisi del flusso di lavoro	6
Ottimizzazione del flusso di lavoro	8
Requisiti di range di volume e produttività dei campioni	8
Requisiti dei contenitori per campioni/reagenti	11
Requisiti specifici dei campioni/delle analisi	12
3. Scegliere la pipetta giusta	16
Pipette a spostamento d'aria	17
Pipette a spostamento positivo	17
Ottimizzazione del flusso di lavoro	18
Requisiti di range di volume e produttività dei campioni	18
Pipette monocanale elettroniche	20
Pipette multicanale	21
Sistemi di pipettaggio a elevata produttività	22
Pipette speciali	23
Pipette a spostamento positivo	23
Pipette a ripetizione	24
Pipettatori	25
Dispenser per bottiglia	26
4. Scegliere il puntale giusto: design, qualità e adattabilità	28
Design del puntale	28
Qualità del puntale	29
Tenuta tra la pipetta e il puntale	30
Sistema di espulsione dei puntali LTS™ LiteTouch™	30
Scelta del puntale	32
Puntali esclusivi per applicazioni speciali	32

Sommario

5. Tecniche di pipettaggio	34
Range di volume ottimale	35
Profondità di immersione del puntale	36
Inclinazione corretta dell'aspirazione	37
Mantenere l'uniformità	38
Dosaggio uniforme dei campioni	39
Avvinamento dei puntali	40
Evitare le variazioni di temperatura	41
Impostazioni costanti del micrometro	42
Quali sono i vostri rischi di pipettaggio?	44

1 Prefazione

Good Pipetting Practice ha lo scopo di aiutare i ricercatori a compiere scelte informate in merito agli strumenti, alle corrette tecniche di pipettaggio, all'ergonomia, alla taratura e al funzionamento di routine, in modo tale che possano ottenere i migliori risultati possibili.

Il pipettaggio, ovvero la misura e il trasferimento di volumi ridotti di liquido, nell'ordine di microlitri e millilitri, è probabilmente l'attività praticata con maggiore frequenza nei laboratori di ricerca: la capacità di portarla a termine in maniera rapida e accurata è un requisito indispensabile per ottimizzare le attività in laboratorio. Per la maggior parte del lavoro in laboratorio vengono utilizzate le moderne pipette a spostamento d'aria, poiché offrono numerosi vantaggi e sono ideali per dosare in maniera efficace piccole quantità di liquido. Utilizzando pipette e puntali di alta qualità è possibile aumentare la produttività e ridurre i costi.

2. Pianificazione, flusso di lavoro e selezione

Pianificazione del progetto e flusso di lavoro

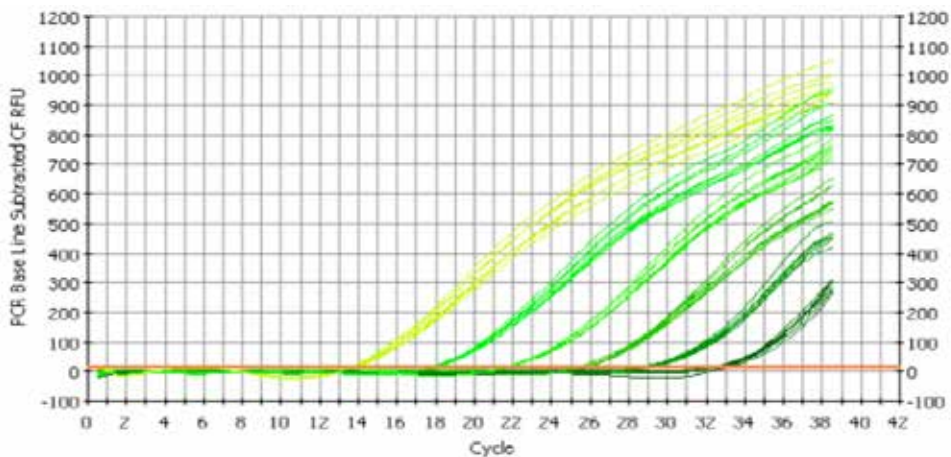
La maggior parte dei nuovi progetti beneficerà dei vantaggi di un processo completo di pianificazione nel quale tutte le fasi del flusso di lavoro mirano a conseguire la massima efficienza nella produzione dei dati. Dal punto di vista della manipolazione dei liquidi ciò presuppone un'analisi del campione iniziale, del punto finale richiesto dall'analisi e della produttività. A loro volta questi fattori condizioneranno le tecniche impiegate e i formati richiesti per la manipolazione dei liquidi (provette, piastre, ecc.), determinando di conseguenza la scelta degli strumenti ottimali per il flusso di lavoro. Per erogare il volume di liquido richiesto, in ogni attività di pipettaggio, la pipetta, il puntale e la tecnica dell'operatore devono essere considerati come un unico sistema. La scelta della pipetta e del puntale più adeguati e l'uso della tecnica più efficace rappresentano una parte integrante della progettazione e dell'implementazione di qualsiasi progetto o esperimento.

Analisi del flusso di lavoro

La prima fase della procedura è quella che prevede l'identificazione di tutti i passaggi di un flusso di lavoro sperimentale: dall'isolamento del campione iniziale alla produzione finale dei dati, comprese inoltre tutte le fasi della preparazione a supporto del flusso di lavoro, ad esempio le preparazioni di soluzioni tampone o mastermix. Quindi, è necessario comprendere il livello di variabilità tollerabile affinché l'esperimento produca dati di buona qualità. Alcune applicazioni e fasi sono molto più sensibili alla variabilità sperimentale rispetto ad altre; ad esempio, gli esperimenti che comportano l'amplificazione, come la qPCR, possono essere molto sensibili alla variabilità contrariamente alla preparazione di una semplice soluzione tampone. Una scelta non ottimale di pipetta e puntale e una tecnica di pipettaggio non adeguata possono rappresentare un'importante fonte di variabilità sperimentale: tutti gli esperimenti che, ad esempio, dipendono da una curva standard generata mediante una diluizione in serie possono essere influenzati in maniera significativa da un pipettaggio inadeguato.

Analisi del flusso di lavoro

- Identificare la tolleranza massima per la variabilità sperimentale
- Identificare le applicazioni e le fasi che hanno maggiore probabilità di introdurre la variabilità
 - qPCR
 - Diluizioni in serie



Ottimizzazione del flusso di lavoro

Requisiti di range di volume e produttività dei campioni

Spesso un flusso di lavoro comincia con un certo numero di liquidi a volumi relativamente elevati (ad esempio per la preparazione di soluzioni tampone, la piastratura delle cellule, ecc.), come il caso del trasferimento di 5 o 10 ml per il quale viene posta meno enfasi sull'accuratezza. Tuttavia, la tecnica di rilevazione finale prevede solo l'uso di volumi ridotti e potrebbe richiedere un'erogazione più accurata.

