



Pipettes
Cônes
Techniques

Évaluation
Choix
Techniques

Obtenez de meilleurs résultats

Guide de référence pour le pipetage



Table des matières

1. Avant-propos	5
2. Planification, flux de travail et sélection	6
Planification du projet et flux de travail	6
Analyse du flux de travail	6
Optimisation du flux de travail	8
Plage de volumes et type d'échantillons	7
Exigences en matière de format de contenant des échantillons/réactifs	11
Exigences spécifiques à l'échantillon/l'analyse	12
3. Choix de la pipette la plus adaptée	16
Pipettes à déplacement d'air	17
Pipettes à déplacement positif	17
Optimisation du flux de travail	18
Exigences en matière de plage de volumes et de type d'échantillons	18
Pipettes électroniques monocanal	20
Pipettes multicanaux	21
Systèmes de pipetage haut rendement	22
Pipettes spécialisées	23
Pipettes à déplacement positif	23
Pipettes à distribution répétée	24
Dispositifs d'aide au pipetage	25
Distributeurs pour flacons	26
4. Choix du cône le plus adapté : conception, qualité et adéquation	28
Conception du cône	28
Qualité des cônes	29
Étanchéité des cônes de pipette	30
Système d'éjection de cônes LTS™ LiteTouch™	30
Choix des cônes	32
Cônes spécialisés pour des applications spécifiques	32

Table des matières

5. Techniques de pipetage	34
Plage de volumes optimale	35
Profondeur d'immersion du cône	36
Aspiration à l'angle approprié	37
Maintenance de la cohérence	38
Distribution homogène de l'échantillon	39
Pré-rinçage des cônes	40
Éviter les variations thermiques	41
Cohérence des paramètres du micromètre	42
Quel est le risque lié au pipetage ?	44

1. Avant-propos

Le programme Good Pipetting Practice vise à aider les chercheurs à choisir leur équipement en connaissance de cause. Il explique les techniques de pipetage et ergonomiques appropriées, l'étalonnage et le contrôle en routine, afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

Pipeter (ou mesurer et transférer) de petits volumes de liquide de l'ordre du microlitre ou du millilitre est probablement l'une des tâches les plus fréquentes dans les laboratoires de recherche. Être en mesure de s'en acquitter rapidement et précisément est une condition sine qua non à la réussite des travaux de laboratoire. Les pipettes modernes à déplacement d'air sont principalement utilisées pour les travaux en laboratoire, car elles présentent de nombreux avantages : elles sont idéales pour transférer efficacement de petites quantités de liquide. Les pipettes et cônes modernes de qualité élevée offrent une productivité exceptionnelle.

2. Planification, flux de travail et sélection

Planification du projet et flux de travail

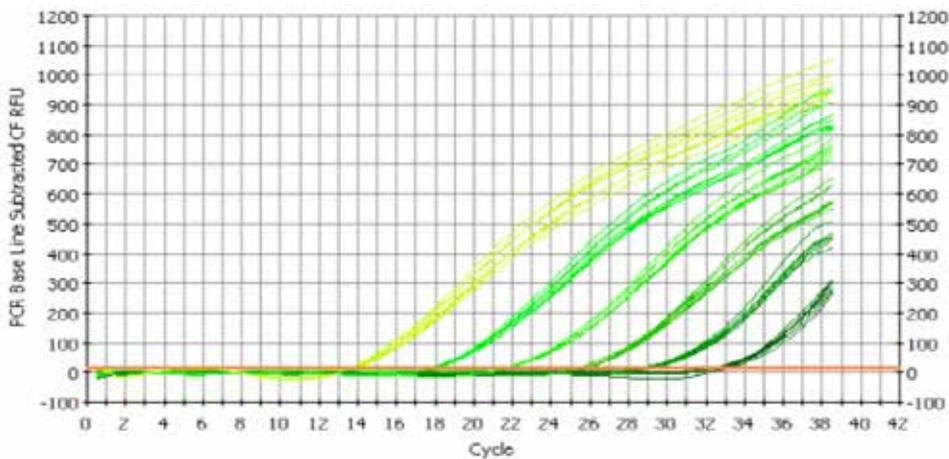
La plupart des nouveaux projets peuvent être optimisés via un processus de planification complet, où toutes les étapes sont analysées pour une efficacité et une génération de données maximum. Du point de vue de la manipulation de liquides, cela implique de connaître le type d'échantillon initial, l'analyse de point final et les cadences d'analyse. Ces données détermineront les techniques utilisées et les formats de manipulation de liquide requis (tubes, plaques, etc.). Enfin, on déterminera les outils de manipulation de liquides les mieux adaptés au flux de travail. Pour toute activité ou action de pipetage, la pipette, le cône associé et la technique de l'opérateur doivent être considérés comme un système global afin de distribuer la quantité exacte de liquide requise. Le choix de la pipette et du cône appropriés, ainsi que l'utilisation de la technique la plus efficace, font partie intégrante de la conception et de la mise en œuvre d'un projet ou d'une expérience.

Analyse du flux de travail

La première étape du procédé consiste à identifier toutes les étapes du flux de travail expérimental, de l'isolement de l'échantillon initial à la production des données finales, sans oublier les étapes de préparation du flux de travail, telles que les préparations de tampons ou de mastermix. Il convient ensuite d'identifier la variabilité tolérable pour l'expérience, afin d'obtenir des données correctes. Certaines applications et certaines étapes sont beaucoup plus sensibles à la variabilité expérimentale que d'autres ; par exemple, une expérience demandant une amplification, telle que la qPCR, peut être très sensible à la variabilité, tandis qu'une simple étape de préparation de tampon ne le sera pas nécessairement. Un choix de pipette et de cône non optimal, ainsi qu'une technique médiocre, peuvent être une source majeure de variabilité. Par exemple, une expérience qui dépend d'une courbe étalonnage générée à partir d'une dilution en série d'étalons peut pâtir gravement d'un pipetage inapproprié.

Analyse du flux de travail

- Identification de la tolérance maximum pour la variabilité expérimentale
- Identification des applications et des étapes les plus propices à la variabilité
 - qPCR
 - dilutions en série



Optimisation du flux de travail

Plage de volumes et type d'échantillons

Généralement, un flux de travail suppose de commencer par des volumes relativement importants de quelques liquides (par ex., préparation de tampons, mise en plaque de cellules, etc.) où il peut être courant de transférer 5 ou 10 mL sans mettre l'accent sur l'exactitude. Toutefois, la technique de détection finale peut nécessiter uniquement de petits volumes, avec un besoin accru d'exactitude lors de la distribution.

