



Retsch GmbH
Retsch-Allee 1-5
D - 42781 Haan

Telefon 02104/2333-100
E-Mail info@retsch.de

www.retsch.de

TEMPERATURREGULIERTE PROBENVORBEREITUNG IN DER BIOCHEMIE

MIT DER NEUEN SCHWINGMÜHLE MM 500 CONTROL

Bei biochemischen Analysen nimmt die Temperatur einen hohen Stellenwert ein. Damit die Eigenschaften biologischer Proben auch bei der Probenvorbereitung nicht verändert werden, ist eine kontinuierliche Kühlung oder sogar das Einfrieren des Probenmaterials erforderlich.

In diesem Fachbericht werden die Möglichkeiten der temperaturregulierten Probenvorbereitung von biochemischen Proben mit der Schwingmühle MM 500 control aufgezeigt; der temperaturkontrollierte Zellaufschluss, wie ihn ein globales Pharmaunternehmen durchführt, wird als Anwendungsbeispiel vorgestellt.



Abb. 1: Schwingmühle MM 500 control

Patentierte Probenkühlung

Die MM 500 control von RETSCH ist eine innovative Schwingmühle mit zwei Mahlstationen für verschraubbare Screw-Lock Mahlbecher und einer Schwingfrequenz bis zu 30 Hz. Sie ist die erste Schwingmühle weltweit, die eine kontinuierliche Probenkühlung während der Probenvorbereitung erlaubt, womit sie bestens für biochemische Anwendungen geeignet ist. Die Kühlung erfolgt über sogenannte Kühlplatten: Die Probengefäße werden auf den oszillierenden Kühlplatten eingespannt und somit während des gesamten Prozesses gekühlt. Die aktuelle Temperatur der Kühlplatten wird kontinuierlich überwacht und im Display angezeigt.

Das neuartige patentierte Kühlkonzept ermöglicht zahlreiche neue Anwendungen und erreicht bei der Zuverlässigkeit von biochemischen Anwendungen ein neues Niveau: die MM 500 control ermöglicht einen sicheren und effizienten Prozessablauf mit einfachem Probenhandling bei kontinuierlicher Kühlung der Probe. Eine Zwischenkühlung während der Probenvorbereitung, z. B. im Kühltank oder in einem Eisbad, oder auch das Arbeiten im Kühlraum sind nicht länger erforderlich.

Die Probenkühlung in der MM 500 control lässt sich auf zwei unterschiedliche Arten umsetzen, je nachdem, in welchem Temperaturbereich gekühlt werden soll. Neben der im Folgenden beschriebenen aktiven Kühlung, bietet die MM 500 control auch die Möglichkeit, wie die anderen Retsch Schwingmøhlen, Zyklenprogramme mit Kühlpausen zu wählen oder die Frequenz zu verringern, um den Energieeintrag und damit die Wärmeentwicklung im Prozess zu reduzieren.

Konfiguration 1: Kühlung mit einem Umlaufkøhler

Für diese Variante wird ein Umlaufkøhler, zum Beispiel ein Chiller, an die Møhle angeschlossen:

- I Für eine moderate Probenkøhlung, bspw. bis - 10 °C
- I Für lange Prozesszeiten geeignet



Abbildung 2: Konfiguration 1 - Kühlung mit einem Umlaufkøhler.

Bei der Konfiguration der Variante 1 werden die Køhlplatten der Møhle mit einem flüssigen Køhlmedium (z.B. Wasser, Ethylen, Glykol oder einem anderen Thermofluid) durchstrømt. Sie nehmen damit die Temperatur des Køhlmediums an, die sich wiederum auf die Probengefäße überträgt.

Die Køhltemperatur wird bei dieser Konfiguration manuell am Umlaufkøhler eingestellt. Im Display lässt sich kontrollieren, welche Temperatur aktuell an den Køhlplatten vorliegt. Je nach Leistungsbereich des Umlaufkøhlers und seinen erreichbaren Køhltemperaturen, lassen sich hiermit moderate Køhltemperaturen beispielsweise von - 10 °C an der Køhlplatte umsetzen.

Die Kühlung mit einem zirkulierenden Køhlmedium bietet sich für biochemische Prozesse mit langen Prozesszeiten und moderaten Køhltemperaturen an. Soll beispielsweise die Temperatur für einen Zellaufschluss durchgängig unter 4 °C gehalten werden, bietet sich das Arbeiten mit einem Umlaufkøhler an (siehe Anwendungsbeispiel Hefezellen im zweiten Teil des Artikels).

