



Welche Pipette ist die richtige für meine Anwendung?

- > Fünf Wege zur Optimierung und Beschleunigung Ihrer PCR
- > FCKW, FKW, KW? Einfach einen grünen Freezer, bitte!
- > Backstage bei einem Eppendorf Webinar

Application Notes

Überwachung des Redoxpotenzials für verbesserte anaerobe Fermentation · Verkürzte PCR-Laufzeiten + erhöhte Ausbeute · Amber Conical Tubes: maximaler Probenschutz, gute Sichtbarkeit · etc.





Liebe Leser,

Vielen Dank für die zahlreichen guten Wünsche zum 25. Jubiläum der BioNews. Ihr Feedback hat uns sehr gefreut und spornt uns weiter an. Besonderen Anklang fanden übrigens die personalisierten Pipetten, die in unseren Jubiläums-Preisrätseln zu gewinnen waren.

Für den Umgang mit problematischen Flüssigkeiten gibt es so manches Geheimrezept. Dabei kommt es eigentlich nur darauf an, das für Ihren Anwendungsfall optimale Rüstzeug aus Pipette und Spitze zu bestimmen. Hierbei sind gute Kenntnisse über Pipettier-techniken sowie über aktuelle Pipettiersysteme unerlässlich. Werden auch Sie zum Pipettierexperten – oder gar zum Pipettier-Ninja! Wie Eppendorf Ihnen dabei helfen kann, erfahren Sie in unserem Leitartikel auf den Seiten 4–5.

Vor zehn Jahren war das (Eppendorf) New Brunswick™ Premium U570-G Ultratiefkühlgerät eines der allerersten Geräte mit grünem Kältemittel im Markt. Mit unserer langjährigen Erfahrung in Entwicklung, Herstellung, Logistik und Service sehen wir unser Konzept global bestätigt. Eine wachsende Zahl von Anwendern sieht „grüne“ Geräte heute als selbstverständlich an. Mehr Hintergrundwissen finden Sie auf Seite 6.

Die PCR ist momentan die schnellste und sicherste Methode zur DNA-Amplifikation. Dennoch birgt diese Standardmethode Tücken und unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren. Der Bedarf, PCR-Durchläufe zu beschleunigen und zu optimieren, ist allgegenwärtig und kann auf verschiedene Weise angegangen werden. In unserem Artikel auf den Seiten 12–13 zeigen wir Ihnen fünf Möglichkeiten auf.

Neben weiteren Berichten zu Neuheiten und Neuigkeiten, z. B. zur Bioprozesstechnik, gibt es im Innenteil wieder vier detaillierte Application Notes.

Ihr Eppendorf BioNews-Team

Impressum

Redaktion

Berrit Hoff (Projektleitung), Hanaë König,
Tanja Musiol, Natascha Weiß

Anschrift

Eppendorf AG
Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Telefon: + 49 40 53 801-0
Fax: + 49 40 53 801-556
E-Mail: bionews@eppendorf.de
www.eppendorf.com/bionews

Beiträge von Lesern sind willkommen.
Für unverlangt eingesandte Manuskripte
wird keine Verantwortung übernommen.

Ihre Ansprechpartner

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Henlein-Str. 2
50389 Wesseling-Berzdorf
Tel. 01803-255911
(0,09 €/min aus dem Festnetz, Mobilfunk
max. 0,42 €/min)
E-Mail: vertrieb@eppendorf.de

Vertrieb Schweiz

Vaudaux-Eppendorf AG
Im Kirschgarten 30
4124 Schönenbuch/Basel
Tel. (061) 4821414
E-Mail: eppendorf@eppendorf.ch

Vertrieb Österreich

Eppendorf Austria GmbH
Ignaz-Köck-Straße 10
1210 Wien
Tel. (01) 8901364-0
E-Mail: office@eppendorf.at

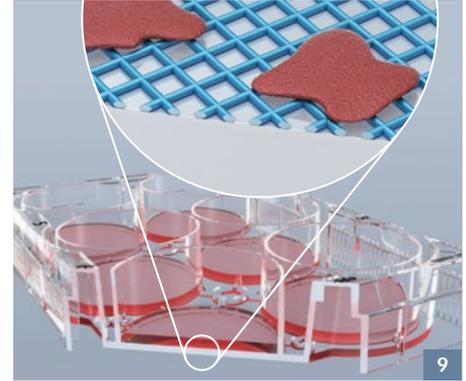
Hinweis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit
haben wir im Text auf die konsequente
Nennung der männlichen und weiblichen
Form verzichtet. Es sind selbstverständ-
lich immer beide Geschlechter gemeint.

Die Einführung von Produkten kann in
verschiedenen Märkten zu unterschied-
lichen Zeitpunkten erfolgen. Wir beraten
Sie gern.

Irrtum und technische Änderungen
vorbehalten.

Alle Rechte vorbehalten,
einschließlich der Grafiken und Bilder.
© Copyright Eppendorf AG, Januar 2019.
Klimaneutral gedruckt in Deutschland.



