LABORWELT

Nr. 6 / 2010 – 11. Jahrgang

Polymerase-Kettenreaktion

Methylierungssensitive PCR zum sensitiven Nachweis von Krebs-Vorstufen

Paper des Monats:
Wie EGF-Rezeptoren intrazellulär aktiviert werden

Messung von miRNA-Expressionsprofilen in Blutstammzellen



Marktübersicht: PCR-Kits

BIOCOM

analytikjena | Biometra

It`s time for Real-Time *rapid*PCR!



- **High-End Premium Performance mit maximaler Flexibilität**
- **Außergewöhnliche Geschwindigkeit**
- **Patentiertes Faser-Optisches System**
- **10 Jahre Langzeit-Garantie auf Hochleistungs-Optik**
- **Modernste Kontroll- und Auswertesoftware qPCRsoft**

Analytik Jena AG | Life Science | Konrad-Zuse-Straße 1 | 07745 Jena | Telefon +49 (0) 3641 77-9400
Fax +49 (0) 3641 77-76 77 76 | lifescience@analytik-jena.de | www.bio.analytik-jena.de

Life Science unlimited

Neue Biomarker finden mit PCR

Nach Pionieren wie der Berliner Epigenomics AG mit ihrem Septin-9-Biomarker greifen nun auch die Laborfirmen das Thema DNA-Methylierung auf. Gleich zwei vor dem Start stehende Universitäts-Spin-offs präsentierten auf der Biotechnica in Hannover neue methylierungssensitive PCR-Tests, die versprechen, die Diagnose des HPV-induzierten Gebärmutterhalskrebses (OnCGnostics, S. 14) und des Blasenkarzinoms (Epivios, S. 32) signifikant zu verbessern. Die Arbeit der noch universitären OnCGnostics-Forscher aus Jena verspricht die bisherige testimmanente Überdiagnose des Humanen Papillomvirus (HPV) in Cervixabstrichen signifikant zu verbessern – weist es doch die tatsächlich krebsrelevanten Gewebeveränderungen CIN2 und CIN3 nach. Gerüchten zufolge haben Hildener HPV-Test-Anbieter bereits an die Tür geklopft – wohl auch, weil *in vitro*-Diagnostik-Schwergewicht Roche schon eine Kooperation mit dem DKFZ geschlossen hat, um die Gewebeveränderungen zusätzlich zum PCR-Nachweis der 15 HPV-Hochrisikosubtypen nachzuweisen. Über beides lesen Sie in diesem LABORWELT-Themenheft „PCR".

Ganz aktuell wartet auch New England Biolabs mit einem Test auf, mit dem sich die verbreitete Methylierung in CpG-Inseln von der erst seit einem Jahr bekannten Hydroxymethylcytosin-Modifikation sicher quantitativ unterscheiden lässt (vgl. S. 22). Methode der Wahl, um potentiell krebsassoziierte Methylierungsmuster nachzuweisen, ist auch hier die qPCR, denn es geht bei der Entstehung von Krankheiten und Identifikation neuer Biomarker schließlich um Früherkennung, das heißt den Nachweis einer beginnenden Methylierung an krankheitsrelevanten Loci. Wichtig dabei: die Validierung verlässlicher Referenzgene. PCR-Experten werben daher für die Einführung eines minimalen Datensatzes, mit dem die Qualität von PCR-Daten nachvollziehbar und vor allem reproduzierbar wird. Ihre MIQE-Standards haben sie unlängst festgelegt (S. 30) . Daneben berichten wir über neue Möglichkeiten bei der Single Cell-PCR-Quantifizierung von miRNAs in seltenen Zellen (s. 17) und vieles mehr. Viel Lesespaß wünscht.

Thomas Gabrielczyk

In diesem Heft



Marktübersicht: PCR-Kits

Ob zum hochsensitiven Nachweis von Krankheitserregern oder zur relativen Quantifizierung von SNPs, miRNA und der DNA-Methylierung – PCR-Kits sind im molekularbiologischen Labor Standard und damit ein Riesenmarkt. Informationen zu den spezifischen Vorteilen der verschiedenen Kits geben die Hersteller in unserem aktuellen Überblick über die Tools ab Seite 36.

Inhalt

Paperwelt Highlight des Monats
4 **Cytohesine modulieren die Aktivität des EGF-Rezeptors**
Michael Famulok et al., LIMES-Institut, Universität Bonn

Blitzlicht Isotherme Amplifikation
6 **OSNA: Standardisierte intraoperative Sentineldiagnostik**
Elisabeth Breit, Monika Zänkert, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt



Titel: **PCR**
Mit einem Lab-on-a-Chip wird jetzt das Expression Profiling regulatorischer miRNAs in Einzelzellen möglich. Mehr ab Seite 17.

Foto: Fluidigm BV

Blitzlicht Analytik
10 **MLVA-Genotypisierung von *L. pneumophila* direkt im Trinkwasser**
Leila Kahlisch, Ingrid Brettar und Manfred G. Höfle,
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig

Wissenschaft DNA-Methylierung
14 **Erkennung von Neoplasien und invasiven Karzinomen des Gebärmutterhalses**
Alfred Hansel und Matthias Dürst, Universitätsklinikum Jena

Blitzlicht Microfluidics
17 **miRNA-Expression Profiling einzelner blutbildender Stammzellen**
Ken Livak, Fluidigm Corporation,South San Francisco, USA,
Véronique Lecault, Adam K. White und Oleh I. Petriv, University of British Columbia, Vancouver, Kanada

Report PCR-Analytik
22 **Identifikation neuer epigenetischer Biomarker**
Sriharsa Pradhan,
New England Biolabs Inc., Ipswich (MA), USA

Blitzlicht qPCR
28 **Real-Time quantitative rapidPCR: Ultraschnelle Echtzeitanalyse**
Melanie Trenkmann, Melanie Jahn, Stefan Winter, Alexander Berka,
Analytik Jena AG, Geschäftseinheit Life Science

Blitzlicht Standardisierung
30 **Qualität und Richtigkeit von qPCR-Ergebnissen steigern**
Michael W. Pfaffl, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan

Blitzlicht Diagnostik
32 **Messung von Änderungen der DNA-Methylierung zur Krebsfrüherkennung**
Foued Ghanjati und Simeon Santourlidis,
Epivios, Universitätsklinikum Düsseldorf

35 Labormarkt im Umbruch

44 Karrierewelt: Forschungsergebnisse verwerten

45 Stellenmarkt

50 Verbände

51 Produktwelt

53 Termine

54 Ausblick / Impressum

Cytohesine modulieren die Aktivität des EGF-Rezeptors



Anke Bill, Anton Schmitz, Barbara Albertoni, Jin-Na Song, Lukas C. Heukamp, David Walrafen, Franziska Thorwirth, Peter J. Verveer, Sebastian Zimmer, Lisa Meffert, Arne Schreiber, Sampurna Chatterjee, Roman K. Thomas, Roland T. Ullrich, Thorsten Lang & Michael Famulok (2010): Cytohesins Are Cytoplasmic ErbB Receptor Activators, Cell, doi: 10.1016/j.cell.2010.09.011

Der EGF-Rezeptor wird nicht allein durch seinen Liganden, den Epidermalen Wachstumsfaktor (engl. Epidermal Growth Factor. EGF), aktiviert. Erstmals haben Famulok und Kollegen den Nachweis erbracht, dass auch cytoplasmatische Proteine aus der Familie der Cytohesine die Aktivität der Kinasefunktion des Rezeptors modulieren. In Anwesenheit des Cytohesin-Inhibitors SecinH3 reduzierte sich die Autophosphorylierung aktivierter EGF-Rezeptor-Dimere in Lungenadenokarzinomzellen um etwa 50%. Cytohesin-Überexpression korrelierte dagegen mit einer Aktivierung des Rezeptorsignalings. Dass der Effekt physiologisch relevant ist, zeigten die Forscher um Famulok *in vitro* in Lungenkrebszellen. Cytohesin-Hemmung führte hier durch Modulation des Rezeptorsignalings zu einer signifikanten Senkung der Proliferationsrate, und in Lungenkrebspatienten zeigte sich ein erhöhter Cytohesinlevel. Obgleich der genaue Mechanismus der Cytohesin-Wirkung noch unbekannt ist, sprechen experimentelle Daten dafür, dass sie direkten Einfluss auf die Anordnung von EGF-Dimeren nehmen, welche nur in der sogenannten asymmetrischen Konformation aktiv sind. Mit dem neuen Modell der EGF-Aktivierung stellt sich die Frage, ob die bekannten Cytohesine bei der Aktivierung anderer Tyrosinkinasen auch eine Rolle spielen, worin diese besteht und wie sie mechanistisch zustande kommt.

Michael Famulok studierte in Marburg Chemie und ging nach seiner Promotion 1989 als Postdoc nach Boston, zunächst ein Jahr an das Dept. of Chemistry des MIT, dann für zwei weitere Jahre an das Massachusetts General Hospital. Zurückgekehrt nach Deutschland, gründete er seine eigene Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie der LMU München. Seit 1999 ist der Professor für Biochemie und Chemische Biologie am LIMES-Institut der Universität Bonn. Die Forschungsinteressen des Trägers des Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Preises liegen in der Aptamer- und Intramer-Technologie, DNA-Nanoarchitektur und der Biologie von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren.

LABORWELT:
Worin liegt die biologische Bedeutung Ihrer Ergebnisse?

Famulok:
Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) benötigen ein Stimulationssignal, um aktiviert zu werden – im Falle des EGF-Rezeptors den Epidermalen Wachstumsfaktor EGF. Das Andocken des EGF-Liganden an seinen Rezeptor bewirkt dessen Dimerisierung sowie Konformationsänderungen in dessen intrazellulären Domänen. Bis vor einiger Zeit hat man gedacht, das die EGF-Bindung hinreichend ist, um die Signalkaskade auszulösen. Dafür ist sie auch absolut essentiell. Aber in den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass die Aktivierung komplexer ist – zum Beispiel ist stets nur ein Bruchteil der EGF-Rezeptoren aktiv. Zudem gab es aus Strukturanalysen Hinweise, dass eine bestimmte Konformation – das sogenannte asymmetrische Dimer – die Kinasedomänen aktiviert. Damit kam die Frage auf, ob diese Konformation allein durch Ligandenbindung oder zusätzliche Faktoren gefördert wird.

Die Bedeutung unserer Arbeit besteht darin, dass wir mit den Cytohesinen erstmals zytoplasmatische Faktoren identifizieren konnten, deren Präsenz die Aktivierung noch weiter verstärken kann. Der molekulare Mechanismus ist allerdings noch unbekannt. Wir können aber sagen, dass ein Cytohesin entweder das asymmetrische Dimer induziert oder aber die Konformation des aktiven Dimers stabilisiert. Wir haben Hinweise, dass Cytohesine eine Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne bewirken beziehungsweise dass ihre Hemmung die Signalweiterleitung vom EGF-Rezeptor beeinträchtigt. Nach unserer Vorstellung ermöglichen die Cytohesine – neben dem essentiellen Aktivierungssignal durch die EGF-Bindung – eine Art Feinjustierung der Rezeptoraktivität.

LABORWELT:
Wie groß ist dieser Effekt?

Famulok:
Bei Überexpression von Cytohesin 2 in Zellen sehen wir konzentrationsabhängig eine Verdopplung bis Verdreifachung des Signals.

LABORWELT:
Welche diagnostischen oder therapeutischen Optionen ergeben sich aus Ihrer Arbeit?

Famulok:
Nachdem der Aktivierungseffekt des EGF-Signalings durch Cytohesine in Lungenkrebszellen gezeigt war, haben wir uns zusammen mit Pathologen die Cytohesinspiegel in Lungenkrebsproben angesehen und statistisch erhöhte Spiegel in den Tumoren gefunden. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass das EGF-Signaling und die Cytohesinexpression miteinander korrelieren – ein starker Hinweis auf die physiologische Relevanz. Mittels des von uns bereits 2006 identifizierten organischen Cytohesin-Inhibitors SecinH3 konnten wir zudem das Tumorwachstum verlangsamen. Das beantwortet die Frage nach der diagnostischen und therapeutischen Relevanz. Die Hemmung intrazellulärer Aktivatoren durch kleine membrangängige Moleküle eröffnet vielleicht einen neuen Angriffpunkt gegen Krebs.

LABORWELT:
Welches sind ihre nächsten Forschungsziele?

Famulok:
Eine der ganz wichtigen Fragen ist die nach dem genauen molekularen Mechanismus der Cytohesin-Wirkung. Dem wollen wir mit Strukturanalysen und biochemischen Methoden nachgehen. Darüber hinaus zeigt die Sec7-Domäne von Cytohesinen neben dem direkten Effekt auf die Kinasedomänen eine weitere Wirkung als Guaninnukleotid-Austauschfaktor, und wir würden gerne diese duale Funktion mechanistisch verstehen. Zudem möchten wir uns gerne die Rollen der vier bekannten Cytohesine bei anderen Rezeptortyrosinkinasen anschauen – für den Insulinrezeptor ist zum Beispiel bereits ihre Rolle als Aktivator gezeigt.

IN UNMITTELBARER NÄHE DER VIER GROSSEN SEEN NORDAMERIKAS BEFINDET SICH EINE RIESIGE TALENTSCHMIEDE.

Auch bekannt als die „Ontario workforce“: die am besten ausgebildeten Arbeitnehmer aller G7 Staaten. Doch Ontario bietet nicht nur Talent, sondern auch Zugang zu Märkten: In der nordamerikanischen Freihandelszone leben über 440 Mio. Konsumenten. Von Toronto, dem wirtschaftlichen Zentrum Ontarios, ist ein Großteil des mittleren Westens der USA sowie der Ostküste innerhalb eines Tages erreichbar. Mit einem exzellenten Zugang zum US-Markt und talentierten Arbeitskräften aus der ganzen Welt werden Sie sich wie zu Hause fühlen. Menschen und Märkte. Aus diesen Gründen heißt es: **The world works here.**



ONTARIO
CANADA

investinontario.com/talentiert



Ontario Finanziert von der Regierung von Ontario

OSNA: Standardisierte intraoperative Sentineldiagnostik

Dr. Elisabeth Breit, Monika Zänkert, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt

Der axilläre Nodalstatus ist der wichtigste Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Lange Zeit war die komplette Ausräumung der axillären Lymphknoten und deren pathologische Beurteilung die klassische Behandlungsmethode. Seit den neunziger Jahren ist diese radikale chirurgische Herangehensweise durch eine selektive und weniger invasive Methode ersetzt worden – die Wächterlymphknoten-Biopsie. Nach intraoperativer Beurteilung der Wächterlymphknoten mittels histologischer Schnellschnittanalyse entscheidet der Arzt über die operative Entfernung oder den Verbleib der axillären Lymphknoten. Mit dem molekularbiologischen Diagnoseverfahren OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification) ist eine standardisierte Analyse des gesamten Lymphknotens intraoperativ möglich. Eine verlässliche Diagnose des Nodalstatus erfolgt während der Erstoperation. Die bislang notwendige postoperative histologische Analyse entfällt. Den betroffenen Brustkrebspatientinnen wird die psychische Belastung der Ungewissheit während des Wartens sowie ein zweiter chirurgischer Eingriff erspart.

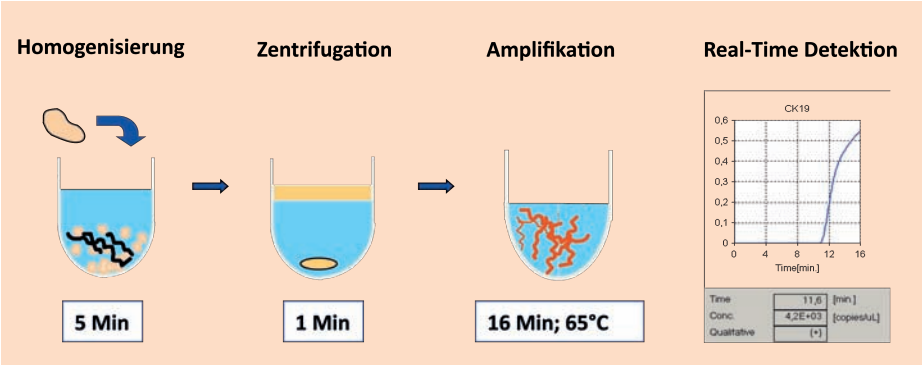


Abb. 1: **Arbeitsablauf bei der One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)**

Die Wächterlymphknoten-Biopsie (sentinel lymph node biopsy) ist als minimalinvasive Methode zur Bestimmung des Nodalstatus bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom in einem frühen Stadium als Behandlungsstandard etabliert[1]. Ein Wächterlymphknoten ist der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet eines Mammakarzinoms und repräsentativ für den Nodalstatus der Axilla[2]. Bei einem positiven Wächterlymphknoten wird eine konventionelle Axilladissektion durchgeführt, bei einem negativen wird darauf verzichtet.

Grundlagen der intraoperativen Sentineldiagnostik

Eine zuverlässige intraoperative Detektion von Metastasen im Wächterlymphknoten ermöglicht die Entscheidung über eine axilläre Dissektion während derselben Operation. Somit entfällt die nachgeführte Bestätigungsanalyse und damit für die Patientinnen die belastende Wartezeit bis zur definitiven Diagnosestellung.

Die Anzahl unnötiger Lymphadenektomien und damit einhergehende Komplikationen wie Schulter-Arm-Morbidität werden erheblich reduziert[3]. Der Wächterlymphknoten kann intraoperativ mittels Gefrierschnittdiagnostik oder Imprintzytologie untersucht werden; allerdings weisen diese Methoden falsch-negative Raten zwischen 5% und 45% auf[4]. Die eingeschränkte Sensitivität resultiert aus der geringen Menge an Lymphknotengewebe, welche in dem begrenzten Zeitrahmen einer Operation begutachtet werden kann. Eine große Anzahl von Lymphknotenmetastasen wird erst postoperativ bei einer aufwendigen histopathologischen Untersuchung am Paraffinschnitt erkannt. Davon betroffene Patientinnen müssen sich dann einer Zweitoperation unterziehen. Die Applikation dieser Methoden erfolgt zudem nicht standardisiert, woraus sich die Spannbreite hinsichtlich der Genauigkeit ergibt[5]

Im Gegensatz dazu ist der OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification)-Test ein automatisiertes System, mit dem intraoperativ der gesamte Lymphknoten bezüglich seiner Tumorlast charakterisiert werden kann. Die molekulardiagnostische Methode ermöglicht eine semi-quantitative Bestimmung der zellulären Zytokeratin 19 (CK19)-mRNA-Expression. CK19 ist als Epithelzellmarker im tumorfreien axillären Lymphknotengewebe nicht nachweisbar. Benigne epitheliale Inklusionen fallen unter die Nachweisgrenze der Methode.

Das OSNA-Verfahren

OSNA ist ein isothermes Reaktionsverfahren, welches auf einer speziellen Technologie zur Amplifizierung von Nukleinsäuren basiert: der Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)[6]. Gegenüber geläufigen PCR-Methoden bietet die Anwendung der RT-LAMP-Technologie deutliche Vorteile. Der Assay wurde so optimiert, dass eine hohe Spezifität und Sensitivität gewährleistet sind. Durch die konstante Reaktionstemperatur wird die unerwünschte Amplifizierung genomischer DNA verhindert. Die Amplifikation erfolgt über eine Strand-displacement-Polymerase, deren Reaktionsoptimum bei 65°C liegt. Während für die RT-PCR nur zwei Primer zur Erkennung der Zielsequenz eingesetzt werden, wurden für die RT-LAMP sechs Exon-übergreifende Primer so konzipiert, dass einerseits die Amplifizierung von Pseudogenen ausgeschlossen, andererseits die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird. Falsch-positive Ergebnisse werden dadurch vermieden.

Die Reaktionszeit für eine Probe beträgt 16 Minuten, und der Amplifizierungsverlauf wird in Echtzeit überwacht (Abb. 1). Als Messgröße dient ein Nebenprodukt der Reaktion: Magnesiumpyrophosphat bildet sich mengenmäßig proportional zum Amplifikat und führt zu einer Trübung im Reaktionsgemisch, die photometrisch bei 465 nm gemessen wird[7]. Das Präzipitat bildet sich aus Pyrophoshat-Ionen, die bei der Amplifizierung aus den Nukleotiden freigesetzt werden, und in der Reagenzlösung vorhandenem zweiwertigem Magnesium. Zur Ergebnisermittlung dient eine Standardkurve mit drei Kalibratoren unterschiedlicher CK19-mRNA-Konzentrationen, welche im gebrauchsfertigen Reagenzienkit LYNOAMP BC (Sysmex, Kobe, Japan) enthalten sind.

Nach der Homogenisierung (90 Sekunden) des Lymphknotengewebes mit dem Homogenisierungspuffer (LYNORHAG, Sysmex) erfolgt ein kurzer Zentrifugationsschritt (Abb. 1). Im Gegensatz zur RT-PCR entfällt ein vorheriger Aufreinigungsschritt der RNA. Die Amplifizierung erfolgt direkt aus dem Lysat. Der Reaktionsansatz wird durch einen Pipettierrobotor im RD-100i (Sysmex) vorbereitet. Anschließend erfolgt die Amplifizierung und Detektion in dem automatisierten Real-Time-System unter stan-

www.laborwelt.de

MILLIPORE™

MEHR

+ MEHR PARAMETER
+ MEHR ANALYSEN
+ MEHR AUFSCHLUSSREICHE DATEN
+ MEHR ARBEITSFLÄCHE
+ MEHR EINFACHHEIT
+ MEHR LÖSUNGEN



= WENIGER

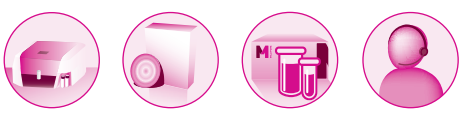
EINE UNIVERSALLÖSUNG FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE – MIT EINSTIEGSPREISEN UNTER €33.000.

Die neue Familie der **easyCyte™** Einzelproben-Durchflusszytometer fasst den gesamten Qualitäts-und Leistungsumfang der Millipore **guava®**-Lösung in einem einzigen Instrument zusammen. Bei bis zu 8 Parametern und 2 Laserquellen, höherer Analyseleistung, verbesserter Datenqualität, validierten Reagenzien und technischem Kundenservice – ein erstaunlich niedriger Preis!

Die Gleichung für die neue **easyCyte** Einzelproben-Lösung lautet:

mehr = weniger.

millipore.com/easyCyte4



ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER®
Research. Development. Production.

Millipore, Advancing Life Science Together und guava sind eingetragene Marken der Millipore Corporation. Das Millipore-Logo und easyCyte sind Marken der Millipore Corporation. ©2010 Millipore Corporation. Alle Rechte vorbehalten.



Abb. 2: Das OSNA-System: Innenansicht des RD-100i (links) mit Reagenzien (Pfeil) und Homogenisierungspuffer (rechts)

dardisierten Bedingungen. Je eine Negativ- und Positivkontrolle der CK19-mRNA, die Bestandteile des Reagenzienkits sind, werden in jedem Analysenlauf mitgeführt und gewährleisten die Ergebnisqualität. Bis zu vier Lymphknoten können parallel analysiert werden. Die Ergebnisse stehen nach etwa dreißig Minuten zur Verfügung. Dies schließt die kurze manuelle Vorbereitungszeit ein. Die semi-quantitative Bestimmung der CK19-mRNA-Kopienzahl differenziert positive und negative Ergebnisse. Zudem wird die Größe der metastatischen Herde indiziert. Abhängig von der gemessenen Kopienzahl der Marker-mRNA werden die Ergebnisse in drei Kategorien unterteilt: Makrometastasen (++, >5000 CK19-mRNA-Kopien/µL), Mikrometastasen (+, 250-5000 CK19-mRNA-Kopien/µL) und keine Metastasen (–, < 250 CK19-mRNA-Kopien/µL).

OSNA in der klinischen Anwendung

Der Beleg für die Wirksamkeit dieser neuen Methode erfolgte weltweit in mehreren klinischen Studien[8-12] an insgesamt 2.313 Lymphkoten. Hierzu wurde der Lymphknoten mit einem speziell entwickelten Schneidegerät in vier gleichgroße Scheiben zerteilt. Zwei alternierende Scheiben wurden mit OSNA untersucht und die beiden Vergleichsproben histologisch aufgearbeitet. Die beiden histologischen Scheiben wurden in Formalin fixiert. Postoperativ wurde jede dieser Scheiben in Stufen mit 100-250 µm-Intervallen, je nach Studienprotokoll, histologisch untersucht. Jede Stufe bestand aus drei Schnitten mit jeweils einer Hämatoxylin&Eosin (H&E)-Färbung, einer immunhistochemischen Färbung mit einem pan-CK-Antikörper sowie des CK19-Proteins. Diese postoperative Analytik ist sehr viel gründlicher als dies in nationalen und internationalen Empfehlungen für die Untersuchung eines Wächterlymphknotens vorgegeben wird. Für den OSNA-Test konnte in diesen multizentrischen Studien eine Sensitivität und Spezifizität von mehr als 95% im Vergleich zu der histologischen Befundung gezeigt werden.

OSNA in der klinischen Routine

OSNA ist CE-zertifiziert und konform zu den Anforderungen der Richtlinie 98/79/eG für *in-vitro*-Diagnostika. Der Test ist für den Einsatz in der Diagnostik zugelassen. Er kommt europaweit in derzeit mehr als 80 Kliniken routinemäßig zur Anwendung. Der Anteil des Lymphknotengewebes, der intraoperativ mit OSNA analysiert wird, kann individuellen Protokollen und Anforderungen angepasst werden. Einige OSNA-Nutzer asservieren etwa eine 1 mm dicke Mittelscheibe für die Histologie.

Bei kompletter Lymphknotenanalyse entfällt die postoperative Histologie mit der entsprechenden Arbeitsentlastung und Kosteneinsparung. Vom intraoperativen Nachweis von Metastasen im Wächterlymphknoten profitieren insbesondere die Brustkrebspatientinnen. Das psychisch enorm belastende Warten bis zur endgültigen Diagnose bleibt ihnen erspart, ebenso wie ein weiterer operativer Eingriff und die damit verbundene Belastung einer erneuten Anästhesie. Das Risiko möglicher technischer Komplikationen wird vermindert und weitere therapeutische Schritte deutlich früher eingeleitet.

Das Vermeiden von Zweiteingriffen und postoperativen Untersuchungen ist auch wirtschaftlich von Vorteil. Prozesse werden optimiert und knapp bemessene finanzielle sowie personelle Ressourcen auf andere Bereiche verteilt. Kürzere stationäre Aufenthalte, besser ausgelastete Operationsflächen und die damit einhergehende Effizienzsteigerung sind das Ergebnis.

OSNA beim Kolonkarzinom

Neben dem routinemäßigen Einsatz beim Mammakarzinom ist die Anwendung von OSNA auch in anderen Krebsentitäten in der Entwicklung. So wurden in einer klinischen Studie 600 Lymphknoten von Patienten mit Kolonkarzinom einer intensiven histologischen Analyse und OSNA unterzogen, analog dem Studienprotokoll im Brustkrebsbereich. Ein Teil dieser Studie wurde kürzlich publiziert[13]. Die Konkordanz zwischen beiden Diagnostikverfahren lag bei mehr als 95%[13]. Im Gegensatz zum Einsatz beim Mammakarzinom ist OSNA beim Kolonkarzinom für die postoperative Analytik indiziert. Die Lymphadenektomie wird beim Kolonkarzinom standardmäßig durchgeführt. Daraus resultiert eine relativ große Anzahl von Lymphknoten für die histologische Untersuchung, welche in der Regel aus einem oder gegebenenfalls seriellen H&E-Schnitten besteht. Allerdings erleiden 20% der initial nodal-negativen Darmkrebspatienten, für die keine adjuvante Therapie indiziert ist, innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv[14] – ein deutlicher Hinweis darauf, dass bei diesen Patienten Metastasen übersehen wurden[15]. Auch hier könnte die OSNA-Analyse des ganzen Lymphknotens entscheidend zu einer genaueren und standardisierten Anzeige der Tumorlast und somit einer richtigen Zuordnung von Kolonkarzinompatienten in klinischen Stadien beitragen.

Fazit

OSNA ist ein standardisiertes, molekulardiagnostisches Testverfahren für die intraoperative Diagnostik des Wächterlymphknotens beim Mammakarzinom. Die Genauigkeit von OSNA ist vergleichbar mit einer aufwendigen histologischen Aufarbeitung (H&E sowie IHC-Färbung) von seriellen Paraffinschnitten. Im Gegensatz zu den konventionellen histopathologischen Methoden ermöglicht das OSNA-System die Analyse des gesamten Lymphknotens und somit die Entscheidung während des chirurgischen Eingriffs. Beim Kolonkarzinom kann es postoperativ zur Typisierung der metastatischen Besiedlung in den Lymphknoten eingesetzt werden.

Literatur

[1] Lyman GH, et al (2005). J Clin Oncol 23:7703-20.
[2] Morton DL, et al (1992). Arch Surg 127:392-99.
[3] Lucci A, et al (2007). J Clin Oncol 25:3657-63.
[4] Motumura K, et al (2000). Br J Surg 87:597-601.
[5] Cserni G (2005). Histopathology 46: 697-706.
[6] Notomi T, et al (2000). Nucleic Acids Research 28:e63.
[7] Mori Y, et al (2001). Biochem Biophys Res Commun 289:150-54.
[8] Tsujimoto M, et al (2007). Clin Can Res 13: 4807-16.
[9] Visser M, et al (2008). Int J Cancer 122: 2562-67.
[10] Schem C, et al (2009). Virchows Arch 454: 203-10.
[11] Tamaki Y, et al (2009). Clin Can Res 15: 2879-84.
[12] Snook KL, et al (2010). Br J Surg, accepted 10/2010
[13] Croner RS, et al (2010). J Transl Med 8:83-8.
[14] Berberoglu U (2004). Hepatogastroenterology 51:1689-93.
[15] Bilchik AJ, et al (2002). Arch Surg 137:1377-83.

Korrespondenzadresse

Dr. Elisabeth Breit
Monika Zänkert
Sysmex Europe GmbH
Bornbarch 1, 22848 Norderstedt
Tel.: +49-(0)40-52726-0
breit.elisabeth@sysmex-europe.com
zaenkert.monika@sysmex-europe.com



© 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Endlich frei –
mit einem Probenaufreinigungssystem für alle Anwendungen.

Genießen Sie die Freiheit, die Ihnen die Thermo Scientific KingFisher Aufreinigungssysteme bieten. Wählen Sie Ihre Reagenzien völlig unabhängig vom Gerät und erreichen Sie so die bestmöglichen Ergebnisse für alle DNA/RNA-, Protein- und Zellreinigungsprozesse.

Unsere Magnetpartikelprozessoren sind Ihr flexibler Partner. Sie können jede Probe von RNA bis zum Protein aus nahezu allen Ausgangsmaterialien von Blut bis hin zu Bodenproben isolieren. Das Endprodukt besticht durch höchste Reinheit. Durch hohe Automatisierung der Verarbeitungsprozesse bleibt Ihnen viel mehr Zeit für andere Aufgaben.

Erfahren sie mehr über flexible, effizientere und anwenderfreundliche Probenaufreinigung unter **www.thermoscientific.de/kingfisher**



NEU: Thermo Scientific KingFisher Flex
Höhere Ausbeute, mehr Flexibilität und exzellente Qualität

Moving science forward

Thermo SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific

MLVA-Genotypisierung von *L. pneumophila* direkt im Trinkwasser

Dr. Leila Kahlisch, Dr. Ingrid Brettar und Dr. Manfred G. Höfle, Abteilung Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig

***Legionella pneumophila* verursacht die Legionärskrankheit, eine schwere Lungeninfektion, und ist vor allem für ältere und immungeschwächte Personen eine Gefahr. Die Infektion erfolgt durch Einatmen erregerhaltiger Aerosole, etwa beim Duschen oder über Klimaanlagen. Da Legionellen natürlich in den meisten aquatischen Lebensräumen vorkommen, ist es kaum möglich, ihr Eindringen in von Menschen geschaffene Lebensräume wie Trinkwasserversorgungssysteme zu verhindern. Um *L. pneumophila*-bedingte Lungeninfektionen besser verstehen und vermeiden zu können, ist es wichtig, das Bakterium möglichst frühzeitig zu erkennen und einzuordnen. PCR-gestützte Verfahren auf Grundlage repetitiver DNA-Elemente können dabei helfen, Legionellen-Isolate sehr präzise zu genotypisieren und damit Informationen über ihre Virulenz und Herkunft zu erhalten. Da die Isolierung der Legionellen oft problematisch ist, haben wir die Methodik weiterentwickelt, so dass Legionellenstämme nun direkt auf der Basis von aus dem Wasser gewonnener genomischer Bakterien-DNA identifiziert und genotypisiert werden können.**

Bei der Gattung *Legionella* handelt es sich um stäbchenförmige Bakterien aus der Klasse der γ-Proteobakterien. Die Gram-negativen begeißelten Bakterien kommen in vielen natürlichen und künstlich geschaffenen aquatischen Lebensräumen vor, besonders in Biofilmen (Abb. 1). Dort leben und vermehren sie sich in aquatischen Protozoen-Arten, wie etwa Amöben[1]. Manche Legionellen sind in der Lage, im Menschen eine atypische Pneumonie auszulösen. Dies geschieht über das Inhalieren kontaminierter Wassertröpfchen, die zum Beispiel beim Duschen entstehen. Über die Tröpfchen gelangen die Erreger tief in die Lungenalveolen, wo sie alveoläre Makrophagen infiltrieren und so die Pneumonie auslösen können.