Les exigences en matière de vitesse et de précision doivent être définies, car les différents outils pour les volumes importants ont des capacités différentes. Pour le choix du volume de pipette adapté, il est recommandé d'estimer la plage d'utilisation entre 35 et 100 % du volume total indiqué. Par exemple, une pipette de 1 000 μL a une plage d'utilisation effective comprise entre 350 et 1 000 μL . Même si les spécifications minimales de la pipette font état de 100 μL pour ce volume, et si l'instrument est réglable jusqu'à 0 μL , le minimum recommandé de 350 μL se base sur la technique de l'utilisateur. Les volumes inférieurs à 35 % nécessitent une technique de pipetage plus précise. Si la plage de l'instrument utilisé n'est pas adéquate, l'exactitude et la fidélité en pâtiront.

Type de pipette	Modèle	Capacité min.	Capacité max.	Exactitude 10 %	Fidélité 10 %	Exactitude 50 %	Fidélité 50 %	Exactitude 100 %	Fidélité 100 %
Pipettes à déplacement positif	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 %

Pipette à déplacement d'air	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 %

Exactitude et fidélité

L'exactitude désigne la capacité d'une pipette à distribuer une quantité de liquide égale au volume défini. Les spécifications d'exactitude standard pour les pipettes à déplacement d'air sont d'environ 1 % si le volume d'échantillonnage est supérieur à 35 % du volume nominal de la pipette. Pour un volume défini inférieur ou égal à 10 % du volume nominal, l'exactitude peut être jusqu'à 3 fois inférieure.

La fidélité désigne la capacité de la pipette à distribuer des volumes identiques de liquide de façon répétée. La spécification de fidélité standard des pipettes à déplacement d'air correspond à 1/3 ou 1/4 de la spécification d'exactitude. La fidélité est souvent appelée « répétabilité », « reproductibilité d'échantillon » ou « écart-type ».

Certains types de pipettes conviennent mieux que d'autres à certains types d'échantillons. Par exemple, les échantillons visqueux requièrent une technique ou un modèle de pipette différent afin d'obtenir une fidélité et une exactitude optimales. Le tableau ci-après fournit des informations plus détaillées :

Type de solution échantillon		Plage de volumes	Solution suggérée	
			Systèmes manuels	Systèmes électroniques
Visqueux, solvant organique, conditions extrêmes	Volumes d'échantillons élevés	20 - 50 mL	AutoRep S	AutoRep E
Non visqueux, aqueux, température ambiante		20 - 50 mL	AutoRep S	Pipet-X
Visqueux, solvant organique, conditions extrêmes		1 - 20 mL	AutoRep S	AutoRep E
Non visqueux, aqueux, température ambiante		1 - 20 mL	Pipet-Lite XLS, AutoRep S	Pipet-X, E4 XLS
Visqueux, solvant organique, conditions extrêmes	Volumes d'échantillons moyens	200 - 1 000 µL	Pos-D, AutoRep S	AutoRep E
Non visqueux, aqueux, température ambiante		200 - 1 000 µL	Pipet-Lite XLS+	E4 XLS+
Visqueux, solvant organique, conditions extrêmes	Volumes d'échantillons faibles	10 - 200 µL	Pos-D	
Non visqueux, aqueux, température ambiante		10 - 200 µL	Pipet-Lite XLS+	E4 XLS+
Visqueux, solvant organique, conditions extrêmes	Microvolumes d'échantillons	< 10 µL	Pos-D	
Non visqueux, aqueux, température ambiante		< 10 µL	Pipet-Lite XLS+	E4 XLS+

Si le nombre d'échantillons à analyser est assez élevé, il convient de passer du format tube au format plaque pour la préparation et/ou l'analyse des échantillons. Dans ce cas, l'utilisation de pipettes multicanaux accélère le flux de travail.

Si vous analysez plusieurs plaques de 96 ou 384 puits, il peut être pertinent d'utiliser une solution de pipetage à 96 canaux, afin de gagner du temps et de réduire le risque d'erreurs.

Exigences en matière de format de contenant des échantillons/réactifs

L'utilisation de plaques 96 puits peut nécessiter le déplacement de plusieurs échantillons ou réactifs de tubes vers les plaques, ou inversement ; des transferts sont parfois également nécessaires entre différents formats de plaques (de 24 à 96 puits). Les pipettes multicanaux à écartement variable permettent de réduire jusqu'à 85 % le temps nécessaire à ces changements, en déplaçant jusqu'à 8 échantillons à la fois ; par ex. lors du transfert de l'échantillon cible d'un jeu de tubes non formatés vers une plaque de 96 puits formatés (9 mm au centre), une simple aspiration de l'échantillon à partir de la plaque non formatée est nécessaire.



Pipettes multicanaux à écartement variable

Transférer plusieurs échantillons simultanément

- Des tubes aux plaques, et vice versa
- Entre des plaques différentes (24/48/96 puits)

Exigences spécifiques à l'échantillon/l'analyse

Les pipettes électroniques peuvent s'avérer avantageuses lorsque le pipetage est complexe ou répétitif, car vous pouvez les utiliser pour répéter le pipetage et les programmer pour des protocoles de pipetage spécifiques. En outre, les données obtenues sont plus cohérentes qu'avec les pipettes manuelles, car le microprocesseur élimine l'erreur humaine, ainsi que la variabilité liée aux mouvements du piston. Cette différence est particulièrement appréciable dans le cas des données qui nécessitent des dilutions en série, ainsi que dans le cas des applications nécessitant une amplification, comme la qPCR.

Chaque analyse et chaque échantillon disposent de propriétés uniques pouvant constituer un véritable défi. Par exemple, pour les applications génomiques, il faut toujours utiliser des cônes à filtre afin de minimiser l'impact de la contamination par l'ADN de l'échantillon ou de la pipette. Des filtres empêchent les aérosols des échantillons de contaminer l'embout et donc de contaminer ensuite les échantillons. Ils permettent également de protéger la pipette de la contamination des microbes, des produits corrosifs et des dépôts de sel.