Le esigenze in termini di velocità e accuratezza/ripetibilità devono essere bilanciate poiché strumenti a volume elevato diversi presentano funzioni diverse. La linea guida consigliata per la scelta della pipetta con il volume corretto è quella di considerare il range operativo compreso tra il 35 e il 100% del volume totale indicato. Una pipetta da 1.000 µl, ad esempio, presenta un range operativo tra 350 e 1.000 µl. Anche se la specifica minima per questa pipetta può essere pari a 100 µl e lo strumento è regolabile fino a 0 µl, il suggerimento di utilizzare 350 µl come valore minimo è basato sulla tecnica degli utenti. Per volumi inferiori al range del 35% sulle pipette è necessaria una tecnica di pipettaggio più accurata. Lavorare con un range inadeguato per qualsiasi strumento compromette l'accuratezza e la ripetibilità.

Tipo di pipetta	Modello	Capacità min.	Capacità max.	Accuratezza 10%	Ripetibilità 10%	Accuratezza 50%	Ripetibilità 50%	Accuratezza 100%	Ripetibilità 100%
Pipetta a spostamento positivo	MR-10	0,5 µl	10 µl	9%	3%	2%	0,60%	1,50%	0,60%
	MR-250	50 µl	250 µl	3%	0,60%	1,70%	0,30%	1%	0,20%
	MR-1000	100 µl	1.000 µl	3%	1,60%	1%	0,50%	0,80%	0,40%

Pipetta a spostamento d'aria	L-10XLS	0,5 µl	10 µl	2,50%	1,20%	1,50%	0,60%	1%	0,40%
	L-200XLS	20 µl	200 µl	2,50%	1%	0,80%	0,25%	0,80%	0,15%
	L-1000XLS	100 µl	1.000 µl	3%	0,60%	0,80%	0,20%	0,80%	0,15%

Accuratezza e ripetibilità

L'accuratezza è la capacità di una pipetta di erogare un volume di liquido prossimo a quello impostato. In genere le specifiche relative all'accuratezza delle pipette a spostamento d'aria riportano un valore dell'1% circa per pipette con impostazioni del volume nominale superiori al 35%. Per le pipette con impostazione del volume pari o inferiore al 10%, le specifiche possono corrispondere a un'accuratezza fino a 3 volte inferiore.

La ripetibilità misura la capacità delle pipette di fornire erogazioni simili di un liquido in modo riproducibile. In genere la specifica relativa alla ripetibilità delle pipette a spostamento d'aria si attesta tra 1/3 e 1/4 del valore relativo all'accuratezza. L'accuratezza si definisce spesso come ripetibilità o riproducibilità del campione oppure anche come deviazione standard.

Alcune tipologie di pipette sono più adeguate rispetto ad altre per diversi tipi di campioni. Per i campioni viscosi, ad esempio, è necessario optare per una tecnica o un modello di pipetta differenti al fine di ottenere un buon livello di accuratezza e ripetibilità negli esperimenti. La tabella seguente fornisce maggiori informazioni:

Tipo di soluzione campione		Range di volume	Soluzione suggerita	
			Sistemi manuali	Sistemi manuali
Viscosa, solvente organica, estrema	Grandi volumi di campione	20 - 50 ml	AutoRep S	AutoRep E
Non viscosa, acquosa, ambiente		20 - 50 ml	AutoRep S	Pipet-X
Viscosa, solvente organica, estrema		1 - 20 ml	AutoRep S	AutoRep E
Non viscosa, acquosa, ambiente		1 - 20 ml	Pipet-Lite XLS, AutoRep S	Pipet-X, E4 XLS
Viscosa, solvente organica, estrema	Volumi medi di campione	200 - 1.000 µl	Pos-D, AutoRep S	AutoRep E
Non viscosa, acquosa, ambiente		200 - 1.000 µl	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Viscosa, solvente organica, estrema	Piccoli volumi di campione	10 - 200 µl	Pos-D	
Non viscosa, acquosa, ambiente		10 - 200 µl	Pipet-Lite XLS	E4 XLS
Viscosa, solvente organica, estrema	Campioni in microvolumi	<10 µl	Pos-D	
Non viscosa, acquosa, ambiente		<10 µl	Pipet-Lite XLS	E4 XLS

Se il numero di campioni da analizzare è abbastanza elevato, può essere conveniente, per la preparazione dei campioni e/o per l'analisi, passare dalle provette alle piastre e utilizzare le pipette multicanale, che consentono di velocizzare il flusso di lavoro.

Se devono essere analizzate più piastre a 96 o 384 pozzetti, è preferibile utilizzare una soluzione di pipettaggio a 96 canali, che permette di risparmiare tempo e di ridurre le possibilità di errori.

Requisiti dei contenitori per campioni/reagenti

L'uso di piastre a 96 pozzetti potrebbe richiedere lo spostamento di più campioni o reagenti dalle provette alle piastre o viceversa e, a volte, sono necessari trasferimenti tra piastre di diverso formato (da 24 a 96 pozzetti). Le pipette multicanale con distanziatore regolabile possono ridurre i tempi di sostituzione del formato fino all'85% poiché è possibile spostare simultaneamente fino a 8 campioni alla volta: ad esempio, lo spostamento del campione target da un gruppo di provette non standard a una piastra a 96 pozzetti standard (centri da 9 mm) richiede solo una semplice aspirazione di campione dalla piastra non standard.



Pipette multicanale con distanziatore regolabile

Aiutano a spostare simultaneamente più campioni

- Dalle provette alle piastre (e viceversa)
- Tra piastre diverse (24/48/96 pozzetti)

Requisiti specifici dei campioni/delle analisi

Le pipette elettroniche possono essere molto utili in caso di pipettaggio complesso o ripetuto grazie alla possibilità di eseguire erogazioni ripetute e di programmare specifici protocolli di pipettaggio. Inoltre, i risultati ottenuti con le pipette elettroniche sono più costanti rispetto alle pipette manuali perché il microprocessore permette di evitare gli errori umani e la variabilità nel movimento del pistone. Questa tendenza si nota soprattutto con i dati che richiedono diluizioni in serie, che possono dare origine a errori di pipettaggio multipli, e con applicazioni per cui è necessaria l'amplificazione, come la qPCR.