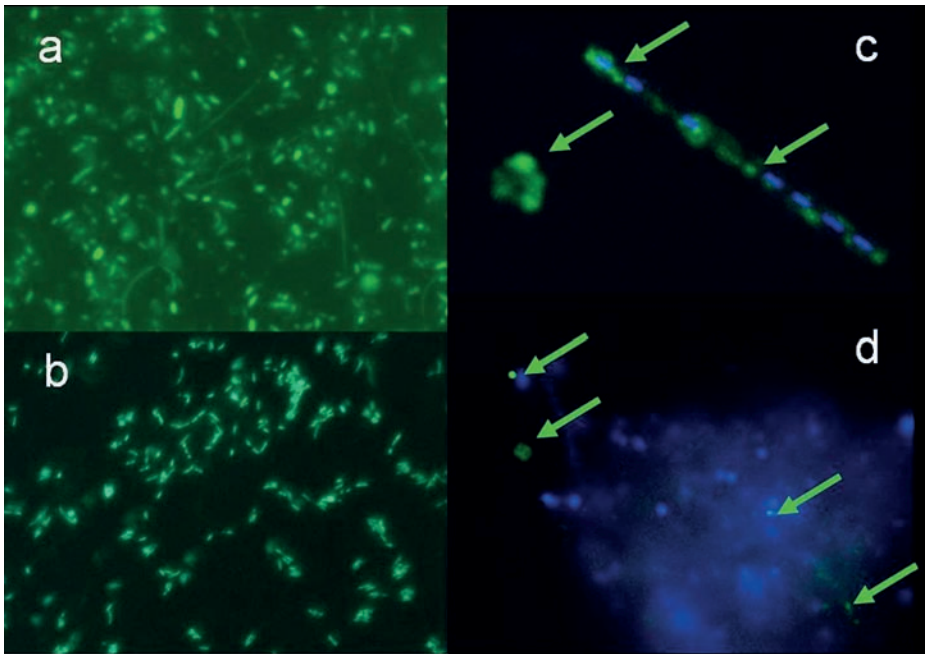


Abb. 1. a. Typische Trinkwasser-Mikroflora gefärbt mit SybrGreen I. b. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* in Reinkultur. c. und d. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* in Biofilmproben eines Kühlturms. 1. Antikörper: anti-Legionella pneumophila 1:100, 2. Antikörper: DyLight 488 konjugierter anti-Maus-Antikörper 1:250. Hintergrundfärbung: DAPI. Grüner Pfeil: *L. pneumophila*-Zelle.

Von den bisher identifizierten 48 *Legionella*-Spezies ist *Legionella pneumophila* für etwa 91% aller Legionellen-Erkrankungen beim Menschen verantwortlich[2]. Das Bakterium wurde erstmals 1976 bei einem Veteranentreffen der „American Legion" in Philadelphia identifiziert, bei dem 29 Teilnehmer an einer schweren Lungeninfektion starben[3]. Daher rührt der Name „Legionärskrankheit". Legionellen-assoziierte Lungeninfektionen haben in den vergangenen Jahrzehnten zugenommen. Dies lässt sich vor allem auf Veränderungen im Lebensstil zurückführen, die das Vorkommen von warmem Wasser fördern: Kühltürme, Klimaanlagen, Duschen und Whirlpools bieten für Legionellen ideale Lebensräume und unterstützen zugleich ihre Übertragung per Aerosol auf den Menschen.

Methoden zur Genotypisierung von *Legionella pneumophila*-Isolaten

Eine Infektion mit *Legionella pneumophila* kann – vor allem für immungeschwächte, ältere Menschen, AIDS-Patienten oder Organtransplantatempfänger – ein bedeutendes Gesundheitsrisiko darstellen. Um durch diesen Erreger verursachte Lungeninfektionen und deren Epidemiologie zu verstehen, ist eine genaue Identifizierung von Stämmen, mindestens Sub-Spezies, nötig. Molekulare Werkzeuge zur Analyse bakterieller DNA wie zum Beispiel MLST (Multi-Locus Sequence Typing,[4]) und MLVA (Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis) sind anerkannte Methoden, um den Genotyp pathogener Bakterien zu bestimmen. Die MLVA-Analyse basiert dabei auf der Variation sogenannter VNTRs (variable number of tandem repeats) an verschiedenen Genom-Loci. Diese repetitiven DNA-Elemente sind Orte häufiger DNA-Rekombinationen. Des Weiteren begünstigen sie ein „Verrutschen" der DNA-Polymerase während der Replikation, was zu Strangverschiebungen und somit Variationen in der Länge der repetitiven Elemente führen kann. Wenn dies mit einer gewissen Häufigkeit in der Entwicklung/Geschichte einer Art aufgetreten ist, können die Variationen an verschiedenen Genom-Loci dazu genutzt werden, um Stämme voneinander zu unterscheiden.

Mit Hilfe von PCR-Primern, die an die flankierenden Regionen dieser repetitiven DNA-Elemente binden, kann die Variation über die Analyse der Länge des PCR-Produktes analysiert werden (Abb. 2). Vor allem bei innerhalb der Spezies genetisch sehr ähnlichen Bakterien wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* oder *Pseudomonas aeruginosa* konnte mit Hilfe dieses Werkzeuges eine Genotypisierung durchgeführt werden, obwohl sich die Stämme mit klassischen Methoden (wie zum Beispiel einer Serotypisierung) kaum voneinander unterscheiden ließen. Der sicherheitstechnische Vorteil dieser Methode ist, dass MLVA-Daten via Internetdatenbanken weltweit unter Forschungseinrichtungen und Kliniken ausgetauscht werden

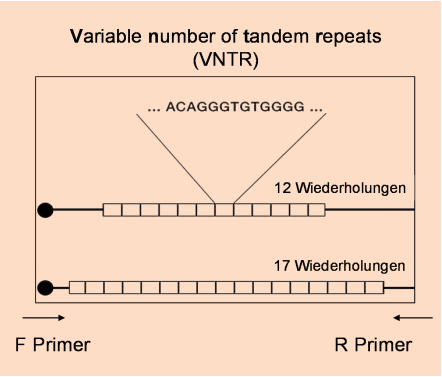


Abb. 2: Prinzip der VNTR-PCR. Wenn mehrere Genom-Loci untersucht werden, wird die Methode MLVA (Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis) genannt.

können statt potentiell infektiöse Isolate von Labor zu Labor verschicken zu müssen. Die Datenbanken, die nun zum Abgleich von neuen Isolaten zur Verfügung stehen, wachsen von Tag zu Tag und sind zu einem wichtigen Hilfsmittel zur Analyse neuer, epidemiologisch relevanter Isolate einer Spezies geworden.

Für *Legionella pneumophila* steht seit 2007 eine Datenbank zur Verfügung, die Daten zu acht verschiedenen Genom-Loci vorhält und Vergleiche zu bereits bekannten Legionellen-Isolaten ermöglicht. Die von Pourcel *et al.*[5] entwickelte Methode zur Genotypisierung von *Legionella pneumophila*-Isolaten wurde von uns für die Anwendung auf Kapillarsequenzern optimiert; dabei werden die unterschiedlichen Primer-Paare fluoreszenzmarkiert und die so entstehenden PCR-Produkte über ihre Länge nach Farbmarkierung mit einem Kapillarsequenzierer identifiziert[5-7].

Isolation und Genotypisierung mit MLVA

Die Isolation von Legionellen aus Umweltproben ist zeitaufwändig und schwierig, denn die Bakterien wachsen sehr langsam und stellen hohe Ansprüche an das Kulturmedium. Hinzu kommt, dass Legionellen auch auf Selektionsmedium oft überwachsen werden, wodurch sie oft supprimiert oder ihre Identifizierung erschwert werden. In Fällen einer Epidemie, ist daher das Kultivierungsverfahren oft zu langwierig und zu wenig erfolgreich, um Genotyp und Virulenz schnell und sicher zu ermitteln. Die Analyse der DNA, die aus einer Probe (z.B. Wasserprobe oder klinischen Probe wie Sputum oder Lavage-Flüssigkeit) gewonnen werden kann, könnte das Isolierungsverfahren für Pathogene in Zukunft nicht nur ergänzen, sondern eventuell sogar ersetzen. Für die Analyse von Wasserproben werden dabei mehrere Liter Wasser durch feinporige Membranen (Porenweite: 0,2µm) filtriert. Die so „geernteten" Bakterien können auf dem Filter bei –70°C bis zur Extraktion der genomischen DNA aufbewahrt werden[8].

Um Legionellen-Isolate zu erhalten, wurden auf einem Filter konzentrierte Trinkwasserbakterien nach Behandlung mit einem sauren Puffermedium auf Legionellen-spezifischem Agar-Nährmedium inkubiert. Die nach einigen Tagen sichtbaren Kolonien wurden in Kultur genommen und die Art mittels 16S-rRNA-Sequenzierung bestimmt. Auf diese Weise wurden 15 unterschiedliche Legionellen-Isolate aus verschiedenen Kalt- und Warmwasserquellen auf dem Gelände des Helmholtz-Zentrums in Braunschweig gewonnen. Diese Isolate wurden in zwei Multiplex-PCRs mit fluoreszenzmarkierten Primern analysiert und in verschiedene Genotypen eingeteilt.

In-situ-Genotypisierung in Trinkwasser

Traditionell wird *Legionella pneumophila* in 15 Serogruppen eingeteilt, wobei Serotyp 1 als Hauptkrankheitserreger gilt. Diese Klassifizierung ist aber zu grob, um etwa die Ausbreitung virulenter Serotyp 1-Stämme effizient zu überwachen und bis zur Quelle zurückzuverfolgen. Epidemiologische Studien erfordern stattdessen Methoden, die jeden Serotyp sehr präzise in Genotypen unterteilen. Um eine hochauflösende Einordnung der Stämme zu ermöglichen, ist eine PCR-basierte Typisierungsmethode wie die MLVA geeignet, wie mit Isolattypisierung gezeigt wurde. Die acht Loci umfassende Multiplex-PCR wurde genutzt, um direkt mehrere Wasserproben auf das Vorkommen und die Genotypen von *Legionella pneumophila* zu screenen. Die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese zeigten, dass es mehrere *Legionella pneumophila*-Genotypen innerhalb einer Umweltprobe gab. Um diese voneinander zu trennen, wurde eine neue Methode entwickelt, die neben dem Nachweis von *Legionella pneumophila* in einer Probe auch den MLVA-Genotyp erfasst. Dabei werden anstelle fluoreszenzmarkierter VNTR-Primer, Primer mit einer Biotin-Markierung eingesetzt und acht einzelne PCR-Reaktionen durchgeführt (Abb. 3, S. 12). Sofern in einer PCR-Probe mehrere Genotypen vorhanden sind, entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer PCR-Produkte. Um dieses effektiv aufzutrennen, setzten wir eine Hochspannungselektrophorese ein, die es erlaubt, auch PCR-Produkte voneinander zu trennen, die sich nur durch wenige Basen voneinander unterscheiden. Diese „Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse" ist ein anerkanntes elektrophoretisches Verfahren, das bereits erfolgreich zur Charakterisierung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften eingesetzt wurde[9-11]. Die Methodik basiert darauf, dass einzelsträngige DNA-Moleküle eine individuelle Konformation einnehmen und demzufolge unterschiedliche Laufstrecken bei einer Gelelektrophorese zurücklegen[11]. Um ein einzelsträngiges PCR-Produkt zu erhalten, wird dazu die PCR mit einem Biotin-markierten Vorwärts-Primer durchgeführt. Das entstandene Biotin-markierte PCR-Produkt wird dann mit Hilfe einer Biotin-Streptavidin-



SPRIworks

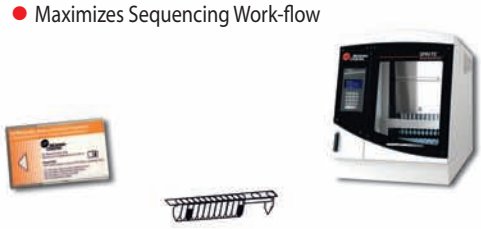
Simplifies Next Generation Sequencing

Fully Automated

Fragment Library System

For the next Generation Sequencers

- Full Library Construction Process in a Cartridge
- Easy to Use and Operate Bench-top System
- No More Gels - Built in SPRI Size Selection Chemistry
- Run up to 10 Samples at a Time
- Maximizes Sequencing Work-flow



BECKMAN COULTER

Beckman Coulter GmbH
47807 Krefeld Europark Fichtenhain B13
Tel. 02151/333 625
www.beckmancoulter.de

Genomics Proteomics Cell Analysis Centrifugation Lab Tools
Particle Characterization Bioseperation Lab Automation

Aufreinigung über magnetische Beads in die zwei Einzelstränge geteilt, die auf ein SSCP-Gel geladen werden. Nach Gelelektrophorese werden die aufgetrennten DNA-Amplicons mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die einzelnen Banden können ausgeschnitten und unter Einsatz der Original-Primer-Paare sequenziert werden.

Die PCR-Produkte der einzelnen VNTR-Loci wurden auf diese Weise aufgetrennt. Dieser experimentelle Ansatz wurde für zwei Umwelt-Isolate und die zugehörige Umwelt-DNA des Isolationsortes durchgeführt (Abb. 4). Die entstandenen Banden wurden sequenziert, um die Länge der Amplicons und deren Sequenz genau zu bestimmen. Die zwei *Legionella pneumophila*-Isolate zeigten bei der Analyse meist eine klare Bande pro VNTR-Locus. In der Umweltprobe konnten aber für drei VNTR-Loci zusätzliche Banden identifiziert werden. Ihre Sequenzierung ergab, dass es sich um Allele der Genom-Loci handelt. Beispielsweise wurden an Locus 1 sowohl zwei als auch sieben Wiederholungen des gleichen VNTRs durch Sequenzierung nachgewiesen. Dies zeigt, dass mit der neuen molekularen Methode in einer Umweltprobe mehr *Legionella pneumophila*-Genotypen nachgewiesen werden können als mit herkömmlichen Methoden. Die neue Methodik erwies sich zudem als sehr sensitiv – mittels real-time-PCR wurde gezeigt, dass auch geringe Konzentrationen von *Legionella pneumophila* im Trinkwasser ausreichen (Anzahl Genome pro ml), um das Bakteriums nachweisen und genotypisieren zu können[12].

Anwendungsmöglichkeiten

Mit Hilfe dieser Methode wurde, unseres Wissens nach, die erste Studie durchgeführt, bei der eine MLVA-Analyse direkt auf Umweltproben angewandt wurde, also ohne zuvor Isolate zur Genotypisierung gewinnen zu müssen[12]. Dieser Ansatz ist nicht nur auf Trinkwasser beschränkt, sondern universell einsetzbar. Auch klinische Proben wie Sputum oder Biopsie-Material können untersucht werden, sofern sich aus diesen genomische Bakterien-DNA isolieren lässt. Dadurch dass die Methodik nur auf dem Nachweis der bakteriellen Nukleinsäuren basiert, können auch gefrorene Proben (etwa aus Biobanken) eingesetzt werden, um molekulare Epidemiologie-Studien nach Ausbrüchen von Legionellosen durchzuführen. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Ansatzes ist, dass keine potentiell infektiösen Isolate generiert werden müssen, um *Legionella pneumophila* nachweisen zu können. Die neue Methode kann daher dazu dienen, die Infektionspfade von Legionellosen besser zu verstehen und Strategien zu entwickeln, um zukünftigen Ausbrüchen vorzubeugen.

Literatur

[1] Steinert, M., Hentschel, U. & Hacker, J. FEMS Microbiol. Rev 26, 149-162 (2002).
[2] Yu, V.L. u. a. J. Infect. Diseases 186, 127-128 (2002).
[3] Fraser, D.W. u. a. N. Engl. J. Med 297, 1189-1197 (1977).
[4] Gaia, V. u. a. . J. Clin. Microbiol. 43, 2047 (2005).
[5] Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramisse, F., Vergnaud, G. & Tram, C. J. Clin. Microbiol. 41, 1819-1826 (2003).

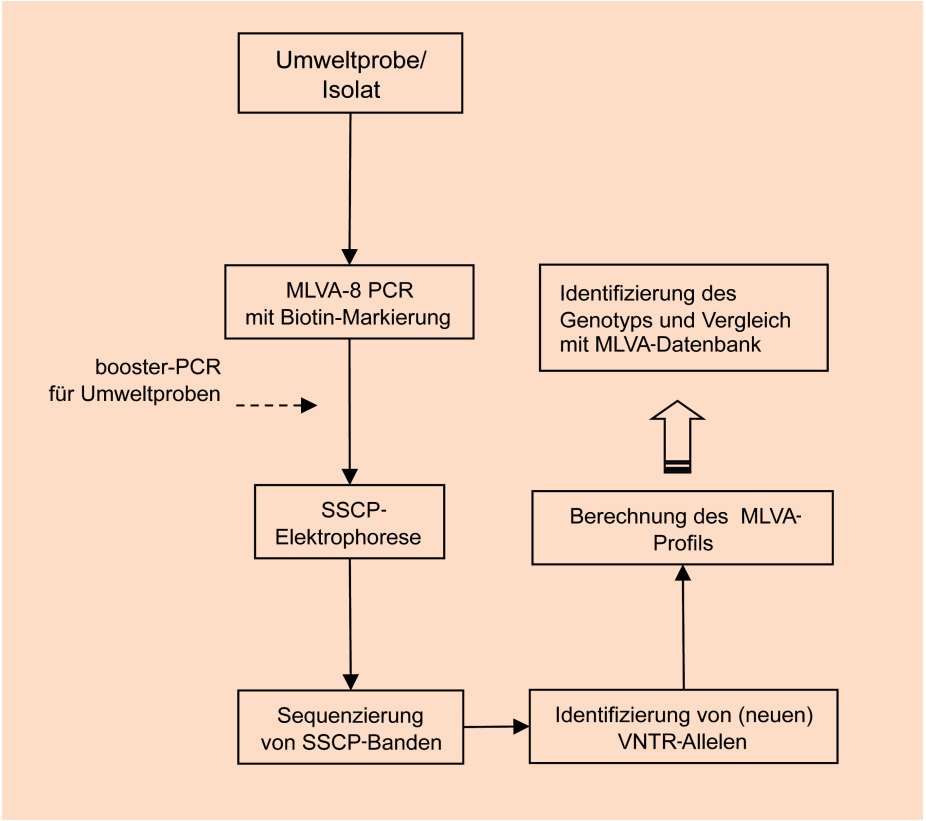


Abb. 3: **Ablaufdiagramm der molekularbiologischen Analyse**

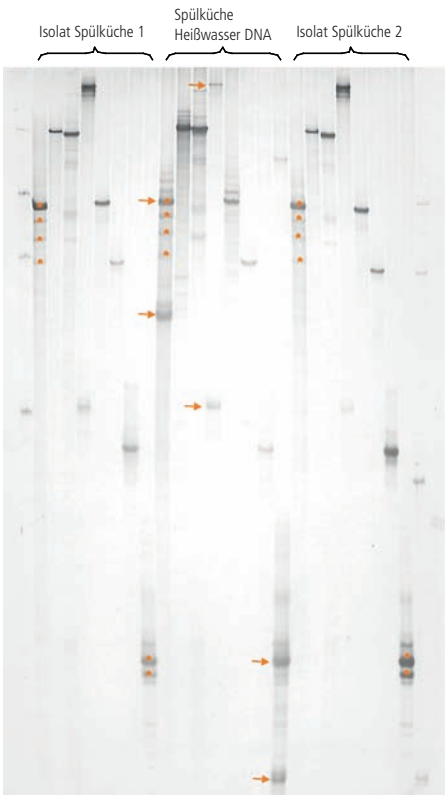


Abb. 4: **Single-strand conformation polymorphism (SSCP)-Gelelektrophorese der einzelsträngigen PCR-Produkte für alle acht VNTR-Loci. Aufgetragen sind zwei *L. pneumophila*-Isolate (SK1, SK2) und die korrespondierende Umweltproben-DNA (Heißwasser, Spülküche). Pfeile markieren die Hauptbanden für die einzelnen VNTR-Loci; Sternchen markieren VNTRs gleicher Sequenz mit verschiedener Wiederholungszahl (entsprechend unterschiedlicher Lauflänge).**

[6] Pourcel, C. u. a. J. Clin. Microbiol. 45, 1190-1199 (2007).
[7] Nederbragt, A.J. u. a. J. Microbiol. Methods 73, 111-117 (2008).
[8] Eichler, S., Weinbauer, M.G., Dominik, D. & Höfle, M. Extraction of total RNA and DNA from bacterioplankton, chapter 1.0.8. Molecular microbial ecology manual 103-120 (2004).
[9] Eichler, S. u. a. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1858–1872 (2006).
[10] Henne, K., Kahlisch, L., Draheim, J., Brettar, I. & Höfle, M.G. Water Science & Technology: Water Supply 8, 527 (2008).
[11] Schmalenberger A., Schwieger, F., & Tebbe, C. C. Appl. Environ. Microbiol 67, 3557-3563 (2001).
[12] Kahlisch, L. Henne, K, Draheim, J., Brettar, I., & Höfle, M. G. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6186-6195 (2010).

Korrespondenzadresse

PD Dr. Manfred G. Höfle
Abt. Vakzinologie u. Angew. Mikrobiologie
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Tel.: +49-(0)531-6181-4234
Fax: +49-(0)531-6181-4699
Manfred.Hoefle@helmholtz-hzi.de

PARTEC

CyFox®

Die kompakte „All in One“-Gelelektrophorese.

Das Real-Time-System für Ihre qualitative Gelanalyse

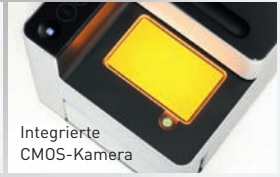


Highlights CyFox®

- entnehmbare Elektrophoresekammer
- „Real Time“ Gel-Observation über Kamera und durch Schutzglasfilter
- LED-Gel-Illumination bei 470 nm (weitere Wellenlängen möglich)
- hochsensitive DNA/RNA Detektion bis unter 1ng mit CySense® Staining Solution
- automatische Datenspeicherung über USB-Port
- integrierte, programmierbare und hochauflösende CMOS-Kamera
- ABS Software für Bildverarbeitung inbegriffen
- große Auswahl an molekular-diagnostischen Kits für: HIV, CMV, Hepatitis, Tuberkulose, Malaria (Weitere Kits sind in der Entwicklung)
- geringe Außenmaße: L x B x H (mm) 210 x 210 x 227; Gewicht 6 kg


Austauschbare LED-Gel-Illumination


Entnehmbare Elektrophorese-kammer


Integrierte CMOS-Kamera

12.10
www.cyclos-design.de
Produktdesign: formfreun.de

Kontakt
Partec GmbH | Am Flugplatz 13 | D-02828 Görlitz | Deutschland
Fon +49 3581 8746-0 | Fax +49 3581 8746-70 | **cyfox@partec.com**

Partec ist in über 100 Ländern weltweit vertreten
Weitere Infos finden Sie auf unserer Website: **www.partec.com**

Erkennung von Neoplasien und invasiven Karzinomen des Gebärmutterhalses

Dr. Alfred Hansel und Prof. Dr. Matthias Dürst, Gynäkologische Molekularbiologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena

Die Methylierung von CpG-Inseln, insbesondere in Promotor-nahen Bereich von Genen, geht häufig mit einer Reduktion der Genexpression einher. Die Tatsache, dass die Modulation einzelner Gene einen wesentlichen Beitrag zur Umprogrammierung in eine Krebszelle leisten kann, hat die Analyse der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit der Tumorentstehung stark forciert[1]. Bei diesen Untersuchungen wurde auch deutlich, dass das Muster der methylierten DNA-Bereiche spezifisch für bestimmte Tumorentitäten sein kann. Dies nährt die Hoffnung, Signaturen tumorspezifischer Marker definieren zu können, die in der Krebsdiagnostik Anwendung finden. In diesem Artikel wird die Vorgehensweise für die Identifizierung einer solchen Methylierungssignatur dargestellt. Diese Methylierungssignatur soll perspektivisch in der Zervixkarzinomvorsorge eingesetzt werden.

Das Zervixkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit, mit jährlich mehr als 530.000 registrierten Neuerkrankungen (Deutschland: 5.470) und 275.000 Todesfällen (D: 1.492)[2]. Das invasive Karzinom geht in der Regel aus Präkanzerosen unterschiedlicher Ausprägung (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN2 und CIN3) hervor. Krebs- und Krebsvorstufen-verdächtige Zellen lassen sich grundsätzlich mit dem von George N. Papanicolou entwickelten, einfachen zytologischen Abstrichverfahren (Pap-Test) erkennen. Seit der Einführung dieser Vorsorgeuntersuchung in Deutschland (1971) ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms kontinuierlich gesunken, bleibt aber mit einer Neuerkrankungsrate von 11 pro 100.000 Frauen zu hoch. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass eine konsequente jährliche Teilnahme an dem Vorsorgeprogramm nur von etwa der Hälfte der sexuell aktiven Frauen wahrgenommen wird. Andererseits belegt eine Reihe von Studien qualitative Mängel bei der zytologischen Krebsvorsorge. Im Rahmen einer Multicenter-Studie mit 60.000 Patientinnen konnte auf Basis eines einmaligen Pap-Tests lediglich die Hälfte aller Krebsvorstufen erkannt werden. Dagegen lag nur jedem fünften auffälligen Pap-Befund auch wirklich eine Krebsvorstufe zugrunde[3]. Auffällige Pap-Befunde haben aufwändige Abklärungsuntersuchungen zur Folge, die aufgrund des schlechten positiven Vorhersagewerts des Pap-Tests in 80% der Fälle eigentlich überflüssig sind.

HPV-Diagnostik

Mit der Entdeckung, dass High-risk (HR)-humane Papillomviren (HPV)-Typen ursächlich an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt sind, war der Startschuss für die molekulare Diagnostik in der gynäkologischen Krebsvorsorge gegeben. Annähernd 100% aller Zervixkarzinome enthalten HR-HPV-DNA. Verschiedene zuverlässige Verfahren für den Nachweis von HPV-DNA sind inzwischen kommerziell verfügbar. Dabei hat ein negatives Testergebnis eine besonders hohe Wertigkeit: Liegt keine Infektion mit den krebsauslösenden HR-HPV-Typen vor, ist eine Krebserkrankung oder Krebsvorstufe praktisch ausgeschlossen[4]. Umgekehrt bedeutet die Infektion mit HPV aber nicht automatisch das Vorliegen oder die Entstehung einer Krebsvorstufe. Tatsächlich heilen die meisten HPV-Infektionen innerhalb von acht Monaten wieder aus. Nur etwa 10% aller Infizierten entwickeln klinisch manifeste Läsionen, die in eine therapiebedürftige Krebsvorstufe übergehen können.

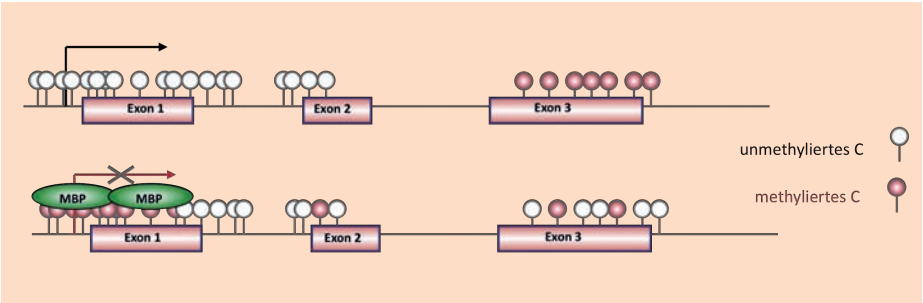


Abb. 1: : DNA-Methylierung im Bereich eines Gens in Normal- (oben) und Tumor-DNA (unten). In Tumor-DNA steht einer globalen Demethylierung meist eine spezifische Methylierung in CpG-Inseln gegenüber, die besonders häufig in Promotorbereichen liegen.

Methylierungssignaturen

Entscheidend für eine vergleichende genomweite Methylierungsanalyse von Normal- und Tumorgewebe ist die Anreicherung der methylierten DNA. Für diese Anreicherung können entweder in rekombinanter Form erhältliche, Methylcytosin-bindende Proteine (Abb. 1) oder aber Antikörper gegen Methylcytosin verwendet werden. Die so angereicherte DNA wird dann in Arrayanalysen eingesetzt. Dazu werden die angereicherten DNAs durch Ultraschall oder DNA-Restriktion in Fragmente von etwa 500 Bp zerkleinert und anschließend mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Normal- und Tumor-DNA werden andersfarbig markiert, beide DNAs gemischt und auf Arrays hybridisiert. In unseren ersten Experimenten haben wir CpG-Island-Arrays der Firma Agilent eingesetzt. Diese enthielten etwa 240.000 Sonden für die etwa 27.000 CpG-Inseln des menschlichen Genoms, darunter auch alle CpG-Inseln in Promotorbereichen von Genen. Inzwischen stehen Arrayträger zur Verfügung, die auf gleicher Fläche Platz für zwei Arrays mit jeweils 400.000 Sondenspots bieten. Für eine Methylierungssignatur geeignete Markerregionen zeichnen sich durch möglichst große Unterschiede in der Signalintensität zwischen der verwendeten Tumor- und Normal-DNA aus.

Mit unseren Array-Analysen konnten wir 272 CpG-Inseln identifizieren, die in Zervixkarzinomen gegenüber zervikalen Zellabstrichen von HPV-positiven, aber histopathologisch unauffälligen Frauen verstärkt methyliert waren.

Methylierungsspezifische PCR

Voraussetzung für eine diagnostisch bedeutende Methylierungssignatur ist die Validierung der in den Array-Analysen identifizierten Kandidatengene. Als geeignetes Verfahren gilt die methylierungsspezifische (MS)-PCR. In isolierter DNA lässt sich die Methylierung durch Bisulfitkonversion „fixieren". Bei dieser chemischen Behandlung werden in der DNA nur Cytosine sulfoniert, die unmethyliert sind. Durch eine anschließende Desaminierung und Desulfonierung werden diese Cytosine zu Uracilen umgesetzt, welche in PCR-Experimenten wie Thymine mit Adeninen paaren und entsprechend komplementiert werden. Sind die Oligonukleotidprimer für die Bindung an die me-

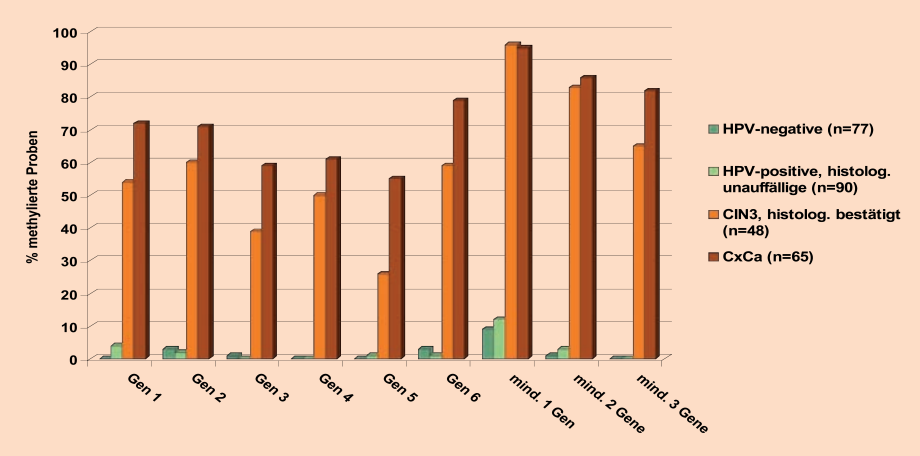


Abb. 2: Methylierung von sechs Markergenen in DNA aus Abstrichproben von HPV-negativen Frauen, HPV-positiven, aber histopathologisch unauffälligen Frauen, Frauen mit CIN3-Läsionen und Frauen mit Zervixkarzinom

thylierten DNA-Regionen nach Bisulfitbehandlung optimiert, können diese Regionen in einer methylierungsspezifischen PCR nachgewiesen werden. Kits für die Bisulfitbehandlung von DNA werden von unterschiedlichen Herstellern angeboten (SIGMA, Zymo-Research, QIAGEN, Epigenomics, Epigentek), sie funktionieren alle nach dem beschriebenen Prinzip. An die chemische Behandlung schließt sich eine Bindung der DNA an eine Säule und die Aufreinigung und Elution der DNA an. Da diese nach Bisulfitbehandlung einzelsträngig und stark fragmentiert vorliegt, ist eine geeignete Bindematrix bei der nachfolgenden Reinigung besonders wichtig. Diese macht sicherlich auch den Hauptunterschied zwischen den verfügbaren Kits aus.

Bei der methylierungsspezifischen PCR wird besonderer Wert auf das Design der PCR-Primer gelegt. Diese sollen nur an tatsächlich in den Primerbinderegionen zuvor methylierte DNA binden, so dass die Amplifikation dieser Regionen die Methylierung in der Probe anzeigt. Wird in einem MethyLight-Verfahren zusätzlich eine fluoreszenzmarkierte Sonde eingesetzt, die ebenfalls methylierbare Cytosine enthält, erhöht dies die Spezifität der PCR. Allerdings werden dann auch möglicherweise nur partiell methylierte DNA-Proben nicht detektiert.

Bis dato konnten wir durch MS-PCR eine Methylierungssignatur, bestehend aus sechs Genen, validieren, die für den Nachweis von Zervixkarzinomen und deren Vorstufen geeignet ist (Abb. 2).

Sofern mindestens eines der Gene methyliert vorliegt, erreicht das Verfahren eine Sensitivität für den Nachweis von CIN3 und Zervixkarzinomen von mehr als 93%. Allerdings sind unter diesen Bedingungen auch 10% der HPV-infizierten Frauen ohne klinischen Befund sowie 8% der nicht-infizierten Frauen positiv.

Kombination von HPV-DNA-Nachweis und Methylierungssignatur

Durch einen negativen HPV-DNA-Test kann das Vorliegen einer Krebsvorstufe oder eines Zervixkarzinoms praktisch ausgeschlossen werden. Es liegt daher nahe, die hervorragende Sensitivität des HPV-Tests mit der Spezifität einer Methylierungssignatur zu verbinden. Bei dieser Vorgehensweise wird zuerst der HPV-Test durchgeführt. Nur bei HPV-positiven Abstrichen wird dann in Form eines Reflextest eine MS-PCR durchgeführt. Mit diesem Algorithmus kann eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von mehr als 99% für CIN3 und Zervixkarzinome in der primären Krebsvorsorge erreicht werden. Dieser vielversprechende Ansatz wird innerhalb des über EXIST-Forschungstransfer geförderten Projekts „onCGnostics“ weiter optimiert.