Les pipettes électroniques sont avantageuses pour les applications suivantes :

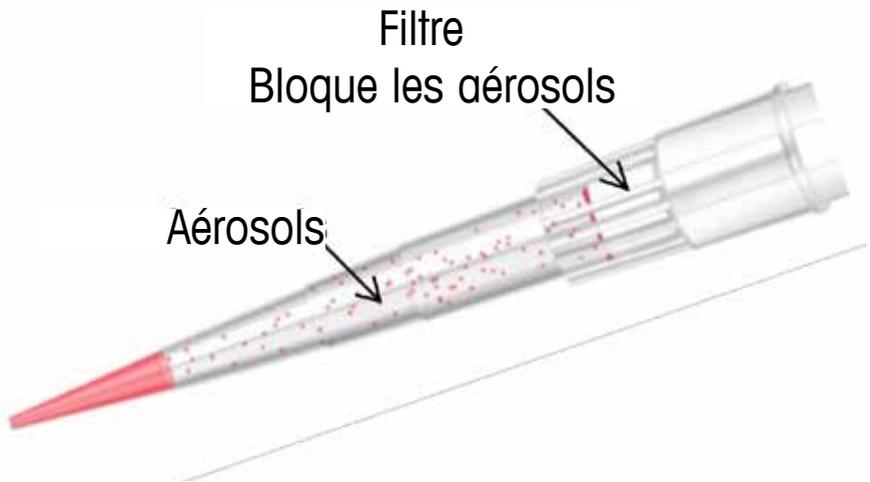
- Protocoles complexes ou répétitifs
- Applications nécessitant une exactitude et une fidélité élevées (par ex. qPCR)



Une fois les plages de volumes et les types de pipette choisis, la prochaine étape consiste à identifier les cônes adaptés à toutes les applications impliquées. Les cônes sont généralement en polypropylène ; bien qu'ils soient inertes et capables de résister à de nombreux solvants, il est nécessaire de tenir compte de facteurs intrinsèques au polypropylène. Différentes résines de polypropylène fournissent des caractéristiques spécifiques, et de nombreux additifs peuvent intervenir dans le procédé de fabrication et modifier certaines de ces caractéristiques. Certains de ces additifs peuvent s'échapper du produit fini et avoir un impact sur les résultats d'expérience. Pour résoudre ce problème potentiel, il est recommandé d'acheter des cônes certifiés exempts de substances relargables et de s'assurer que le fournisseur produit la documentation certifiant la sensibilité de test pour toutes les substances relargables et tous les contaminants. Les contaminants possibles incluent l'ADN et les pyrogènes, qui seront présents si les procédés de fabrication et d'emballage ne se déroulent pas dans un environnement de salle blanche. De nombreuses sociétés de moulage et d'emballage travaillent sur des sites qui ne sont pas entièrement contrôlés. Un site de production adéquat garantit que tous les employés portent des vêtements de protection, des charlottes, des masques et des gants, et que l'environnement de travail ne contient que de l'air filtré, afin d'éviter toute contamination par des cheveux ou des insectes. Là encore, les certificats de test de ces matériaux doivent faire apparaître le procédé de test et la sensibilité de l'analyse ; les certificats faisant simplement état de l'absence d'un contaminant spécifique sans indiquer la méthode ou la sensibilité de détection ne fournissent aucune information ou garantie quant à la qualité.

Application unique

- Utilisez des cônes à filtre afin de réduire les risques de contamination de l'ADN ou de contamination croisée
- Les cônes à filtre protègent également le piston des contaminations microbiennes corrosives et des dépôts de sel



La considération suivante en matière de cônes est la disponibilité des volumes spécifiques requis pour les différentes pipettes choisies, ainsi que les éventuels cônes spécialisés requis pour l'application, par ex. les cônes à filtre pour les applications génomiques. Enfin, le choix du format de conditionnement permet de garantir une quantité suffisante de cônes pour une période donnée.

Pour la plage de volumes à pipeter, un nombre soigneusement déterminé de pipettes manuelles peuvent être requises, afin de respecter les plages de volumes requises et d'éviter les changements de volumes répétitifs.



3. Choix de la pipette la plus adaptée

De nombreux outils de pipetage sont disponibles afin d'obtenir des résultats optimaux et une meilleure productivité, tout en offrant des avantages supplémentaires, tels qu'une ergonomie améliorée et une meilleure fonctionnalité pour une application donnée. Il existe deux principaux types de micropipettes : à déplacement d'air et à déplacement positif. Ces deux types déterminent le volume de liquide distribué à l'aide du diamètre du piston et de la longueur de la course du piston.

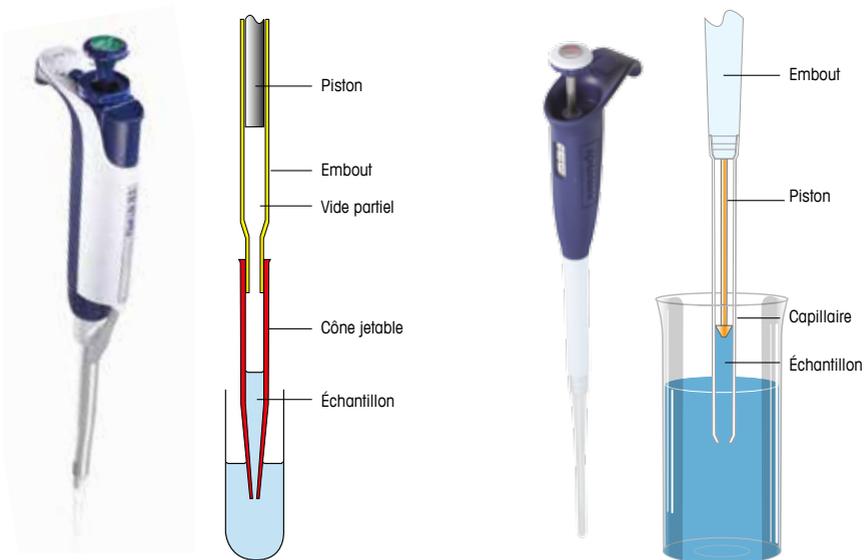


Figure 1 : Pipettes à déplacement d'air et à déplacement positif

Pipettes à déplacement d'air

- Exactitude exceptionnelle avec les solutions aqueuses
- Économiques

Les pipettes à déplacement d'air sont les instruments de pipetage en laboratoire les plus courants. On les utilise en plaçant l'extrémité du cône dans l'échantillon liquide, puis en relâchant le bouton-poussoir. Un vide partiel se crée lorsque le piston remonte dans le corps de la pipette, et l'échantillon remonte dans le cône pour remplir ce vide, équivalent au volume sélectionné.