IM BLICKPUNKT	Welche Pipette ist eigentlich die richtige für meine Anwendung?	4–5
LABORPRAXIS	FCKW, FKW, KW? Einfach einen grünen Freezer, bitte!	6
	Alles für den Bioprozess – Online!	8
	Fünf Möglichkeiten, PCR-Durchläufe zu optimieren und zu beschleunigen	12–13
NAHAUFNAHME	CCAdvanced® FN 1 motifs Zellkulturartikel	9
NEWS/TIPPS	Viskose Lösungen mit der richtigen Technik pipettieren	5
	Backstage bei einem Eppendorf Webinar	7
	Vorteile für Ihre Stammzellkultur	9
	Rundum sorglos mit unserem Technischen Service	10
	Reinigung und Wartung Ihrer Laborgeräte	11
	Was unsere Leser sagen	11
	Willkommen in Hamburg: Flavio Donato & Andrea Ablasser	14
SERVICE	Warenzeichenhinweise	14
	Gewinnspiel: Pipetten-3er-Pack zu gewinnen	15

Eppendorf BioNews Application Notes

	<p>YING YANG, MA SHA Überwachung des Redoxpotenzials zur verbesserten anaeroben Fermentation mit Hilfe der BioFlo® 120 Bioprozess-Steuerungseinheit</p>	<p>1–2</p>
	<p>ALISA GRUSCHKA, KERSTIN ISERMANN, ARORA PHANG Verkürzte PCR-Laufzeiten bei erhöhter Ausbeute mit Eppendorf Fast PCR-Consumables</p>	<p>3–4</p>
	<p>MARTIN ARMBRECHT Kostengünstige DNA-Bestimmung mit Qubit™-Assays im Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence</p>	<p>5–6</p>
	<p>RAFAL GRZESKOWIAK, SANDRINE HAMELS Eppendorf Amber Conical Tubes: maximaler Probenschutz bei guter Sichtbarkeit</p>	<p>7–8</p>

SAMIRA SCHROEDER, EPPENDORF AG

Welche Pipette ist eigentlich die richtige für meine Anwendung?

Für den Umgang mit problematischen Flüssigkeiten gibt es so manches überlieferte „Geheimrezept“. Die Pipettenspitze wird abgeschnitten, um viskose Flüssigkeiten pipettierbar zu machen. Ethanol und Aceton werden im Wettrennen mit der Zeit in Höchstgeschwindigkeit pipettiert, denn die Flüssigkeiten könnten heraustropfen. Detergenzienreste in der Spitze werden auch mal hingegenommen. So richtig präzise ist das alles nicht? Es geht auch anders!

Seit 1961 die erste Mikroliterpipette auf den Markt kam, haben sich Modelle und Techniken zwar weiterentwickelt, die meisten Pipetten basieren jedoch weiterhin auf dem ursprünglichen Kolbenhubprinzip. Hierbei befindet sich zwischen Kolben und Flüssigkeit ein Luftpolster. Luftfeuchte, Temperatur und physikalische Eigenschaften von Flüssigkeiten beeinflussen das Luftpolster und damit das zu pipettierende Volumen. Die auf Wasser kalibrierten Luftpolsterpipetten sind für die meisten Anwendungen hochpräzise, es gibt jedoch Ausnahmen.

Eine Luftpolsterpipette für alles?

Häufiger als angenommen verwenden Anwender nur eine einzige klassische Luftpolsterpipette, unabhängig von der zu pipettierenden Flüssigkeit. Bei Flüssigkeiten mit einer anderen Viskosität, Flüchtigkeit, Oberflächenspannung oder Dichte als Wasser stößt die Luftpolsterpipette jedoch an ihre Grenzen: Es tropft und klebt, fließt langsam und Luftblasen entstehen.

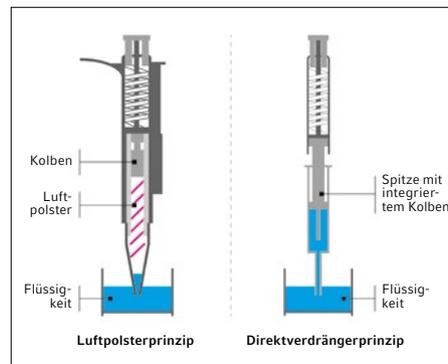
Was tun? Schneller oder langsamer pipettieren? Vorbenetzen? Revers pipettieren? Anwender berichten von weiteren, teils sehr individuellen Techniken, die darauf hindeuten, dass hier ein großer Leidensdruck besteht.

Mit Luftpolsterpipetten bessere Ergebnisse erzielen

Auch mit Luftpolsterpipetten kann man bereits mit einigen Tricks herausfordernde

Flüssigkeiten deutlich präziser verarbeiten. Die Herausforderung bei z.B. viskosen Flüssigkeiten wie Glycerol liegt darin, dass sie sich aufgrund geringerer Fließfähigkeit schwer aufziehen lassen und unklar ist, wann die gewünschte Flüssigkeitsmenge komplett aufgezogen ist. Schnell entstehen so auch Luftblasen und Flüssigkeitsrückstände bleiben an der Wand der Spitze zurück.

Zur Vorbeugung kann man langsam oder revers pipettieren. Mehr Sicherheit und Präzision bietet jedoch ein Direktverdrängersystem.



Luftpolster- und Direktverdrängerprinzip im Vergleich

Präzise und sicher arbeiten mit dem Direktverdrängersystem

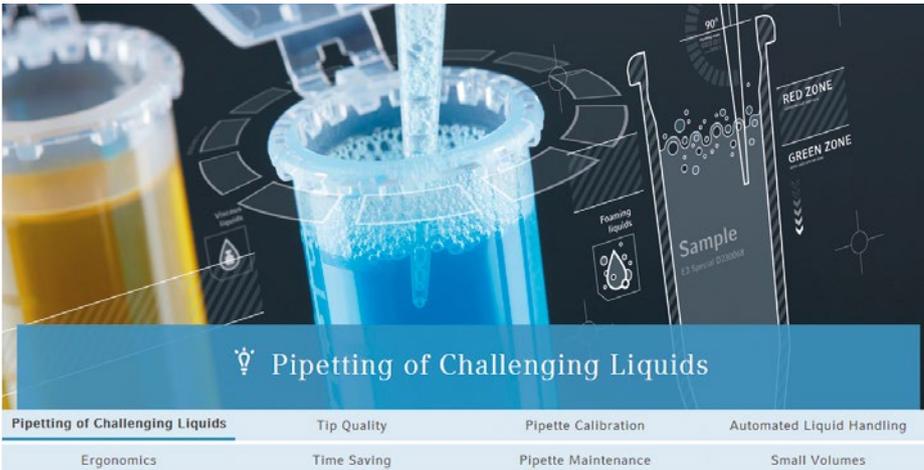
Sie sind es satt, sich mit abgeschnittenen Spitzen zu behelfen und Kompromisse bei der Präzision einzugehen? Direktverdränger wie beispielsweise das Multipette®/ Combitips advanced® System vereinfachen den Pipettierprozess und sorgen für prä-

zise Pipettierergebnisse, unabhängig von den physikalischen Eigenschaften einer Flüssigkeit.