Literatur

[1] Ballestar E, Esteller M (2008) Epigenetic gene regulation in cancer. Adv. Genet. 61: 247-267.

[2] Robert Koch-Institut (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Robert Koch-Institut, Berlin.

[3] Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. (2006) Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. Int J Cancer119(5):1095-101.

[4] Hoyer H, Scheungraber C, Kühne-Heid R, Teller K, Greinke, Leistritz S, Ludwig B, Dürst M, Schneider A (2005) Cumulative 5-year diagnoses of CIN2, CIN3 or cervical cancer after concurrent high-risk HPV and cytology testing in a primary screening setting. Int J Cancer 116(1):136-143.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Matthias Dürst
Gynäkologische Molekularbiologie
Abt. Frauenheilkunde, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena
Bachstr. 18, 07743 Jena
Tel./ Fax: +49-(0)3641-933720/-934272
Matthias.Duerst@med.uni-jena.de

Still using HAMA blockers???

LowCross-Buffer®
minimises
- HAMA problems
- matrix effects
- cross-reactivities



Reliable results with economical solutions! Bulk available, please contact us for details!

Liquid Plate Sealer®
- for long-term stability
- economically priced
- Made in Germany



Your coated ELISA plates are stable for years.

CANDOR Bioscience GmbH

Improve your assays!
www.candor-bioscience.com

LowCross-Buffer® and Liquid Plate Sealer® are registered trademarks of CANDOR Bioscience GmbH.

miRNA-Epression-Profiling einzelner blutbildender Stammzellen

Ken Livak[1], Véronique Lecault[2], Adam K. White[2] und Oleh I. Petriv[2,3]. [1]Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA USA, [2]Center for High-Throughput Biology, [3]Fakultät für Physik und Astronomie, University of British Columbia, Vancouver, BC Kanada

Einzelzellstudien werden in der Stammzellbiologie immer wichtiger, seit erkannt wurde, dass gerade seltene Zellsubpopulationen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Prozessen wie der Hämatopoese spielen. MicroRNAs werden während der Hämatopoese reguliert. Die Fähigkeit, ihr Expressionsniveau in Einzelzellen untersuchen zu können, ist entscheidend, um zu verstehen, welche Rolle sie für die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen spielen. Selbst gereinigte hämatopoetische Stammzellpopulationen sind heterogen. Werden Daten über die Gesamtheit solcher Zellpopulationen gemittelt, wird es schwierig, die seltenen Zellen zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit zeigt, wie mit Hilfe der Mikrofluidik tausende miniaturisierte microRNA-Expressionsassays an Einzelzellen aus verschiedenen hämatopoetischen Populationen – einschließlich hochreiner Stammzellen – zusammengestellt und durchgeführt werden können. In Einzelzelllysaten werden dazu mehrere miRNAs zugleich mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR untersucht; die erhaltenen Daten sind hinreichend präzise, um die biologische Variabilität der Expressionsstärke zwischen einzelnen Zellen zu erfassen.

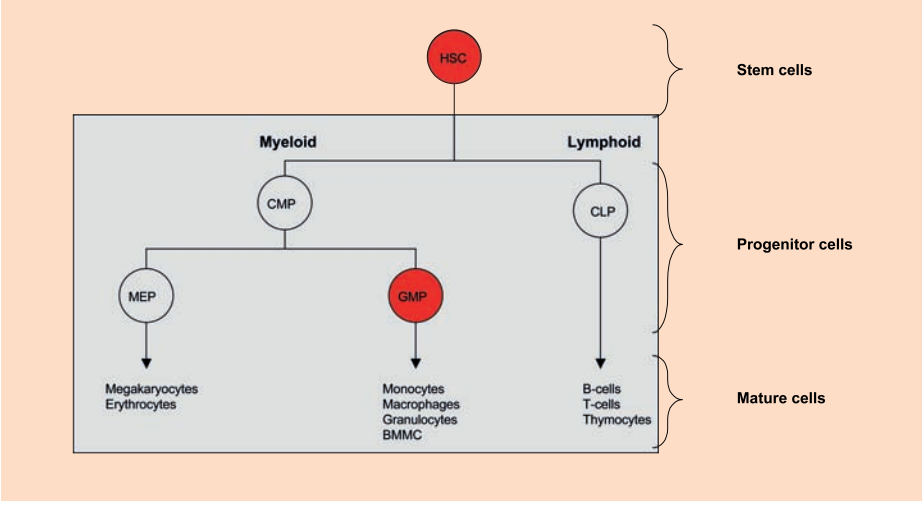


Abb. 1: **Die selbsterneuernden hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) bilden Vorläuferzellen, die in die verschiedenen Blutzelltypen differenzieren. Für die hier beschriebenen miRNA-Expressionsexperimente wurden Einzelzellen aus drei Populationen verwendet. Zwei davon, HSCs und Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (GMPs), sind rot markiert. Die dritte Population besteht aus Knochenmarkvorläufer- und reifen Zellen (Zelltypen in grauer Box).**

Um die Funktion einzelner Zellen zu verstehen, sind neue experimentelle Ansätze gefragt, mit denen kleinste Materialmengen analysiert werden können. Ein ideales Modell für derartige Einzelzellanwendungen ist die Hämatopoese – die kontinuierliche Produktion von Blutzellen durch Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs – Hematopoietic Stem Cells) in reife Blutzelllinien (Abb. 1). HSCs stellen einen kleinen Teil der mehr als 100 Zellarten dar, die im Knochenmark und im Blutkreislauf vorkommen und können daher nicht in Gewebeproben oder großen Zellpools untersucht werden. Zwar kann die Durchflusszytometrie (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) verwendet werden, um verschiedene hämatopoetische Zelltypen anhand der Expression unterschiedlicher Zelloberflächenmarker aufzutrennen. Gleichwohl lassen sich mit den bekannten Stammzellenmarkern bislang nur Populationen begrenzter Reinheit gewinnen; deshalb bleiben auch sorgsam sortierte Populationen heterogen. Durch die Mittelwertbildung der aus solchen Populationen gewonnenen Daten kommt es zu einem beträchtlichen Verlust an Informationen, die gerade für die seltenen Stammzellen spezifisch sind, da deren Signale von denen häufiger auftretender Progenitorzelltypen überdeckt werden. Darüber hinaus können Stammzellenpopulationen Subpopulationen beinhalten, die subtile phänotypische Abweichungen zeigen. Diese können nur durch die Untersuchung von Einzelzellen detektiert werden.

MicroRNAs (miRNAs) regulieren die Expression von Genen während der Entwicklung sowie in zahlreichen biologischen Prozessen. Auch in der Hämatopoese fungieren sie als wichtige Akteure[1]. Die in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu beobachtende, höchst unterschiedliche Expression von miRNAs ist dabei ein Maß dafür, wie stark die die miRNA-Expression selbst kontrolliert ist[2]. Um die Expression von miRNA-Genen in hämatopoetischen Stammzellen genau zu bestimmen, ist ein Einzelzellansatz mit hohem Durchsatz erforderlich. Dabei muss eine statistisch ausreichend große Zahl an Zellen untersucht werden, um zu bestimmen, ob die miRNA-Expressionshöhe in vielen Zellen ähnlich ist oder um Subpopulationen innerhalb einer FACS-sortierten Zellpopulation zu identifizieren. Um ein möglichst vollständiges und nützliches Profil jeder Zelle zu erhalten, empfiehlt es sich zudem, mehrere Gene pro Zelle zu untersuchen.

Die Mikrofluidik ermöglicht es, bekannte Verfahren wie die Real-Time-PCR miniaturisiert durchzuführen, wie es die aus Einzelzellen gewonnenen, limitierten Probenmengen erfordern. Die in den mikrofluidischen Schaltkreisen genau kontrollierten Volumina ermöglichen es, Reaktionen mit multiplen Targets automatisiert in Nanolitervolumina durchzuführen. Das Aufrechterhalten einer hohen Targetkonzentration gewährleistet dabei verbesserte Reaktionseffizienzen, bei gleichzeitiger Minimierung des Reagenzienverbrauchs[3]. Weil die Architektur des Chips eine exakte Kontrolle des Reaktionsvolumens gewährleistet, sind die Assays einerseits hochgradig reproduzierbar; andererseits bieten sie genau die Trennschärfe und Genauigkeit, die erforderlich sind, um auch kleinste Expressionsunterschiede zu erfassen.

Fortschritte in der Mikrofluidik tragen auch zur Verbesserung des Durchsatzes bei der Real-Time-PCR bei. Mit dem 96.96 Dynamic Array Integrated Fluidic Circuit (IFC) von Fluidigm können etwa mit nur 192 Pipettierschritten 9.216 unterschiedliche PCR-Reaktionen auf einem einzelnen Chip zusammengestellt und durchgeführt werden. Im Dynamic Array IFC werden die Targetproben automatisch mit PCR-Primer-Sonden-Sets gemischt. Dies beschleunigt – bei vollständiger Volumenkontrolle – einerseits die Zusammenstellung des Assays; andererseits hilft es, Kreuzkontaminationen infolge multipler Pipettierschritte zu vermeiden.

TOptical real-time PCR Thermocycler

licensed and authorized

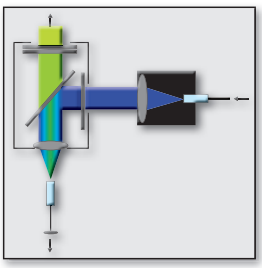
Biometra
An Analytik Jena Company

NEW









TOptical Thermocycler

Premium performance
with maximum flexibility

- Up to 6 exchangeable colour filters
- Patented array of high performance optical fibers
- TProfessional upgrade possible
- MIQE-compliant sample documentation



Now available:
The new Biometra Catalogue 2011/2012

www.biometra.com
+49 551 50686-0 · info@biometra.com

Innovation · Advancement · Development
Quality Products Made in Germany

P.O.S. KRESIN DESIGN GmbH · P1009-001

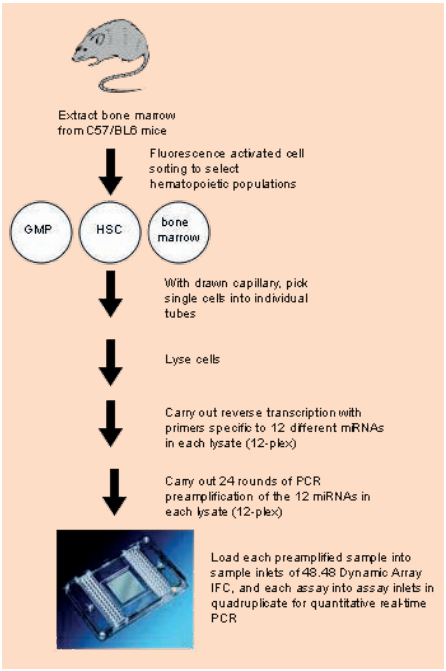


Abb. 2: Versuchsablauf. C57/BL6-Mäusen wurde Knochenmark entnommen und die drei blutbildenden Zellpopulationen auf Basis unterschiedlicher Zelloberflächenmarker sortiert. Aus den Populationen entnommene Einzelzellen wurden lysiert und 12 verschiedene miRNAs revers transkribiert sowie mittels spezifischer Primer in einem Lauf präamplifiziert. Die voramplifizierten Proben wurden mit dem TaqMan-Assay für jedes Gen auf dem Mikrofluidik-Chip gemischt.

Hier berichten wir über die Machbarkeit der Expressionsanalyse multipler miRNAs in Einzelzellen. Der durch die IFCs ermöglichte hohe Durchsatz gestattet es, Standardkurven und Mehrfachkontrollen für jeden Assay in einem einzigen Experiment zu erfassen und qualitativ hochwertige quantitative Daten zu erhalten. In einer unlängst erschienenen Arbeit wurde dieser Ansatz auf verschiedene Populationen einzelner hämatopoetischer Zellen angewandt. Die Reaktionen erwiesen sich als hinreichend genau, um biologische Unterschiede beim Vergleich einzelner Stammzellen zu detektieren[4].

Methoden

Knochenmarkzellen wurden aus C57/B6-Mäusen (Abb. 1) gewonnen und anhand verschiedener Oberflächenmarker, wie in der Literatur beschrieben, mittels Durchflusszytometrie (FACS) sortiert[4]. Aus Zellpopulationen hämatopoetischer Stammzellen ($CD45^+/CD48^-/EPCR^+/CD150^+$), von Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (GMP) ($lin^-/ckit^+/sca\text{-}1^-/CD34^+/FcγR^{high}$) und von Knochenmarkzellen ($CD45^+/CD48^+$) wurden Einzelzellen mit gezogenen Glaskapillaren gepickt und in ein 4,35 µl -Reverse Transkriptase (RT)-Reaktionsgemisch gegeben, bestehend aus: 1x RT-Puffer aus dem High Capacity-cDNA Reverse Transkription Kit (ABI), 12,5 nM pooled Stem-Loop RT-Primer (12-plex, ABI), 1 U/µl RNase-Inhibitor, 0,1% Tween, 0,2 pg/µl Cel-2-Template als „Spike-in"-Kontrolle).

Negativ-No-Template-Kontrollen bestanden aus je 2 Gefäßen mit 1 µl PBS, die zum RT-Reaktionsgemisch hinzugefügt wurden, und je 2 Gefäßen mit 1 µl Zellüberstand jeder Zellpopulation.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit jedes Real-Time-PCR-Assays auf dem Chip wurden 10 gepickte Einzelzellen in 43,5 µl gegeben. Nach Lyse wurden neun Einzelzell-Äquivalente zu je 4,35 µl daraus aliquotiert, die Enzymmischung hinzugefügt und die RT-Reaktion durchgeführt, wie unten beschrieben.

Um eine Standardkurve zu erstellen, gegen die die Ergebnisse aus den Einzelzellexperimenten abgeglichen werden konnten, wurden zunächst eine Probe mit 10^6 hämatopoetischen Zellen/ml lysiert und Dreifachwiederholungen einer Verdünnungsreihe aus je 1000, 100, 10, 1, und 0,1 Zelläquivalenten erstellt. Nach Zugabe der Enzymmischung wurde dann die RT-Reaktion wie unten beschrieben durchgeführt.

Die Zellen wurden durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C im RT-Mix lysiert, dann wurde jedem Gefäß 0,65 µl Enzym-Mastermix zugegeben, um eine Endkonzentration von 5 mM dNTPs, 3,35 U/µl MMLV Reverse Transkriptase, und 0,26 U/µl RNase Inhibitor einzustellen.

Um die RT-Reaktion durchzuführen, wurde ein gepulstes RT-Protokoll eingesetzt, wie nachfolgend beschrieben: 30 Min. bei 16 °C, gefolgt von 60 Zyklen bei 20 °C für 30 Sek., bei 42 °C für 30 Sek., und bei 50 °C für 1 Sek. Zum Beenden der Reaktion erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C, die dazu diente die RT-Enzyme inaktivieren.

Je 20 µl Präamplifikations-Mastermix wurden zu jedem Gefäß hinzugefügt, um eine Konzentration von 1 x TaqMan® Universal Master Mix No AmpErase®, UNG Mix, 0,02X pooled (12-plex) TaqMan Assays (ABI), 4 mM $MgCl_2$, 0,8% Tween, 4 mM dNTPs und 0,25 U/µl AmpliTaq® Gold einzustellen. Die Voramplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 24 Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 4 Minuten.

Nach Präamplifikation wurden die Reaktionen mit 75 µl H_2O auf 100 µl verdünnt. 1,67 ml der Verdünnung wurden zu 5 µl sample loading mix (3,7 µl 2 x Universal Master Mix (ABI), 0,37 µl Fluidigm sample loading reagent, 0,93 µl TE- Puffer) gegeben. Die TaqMan-Assays wurden durch 1:1-Verdünnung mit Fluidigm assay loading reagent erstellt. Je 6 µl jeder Probe wurden in die Proben-Inlets pipettiert, und je 6 µl aus den 12 Assays wurden in Vierfachansätzen in die Assay-Inlets zweier 48.48 Dynamic Array IFCs (Fluidigm) geladen. Die Proben und Assays wurden automatisch on-chip mit Hilfe des BioMark™-Systems (Fluidigm) für insgesamt 4.608 PCR-Reaktionen gemischt.

Die Real-Time-PCR wurde mit dem BioMark-System (Fluidigm) durchgeführt, und die Cycle thresholds (Ct) mit der BioMark-Software kalkuliert. Die Ct-Werte wurden als Heat Map unter Verwendung der BioMark-Software dargestellt.

Ergebnisse

Die reverse Transkription (RT) und die Präamplifikation wurden jeweils als 12-plex-Reaktionen durchgeführt. Aus Kontrollexperimenten war bekannt, dass 12 x der optimale Multiplexlevel ist, um in Einzelzellen häufig auftretende miRNAs zuverlässig zu erkennen[4]. Die voramplifizierten Proben wurden in die Proben-Inlets des 48.48 Dynamic Array IFCs pipettiert, und automatisch auf dem Chip mit 12 Primer- und Sondenansätzen in Vierfach-Wiederholungen gemischt.

Erste Experimente dienten zur Bestätigung der Annahme, dass weniger als ein Zelläquivalent ausreicht, um die miRNA-Expression quantitativ zu bestimmen. Die Zellpools wurden wie beschrieben lysiert und auf 1000, 100, 10, 1 und 0,1 Zelläquivalente für den 12-plex RT-Schritt verdünnt. Dabei ergab sich ein linearer Verlauf des Ct-Wert über die gesamte Verdünnungskurve (Abb. 3), einschließlich ein Zelläquivalent. Assays, bei denen die Einzelzell-Ct-Werte aus dem linearen Bereich herausfielen oder kleiner waren als die Kontrolle ohne Template, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Neun technische Replikate mit äquivalenter Menge an miRNA aus einer Einzelzelle wurden verwendet, um die Reproduzierbarkeit der qPCR-Reaktionen zu überprüfen. Wie in Abbildung 4

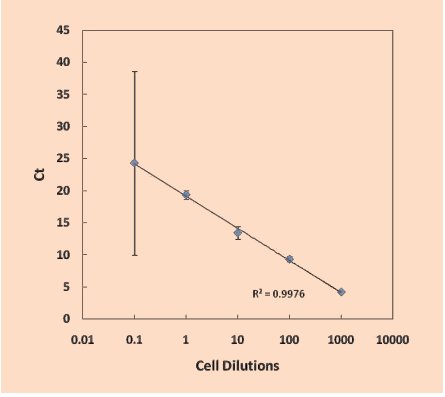


Abb. 3: Nachweis, dass microRNAs von weniger als einem Zelläquivalent der gesamten miRNA der hämatopoetischen Zellen quantifiziert werden können. Nach Multiplex-reverser Transkription sowie -Voramplifikation lieferte der quantitative PCR-Assay für miR-223 eine lineare Beziehung zwischen RNA-Gehalt und Ct-Werten, auch bei weniger als einem Zelläquivalent miRNA.

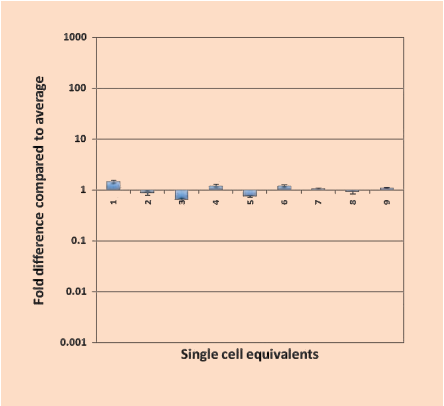


Abb. 4: Hohes Maß an technischer Präzision bei der Bestimmung der Einzelzell-Äquivalente von miRNA. Der qPCR-Assay für miR-223 wurde für neun Aliquots gepoolter HSC-Lysate durchgeführt, von denen jedes dem mi-Äquivalent einer Einzelzelle entsprach. Der Assay wird als gut reproduzierbar angesehen, wenn Einzelzell-Äquivalente erfasst werden.

gezeigt, wurde eine sehr hohe Präzision beobachtet, mit einer Abweichung von weniger als dem 2-fachen des Mittelwertes. Die technische Variation lag bei weniger als einem Ct-Wert für einzelne Zellen[4], was darauf hindeutet, dass die Assays bei einer 100%igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung/Halbierung der Anfangskopienzahl detektieren können.

Im Folgenden wurden je 20 Einzelzellen einer homogenen Population (Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen, GMP), 20 Einzelzellen einer sehr heterogenen (Knochenmark) Zellpopulation, und 20 Zellen einer hochreinen hämatopoetischen Stammzellpopulation (HSC) (vgl. Abb. 1) untersucht. Die Reaktionen wurden als Vierfachwiederholungen durchgeführt und die resultierenden Ct-Werte als Heat map aufgetragen (Abb. 5). Dabei zeigte sich eine große Ähnlichkeit der Ct-Werte für die einzelnen Zellen der homogenen Population, während die Ct-Werte für die Zellen der heterogenen Population weite Schwankungen der miRNA-Expression zeigten. Dies bestätigt, die Fähigkeit des Verfahrens biologische Veränderungen nachweisen zu können, wie in der HSC-Population beobachtet. In jedem einzelnen Fall zeigen die vier Replikatmessungen für jede Zelle eine hohe Genauigkeit.

Diskussion

Hämatopoetische Stammzellen sind essentiell für die Erneuerung von Blutzellenpopulationen. Das Verständnis der Biologie dieser Zellen ist bedeutend für klinische Anwendungen, wie etwa die Behandlung von Krebs und Erkrankungen des Blutes. Mit lediglich 1 von 100.000 hämatopoetischen Zellen sind HSCs relativ selten und müssen demzufolge vor ihrer Untersuchung von der Masse der blutbildenden Zellen abgetrennt werden. Aber auch nach FACS-Aufreinigung sind die Stammzellenpopulationen nicht homogen – verschiedene Stammzellen bringen unterschiedlich differenzierte Linien hervor. Einzelzellstudien bieten daher das Potential vertiefte Einblicke in HSCs zu gewinnen und neue Marker zu identifizieren, mit denen verschiedene Subpopulationen innerhalb der sortierten HSC-Population erfasst werden können.

Da miRNAs in die Regulation der Hämatopoese involviert sind[1], liefert das miRNA-Expression-Profiling von HSCs wertvolle Informationen. Erst unlängst wurde die erste hochauflösende Karte der miRNA-Expression in hämatopoetischen Zellpopulationen veröffentlicht[4]. Bei der Expressions-Analyse von 288 miRNAs in mehr als 20 verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen kam die quantitative Hochdurchsatz-PCR auf dem BioMark™-System zum Einsatz. Das miRNA-Expressionsniveau konnte dabei bestimmten Zelltypen zugeordnet werden – ein Beleg dafür, dass miRNAs dazu beitragen, die Differenzierung dieser Zellpopulationen zu regulieren. Es wurde auch beobachtet, dass einzelne Stammzellen eine größere Variabilität zeigten als einzelne Zellen homogener Populationen wie beispielsweise GMP (Abb. 1).

Die hier präsentierte Arbeit zeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR miRNA-Expressionslevel in Einzelzellen mit einer Sensitivität (vgl. Abb. 3) und Präzision (vgl. Abb. 4) zu erfassen, die das Erkennen biologischer Variationen gestattet (vgl. Abb. 5). Es wurden Bedingungen für die Multiplex-reverse Transkription sowie Präamplifikation entwickelt[4], die es gestatten, die molare Konzentration der Zielsequenzen und die Anzahl an miRNA-Genen zu erhöhen, die in einer Einzelzelle in Nanolitervolumen untersucht werden können.

Neue Techniken zur Untersuchung der Genexpressionen in Einzelzellen werden gebraucht, weil die derzeit verbreiteten Hochdurchsatz-Expressionsstudien mit Microarrays Mikrogrammmengen an Gesamt-RNA benötigen, was einer Menge entspricht, die aus Zehntausenden von Zellen gewonnen wird. Lineare Amplifikation kann die Nukleotid-Mengen um den Faktor 1.000 steigern, ohne die anfangs vorhandenen Mengenverhältnisse zu beeinträchtigen[5]; die benötigte Menge an Ausgangsmaterial wird dadurch zwar verringert, aber dennoch wird immer noch eine große Anzahl an Zellen benötigt.

Die quantitative Echtzeit-PCR quantifiziert RNA-Level wesentlich genauer und kann mit RNA-Mengen durchgeführt werden, die dem Wert einer einzelnen Zelle entsprechen. Gleichwohl erreicht die qPCR bei Nutzung herkömmlicher Technologien nicht den Durchsatz von Microarrays. Selbst wenn mit Hilfe von Robotern durchgeführt, benötigt die PCR im 384 Well-Format Dutzende von Platten, Dutzende 3-stündige PCR-Protokolle und Tausende Pipettierschritte, um den Durchsatz eines typischen Microarray zu erreichen.

Der hier vorgestellte Mikrofluidik-Ansatz erhöht den Durchsatz der quantitativen Echtzeit-PCR und eröffnet damit eine genaue Bestimmung der Expression zahlreicher Gene aus vielen Einzelzellen in einem einzigen Lauf. Die Optimierung der Multiplex-reversen Transkription und die Voramplifikation aus Einzelzellen steigert die Informationsmenge, die aus jeder Zelle erhalten wird. Das Multiplexing kann sich auf die qPCR-Effizienz auswirken. So gestattet die Fähigkeit, eine Standardkurve aus seriellen Verdünnungen zu erstellen und zugleich Einzelzellassays durchzuführen, eine Kalibrierung der Daten sowie eine genaue Berechnung der relativen Veränderungen. Der naturgemäß hohe Durchsatz der Mikrofluidik-Chips ermöglicht durch zahlreiche Kontrollen und Standardkurven, die

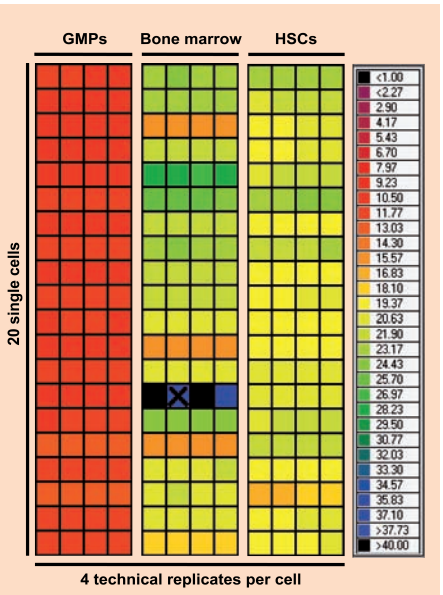


Abb. 5: Detektion biologischer Abweichungen in einzelnen Zellen. Die microRNA miR-223 wurde in 20 Einzelzellen einer homogenen Zellpopulation (GMP), einer heterogenen Zellpopulation (Knochenmark) aus Progenitorzellen und reifen Zellen sowie einer hochreinen HSC-Population quantifiziert. Es wurden vier Replikate jeder Zelle durchgeführt, und die Ct-Werte für jeden Assay auf einem Wärmebild dargestellt. Die Ct-Werte für die GMP-Zellen fallen sehr ähnlich aus. Dies deutet darauf hin, dass die Expressionslevel in diesem homogenen Zelltyp vergleichbar sind. Dagegen variiert die Expression von miR-223 sehr stark unter heterogenen Zellen, wie die verschiedenen Ct-Werte für Knochenmarkzellen belegen. Biologische Abweichungen können in der hochreinen HSC-Population beobachtet werden.

gleichzeitig mit den Einzelzellen erfasst werden, die Erhebung qualitativ und quantitativ hochwertiger Daten.

Die Nanoliter-Reaktionsvolumina der Dynamic Array Mikrofluidik-Chips vermindern den Reagenzienverbrauch um das 100- bis 200-fache, verglichen mit den größeren plattenbasierenden PCR-Reaktionen, und tragen damit zu erheblichen Kosteneinsparungen bei. Da das Reaktionsvolumen durch die Bauweise des Chips vorgegeben ist und die Volumina daher streng kontrolliert werden, ist die Reproduzierbarkeit zwischen den Reaktionen hoch, und sie umfasst auch Einzelzellreaktionen (Abb. 4).

Mikrofluidische Ansätze bieten eine große Flexibilität. Das BioMark™-System ist kompatibel mit PCR-basierten Tests, Probentypen wie mRNA oder miRNA und Nachweisverfahren wie TaqMan-Assays oder anderen DNA-bindenden Farbstoffen. Die Proben und Primer-Sonden-Paare können in jeder Reihenfolge in die Dynamic Array IFC Reaktions-Inlets geladen werden und bieten damit eine praktisch unbegrenzte Anzahl an Möglichkeiten hinsichtlich des Assaydesigns. Die automatische Matrixassemblierung der Proben mit Primer-Sonden-Paaren vereinfacht den Arbeitsablauf deutlich und spart erheblich Zeit, verglichen mit der Zusammenstellung einer ähnlichen Anzahl an Reaktionen in 96-Well- oder 384-Well-Mikrotiterplatten. Mit IFCs werden präzise und quantitative Analysen der miRNA-Genexpression mit vielen Einzelzellen möglich.

Literatur

[1] Chen CZ, Ling L, Lodish HF, and Bartel DP. (2004) MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. Science. (303):83.

[2] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschi T, Sander C and Marks DS. (2004) Human MicroRNA Targets. PLoS Biology. 2(11): e363.

[3] Spurgeon SL, Jones RC, and Ramakrishnan, R. (2008) High Throughput Gene Expression Measurement with Real Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array. PLoS ONE. v.3(2): e1662.

[4] Petriv OI, Kuchenbauer F et al. (2010) Comprehensive microRNA expression profiling of the hematopoietic hierarchy. PNAS USA 107(35): 15443.

[5] Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD and Eberwine JH. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. PNAS USA. 87(5):1663.

Die Autoren bedanken sich bei Dr. Carl Hansen für seine Unterstützung und Beratung im Hinblick auf dieses Projekt. Ein weiterer Dank gilt Dr. Florian Kuchenbauer für das Zurverfügungstellen von primären hämatopoetischen Zellpopulationen.

Korrespondenzadresse

Dr. Ken Livak
Fluidigm Corporation
7000 Shoreline Court, Suite 100
South San Francisco, CA 94080
Tel.: +1-(0)650-266-6000
Fax: +1-(0)650-871-7152
ken.livak@fluidigm.com
www.fluidigm.com

Identifikation neuer epigenetischer Biomarker

Dr. Sriharsa Pradhan, New England Biolabs Inc., Ipswich (MA), USA

Epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung bestimmen maßgeblich darüber, welche Gene in einer Zelle abgelesen werden. Reprimierte Gene liegen dabei meist in methylierter Form vor. Das individuelle Methylierungsmuster einer Säugerzelle entscheidet somit – zusammen mit anderen Prozessen der Genregulation – darüber, wie sich diese differenziert oder ob sie entartet. Die Identifikation entsprechender Marker ist deshalb sowohl für Entwicklungsbiologen als auch klinische Forscher von zunehmendem Interesse. Konzentrierte sich die Forschung bisher vor allem auf die in Säugerzellen von DNA-Methyltransferasen katalysierte Methylierung von Cytosin zu 5'-Methylcytosin (5-mC) innerhalb der häufig auftretenden CpG-Dinukleotide, ist seit dem vergangenen Jahr eine neue Cytosinmodifikation in den Focus getreten[1-2]. 5-Hydroxymethylcystosin (5-hmC) wurde sowohl im Genom undifferenzierter embryonaler Stammzellen als auch in Neuronen identifiziert und wird derzeit als Demethylierungszwischenstufe diskutiert. Bisher genutzte Methoden zur Bestimmung des genomischen Methylierungsstatus können indes nicht zwischen 5-mC- und 5-hmC-Modifikationen differenzieren. Ein neuer Kit von New England Biolabs auf Basis methylierungssensitiver Restriktionsenzyme und anschließender PCR gestattet erstmals die Quantifizierung beider Modifikationen und eröffnet so die Identifikation neuer epigenetischer Biomarker.

Die Epigenetik befasst sich mit der Vererbung von Zelleigenschaften, die nicht an die DNA-Sequenz gebunden sind, sondern über die Zugänglichkeit des Chromatins gesteuert werden. Neben der Modifikation von Histonproteinen ist die DNA-Methylierung eine der häufigsten epigenetischen Modifikationen. In Säugerzellen betrifft sie meist die durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysierte Methylierung des 5'-C-Atoms der Pyrimidinbase Cytosin innerhalb sogenannter CpG-Dinukleotide – Untersuchungen belegen, dass ca. 70% bis 80% der CpG-Dinukleotide methyliert vorliegen.

Die Rolle des 5'-Methylcytosins (5-mC) bei der epigenetischen Vererbung und der Genexpression ist gut erforscht und betrifft bei Säugern eine Vielzahl von Entwicklungs- und Pathogeneseprozessen. So ist sie etwa für die Embryonalentwicklung und das Überleben

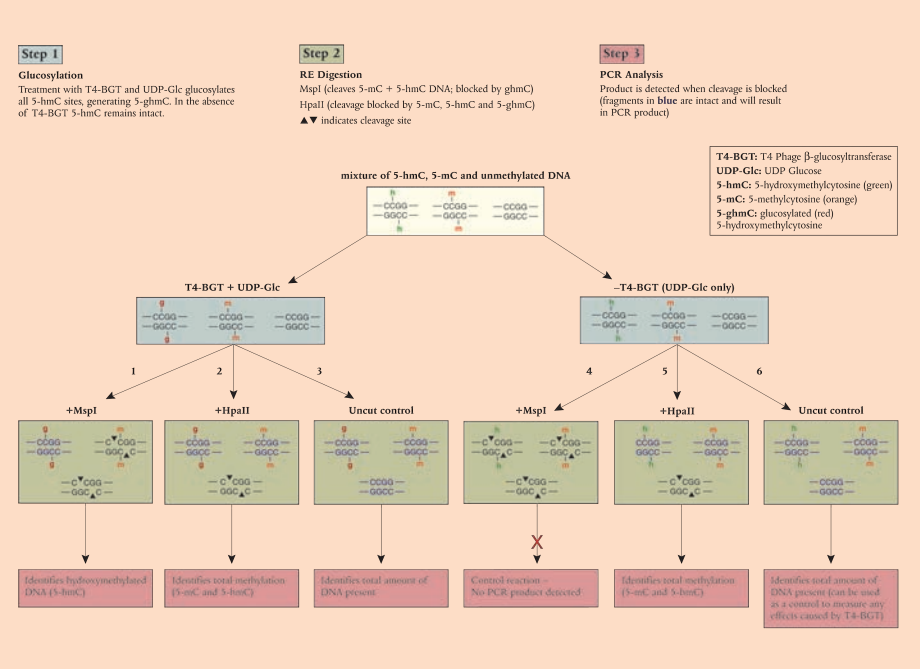


Abb. 1: Analyse der Cytosinmethylierung mit dem Epimark-Kit

Bayern Innovativ

FORUM LIFE SCIENCE 2011

7th International Congress and Exhibition

Forum Life Science



Pharma Development



Food & Nutrition



Industrial Biotechnology

23 – 24 March 2011

Technische Universität München, Garching

Information and registration:
www.bayern-innovativ.de/fls2011

Pictures: Roche, Fotolia/Fritzi Braun

Cluster Initiative Bavaria

Tab. 1: Vergleich gängiger Methoden zur Vorbehandlung genomischer DNA für die Methylierungsanalyse. Derzeitiger Goldstandard ist die Bilsulfit-Behandlung mit nachfolgender DNA-Sequenzierung.