Pipettes à déplacement positif

- Exactitude exceptionnelle avec la plupart des solutions
- Recommandées pour les liquides visqueux, denses, volatils ou corrosifs

Bien que moins répandues que les pipettes à déplacement d'air, les pipettes à déplacement positif sont fréquemment utilisées en laboratoire. Elles utilisent un piston jetable et un système de capillaires pour créer un vide physique équivalent au volume sélectionné. Le piston est en contact direct avec l'échantillon, et lorsque celui-ci remonte, l'échantillon est attiré dans les capillaires. Les pipettes à déplacement positif offrent une exactitude et une fidélité élevées avec des solutions aqueuses, et elles sont recommandées pour les solutions visqueuses, denses, volatiles et corrosives. Les capillaires et pistons jetables utilisés sont plus coûteux que les cônes jetables de pipettes à déplacement d'air. Ces dernières sont donc recommandées lorsque les deux types de pipettes produisent les mêmes résultats.

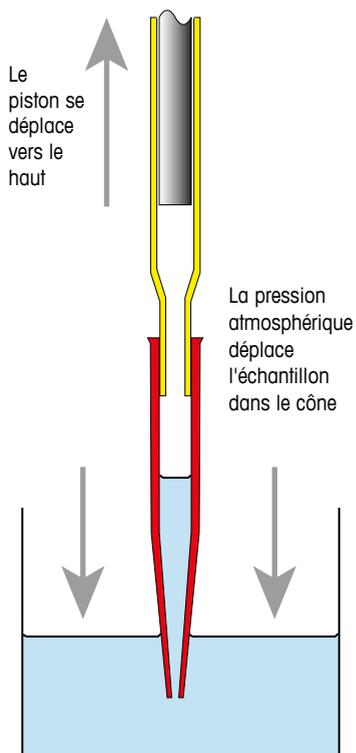


Figure 2 :
Fonctionnement des pipettes à déplacement
d'air

Optimisation du flux de travail

Exigences en matière de plage de volumes et de type d'échantillons

Généralement, un flux de travail suppose de commencer par des volumes relativement importants de quelques liquides (par ex., préparation de tampons, mise en plaque de cellules, etc.) où il peut être courant de transférer 5 ou 10 mL sans mettre l'accent sur l'exactitude. Toutefois, la technique de détection finale peut nécessiter uniquement de petits volumes, avec un besoin accru d'exactitude lors de la distribution.

Les exigences en matière de vitesse, d'exactitude

et fidélité doivent être définies, car les différents outils pour les volumes importants ont des capacités différentes. Pour le choix du volume de pipette adapté, il est recommandé d'estimer la plage d'utilisation entre 35 et 100 % du volume total indiqué. Par exemple, une pipette de 1 000 μL a une plage d'utilisation effective comprise entre 350 et 1 000 μL . Même si les spécifications minimales de la pipette font état de 100 μL pour ce volume, et si l'instrument est réglable jusqu'à 0 μL , le minimum recommandé de 350 μL se base sur la technique de l'utilisateur. Les volumes inférieurs à 35 % nécessitent une technique de pipetage plus précise. Si la plage de l'instrument utilisé n'est pas adéquate, l'exactitude et la fidélité en pâtiront.

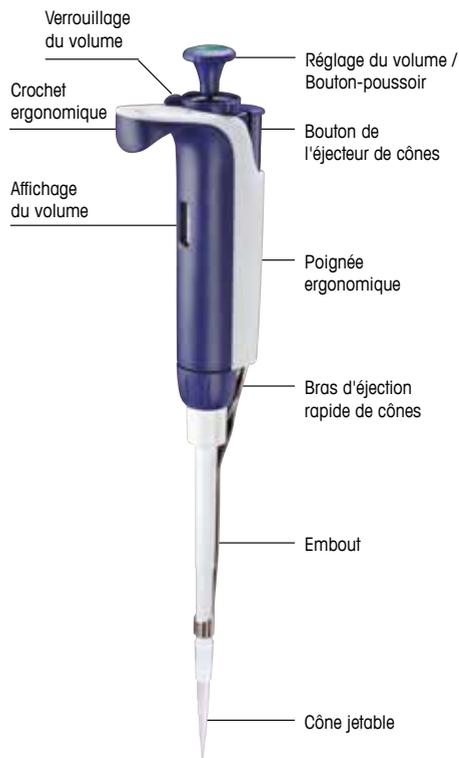


Figure 3 :
Pipette manuelle



Figure 4 : Pipette électronique

Pipettes électroniques monocanal

Les pipettes électroniques sont sur le marché depuis le milieu des années 1980. Dans les pipettes électroniques à déplacement d'air, l'aspiration et la distribution sont contrôlées par un microprocesseur et initiées par un déclencheur, plutôt que d'appuyer manuellement sur un bouton-poussoir. Les pipettes électroniques permettent à la plupart des utilisateurs de prélever et de distribuer les échantillons de façon plus homogène, exacte et répétable, ce qui élimine quasiment la variabilité entre les utilisateurs.

Les pipettes électroniques modernes doivent être simples à utiliser et s'accompagner d'une interface utilisateur pratique et d'un grand écran couleur. Elles sont polyvalentes et permettent d'effectuer précisément des tâches complexes comme la distribution répétée, les titrages contrôlés, les dilutions en série, la mesure de volumes d'échantillons inconnus et d'autres fonctions programmables. Une pipette électronique permet de programmer facilement des mouvements répétés du piston, afin de mélanger deux solutions dans le cône. Les pipettes électroniques avec contrôles de l'aspiration et de la distribution permettent de pipeter une grande palette de liquides. Les vitesses les plus élevées sont idéales pour le pipetage d'échantillons aqueux, tandis que les vitesses plus lentes conviennent aux échantillons aqueux, moussants ou sensibles au cisaillement.

Pipettes multicanaux

Les pipettes multicanaux sont idéales pour les applications à haut rendement, notamment les tests ELISA sur plaque 96 puits et la PCR pour la synthèse d'ADN. Les pipettes multicanaux au design avancé, telles que les modèles légers 8 et 12 canaux Rainin, offrent une conception ergonomique et chargent les cônes rapidement et en toute sécurité avec un prélèvement homogène des échantillons sur tous les canaux. Les modèles à écartement variable permettent à l'utilisateur de déterminer l'écartement des cônes, afin de passer de plaques 96 puits à des portoirs de tubes ou des plaques 24 puits. Les pipettes multicanaux et à écartement variable sont disponibles en versions manuelle et électronique, et dans une large gamme de volumes.