Anders als bei Luftpolsterpipetten ist hier der Kolben der Spitze im direkten Kontakt mit der Flüssigkeit. Die Flüssigkeitsabgabe erfolgt direkt und ohne Luftpolster und die Dichtlippe des Kolbens transportiert sämtliche Rückstände aus der Spitze. Da sich die Flüssigkeit in einer speziellen hermetisch abgedichteten Spitze befindet, wird auch das Risiko von Aerosol-Kontamination verringert. Sowohl der Anwender als auch die Pipette werden somit zusätzlich vor gefährlichen Flüssigkeiten geschützt.



Let it flow! Der neue ViscoTip ist spezialisiert auf hochviskose Flüssigkeiten



Hier werden Sie zum Pipettierexperten

Mit dem ViscoTip® sogar spielend leicht Cremes und Honig meistern

Sicherlich kennen auch Sie die Grenzen, wenn es um das präzise Pipettieren hochviskoser Flüssigkeiten geht. Dank der jüngsten Ergänzung zur Familie der Combitips advanced für die Multipipette kann jetzt auf umständliches Auswiegen solcher Flüssigkeiten verzichtet werden.

Die neuartige ViscoTip Pipettenspitze ist spezialisiert auf hochviskose Flüssigkeiten wie z.B. Cremes, Honig oder hochprozentiges Glycerol. Besonders geeignet ist das System aus Multipipette und ViscoTip für Applikationen im Bereich der Lebensmittelanalytik, Kosmetik oder der petrochemischen Industrie.

Erfahren Sie mehr in unserem Webinar „Handling of Viscous Liquids – Basics, Techniques and Tricks“ (s. Kasten) sowie auf www.ependorf.com/let-it-flow

Keine Kompromisse bei Präzision und Richtigkeit

Sie haben die Qualität Ihrer Pipettierergergebnisse in Ihrer eigenen Hand. Kombinieren Sie das für Ihren Anwendungsfall optimale Rüstzeug aus Pipette und Spitze mit verbesserter Kenntnis von Pipettier-techniken.

Werden Sie zum Pipettierexperten ...

Wir helfen Ihnen dabei, Ihre Pipettierkenntnisse auszubauen: mit weitergehenden Informationen, Problemstellungen und Lösungen, Artikeln, Postern, Videos und Application Notes. Zu finden unter <https://handling-solutions.ependorf.com/liquid-handling> oder per QR-Code.



... und zum Pipettier-Ninja!

Ihr erworbenes Wissen können Sie in unserem Online-Test überprüfen und sich Ihr persönliches Zertifikat ausdrucken, welches Ihr Können beweist.

Wir wünschen Ihnen viel Spaß dabei, Ihre Kenntnisse und Fähigkeiten weiter auszubauen.



QR-Code scannen für mehr Informationen!

Tipp

Viskose Lösungen mit der richtigen Technik pipettieren

Im Labor begegnet man in der täglichen Arbeit zahlreichen Flüssigkeiten unterschiedlichster Viskosität. Von leicht- über mittel- bis hochviskos ist alles dabei. Doch wie unterteilt man Flüssigkeit in Viskositätsklassen? Wie entsteht Viskosität? Und vor allem – wie pipettiere ich viskose Flüssigkeit korrekt?



Auf diese Fragen wurde in unserem Webinar „Handling of Viscous Liquids – Basics, Techniques and Tricks“ eingegangen, das wir Ihnen auch als Webinar-Aufzeichnung ans Herz legen möchten.

Im Vordergrund stehen insbesondere die verschiedenen Pipettier-techniken und Pipettentypen, die für reproduzierbares und akkurates Dosieren von viskosen Lösungen notwendig sind. Darüber hinaus wird gezeigt, wie der Wechsel von klassischen Luftpolsterpipetten zu Direktverdrängerpipetten sich positiv auf das Pipettierergebnis auswirkt. Erfahren Sie, wie Sie die Präzision und Richtigkeit sowie die Geschwindigkeit des Pipettierens erhöhen können, indem Sie die passende Pipette mit der richtigen Technik verwenden.

Das kostenfreie Webinar finden Sie unter www.ependorf.com/webinar/viscosity



QR-Code scannen für mehr Informationen!

JAN-HENDRIK BEBERMEIER, EPPENDORF AG

FCKW, FKW, KW? Einfach einen grünen Freezer, bitte!

Der Klimawandel ist eine Herausforderung für die Weltbevölkerung. Zusätzlich zu direkten CO₂-Emissionen fördern die in Kühlsystemen verwendeten Fluorkohlenwasserstoffe (FKW) die globale Erwärmung. FKWs sind um ein Mehrfaches schädlicher als CO₂. Daher gibt es eine Verschiebung hin zu Kohlenwasserstoffen (KW), auch bekannt als grüne Gase. Vor zehn Jahren war Eppendorf einer der „First Mover“ in Richtung grüner Gase bei –86°C.