Methode	Beschreibung	Vorteile	Nachteile
Natriumbisulfit-Konversion	Behandlung einzelsträngiger DNA mit Natriumbisulfit führt via Desaminierung nichtmethylierter Cytosinreste zu Uracil (U), während 5-mc unverändert bleiben. Die Us werden in der PCR als Thyminreste, die 5-mC-Reste als Cytosine amplifiziert. Der Sequenzvergleich der bisulfitbehandelten DNA mit einem Referenzgenom liefert Informationen über das 5-mc-Muster in Einzelnukleotidauflösung.	Auflösung auf Nukleotidebene geeignet für 5-mc-enthaltende DNA automatisierte Analyse	benötigt DNA-Mengen im Mikrogrammbereich DNA-Schädigung aufgrund harscher chemischer Reaktionsbedingungen möglich evtl. unvollständige Konversion der DNA keine Unterscheidung zwischen 5-mC und 5-hmC aufwendiges Protokoll
Sequenzspezifischer Restriktionsenzymverdau	Hier gibt der Vergleich von Verdaus mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und ihren methylierungsresistenten Isoschizomeren Auskunft über den Methylierungsstatus. Zudem können die Enzyme zur DNA-Fragmentierung vor Sequenzierungen eingesetzt werden	gut etabliert einfach in der Anwendung gute Verfügbarkeit von rekombinanten Enzymen	Bestimmung des Methylierungsstatus ist durch die Enzymerkennungssequenz beschränkt Über-Nacht-Protokolle geringer Durchsatz
Immunpräzipitation methylierter DNA	Durch Restriktionsenzyme oder Ultraschallbehandlung fragmentierte genomische DNA wird denaturiert und mit Antikörpern spezifisch für 5-mC immunpräzipitiert. Die angereicherten DNA-Fragmente können entweder mittels PCR bei ortsspezifischen Studien oder mittels Microarrays (MeDIP-chip) und Hochdurchsatz-Sequenzierung (MeDIP-seq) bei gesamtgenomischen Studien analysiert werden.	relativ schnell mit Array-basierten Analysen kompatibel für Hochdurchsatz-Sequenzierung geeignet	abhängig von Antikörperspezifität evtl. mehr als ein 5-mC für Antikörperbindung benötigt DNA-Denaturierung notwendig Auflösung abhängig von der Größe der immunpräzipitierten DNA und bei Microarrays abhängig vom Sondendesign Daten von repetitiven Sequenzen evtl. überrepräsentiert
Methyl-DNA-bindende Proteine	Anstelle der antikörpergestützten DNA-Anreicherung verwenden affinitätsbasierte Assays Proteine, die spezifisch methylierte oder nichtmethylierte CpG-Stellen in fragmentierter DNA binden. Die angereicherten DNA-Fragmente können analog zur Immunpräzipotation weiter analysiert werden	gut etabliert Denaturierung nicht nötig mit Array-basierten Analysen kompatibel für Hochdurchsatz-Sequenzierung geeignet	evtl. große DNA-Probenmengen evtl. langes Protokoll Salzelution erforderlich keine Auflösung des Methylierungsstatus für einzelne Basen

differenzierter Zellen essentiell[3-5]. Des weiteren sind zahlreiche Krebserkrankungen mit einer genomweiten Hypomethylierung und einer lokalen Hypermethylierung von CpG-Inseln innerhalb von Promotoren assoziiert[6-7]. Das dies diagnostisch zunehmend von Interesse ist[8-10], belegt die Vermarktung erster epigenetischer Marker, wie etwa des Septin-9-Markers der Berliner EpiGenomics AG zum blutbasierten Nachweis des kolorektalen Karzinoms.

Unlängst wurde eine neue Cytosinmodifikation in Granulären Neuronen, Pukinje-Zellen sowie undifferenzierten, embryonalen Stammzellen identifiziert[1-2, 12]. Zwar liegt die exakte biologische Rolle des 5'-Hydroxymethyl-Cytosins (5-hmC) noch im Dunkeln, doch ist bekannt, das die sogenannten Tet-Proteine (Tet = „Ten Eleven Translocation") die Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5'-Hydroxymethyl-Cytosin katalysieren und dass Mutationen des Tet1- und Tet2-Gen zum Beispiel mit der akuten myeloischen Leukämie assoziiert sind. Weitere Studien, in denen eine reversible, durch DNA-Methyltransferasen katalysierte 5-hmC-Umwandlung in Cytosin nachgewiesen wurde, legen nahe, dass 5-hmC als Intermediat der Demethylierung von 5-mC zu Cytosin im Säugergenom auftritt.

Umfassender Nachweis der Cytosinmethylierung

Weder bisherige Biomarkerstudien, mit dem Ziel krankheitsassoziierte Methylierungsmuster zu identifizieren, noch Genexpressionsstudien haben die Existenz der neuen Cytosinmodifikation bislang berücksichtigt. Denn keine der etablierten Techniken zum Nachweis der DNA-Methylierung (vgl. Tab. 1) ist imstande, 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin zu unterscheiden.

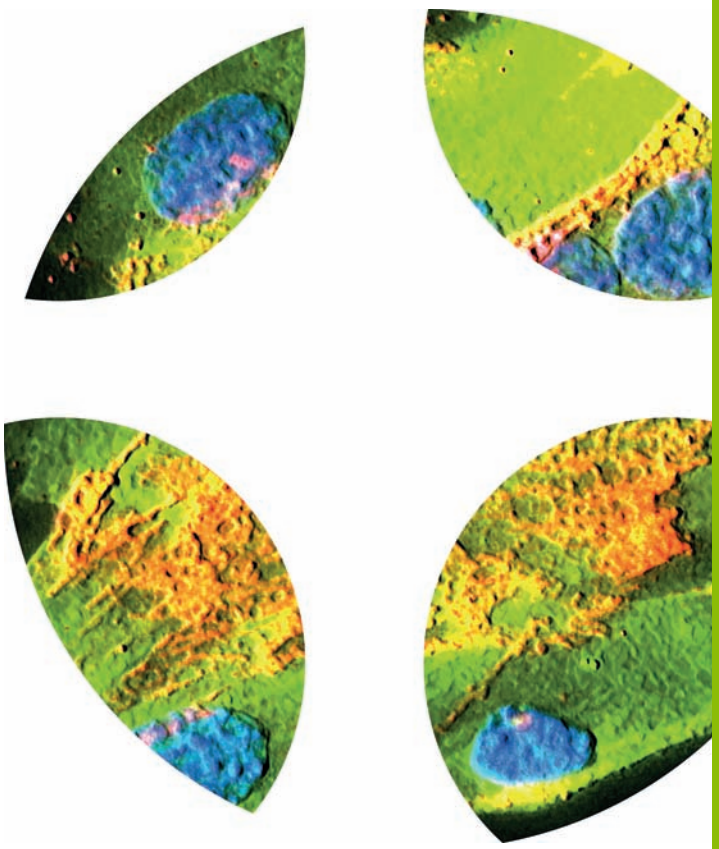
Um Untersuchungen zur biologischen Rolle des 5-Hydroxymethylcytosins voranzubringen, hat New England Biolabs ein robustes Verfahren entwickelt, das hilft, 5-mC und 5-hmC verlässlich zu unterscheiden. Der Epimark™-5-hmC- & 5-mC-Kit macht sich dabei die Tatsache zunutze, dass das Enzym T4-β-Glucotransferase vorhandenes 5-Hydroxymethylcytosin, nicht aber 5-Methylcytosin in Anwesenheit von UDP-Glucose zu 5'-Glucosylmethyl-Cytosin (5'-ghmC) glucosyliert[12] und dass methylierungssensitive Enzyme zwischen glucosylierten und nicht-glucosylierten methylierten Cytosinen sicher unterscheiden können. Die nach Locus-spezifischer PCR in einem Gel aufgetrennten DNA-Fragmente geben also Aufschluss über die Art (5-mC oder 5-hmC) und relative Häufigkeit der Methylierung.

Arbeitsablauf

Um zu bestimmen, ob ein bestimmter DNA-Locus 5-mC- oder 5-hmC-modifiziert ist, wird die genomische DNA zunächst mit dem Enzym β-Glucosyltransferase aus dem Bakteriophagen T4[12] behandelt, wobei 5-hmC selektiv zu 5-ghmC glucosyliert wird (vgl. Abb. 1, S. 22). Eine Kontrollreaktion ohne das Enzym belässt alle 5-hmC-Modifikationen so wie zuvor.

Zur Differenzierung zwischen 5-ghmC und den unmodifiziert gebliebenen 5-mC werden beide Ansätze mit dem Restriktionsenzym Msp I behandelt. Msp I schneidet die nichtglucosylierten 5-mC und 5-hmC, nicht aber 5-ghmC. Ein weiterer Verdau der mit T4-β-Glucosyltransferase behandelten DNA mit dem Restriktionsenzym Hpa II eröffnet die Bestimmung des prozentualen Anteils der Gesamtmethylierung (also von 5-mC, 5-hmC und 5-ghmC), da das Enzym weder glukosylierte noch methylierte DNA schneiden kann. Eine Kontrolle mit T4-β-Glucosyltransferase-behandelter, aber nichtverdauter DNA liefert den Gesamtgehalt der interessierenden DNA. Nach der enzymatischen Spaltung bzw. Kontrolle kann eine qPCR mit Primern durch-

www.laborwelt.de



6th International Meeting

Stem Cell Network North Rhine-Westphalia

April 5–6, 2011
Essen, Germany

- sessions in disease modeling, non-human primate pluripotent stem cells, transdifferentiation and hypoxia & metabolism
- keynote by John Dick (Toronto)
- lectures by Thomas Graf, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Erika Matunis, Andreas Trumpp and many more
- poster session
- company exhibition
- satellite symposium on bioinformatics

Congress attendance is free of charge.

Please register at:
www.congress.stemcells.nrw.de

Ministry of Innovation, Science and Research of the German State of North Rhine-Westphalia

Stem Cell Network North Rhine Westphalia

geführt werden, die in den flankierenden Regionen des interessierenden DNA-Locus binden, um die Menge an 5-hmC und 5-mC am betreffenden Genort zu quantifizieren.

Die Amplifikation ist dabei abhängig vom Ausmaß des Msp I- und Hpa II-Verdaus (geschnitten = kein PCR-Produkt, vor Verdau geschützt = PCR-Produkt) und liefert daher eine direkte Korrelation zu den Mengen von 5-hmC sowie 5-mC plus 5-hmC. Wir haben diese Methode zunächst validiert, indem wir synthetische DNA mit verschiedenen Verhältnissen der diversen Cytosinmodifikationen getestet haben.

Ergebnisse

Um nachzuweisen, dass die hier beschriebene Methode zuverlässig Unterschiede in einer Population differentiell methylierter DNA-Moleküle detektiert, wurden Mischungen *in vitro* synthetisierter Oligonukleotide präpariert, die bekannte Gehalte unmethylierter Cytosinreste, von 5-mC und 5-hmC enthielten. Mischung Nr. 1 enthielt 20% Cytosin (C), 60% 5-Methylcytosin und 20% 5-Hydroxymethylcytosin, Mischung Nr. 2. 20% C, 50% 5-mC und 30% 5-hmC.

Beide Ansätze wurden wie beschrieben mit β-GT und nachfolgend mit den Enzymen Msp I oder Hpa II behandelt. Unverdaute DNA diente als Positivkontrolle der Amplifikation, mit Msp I verdaute, nicht-glucosylierte DNA als Negativkontrolle. qPCR der synthetischen Mischungen lieferte Resultate, die mit den Anteilen in den Mischungen übereinstimmten (Tab. 2).

In weiteren Experimenten wurde der Kit eingesetzt, um die differentielle DNA-Methylierung eines DNA-Abschnittes in verschiedenen Geweben von BALB/C-Mäusen nachzuweisen. Dabei konnte mittels qPCR ein differentielles Auftreten von 5-mC und 5-hmC in den unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (Abb. 2).

Mit dem Epimark-Kit steht damit die erste Methode zur Verfügung, die eine verlässliche Bestimmung von 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin gestattet.

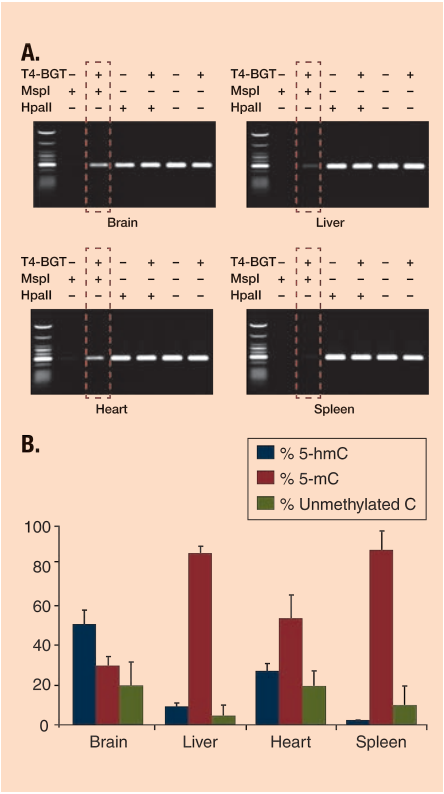


Abb. 2: A.) EpiMark-Analyse zur Untersuchung der DNA-Methylierung (PCR-Analyse) eines Gens an gDNA-Proben aus vier verschiedenen Gewebearten eines Individuums (hier Locus 12 einer BALB/C-Maus): sechs PCR-Reaktionen wurden für eine eindeutige Methylierungsanalyse benötigt. Das gestrichelte rote Kästchen verdeutlicht das Auftreten von 5-hmC in den jeweiligen Gewebearten.
B.) Mittels qPCR wurde die Menge an 5-hmC und 5-mC in den DNA-Proben aus unterschiedlichen Gewebearten bestimmt. Die Daten belegen eine gewebespezifische Verteilung von 5-hmC und 5-mC.

Tab. 2: Analse definierter Mischungen in vitro synthetisierter Nukleotide mit dem EpiMark 5-hmC and 5-mC Analysis Kit.

Modifikation	Mischung 1		Mischung 2	
	erwartet	bestimmt	erwartet	bestimmt
5- hmC	20%	26±8	30%	34±2
5-mC	60%	59±8	50%	49±11
C	20%	13±9	20%	17±11

Schlussfolgerung

Die Quantifizierung DNA-Locus-spezifischer epigenetischer Modifikationen im Säugergenom ist erforderlich, um epigenetische Veränderungen im Zuge von Entwicklungsvorgängen und der Entstehung von Krankheiten besser zu verstehen. Der hier vorgestellte Epimark™-5-hmC- & 5-mC-Kit von New England Biolabs bietet eine einfache, robuste und reproduzierbare Detektionsplattform zur Untersuchung des Locus-spezifischen Methylierungsstatus einer DNA-Population. Er bietet darüber hinaus erstmals die Möglichkeit, 5-hmC in genomischer DNA zu detektieren und zu quantifizieren und damit die Option, die Rolle der 5-Hydroxymethylierung als potentiellem Biomarker zu überprüfen. Wird der qPCR-Schritt durch eine Endpunkt-PCR ersetzt, können einfache Ja/Nein-Aussagen erhalten werden, ob an einem bestimmten Locus 5-hmC-Modifikationen vorhanden sind. Mittels Multiplexing können so mit Standard-Thermocyclern mehrere Amplicons zugleich untersucht werden.

Die Epimark-Methode mit nachfolgender PCR wird derzeit eingesetzt, um biologisch relevante Unterschiede der Hydroxymethylierung in Säuger-DNA während verschiedener Entwicklungsstadien zu untersuchen. Erste Daten belegen dabei das Auftreten unterschiedlicher 5-hmC-Mengen in der genomischen DNA von Herz-, Leber- und Hirngewebeproben aus Maus und Mensch. Der neue Kit ermöglicht damit eine verfeinerte Untersuchung der zeitlichen Orchestrierung epigenetischer Modifikationen im Zuge von Entwicklungs- und Pathogenese-Prozessen und kann dabei helfen, die derzeit entstehenden epigenetischen Karten zu optimieren.

Literatur

[1] Kriaucionis, S. and Heintz, N. (2009) Science, 324, 929-930.
[2] Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., et al. (2009) Science, 324, 930-935.
[3] Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Cell, 69, 915-926.
[4] Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) Cell, 99, 247–257.
[5] Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., et al. (2001) Nat. Genet. 27, 31-39.
[6] Kim, J.K., Samaranayake, M. and Pradhan S. (2009) Cell. Mol. Life Sci. 66, 596-612.
[7] Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2002) Nat. Rev. Genet. 3, 415-28.
[8] Qureshi, S.A., Bashir, M.U. and Yaqinuddin, A. (2010) Int. J. Surg. 8, 194-198.
[9] Kim, M.S., Lee, J. and Sidransky, D. (2010) Cancer Metastasis Rev. 29, 181-206.
[10] Despierre, E., Lambrechts, D., Neven, P., Amant, F., Lambrechts, S. and Vergote, I. (2010) Gynecol. Oncol. 117, 358-365.
[11] Martens, J.W., Margossian, A.L., Schmitt, M., Foekens, J. and Harbeck, N. (2009) Future Oncol. 5, 1245-1256.
[12] Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C.S., Spada, F. and Leonhardt, H. (2010) Nucl Acids Res. doi:10.1093/nar/gkq684.

Korrespondenzadresse

New England Biolabs GmbH
Brüningstr. 50
65926 Frankfurt am Main
Tel: +49-(0)69-305-23140
Fax: +49-(0)69-305-23149
info@de.neb.com
www.neb-online.de

ScieCon – Dein Job-Enzym!



Biowissenschaften | Chemie | Pharmazie | Medizin

Firmenkontaktmesse

Viele Firmen – Ein Weg – Dein Job

ScieCon München 2011
Klinikum Großhadern
2. Februar 2011, 10-17 Uhr

ScieCon
München 2011

Mit freundlicher Unterstützung von:

BioM Biotech Cluster Development | Roche | MERCK | IDT | sanofi aventis – Das Wichtigste ist die Gesundheit | SÜD-CHEMIE – CREATING PERFORMANCE TECHNOLOGY | headway pharma

www.ScieCon.info

Real-Time quantitative rapidPCR: Ultraschnelle Echtzeitanalyse

Melanie Trenkmann, Melanie Jahn, Stefan Winter, Alexander Berka, Analytik Jena AG, Business Unit 'Life Science'

Die Real-Time PCR als etablierte Standardmethode hält immer mehr Einzug in Dienstleistungslaboren, Forschungsinstituten und molekularbiologisch orientierten Einrichtungen. Besonders relevant sind dabei sowohl der Zeit- als auch der Kostenfaktor. Die Real-Time quantitative rapidPCR, die hier an verschiedenen Anwendungsbeispielen näher erläutert wird, bietet ein unschlagbares Werkzeug. In weniger als 25 Minuten können ganze qPCR-Läufe inklusive applikationsspezifischer Auswertung abgeschlossen werden. Zudem sind Probenvolumina ab 5 µl im Hinblick auf die oft kostenintensive Real-Time-Chemie ein starkes Argument für diese neuartige Technologie.

Die fluoreszenzbasierende Real-Time-PCR ist ein wichtiges Werkzeug in der Wissenschaft, der molekularen Medizin und Pharmakologie sowie der Biotechnologie. Die unterschiedlichen Verfahren sind einfach durchzuführen und erlauben im Allgemeinen einen hohen Pro bendurchsatz[1]. Zusätzlich kombiniert die Real-Time PCR eine hohe Sensitivität mit einer verlässlichen Spezifität, die durch das Format der einzigartigen rapidPCR-Technologie weiter gesteigert werden kann. Standardisierte Assays und konventionelle Auswertealgorithmen machen die qPCR zu einer der empfindlichsten Nachweismethoden für Nukleinsäuren.

Die schnelle Echtzeit-Erfassung und direkte Auswertung der aufgenommen Plots machen aufwendige Datenanalysen nahezu überflüssig, wodurch die Reduktion des Reaktionsansatzes besonders interessant wird. Gerade die oftmals kostenintensiven Real-Time-Kits, aber auch Sonden oder interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe werfen die Frage nach neuen Systemen mit der Möglichkeit auf, die notwendigen Volumina zu senken.

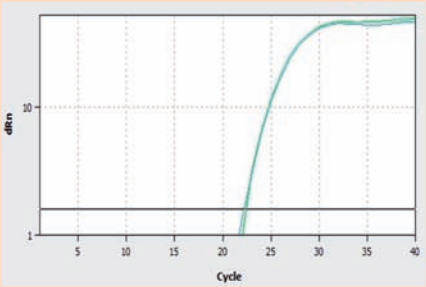
Der qTOWER (Abb. 1) erreicht dies durch die Kombination eines rapid-Thermoblockes im Low-Profile-Format und einer ultradünnen 96 Well-Mikroplatte. Das Gesamtsystem bietet so eine enorme Geschwindigkeit mit Laufzeiten von weniger als 25 Minuten, bei gleichzeitiger Nutzung von minimal 5 µl- und maximal 20 µl-Reaktionsansätzen.



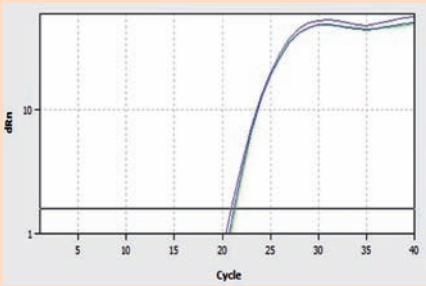
Abb. 1: **Der qTOWER – Die Lösung für Real-Time quantitative rapidPCR**

Real-Time rapidPCR und Standard-qPCR im Vergleich

Aus den Blättern der Tabakpflanze *Nicotiana attenuata* wurde zunächst die RNA mittels innuSPEED Plant RNA Kit (Analytik Jena) extrahiert. Anschließend wurde die pflanzliche RNA unter Verwendung der innuSCRIPT Reverse Transcriptase (Analytik Jena) und oligo (dT) Primer in cDNA umgeschrieben. Während der sich anschließenden Real-Time PCR eines *N. attenuata*-Aktin-Gens[2] wurde der Fluoreszenzanstieg eines interkalierenden Farbstoffes über 40 Zyklen detektiert. In Abbildung 2 sind die Amplifikationsplots der Standard- und rapid-qPCR mit zugehörigem Temperatur-/Zeitprofil vergleichend dargestellt. Die Gesamtlaufzeit des Experimentes inklusive Auswertung konnte mittels qTOWER um mehr als 50% gesenkt werden. Die ermittelten Ct-Werte zeigen eine vergleichbare Sensitivität beider Methoden.



A: Real-Time rapidPCR-Plots mit 60 s initialer Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 2 s bei 95°C, 2 s bei 57°C und 20 s bei 72°C. Gesamtdauer: ca. 35 Minuten



B: Real-Time PCR-Plots mit 120 s initialer Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C, 15 s bei 57°C und 30 s bei 72°C. Gesamtdauer: ca. 75 Minuten

Probennummer	Ct-Werte Real-Time rapidPCR	Ct-Werte Real-Time standard PCR
1	23,96	23,23
2	24,01	23,09
3	24,34	23,19

Abb. 2: **Der Vergleich zwischen Real-Time rapidPCR (qTOWER) und der Real-Time Standard-PCR (TOptical) zeigt eine vergleichbare Sensitivität beider Methoden bei einer gleichzeitigen Reduktion der Gesamtlaufzeit um mehr als 50%.**

Unterschiedliche Reaktionsansätze

In einer weiteren Real-Time-Amplifkation des *N. attenuata* Aktin-Gens wurden die eingesetzten Reaktionsvolumina variiert. Es erfolgte eine Vierfach-Bestimmung in Ansätzen von je 5 µl, 10 µl und 15 µl. Wiederum wurden die Ct-Werte der Proben bestimmt und in Abbildung 3 gegenübergestellt. Alle Werte weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf und sind unabhängig vom eingesetzten Probenvolumen.

Der qTOWER ist in puncto Geschwindigkeit und Kostenersparnis ein leistungsstarker Thermocycler für quantitative Echtzeitamplifikationen. Neben interkalierenden Farbstoffen sind ebenso sequenzspezifische Hydrolyse-, aber auch Hybridisierungssonden einsetz-

bar. Auf anspruchsvolle Multiplex-Analysen reagiert das Gerätesystem flexibel mit bis zu vier Positionen für unterschiedliche Farb- oder FRET-Module. Weiterhin sind neben der Einstellung der qPCR-Bedingungen auch direkte Auswertealgorithmen in der umfangreichen Kontroll- und Analysensoftware qPCRsoft verfügbar. Die Real-Time rapidPCR unter Verwendung des qTOWER ist dadurch ein Allrounder auf dem Gebiet der quantitativen Nukleinsäureanalyse.

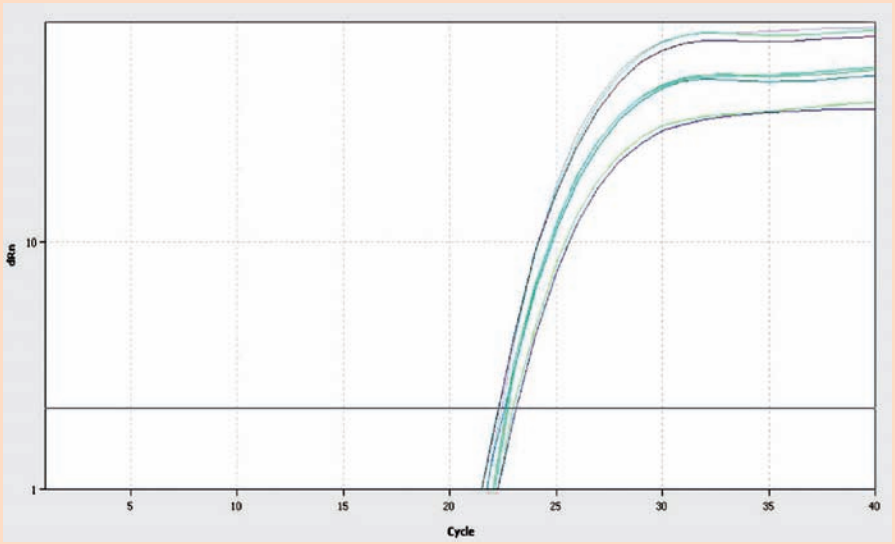
Literatur

[1] http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biuz.200610332/abstract;jsessionid=880BC4D0D21E1EF4852BE37EC1AB5D50.d02t02 [06.10.2010]

[2] Wu, J., Wang, L. and Baldwin, I.T. (2008). Planta 227: 1161-1168.

Korrespondenzadresse

Melanie Trenkmann
Analytik Jena AG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena
Tel.: +49-(0)3641-779461
Fax: +49-(0)3641-77-767776
m.trenkmann@analytik-jena.de
www.bio.analytik-jena.de
lifescience@analytik-jena.de



Probe	5 µl - Ansatz	10 µl - Ansatz	15 µl - Ansatz
1	23.25	23.04	22.45
2	23.44	23.04	22.73
3	23.34	22.96	22.63
4	23.33	23.02	22.62

Abb. 3: Der qTOWER erlaubt ultra-schnelle Real-Time PCR-Amplifikationen bei gleichzeitiger Reduktion der Reaktionsvolumina. Bei der durchgeführten Vierfachbestimmung in je 5 µl-, 10 µl- und 15 µl-Ansätzen konnten vergleichbare Ct-Werte ermittelt werden.

MILLIPORE



ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER®
Forschung. Entwicklung. Produktion.

Lernen Sie den neuen Mobius CellReady™ 3L-Einweg-Bioreaktor mit Rührtank kennen.

Keine Reinigung, keine Beutel, kein Warten. Der neue CellReady 3L-Bioreaktor ist mit den meisten Steuersystemen kompatibel und kann daher schnell und ohne zusätzliche Betriebsmittelausgaben installiert werden. Sie sparen wertvolle Zeit und können sich ganz auf Ihre Forschung konzentrieren.

Legen Sie den Abwasch beiseite und rüsten Sie auf CellReady um!

Weitere Informationen erhalten Sie im Internet unter **www.millipore.com/cellready** oder per E-Mail von **virginie_isner@millipore.com**



MOBIUS® by MILLIPORE

Millipore, Advancing Life Science Together und Mobius sind eingetragene Marken der Millipore Corporation. CellReady und das M-Logo sind Marken der Millipore Corporation.

Qualität und Richtigkeit von qPCR-Ergebnissen steigern

PD Dr. Michael W. Pfaffl, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan

Die Anwendung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) oder die Kombination der qPCR mit der reversen Transkription (RT) ist zu einem Routinewerkzeug in der modernen molekularbiologischen Forschung und molekularen Diagnostik geworden. Das Expression Profiling biologischer Proben auf mRNA- und microRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR) ist von großem Nutzen und liefert wichtige Ergebnisse in zahlreichen biologischen Disziplinen. Vor allem in der Routinediagnostik, der universitären und industriellen Forschung sowie in der funktionellen Genomforschung ist sie unverzichtbar.

Dennoch gilt es, der selbst in Fachmedien oft als „einfach und reproduzierbar" bezeichneten qPCR-Methodik weiter kritisch gegenüberstehen und weiter an der Richtigkeit der erzeugten quantitativen Ergebnisse zu arbeiten. Dazu gehört es, den gesamten qPCR-Arbeitsablauf – von der Probennahme bis zur statistischen Auswertung der Ergebnisse – gründlich zu hinterfragen und die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. In der aktuellen publizierten Literatur mangelt es oft an Informationen hinsichtlich der experimentellen Details darüber, welche Reagenzien in welcher Konzentration eingesetzt und wie die signifikanten Expressionsunterschiede berechnet wurden. In vielen Publikationen hochrenommierter Journale fehlen essentielle Informationen, die es erlauben, die wissenschaftliche Qualität der dargestellten Resultate kritisch zu bewerten oder das Experiment im eigenen Labor zu wiederholen. Deshalb wurden im vergangenen Jahr von einem kleinen Kreis an Wissenschaftlern die MIQE-Richtlinien[1] ins Leben gerufen – The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Diese zielen darauf ab, die Richtigkeit der gewonnenen Resultate zu verbessern und die Vollständigkeit der publizierten wissenschaftlichen Literatur sicherzustellen, um experimentelle Transparenz herzustellen und die Interlabor-Reproduzierbarkeit zu fördern.

Die MIQE Guidelines stellen einen Richtliniensatz dar – gruppiert in neun Überschriften mit 85 Unterpunkten –, der das Minimum an essentiellen Informationen zu qPCR-Experimenten beschreibt, die in Publikationen beschrieben werden müssen (Abb. 1), damit sie für den Leser verständlich, transparent und vollständig nachvollziehbar sind. Des Weiteren fordern die Autoren, dass alle relevanten experimentellen Bedingungen – wie etwa die Probeneigenschaften, die exakte Beschreibung der verwendeten Chemikalien und Kits, sämtliche Sequenzen für Primer und Sonden – offengelegt und zur Verfügung gestellt werden, sodass die Leser die Richtigkeit der verwendeten Protokolle beurteilen können. Dies schafft Vertrauen in veröffentlichte Daten, und gegebenenfalls können die gewonnenen Ergebnisse reproduziert und bestätigt werden.

Insgesamt sollen die MIQE-Richtlinien eine bessere experimentelle Praxis sowie vollständigere Publikation der Methoden anregen, um in Zukunft eine zuverlässigere und unmissverständlichere Deutung der qPCR-Resultate zu ermöglichen. Die MIQE-Datensätze sollten der Leserschaft entweder als Kurzform in der Publikation oder als online-Supplement zur Verfügung gestellt werden. Dadurch sollen die Qualität der Experimente und die richtige biologische Deutung der Ergebnisse möglich sowie fehlerhafte biologische Schlussfolgerungen infolge mangelhafter qPCR-Ergebnisse verhindert werden.