Figure 5 : Pipettes multicanaux

Systèmes de pipetage haut rendement

Les systèmes de pipetage pouvant aspirer et distribuer les échantillons dans 96 puits à la fois conviennent parfaitement aux flux de travail sur plaque rapides et efficaces. Jusque récemment, le pipetage sur 96 puits ou sur des plaques entières était uniquement possible avec des systèmes robotisés coûteux. Toutefois, le modèle Rainin Liquidator 96, un système de pipetage de paillasse entièrement manuel, sans alimentation électrique, ni programmation ni formation des opérateurs, simplifie et rationalise le pipetage sur 96 ou 384 puits, aussi bien en laboratoire que sur le terrain.



Figure 6 :
Système de pipetage de paillasse Liquidator

Pipettes spécialisées

D'autres types de pipettes (ou de dispositifs de manipulation de liquides), moins courants que les pipettes à déplacement d'air, sont souvent préférés par les chercheurs pour leur conception et leur application spécifique.

Pipettes à déplacement positif

Rainin Pos-D est un exemple de pipette manuelle à déplacement positif. Ces pipettes utilisent un système de capillaires et un piston jetable pour créer un vide physique du volume sélectionné. Le piston est en contact direct avec l'échantillon, et lorsque celui-ci remonte, l'échantillon est attiré dans les capillaires. Ces pipettes empêchent toute contamination croisée de la pipette par l'échantillon, car un nouveau piston est utilisé pour chaque échantillon. Elles sont ainsi idéales pour la PCR et les autres applications critiques. Les pipettes à déplacement positif sont recommandées pour les solutions visqueuses, denses, volatiles et corrosives.



Figure 7 :
Pipette à déplacement positif



Pipettes à distribution répétée

Grâce à leur seringue et à leur piston intégré, les pipettes à distribution répétée fonctionnent sur le principe du déplacement positif. Elles sont conçues pour prélever un volume important d'échantillon et le distribuer en plusieurs aliquotes égales. Elles sont disponibles en versions électronique et manuelle, et utilisent des seringues jetables dans une large gamme de volumes.

Figure 8 :
Pipettes à distribution répétée électronique (gauche)
et manuelle

Dispositifs d'aide au pipetage

Principalement utilisés pour les volumes importants (25-100 μL), il s'agit de dispositifs électroniques ou manuels fournissant l'aspiration pour les pipettes sérologiques en verre ou en plastique. La pipette est fixée à un « nez » souple et l'utilisateur appuie sur un bouton du dispositif d'aide au pipetage pour créer un vide partiel à l'intérieur de la pipette. Ce vide partiel est déplacé par le liquide sous pression atmosphérique. Une fois transféré dans un autre récipient, le liquide est distribué en appuyant sur un autre déclencheur ou par l'effet de la gravité. Les versions les plus simples utilisent une boule flexible et souple qui est manuellement écrasée et relâchée pour créer et contrôler le vide partiel.



Figure 9 :
Dispositif électronique d'aide au pipetage

Distributeurs pour flacons

Par nature, certains liquides en laboratoire (par ex. les liquides corrosifs ou toxiques) doivent rester à leur place sous une hotte ou une cabine de sécurité. Un distributeur pour flacons permet de transférer en toute sécurité des quantités relativement faibles de ces liquides. Le distributeur fonctionne par pompage ; les versions récentes permettent de distribuer de façon exacte et sûre des volumes de liquides « dangereux » allant jusqu'à 50 mL.



Figure 10 : Distributeur pour flacons



4. Choix du cône le plus adapté : conception, qualité et adéquation

Il convient de considérer la pipette et le cône recommandé par son fabricant comme un système global plutôt que comme deux composants individuels. Les cônes de pipette présentés comme universels font souvent des compromis en matière d'adéquation ou de conception, car ils sont conçus pour s'adapter à une large gamme de modèles.

Lors de la sélection des cônes de pipette, il faut prendre en compte la conception, la qualité et l'adéquation.

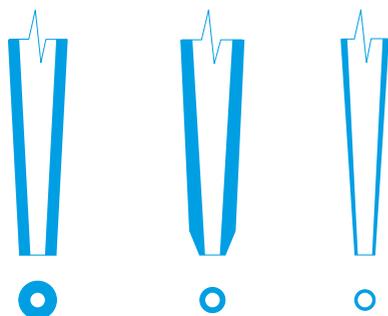


Figure 11 :
Cône à paroi épaisse (gauche), cône à extrémité biseautée (centre) et cône Rainin FinePoint (droite)

Conception du cône

La conception de cône la plus avancée est le cône flexible à paroi fine et à pointe fine, ou à petit orifice. Pour le pipetage de petits volumes (moins de 20 μL), les cônes Rainin FinePoint™ améliorent l'exactitude et la fidélité par rapport aux cônes standard à paroi épaisse ou à extrémité en biseau.

Les cônes FinePoint sont plus flexibles que la plupart des autres cônes standard, et ils permettent à l'échantillon de s'écouler à n'importe quel angle, pour une distribution complète. Ainsi, il reste dans ces cônes une quantité d'échantillon bien moindre que dans les cônes plus épais ou à extrémité biseautée.

Les différences de conception ont un impact sur la performance, l'exactitude et la fidélité. Toutefois, lorsque les pipettes sont utilisées correctement et avec les cônes recommandés par le fabricant, ceux-ci offrent des performances garanties en matière d'exactitude et de fidélité.

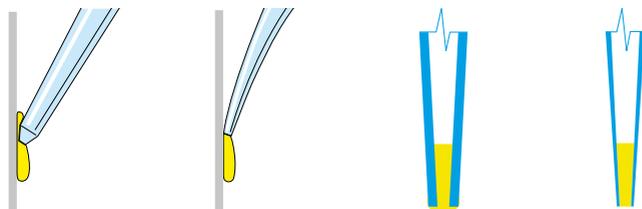


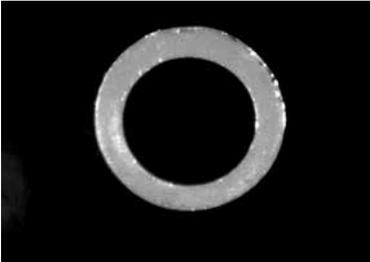
Figure 12 : Distribution (gauche) et rétention d'échantillon (droite) avec cône à extrémité biseautée et un cône FinePoint

Qualité des cônes

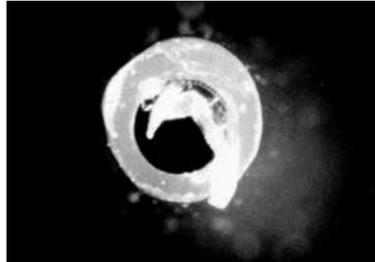
Les défauts de qualité les plus graves surviennent au niveau de l'orifice ou de l'ouverture, là où l'impact sur l'aspiration et la distribution est le plus important. La figure 13 présente une vue grossie de 4 extrémités de cônes.