Konfiguration 2: Kühlung mit flüssigem Stickstoff

In dieser Konfiguration wird die MM 500 control mit dem Zusatzmodul „cryoPad“ ausgestattet und an einen Stickstofftank angeschlossen:

- I Vollautomatisierte Temperaturregulierung mit Hilfe des Zusatzmoduls cryoPad
- I Für eine Probenkühlung bis – 100 °C geeignet

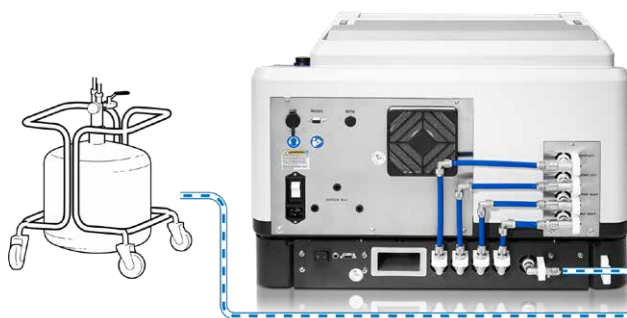


Abbildung 3: Konfiguration 2 - Kühlung mit flüssigem Stickstoff

In der Variante 2 durchströmt flüssiger Stickstoff die Kühlplatten der Schwingmühle und kühlt diese auf bis zu - 100 °C herunter. Die Temperatur der Kühlplatten überträgt sich effektiv auf die Probengefäße. Die sehr niedrige Temperatur von flüssigem Stickstoff von – 196 °C wirkt der Wärmeentwicklung während der Zerkleinerung effektiv entgegen.

Bei dieser Konfiguration ist der Wert über das Display der MM 500 control in Schritten von 10 °C zwischen 0 und - 100 °C wählbar. Die vollautomatisierte Regelung gewährleistet die Temperaturkonstanz während des gesamten Prozesses.

Die Kühlung mit flüssigem Stickstoff ermöglicht das Einfrieren von Proben oder die Zerkleinerung bereits eingefrorener Proben. Werden wässrige oder fettige Proben eingefroren, sind sie spröde und lassen sich in Kugelmøhlen durch Prall und Reibung zu Pulver zerkleinern, wie zum Beispiel Gewebeproben (Abb. 4).



Abbildung 4: Homogenisierung einer gefrorenen Gewebeprobe in der MM 500 control bei -60 °C.



Abb. 5: Screw-Lock Probengefäße in verschiedenen Größen und Materialien.



Abb. 6: Der Begasungsdeckel verändert die Atmosphäre im Mahlbecher.



Abb. 7: GrindControl überwacht Druck und Temperatur im Mahlbecher.



Abb. 8: Adapter für die Aufnahme von 18 Reaktionsgefäßen (z. B. Eppendorf Tubes 1,5 ml oder 2 ml).

Große Auswahl an Zubehör erlaubt die optimale Anpassung einer Anwendung

Die Screw-Lock Probengefäße lassen sich komfortabel auf den Kühlplatten einsetzen und während der Mahlpausen öffnen, ohne sie aus der Station zu entnehmen, zum Beispiel für eine zwischenzeitliche Überprüfung. Die Probenkühlung ist während des gesamten Prozesses, also auch in den Pausen, gewährleistet.

Für die optimale und kontaminationsfreie Verarbeitung eines spezifischen Probenmaterials sind die Screw-Lock Mahlbecher der MM 500 control in verschiedenen Werkstoffen und Größen von 50 ml bis 125 ml erhältlich (Abb. 5).

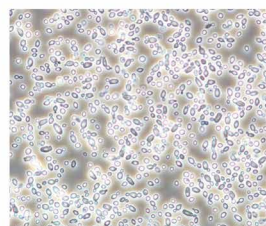
Mit Hilfe eines Adapters (Abb. 8) können achtzehn 2 ml Kunststoffgefäße (z. B. Eppendorf Tubes) oder 9 Metallbecher zur gleichzeitigen Verarbeitung kleiner Probenmengen verwendet werden.

Für Spezialanwendungen, die einer Kontrolle der Atmosphäre im Probengefäß bedürfen oder eine Überwachung der Zustandsgrößen „Druck“ und „Temperatur“ erfordern, stehen funktionalisierte Deckel für die Screw-Lock Probengefäße zur Verfügung (Abb. 6 und 7).