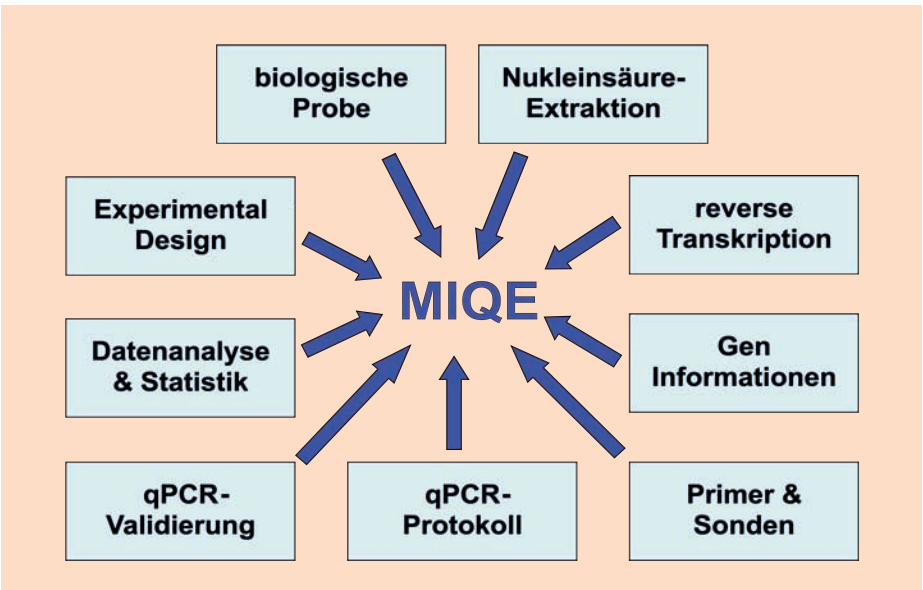


Abb. 1: Hauptüberschriften der MIQE-Richtlinien

Die größten Fehlerquellen der qPCR

Betrachtet man den Arbeitsablauf der qPCR , von der Probennahme bis hin zur statistischen Auswertung der Ergebnisse, so fällt auf, dass vor allem in den Prä-und Post-qPCR-Arbeitsschritten häufig Fehler auftreten. Dies kann einerseits im experimentellen Design des Versuchs begründet sein oder in den ersten Arbeitsschritten, die zur Degradierung der biologischen Proben und Nukleinsäure führen[2]. Im Post-PCR-Bereich fällt oft die mangelnde oder fehlerhafte Datenauswahl bei der Normalisierung auf, was zu einer signifikanten Verschiebung der Expressionslevel und somit zu unrichtigen Quantifizierung führen kann[3]. Weitere Fehler, die in der Praxis auftreten, sind im Folgenden exemplarisch genannt.

Inadäquate Probennahme: Der Zeitraum zwischen der Beprobung und der Fixierung der DNA oder RNA in stabilisierender Lösung ist zu lang. In der Folge kommt es zur Degradierung niedrig exprimierter Nukleinsäuren und zur Verschiebung des gesamten Expressionsmusters.

Lagerung: Die Lagerung der biologischen Probe oder der extrahierten RNA in falschem Puffer (Stabilisator) sowie bei falscher Temperatur haben signifikanten Einfluss auf die quantitativen Ergebnisse.

Nukleinsäureextraktion: Die Reproduzierbarkeit der Extraktion bestimmter Nukleinsäurefraktionen (total-RNA, mRNA, microRNA, small RNAs oder genomische DNA) stellt immer noch ein zentrales Problem dar. Wird die extrahierte Nukleinsäurekonzentrationen aus identischen Mengen an zu untersuchendem Gewebestücken verglichen, kommt es oft zu bemerkenswerten Unterschieden. Weshalb? Vielleicht sollte man doch noch einmal am Protokoll, an der Beprobungsmethode und an der Wiederholbarkeit der Methode zweifeln oder sich Gedanken über die Gewebezusammensetzung der biologischen Probe machen! Komplexe und heterogen zusammengesetzte biologische

Proben ergeben heterogene quantitative Nukleinsäurekonzentrationen.

Degradierung der RNA: Was bedeutet der RIN- oder RQI-Wert, und welchen Effekt hat er auf die Ergebnisse? Das sollte jedem Wissenschaftler bewusst sein, der quantitative Expressionsstudien durchführt[4-5].

Reverse Transkription (RT): In der Literatur wurde wiederholt gezeigt[6-7], dass der RT-Schritt eine immense Varianz birgt, die es zu vermeiden gilt. Leider glauben die meisten Wissenschaftler heute immer noch, dass die RT-Effizienz nahezu 100% beträgt. Weit gefehlt! Die Effizienzen und Varianzen sind enzymabhängig und von Gewebe zu Gewebe sowie von mRNA zu mRNA unterschiedlich. Hier hilft nur Optimierung der reversen Transkription und technische Replikate auf RT-Ebene[2].

Primer und Sonden: Die Wahl der Primer- und Sondensequenzen haben einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionseffizienz und entscheiden über Erfolg oder Misserfolg sowie über die Robustheit des verwendeten Assays in unterschiedlichen Geweben[1]. Deshalb ist es wichtig, über die PCR-Effizienz und über die Wiederholbarkeit bei verschiedenen Expressionsniveaus Bescheid zu wissen[8-9].

Datenauswertung: Seit nunmehr acht Jahren gibt es das Schlüsselpaper von Vandesompele et al.[10], und noch immer liest man in hochrangigen Journalen, dass die Referenzgene anhand anderer Publikationen ausgewählt wurden und nicht hinsichtlich ihrer Eignung als unregulierte Referenzgene überprüft wurden. Bei der relativen Quantifizierung kommt es durch mangelnde Validierung der Referenzgene zu quantitativ falschen Ergebnissen und somit zu falschen biologischen Schlussfolgerungen. Wird die Normalisierung mit mehreren validierten Referenzgenen durchgeführt, und verlässt man sich bei der relativen Berechnung sowie der statistischen Auswertung nicht auf seine selbstgeschriebenen Excel-Tabellen, sondern auf frei verfügbare Quantifizierungssoftware[11-12], lässt sich die technische Varianz reduzieren. Dann erhält man validere Ergebnisse[11-13], die richtiger sind (Richtigkeit!), eine kleine Varianz aufweisen (Wiederholbarkeit!), und zu einer signifikanteren Abgrenzung der Expressionsunterschiede in den untersuchten Gruppen führen können (biologische Relevanz!).

Aber warum wollen wir heute die voll quantitative PCR-Methode anwenden und nicht wie früher die klassische Block-PCR mit Endpunktanalyse auf dem Agarosegel? Weil wir mit den vergangenen sehr fraglichen „semi-quantitativen" Ergebnissen nicht zufrieden waren und uns jetzt bessere Methoden zur Wahl stehen. Aber wir müssen es schaffen, die wirklichen Vorteile der qPCR herauszuarbeiten und nicht blind den Cq-Werten zu vertrauen, die unsere real-time Cycler auswerfen. Ziel ist es nicht, weitere Hürden auf dem Weg zum Publizieren einzubauen, sondern die Qualität der Wissenschaft zu verbessern. Zweifellos ist es wichtig, den gesunden Menschenverstand anzuwenden, um zu entscheiden was im individuellen Studiendesign wichtig ist und was mit den Ergebnissen ausgesagt werden soll.

Ziel ist es, möglichst viele der 85 Unterpunkte, zumindest aber die 57 essentiellen Punkte auf der Checkliste zu beachten. Um die Sache ein wenig zu vereinfachen, sind kürzlich für Publikationen, die eine reine „relative Quantifizierung" durchführen, verkürzte Richtlinien mit 29 Unterpunkten publiziert worden - MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments[14].

Nachschlag

Wir bekommen sehr viele Nachfragen aus allen Anwendungsbereichen der qPCR und auch von Editoren diverser Journale bzw. Verlagshäusern, wie streng die MIQE-Richtlinien anzuwenden und zu werten sind. Der Diskussionsbedarf ist groß, und deshalb widmen wir auf unserer nächsten qPCR Tagung im März 2011 (*www.qPCR2011.net*) wieder eine Session den MIQE Guidelines und der qPCR-Qualitätskontrolle.

Literatur

[1] Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, Carl T. Wittwer (2009) Clin Chem 55(4): 611 - 622

[2] Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. (2009) Clin Chem 55(10): 1816-1823

[3] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. (2010) Methods. 50(4): 227-230

[4] Fleige S. and Pfaffl M. W. (2006) Mol Aspects Med (27): 126-139

[5] Becker C. Hammerle-Fickinger A., Riedmaier I, Pfaffl. M.W. (2010) Methods 50(4): 237-243

[6] Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. (2004) Clin Chem 50: 509-515

[7] Stahlberg A, Kubista M, Pfaffl M. (2004) Clin Chem 50: 1678-1680

[8] Pfaffl MW, Hageleit M (2001) Biotech Letters, 23: 275-282

[9] Pfaffl MW (2001) Nuc Acids Res 29 (9): e45

[10] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Genome Biology, 3(7): 0034. 1-0034.11

[11] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) Genome Biol. 8(2): R19

[12] Michael W. Pfaffl, Graham W. Horgan & Leo Dempfle (2002) Nuc Acids Res 2002, 30(9): e36

[13] Bergkvist A, Rusnakova V, Sindelka R, Garda JM, Sjögreen B, Lindh D, Forootan A, Kubista M. (2010) Methods 50(4):323-35.

[14] Stephen A Bustin, Jean-Francois Beaulieu, Jim Huggett, Rolf Jaggi, Frederick SB Kibenge, Pal A Olsvik, Louis C Penning and Stefan Toegel (2010) BMC Mol Biol (11): 74 - 78

Korrespondenzadresse

PD Dr. Michael W. Pfaffl
Lehrstuhl für Physiologie
Life Science Zentrum Weihenstephan
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85350 Freising-Weihenstephan
Tel.: +49-(0)8161-71-3511
Fax: +49-(0)8161-71-4204
michael.pfaffl@wzw.tum.de
www.gene-quantification.info

Life Science Nord

Good conditions



13 Innovation centers
9 Universities and colleges
2 University Medical Centers
12 Renowned research institutes
2 Strong industry associations
500 Medtech, biotech- and pharmaceutical companies

Business, science, and quality of life – North Germany provides the ideal setting for your objectives.

www.life-science-nord.net

Powering Life Sciences

SCHLESWIG-HOLSTEIN, HAMBURG

Messung von Änderungen der DNA-Methylierung zur Krebsfrüherkennung

Dipl.-Biol. Foued Ghanjati und Dr.rer.nat. Simeon Santourlidis, Epivios im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf

Die DNA-Methylierung ist der wichtigste epigenetische Mechanismus, der für die Regulation der Genexpression jeder Zelle maßgeblich ist. Immer mehr Studien zeigen, dass Veränderungen der DNA-Methylierung in Krebszellen nicht nur begleitende Ereignisse der zellulären Transformation sind, sondern eine aktive Rolle in der Onkogenese spielen. Es stellt sich zunehmend heraus, dass diese zahlreichen Veränderungen auch Stadiumspezifität besitzen können. Diese Erkenntnisse bergen ein enormes diagnostisches und prognostisches Potential. Voraussetzung für eine effektive Diagnose sind vor allem die Spezifität und die Sensitivität der Messverfahren. Allerdings ist die zelluläre Entartung meistens von genetischen Aberrationen begleitet, was eine normierte Bestimmung der DNA-Methylierung erschwert. Die konventionelle Normierung erfolgt über einzelne nichtkoinzidente Referenz-Loci mit unveränderlichem Methylierungsgrad. Diese kommen in genetisch aberranten DNA-Proben in unbestimmter Anzahl vor. Hierdurch kommt es bei der Analyse der DNA-Methylierung mit ungleicher genomischer Ausstattung zu Fehlinterpretationen. Epivios hat ein Verfahren entwickelt, das einen normierten Vergleich der DNA-Methylierung zwischen Proben zulässt, die verschiedenartig bezüglich ihrer genomischen Ausstattung sind.

Der derzeit bedeutendste epigenetische Mechanismus, der die Genregulation entscheidend mitbestimmt, der aber auch dafür sorgt, dass potentiell störende Sequenzen nicht exprimiert werden, ist die DNA-Methylierung. Sie betrifft ausschließlich Cytosin-Guanin (CpG)-Dinukleotide. In der DNA des Menschen liegen schätzungsweise 80% der CpG-Dinukleotide methyliert vor. Die Methylierung erfolgt dabei durch den enzymatischen Einbau einer Methylgruppe an der Cytosin-Nukleinbase. Das Genom jeder ausdifferenzierten gesunden menschlichen Zelle besitzt ein spezifisches und stabiles DNA-Methylierungsmuster, das maßgeblich reguliert, welche Gene exprimiert werden. Hierbei sind transkriptionell irrelevante Abschnitte methyliert, wogegen genomische Regionen mit regulativer Funktion für die Transkription oft unmethyliert vorliegen. Schätzungen zufolge können 60% unserer Gene durch die DNA-Methylierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Die DNA-Methylierungsmuster werden replikationsgekoppelt von der Mutterzelle auf die Tochterzellen übertragen. Somit sind die Vererbung dieser epigenetischen Erbinformation und deren Auswirkung auf die Genregulation sichergestellt.

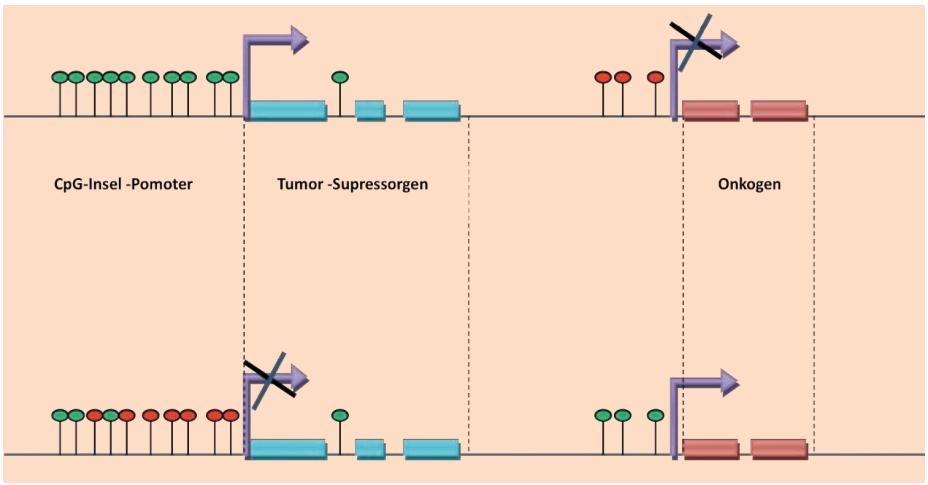


Abb. 1: **Das Methylierungsmuster von gesunden Zellen unterscheidet sich von dem in Tumorzellen. Veränderungen befinden sich häufig auch in der Promotorregion funktionell wichtiger Gene, z.B. von Tumorsupressorgenen und Onkogenen. grün: unmethyliertes CpG, rot: methyliertes CpG**

Das genomische Methylierungsmuster einer Tumorzelle, die sich unter anderem durch eine erhöhte Proliferationsrate, eine veränderte Genexpression und chromosomale Anomalien auszeichnet, weicht von dem einer normalen Zelle ab[1,5]. In vielen Tumorentitäten findet man eine fokal auftretende Erhöhung der DNA-Methylierung von Genpromotoren (Hypermethylierung), die unter anderem Tumorsuppressorgene betrifft (Abb. 1). Darüber hinaus kann ebenfalls ein geringerer Grad der genomweiten, intergenischen Methylierung der DNA vorliegen, den man mit dem Begriff Hypomethylierung bezeichnet. Diese ist in der Fachwelt, insbesondere beim Blasenkarzinom, als ein sehr frühes Ereignis der Tumorgenese beschrieben.

In der Fachliteratur findet sich einhellig die Auffassung, dass die zahlreichen epigenetischen Veränderungen ein immenses, diagnostisch und prognostisch relevantes Potential bergen, dessen Evaluierung zu modernen Verfahren der Krebsfrüherkennung, -prognose und -nachsorge führen kann.

Der aktuelle Stand der Technik in der Molekularbiologie erlaubt den sensitiven, reproduzierbaren und verlässlichen Nachweis von DNA-Methylierungsveränderungen in den verschiedensten Körperflüssigkeiten. Denn Tumorzell-DNA wird bereits sehr früh in der Tumorentwicklung in Körperflüssigkeiten abgegeben[2,3].

DNA-Methylierung: Abweichungen zeigen Krebs an

Das charakteristische DNA-Methylierungsmuster des Tumorgenoms kann für die Diagnose und Prognose von Tumoren genutzt werden. Dazu sind zwei Schritte erforderlich. Zum einen müssen die Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters identifiziert werden, die für eine Tumorzelle charakteristisch sind. Zum zweiten werden Methoden benötigt, die diese Veränderungen einzeln oder kombiniert höchst sensitiv und verlässlich nachweisen können.

Mit Hilfe des modernsten Screening-Verfahrens können wir bis zu zwei Millionen potentiell aberrant methylierte Regionen des Genoms in einem einzigen Experiment untersuchen. Diese Technologie ist etabliert und ermöglicht sehr umfassende Screenings nach neuen Biomarkern, die auf DNA-Methylierungsveränderungen beruhen. Somit ist es möglich neue potentielle Tumormarker zu identifizieren (Abb.2).

Chromosomale Anomalien erschweren normierte Messung der Methylierung

Es ist belegt, dass Tumorgewebe zahlreiche und vielfältige chromosomale Anomalien aufweist (Abb. 3). Bei diesen Anomalien handelt es sich beispielsweise um chromosomale Verlus-

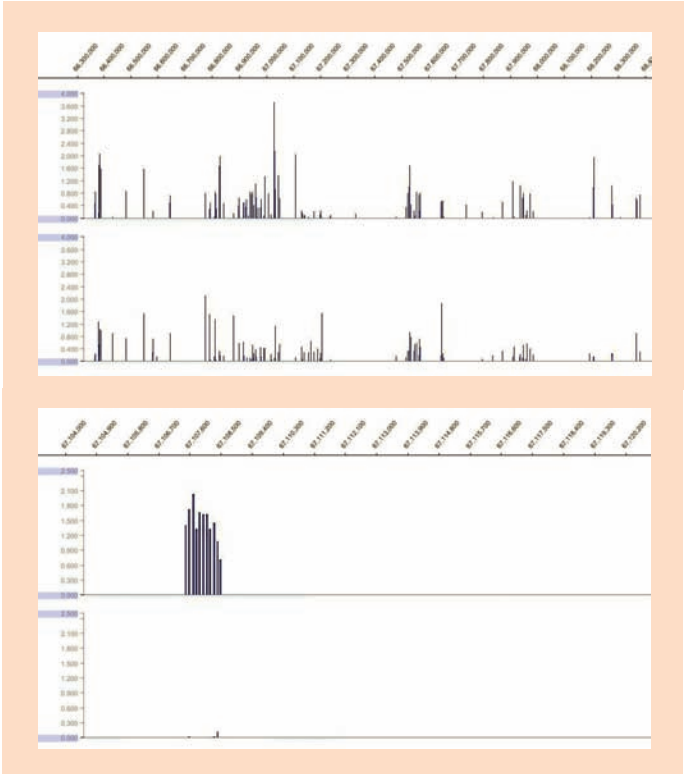


Abb.2: **Methylierungsveränderungen eines DNA-Abschnitts. An vielen Stellen der DNA sind gravierende Unterschiede der DNA-Methylierung zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu beobachten.**

te, Zugewinne und Translokationen[4]. Diese genetischen Aberrationen erschweren eine normierte Bestimmung der DNA-Methylierung. Unser real-time PCR-basiertes Verfahren lässt einen normierten Vergleich von Proben zu, die sich bezüglich ihrer genomischen Ausstattung unterscheiden. Es stellt damit das erste Verfahren seiner Art da, das DNA-Proben mit unterschiedlicher genomischer Ausstattung – also einem unterschiedlichen Gehalt von DNA – untersuchen und miteinander vergleichen kann. Das ist von besonderer Bedeutung, da mit dem Alter der Patienten aber auch mit der Tumorprogression, die chromosomale Ausstattung der betreffenden Gewebe einer stetigen Veränderung unterworfen ist. Die konventionelle Normierung erfolgt über einzelne nichtkoinzidente Referenz-Loci mit unverändertem Methylierungsgrad. Dadurch kann es bei der Untersuchung von Proben mit unterschiedlicher genomischer Ausstattung zu Fehlinterpretationen kommen. Unser Verfahren bietet eine Lösung dieses Problems, indem es Normierungsfaktoren nutzt, die neben dem Detektionsspot liegen. Im Unterschied zu existierenden Testverfahren kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Unterschiede lediglich auf genomische Unterschiede zurückzuführen sind.

In einer besonderen Anwendung analysiert das Verfahren Sequenzen, die über das ganze Genom verteilt und zu mehreren Zehntausend vorhanden sind. Es wird also kein einzelner DNA-Abschnitt untersucht, sondern mehrere Tausend auf einmal. Dadurch ist der ermittelte Methylierungsgrad repräsentativ für den gesamten intergenischen Genombereich. Dies wiederum bedingt, dass die Sensitivität des Verfahrens – im Vergleich zu Verfahren mit vereinzelt vorkommenden Template-Sequenzen – um ein Vielfaches erhöht ist. Dadurch kann auf Basis einer viel geringeren Menge von Tumor-DNA mit Methylierungsveränderung der Nachweis erfolgen. (Abb. 4).

www.laborwelt.de



Die Vorzüge eines MiniVap™

Selbstverständlich würden Sie keinen Haartrockner verwenden, um chromatographische Proben in einer einzelnen Mikrotestplatte zu verdampfen. Sie haben wahrscheinlich aber auch keine Lust Schlange zu stehen, um einen großen Evaporator in Ihrer Abteilung für denselben Zweck zu benutzen. In diesem Fall brauchen Sie einen Porvair MiniVap. Das Gerät ist klein, schnell, flexibel und beeinträchtigt Ihre Proben nicht. Weitere Information finden Sie unter **www.microplates.com/downloads.php**



Telephone: 0 26 83 / 4 30 94
Email: info@dunnlab.de
www.microplates.com

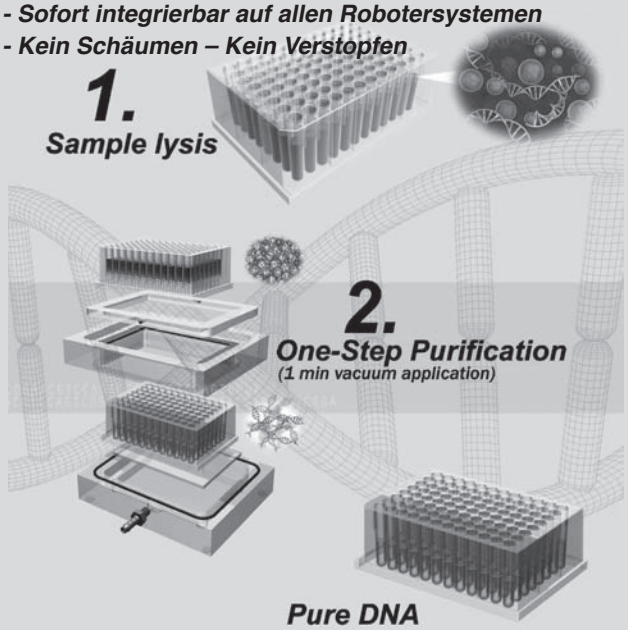
porvair sciences

nexttec™

Principle of the nexttec™ DNA Isolation System using nexttec™ Clean Vac 96

Geschwindigkeits-Revolution DNA-Aufreinigung

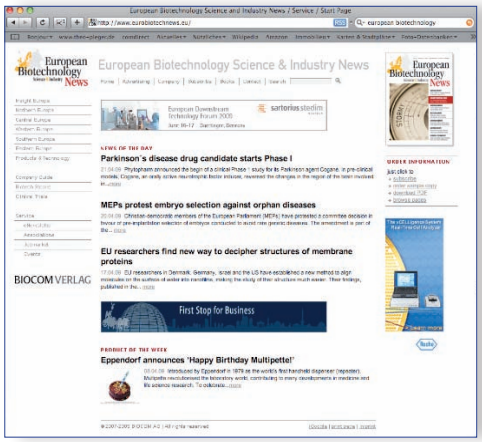
- *15x schneller als Silica-basierte Methoden*
- *Einfachstes 1-Schrittverfahren*
- *Sofort integrierbar auf allen Robotersystemen*
- *Kein Schäumen – Kein Verstopfen*



nexttec GmbH
www.nexttec.biz
info@nexttec.biz
Tel.: +49(0)214 869 15 16
Fax: +49(0)214 869 15 28

European Biotechnology Science & Industry News

More up-to-date than ever before!



Did you know that you can call up daily European biotech news and event information at www.eurobiotechnews.eu?

Keep yourself informed - every day.

Diagnose des Harnblasenkarzinoms

Dieses spezielle Verfahren wird für die Diagnose des Harnblasenkarzinoms eingesetzt (Abb. 5). Die Abnahme der DNA-Methylierung an diesen repetitiv im Genom vorliegenden DNA-Abschnitten, stellt dabei ein sehr frühes Ereignis der Blasentumorentstehung dar[5] und betrifft mindestens 90% der Tumore[6]. 3% der Tumorpatienten mit nicht nachweisbarer Hypomethylierung haben eine längere rezidivfreie Zeit und Überlebenszeit, und ein höherer Grad an Hypomethylierung korreliert mit einer kürzeren Tumor-spezifischen Überlebenszeit. Es ist bekannt, dass viele Zellen des Tumorgewebes einem natürlichen Zelltod unterliegen und dabei Tumorzell-DNA in die umliegenden Körperflüssigkeiten abgeben, so auch der frühe Blasentumor in die Lumenflüssigkeit der Blase[7-8].

Für die Diagnose des Harnblasenkarzinoms wurde Urin verwendet. Dieser Nachweis erfolgte aus 10 ng konvertierter DNA, die aus einem ml Urin isoliert wurden. Von rund 60 Urinproben wurde der Methylierungsgrad gemessen. Nach der Normierung war ein Vergleich der Methylierungsintensität der verschiedenen Proben trotz chromosomaler Anomalien möglich. Die Normierung mittels konventioneller Housekeepinggene dagegen ermöglichte aufgrund der zuvor beschriebenen Anomalien keinen korrekten Vergleich und hätte somit zu Fehlinterpretationen der Messergebnisse führen können.

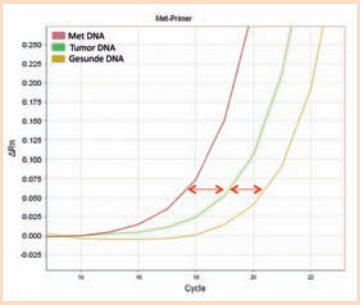


Abb. 4: Normierte und effiziente Bestimmung des Methylierungsgrads von methylierter sowie Tumor- und normaler DNA aus Urin

Literatur

[1] Schulz WA.,DNA methylation in urological malignancies (review). Int J Oncol. 1998 Jul;13(1):151-67. Review.
[2] Cairns, P., Esteller, M., Herman, J.G. et al. (2001), Molecular detection of prostate cancer inurine by GSTP1 hypermethylation. Clinical Cancer Res; 7:2727–30
[3] Battagli, C., Uzzo, R.G., Dulaimi, E., et al. (2003), Promoter hypermethylation of tumorsuppressor genes in urine from kidney cancer patients. Cancer Res; 63:8695–9.
[4] Raymond L. Stallings Are chromosomal imbalances important in cancer? TRENDS in Genetics Vol.23 No.6 .
[5] Seifert, H.H., Schmiemann, V., Mueller, M., et al. (2007), In situ detection of global DNAhypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer.Exp Mol Pathol.; 82(3):292-7.
[6] Neuhausen A, Florl, A.R., Grimm, M.O., Schulz, W.A. (2006), DNA methylationalterations in urothelial carcinoma. Cancer Biol Ther.; 5(8):993-1001.
[7] Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Int J Surg. 2010;8(3):194-8. Epub 2010 Feb 6. Review.
[8] Sanchez-Carbay, M. (2004), Recent advances in bladder cancer diagnostics. Clin Biochem; 37(7):562-71.

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Foued Ghanjati
Epivios
im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf
Tel: +49-(0)211-810-4341
Fax: +49-(0)211-810-???
foued.ghanjati@epivios.com

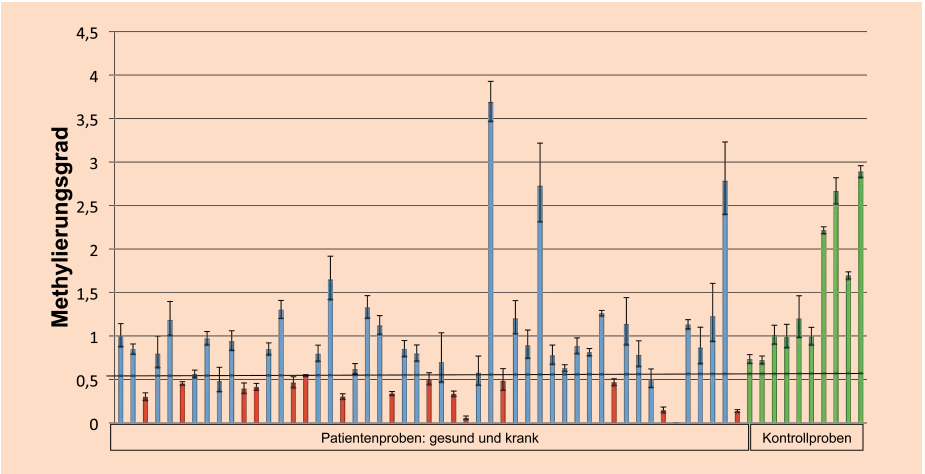


Abb. 5: Urinproben aus gesunden Probanden (grün) und Patienten mit Urothelkarzinom sowie mit Verdacht auf diese Tumorentität (rot, blau). Der waagerechte Strich zeigt den Cut-off-Wert an, unterhalb dessen eine Messung als indikativ für das Vorliegen eines Blasentumors gilt.

Sartorius AG: Krisenfest durch Biotechnologie

Dr. Patrick Dieckhoff, BIOCOM AG

Über Jahre hinweg war der Markt für Laborzulieferer von kleinen und mittleren Unternehmen geprägt. Viele Spezialanbieter bestimmten das uneinheitliche Bild. Wer Massenspektrometer lieferte, musste noch lange keine Chromatographiesäulen im Angebot haben. Zwar gab es schon immer einzelne Übernahmen, doch häufen sich in jüngster Zeit die Elefantenhochzeiten: Applied Biosystems übernimmt Invitrogen und wird zu Life Technologies, Thermo kauft Fisher Scientific. Zunehmend treten aber auch Unternehmen von außerhalb ein. Der Technologiekonzern General Electric hatte vor einigen Jahren eine Art Erweckungserlebnis mit dem Kauf von Amersham. Die Preise sind hoch, in zehn Jahren wird der Labormarkt nicht mehr so aussehen, wie wir ihn heute kennen. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit wird die Göttinger Sartorius AG noch selbständig sein. Aufgrund einer testamentarischen Besonderheit ist der Spezialist für Fermentation und Waagen gezwungen, eigenständig zwischen den Dickschiffen zu agieren. Die LABORWELT-Serie „Labormarkt im Umbruch" stellt die Sartorius AG vor.

Für den Sartorius-Konzern ist die Krise vorbei. Davon künden die jüngst veröffentlichten Geschäftszahlen für die ersten neun Monate des laufenden Jahres. Im Vergleich zum Vorjahreszeitraum stiegen die Erlöse um 8,5% auf 482,3 Mio. Euro. Der Gewinn des Konzerns stieg sogar um 34,1% auf 58,9 Mio. Euro. Damit hat Sartorius die Rezession besser überwunden als einige seiner Wettbewerber. Das ist das Ergebnis eines jahrelangen Umbaus, der das Unternehmen von einem Spezialisten für Präzisionsmessgeräte im Labor zu einem Anbieter von Lösungen für die Produktion in der biopharmazeutischen Industrie machte.

Hochpreisige Übernahme

Begonnen hat alles vor zehn Jahren mit einer Reihe von Übernahmen, unter denen der Kauf des Fermenterherstellers B.Braun Melsungen der wichtigste war. Die Göttinger kauften sich 100 Mio. DM Umsatz ein, eroberten ein neues Geschäftsfeld und hofften auf zusätzliche Kunden für die eigene Separationstechnik. Heute ist die Biotechnologie zur wichtigsten Sparte des Konzerns geworden. Auch wenn nicht alles gelang: Mit der Vivascience AG hoffte Sartorius, eine zweite Qiagen in der Proteinaufreinigung im Labor schaffen zu können. Jedoch scheiterte ein Börsengang der Sparte wiederholt, so dass sie schließlich wieder integriert wurde.

Heute erwirtschaften die biotechnologischen Produkte etwa drei Viertel des Konzernumsatzes, der im vergangenen Jahr rund 602 Mio. Euro betrug. „Mit der Strategie, uns als Anbieter kompletter Lösungen auf die Pharma-Produktionprozesse zu fokussieren sind wir gut durch die allgemeine wirtschaftliche Krise gekommen", analysiert Joachim Kreuzburg, der Vorstandsvorsitzende von Sartorius. Pharmaunternehmen müssten den Nachschub an Medikamenten immer sicherstellen. Entsprechend wuchs Sartorius' Biotechnologie-Sparte auch in Krisenzeiten dynamisch, während das traditionelle Mechatronik-Geschäft schwächelte.



Flüssigkeitstransport in der Produktion mit Disposables

Sartorius in Zahlen:

Umsatz:	602,1 Mio. Euro (2009)
Gewinn (EBITDA):	10,3 Mio. Euro
Marge:	10,1%
Börsenwert:	550 Mio. Euro (VZ + Stämme)
Mitarbeiter:	4.300
CEO:	Joachim Kreuzburg

Umsätze nach Regionen:

- Europa (58,1%)
- Nordamerika (24,2%)
- Asien-Pazifik (13,8%)
- übrige Märkte (3,9%)

Produktgruppen:

- Biotechnologie (75%)
- Mechatronik (25%)

Wettbewerber Pall und Millipore

Sartorius sieht sich als Marktführer im Verkauf von Fermentern. Die Größe des Weltmarktes wird auf rund 300 Mio. Euro geschätzt. Hauptwettbewerber sind hier die Eppendorf-Tochter New Brunswick, Applikon, General Electric oder Thermo Fisher. Auch im Fluidmanagement (Marktgröße 200 Mio. Euro/Jahr) schreibt sich das Unternehmen die Nummer 1-Position zu – noch vor Thermo Fisher, ATMI oder der Merck-Tochter Millipore. Laut Selbstdarstellung haben Pall, Millipore oder General Electric auch das Nachsehen im Verkauf von Membranchromatographie-Materialien (Markt: 100 Mio. Euro/Jahr). Im Markt für Spezialfilter für das Labor oder die biotechnologische Produktion (Volumen 750 Mio. Euro/Jahr) liegen allerdings Millipore und Pall vor den Göttingern.