La bavure est un résidu de plastique provenant du moulage, à l'intérieur du cône ou autour de l'ouverture.

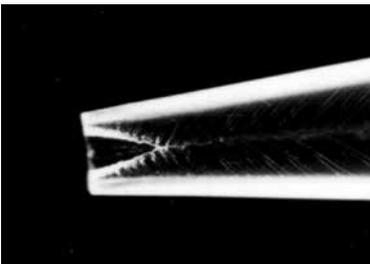
Les défauts de moulage et les **défauts coaxiaux** proviennent d'un chauffage incorrect des cannes de soufflage après l'injection du plastique. Tous ces défauts entraînent une perte d'échantillon lors du pipetage. Un processus de fabrication haute qualité permet de réduire le risque de défaut sur les cônes et les erreurs en résultant.



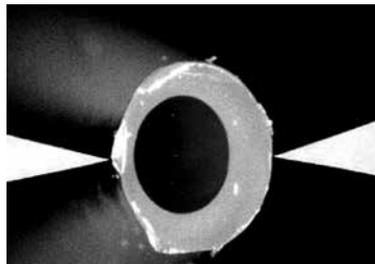
Orifice de cône de qualité élevée



Bavure sur l'orifice du cône



Défaut de moulage



Défaut coaxial

Figure 13 : Orifices de cône présentant un cône correct et trois types de défauts

Étanchéité des cônes de pipette

La plupart des cônes sont conçus pour s'adapter à toutes les marques de pipettes : le joint entre l'intérieur du cône et l'extérieur de l'embout de la pipette est large, afin de convenir à la plus grande variété de pipettes. Ce joint relativement large crée davantage de friction entre l'embout et le joint à mesure que l'embout de la pipette est enfoncée dans le cône. Il n'existe pas de mécanisme de retour pour vous informer qu'un cône universel est bien étanche, ce qui amène généralement l'utilisateur à forcer pour être sûr que l'embout et le cône sont étanches.

Le chargement des cônes impliquant tout l'avant-bras, on applique facilement une force excessive, qui nécessitera à son tour une force d'éjection des cônes élevée. En fin de compte, la force nécessaire pour charger et éjecter les cônes universels peut accroître le risque de troubles musculosquelettiques (TMS), notamment en cas d'utilisation prolongée de la pipette.

Système d'éjection de cônes LTS™ LiteTouch™

Consciente des problèmes d'ergonomie et de force liés au chargement et à l'éjection des cônes, ainsi que des autres problèmes d'étanchéité (particulièrement dans les pipettes multicanaux), Rainin a développé un nouveau cône baptisé LTS™ ou LiteTouch™ System, afin d'améliorer considérablement l'ajustement entre les cônes et les embouts. Le système LTS réduit considérablement la force nécessaire pour insérer l'embout de la pipette et éjecter les cônes.

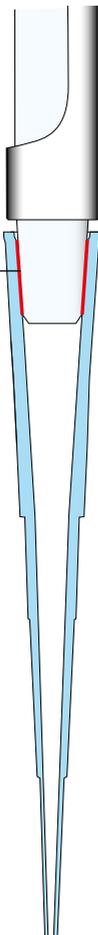
La réduction de la force d'éjection est possible grâce aux deux caractéristiques suivantes :

- La surface de joint réduite facilite l'étanchéité
- Un arrêt positif est créé par l'épaulement à l'intérieur du cône, qui évite de forcer l'embout dans le cône

La conception du joint offre une bonne stabilité latérale, qui évite la chute du cône pendant l'utilisation.

Universel

Grande zone
d'étanchéité



Système LTS Lite Touch

Zone d'étanchéité
réduite

Butée positive

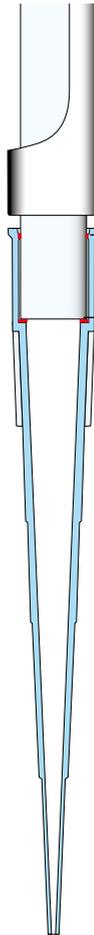


Figure 14 : Systèmes de cônes universels (coniques) et LTS (cylindriques)

Choix des cônes

En bref, pour garantir un débit constant et égal de l'échantillon et réduire le risque de contamination, il convient de tenir compte des points suivants pour choisir les cônes de pipette :

Matériau du cône. Les cônes doivent être fabriqués en matériau à très faible rétention, comme le polypropylène vierge, et sans additifs, colorants ou matériaux recyclés.

Conception du cône. L'épaisseur des parois, la flexibilité, la taille de l'orifice et la finition de la surface sont des facteurs importants pour l'ajustement de la pipette et le débit de liquide entrant et sortant du cône.

Qualité des cônes. Les cônes ont-ils été fabriqués dans un environnement de salle blanche ? La traçabilité de chaque lot est-elle assurée ? Les cônes sont-ils exempts d'additifs ou de défauts pouvant causer des pertes d'échantillon et des erreurs ?

Cônes spécialisés pour des applications spécifiques

Il existe plusieurs types de cônes « non standard » dédiés à certaines applications ou certains flux de travail spécifiques.

Les cônes Rainin Gel-Well™ sont spécialement conçus pour charger les gels, et sont disponibles avec des extrémités rondes ou plates et des orifices très réduits.

Les cônes à large orifice sont conçus pour la manipulation d'échantillons délicats, tels que des cellules entières ou l'ADN de haut poids moléculaire. L'orifice large réduit de cisaillement de l'échantillon et évite la lyse de cellule.

Les cônes à faible rétention comportent des polymères spécifiques super-hydrophobes qui permettent de distribuer intégralement des échantillons particulièrement « collants », tels que des protéines. Ces cônes ne sont généralement pas nécessaires pour les échantillons liquides classiques.