In Nachhaltigkeitsdiskussionen steht häufig der Energieverbrauch im Vordergrund. Doch selbst energieeffiziente Ultratiefkühlgeräte verbrauchen viel Energie, um rund um die Uhr und an sieben Tagen der Woche extrem niedrige Temperaturen zu halten. Neben dem Energieverbrauch rückt daher auch das Kältemittel in den Fokus.

Auf Grundlage des Montreal-Protokolls wurden vor einigen Jahren ozonschichtschädigende FCKW*-basierte Kältemittel (*Fluorchlorkohlenwasserstoffe) abgeschafft und durch alternative Verbindungen wie Fluorkohlenwasserstoffe (FKW) ersetzt. Obwohl besser für die Umwelt, besitzen FKWs wie R508b und R404a ein hohes Treibhauspotential (Global Warming Potential; Abk. „GWP“). R404a hat z.B. einen GWP-Wert von 3922, was bedeutet, dass 100 g dieser Substanz den gleichen GWP-Wert wie 392 kg CO₂-Äquivalent besitzen.

Kohlenwasserstoffe

2014 kündigte die EU die Abschaffung aller nicht-Kohlenwasserstoff basierten Flüssigkeiten bis zum Jahr 2020 an (EU_517/2014). Kohlenwasserstoffe sind auch bekannt als grüne oder natürliche

Gase. Die Hauptvertreter sind Propan (R290) und Ethan (R170). Laut IEC 60335-2-89 bedarf der Einsatz grüner Gase in Ultratiefkühlgeräten keiner weiteren Sicherheitsvorschriften.

Das EU-Verbot schließt alle Kühlgeräte außer Geräten für Temperaturen unter –50°C ein. Daher ist es zwar zulässig, in –86°C Ultratiefkühlgeräten weiterhin FKWs einzusetzen. Sinnvoller ist es jedoch, FKW-haltige Kältemittel zu ersetzen, um dem Klimawandel entgegenzuwirken.

Daher plant Eppendorf, innerhalb der nächsten Jahre alle Ultratiefkühlgeräte zu ersetzen, die noch klassische Kältemittel verwenden. Aktuell wurde der Einsatz nachhaltiger, grüner Kältemittel in den Modellen F740h, F740hi und F740hiw (mit Wasserkühlung) unserer Flaggschiff-Serie CryoCube® F740 erfolgreich umgesetzt. Doch dies ist nur ein Teil einer langen Geschichte.

Blick zurück ins Jahr 2008

Das (Eppendorf) New Brunswick™ Premium U570-G Ultratiefkühlgerät war eines der allerersten Geräte mit grünem Kältemittel im Markt. Mit nun zehn Jahren Erfahrung in Entwicklung, Herstellung, Logistik und Service sehen wir unser Konzept global bestätigt. Die meisten Ultratiefkühlgeräte in Europa werden heutzutage als „grüne“ Variante verkauft. Asien und Amerika ziehen nach. Eine wachsende Zahl von Anwendern sieht grüne Geräte als selbstverständlich an, so dass mehr und mehr Freezer-Hersteller auf grüne Technologie umstellen. Willkommen im Green-Club!



QR-Code scannen für mehr Informationen!

Weitere Informationen unter www.eppendorf.com/freezers

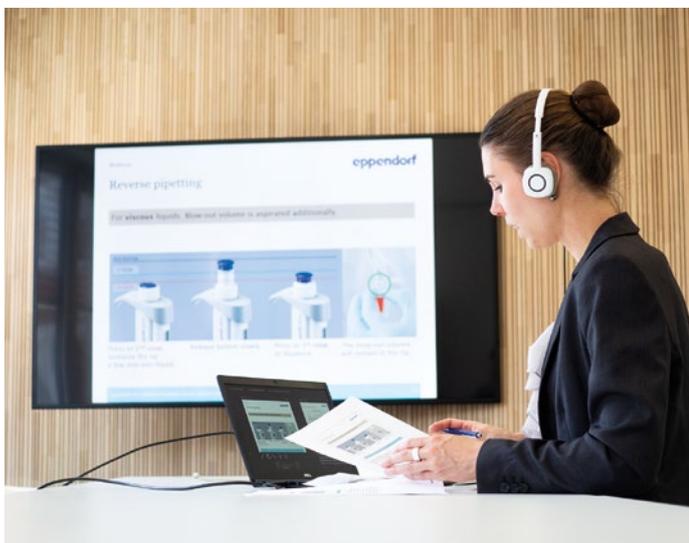
HANAË KÖNIG UND BERRIT HOFF, EPPENDORF AG

Backstage bei einem Eppendorf Webinar

10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ... der Countdown läuft. Es kribbelt im Bauch. Gleich werde ich live geschaltet, und mehrere hundert Menschen über die ganze Welt verteilt werden meiner Stimme lauschen und der Präsentation folgen. 3, 2, 1, und los! Nach der Begrüßung durch den Moderator starte ich mit der Präsentation. Nach den ersten drei Folien ist das leichte Zittern in meiner Stimme fort, die Anspannung nimmt ab und der Spaß beginnt.

So beschreibt Hanaë König, erfahrene Webinar-Präsentatorin bei Eppendorf, den Start eines Webinars. Ein Webinar ist aufregend, birgt aber auch eine Menge Arbeit in der Vor- und Nachbereitung. Die Planung beginnt bereits ein Jahr vor dem Live-Event. Webinar-Themen basieren auf häufigen Fragestellungen an die Eppendorf-Support Hotline, auf typischen Problemen im Labor oder aktuellen Forschungsthemen. Sobald das Thema feststeht, werden gemeinsam mit dem Webinar-Provider Datum und passende Uhrzeit fixiert. „Uns ist wichtig, dass weltweit möglichst viele Interessenten teilnehmen können. Das ist gar nicht so einfach, wenn man die unterschiedlichen Zeitzonen berücksichtigt“, so Hanaë König.