Ogni analisi e campione presenta proprietà uniche che possono porre potenziali problemi. Nelle applicazioni di genomica, ad esempio, si dovrebbero sempre utilizzare puntali con filtro per ridurre al minimo gli effetti della contaminazione da DNA nel campione o nella pipetta. I filtri impediscono che gli aerosol del campione contaminino lo shaft e di conseguenza i campioni successivi. I filtri contribuiscono a proteggere anche da contaminazioni batteriche, agenti corrosivi e incrostazioni saline.

Le pipette elettroniche possono essere vantaggiose per:

- Protocolli complessi o ripetitivi
- Applicazioni che richiedono elevati livelli di accuratezza e ripetibilità (ad esempio la qPCR)

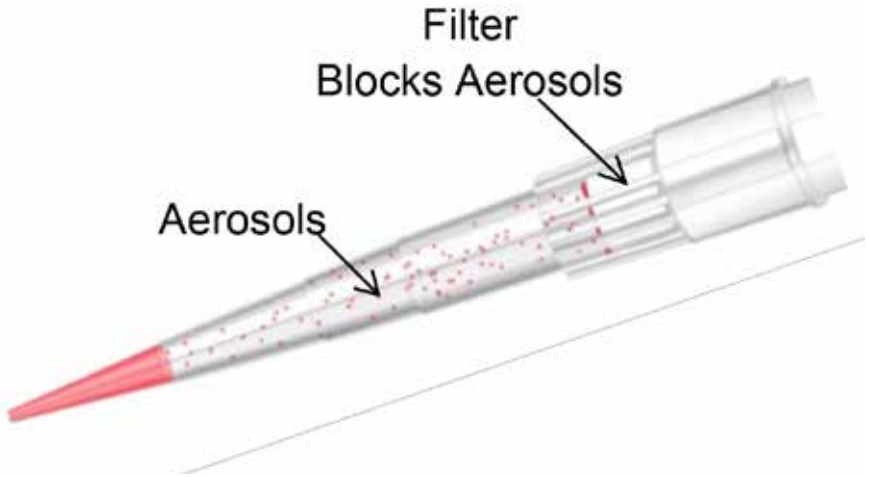


Una volta selezionati il range di volume e le tipologie di pipette, la fase successiva del processo è quella di identificare i puntali adeguati per tutte le applicazioni previste.

I puntali sono solitamente prodotti in polipropilene che, sebbene inerte e in grado di resistere a diversi solventi, è un materiale che presenta dei fattori nascosti da considerare. Le differenti resine polipropileniche forniscono caratteristiche chiave per il produttore ed è possibile includere numerosi additivi in grado di alterare alcuni dei processi produttivi. Alcuni di questi additivi possono essere rilasciati dal prodotto finito e di conseguenza influenzare i risultati degli esperimenti. Per superare questo potenziale problema, è consigliabile acquistare puntali garantiti come privi di sostanze contaminanti, assicurandosi che il fornitore offra prove documentate della sensibilità a suddette sostanze. Esempi di contaminanti comprendono DNA e pirogeni, che saranno presenti se il processo di produzione e confezionamento non viene effettuato in una camera bianca. Esistono numerose società di stampaggio e confezionamento di consumabili che producono i loro articoli in stabilimenti che non vengono completamente controllati. Uno stabilimento di produzione adeguato garantisce che tutti i lavoratori indossino camici, cappelli, maschere e guanti protettivi e che nell'ambiente di lavoro sia presente solo aria filtrata in modo tale da prevenire la contaminazione. Anche in questo caso, i certificati a supporto dei test condotti su questi materiali devono specificare il processo di verifica e la sensibilità delle analisi; i certificati che indicano solo che un prodotto è privo di un determinato contaminante senza riportare il metodo o la sensibilità di rilevazione non forniscono alcuna informazione o garanzia di qualità.

Applicazioni esclusive

- Utilizzare puntali con filtro per ridurre al minimo gli effetti della contaminazione da DNA o del trascinarsi di campione
- I puntali con filtro proteggono inoltre il pistone da contaminazione batterica, agenti corrosivi e incrostazioni



La considerazione successiva riguardante i puntali è la disponibilità dei volumi specifici richiesti per le varie pipette scelte, nonché dei puntali speciali che potrebbero essere necessari per l'applicazione, ad esempio i puntali con filtro per le applicazioni di genomica. Infine, viene valutata la dimensione della confezione in termini della capacità di fornire quantità sufficienti di puntali per un determinato periodo di tempo.

Per range di volumi diversi da pipettare, potrebbe essere necessario un numero attentamente pianificato di pipette manuali per rimanere all'interno dei range di volume richiesti ed evitare cambi di volume ripetuti.



3. Scegliere la pipetta giusta

Esistono numerosi strumenti di pipettaggio disponibili che consentono di ottenere risultati ottimali e una maggiore produttività e che allo stesso tempo forniscono ulteriori vantaggi come il miglioramento delle caratteristiche ergonomiche e della funzionalità per una data applicazione. Esistono due principali tipologie di pipette per microvolumi: a spostamento d'aria e a spostamento positivo. Entrambe determinano il volume di liquido erogato utilizzando il diametro del pistone e la lunghezza della corsa del pistone.

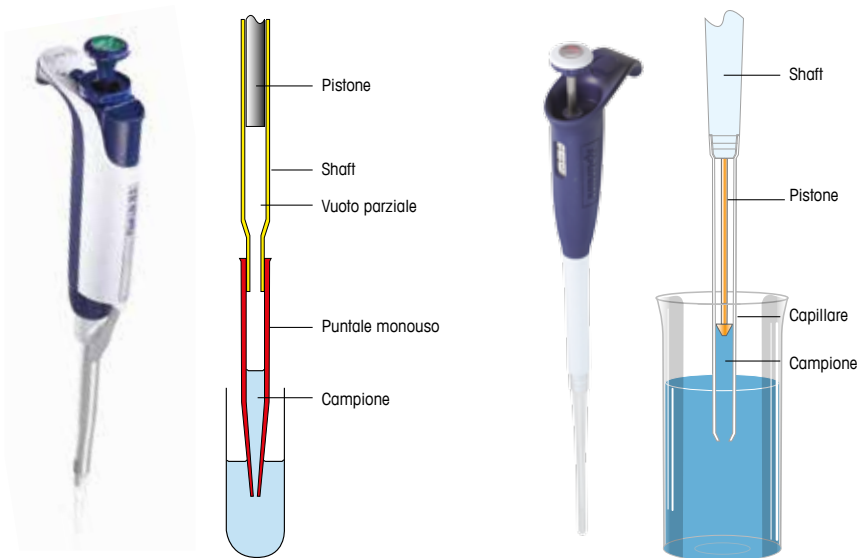


Figura 1: pipette a spostamento d'aria e a spostamento positivo

Pipette a spostamento d'aria

- Estremamente accurate con soluzioni acquose
- Convenienti

Le pipette a spostamento d'aria sono gli strumenti di pipettaggio più comuni presenti in laboratorio. Il metodo di funzionamento prevede il posizionamento dell'estremità del puntale nel campione liquido e quindi il rilascio del pistone. Quando il pistone viene spostato verso l'alto all'interno del corpo della pipetta si crea un vuoto parziale e il campione liquido sale nel puntale riempiendo la parte non occupata del volume selezionato creata dal vuoto parziale stesso.