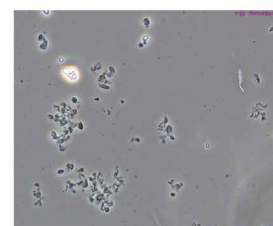
Anwendungsbeispiel eines globalen Pharma- und Diagnostikunternehmens: Temperaturkontrollierter Aufschluss von Hefezellen mit der MM 500 control

Der Zellaufschluss ist ein biochemisches Verfahren, um an Proteine, RNA oder andere biologische Bestandteile einer Zelle zu gelangen. Um die Zellwand aufzubrechen, kommt z. B. das sogenannte „Bead-Beating-Verfahren“ zum Einsatz. Die Zellsuspension wird hierbei zusammen mit Glaskügelchen in ein Reaktionsgefäß gegeben und kräftig geschüttelt. Das Schütteln erfolgt üblicherweise mit Vibrationshomogenisatoren oder Schwingmühlen. Die durch die Schwingung induzierten Reibungseffekte scheren die Zellwände auf, so dass die Bestandteile der Zelle analysiert werden können. Die Reibung führt aber gleichzeitig auch zu einem Temperaturanstieg der Probe. Bereits Temperaturen >10 °C können kritisch sein und die Homogenate der Zelle zerstören. Bei einem Zellaufschluss ist demnach eine Probenkühlung zwingend erforderlich.

Bei der hier vorgestellten Anwendung eines globalen Pharma- und Diagnostikunternehmens handelt es sich um eine Inprozesskontrolle bei der Enzymproduktion mit den Hefezellen *P. pastoris* und *C. boidinii*. Bisher wurde der Zellaufschluss mittels Bead Beating in einem Vibrationshomogenisator mit Taumelbewegung durchgeführt. In diesem Anwendungsbericht wird daher nicht nur der Vorteil der kontinuierlichen Kühlung in der MM 500 control bewertet, sondern auch gezeigt, dass der Zellaufschluss in der Schwingmühle vergleichbar effektiv wie im Vibrationshomogenisator ist.



vorher



nachher

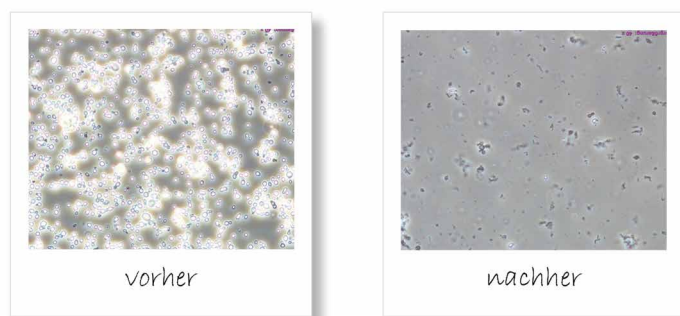


Abb. 9: Mikroskopische Aufnahme von *C.boidinii* (vorherige Seite) und *P.pastoris* (oben) vor und nach dem Zellaufschluss in der MM 500 control.

Setup und Prozessparameter bei der Anwendung

- I Für den Zellaufschluss wird die MM 500 control an einen laboreigenen Umlaufkühler angeschlossen (Konfiguration 1). Das Kühlmedium ist Wasser.
- I Für den Zellaufschluss werden zwei 125 ml Screw-Lock Probengefäße aus rostfreiem Stahl verwendet. Für eine Machbarkeitsstudie wird weiterhin der in Abbildung 6 dargestellte Adapter für 18 Reaktionsgefäße getestet.
- I Für das Bead Beating werden Glaskugeln mit 0,5 – 1,0 mm Durchmesser in die Suspension eingebracht.
- I Es wird eine Schwingfrequenz von 30 Hz über eine Zeit von 8 – 10 Minuten an der Maschine eingestellt und ein Programm mit Kühlungsintervallen gewählt.

Messergebnisse

Der Zellaufschluss in der MM 500 control erfolgt ebenso effektiv, wie in dem zuvor eingesetzten Homogenisator (Abb. 10 und 11). Es können sowohl die Screw-Lock Probengefäße als auch Eppendorf Reaktionsgefäße für den Aufschluss verwendet werden. Der Umstieg vom bislang genutzten Vibrationshomogenisator mit Taumelbewegung auf die Schwingmühle MM 500 control ist ohne Qualitätsverlust möglich.