Geschützt gegen Übernahmen

Erneuerung ist der Treiber für viele der genannten Laborkonzerne, ihr bestehendes Territorium zu verlassen und sich mit Übernahmen auf neues Terrain zu begeben. Neue Märkte locken: „Die Biotechnologie erobert immer größere Bereiche unseres täglichen Lebens. Neben Pharma wird künftig auch die Nahrungsmittelindustrie ein interessanter Markt für uns sein", prognostiziert Kreuzburg, der auch für sein Unternehmen künftige Übernahmen nicht ausschließen mag: „Wir machen aber nicht jeden Wahnsinn mit." Sartorius selbst ist bis auf weiteres gut gegen Übernahmen geschützt. obwohl Bio-Rad gut 25% der Anteile hält. Bis 2028 bestimmt der Testamentsvollstrecker Arnold Picot über 50,1% der stimmberechtigten Aktien – Verkauf ausgeschlossen. Mit der Verwaltung seines Nachlasses beendete Firmenpatron Horst Sartorius – Enkel des Firmengründers – nach seinem Tod 1998 einen erbitterten Erbschaftsstreit.

Marktübersicht: PCR-Kits

Ob zum hochsensitiven Nachweis von Krankheitserregern oder zur relativen Quantifizierung von SNPs, miRNAs, der DNA-Methylierung, ob als Multiplex- oder miniaturisierter Test – PCR-Kits sind im molekularbiologischen Labor Standard und damit ein Riesenmarkt. Der Entwicklung hin zu sensitiveren, spezifischeren, robusteren, miniaturisierten und kontaminationssichereren PCR folgen auch die Kits. In der folgenden Marktübersicht präsentieren die Anbieter einen Ausschnitt aus ihrem aktuellen Angebot.

Firma/Kontakt	Anagnostics Bioanalysis GmbH Markus Jaquemar Westbahnstraße 55 A-4300 St. Valentin markus.jaquemar@ anagnostics.com Tel.: +43-(0)7435-58193-0 www.anagnostics.com	Analytik Jena AG | Life Science Konrad-Zuse-Straße 1 07745 Jena Tel.: +49-(0)3641-77-94 00 Fax: +49 (0)3641-77-767776 lifescience@analytik-jena.de www.bio.analytik-jena.de Christiane Knippschild			
Produktname	hybcell Onco plexA für die Diagnostik von Mutationen im kras-Gen	rapidSTRIPE H1N1 Detection Assay I rapidSTRIPE H1N1 Assay – KF	rapidSTRIPE Salmonella Assay	rapidSTRIPE Pertussis Assay	rapidSTRIPE Influenza A/B Assay
Einsatzgebiete	hybcell Onco plexA wird bei der Therapie von Krebspatienten eingesetzt (besonders bei soliden Tumoren), um den Einsatz bestimmter Medikamente zu rechtfertigen (da diese Medikamente nur bei Abwesenheit bestimmter Mutationen wirken).	Humane Diagnostik, Verwendung von Rachen- oder Nasalsabstrichen	Lebensmitteldiagnostik	Humane Diagnostik, Verwendung von Rachen- oder Nasalsabstrichen	Humane Diagnostik, Verwendung von Rachen- oder Nasalsabstrichen
Beschreibung des Produktes	hybcell Onco plexA: PCR mit anschließender Primer-Extension auf der hybcell zur Analyse bekannter Mutationen in Codon 12 und 13 des kras-Gens. Aus FFPE-Gewebe wird ein Anteil bis zu 1% an mutierten Zellen analysiert.	CE-IVD zertifizierte Ready-to-Use Assays für den schnellen und hochsensitiven Nachweis des Influenza A/H1N1(Swine Flu)-Subtyps I Inklusive optimierter Reagenzien für die automatische RNA-Extraktion (nur rapidSTRIPE H1N1 Assay – KF), RT-PCR, PCR-Amplifizierung und die finale Detektion I basierend auf der hochspezifischen Rapid Amplification and Hybridization (RAH)-Technologie I optimiert für standard und rapidPCR I Detektion unter Verwendung hochsensitiver Lateral Flow Strips (LFS)	Hochspezifische Detektion von *Salmonella enterica* I alle benötigten Reagenzien für die Amplifikations- und Hybridisierungsreaktion sowie die finale Detektion enthalten I einfache und schnelle Ja/Nein-Aussage auf Basis eines Lateral Flow Strips (LFS) I vollständiger Nachweis in 1 h möglich I optimiert für Standard- und rapidPCR	CE-IVD zertifizierter Ready-to-Use Assay für den schnellen und hochsensitiven Nachweis von *Bordetella pertussis* I Inklusive optimierter Reagenzien für die DNA-Extraktion, die Amplifizierungs- und Hybridisierungsreaktion sowie die finale Detektion I Basierend auf der hochspezifischen Rapid Amplification and Hybridization (RAH)-Technologie I Sowohl für die Nutzung von Standard- als auch für rapidPCR-Thermocycler	Ready-to-Use Assay für die hochspezifische und sensitive Detektion von Influenza A und Influenza B I Optimiert für die einzigartige rapidPCR-Technologie und Standard-PCR-Thermocycler I Einfachstes Handling und enorme Zeitersparnis: Gesamtdauer ab 1½ Stunden I Angemeldet für die CE-IVD-Zertifizierung (voraussichtlich Anfang 2011 erteilt) I Detektion unter Verwendung hochsensitiver Lateral Flow Strips (LFS)
Lagerung	Raumtemperatur, trocken, lichtgeschützt.	-20 °C	-20 °C	-20 °C	-20 °C
Besonderheiten/ Extras	vollständig automatisierte Auswertung und tabellarische Ergebnisse, Multiplex durch anschließende automatisierte Hybridisierung oder Primer-Extension	Sensitivität: Vergleichbar mit TaqMan® Real-Time PCR I Gesamtdauer: < 2 h (rapidPCR) bzw. < 3,5 h (standard PCR	Sensitivität: Vergleichbar mit TaqMan® Real-Time PCR I Gesamtdauer: ca. 1 h (rapidPCR) bzw. ca. 2,5 h (Standard-PCR)	Sensitivität: Vergleichbar mit TaqMan® Real-Time PCR I Gesamtdauer: ca. 1 h (rapidPCR) bzw. ca. 2,5 h (standard PCR) I Nachweis B. pertussis DNA (Zielsequenz IS481) in Abstrichproben (Rachen, Nasopharyngealtrakt) I Keine Kreuzreaktion mit *B. bronchioseptica, B. parapertussis* und humaner DNA I 100 %ige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei über 200 Wiederholungen derselben Proben mit verschiedenen Chargen des Kits	Sensitivität: Vergleichbar mit TaqMan® Real-Time PCR I Gesamtdauer: < 2 h (rapidPCR) bzw. < 3,5 h (Standard-PCR)
Preis	ab 12 Euro/Reaktion I verfügbare Mengen 10, 25 und 50 Reaktionen	ab 5,50 Euro/Reaktion I verfügbare Mengen 10, 25 und 50 Reaktionen	ab 7 Euro/Reaktion I verfügbare Mengen 10, 25 und 50 Reaktionen	ab 10 Euro/Reaktion I verfügbare Mengen 10, 25, 50 und 100 Reaktionen	

Firma/Kontakt	Bio-Budget Technologies GmbH Dießemer Bruch 150 47805 Krefeld Tel.: +49-(0)2151-6520830 www.bio-budget-shop.de info@bio-budget.de Dr. Karin Widulle	BioCat GmbH Im Neuenheimer Feld 584 D-69120 Heidelberg Tel.: +49-(0)6221-7141516 Fax: +49-(0)6221-7141529 info@biocat.com www.biocat.com Dr. Elke Gamer	Bioline GmbH Im Biotechnologiepark TGZ2 14943 Luckenwalde Tel.: +49-(0)3371-681-229 Fax: +49-(0)3371-681-244 info.de@bioline.com Holger Berthel	Biomol GmbH 22769 Hamburg Waidmannstr. 35 Tel.: +49-(0)40-853260-37 www.biomol.de Dr. Edgar Lipsius	Bio-Rad Laboratories GmbH 80939 München Heidemannstraße 164 Dr. Marcus Neusser Marcus_Neusser@bio-rad.com	BIOTECON Diagnostics GmbH Hermannswerder 17 14473 Potsdam Benjamin Junge
Produktname	my-Budget 5x PCR Mastermixe	PRECISOR High-Fidelity DNA-Polymerase	unterschiedliche DNA-Polymerasen	RealQ PCR 2x Master Mix	iScriptTM RT Supermix	foodproof GMO Screening Kit, 5'Nuclease (4 Targets)
Einsatzgebiete	PCR, Hot-Start-PCR, quantitative PCR	Klonierung, Amplifikation von schwierigen Templates, Site-directed Mutagenesis	Endpunkt PCR, hot-start PCR, High Fidelity PCR, Multiplexing, Kolonie-PCR, GC-reiche Templates, FAST PCR, real-time PCR, RT-PCR und automatisierte Anwendungen	quantitative Real-Time PCR z.B. für Genexpressionsanalyse, RNA-Interferenz-Messung, SNP-Analyse, Drug Target-Validierung	Quantitative real-time PCR (qPCR, Genexpressionsstudien)	Rohmaterialien und Fertigprodukte, die genetisch veränderte Organismen (GVO) enthalten können
Beschreibung des Produktes	"Ready-to-use"-Lösungen für hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse | mit oder ohne Farbstoff zum direkten Auftragen auf das Gel | PCR-Mastermixe mit Taq, dNTPs, Reaktionspuffer, $MgCl_2$ und wahlweise Farbstoff in optimierter Zusammensetzung | Hot-Start-PCR-Mastermixe mit Hot-Start-Taq, dNTPs, Reaktionspuffer und $MgCl_2$ in optimierter Zusammensetzung | qPCR-Mastermixe zur Verwendung mit Sonden oder fertig mit interkalierendem EvaGreen®-Farbstoff; mit oder ohne ROX-Farbstoff als interne Referenz | qPCR-Mastermixe mit Hot-Start-Taq, dNTPs, qPCR-Reaktionspuffer, $MgCl_2$ und wahlweise EvaGreen®-Farbstoff, ROX in optimierter Zusammensetzung	Die PRECISOR High-Fidelity DNA-Polymerase ist ein schnelles, thermostabiles Enzym mit 5'-3' DNA-Polymerase und 3'-5' Proofreading Exonuclease-Aktivitäten. Sie ist optimiert für höchste Genauigkeit und hohe Prozessivität. Hohe Ausbeuten werden auch bei wenig Ausgangsmaterial sowie bei langen/schwierigen Templates erzielt. | Mitgeliefert werden HiFi-Puffer, $MgCl_2$-Lösung, DMSO und GC-Buffer.	MyTaq DNA Polymerase-Produkte – für alle klassischen PCR Anwendungen, hot-start PCR, Multiplexing, GC-reiche Templates, FAST-PCR und Kolonie-PCR | Weitere Polymerasen unter www.bioline.com	enthält modifizierte Taq-DNA-Polymerase für die Hot-Start-PCR (Tempase Hot Start DNA-Polymerase), Green Dye, Referenzfarbstoff ROX, optimiertes Puffer-System, 7 mM $MgCl_2$ (Endkonzentration 3,5 mM), dNTPs	Der iScript™ Reverse Transcription Supermix ist ein einfach zu handhabendes, schnelles und sensitives one-tube RT-qPCR-Kit. zur Expressionsanalyse mittels real-time PCR.	derzeit einziges real-time PCR-Screening-Kit für alle existierenden GVOs, da es vier verschiedene GVO-Zielsequenzen (auf DNA-Basis) enthält (35S, bar, NOS, FMV).
Lagerung	-20°C; Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 1 Monat ohne Aktivitätsverlust; bei 2 bis 8°C für bis zu 6 Monate	-20°C	Bei -20 °C zwischen 6 und 12 Monaten haltbar	bei -20 °C	bei -20°C im Gefrierschrank	Versand auf Trockeneis, Lagerung bei -15 bis - 25 °C
Besonderheiten/ Extras	sehr hohe Lagerungs- und Reaktionsstabilität | einfache Handhabung | zeitsparend | hohe Reproduzierbarkeit | geringes Kontaminationsrisiko | weniger Optimierungsarbeit	höchste Genauigkeit | hohe Prozessivität | hohe Ausbeute | Amplifikation von Templates bis 30kb	MyTaq DNA-Polymerasen enthalten bereits dNTPs im Reaktionspuffer. Die MyTaq HS-Polymerase ist zudem für ultraschnelle PCR-Zyklen geeignet. Sonderabfüllungen auf Anfrage möglich.	mit oder ohne Green Dye erhältlich | anwendbar auf gängige PCR-Cycler wie z. B. ABI PRISM™, LightCycler™, Mx4000™ und das Opticon™-System | für konventionelle PCR sind ebenfalls verschiedene Master-Mixe vorhanden	Durch das neue one-tube-Format lassen sich Pipettierfehler, die beim Pipettieren kleiner Volumina multipler RT-Komponenten auftreten, verhindern. Hierdurch wird die Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Genexpressionsdaten erhöht, ohne dabei auf höchste Sensitivität und kurze Reaktionszeiten (40 Minuten) verzichten zu müssen.	siehe Produktbeschreibung, für dieses Produkt gibt es auch ein assoziiertes Probenaufarbeitungskit, das foodproof GMO Sample Preparation Kit (S 400 06).
Preis	PCR-Mastermixe: ab 45 Euro/ml, qPCR-Mastermixe ab 65 Euro/ml	250 units 189 Euro	Alle Preise auf www.bioline.com	für 200 Reaktionen: 235 Euro 2000 Reaktionen: 1.997 Euro	Markteinführung	Listenpreis: 699,- Euro

Firma/Kontakt	**Finnzymes** **02150 Espoo, Finland** **www.finnzymes.com** **Deutschland/** **Österreich:** **Biozym Scientific GmbH** **31840 Hess. Oldendorf** **www.biozym.com** **Helmut Prechel** **Tel.: +49-(0)5152-9020** **support@biozym.com**	**IBA GmbH** **Rudolf-Wissell-Str. 28** **37079 Göttingen** **Tel.: +49-(0)551-50672-0** **Fax: +49-(0)551-50672-181** **oligo@iba-go.com** **www.oligo-specialist.com** **Bettina Renker, MSc**	**Invitek GmbH** **Robert-Rössle-Str. 10** **13125 Berlin** **Tel: +49-(0)30-9489-2901** **Fax: +49-(0)30-9489-2909** **info@invitek.de**	**LGC Genomics GmbH** **Ostendstr. 25 • TGS Haus 8** **12459 Berlin** **Dr. Frank Schubert** **Tel.: +49-(0)30-5304-2250** **Fax: +49 -(0)30-5304-2201** **frank.schubert@lgcgenomics.com** **www.lgcgenomics.com**	**Lonza-Cologne GmbH** **(Distributor)** **Lonza-Cologne GmbH** **Tel.: +49-(0)221-99199400** **Scientific.support.eu@lonza.com** **www.lonzabio.com/molecular-biol/takara-products/**	**Merck Chemicals Ltd** **Padge Road** **Nottingham NG9 2JR, UK** **Tel.: 0800-6931-000** **Fax: 0800-6236-100** **customer.service@merckbio.eu** **techservice@merckbio.eu** **www.merck4biosciences.com**
Produktname	Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	Auftragssynthesen von Real-time PCR-Proben	MSB® Spin PCRapace	sbeadex PCR cleanup kit	TaKaRa Ex Taq™, 250 U, FRR-R001A	Novagen® KOD Hot Start Master Mix Kit
Einsatzgebiete	High-Fidelity PCR | PCR-Klonierung | lange und schwierige Templates | DHPLC und Microarray-Applikationen	Quantitative PCR im biomedizinischen Bereich, z.B. Virusdetektion, Tumormarker-Analyse, siRNA-basierte Analysen und vieles mehr	Aufreinigung von PCR-Produkten aus PCR-Reaktionen | Entfernung von Dye-Terminatoren aus Sequenzierungsreaktionen	Isolation von PCR-Produkten aus Reaktionsmischung, Abtrennung von Primern und anderen Reaktionskomponenten, Vorbereitung von PCR-Produkten zur Sequenzierung im Hochdurchsatz	This PCR kit can be used for a broad range of PCR applications. In addition, Lonza offers a comprehensive panel of dedicated TaKaRa PCR kits for special PCR applications (qPCR, long products, high fidelity, etc.)	Amplification of genomic and plasmid/phage DNA targets up to 12 and 21 kb, respectively. Proofreading capacity allows for high fidelity site-specific mutagenesis. Efficient amplification of GC-rich targets. KOD DNA Polymerase generates blunt-ended PCR products suitable for cloning with the Novagen Perfectly Blunt® and LIC Vector Kits.
Beschreibung des Produktes	Pyrococcus-ähnliche proofreading-Polymerase mit dsDNA-Bindedomäne für High-Fidelity-PCR	Oligos werden nach Wunsch des Kunden synthetisiert; über 150 verschiedene Farbstoffe, die das gesamte Spektrum abdecken, stehen dabei für die Markierung der PCR-Sonden zur Verfügung.	Aufreinigung in nur 5 min (nur Binden und Eluieren) | Elutionsvolumen bis zu 10 µl möglich | bis zu 95 % Recovery für Fragmentgrößen von 80 bp bis 30 kb	Automatisierbares, auf der Basis von magnetischen Mikropartikeln arbeitendes Verfahren	TaKaRa Ex Taq™ provides more efficient amplification and higher fidelity than conventional Taq DNA polymerase under conventional PCR conditions.	KOD Hot Start combines the high fidelity, fast extension speed, and outstanding processivity of KOD with the high specificity of an antibody-mediated hot start. Product contains a ready-to-use 2X mixture optimized for convenient high-fidelity PCR. The mix contains KOD Hot Start DNA Polymerase, two monoclonal antibodies, ultra pure deoxynucleotides, and reaction buffer with $MgSO_4$.
Lagerung	-20°C, PCR-Setup bei Raumtemperatur (Hot-Start Version)	bei -20°C; Lieferung bei Raumtemperatur	bei Raumtemperatur	bei Raumtemperatur	-20°C	-20°C
Besonderheiten/ Extras	Genauigkeit – geringste Fehlerrate aller thermostabilen DNA-Polymerasen | Geschwindigkeit – 15 bis 30 s/kb Elongationszeit | hohe Ausbeute – bei minimaler Enzymmenge (0,5 bis 1 U/50 µl rxn) | robuste Reaktionen – bis 40 kb und GC-reiche Templates | erhältlich auch als Hot-Start-Enzym, 2x Mastermix oder Kit (inkl. dNTPs, Kontroll-Reaktionen und Marker)	exzellente Qualität und hohe Reinheit der Sonden; doppelte HPLC-Reinigung inklusive (unmarkierte Oligos sowie überschüssige Farbstoffe werden entfernt) | Lizenzen für alle relevanten Farbstoffe | Maßanfertigungen jeder Art | hochqualifiziertes Personal mit fast 20-jähriger Erfahrung | technische Hotline von 8 bis 20 Uhr (Tel. +49-551 50672-141). 24 h Web shop für Oligonukleotide (www.iba-shop.com).	Entfernung von Primer-Dimeren mit Hilfe des MSB® Vario Cleanup (50 preps – 90,50 Euro)	Schnelles skalierbares Protokoll, ideal für Hochdurchsatz und Automation	Complete kit for PCR, includes: | 10× Ex Taq Buffers with and without (Mg2+) and dNTP Mixture.	Elongation rate: 106-138 bp per second Mutation frequency: 0.1% (compared to 5.1% for Taq),
Preis	Ab 50 ct/ 50 µl rxn	z. B. Real-time PCR-Sonde mit 5' FAM 3' TAMRA, 5 nmol, 135 Euro; weitere Preise auf Anfrage, da individuelle Synthesen.	50 preps – 69 Euro | 250 preps – 254 Euro | 500 preps – 412 Euro		255,70 Euro (please request special volume discounts) | Free samples available at www.lonza.com/taqsample	100 reactions: 177 Euro | 500 reactions: 707 Euro

Firma/Kontakt	MIKROGEN GmbH Floriansbogen 2-4 82061 Neuried Christine Reichhuber Tel.: +49-(0)89-54801-143 reichhuber@mikrogen.de www.mikrogen.de	Molzym GmbH + Co. KG Mary-Astell-Str.10 28359 Bremen www.molzym.com info@molzym.com Dr. Karen Hinsch	New England Biolabs GmbH Frankfurt a. Main Tel.: 0800-246-5227 (kostenfrei in D) Tel.: 00800-246-52277 (kostenfrei in A) info@de.neb.com www.neb-online.de		
Produktname	Diagenode Respiratory RNA Viruses Multiplex	Mastermix 16S Complete	Taq PCR Kit (E5000 S) I Taq PCR Kit with controls (E5100 S) I Crimson Taq-PCR Sampler (E0547 S)	Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR Kit (E6400 S) Protoscript AMV LongAmp Taq RT-PCR Kit (E5300 S)	Phusion High Fidelity PCR Kit (F-553 S/L)
Einsatzgebiete	Nachweis und Differenzierung viraler Infektionserreger bei respiratorischen Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege mittels multiplexer Real-Time-PCR.	Infektionsdiagnostik, Sterilitätsnachweis, generelle16S rDNA-PCR	Routine-PCR, Hochdurchsatz-PCR, Microarray-Analysen, DHPLC, Colony-PCR	RT-PCR, qPCR, Klonierung	Klonierung/High Fidelity PCR, Routine-PCR, Hochdurchsatz-PCR
Beschreibung des Produktes	Multiplexe Detektion von neun respiratorischen RNA-Viren: Humanes Influenza (HI) A/B, humanes Respiratory Syncytial virus (RSV), humanes Metapneumovirus (MPV), humanes Rhinovirus (HRV) und humanes Parainfluenza Virus (HPIV) 1/2/3/4 I Zusätzlich große Produktpalette zum direkten Nachweis von Viren, Bakterien und Parasiten verfügbar. Detektion der 9 viralen Infektionserreger; Extraktions- und Inhibitionskontrollen	DNA-freier Mastermix für den generellen Bakterien-Nachweis. Mastermix enthält Taq-Polymerase, dNTPs, Puffer, Wasser, SYBR Green und 16S rDNA-Primer. Primer für über 345 Keime validiert. Konventionelle oder Real-time PCR möglich. Protokolle für versch. Cyclertypen vorhanden.	Hochqualitative, rekombinante Taq-Polymerase Taq inkl. dNTPs, Reaction Buffer und $MgCl_2$ „ready-to-use" DNA-Leitern als Größenstandard-Kontrollen für PCR enthalten (nur E5100 S)	Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR Kit (E6400 S) enthält alle Reagenzien und Puffer für zuverlässige cDNA-Synthese mit hoher Ausbeute und anschließender PCR für reproduzierbare „Routine"-Anwendungen. I Protoscript AMV LongAmp Taq RT-PCR Kit (E5300 S) enthält die AMV-RTase für eine cDNA-Erststrangsynthese bei Temperaturen >42°C und anschließender PCR	Phusion High Fidelity DNA-Polymerase ist dank einer zusätzlichen dsDNA-bindenden Domäne das wohl beste HiFi-PCR-Enzym im Makrt. Phusion High Fidelity-PCR-Kit (F-553 S/L) enthält Phusion HF und GC-Puffer, $MgCl_2$, dNTPs, Kontroll-DNA und Kontroll-Primer, DMSO, DNA-Größenstandard
Lagerung	bei -20 °C für 24 Monate haltbar	-20C	-20°C	-20°C	-20°C
Besonderheiten/ Extras	CE-zertifiziert, auf allen gängigen Real-Time PCR-Cyclern durchführbar; aus BAL, Sputum und Abstrich; verschiedene Protokolle zur manuellen und automatischen Nukleinsäureextraktion evaluiert, optimale Auslastung der Cyclerkapazität durch Kombinierbarkeit mit weiteren RT-PCR-Produkten; identische Cyclerprotokolle für alle RT-PCR und PCR-Teste	Hochreine Reagenzien, frei von DNA-Kontaminationen, bei hochaktiver Taq, inkl. SYBR Green, 1kb DNA-Marker und Gel-loading solution	Hohe Ausbeuten und extreme Zuverlässigkeit I Crimson Taq PCR-Sampler: Direktes Auftragen des PCR-Produktes auf das Gel nach PCR dank beigesetztem Purpur-Farbstoff	Hohe Ausbeuten und Zuverlässigkeit M Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR Kit (E6400 S) I Detektion von „Full-legth"-Transkripten (bis 13 kb) mit Hilfe des Protoscript AMV LongAmp Taq RT-PCR-Kit (E5300 S).	Die Phusion High Fidelity-Polymerase bietet die beste Genauigkeit und höchste Prozessivität aller derzeit erhältlichen Polymerasen.I Das Phusion High Fidelity-PCR-Kit (F-553 S/L) enthält alle nötigen Reagenzien zur Durchführung der PCR sowie die entsprechenden Kontrollen und einen Größenstandard für die Überprüfung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese.
Preis			Taq PCR Kit (E5000 S) – 95,- Euro (200 rxn) I Taq PCR Kit with controls (E5100 s) – 110,- Euro (200 rxn) I Crimson Taq PCR Sampler (E0547 S) – 35,- Euro (40 rxn)	Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR Kit (E6400 S): 150,- (30 rxn) I Protoscript AMV LongAmp Taq RT-PCR Kit (E5300 S): 145,- (30 rxn)	60,- Euro (F-553 S, 50 rxn) I 210,- Euro (F-553 L, 200 rxn)

Firma/Kontakt	New England Biolabs GmbH Frankfurt a. Main Tel.: 0800-246-5227 (kostenfrei in D) Tel: 00800/246-52277 (kostenfrei in A) info@de.neb.com www.neb-online.de	Promega GmbH Schildkrötstraße 15 68199 Mannheim Tel.: +49-(0)621-8501-0 Fax: +49-(0)621-8501-222 de_techserv@promega.com www.promega.com	PromoCell GmbH Sickingenstraße 63 / 65 69126 Heidelberg Tel: 06221-64934-0 Fax: 06221-64934-40 www.promokine.de info@promokine.de Dr. Jürgen Becker	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Sandhofer Str. 116 68305 Mannheim www.roche-applied-science.com; Kontakt: Fachliche Information Roche Applied Science Tel.: +49-(0)621-759-8568 mannheim.csc@roche.com	
Produktname	LongAmp Taq PCR Kit (E5200 S)	GoTaq®-Produktfamilie	PCR Mycoplasma Test-Kits	Transcriptor Universal cDNA Master	LightCycler® 480 SYBR Green I Master
Einsatzgebiete	Routine-PCR, Long Range PCR	PCR, Hotstart-PCR und Real-Time PCR	Mykoplasmen-Detektion in Zellkulturen (research use only)	hochsensitive cDNA-Synthese in der 2-Schritt qRT-PCR | geeignet für LightCycler® Kapillar- und Platten-basierte Systeme sowie für alle weiteren qPCR-Systeme | For research use only	Real-Time PCR für qualitative und quantitative Analysen, Produktidentifikation über Schmelzkurvenanalyse | geeignet für das LightCycler® 480 System | For research use only
Beschreibung des Produktes	Optimierter, einzigartiger Blend von Taq und Deep Vent DNA-Polymerase für extrem lange Amplifikate und hohe Zuverlässigkeit im praktischen PCR-Kit mit LongAmp Taq, dNTPs, Reaction Buffer und $MgSO_4$.	Die GoTaq®-Produktfamilie beinhaltet Einzelenzyme , Systeme und Master Mix für alle gängigen PCR- und Real- Time PCR-Applikationen.	PCR-basierte Kits (konventionelle und Real-Time PCR) zum schnellen und sensitiven Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen. Auswertung über Gelelektophorese oder mit Real Time PCR-Cyclern verschiedener Hersteller. | PCR Mycoplasma Test Kit I/C besteht aus: Reaktionsgefäßen mit lyophilisierten Primern, dNTPs und DNA-Template/ Interne Kontrolle; Reaktionsgefäßen mit lyophilisierten Primern, dNTPs, DNA-Template/Interne Kontrolle und DNA-Template/Positivkontrolle; Rehydrierungspuffer; Hot-Start Taq Polymerase; 24, 48 bzw. 96 PCR-Tests | PCR Mycoplasma Test Kit I/RT besteht aus: Reaktionsgefäßen mit lyophilisierten Primern, dNTPs und Mykoplasmen-spezifischer Sonde; Inhibition Control Spike (lyophilisiert); Positiv-Kontrolle; Reaktionspuffer; DNA-freies Wasser; Hot-Start Taq Polymerase; 25 PCR-Tests | PCR Mycoplasma Test Kit II besteht aus: Reaction-Mix (Primer, dNTPs, Taq-Polymerase), Buffer Solution, DNA-Template/Positivkontrolle; 10 bzw. 20 PCR-Tests	Alle Reagenzien für die 2-Schritt qRT-PCR in nur 2 Vials, ready-to-use: Puffer, Random Hexamer Primer, Nukleotide, Enzyme	Ready-to-use 2x-konz. HotStart Mastermix
Lagerung	-20°C	-20°C		-15 to -25°C, 12 Monate	-15 to -25°C, 12 Monate
Besonderheiten/ Extras	zweifach höhere Genauigkeit als Standard Taq | Amplifikation von großen Fragmenten bis 30 kb | Amplifikation schwieriger (GC-reicher) Fragmente	Erfolgreiche PCR auch bei schwierigem DNA- Ausgangsmaterial. Alle Kits für die klassische PCR Applikation beinhalten sowohl einen farblosen, als auch einen grünen Puffer, der direktes Beladen von Gelen erlaubt. Im Real-Time Master-Mix neu entwickelter Farbstoff BRYT-Green für sensitive und robuste qPCR.	Kits detektieren schnell, hochspezifisch und sehr sensitiv: M. agalactiae, M. arginini, M. arthritidis, M. bovis, M. capricolum, M. cloacale, M. falconis, M. faucium, M. fermentans, M. hominis, M. hyorhinis, M. hyosynoviae, M. opalescens, M. orale, M. pneumoniae, M. pirum, M. primatum, M. pulmonis, M. salivarium, M. spermatophilum und M. timone sowie verschiedene Acholeplasma (z.B. A. laidlawii) und Spiroplasma-Arten. Einfache Probenvorbereitung.	Reverse Transkription bis zu 60°C | Hohe Hitzebeständigkeit des Enzyms erlaubt RT von RNA mit >70% GC-Gehalt | Zeitgewinn durch weniger Pipettierschritte | In Kombination mit RealTime ready Cell Lysis-Kit ist die beschleunigte qPCR direkt aus Zell-Lysaten ohne zusätzlichen Aufreinigungsschritt möglich | Informationen unter http://www.roche-applied-science.com/sis/amplification	Ampliconlänge: ≤ 500 – 750 bp | Keine $MgCl_2$-Optimierung erforderlich | Stabil bei RT für 24 h ohne Effizienzverlust | Gesamtassay-Dauer ca. 45 Min. (40 Zyklen + optional 5 Min. Schmelzkurve) | https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp
Preis	105,- Euro (100 rxn)	Routine PCR Anwendungen ab 0,13 Euro/Unit, Real-Time PCR ab 1,10 Euro/ Reaktion	PCR Mycoplasma Test Kit I/C: 129 Euro (24 Tests), 229 Euro (48 Tests), 399 Euro (96 Tests) | PCR Mycoplasma Test Kit I/RT: 229 Euro (25 Tests) | PCR Mycoplasma Test Kit II: 75 Euro (10 Tests), 120 Euro (20 Tests)	560 Euro/100 Reaktionen	420 Euro/500 Reaktionen a 20 µl, 2.940 Euro/ 5000 Reaktionen a 20 µl

Firma/Kontakt	**Roche Diagnostics Deutschland GmbH** **Sandhofer Str. 116** **68305 Mannheim** **www.roche-applied-science.com;** **Kontakt: Fachliche Information Roche Applied Science** **Tel.: +49-(0)621-759-8568** **mannheim.csc@roche.com**		**Sigma-Aldrich Chemie GmbH** **Eschenstr. 5** **D-82024 Taufkirchen** **Dr. Markus Veit** **www.Sigma.com**	**VWR International GmbH** **Hilpertstr. 20a** **64295 Darmstadt** **Tel.: +49-(0)6151-39720** **Fax: +49-(0)6151-3972450** **biotech@de.vwr.com** **Matthias Dornheim**
Produktname	LightCycler® 480 Probes Master	FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack	Extract-N-Amp (XNA) PCR Kits, (Tissue, Blood, Plant, Seed) I Whole Genome Amplification (WGA) Kits I Enhanced Avian HS RT-PCR Kits I LuminoCt, Fast qPCR-Kits	VWR Collection PCR Mastermixe
Einsatzgebiete	Real-Time PCR mit sequenzspezifischen Sonden für qualitative und quantitative Analysen I geeignet für das LightCycler® 480 System I For research use only	Ideal für sequenzgenaue Folgeapplikationen (z.B. Klonierung, Sequenzierung) I Hervorragend für PCR, RT-PCR, Multiplex PCR I Auch für schwierige Anwendungen geeignet I For research use only	XNA: Schnelles Screening, Genotypisierung I WGA: z.B. Comparative Genomic Hybridisation; Downstream-Applikation z.B. für CHIP I qPCR im Fast-Modus	Endpunkt-PCR
Beschreibung des Produktes	Ready-to-use 2x-konz. HotStart Mastermix I dNTP Mix mit dUTP für carry-over Prevention	HotStart Polymerase I Proofreading-Aktivität I Amplifikate bis 5 kb I Effiziente, nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	XNA: DNA Extraktions- und Amplifikationsreagenzien in einem Kit I WGA von Einzelzellen, FFPE-Gewebe und präparierter DNA I RT: Oligo dT und Random Priming I LuminoCt: qPCR Lauf in nur 25 min.	Taq DNA MasterMixe 1,1x und 2,0x Reaktionsmixe mit 1,5mM oder 2,0mM $MgCl_2$-Konzentration
Lagerung	-15 to -25°C, 12 Monate	-15 to -25°C, entsprechend dem Haltbarkeitsdatum	Lagerung bei -20°C	Lagerung bei -20°C
Besonderheiten/ Extras	Ampliconlänge: : ≤ 500 – 1000 bp I 5´-3´ Exonuklease-Aktivität I Keine $MgCl_2$-Optimierung erforderlich I Stabil bei RT für 24 h ohne Effizienzverlust I Gesamtassay-Dauer ca. 40 Min. (40 Zyklen) I https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp	4-fach höhere Genauigkeit als Taq-DNA Polymerase I Geeignet für Multiplex-PCR mit bis zu 18 Amplifikaten in einem Ansatz unter optimalen Bedingungen I TA-Klonierung I Protokolle unter http://www.roche-applied-science.com/sis/amplification I Auch ohne dNTP-Mix erhältlich	XNA: Auch als RED-Readymixe oder als SYBR-Green qPCR Applikation verfügbar I WGA4: Whole Genome Amplifikation von Einzelzellen I LuminoCt: SYBR-Green und Probe-based erhältlich	Für einen PCR-Ansatz einfach Primer und Template hinzu pipettieren
Preis	400 Euro/500 Reaktionen a 20 µl I 2.800 Euro/ 5.000 Reaktionen a 20 µl	82 Euro/125 units bzw. 50 Standardreaktionen a 50 µl I 266,50 Euro/500 units bzw. 200 Standardreaktionen a 50 µl		605 Euro für 2.500 Reaktionen

Tech-Transfer – Arbeiten an der Schnittstelle

Dr. Sabina Heim, Technology Manager, Ascenion GmbH, heim@ascenion.de



Sabina Heim studierte Biologie an der Universität Braunschweig und wechselte für die Promotion an die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), das heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Nach der Promotion (1986) blieb sie für drei Jahre als Post-Doc an der Großforschungseinrichtung. Nach 7-jähriger Erziehungspause kehrte Heim für sechs Jahre als wissenschaftliche Mitarbeiterin an die GBF zurück und war an der Etablierung der Proteomicsplattform des Instituts beteiligt. Im April 2002 wechselte Heim als Technologie-Manager zu dem Technologietransfer-Unternehmen Ascenion GmbH mit Sitz in München. Bis heute ist sie in dessen Außenstelle auf dem Campus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) tätig.