Pipette a spostamento positivo

- Estremamente accurate con la maggior parte delle soluzioni
- Consigliate per liquidi viscosi, densi, volatili o corrosivi

Sebbene non siano comuni come quelle a spostamento d'aria, le pipette a spostamento positivo vengono usate di frequente negli ambienti di laboratorio. Esse sfruttano un pistone monouso e un sistema capillare per creare uno spazio vuoto fisico pari al volume selezionato. Il pistone è a diretto contatto con il campione e quando si sposta verso l'alto, il campione viene trascinato nel vaso capillare. Le pipette a spostamento positivo offrono accuratezza e ripetibilità elevate in caso di soluzioni acquose, ma il loro utilizzo è consigliato anche per soluzioni viscosi, dense, volatili e corrosive. I pistoni e i capillari monouso impiegati nelle pipette a spostamento positivo sono più costosi rispetto ai puntali delle pipette a spostamento d'aria, pertanto si raccomanda l'uso di queste ultime nei casi in cui i risultati attesi siano i medesimi.

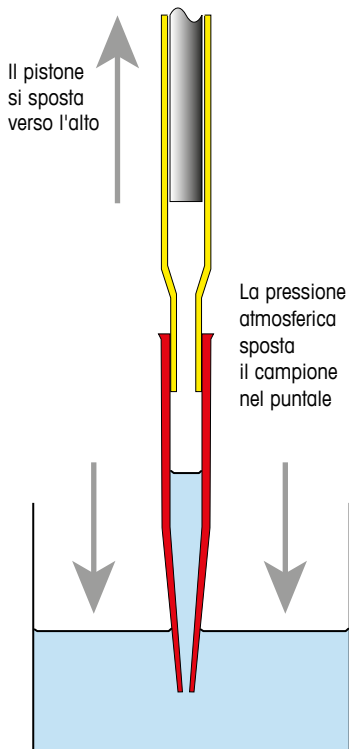


Figura 2:
funzionamento delle pipette a spostamento d'aria

Ottimizzazione del flusso di lavoro

Requisiti di range di volume e produttività dei campioni

Spesso un flusso di lavoro comincia con un certo numero di liquidi a volumi relativamente elevati (ad esempio per la preparazione di soluzioni tampone, la piastratura delle cellule, ecc.), come il caso del trasferimento di 5 o 10 ml per il quale viene posta meno enfasi sull'accuratezza. Tuttavia, la tecnica di rilevazione finale prevede solo l'uso di volumi ridotti e potrebbe richiedere un'erogazione più accurata.

Le esigenze in termini di velocità e accuratezza/ripetibilità devono essere bilanciate poiché strumenti a volume elevato diversi presentano funzioni diverse. La linea guida consigliata per la scelta della pipetta con il volume corretto è quella di considerare il range operativo compreso tra il 35 e il 100% del volume totale indicato. Una pipetta da 1.000 µl, ad esempio, presenta un range operativo tra 350 e 1.000 µl. Anche se la specifica minima per questa pipetta può essere pari a 100 µl e lo strumento è regolabile fino a 0 µl, il suggerimento di utilizzare 350 µl come valore minimo è basato sulla tecnica degli utenti. Per volumi inferiori al range del 35% sulle pipette è necessaria una tecnica di pipettaggio più accurata. Lavorare con un range inadeguato per qualsiasi strumento compromette l'accuratezza e la ripetibilità.

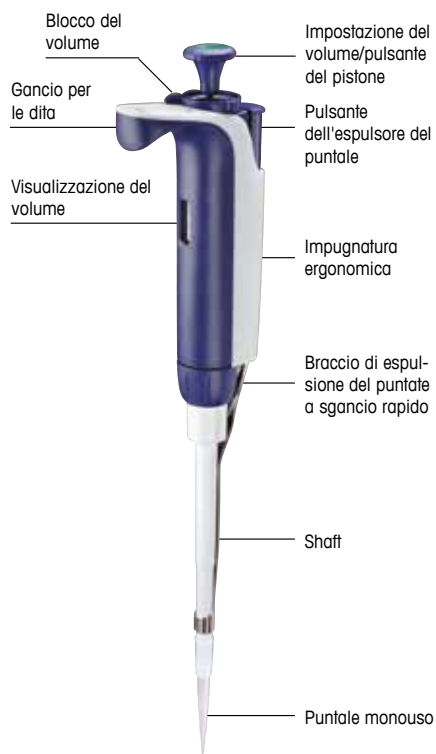


Figura 3:
pipetta manuale



Figura 4: pipetta elettronica

Pipette monocanale elettroniche

Le pipette elettroniche sono presenti sul mercato sin dalla metà degli anni 80. Nelle pipette elettroniche a spostamento d'aria, l'aspirazione e l'erogazione sono controllate da un microprocessore e l'avvio è consentito da una levetta di sgancio e non è quindi necessario utilizzare il pollice per premere o rilasciare il pistone. Utilizzando una pipetta elettronica, la maggior parte degli utenti otterrà maggiore uniformità nel prelievo e nell'erogazione dei campioni, nonché accuratezza e ripetibilità superiori, eliminando potenzialmente la variabilità dovuta alla tecnica di ognuno.

Le moderne pipette elettroniche sono facili da utilizzare con una buona interfaccia utente e un ampio schermo a colori. Sono versatili e indicate all'accurata esecuzione di attività complesse, come dosaggi ripetuti, titolazioni controllate, diluizioni in serie, misure dei volumi di campioni sconosciuti e altre funzioni programmabili. Con una pipetta elettronica è facile programmare il movimento ripetuto del pistone per miscelare due soluzioni nel puntale. Le pipette elettroniche con controlli di aspirazione e velocità di dosaggio possono essere utilizzate per pipettare una grande varietà di liquidi. Le velocità maggiori sono ideali per il pipettaggio di campioni acquosi, mentre quelle inferiori sono indicate per campioni viscosi, schiumogeni o sensibili al taglio.