Les cônes Rainin ShaftGard™ protègent l'embout de la pipette et l'éjecteur de cônes contre toute contamination accidentelle, en enfermant ces composants à l'intérieur du cône. Les cônes ShaftGard peuvent être utilisés dans des tubes étroits ou des puits profonds sans risque de contact entre la pipette et les parois du récipient.

Les cônes allongés sont plus étroits et plus longs que les autres cônes d'un volume équivalent. Leur faible diamètre et leur longueur de 102 mm permettent à ces cônes d'atteindre le fond de tubes étroits et de puits profonds, sans que la pipette ou l'éjecteur de cônes ne touche la paroi du récipient.

Les cônes à filtre servent à éliminer la contamination croisée de la pipette ou sa contamination par des aérosols, sans différence sensible de performance. Ces cônes sont recommandés avec les solutions volatiles afin d'empêcher des vapeurs potentiellement corrosives de pénétrer dans l'embout et d'endommager le piston.

Les capillaires et pistons sont conçus pour les pipettes à déplacement positif ; ils sont plus efficaces sur des solutions non aqueuses denses, visqueuses ou volatiles, ou pour le pipetage de solutions aqueuses froides ou chaudes.

Cônes de préparation d'échantillon. Les cônes Rainin PureSpeed, dotés de résine, constituent une méthode pratique, économique et semi-automatisée de purification des biomolécules, de désalinisation ou pour les applications d'échanges d'ions.

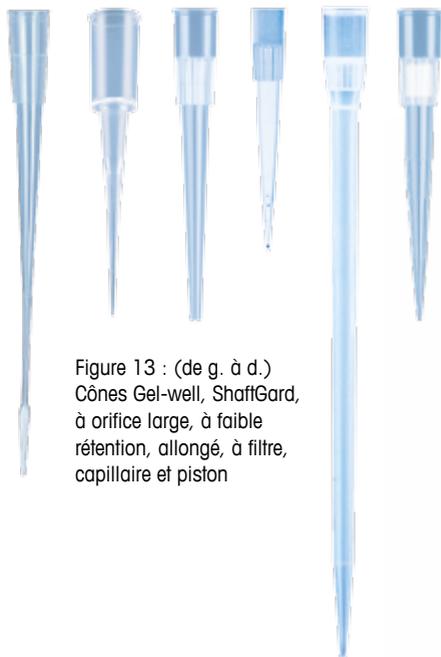


Figure 13 : (de g. à d.)
Cônes Gel-well, ShaffGard,
à orifice large, à faible
rétention, allongé, à filtre,
capillaire et piston



Figure 14 :
Rainin PureSpeed
Cône de préparation
d'échantillon

5. Techniques de pipetage

L'évaluation correcte de votre application et la sélection de vos instruments en conséquence ont un impact considérable sur les résultats de vos recherches. Toutefois, ces facteurs ne suffisent pas pour obtenir des résultats optimaux. D'autres influences, telles que la technique de pipetage appropriée, les influences de l'instrument et de l'environnement, ont un impact notable sur les résultats. L'exactitude et la fidélité sont essentielles dans la recherche scientifique, et les pages suivantes vous présentent brièvement les différents sujets liés aux techniques de pipetage. Saviez-vous qu'en suivant ces techniques, vous pouvez améliorer votre exactitude et votre fidélité jusqu'à 5 % ?

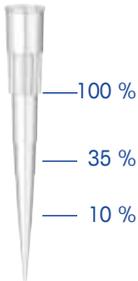
Plage de volumes optimale

Pour la plupart des pipettes, la plage de fonctionnement se situe entre 10 et 100 % du volume nominal. Cependant, les spécifications de performances changent à mesure que le paramètre de volume diminue.

Les spécifications d'exactitude pour une pipette de 100 μL sont de $\pm 0,8\%$ de 50 à 100 % du volume nominal. Toutefois, si vous définissez le volume sur 10 μL (ou 10 % du volume nominal), la spécification d'inexactitude sera plus de 3 fois supérieure, soit 2,5 à 3 %.

Le volume optimal offrant la meilleure exactitude et la meilleure fidélité est donc généralement compris entre 35 et 100 % du volume nominal. Évitez d'utiliser un volume de la pipette inférieur à 10 % du volume nominal. Il est préférable d'utiliser des pipettes de volume inférieur pour les petits volumes.

Volume vs. plage



Un pipetage à 10 % du volume nominal peut affecter la justesse jusqu'à 3 %

Profondeur d'immersion du cône

La profondeur d'immersion appropriée du cône permet jusqu'à 5 % d'amélioration de la précision, et s'avère particulièrement importante pour les pipettes micro-volume. Le cône doit être immergé entre 1 et 2 mm pour les pipettes micro-volume et entre 6 et 10 mm pour les pipettes à grand volume, selon la taille du cône. Si le cône est immergé trop profondément, le gaz contenu à l'intérieur de celui-ci est comprimé et provoque l'aspiration d'une quantité excessive de liquide. Le liquide retenu à la surface du cône peut également altérer les résultats. Si le cône n'est pas immergé assez profondément, de l'air peut être aspiré, occasionnant des bulles d'air et des volumes inexacts. Dans les deux cas, le volume d'échantillon est incorrect.



1-10 μL : 1-2 mm

10-200 μL : 2-3 mm

200-2 000 μL : 3-6 mm

Une profondeur d'immersion appropriée peut permettre d'obtenir jusqu'à 5 % de précision supplémentaire ; il convient donc d'adopter les recommandations ci-dessous. (> 2 000 μL , utilisez une profondeur de 6 à 10 mm)

Aspiration à l'angle approprié

L'angle d'immersion du cône de votre pipette dans l'échantillon doit être aussi proche que possible de 90 degrés et ne doit pas s'écarter de plus de 20 degrés de la verticale.

En ce qui concerne les micropipettes, conserver un angle le plus proche possible de la verticale peut apporter jusqu'à 2,5 % d'exactitude supplémentaire.

Si l'angle dépasse 20 degrés, les mesures peuvent être inexacts.

Cela signifie qu'une trop grande quantité de liquide sera alors aspirée dans le cône, donnant lieu à des résultats inexacts.

Angle d'immersion vertical



Angle approprié



Angle incorrect

Un angle d'immersion de 60 degrés peut entraîner un excédent d'aspiration de liquide allant jusqu'à 0,7 %.