Der Anfang meiner beruflichen Laufbahn entspricht einer klassischen Forscherkarriere: Biologiestudium an der Technischen Universität Braunschweig, gefolgt von Promotion und Post-Doc-Zeit an der GBF in Braunschweig, dem heutigen Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI).

Start in der Wissenschaft

Mit Projekten auf den Gebieten der Hefegenetik, Enzymologie und Signaltransduktion in pflanzlichen Zellen hatte ich mich fachlich bewusst breit aufgestellt, um bei meiner beruflichen Entwicklung flexibler zu sein. Als dreifache Mutter entschied ich mich dann aber zunächst für eine knapp siebenjährige Pause – nicht ganz freiwillig, seinerzeit herrschte akuter Mangel an Kinderbetreuungsangeboten.

Rückkehr und Neustart

Von daheim arbeitete ich als Autorin an Thiemes Römpp Biotechnologie-Lexikon mit, bis mir 1996 schließlich der Wiedereinstieg in die Forschung gelang. Sechs Jahre lang habe ich dann zusammen mit meinen Kollegen vielfältige Projekte vorangebracht, unter anderem in der Sensorik, funktionellen Genomanalyse und Proteomik. 2001 ergriff ich dann die Möglichkeit, mir noch einmal ein völlig neues Arbeitsfeld im Umfeld der Forschung zu erschließen: den Technologietransfer. Die Ascenion GmbH, bis heute mein Arbeitgeber, war gerade auf Initiative mehrerer Einrichtungen der Helmholtz-Gemeinschaft gegründet worden, um den Technologietransfer im Bereich Life Sciences zu verbessern. Ich bewarb mich als Technologie-Scout für das HZI, bekam den Job und wechselte von der Bench im Labor an den Schreibtisch im Büro. Bis heute habe ich diesen Schritt nicht bereut.

Zwischen den Welten unterwegs

Als Technologie-Manager betreue ich inzwischen drei Forschungseinrichtungen: Das HZI, das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben und das Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena. Zu meinen Aufgaben gehört die Identifikation von kommerziell aussichtsreichen Erfindungen ebenso wie die Entwicklung von Vermarktungsstrategien und deren Umsetzung in enger Kooperation mit meinen Kollegen. Dabei bin ich wortwörtlich viel unterwegs: Zum einen pflege ich engen Kontakt zu den Wissenschaftlern und administrativen Mitarbeitern in der Forschung. Ich besuche „meine" Institute regelmäßig, um ein Gespür für aktuelle Entwicklungen zu bekommen und die Basis für eine vertrauensvolle Zusammenarbeit zu schaffen. Zum anderen nehme ich an Konferenzen wie der BIO oder BioPartnering teil, um Kontakte zur Industrie zu knüpfen und die Vermarktung der Technologien von unseren Partnerinstituten zu unterstützen. Kommt es zu Vertragsverhandlungen, sitze ich oft auch mit am Verhandlungstisch. Schließlich komme ich immer wieder mit meinen Kollegen aus den insgesamt sechs Ascenion-Niederlassungen zusammen, um Erfahrungen auszutauschen und einen Katalog von „Best Practices" für den Technologietransfer zu entwickeln. Auch wenn jedes der 19 Institute und Unikliniken, die wir momentan zusammen betreuen, seine eigenen Herausforderungen stellt, gibt es doch Gemeinsamkeiten, was die entscheidenden Hürden und Erfolgsfaktoren für den Technologietransfer anbelangt.

Von der Forschung in die Anwendung

Was mir besonders viel Spaß macht: Obwohl ich die Bench im Labor verlassen habe – also nicht mehr direkt zum wissenschaftlichen Fortschritt beitrage – bin ich ganz dicht am Puls der Forschung. Jede neue Erfindungsmeldung, die mir auf den Tisch flattert, ist spannend und herausfordernd. Die Breite meiner wissenschaftlichen Ausbildung und Erfahrung kommt mir jetzt zugute, ebenso wie das Know-how, das ich inzwischen durch zahlreiche Fortbildungen im Bereich Patentwesen und Vermarktung erworben habe. Außerdem kann ich jederzeit auf die Analysten, Juristen, Marktforscher und Unternehmensberater in unserem Team zukommen, wenn ich besondere Expertise brauche. Damit ein Projekt gelingt, brauche ich jedoch ebenso die Unterstützung der Wissenschaftler und des administrativen Personals der zugehörigen Forschungseinrichtung. Die Rolle als Moderator zwischen den vielfältigen Interessen kann auch ganz schön Nerven kosten, insbesondere dann, wenn es um Gemeinschaftserfindungen geht, an denen mehrere Forscher unterschiedlicher Institute beteiligt sind und wenn von Seiten der Industrie mehrere Interessenten ins Spiel kommen. Letztlich sind wir jedoch immer Anwalt unserer Auftraggeber, also der Wissenschaft. Meine Erfahrung in der Forschung ist für mich deshalb nicht nur fachlich, sondern auch menschlich hilfreich. Ich kann sehr gut nachfühlen, wie undurchschaubar die Patent- und Vertragssprache aus Sicht eines Wissenschaftlers wirken kann und verstehe, wie der Wissenschaftsbetrieb an öffentlichen Einrichtungen organisiert ist. Und wenn die Zusammenarbeit gelingt, ist es für mich äußerst befriedigend, einen kleinen Beitrag dazu geleistet zu haben, dass ein vielversprechendes Projekt in die Anwendung vorankommt. Ein gutes Beispiel ist die Lizenzierung eines neuen potenziellen Antibiotikums gegen Tuberkulose aus dem HKI. Noch immer ist es ein langer Weg bis zum Markt, aber durch den Deal mit Inverness Medical sind die Aussichten, das Projekt in die medizinische Anwendung zu überführen, deutlich gestiegen.

www.laborwelt.de

Akademischer Stellenmarkt

Veröffentlichen Sie Ihre Stellenanzeigen zielgruppengerecht in unserem akademischen Stellenmarkt (auch online), der allen nicht-kommerziellen Instituten für ihre Stellenausschreibungen kostenlos zur Verfügung steht. Bitte senden Sie dazu Ihre Anzeige (Ausschreibungstext als Word-Datei, Logo – jpg oder tiff, 300 dpi Auflösung) an a.macht@biocom.de. Annahmeschluss für die nächste LABORWELT-Ausgabe „Cell-based Assays, Automation" (Erscheinungstermin 17.02.2011) ist der 4. Februar 2011.

HPI Heinrich Pette Institute
Leibniz Institute for Experimental Virology

Junior Group Leader in Virology

The Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology (HPI) invites applications for a position of an independent Junior Group Leader starting at July 1, 2011.

Applicants should hold a doctoral degree and have postdoctoral experience. The position is for an initial 6-year appointment with the possibility of extension. Adequate laboratory space (joint use of S3 laboratories and small animal facilities), equipment, technical and scientific assistance (1 Technician, 1 Postdoc), funding and access to technology platforms, offering state-of-the-art infrastructure for imaging, and cell manipulation will be provided. The acquisition of additional extra-mural funding is expected. Payment and social benefits will be in accordance with the regulations of the German TV-AVH (salary agreement for public service employees).

The research of the junior group will focus on human pathogenic viruses and will be part of the inter-departmental research programs "Viral Life Cycles and Mechanisms of Pathogenesis" and/or "Antiviral Targets and Strategies" at the Heinrich Pette Institute. Collaboration with the existing departments and research groups of the institute is strongly encouraged.

The Heinrich Pette Institute, a member of the Leibniz Association (http://www.wgl.de), is an independent research institution that is affiliated with the University of Hamburg by a cooperation agreement. For further information about the Heinrich Pette Institute please visit our web site: http://www.hpi-hamburg.de.

The Heinrich Pette Institute aims to increase the percentage of women in research, and therefore encourages women scientists to apply. Equally qualified candidates with disabilities will be considered preferentially.

Applicants should send their CV, a letter of motivation, 2-3 page research plan, reprints of the top 5 publications, and contact details of three referees by regular or electronic mail to: Heinrich Pette Institute, personnel department, Martinistraße 52, D- 20251 Hamburg, personnel@hpi.uni-hamburg.de .

Applications must be received before February 28, 2011.

Leibniz Gemeinschaft

TOTAL E-QUALITY

HOCHSCHULE BIBERACH
BIBERACH UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Die Hochschule Biberach nimmt zum Wintersemester 2011/2012 den neuen Studiengang Industrielle Biotechnologie in ihr Studienprogramm auf. Vorbehaltlich der endgültigen Genehmigung ist für den Aufbau dieses neuen Studiengangs zum 01.03.2011 eine

W 2 - Professur
(Kennziffer BPT 03)

für das Lehrgebiet **Chemie und Biokatalyse** zu besetzen.

Bewerber sollten über einen überdurchschnittlichen Hochschulabschluss und eine Promotion sowie über mehrjährige einschlägige Erfahrungen in der Industrie vorzugsweise im biotechnologischen Umfeld verfügen.

Die/der zukünftige Stelleninhaber/in soll Vorlesungen und praktische Übungen in den Lehrgebieten anorganischer, analytischer und organischer Chemie, Biokonversion, Biomaterialien und in verwandten Disziplinen übernehmen. Darüber hinaus wird die aktive Mitarbeit in der Selbstverwaltung und in Gremien erwartet.

Es wird vorausgesetzt, dass die/der zukünftige Stelleninhaber/in beim Auf- und Ausbau sowie bei der Fortentwicklung des Studiengangs Industrielle Biotechnologie tatkräftig mitarbeitet. Dazu gehören auch die Konzeption und Übernahme von Lehrveranstaltungen aus dem Bereich anderer, noch nicht besetzter Professorenstellen und der Ausbau eines internationalen Netzwerkes für Kooperationen mit Hochschulen und Industrie. Die Fähigkeit zur Durchführung von Lehrveranstaltungen in englischer Sprache wird vorausgesetzt.

Nähere Informationen zur Dienstaufgabe, zu den Bewerbungs- und Einstellungsvoraussetzungen und die ausführliche Stellenausschreibung finden Sie unter
www.hochschule-biberach.de/sections/service/stellenanzeigen

Bitte senden Sie Ihre Bewerbung unter Angabe der Kennziffer mit den üblichen Unterlagen bis **28.01.2011** an die Hochschule Biberach.

HBC Hochschule Biberach I Personalabteilung
Karlstr. 11, 88400 Biberach, Tel. Nr. 07351/582-120
www.hochschule-biberach.de

Alle Stellenanzeigen finden Sie auch unter:

www.laborwelt.de

OncoRay
National Center for Radiation Research in Oncology Dresden

ZIK0210164

OncoRay – National Center for Radiation Research in Oncology Dresden hat das Ziel, Krebsbehandlung mittels biologisch individualisierter, technisch optimierter Strahlentherapie zu verbessern. OncoRay wird getragen durch die Technische Universität Dresden, das Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, sowie dem Forschungszentrum Dresden-Rossendorf e.V., ist an der Medizinischen Fakultät angesiedelt und wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

Zur Erweiterung der Forschungsgruppe „Biologisches und Molekulares Imaging" ist ab sofort eine Stelle als

Medizinisch-technischen Röntgenassistentin/en (MTRA)

oder ähnliche Qualifikation

vorerst befristet bis 31.12.2011 (mit der Option einer bis zu 2-jährigen Verlängerung) zu besetzen.

Aufgaben:

- Koordination von Untersuchungen in der präklinischen Imagingplattform des OncoRay
- Technische Durchführung und Auswertung von Studien an µPET, µCT, µUS und optischer Bildgebung
- Bereitstellung dieser Technologien für andere Arbeitsgruppen (z.B. Einarbeitung, Supervision) auf Basis der jeweils gültigen Geschäftsordnung
- Qualitätsmanagement der Core Facility.

Anforderungen:

- Technische Ausbildung in der Bildgebung an und fundierte Erfahrung mit mindestens zwei der genannten Verfahren, bevorzugt µPET und µCT
- Erfahrungen in Bildverarbeitung
- Selbständige Arbeitsorganisation und Organisationstalent
- Kooperations- und Teamfähigkeit mit den Gruppenmitgliedern und den Kooperationspartnern
- Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren
- Befähigung zum Umgang mit offenen Radionukliden

Schwerbehinderte sind ausdrücklich zur Bewerbung aufgefordert.

Ihre aussagefähigen Bewerbungsunterlagen richten Sie bitte per Post (mit frankiertem Rückumschlag) unter Angabe der Kennziffer **ZIK0210164** bis zum **17.12.2010** an:

National Center for Radiation Research in Oncology Dresden, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden, Wissenschaftlicher Koordinator Stefan Pieck, Fetscherstraße 74, PF 41, 01307 Dresden; Telefon: +49-351-458 5288, Fax: +49-351-458 7311 oder Email an: Stefan.Pieck@oncoray.de.

Paul-Ehrlich-Institut

Das Paul-Ehrlich-Institut ist eine wissenschaftliche Einrichtung des Bundes, das als Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel zuständig ist und auf den damit verbundenen Gebieten der Lebenswissenschaften (z. B. Virologie, Bakteriologie, Allergologie, Immunologie, Medizinische Biotechnologie, Hämatologie) Forschung betreibt. Im Fachgebiet „Avitale Gewebezubereitungen, Xenogene Zelltherapeutika" der Abteilung Medizinische Biotechnologie ist nachfolgende Position vakant:

Dokumentations-Assistent/-in

Bewerbungsfrist: 03.12.2010 / Stellenbewertung: E 8 TVöD / Arbeitsbeginn: zum nächstmöglichen Zeitpunkt

Aufgabenprofil:

Anlegen und Pflege einer Datenbank in Abstimmung mit dem Software-Anbieter

- Dateneingabe, Berichterstellung
- Übernahme von administrativen Aufgaben innerhalb der Abteilung
- Kontakt mit nationalen und europäischen Behörden/Firmen
- Mitwirkung bei der Bearbeitung von Genehmigungsanträgen gemäß § 21 a AMG
- Vorbereitung von Sitzungen/Meetings
- Erstellen von Sitzungsprotokollen
- Koordination von Terminen

Anforderungsprofil:

- Abgeschlossene Ausbildung als Dokumentations-Assistent/-in oder vergleichbarer Ausbildungsabschluss
- Interesse an Themen der Lebenswissenschaften und Medizin
- Bereitschaft zur Weiterbildung

Das Beschäftigungsverhältnis ist vorerst auf 3 Jahre befristet. Die wöchentliche Arbeitszeit beträgt 19,25 Stunden. Die Eingruppierung erfolgt gemäß den tariflichen Bestimmungen des TVöD-Bund.

Auswärtigen Bewerbern ist das Paul-Ehrlich-Institut bei der Wohnraumbeschaffung behilflich. Trennungsgeld und Umzugskosten werden nach den gesetzlichen Vorschriften gewährt. Schwerbehinderte werden bei gleicher Eignung bevorzugt berücksichtigt. Das Paul-Ehrlich-Institut fördert die Gleichstellung von Frauen und Männern und ist daher an Bewerbungen von Frauen interessiert.

Fachliche Auskünfte erteilt Ihnen gerne Herr Prof. Dr. R. Tönjes (Telefon 06103 77-4010, Fax 06103 77-1255, toera@pei.de, www.pei.de).

Bitte richten Sie Ihre vollständige Bewerbung an:
Personalreferat des Paul-Ehrlich-Instituts
Paul-Ehrlich-Straße 51-59, 63225 Langen
www.pei.de

Kontakt für weitere Informationen:
E-Mail personal@pei.de
Telefon 06103 77-1100
Bitte geben Sie die Bewerbungskennziffer 37/2010 an.

Das Paul-Ehrlich-Institut ist ein Bundesinstitut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit

Julius-Maximilians-
UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

ZINF
IMIB

Das **Zentrum für Infektionsforschung** der Julius-Maximilians-Universität sucht eine/n

Technischen/n Assistentin/en oder Biologielaborantin/en

Die entsprechende Forschungsgruppe befasst sich schwerpunktmäßig mit der Charakterisierung von molekularen Mechanismen regulatorischer RNA in Bakterien und Eukaryonten. Weitere Informationen finden Sie im Internet unter: http://www.infektionsforschung.uni-wuerzburg.de/.

Bewerber/innen sollten mit Methoden der allgemeinen Molekularbiologie, Mikrobiologie und/oder Zellbiologie vertraut sein. Die Aufgaben sollen nach Einarbeitung weitgehend selbständig durchgeführt werden. Die Stelle kann ab dem 1. Januar 2011 oder nach Absprache besetzt werden und ist zunächst auf 3 Jahre befristet. Die Stelle ist auch in Teilzeit besetzbar.

Die Vergütung erfolgt nach TV-L. Schwerbehinderte Bewerberinnen und Bewerber werden bei ansonsten im Wesentlichen gleicher Eignung bevorzugt eingestellt.

Bewerbungen bitte mit Betreff „TA-Stelle AG Sharma" schriftlich oder per Email bis 31. Dezember 2010 an:

kristina.schaeffer@uni-wuerzburg.de / Zentrum für Infektionsforschung, Josef-Schneider-Str. 2, Bau D15, 97080 Würzburg

PhD student position (50% E13) in brain tumor research

The Institute of Neuropathology, University Hospital Muenster, offers a PhD student position (50% E13) in brain tumor research. The position is for an initial 2-year period (starting January 2011) with an option for a third year.

The focus of this project is on atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT), highly malignant pediatric brain tumors poorly responding to therapy. The applicant will identify genes and pathways relevant for the pathogenesis of AT/RT in cell culture (SMARCB1-deficient human rhabdoid tumor cell lines) as well as a mouse xenograft model. After examining the role of products of identified genes in tumor samples from the European Rhabdoid Tumor Registry, this project will contribute novel prognostic and predictive markers for the treatment of children with AT/RT.

This is an exciting interdisciplinary project based on our expertise in pediatric brain cancers. We are seeking highly motivated applicants with a strong background in cell culture and siRNA transfection.

Please send applications, preferably via e-mail (hasselbl@uni-muenster.de), to:

Martin Hasselblatt, MD
Institute of Neuropathology
University Hospital Muenster
Domagkstr. 19
48129 Muenster

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

qPCR 2011 / 28 March – 1st April 2011

Symposium & Industrial Exhibition & Application Workshops

5th intern. qPCR Event, Technical University Munich, Freising-Weihenstephan, Germany

www.qPCR2011.net

The event will focus on all aspects of qPCR technology and its applications in research and diagnostics. Leading academic researchers and industrial contributors in the qPCR field will participate in the symposium, which will be an arena for fruitful discussions between researchers of different backgrounds. The Symposium, the Industrial Exhibition and associated hands-on Workshops offer an overview of the present knowledge and future developments in qPCR technology and its wide application field. The focus of the event will be on:

Molecular Diagnostics: from single-cells to Next Generation Sequencing

28th–30th March – International qPCR Symposium

- **Keynote lectures:** SA. Bustin, Dennis YM Lo, M. Kubista, Yu Hui Rogers, Jo Vandesompele
- **Invited speakers:** A. Stahlberg, J. Helemanns, Afif Abdel Nour, KH. Hasenstein, A. Nitsche, K. Knudtson, F. Pattyn, A. Untergasser, … and much more
- **Industrial talks:** Roche, Agilent Technologies, Bio-Rad, Qiagen, Exiqon, Nanostring, IDT, Biosearch Technologies, Sigma Life Science, Thermo Fisher Scientific, …
- **Symposium Chair:** MW. Pfaffl

28th–30th March – qPCR Industrial Exhibition
with more than 30 leading qPCR companies

31th March – 1st April – qPCR Application Workshops held by tataabiocenter germany

Symposium Sessions:
- Molecular diagnostics in single-cells
- High throughput analysis in qPCR & Next Generation Sequencing
- MIQE and QM strategies in qPCR
- small RNAs qPCR - microRNA and siRNA Applications
- Digital PCR & Nano-fluidics
- qPCR BioStatistics & Bio-Informatics

Contact:
qPCR2011@wzw.tum.de

Event organization:
Martina Reiter, BioEPS GmbH, Freising, Germany, Martina.Reiter@BioEPS.com

BioEPS
Bioscience Events & PCR Services

Translationale Onkologie
an der Universitätsmedizin
der JGU Mainz

TRON

Job vacancy for a

Molecular Biologist Technician

to work in our next-generation sequencing lab

TRON, the Institute for Translational Oncology and Immunology, is a new, rapidly growing biopharmaceutical institute seeking to diagnosis and treat unmet medical needs through novel therapies. TRON is located in Mainz, Germany, has strong connections to start-up BioNTech AG, Ganymed AG, the University of Mainz, and is developing novel platforms for therapies and biomarkers. As part of our team, you'll have the opportunity to collaborate with talented and dedicated colleagues, develop and expand your career, be on the cutting-edge of science, and help treat disease.

TRON is building a multidisciplinary molecular biology and computational genomics unit with experience in computational genomics, biotechnology, next-generation sequencing (NGS), and molecular biology. We are searching for a molecular biologist technician to further TRON's translational biomarker and drug development programs.

DUTIES AND RESPONSIBILITIES

- Extract RNA and DNA from tissue samples
- Run an Illumina HiSeq next-generation sequencing (NGS) platform
- Work with biostatisticians, molecular biologists, immunologists, and clinicians to identify new drug targets
- Participate in the invention and development of new protocols and biotechnology platforms

EXPERIENCE & QUALIFICATIONS

- Experience with nucleic acid molecular biology (DNA and RNA)
- Experience working in a next-generation sequencing or microarray facility
- Experience generating large genomic datasets, such as with next-generation sequencing or microarrays
- Attention to detail and practical problem-solving skills
- Excellent teamwork and communication skills
- Willingness to work in an exciting and dynamic environment

Preferred

- Experience working with clinical RNA or DNA samples
- Experience working with a LIMS system
- Familiarity with disease-relevant biology, particularly oncology
- Experience generating genetic and biological data for patient stratification, biomarker discovery, and target selection

We look forward to your application.

Contact: Kerstin Lehrbach
kerstin.lehrbach@tron-mainz.de

Ausbildungsplatz zum/zur Biologielaborant/in

Wir, die Arbeitsgruppe Synaptische Plastizität am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, bieten zum **1. September 2011** einen Ausbildungsplatz zum/zur Biologielaborant/in für Bewerber (m/w) mit Mittlerer Reife oder Abitur an.

Sie sollten gute/sehr gute Noten in naturwissenschaftlichen Fächer (Biologie, Chemie, Physik und Mathematik) vorweisen können und über gute EDV- und Englisch-Kenntnisse verfügen. Darüber hinaus sollten Sie kommunikativ sein und gerne in einem internationalen Team arbeiten.

Als Biologielaborant/-in arbeiten Sie in unseren Laboratorien an der Lösung vielseitiger Fagestellungen mit. Den Schwerpunkt der Arbeit bilden: Molekularbiologie, Gentechnik, Histologie, genetisches Arbeiten mit Fruchtfliegen sowie quantitative Mikroskopie. Auszubildende lernen ein breites Spektrum an Arbeitstechniken und Einsatzgebieten kennen.

Ein bezahltes Vorabpraktium von flexibler Dauer (z.B. für Abiturienten 2010 die zum 1. September 2011 bei uns eine verkürzte Lehre beginnen möchten, aber erst noch Wehr/Zivildienst leisten) ist möglich.

Bitte richten Sie eine aussagekräftige Bewerbung bis zum **20.12.2010** an:
Dr. Tobias Rasse, AG Synaptic Plasticity (HIH), Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen, c/o CIN, Paul-Ehrlich Straße 15-17, 72076 Tübingen, Germany

http://www.hih-tuebingen.de/synaptic-plasticity/job-openings/

Julius-Maximilians-
UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

ZINF
IMIB

Das **Institut für Molekulare Infektionsforschung** der Julius-Maximilians-Universität sucht eine/n

Technischen/n Assistentin/en oder Biologielaborantin/en

Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. Jörg Vogel befasst sich schwerpunktmäßig mit der Charakterisierung von molekularen Mechanismen regulatorischer RNA in Bakterien und Eukaryonten (siehe auch http://www.infektionsforschung.uni-wuerzburg.de/).

Bewerber/innen sollten mit Methoden der allgemeinen Molekularbiologie, Mikrobiologie und/oder Zellbiologie vertraut sein. Die Aufgaben sollen nach Einarbeitung weitgehend selbständig durchgeführt werden. Die Stelle kann ab dem 1. Januar 2011 oder nach Absprache besetzt werden und ist zunächst auf 3 Jahre befristet. Die Stelle ist auch in Teilzeit besetzbar.

Die Vergütung erfolgt nach TV-L. Schwerbehinderte Bewerberinnen und Bewerber werden bei ansonsten im Wesentlichen gleicher Eignung bevorzugt eingestellt.

Bewerbungen bitte mit Betreff „TA-Stelle AG Vogel" schriftlich oder per Email bis 31. Dezember 2010 an:

monika.meece@uni-wuerzburg.de / Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Josef-Schneider-Str. 2, Bau D15, 97080 Würzburg

UniversitätsKlinikum Heidelberg

Die Abteilung Wissenschaftsmanagement an der Abteilung Innere Medizin III (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Hugo A. Katus) des Universitätsklinikums Heidelberg sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt eine/n

Wissenschaftler/in mit Erfahrung in Wissenschaftskoordination

(in Vollzeit, ggf. Teilzeit möglich)

Die Stelle ist zunächst auf 1 Jahr befristet, eine Verlängerung ist möglich.

Die Aufgabe des/der Stelleninhabers/-inhaberin besteht in der Unterstützung der Leiterin bei der allgemeinen Koordination, bei der Erstellung von wissenschaftlichen Anträgen und Berichten, dem Entwurf von Präsentationen, der Mitarbeit im Vertragsmanagement und der Öffentlichkeitsarbeit sowie Pflege des Internetauftritts verschiedener großer Konsortien der kardiovaskulären Genomforschung sowie großer interdisziplinärer Projekte.

Voraussetzung ist ein Studium im biomedizinischen Bereich und entsprechende wissenschaftliche Erfahrung. Erfahrungen im Wissenschaftsmanagement sowie gute Kommunikationsfähigkeit sind sehr erwünscht. Der sichere Umgang mit dem Microsoft-Office Paket, insbesondere Word und Powerpoint sowie mit allgemeinen PC-Anwendungen, ist erforderlich. Kenntnisse in Bildbearbeitung (Photoshop oder Corel Draw) sind von Vorteil.

Die Vergütung erfolgt nach TV-L/Drittmitteln.

Bitte richten Sie Ihre Bewerbung mit den üblichen Unterlagen innerhalb von vier Wochen nach Bekanntgabe der Stellenausschreibung an: **Universitätsklinik Heidelberg, Medizinische Klinik III, - Kardiologie -, Frau Dr. Tanja M. Weis, Im Neuenheimer Feld 410, 69120 Heidelberg.**

Telefonische Informationen vorab erteilt: Dr. Tanja Weis, Tel. 06221-56-8010, oder per E-Mail: tanja.weis@med.uni-heidelberg.de

---

Das Universitätsklinikum strebt die Erhöhung des Frauenanteils in den Bereichen an, in denen sie unterrepräsentiert sind. Entsprechend qualifizierte Frauen werden um ihre Bewerbung gebeten.

Schwerbehinderte werden bei gleicher Eignung vorrangig eingestellt.

improve world health
start a scientific career
come to berlin

10 Fellowships for Doctoral Candidates

to start October 2011 (or earlier)

Deadline for Application – January 15, 2011

The ZIBI Graduate School Berlin is an international doctoral program for research in infection biology and immunology. Research projects are in the areas of

- Host-pathogen interaction
- Pathogenicity mechanisms
- Host-pathogen co-evolution
- Chronic inflammations
- Autoimmune diseases
- Development and differentiation of immune cells
- Neuroimmunology
- Antiviral and antimicrobial strategies and vaccine development

We offer outstanding training and support in an excellent scientific network. Faculty members are affiliated to well-known institutes such as the Max Planck Institute for Infection Biology, the German Rheumatism Research Center, the Institute for Zoo and Wildlife Research as well as to institutes of the Humboldt Universität zu Berlin, the Freie Universität Berlin and the Charité - University Medicine Berlin.

Our mission is to develop students into creative, responsible and self-confident young researchers.
We are looking for highly motivated students of all nationalities who are strongly committed to research and share our vision to improve world health.

For further information and the online application form, please visit our website:

www.zibi-graduateschool-berlin.de

Contact:
ZIBI Graduate School, c/o Dr. Susann Beetz,
Max Planck Institute for Infection Biology
Campus Charité Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany
Phone: +49 (0) 30 28460160, email: info@zibi-graduateschool-berlin.de

The ZIBI Graduate School is the roof of:

International Max Planck Research School for Infectious Diseases and Immunology (IMPRS-IDI) funded by the Max Planck Society (MPG) Research Training Group "Genetic and Immunologic Determinants of Pathogen- Host-Interactions" (GRK1121) funded by the German Research Foundation (DFG).

Seite bitte abtrennen – per Fax an 030-264921-11

Kontakt zu Verbänden

Die Mitglieder der nachfolgenden Fachgesellschaften erhalten LABORWELT regelmäßig mit freundlicher Empfehlung ihrer Organisationen. Wer sich darüber hinaus für eine Mitarbeit oder einen Beitritt interessiert, erreicht die Fachgesellschaften unter den folgenden Kontaktdaten:

Ich interessiere mich für
- ☐ den Beitritt
- ☐ Unterstützung für Jungwissenschaftler
- ☐ Interessenvertretung
- ☐ eine Spende
- ☐ Fachgruppen im Bereich

Verband (siehe unten, bitte ankreuzen)

☐ Bitte kontaktieren Sie mich

Name Firma

Tel. Fax

E-Mail

☐ Dt. Ver. Gesell. f. Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)

Geschäftsstelle der DGKL
Im Mühlenbach 52 b
53127 Bonn
Tel.: +49-(0)-228-92-68-9522
Fax: +49-(0)-228-92-68-9527
geschaeftsstelle@dgkl.de
www.dgkl.de

☐ Gesellschaft für Genetik

c/o HZM – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit/Inst. of Developmental Genetics
Tel.: +49-(0)-89-3187-2610
Fax: +49-(0)-89-4620
www.gfgenetik.de

☐ Netzwerk Nutrigenomik

Netzwerk Nutrigenomik
Arthur-Scheunert-Allee 114
14558 Nuthetal
Tel.: +49-(0)-33200-88-301
Fax: +49-(0)-33200-88-541
mail@nutrigenomik.de
www.nutrigenomik.de

☐ Deutsche Gesellschaft für Proteomforschung

c/o MPI für Biochemie
Am Klopferspitz 18a
82152 Martinsried
Tel.: +49-(0)-89-1897-9007
Fax: +49-(0)-89-1897-9009
c.kleinhammer@dgpf.org
www.dgpf.org

☐ Gesellschaft für Signaltransduktion

c/o Prof. Dr. Ralf Hass
Med. Hochschule Hannover
AG Biochemie u. Tumorbiol.
30625 Hannover
Tel.: +49-(0)-511-532-6070
Fax: +49-(0)-511-532-6071
www.sigtrans.de

☐ RNA-Netzwerk

c/o Prof. Dr. Volker A. Erdmann
Freie Universität Berlin
Thielallee 63, 14195 Berlin
Tel.: +49-(0)-30-8385 6002
Fax: +49-(0)-30-8385 6413
erdmann@chemie.fu-berlin.de
www.rna-network.com

☐ BIO Deutschland

Tegeler Weg 33/
berlinbiotechpark
10589 Berlin
Tel.: +49-(0)-30-3450593-30
Fax: +49-(0)-30-3450593-59
info@biodeutschland.org
www.biodeutschland.org

☐ Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie

Geschäftsstelle der DGPT
Achenbachstraße 43
40237 Düsseldorf
Tel.: +49-(0)-211-600-692-77
Fax: +49-(0)-211-600-692-78
mitglieder@dgpt-online.de
www.dgpt-online.de

☐ Verband der Diagnostica-Industrie e.V.