Pipette multicanale

Le pipette multicanale sono ideali per applicazioni ad elevata produttività, come il metodo ELISA su piastra a 96 pozzetti e la PCR per la sintesi del DNA. Le pipette multicanale dal design avanzato, come i modelli Rainin leggeri a 8 e 12 canali, sono dotate di impugnatura ergonomica e consentono di eseguire in maniera rapida e sicura il caricamento dei puntali, offrendo un prelievo costante dei campioni su tutti i canali. I modelli con distanziatore regolabile permettono all'utente di impostare la distanza dei puntali per l'erogazione da piastre a 96 pozzetti a rack di provette o piastre a 24 pozzetti. Le pipette multicanale con distanziatore regolabile sono disponibili nel formato manuale ed elettronico e in un ampio range di volumi.



Figura 5: pipette multicanale

Sistemi di pipettaggio a elevata produttività

I sistemi di pipettaggio che consentono aspirazione e dosaggio simultanei in 96 pozzetti sono ideali per flussi di lavoro rapidi ed efficienti per i quali vengono utilizzate piastre a pozzetti multipli. Fino a poco tempo fa, l'unico modo di effettuare il pipettaggio in 96 pozzetti o nell'intera piastra era quello di utilizzare costosi sistemi robotizzati. Tuttavia, il Liquidator 96 di Rainin, un sistema di pipettaggio da banco completamente manuale che non richiede elettricità né programmazione e formazione per gli utenti, semplifica e velocizza il pipettaggio a 96 e 384 pozzetti e può essere utilizzato in laboratorio o sul campo.



Figura 6:
sistema di pipettaggio da banco Liquidator

Pipette speciali

Altre tipologie di pipette (o strumenti di manipolazione dei liquidi) sono meno comuni di quelle a spostamento d'aria, ma vengono spesso preferite dai ricercatori per il loro design e gli specifici ambiti di applicazione.

Pipette a spostamento positivo

La Rainin Pos-D è un esempio di pipetta manuale a spostamento positivo. Queste pipette utilizzano un pistone monouso e un sistema capillare per creare uno spazio vuoto fisico pari al volume selezionato. Il pistone è a diretto contatto con il campione e quando si sposta verso l'alto, il campione viene trascinato nel vaso capillare. Queste pipette prevengono completamente la contaminazione incrociata da parte del campione, poiché viene utilizzato di volta in volta un nuovo pistone. Ciò le rende ideali per la PCR e altre applicazioni critiche. L'uso delle pipette a spostamento positivo è consigliato per soluzioni viscosi, dense, volatili e corrosive.



Figura 7:
pipetta a spostamento positivo



Pipette a ripetizione

Grazie alla siringa e al pistone integrato, le pipette a ripetizione funzionano secondo il principio dello spostamento positivo. Sono progettate per aspirare un ampio volume di campione liquido, che viene quindi erogato in aliquote uguali e multiple. Sono disponibili nella versione elettronica e in quella manuale e utilizzano siringhe monouso in un ampio range di volumi.

Figura 8:
pipetta a ripetizione elettronica (sinistra) e manuale

Pipettatori

Utilizzati principalmente per volumi elevati (25-100 μ l), i pipettatori sono sistemi elettronici o manuali che forniscono la funzione di aspirazione per pipette sierologiche in vetro o plastica. La pipetta è collegata a un "nasello" morbido e l'utente preme un pulsante sul pipettatore per creare un vuoto parziale all'interno della stessa pipetta in vetro o plastica. Il vuoto parziale viene spostato dal liquido sottoposto alla pressione atmosferica. A seguito del trasferimento in un altro contenitore, il liquido viene erogato premendo un'altra levetta di sgancio o sfruttando la gravità. Le versioni più semplici impiegano un bulbo flessibile morbido che viene manualmente premuto e rilasciato per creare e controllare il vuoto parziale.



Figura 9:
pipettatore elettronico

Dispenser per bottiglia

Alcuni liquidi di laboratorio per loro stessa natura (ad esempio liquidi corrosivi o tossici) dovrebbero essere lasciati in cappe aspiranti o armadi di sicurezza e non spostati all'interno del laboratorio. Il dispenser per bottiglia consente di trasferire in maniera sicura quantità relativamente ridotte di questi liquidi. Il dispenser è caratterizzato da un funzionamento a pompa e le versioni più recenti consentono di eseguire l'erogazione accurata e sicura di liquidi "pericolosi" in volumi fino a 50 ml.



Figura 10: dispenser per bottiglia



4. Scegliere il puntale giusto: design, qualità e adattabilità

La pipetta e il puntale consigliato dal produttore devono essere considerati come un sistema e non come due singoli componenti.

Nella scelta dei puntali delle pipette, gli aspetti che occorre considerare sono design, qualità e adattamento.

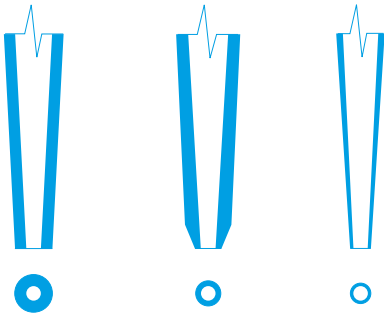


Figura 11:
puntale a pareti spesse (sinistra), puntale smussato (centro) e puntale FinePoint di Rainin (destra)

Design del puntale

Il design più avanzato è quello del puntale flessibile a pareti sottili con una punta fine o un piccolo foro. Per il pipettaggio di volumi ridotti (meno di 20 μl), i puntali FinePoint™ di Rainin migliorano l'accuratezza e la ripetibilità rispetto ai puntali standard.

I puntali FinePoint sono più flessibili rispetto alla maggior parte degli altri puntali standard e consentono al campione liquido di fluire indipendentemente dall'angolazione per un dosaggio completo. Ciò significa che viene trattenuta una quantità molto inferiore di campione rispetto a quanto accade con i puntali caratterizzati da pareti più spesse o estremità smussate.

Le differenze nel design dei puntali influenzano le prestazioni, l'accuratezza e la ripetibilità. Tuttavia, se utilizzate correttamente, le pipette offrono prestazioni garantite in termini di accuratezza e ripetibilità.