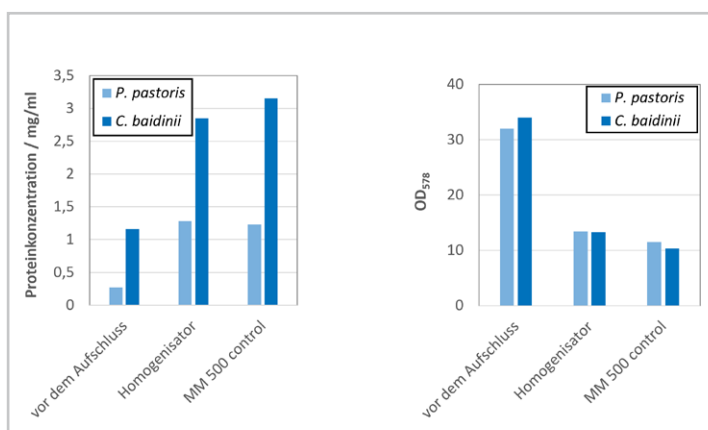


Abbildung 10: Proteinkonzentration und OD₅₇₈ von *P. pastoris* und *C. baidinii* vor und nach der Homogenisierung. Je höher die Differenz der Messwerte zu dem Wert vor dem Zellaufschluss ist, desto höher ist der Aufschlussgrad. Die mit der MM 500 control erzielten Ergebnisse entsprechen denen des Homogenisators.

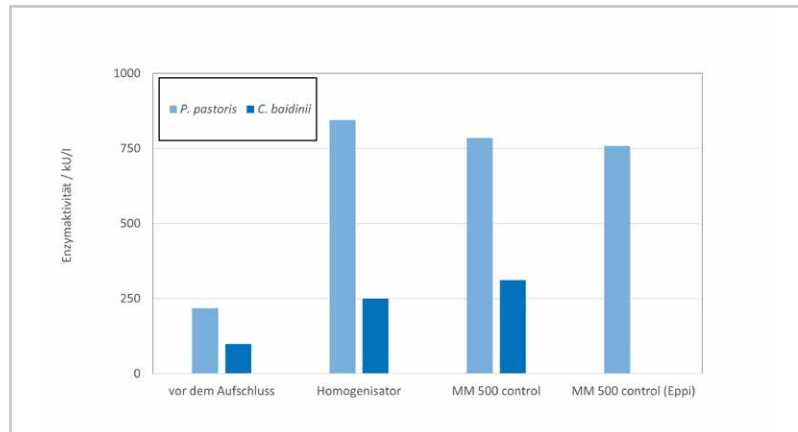


Abbildung 11: Enzymaktivität von *P. pastoris* und *C. baidinii* vor und nach der Homogenisierung. Die mit der MM 500 control erzielten Ergebnisse sind vergleichbar mit denen des Homogenisators.

Die kontinuierliche Kühlung der Proben ist gewährleistet und die Temperatur der Kühlplatten lässt sich entsprechend im Display überwachen, wodurch sich eine Effizienzsteigerung beim Arbeitsablauf und eine erhöhte Prozesssicherheit ergibt. Eine manuelle Zwischenkühlung des Probenmaterials in einem Eisbad während der Probenvorbereitung ist nicht länger erforderlich.

Durch die gleichzeitige Bearbeitung von zwei Proben in den zwei Mahlstationen lässt sich Prozesszeit sparen. Die Handhabung der Probe hat sich durch das einfache Befüllen und Entnehmen und die leichte Reinigung des Probengefäßes bzw. Nutzung von Einmalgefäßen in der MM 500 control deutlich verbessert. Die geringere Lautstärke der Schwingmühle bietet einen wertvollen Zugewinn im Laboralltag.

FAZIT

Die Schwingmühle MM 500 control ist bestens für biochemische Anwendungen geeignet, bei denen die Temperatur eine wichtige Rolle spielt und eine kontinuierliche Probenkühlung erforderlich ist. Die Vorteile der MM 500 control wurden am Anwendungsbeispiel „Zellaufschluss von Hefezellen“ eines globalen Pharma- und Diagnostikunternehmens aufgezeigt. Die Schwingmühle MM 500 control überzeugt durch ihre Leistungsfähigkeit und einfache Handhabung; die patentierte Probenkühlung erhöht signifikant die Prozesssicherheit und -effizienz der Anwendung.

Mehr erfahren auf
www.retsch.de