Maintien de la cohérence

La constance du rythme et de la vitesse de pipetage vous permet d'obtenir des résultats optimum de manière plus répétitive. Un rythme et une vitesse constants vous permettent d'améliorer l'exactitude jusqu'à 5 %.

Rythme de pipetage régulier

Maintenez un rythme constant de pipetage d'un échantillon à l'autre. Évitez de vous dépêcher ou de travailler trop rapidement et adoptez un rythme régulier pour chaque étape du cycle de pipetage.

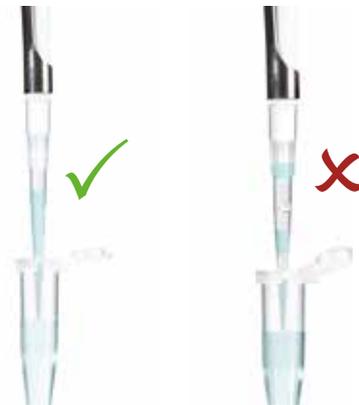
Pipettes de grand volume

Pour les plus grands volumes, généralement de l'ordre de 1 mL ou plus, marquez une pause d'environ 1 seconde ou plus après la prise de l'échantillon, le cône toujours plongé dans le liquide. Cela garantit l'aspiration complète de l'échantillon.

Manipulation sans à-coups du bouton-poussoir

Évitez les mouvements brusques lors de l'enfoncement et du relâchement du piston. Une aspiration non contrôlée peut causer la formation de bulles, des projections, des aérosols et la contamination de l'embout et du piston de la pipette, ainsi que la perte de volume d'échantillon.

Vitesse et rythme de pipetage homogènes



Aspiration appropriée

Cône ayant aspiré de l'air

Distribution homogène de l'échantillon

Pour une meilleure exactitude et la reproductibilité d'un échantillon à l'autre, il convient de s'assurer que l'échantillon est intégralement distribué et qu'il n'adhère pas à l'orifice. Cette homogénéité est particulièrement essentielle pour le micropipetage, en raison de la faiblesse des volumes concernés.

Une bonne maîtrise de la distribution accroît la justesse jusqu'à 1 %. Lors de la distribution d'un échantillon, assurez-vous de placer l'extrémité du cône sur la paroi du récipient, afin d'éviter que l'échantillon ne reste dans le cône. Après distribution, le fait de faire glisser le cône en remontant le long de la paroi du récipient permet de libérer tout liquide restant au niveau de l'orifice.

Distribution d'échantillon homogène



Distribution contre la paroi

Distribution dans
un liquide

Distribution à la surface
d'un liquide

Distribuez l'échantillon dans le liquide ou à la surface de celui-ci.

Lors de la distribution directement dans ou sur le liquide, utilisez le mode inversé pour éviter de prélever l'échantillon une fois la distribution terminée.

Pré-rinçage des cônes

Le pré-rinçage d'un cône à deux ou trois reprises provoque la formation d'un film liquide à l'intérieur du cône qui peut apporter jusqu'à 0,2 % de précision supplémentaire. Le pré-rinçage contribue également à neutraliser les effets de capillarité dans les micropipettes et, pour les pipettes de grand volume, à homogénéiser la température de l'air contenu à l'intérieur de la pipette avec la température de l'échantillon.

Exceptions au pré-rinçage

Le pré-rinçage peut compromettre les résultats de pipetage de solutions très froides, telles que celles provenant d'un bain de glace, ou de solutions supérieures à 37 °C, car cette opération peut générer des erreurs dans une proportion pouvant atteindre 5 %.

Pré-rinçage du cône



Éviter les variations thermiques

Température ambiante constante

La température optimale pour le pipetage est de $21,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (identique à la température utilisée pour l'étalonnage). Évitez les zones soumises aux courants d'air ou exposées au soleil, susceptibles de provoquer de brusques variations de température et de nuire à la précision de l'aspiration. Le pipetage à température constante peut permettre de bénéficier d'une amélioration de la performance des résultats pouvant aller jusqu'à 5 %.



Laisser un temps d'équilibrage approprié

Un aspect important des variations de température est le temps d'équilibrage. Les pipettes réagissent à la variation de la température des différents échantillons. Les liquides froids ont tendance à présenter une distribution excédentaire, tandis que les liquides chauds peuvent être distribués dans une quantité inférieure à celle prévue. Sauf indication contraire, prévoyez suffisamment de temps pour équilibrer la température de vos pipettes et des liquides avant utilisation.

Effets de réchauffement par la chaleur de la main

Durant les opérations de pipetage sur de longues périodes, la chaleur émise par votre main peut réchauffer la pipette et provoquer la dilatation de l'air contenu à l'intérieur, générant ainsi des résultats inexacts.

Évitez les effets de réchauffement par la chaleur de la main en utilisant des pipettes en polymères PVDF de haute qualité. Par ailleurs, replacez la pipette sur son support au lieu de la conserver dans votre main entre les cycles de pipetage.



Cohérence des paramètres du micromètre

Lors du changement du volume d'un niveau supérieur à une valeur inférieure, effectuez le réglage du volume à la valeur inférieure désirée. Toutefois, pour le changement du volume d'un niveau inférieur à une valeur supérieure, tournez le bouton de réglage en ajoutant 1/3 de tour supplémentaire au-dessus de la valeur du volume désiré. Cela permet d'éviter tout jeu mécanique et d'atteindre une précision supérieure.





Quel est le risque lié au pipetage ?

Les bonnes pratiques de pipetage sont un programme complet et personnalisé visant à déterminer les risques spécifiques aux opérations de pipetage et à comprendre comment les atténuer. Notre outil d'évaluation des risques GPP Risk Check™ est un excellent moyen de commencer : 5 minutes suffisent pour obtenir une évaluation de vos risques de pipetage et recevoir des recommandations pour les réduire au minimum.



METTLER TOLEDO propose une gamme complète de séminaires sur les GPP et sur la gestion des risques lors des opérations de pipetage. Si vous êtes intéressé, veuillez contacter votre représentant commercial Rainin.

► www.mt.com/gpp

www.mt.com/rainin

Pour plus d'informations

Mettler-Toledo AG

CH-8606 Greifensee, Switzerland

Téléphone +41-44-944 22 11

Fax : +41-44-944 30 60

Sous réserve de modifications techniques.

© 08/2013 Mettler-Toledo AG

Global MarCom Switzerland