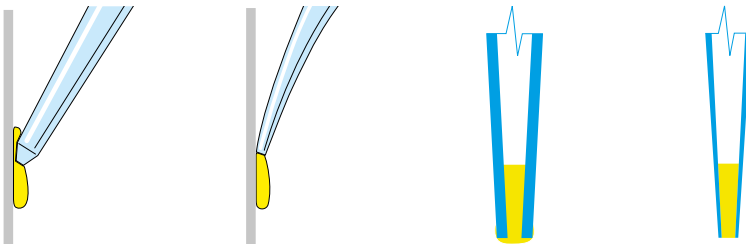


Figura 12: erogazione (sinistra) e ritenzione (destra) con un puntale smussato e un puntale FinePoint

Qualità del puntale

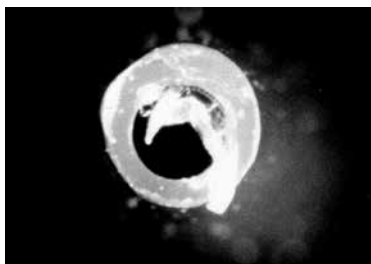
I più gravi difetti di qualità si riscontrano sul foro del puntale, o apertura terminale, in quanto è il punto che influisce maggiormente su aspirazione ed erogazione del campione. La Figura 13 illustra l'ingrandimento di quattro estremità di puntali.

La sbavatura è rappresentata dai resti di plastica derivanti dal processo di stampaggio sulla parte interna del puntale o attorno all'apertura.

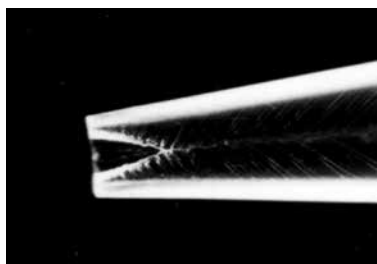
I difetti di stampaggio e **i difetti coassiali** sono causati da un riempimento errato dei perni centrali dello stampo a seguito dell'introduzione della plastica. Tutti questi difetti si traducono in perdita di campione durante il pipettaggio. Un processo di produzione che garantisca un'elevata qualità riduce al minimo l'incidenza dei difetti del puntale e degli errori da essi derivanti.



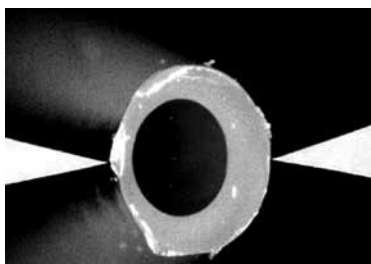
Foro puntale di qualità elevata



Sbavatura sul foro del puntale



Difetto di stampaggio



Foro decentrato

Figura 13: immagini di fori che illustrano un puntale di buona qualità e tre tipologie di difetti

Tenuta tra la pipetta e il puntale

La maggior parte dei puntali conici si adatta a qualsiasi marca di pipette. Ciò si traduce in un maggior attrito tra lo shaft e la superficie di tenuta, dato che lo shaft della pipetta è incuneato nel puntale. Non c'è un meccanismo di feedback che avvisa quando un puntale universale è perfettamente a tenuta; a tal fine, è necessario che l'utente spinga lo shaft della pipetta nel puntale per garantire una tenuta adeguata.

Poiché viene utilizzato l'intero avambraccio, è relativamente facile applicare una forza eccessiva nel caricare i puntali, che richiederanno poi una forza altrettanto elevata per l'espulsione. In conclusione, la forza necessaria per caricare ed espellere i puntali universali può aumentare il rischio di lesioni da sforzo ripetuto, in particolare nel caso di utilizzo prolungato della pipetta.

Sistema di espulsione dei puntali LTS™ LiteTouch™

Riconoscendo le questioni ergonomiche associate alla forza impiegata nel caricamento e nell'espulsione dei puntali nonché gli altri problemi legati alla tenuta (specialmente per le pipette multicanale), Rainin ha sviluppato un nuovo design chiamato LTS™ o sistema LiteTouch™ al fine di migliorare in maniera significativa l'aderenza tra puntali e shaft delle pipette. LTS riduce di molto la forza richiesta per l'inserimento dello shaft della pipetta e per l'espulsione dei puntali.

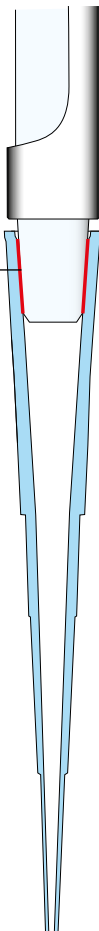
Queste due caratteristiche del sistema LTS operano in maniera congiunta al fine di ridurre la forza necessaria per l'espulsione del puntale

- La superficie di tenuta ridotta consente di sigillare i puntali in maniera molto semplice
- Il fermo all'interno del puntale crea un arresto fisso che previene la necessità di spingere con forza lo shaft nel puntale

Il design della superficie di tenuta garantisce una buona stabilità laterale impedendo al puntale di sganciarsi durante l'utilizzo.

Universale

Ampia superficie
di tenuta



Sistema LTS LifeTouch

Superficie di
tenuta ridotta

Arresto fisso

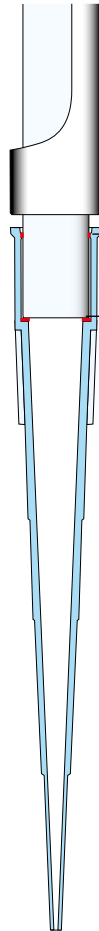


Figura 14: puntale universale (conico) e LTS (cilindrico)

Scelta del puntale

In sintesi, per garantire un flusso di campioni semplice e costante nonché un rischio inferiore di contaminazione del campione è bene considerare i seguenti elementi nella selezione dei puntali delle pipette:

Materiale del puntale. I puntali devono essere di materiale a ritenzione molto bassa, come il polipropilene vergine che non contiene additivi, tinte o materiali riciclati.

Design del puntale. Spessore della parete, flessibilità, dimensione del foro e finitura superficiale sono fattori importanti per adeguare la pipetta e il flusso liquido in entrata e in uscita dal puntale.

Qualità del puntale. I puntali sono prodotti in una camera bianca? È possibile tracciare i singoli lotti? I puntali sono privi di additivi o difetti che possono provocare la perdita di campione ed errori?

Puntali esclusivi per applicazioni speciali

Esistono diverse tipologie di puntali "non standard" che sono utili per applicazioni o flussi di lavoro speciali.

I puntali Gel-Well™ di Rainin sono specificamente progettati per la stratificazione dei gel e sono disponibili con estremità piatte o tonde e dimensioni dei fori molto ridotte.

I puntali con foro ampio sono pensati per la manipolazione di campioni delicati, come cellule intere o DNA con un peso molecolare molto elevato. L'ampio foro riduce la deformazione di taglio del campione e previene la lisi delle cellule. Questi puntali sono inoltre consigliati nel caso di pipettaggio di soluzioni saline o sospensioni di cellule.