„Wenn der Rahmen steht, mache ich mir Gedanken zu Inhalten, Bildern und Anekdoten. Mein Ziel ist es, das Thema spannend zu gestalten und trotzdem viel Inhalt zu vermitteln. Und das Ganze auf hilfreiche und leicht verständliche Weise. Die Teilnehmer sollen das Gefühl bekommen, etwas für ihren Laboralltag gelernt zu haben“, ergänzt Hanaë König.



Die Webinare werden rechtzeitig beworben, um möglichst viele Interessenten zu erreichen. Zwei bis drei Wochen vor dem Live-Termin beginnt die heiße Phase. Hanaë: „Die Teilnehmerzahl steigt und die erste Nervosität kommt auf, wenn ich die Zahl der Anmeldungen sehe.“

Am Tag des Webinars geht Hanaë König die Präsentation noch einige Male durch und feilt am Text, den sie zu jeder Folie sprechen wird. „Ich überlege auch, welche Fragen die Teilnehmer im Anschluss haben könnten.“ Auch wenn sie schon viele Webinare gehalten hat, das Lampenfieber bleibt. „Es ist wie eine Radiosendung, nur zusätzlich mit Live-Fragen der Teilnehmer am Ende. Die Antwort muss ich blitzschnell wissen, um mich nicht zu blamieren.“ Ist das Webinar vorbei, ist sie erleichtert und glücklich. Doch jetzt beginnt die aufwendige Nachbereitung. Alle Fragen, die aus Zeitmangel nicht live beantwortet werden konnten, erhält Hanaë König per Mail. Teilnehmer, die sich für das Webinar registriert haben, können sich die Aufzeichnung anhören und später noch Fragen übermitteln. „Bis zu vier Wochen nach einem Webinar erreichen mich noch einzelne Fragen“, so Hanaë König. „Im Anschluss daran werten wir das Event aus, um für künftige Webinare zu lernen und uns stetig zu verbessern.“

Ihr Fazit: „Ich glaube, alle Webinar-Präsentatoren bei Eppendorf werden mir zustimmen – es macht riesigen Spaß, ein Webinar vorzubereiten und zu halten. Die Interaktion mit den Teilnehmern in der Fragezeit ist großartig, eine Herausforderung und ein wunderbarer Einblick in die aktuellen Themen und Forschungen der Fragenden. Allein dafür lohnt sich die Arbeit!“



QR-Code scannen für mehr Informationen!

Auf www.eppendorf.com/webinars finden Sie geplante und aufgezeichnete Webinare.

ULRIKE BECKEN, EPPENDORF AG BIOPROCESS CENTER, JÜLICH

Alles für den Bioprozess – Online!

Die Bioprozesstechnik ist aus der modernen Medizin, der Medikamentenentwicklung und den Life Sciences nicht wegzudenken, von der chemischen sowie der Nahrungs- und Futtermittelindustrie ganz zu schweigen. Als führender Anbieter von Laborausrüstung und Bioprozesslösungen präsentiert Eppendorf jetzt auf seiner Internetseite einen neuen Bereich zur Bioprozesstechnik.

Auf www.eppendorf.com/bioprocess finden Sie Anwendungsbeispiele, Einblicke von Industrieexperten und aktuelle News.

Diese Wissensplattform richtet sich an Profis aus den genannten Bereichen und bietet nicht nur einen Gesamtüberblick, sondern enthält auch detaillierte Anwendungsbeispiele und Empfehlungen zur Lösung von spezifischen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Anwendungen auf einen Blick

Bioprozessanwendungen sind nicht nur zahlreich, sondern auch sehr unterschiedlich. Diese Diversität findet sich auch in unserem neuen Internetbereich wieder. Sorgfältig aufbereitete Informationen in übersichtlichem Layout vermitteln Wissenswertes über „heiße Themen“ der Bioprozesstechnik: Wie skalier ich die Antikörper- und Hormonproduktion? Was gilt es bei der Entwicklung neuer Prozesse zur Steigerung der Impfstoff-Ausbeute zu beachten? Welche Fortschritte gibt es in der Expansion von Stammzellen für neue Verfahren in der Medikamentenentwicklung? Dieses sind nur einige der hier behandelten Fragen. Die Plattform beleuchtet Bioprozessanwendungen auf einen Blick – aus verschiedenen Perspektiven und in unterschiedlichen Formaten.



Eppendorf-Systeme: maßgeschneidert für jeden Bioprozessbedarf

Anwenderberichte

Expertenaustausch ist unabdingbar für den Fortschritt. Der Großteil der Informationen in dem neuen Bereich stammt von Bioprozessprofis aus Industrie und Hochschulen. Internationale Experten präsentieren Fallstudien in Form von Application Notes, Fachartikeln und wissenschaftlichen Postern und diskutieren einige der relevantesten Fragen aus der aktuellen Bioprozessentwicklung.

Internetseiten-Besucher finden z. B. ein E-Book über Prozessautomation und Datenanalyse, Ergebnisse aus Zellkultur-Scale-up in Einweg-Bioreaktoren, Dokumente über kontrollierte Stammzellkultivierung und vieles mehr. Für den, der lieber zuhört, bieten wir Aufzeichnungen der letzten Bioprozesswebinare und einen Podcast. In unseren letzten Webinaren sprachen wir über die Prozessoptimierung in der Biosimilarproduktion durch Vergleich von Batch-, Fedbatch- und Perfusionskultur und diskutierten die Möglichkeiten der Multivariaten Datenanalyse bei der Prozessentwicklung. In unseren Webinaren lernen Anfänger etablierte Techniken UND neue Prozesse kennen, während sich Fortgeschrittene untereinander und mit Eppendorf, als anerkanntem Experten in der Bioverfahrenstechnik, austauschen können.