Verband der
Diagnostica-Industrie e.V.
Neustädtische Kirchstr. 8
10117 Berlin
Tel.: +49-(0)-30-200-599-40
Fax: +49-(0)-30-200-599-49
vdgh@vdgh.de
www.vdgh.de

☐ Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)

c/o Institut für Hygiene und Med. Mikrobiologie
Carl-Neuberg-Straße 1
30625 Hannover
Tel.: +49-(0)-511-532-4655
Fax: +49-(0)-511-532-4355
www.dghm.org

☐ Nationales Genomforschungsnetz

c/o DKFZ
Im Neuenheimer Feld 580
69120 Heidelberg
Tel.: +49-(0)-6221-424-743
Fax: +49-(0)-6221-423-454
S.Argo@dkfz-heidelberg.de
www.ngfn.de

☐ Österreichische Reinraumgesellschaft (ÖRRG)

ÖRRG
Neudorf 41
A-8262 Ilz
Tel.: +43-(0)-3385-8117
Fax: +43-(0)-3385-8117
office@oerrg.at
www.oerrg.at

☐ bts (Biotechnologische Studenteninitiative e.V.)

c/o BIOCOM
Stralsunder Straße 58–59
13355 Berlin
Tel.: +49-(0)-2649-21-21
Fax: +49-(0)-2649-21-11
www.bts-ev.de

☐ Deutsche Gesellschaft für Neurogenetik

Institut für Humangenetik
Calwer Straße 7
72076 Tübingen
Tel.: +49-(0)-7071-2977692
Fax: +49-(0)-7071-295171
peter.bauer@
med.uni-tuebingen.de
www.hih-tuebingen.de/dgng/

☐ Österreichische Ges. f. Laboratoriumsmedizin & Klinische Chemie

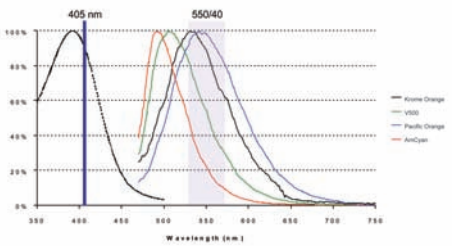
ÖGLMKC Geschäftsstelle
Infomedica-KEG, Xenius Behal
Tullnertalgasse 72
A-1230 Wien
Tel./Fax: +43-(0)-1889-6238
office@oeglmkc.at

www.oeglmkc.at

Beckman Coulter

Farbstoff für die Zytometrie

Der neuartige organische Fluoreszenzfarbstoff Krome Orange von Beckman Coulter wird von violettem Licht angeregt. Das Fluorophor erweitert die Palette verfügbarer Optionen sowie die Sensitivitätsgrenzen von Farbstoffen für violette Laser. Gängige Gating-Marker lassen sich problemlos auf dieses Fluorochrom übertragen und machen damit andere Kanäle für die Verwendung seltenerer Marker frei, so dass vielseitigere Durchflusszytometrie-Anwendungen mit zehn Farben möglich sind. Die Anregungs- und Emissionsmaxima von Krome Orange liegen bei 398 nm bzw. 528 nm, und der Farbstoff liefert ein helleres Signal als Pacific Orange-Konjugate bei äquivalenten spektralen Überlappungen in angrenzende Kanäle. Krome Orange ist mindestens so hell wie V500 und kann mehr als die doppelte Separation von Zellpopulationen erzielen wie Pacific Orange-Konjugate, wobei die Kompensation gegen Pacific Blue geringer ist. Krome Orange-Konjugate erreichen ihre optimale Leistung in violettem Laserlicht mit einem 550/40 Bandpassfilter – der Standard-FL10-Kanal bei Durchflusszytometern. Mit einem



Anregungskurve des Farbstoffs Krome Orange (gestrichelte schwarze Linie); Emissionskurven für die Farbstoffe Krome Orange, Pacific Orange, AmCyan und V500. Der schattierte Bereich stellt den Standard-550/40-Bandpassfilter im FL10-Kanal des Zytometers dar.

488 nm-Laser dagegen lässt sich keine Anregung detektieren. Die initiale Freisetzung von Krome Orange umfasst Konjugate an Human-CD45 und -CD4, während sich die Palette der Human- und Maus-Targets im Zuge der weiteren Entwicklung noch verbreitern wird. Mit dem Farbstoff Krome Orange können Wissenschaftler die Sensitivität für schwache Fluoreszenzsignale erhöhen und bei Zytometrieexperimenten mit mehreren Farbstoffen eine größere Flexibilität erzielen.

Beckman Coulter Europe
Manuela Jeremaes
PO Box 1044
CH-1260 Nyon
Tel.: +41-(0)22-365-3662
Fax: +41-(0)22-365-3467
mjeremaes@beckmancoulter.com.
www.beckmancoulter.com

Merck Millipore

Neue Multiplex-Assays bieten Einblicke in neurologische Erkrankungen

Die neuen Multiplex-Assaykits von Merck Millipore beiten einen vertieften Einblick in die mit Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und anderen neurologischen Krankheiten assoziierten biochemischen Veränderungen im menschlichen Hirn. Bei den drei neuen Milliplex MAP-Kits handelt es sich um validierte Multiplex-Immunoassays zur Bestimmung von insgeamt 21 Biomarkern, einschließlich Amyloid-$\beta_{1\text{-}40}$ und $A\beta_{1\text{-}42}$, Serumamyloid P (SAP), Gesamt- und Phospho-Tau (Thr231), PARK7 und Alpha-Synuclein.

Die Konzentrationen dieser Biomarker sind potentiell prädiktiv für die Bildung von Aggregaten, die Funktionen des Nervensystems negativ beeinträchtigen und eine Abnahme kognitiver Fähigkeiten, motorische Fehlfunktionen und andere Symptome nach sich ziehen. Die Multiplex-Kits sollen die Erforschung von neurodegenerativen Erkrkankungen, wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, beschleunigen.

Verglichen mit gängigen Biomarker-Nachweismethoden sollen die neuen Kits sowohl den Assaydurchsatz als auch die Spezifität erhöhen. Sie basieren auf der Luminex-Technologie und ermöglichen eine schnelle, empfindliche und simultane Quantifizierung mehrerer Biomarker in der Zerebrospinalflüssigkeit, im Serum oder Plasma. Die Messung mehrerer Biomarker in einer einzigen Probe könnte ein genaueres Bild über den neurologischen Zustand des Patienten geben. Mit der Messung von einzelnen Biomarkern ist das häufig nicht möglich. Multiplex-Assays sollen daher eine Spezifität bieten, die es erlaubt, die Alzheimer-Krankheit vor allem in ihren Frühstadien von verwandten neurologischen Erkrankungen zu unterscheiden. Merck Millipore hat mit der Einführung der neuen Kits im November diesen Jahres begonnen. Alle drei Kits sind seit Ende November erhältlich.



Merck KGaA
Merck Millipore
Christine Louvel
Tel.: +33-(0)1-3012 7041
christine_louvel@millipore.com
www.merck.de

Porvair

Zuverlässiger, einfach zu bedienender Microplate Sealer

Der MiniSeal Plus ist ein preisgünstiger halbautomatischer Microplate Heat Sealer, der sich durch hohen Bedienkomfort und hohe Anwendungssicherheit auszeichnet. Er arbeitet mit einer bisher unerreichten Wiederholpräzision und versiegelt ANSI/SBS-Platten mit Standardstandfläche bis zu einer Höhe von 48 mm sowie die meisten gängigen PCR-Platten.

Das Gerät wurde für Labore entwickelt, in denen täglich eine geringe bis mittlere Menge von Platten (10-50) zur Versiegelung anfällt. Im Gegensatz zu größeren automatischen Sealern kann der MiniSeal Plus ohne Druckluftzufuhr arbeiten. Alle Arbeitsvorgänge werden über ein spritzwassergeschütztes Keypad elektronisch kontrolliert. Das bedeutet, dass der MiniSeal Plus schnell installiert und auf Temperatur gebracht werden kann, und schon wenige Minuten nach dem Auspacken mit der Arbeit beginnt. Dank seines geringen Platzbedarfs (H 310 x T 275 x B 181 mm) lässt sich der MiniSeal Plus überall mühelos aufstellen, zum Beispiel auf dem Arbeitstisch im Labor oder etwa in einem Dunstabzugsschrank.



Porvair Sciences Ltd.
Steve Knight
Tel.: +44-(0)7768-781660
sknight@porvair-sciences.com
www.porvair-sciences.com

Tecan

Flexible Automation für die Vorbereitung von Proben für die PCR und Sequenzierungsreaktionen

Die Tecan Freedom EVO ist eine höchst flexible Plattform für die Vorbereitung von Proben. Diese kann auf die Probenvorbereitung für PCR und Sequenzierung konfiguriert und optimal für den jeweiligen Probendurchsatz angepasst werden. Die Kombination aus dem hochentwickelten, flüssigkeitsgefüllten Pipettiersystem und den speziellen Spitzen für kleine Volumen ermöglicht das präzise und robuste Pipettieren von sehr kleinen Volumen. Kontaminationsfreies Pipettieren von DNA, Primern und anderen Komponenten (Puffern, Enzymen, Nukleotiden) wird selbst für empfindlichste PCR-Anwendungen garantiert – durch den 4- oder 8-Spitzen-Pipettierarm oder die 96- und 384-Mehrkanalpipettierköpfe.

Die Freedom EVOware-Software unterstützt die volle Integration verschiedenster Zusatzmodule und Analysegeräte, um anspruchsvolle Abläufe, die über die Probenvorbereitung hinausgehen, komplett zu automatisieren. Für die Quantifizierung und Normalisierung von Nukleinsäuren lässt sich der Infinite™ Microplate Reader von Tecan integrieren. Weitere Beispiele für Module, die integriert werden können, sind kühlbare Reagenzienständer oder PCR-Maschinen und Plattenversiegler von anderen Herstellern. Viele nachfolgende Analysen für Nukleinsäuren benötigen die Aufreinigung

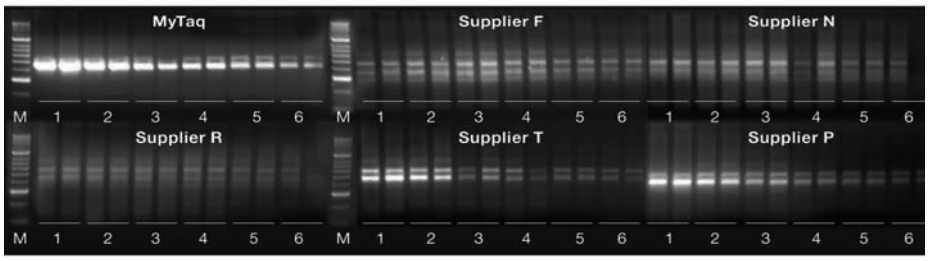


der PCR-Fragmente von nicht eingebauten Nukleotiden, Primern und Enzymen. Als Aufreinigungsmethode können Magnetbeads, Festphasenextraktion oder Gelfiltration zum Einsatz kommen. Für jede Methode gibt es eine voroptimierte Freedom EVO-Konfiguration, die an die jeweiligen Bedingungen genau angepasst werden kann.

Tecan Deutschland GmbH
Werner-von-Siemens-Straße 23
74564 Crailsheim
Tel: +49-(0)7951-94170
Info@tecan.com
www.tecan.com

Bioline

PCR in Bestform – MyTaq DNA Polymerase



Die neuen MyTaq DNA Polymerase-Produkte sind die Antwort der Firma Bioline GmbH auf die gestiegenen Anforderungen an die PCR. Aufgrund der langjährigen Erfahrung bei der Produktion von PCR-Enzymen wurde für diese Produktgruppe die neuste Technologie zur Herstellung der Polymerasen verwendet. Das daraus resultierende Enzym besticht durch eine gesteigerte Affinität zu DNA und somit einer deutlichen Verbesserung des Ertrages, der Sensitivität und der Geschwindigkeit. Das Enzym wird mit einem neuen, verbesserten Puffer geliefert, der bereits dNTPs und $MgCl_2$ enthält. Diese einzigartige Zusammensetzung unterstreicht die herausragenden Eigenschaften des Enzyms und macht die MyTaq Polymerasen zu einem festen Bestandteil jeder PCR. MyTaq DNA Polymerasen eignen sich hervorragend für alle Routineanwendungen und in Kombination mit einem hotstart-Antikörper (MyTaq HS) auch für fastPCR, KoloniePCR, Multiplexing und automatisierte Anwendungen. Weitere Informationen unter: *www.bioline.com/mytaq*.

Bioline GmbH
Holger Berthel
Tel. : +49-(0)3371-681229
Fax: +49-(0)3371-681244
hberthel@bioline.com

Mikrogen

Schneller Real-Time PCR Thermocycler

Der 3M™ Integrated Cycler ist ein schneller, voll integrierter Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Thermocycler für die Identifizierung von Nukleinsäure-Zielsequenzen in biologischen Proben. Die Proben werden in einer Barcode-Disc amplifiziert und fluorimetrisch detektiert (4 Kanäle). Mit einem überraschend geringen Platzbedarf (ca. DIN A4), ist der 3M™ Integrated Cycler eine sehr vielseitige und praktische Laborgeräte-Plattform. Durch tausende von Testläufen in den Focus Diagnostics- eigenen Labors erprobt, und ausgestattet mit einer breiten Auswahl an Focus Diagnostics Simplexa™ Reagenzien, bietet der 3M™ Integrated Cycler zuverlässige, klinisch validierte, Real-Time PCR zur quantitativen, qualitativen und Multi-Analyt-Detektion.



Die vorinstallierte Integrated Cycler Studio-Software verfügt über eine intuitive, leicht zu bedienende Benutzeroberfläche. LIMS-Kompatibilität und -Konnektivität ermöglichen bidirektionalen Datenaustausch für die nahtlose Integration in das Labor. Der mitgelieferte Barcode-Leser spart Zeit und vermeidet Fehler bei der Eingabe von Probendaten. Der 3M™ Integrated Cycler ist skalierbar von der Amplifikation und Detektion von vorverarbeiteten Proben bis hin zur voll integrierten On-Board-Probenvorbereitung. Seine Universal Disc ist in der Lage bis zu 96 Proben gleichzeitig in weniger als einer Stunde zu verarbeiten. Für den 3M™ Integrated Cycler stehen derzeit folgende Testsysteme zur Verfügung: Simplexa™ Bordetella, Simplexa™ Flu A/B & RSV Kit, Simplexa™ Influenza A H1N1 (2009). In Kürze folgen Nachweise für BK-Virus, CMV, EBV, HSV 1/2, Mycoplasma und Streptokokken (Serogruppe A).

MIKROGEN GmbH
Christine Reichhuber
Floriansbogen 2-4
82061 Neuried
Tel.: +49-(0)89-54801-143
Fax: +49-(0)89-54801-100
reichhuber@mikrogen.de
www.mikrogen.de

Dezember 2010 – März 2011

Veranstaltungskalender

15.-16.12.10
BMBF-Fachforum „Pflanzenforschung, Ernährung und Gesundheit“ , Berlin
Info: Dr. Dirk Büssis, Geschäftsstelle Pflanzenforschung (E-Mail: buessis@mpimp-golm.mpg.de, Web: www.gabi.de)

02.02.11
ScieCon München 2011, München
Info: btS e.V. (Web: www.sciecon.info)

08.-10.02.11
HuLST Expo 2011, Köln
Info: David Stradling, Total World Media Ltd/Kölnmesse (Tel./Fax: +44 (0) 1306 803032/-34, E-Mail: d.stradling@hulst-expo.com, Web: www.hulst-expo.com)



8.-10. Februar 2011, Köln

HuLST Expo 2011

Gleich vier verschiedene Fachmessen bringt die HuLST Expo unter ein Dach: Die Medical Device & Technology Test Expo, die Food & Beverage Test Expo, die Pharma Test Expo sowie die Biotech Test Expo. Die Veranstaltung auf dem Gelände der Messe Köln deckt das gesamte Feld der Prüftechniken und Produktevaluierungen ab.

14.-15.02.11
Grundlagen der Fermentation (Seminar), Freising
Info: Prof. Dr. Franz Thurner, FH Weihenstephan, (Tel./Fax: +49-8161-71-5393/-5116, E-Mail: franz.thurner@fh-weihenstephan.de, Web: www.fh-weihenstephan.de)

18.2.11
4rd Berlin Conference on IP in Life Sciences – Rare Diseases – Blockbusters in the Niche, Berlin
Info: Uta Holmer, BIOCOM AG (Tel./Fax: +49-30-2649-21-53/-66, E-Mail: events@biocom.de, Web: www.biocom.de/events)



14.-15. Februar 2011, Freising

9. Fermentationsseminar

Bereits zum zum neunten Mal findet an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf das Seminar „Grundlagen der Fermentation“ statt. Die Veranstaltung gliedert sich in einen theoretischen und einen praktischen Teil und vermittelt den Teilnehmern Grundkenntnisse über Planung, Betrieb und Optimierung von Fermentern.

24.-25.2.11
China Bio-Agriculture Industry Summit 2011, Shanghai (VRC)
Info: Sabrina Yan, IGVision Int. Corp. (E-Mail: sabrina.van@igvision.com, Web: www.bio-agriculture.net)

28.02.-01.03.11
EuroPLX45 – European Pharma License Exchange, Cascais (P)
Info: Dr. Norbert Rau, RauCon (Tel./Fax: +49-6222-9807-0/-77, E-Mail: meetyou@europlx.com, Web: www.europlx.com)

16.-23.03.11
BIOCATALYSIS 2021 Spring School, Rolduc (NL)/Aachen
Info: Karin Meyer-Pannwitt, TuTech Innovation GmbH, Hamburg (E-Mail: Meyer-Pannwitt@tutech.de, http://biocatalyse2021.de/springschool)

21.-25.03.11
Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development + Biotech World 2011, Moscow (RU)
Info: Vladimir E. Aleshnikov, (E-Mail: aleshnikova@mosbiotechworld.ru, Web: www.mosbiotechworld.ru/eng)

22.-24.3.11
ChemBIO Finland, Helsinki (FIN)
Info: Esko Ninii, FinnExpo (E-Mail: esko.ninii@finnexpo.fi, Web: www.chembiofinland.fi)

23.-24.3.11
Forum Life Science 2011, München
Info: Dr. Matthias Konrad, Bayern Innovativ (Tel.: +49-911-206-71-148, Fax: +49-911-206-71-766, E-Mail: lifescience2011@bayern-innovativ.de, Web: www.bayern-innovativ.de/fls2011)

28.-30.03.11
23nd DIA-EuroMeeting, Geneva (CH)
Info: DIA Drug Information Association (E-Mail: diaeurope@diaeurope.org, Web: www.diaeurope.org/euromeeting2011)

29.3.11
IX. Bionnale 2011, Berlin
Info: Thilo Spahl, BioTop Berlin-Brandenburg (E-Mail: spahl@biotop.de, Web: www.biotop.de)

29.-31.03.11
Logipharma Europe 2011, Geneva (CH)
Info: WBR Worldwide Business Research (Tel.: +44-207-368-9465, E-Mail: logipharma@wbr.co.uk, Web: www.logipharmaeurope.com)

30.03.11
jobvector career day , München (GER)
Info: Dr. Martina Sribar, jobvector (Tel.: +49-211-301384-20, Fax: +49-211-301384-30, E-Mail: martina.sribar@jobvector.com, Web: www.jobvector.de/muenchen)



23.-24. März 2011, München

Forum Life Science 2011

Neueste Entwicklungen auf den Gebieten Pharmaentwicklung, Ernährung und industrielle Biotechnologie stehen im Focus des Forum Life Sciences. In einer begleitenden Ausstellung präsentieren Firmen und Institute innovative Produkte und Dienstleistungen in Bereichen wie Wirkstoffentwicklung, Lebensmittelsicherheit, Bioprozesstechnologie, Bioinformatik und Analytik: www.bayern-innovativ.de/fls201

2,4 Mrd. Euro-Geldregen für mehr Nachhaltigkeit

von Thomas Gabrielczyk, Redaktion LABORWELT

Während aufstrebende Schwellenländer wie Brasilien schon längst dabei sind, die Biologisierung der Industrieproduktion mit Hilfe multinationaler Chemiekonzerne stattfinden zu lassen, fristete die sogenannte Bioökonomie bis dato in Europa ein theoretisches Dasein. Dies haben vier deutsche Ministerien (BMBF, BMU, BMELV und BMWi) Anfang November jäh beendet. 2,4 Mrd. Euro fließen in den nächsten sechs Jahren, um den Aufbau einer neuen Bio-basierten Wirtschaft zu beginnen – ein denkwürdiges Investment, soll doch die Biotechnologie helfen, sowohl die Industrieproduktion als auch die CO_2-Bilanz zu verbessern, die Agrarproduktivität zu steigern und die Grundlagenforschung zur biologischen Energieerzeugung voranzutreiben. Ein deutliches Signal, was als wichtig erachtet wird, sandte die Bundesregierung bei der Vorstellung ihrer Nationalen Bioökonomie-Strategie 2030 ganz nebenbei: die erste 100 Mio. Euro-Tranche fließt in ein Innovationsprogramm Industrielle Biotechnologie. Insgesamt folgt die Bundesregierung jedoch den Empehlungen ihres Beratergremiums BioÖkonomie-Rat und steckt am meisten Geld in die Verbesserung der Biomasseproduktion. Unter der anrührenden Überschrift „Kampf gegen den Welthunger" fließen 46% des Budgets (1,1 Mrd. Euro) in die Agrar- und Ernährungsforschung, 33% (792 Mio. Euro) in die industriell-stoffliche Nutzung und 21% (504 Mio. Euro) in die Energieerzeugung aus biologischen Quellen.

Trotz seiner Führungsrolle in Europa muss Deutschland aufpassen, dass die industrielle Konversion der nachwachsenden Rohstoffe nicht andernorts stattfindet. Denn längst hat sich die Industrie dort engagiert, wo Bio-Rohstoffe und Arbeitskräfte (noch) billig sind – ob Dow Chemical, DSM oder BASF, alle setzen derzeit auf Brasilien, wo Ethanol konkurrenzlos billig aus Zuckerrohr hergestellt wird. Längst haben die Multis begriffen, dass der Biosprit der Einstieg in die bio-basierte C2-Chemie und damit die Biokunststoffproduktion ist. Brasiliens größter Petrochemiekonzern Braskem hat die Zeichen der Zeit erkannt. Seit Oktober produziert er im südbrasilianischen Triunfo – mehrere 1.000 Kilometer Luftlinie vom nächsten Regenwald entfernt – weltweit zum ersten Mal den häufigsten Kunststoff Polyethylen klimaschonend durch katalytische Hydratation von Bioethanol. Eine Produktionsanlage für die Bio-Variante des zweithäufigsten Plastiks Polypropylen soll 2013 folgen. Alle großen Chemiefirmen sowie die europäischen Enzymspezialisten DSM und Novozymes haben sich bereits mit Kooperationsvorhaben in Brasilien engagiert.

Chance für deutsche Ingenieurskunst

Eine Antwort auf die brasilianische Herausforderung hält Deutschland schon bereit. Die Süd-Chemie AG hat bereits ein wirtschaftliches Verfahren gefunden, um Bioethanol aus Stroh herzustellen. Wacker arbeitet daran, seine Essigsäurechemie auf Bio umzustellen, und in Leuna startet Europas erste Bioraffinerie in die Pilotphase. Um die Wertschöpfung in Deutschland stattfinden zu lassen, müssen sich nun Experten verschiedenster Couleur mit ganz unterschiedlichen Wissenschaftssprachen zusammentun: Grüne und Weiße Biotechnologen, Ingenieure, Lebensmitteltechniker, Unis und Unternehmen. Das Rezept gegen babylonische Sprachverwirrung hat die Bundesregierung bereits ausgestellt: Geld. Jetzt geht es darum, das vorhandene Know-how zu bündeln.

Impressum

LABORWELT (ISSN 1611-0854)
erscheint zweimonatlich im Verlag der

BIOCOM Media GmbH
Stralsunder Straße 58–59
13355 Berlin, Germany
Tel./Fax: 030/264921-0 / 030/264921-11
laborwelt@biocom.de
www.biocom.de

Redaktion
Dipl.-Biol. Thomas Gabrielczyk
Tel.: 030/264921-50

Anzeigenleitung
Oliver Schnell
Tel. 030/264921-45,
o.schnell@biocom.de

Leserservice
Angelika Werner, Tel. 030/264921-40

Graphik-Design
Michaela Reblin

Druck:
Druckhaus Humburg GmbH, 28325 Bremen

www.laborwelt.de

Für einen regelmäßigen Bezug von LABORWELT ist eine kostenlose Registrierung unter www.biocom.de oder per Fax erforderlich.

Diese Ausgabe enthält eine Beilage der HULST EXPO Köln.

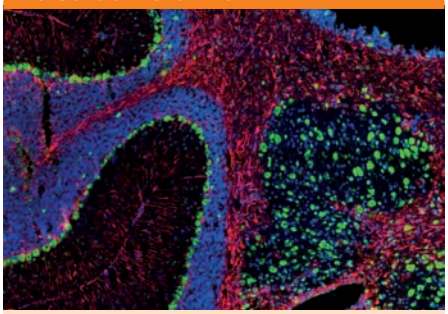
Namentlich gekennzeichnete Beiträge stehen in der inhaltlichen Verantwortung der Autoren. Alle Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Ohne schriftliche Genehmigung des BIOCOM Verlages darf kein Teil in irgendeiner Form reproduziert oder mit elektronischen Systemen verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© BIOCOM Media GmbH, Berlin

Inserentenverzeichnis

Beckman Coulter GmbH 11
Analytik Jena U2
Bayern Innovativ 23
Biometra GmbH 17
Candor Bioscience GmbH 15
Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW 25
MDT Ontario 5
Millipore Corporation 7
Millipore SAS 29
New England Biolabs GmbH U4
Next-Tec GmbH 33
Norgenta – Norddeutsche LifeScience Agentur GmbH 31
Partec GmbH 13
Porvair Sciences Ltd. 33
qPCR-2011 47
ScieCon 27
Thermo Fisher Scientifc 9
Umweltinstitut Offenbach U3

Vorschau Heft 1/2011



Thema

Cell-based Assays/Automation

Zellbasierte Assays erobern neben dem Forschungs- zunehmend den Pharmamarkt. Neben Test des Immunigenitätsstatus neuer Antiköper-Kandidaten gerät zunehmend die Sicherheitstestung von Arzneimittelkandidaten in humanen Zellen in den Fokus. Hand in Hand mit Großprojekten wie dem Human Cancer Genome Projekt werden auch die entsprechenden Signalwege blockiert und analysiert. Die LABORWELT-Themenausgabe „Cell-based-Assays/Automation" gibt einen umfassenden Überblick über die Anbieter am Markt und aktuelle neue Anwendungsmöglichkeiten.

Marktübersicht: Mikroskopie

Werbekunden bietet diese Ausgabe eine optimale Plattform für ihre Produkt-und Imageanzeigen. Reservieren Sie Ihren Werbeplatz in der LABORWELT-Themenausgabe bis spätestens zum 04. Februar 2011. Ergänzend zum Themenschwerpunkt „Assays/Automation" veröffentlichen wir eine Marktübersicht „Mikroskopie". Informationen zu Ihrer möglichen Teilnahme gibt Oliver Schnell (Tel.: +49-30-264921-45, E-Mail: o.schnell@biocom.de).



Bilder: Fotolia/vremar, XYZproject

Umweltinstitut Offenbach

Frankfurter Straße 48, 63065 Offenbach
Tel: (069) 81 06 79, Fax: (069) 82 34 93
mail@umweltinstitut.de

www.umweltinstitut.de

Sicherheit bei Arbeiten in gentechnischen Anlagen

Bundesweit staatlich anerkannte 2-tägige Ausbildung zum Projektleiter und Beauftragten für die Biologische Sicherheit gem. § 15 Abs. 4 GenTSV.

Termine: 21.–22.3.11, 26.–27.9.11

Begrenzte Teilnehmerzahl.
Bitte melden Sie sich rechtzeitig an.

In immer mehr Produktionsverfahren finden gentechnisch veränderte Organismen Anwendung. Somit nimmt auch die Anzahl der Anlagen zu, in denen mit solchen Organismen umgegangen wird.

Deshalb ist es für alle Personen, die mit gentechnischen Anlagen zu tun haben, wichtig, das erforderliche Wissen und die entsprechende Sachkunde zu besitzen, um

- gentechnische Anlagen errichten und sicher betreiben zu können
- die Aufgaben als Projektleiter oder Beauftragter für die Biologische Sicherheit wahrnehmen zu können oder
- als Mitarbeiter oder Führungskraft die Gefahren zu kennen, damit sicher umgehen und fundierte Entscheidungen treffen zu können.

Der Fortbildungslehrgang ist bundesweit staatlich anerkannt. Sie erhalten aktuell und praxisnah in 2 Tagen die erforderlichen Kenntnisse zur Erlangung der Sachkunde für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit nach § 15 Abs. 4 der Gentechniksicherheitsverordnung (GenTSV).

Sie profitieren von der klaren Erläuterung der Inhalte aktueller Regelungen im Gentechnikrecht , den Tipps für die Umsetzung und dem Erfahrungsaustausch mit Referenten und Fachkollegen.

Zielgruppen:

- Biologen, Chemiker, Mediziner, Ingenieure, die als Projektleiter oder Beauftragte für die Biologische Sicherheit bestellt werden sollen
- Fach- und Führungskräfte, die Wissen auf dem Gebiet des Gentechnikrechts benötigen, um fundierte Entscheidungen zu treffen

Inhalt:

- Rechtsvorschriften für gentechnische Anlagen und Freisetzungen und zum Arbeitsschutz
- Gefährdungspotentiale von Organismen in gentechnischen Anlagen und bei Freisetzungen
- Sicherheitsaspekte im Umgang mit Organismen in der Gentechnik

Risikobewertung und Sicherheitseinstufung

- Sicherheitsmaßnahmen
- Sterilisation, Desinfektion, Inaktivierung
- Organisatorische Maßnahmen
- Praktische Beispiele und Übungen, Erfahrungsberichte

Leitung:

Dipl. Biol. Christine Jansen, Umweltinstitu Offenbach

Referenten:

Dr. Astrid Brandt, Hessisches Ministerium für Umwelt;

Dr. Halil Gültekin, Beauftragter für die Biologische Sicherheit, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden;

Matthias Mann, Rechtsanwalt, Egelsbach;

Dr. Jürgen Mertsching, Beauftragter für die Biologische Sicherheit, Medizinische Hochschule Hannover;

Dr. Tobias Jacobi, Ministerium für Umwelt und Forsten Rheinland-Pfalz;

Unterrichtszeiten:

erster Tag: 9.00 – 18.00 Uhr
zweiter Tag: 9.00 – 17.00 Uhr

inkl. Kaffeepausen und gemeinsames Mittagessen

Lehrgangsgebühr EUR 680,– (mehrwertsteuerfrei)

Nach Anmeldung erhalten Sie eine Anmeldebestätigung und eine Rechnung. In der Teilnahmegebühr sind ausführliche Seminarunterlagen sowie Kaffee, Pausengetränke, Gebäck, Obst und Mittagessen enthalten.

S-Bahn-Haltestelle: „Offenbach-Marktplatz“, S1, S2, S8 und S9, 10 Min. ab Frankfurt am Main-Hauptbahnhof.

Hotelverzeichnis und Anfahrtsplan werden der Anmeldebestätigung beigelegt.

❑ Anmeldung per FAX (069) 82 34 93

Termine:

❑ 21.–22.3.11 ❑ 26.–27.9.11

Absender:

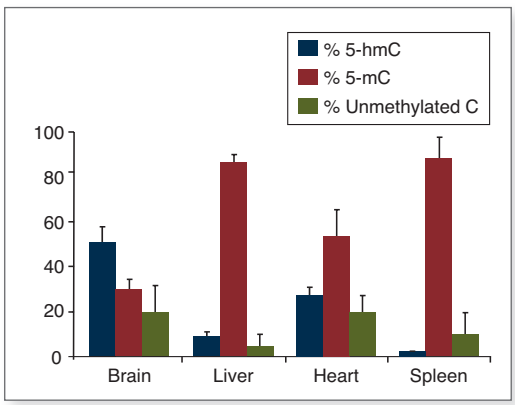


MASTERING CHANGE

Der Durchbruch in der 5-hmC Quantifizierung

Nutzen Sie für Ihre epigenetischen Studien das neue EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis Kit: das erste kommerziell verfügbare, PCR-basierte System, das Ihnen locus-spezifisch eine zuverlässige und reproduzierbare Identifikation und spezifische Quantifizierung von methylierten Cytosinen (5-mC) sowie hydroxymethylierten Cytosinen (5-hmC) ermöglicht. Erweitern Sie mittels des einfachen und zuverlässigen 3-Schritt-Protokolls Ihre Einsichten in die Biologie der Epigenetik und entdecken Sie neue Biomarker!

Identifikation und Quantifizierung des Methylierungs-status mit dem EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis Kit



Die Analyse von verschiedenen Gewebeproben einer Balb/C Maus zeigt eine differenzielle Variation der Menge von 5-hmC und 5-mC (Beispiel: Locus 12).

Ihr Vorteil:

- Reproduzierbare Identifikation und Quantifizierung von 5-hmC und 5-mC
- Einfaches PCR-basiertes 3-Schritt Protokoll
- High Throughput geeignet

Besuchen Sie www.neb-online.de für weitere Informationen und eine vollständige Liste aller EpiMark validierten Produkte von NEB.

NEW ENGLAND BioLabs® GmbH
enabling technologies in the life sciences

CLONING & MAPPING	DNA AMPLIFICATION & PCR	RNA ANALYSIS	PROTEIN EXPRESSION & ANALYSIS	**GENE EXPRESSION & CELLULAR ANALYSIS**

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main Deutschland
www.neb-online.de
Tel. 0800/246-5227 (kostenfrei in D) Tel. 00800/246-52277 (kostenfrei in A) Fax. +49/(0)69/305-23149 email: info@de.neb.com