I puntali a bassa ritenzione dispongono di polimeri speciali super idrofobici che consentono di erogare campioni straordinariamente "viscosi" come le proteine dall'estremità del puntale senza che alcun residuo di campione rimanga all'interno.

I puntali ShaftGard™ di Rainin proteggono lo shaft della pipetta e l'espulsore del puntale dalla contaminazione accidentale. I puntali ShaftGard possono essere utilizzati in provette strette o pozzetti profondi senza il rischio che la pipetta tocchi le pareti del contenitore.

I puntali extra lunghi sono più stretti e più lunghi rispetto ad altri puntali caratterizzati da un volume equivalente. Il diametro ridotto e la lunghezza di 102 mm consente a questi puntali di raggiungere l'estremità di provette strette e pozzetti profondi.

I puntali con filtro vengono utilizzati per eliminare la contaminazione incrociata o la contaminazione da aerosol delle pipette senza produrre alcuna differenza percepibile nelle prestazioni della pipetta. È consigliato l'uso di puntali con filtro per pipettare soluzioni volatili.

Il tubo capillare/i pistoni sono progettati per l'uso con le pipette a spostamento positivo e sono più efficaci con soluzioni non acquose dense, viscoso o volatili oppure per pipettare soluzioni acquose fredde o tiepide.

Puntali per la preparazione dei campioni. Di recente sono stati messi in commercio puntali per la preparazione dei campioni con resine incluse nella stretta estremità del puntale. Il design dei puntali PureSpeed di Rainin offre un metodo comodo, conveniente e semiautomatizzato per la purificazione delle biomolecole, la dissalazione o l'uso nelle applicazioni di scambio ionico.

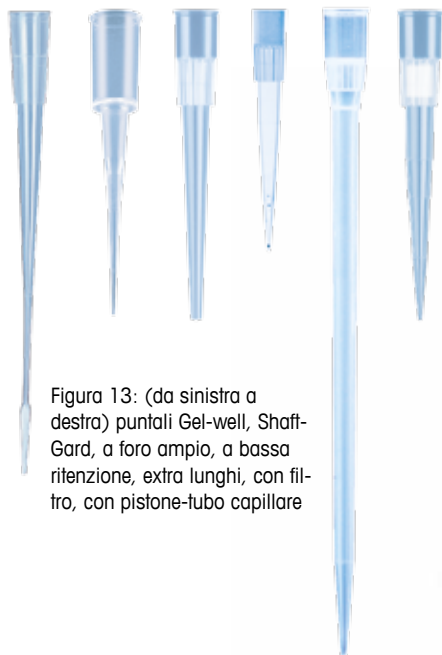


Figura 13: (da sinistra a destra) puntali Gel-well, Shaft-Gard, a foro ampio, a bassa ritenzione, extra lunghi, con filtro, con pistone-tubo capillare



Figura 14: puntale per la preparazione dei campioni PureSpeed di Rainin

5. Tecniche di pipettaggio

La corretta valutazione dell'applicazione e quindi la scelta degli strumenti influenzerà in maniera significativa i risultati della ricerca. Eppure, questi non sono gli unici aspetti che i ricercatori dovrebbero considerare per ottenere risultati ottimali. Anche la corretta tecnica di pipettaggio e le influenze degli strumenti e dell'ambiente avranno un impatto importante sui risultati della ricerca. L'accuratezza e la ripetibilità sono essenziali nell'ambito della ricerca scientifica e le pagine seguenti forniscono quindi una breve panoramica dei diversi argomenti associati alle tecniche di pipettaggio. Seguendo semplicemente queste tecniche, è possibile incrementare accuratezza e ripetibilità del 5%.

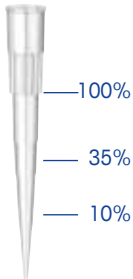
Range di volume ottimale

Il range operativo normale per la maggior parte delle pipette è 10 - 100% del volume nominale. Sebbene questo sia considerato il range operativo delle pipette, le specifiche delle prestazioni variano quando il volume impostato diminuisce.

Le specifiche relative all'accuratezza di una pipetta da 100 microlitri si attestano su +/- 0,8% al 50 - 100% del valore nominale. Eppure, impostando il volume a 10 µl (o 10% del valore nominale), la specifica di inaccuracy sarebbe di oltre 3 volte maggiore, o al 2,5 - 3%.

Pertanto il volume ottimale per accuratezza e ripetibilità è generalmente pari al 35 - 100% del valore nominale. È necessario evitare di impostare il volume della pipetta a meno del 10% del massimo. Piuttosto, è consigliabile scegliere una pipetta più piccola.

Volume e range



Il pipettaggio a volume ridotto (fino al 10%) può ridurre l'accuratezza anche del 3%

Profondità di immersione del puntale

La corretta profondità di immersione del puntale può incrementare l'accuratezza anche del 5% ed è particolarmente importante quando si utilizzano pipette per microvolumi. Il puntale, a seconda delle sue dimensioni, deve essere immerso per 1-2 mm per le pipette per microvolumi e fino a 6-10 mm per le pipette per grandi volumi. Se il puntale viene immerso troppo in profondità il gas al suo interno viene compresso, provocando un'eccessiva aspirazione di liquido. Inoltre il liquido residuo sulla superficie del puntale può alterare i risultati. Se il puntale non viene immerso abbastanza in profondità è possibile che venga aspirata aria. Di conseguenza possono crearsi bolle e il volume risulta inaccurato.

Profondità di immersione del puntale



1-10 μ l: 1-2 mm

10-200 μ l: 2-3 mm

200-2000 μ l: 3-6 mm

Una corretta profondità d'immersione può migliorare l'accuratezza anche del 5%. Si raccomanda di rispettare i seguenti valori: (>2000 μ l, profondità 6 - 10 mm)

Inclinazione corretta dell'aspirazione

L'angolo di immersione del puntale della pipetta nel campione deve essere il più possibile vicino a 90° e non deviare di oltre 20° dalla posizione verticale.

In caso di pipette per microvolumi, mantenere un'inclinazione prossima alla posizione verticale può migliorare l'accuratezza fino al 2,5%.

Se l'inclinazione è maggiore di 20° può produrre misure inaccurate.

Questo provoca l'ingresso di una quantità eccessiva di liquido nel puntale e fa sì che l'aspirazione risulti non accurata.