Maßgeschneiderte Produktempfehlungen

Aufgrund der höchst individuellen Prozesse sind die Anforderungen an das Bioprozessequipment so speziell, dass es keine einfache Standardlösung gibt. Hilfestellung bieten die Anwendungsstudien in unserem Bioprozessbereich. Hier erfahren Sie, welche technischen Herausforderungen mit welchen Produkten erfolgreich gelöst wurden. Das ist Produktsuche einmal anders herum!

Immer up to date mit unserem Newsletter

Wir laden Sie herzlich ein, den neuen Bioprozessbereich zu besuchen, doch gerne würden wir Sie auch persönlich kennenlernen und beraten. Daher finden Sie neben dem News-Bereich auch eine stets aktuelle Liste mit „Bioprocess Events“ sowie einen Button für die schnelle, unkomplizierte Kontaktaufnahme. Um stets auf dem Laufenden zu bleiben, abonnieren Sie ganz einfach unseren Newsletter.



QR-Code scannen für
mehr Informationen!

Mehr Informationen unter
www.eppendorf.com/bioprocess

Überwachung des Redoxpotenzials zur verbesserten anaeroben Fermentation mit Hilfe der BioFlo® 120 Bioprozess-Steuerungseinheit

YING YANG UND MA SHA, EPPENDORF INC., ENFIELD, CT, USA

Zusammenfassung

Bei der Fermentation stellt das Redoxpotenzial einen wichtigen physiochemischen Faktor dar, welcher die Tendenz des Kulturmediums, Elektronen aufzunehmen, misst. Es ist in der Lage, die Effizienz eines Bioprozesses direkt zu beeinflussen. Ein Beispiel ist die anaerobe Fermentation von *Clostridium* zur Produktion von industriellen Lösungsmitteln. Lösungsmittelproduktion durch *Clostridium* Spezies erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Stoffwechselschritten. In der frühen Phase der Kultur produziert die Acidogenese hauptsächlich Essig- und Buttersäure. In der späten exponentiellen Wachstumsphase wechselt der Stoffwechsel dann zur Solventogenese – der Bildung von größtenteils organischen Lösungsmitteln, einschließlich Butanol [1].

Um den Elektronenfluss in die Richtung der Butanolproduktion zu lenken, ist die Regeneration des NAD(P)⁺ Vorrats innerhalb der *Clostridium* Spezies essenziell [1]. Das intrazelluläre Verhältnis von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ ist stark vom Redoxpotenzial abhängig; daher kann das Redoxpotenzial dahingehend genutzt werden, sowohl die Anreicherung von Biomasse als auch die Lösungsmittelproduktion zu modifizieren [2].

Wir kultivierten *C. beijerinckii* unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe einer BioFlo 120 Bioprozess-Steuerungseinheit, ausgestattet mit BioBLU® 3f Single-Use Vessels. Durch das Beibehalten eines Redoxpotenzials von etwa -500 mV

Parameter	Gerät/Sollwert
Inokulationsdichte	1:100 (v/v)
Arbeitsvolumen	3 L
Sparger	Macrosparger
Begasungskontrolle	100 % konstanter Stickstofffluss von 0,1 vvm (0,3 sL/h), während der ersten 4 Stunden durch submerse Begasung, nach 4 Stunden durch Begasung in den Kopfraum
Agitation	Magnetantrieb; 50 rpm
Temperatur	37°C; durch Heizmanschette und Kühlschikanen kontrolliert

Tabelle 1: Überblick über Prozessparameter und Sollwerte

erhöhten sich sowohl das bakterielle Wachstum als auch die Butanolproduktion drastisch im Vergleich zu einem Prozess ohne Steuerung des Redoxpotenzials. Diese Studie zeigt die Vorteile einer Überwachung des Redoxpotenzials während der Fermentation von *C. beijerinckii* klar auf.

Material und Methoden

Wir führten Batch-Fermentationen unter anaeroben Bedingungen durch. Die Vorbereitung des Inokulums sowie die Medienzusammensetzung wurden bereits eingehend beschrieben [3].

Anaerobe Bedingungen wurden durch stetes Begasen mit 0,1 vvm (Vessel Volumen pro Minute) Stickstoff erzielt. Wir führten zwei Batch-Fermentationsläufe durch. Im ersten Lauf kontrollierten wir das Redoxpotenzial nicht. Im zweiten Lauf hingegen wurde das Redoxpotenzial auf einen niedrigen, stabilen Wert von -500 mV eingestellt. Die Prozessparameter sowie die Einstellungen, welche für beide Läufe galten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In 24 h-Intervallen entnahmen wir 1 mL Probenvolumen und quantifizierten die Konzentrationen von sowohl Glucose als auch Butanol [3]. Ebenso wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen, um das bakterielle Wachstum zu verfolgen.

Überwachung und Anpassung des Redoxpotenzials

Wir verfolgten den pH-Wert und das Redoxpotenzial online mit Hilfe von zwei ISM® pH/Redox Sensoren (Mettler Toledo®, Schweiz). Der gleiche Sensortyp kann eingesetzt werden, um entweder den pH-Wert oder das Redoxpotenzial zu messen, und die Wahl kann inner-

halb des Konfigurations-Bereiches der Steuerungssoftware getroffen werden. Wir kalibrierten die pH- und die Redoxsensoren außerhalb des Gefäßes mit Hilfe von 2-Punkt Kalibrierungsmethoden [3].