Angolo di immersione verticale



Inclinazione corretta



Inclinazione sbagliata

Un angolo di immersione di 60° può causare l'aspirazione dello 0,7% in più di liquido rispetto a quanto previsto.

Mantenere l'uniformità

Mantenere un ritmo e una velocità costanti contribuisce a produrre risultati ottimali e più ripetibili. Con un ritmo e una velocità costanti è possibile ottenere un miglioramento di accuratezza pari al 5%.

Un ritmo di pipettaggio regolare

Mantenere un ritmo di pipettaggio costante passando da un campione all'altro. È necessario evitare di eseguire frettolosamente le operazioni ed è necessario mantenere un ritmo costante per le varie fasi del ciclo di pipettaggio.

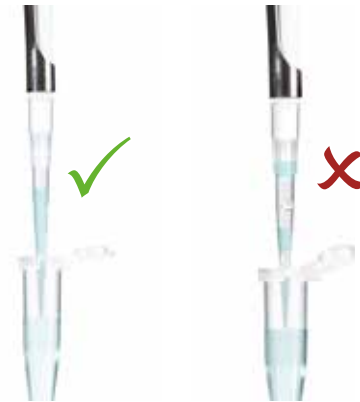
Pipette a volume elevato

Per volumi maggiori, generalmente pari a 1 ml o più, è consigliabile fermarsi circa 1 secondo o più dopo il prelievo dei campioni, con il puntale ancora nel liquido. In questo modo, il campione verrà aspirato completamente.

Azionare il pistone in maniera regolare

Quando si preme e si rilascia il pistone è importante mantenere una velocità costante. Un'aspirazione incontrollata può provocare bolle, schizzi, aerosol nonché la contaminazione dello shaft della pipetta e del pistone e potrebbe inoltre determinare la perdita di volume del campione.

Ritmo e velocità costanti



Aspirazione corretta

Presenza di aria nel puntale

Dosaggio uniforme dei campioni

Per ottenere una maggiore accuratezza e ripetibilità tra i campioni è consigliabile accertarsi che anche l'ultima goccia venga erogata e non aderisca al foro. Ciò è particolarmente importante nel caso in cui vengano pipettati dei microvolumi, proprio a causa delle ridotte quantità di campione presenti.

Una buona tecnica di dosaggio migliora l'accuratezza fino all'1%. Durante il dosaggio, controllate che l'estremità tocchi la parete del contenitore: questo eviterà al campione di rimanere nel puntale. Dopo il dosaggio far scivolare l'estremità del puntale sulla parete del contenitore per rilasciare l'eventuale liquido rimasto sul foro.

Dosaggio uniforme dei campioni



Effettuare il dosaggio in un liquido o sulla superficie di un liquido.

Quando si lavora in un liquido o sulla sua superficie, il pipettaggio inverso evita di raccogliere il campione dopo il dosaggio.

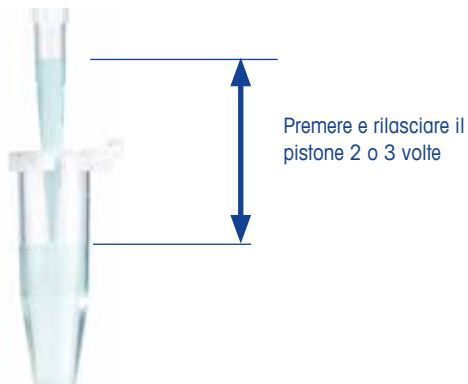
Avvinamento dei puntali

Avvinando preliminarmente i puntali due o tre volte, si forma al loro interno una pellicola che aumenta l'accuratezza anche dello 0,2%. Questa operazione aiuta a neutralizzare gli effetti capillari nelle pipette per microvolumi, mentre nei puntali più grandi equalizza la temperatura interna con quella del campione.

Eccezioni

L'avvinamento può influire negativamente sui risultati quando si pipettano soluzioni molto calde o fredde, come i bagni di ghiaccio o le soluzioni superiori ai 37 °C, poiché potrebbe generare errori fino al 5%.

Risciacquo del puntale



Evitare le variazioni di temperatura

Temperatura ambiente costante

La temperatura ideale per il pipettaggio è di $21,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, la stessa utilizzata per la taratura. Evitare zone soggette a correnti d'aria o luce solare che possono provocare improvvise variazioni di temperatura, compromettendo l'accuratezza dell'aspirazione. Il pipettaggio a una temperatura costante può migliorare i risultati anche del 5%.



Lasciar trascorrere il tempo necessario per l'equilibrio

Un altro importante aspetto della variazione di temperatura è il tempo di equilibrio. Le pipette reagiscono alle variazioni di temperatura dei diversi campioni. I liquidi freddi tendono a essere erogati in eccesso, mentre i volumi di quelli caldi possono essere inferiori rispetto al previsto. Salvo dove diversamente specificato, è necessario lasciar trascorrere il tempo necessario per l'equilibrio della temperatura delle pipette e dei liquidi prima dell'uso.

Calore della mano

Quando il pipettaggio si prolunga, il calore della mano può trasmettersi alla pipetta, espandendo l'aria al suo interno e producendo risultati inaccurati.

È possibile evitare questo effetto usando pipette di alta qualità costruite con polimeri PVDF. Inoltre, tra un ciclo e quello successivo, è bene appoggiare la pipetta sul suo supporto invece di tenerla in mano.



Impostazioni costanti del micrometro

Quando il volume viene ridotto, è sufficiente diminuire l'impostazione fino a ottenere il valore desiderato. Quando invece il volume viene aumentato, ruotare la rotella di selezione di $\frac{1}{3}$ di giro oltre il volume desiderato. Questo evita l'errore di trascinarsi meccanico e aumenta l'accuratezza.





Quali sono i vostri rischi di pipettaggio?

Good Pipetting Practice è un programma completo e personalizzato che contribuisce a individuare e ridurre i rischi specifici associati al pipettaggio. Il nostro strumento GPP Risk Check™ è un modo eccezionale per iniziare: sono sufficienti 5 minuti per ottenere una valutazione dei rischi correlati al pipettaggio e le raccomandazioni per ridurli al minimo.



METTLER TOLEDO propone un seminario approfondito su GPP e gestione del rischio nel pipettaggio. Per maggiori informazioni, è possibile contattare un esperto Rainin.

► www.mt.com/gpp

www.mt.com/rainin

Per maggiori informazioni

Mettler-Toledo GmbH

CH-8606 Greifensee, Switzerland

Tel. +41-44-944 22 11

Fax: +41-44-944 30 60

Soggetto a modifiche tecniche

©08/2013 Mettler-Toledo AG

Global MarCom Switzerland