Das Redoxpotential des Fermentationsmediums stellten wir mit 35 g/L Natriumsulfid Nonahydrat (Sigma-Aldrich®, USA) ein. Um die Einführung von Sauerstoff zu verhindern, wurde die Lösung für 15 min mit Stickstoff begast, bevor sie in das Gefäß gepumpt wurde. Der pH-Wert der Lösung betrug 12,84. Um das Redoxpotenzial bei etwa -500 mV zu halten, schalteten wir 24 h, 32 h, 48 h und 120 h nach dem Animpfen die vorkalibrierte Pumpe ein, um dem Medium 2–3 mL Natriumsulfidlösung hinzuzusetzen.

Ergebnisse

Wir verglichen das bakterielle Wachstum sowie die Butanolproduktion zweier Prozesse. In einem Prozess hielten wir das Redoxpotenzial relativ konstant bei -500 mV. In dem anderen Prozess beeinflussten wir das Redoxpotenzial auf experimentelle Weise nicht.

Redox und pH-Trends

Zu Beginn der Fermentation betrug das Redoxpotenzial etwa 0 mV. Während der ersten 24 h, und bei exponentiellem Wachstum von *C. beijerinckii*, sank es drastisch ab, auf -500 mV. Wenn wir das Redoxpotenzial nicht auf experimentelle Weise änderten, schwankte es zwischen -600 und -300 mV, beginnend 24 h nach dem Animpfen (Abb. 2A).

Wenn wir der Kultur Natriumsulfid Nonahydrat zusetzten, konnte ein relativ stabiles Redoxpotenzial von -500 bis -400 mV beibehalten werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase,

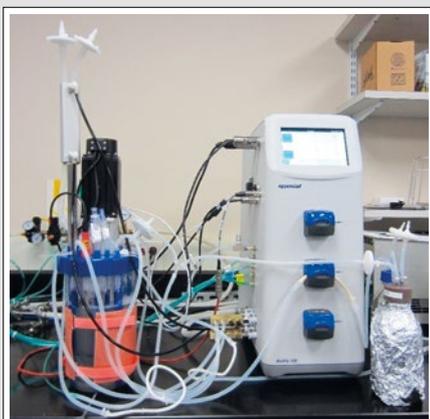


Abb. 1: Bioprozess-Equipment

Überwachung des Redoxpotenzials zur verbesserten anaeroben Fermentation mit Hilfe der BioFlo® 120 Bioprozess-Steuerungseinheit

innerhalb der ersten 24 h der Kultur, sank der pH-Wert in beiden Läufen von 6,5 auf 5,1. Es ist wahrscheinlich, dass Acidogenese stattgefunden hatte und dass sowohl Essigsäure als auch Buttersäure entstanden waren. In dem Lauf ohne Redoxsteuerung blieb der pH-Wert mit 5,0–5,1 relativ niedrig, ohne sich während des Laufes zu erholen, was wiederum auf ein Fehlen einer dominanten solventogenen Phase schließen ließ.

Im Gegensatz dazu begann sich der pH-Wert innerhalb der Redox-gesteuerten Fermentation nach 24 h zu erholen und erreichte nach 70 h einen Wert von 6,0. Dann fiel er langsam auf 5,5 ab – ein Wert, der bis zum Ende der Kultur erhalten blieb. Es ist wahrscheinlich, dass der kurvige pH-Verlauf durch eine Veränderung des mikrobiellen Stoffwechsels hervorgerufen worden ist. Die Butanolproduktion könnte Essigsäure verbraucht haben und es könnte zu einer Produktverschiebung von Buttersäure zu Butanol gekommen sein. Die Verringerung der Säurekonzentration verursachte mit großer Wahrscheinlichkeit den Anstieg des pH-Wertes.

Bakterielles Wachstum

Innerhalb der ersten 24 h beobachteten wir in beiden Kulturen vergleichbare exponentielle Wachstumskurven. In dem Lauf ohne Redoxsteuerung verlangsamte sich das Wachstum nach 24 h signifikant und erreichte nach 124 h einen Endwert von 0,788 OD₆₀₀-Einheiten. Im Gegensatz dazu wuchs *C. beijerinckii* robust weiter, wenn ein Redoxpotenzial von –500 mV beibehalten wurde. Die endgültige OD₆₀₀ nach 124 h betrug 1,565. Dieser Wert ist doppelt so hoch wie derjenige, der ohne Redoxsteuerung erzielt wurde (Abb. 2B).

Fazit

Wenn das Redoxpotenzial experimentell auf einem relativ stabilen Wert von –500 mV beibehalten wurde, wurde im Vergleich zu einem Lauf ohne Redoxsteuerung die doppelte Biomasse sowie eine dreifach erhöhte Ausbeute an Butanol erzielt (Abb. 2C). Dies dient als Beispiel einer Bioprozess-Optimierung durch Überwachung und Anpassung des Redoxpotenzials während der gesamten Dauer einer Kultur.

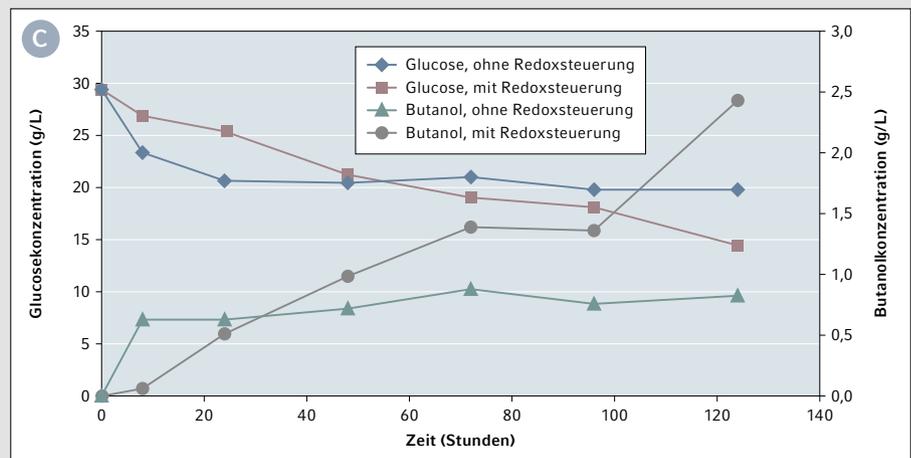
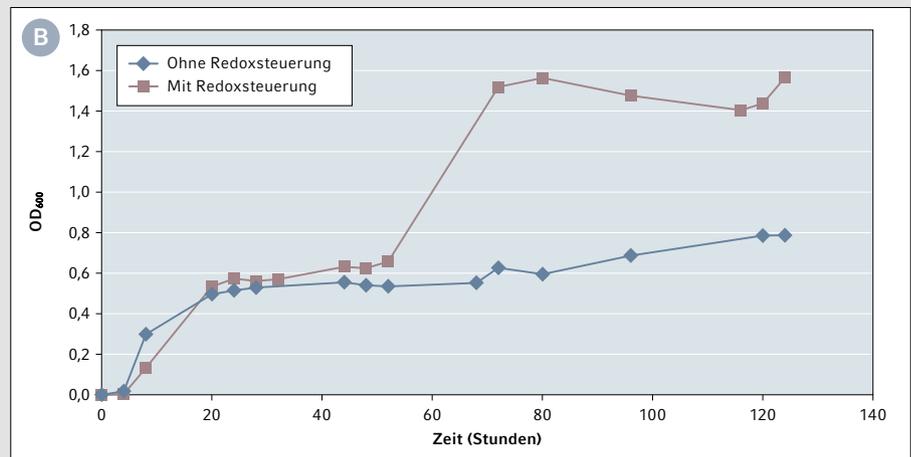
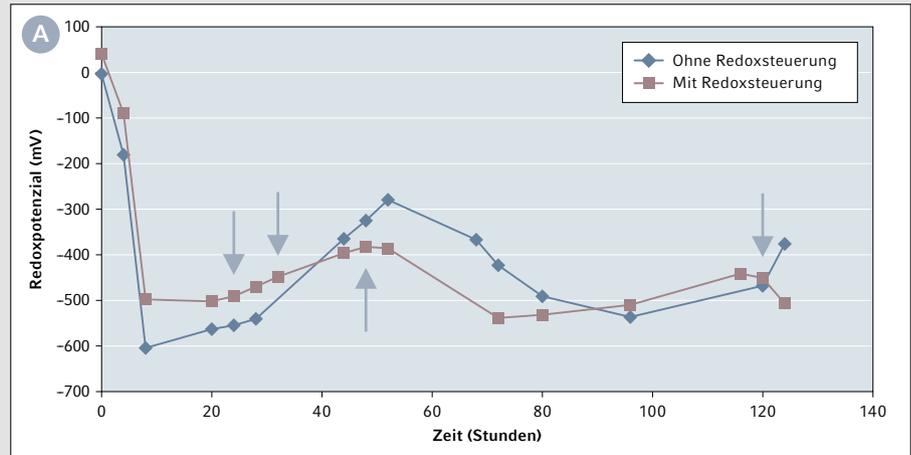


Abb. 2: A) Redoxpotenzial-Trends. In dem Lauf mit Redoxsteuerung wurde Natriumsulfid Nonahydrat 24 h, 32 h, 48 h und 120 h nach dem Animpfen hinzugefügt (Pfeile). B) *C. beijerinckii* Wachstumskurven. C) Glucose- und Butanolkonzentrationen

Literatur

- [1] Wang S, Zhu Y, Zhang Y, and Li Y. Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93: 1021-1030. 2012
- [2] Sridhar J, and Eiteman M. Influence of redox potential on product distribution in *Clostridium*

thermosuccinogenes. *Appl Biochem Biotechnol.* 82: 91-101. 1999

[3] Yang Y, Sha M. Redox Potential Monitoring for Improved Anaerobic Fermentation Using the BioFlo® 120 Bioprocess Control Station and BioBLU® 3f Single-Use Vessels. *Eppendorf Application Note 358*. 2018; erhältlich unter www.eppendorf.com/appnote358

Verkürzte PCR-Laufzeiten bei erhöhter Ausbeute mit Eppendorf Fast PCR-Consumables

ALISA GRUSCHKA, KERSTIN ISERMANN, ARORA PHANG, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Eppendorf Fast PCR-Consumables eine einfache Umsetzung von einem Standard zu einem Fast PCR-Protokoll ermöglichen, ohne dass die Reaktionseffizienz beeinträchtigt wird. Polyethylen, aus dem die Fast PCR Tube Strips gefertigt werden, besitzt bessere Wärmetransfereigenschaften als Polypropylen, das Material, aus dem PCR-Consumables üblicherweise hergestellt werden. Unter Fast PCR-Bedingungen führt die verbesserte Wärmeleitung verglichen mit Standard PCR-Consumables sowie mit Fast PCR-Consumables anderer Hersteller zu einer erhöhten Amplifikationsausbeute. Dies hilft dabei, die Arbeitsabläufe zu optimieren und die Effizienz im Labor zu steigern.

Einleitung

Eine Verkürzung der Amplifikationszeit, und somit ein höherer Durchsatz, sind für jedes Labor von Vorteil. Es ist bereits viel Mühe in die Beschleunigung der PCR geflossen. Ein Ansatz hierzu ist die Etablierung von Zwei-Schritt-Protokollen für den Thermocycler. Weitere Entwicklungen zielen auf Thermocycler mit höheren Temperieraten und spezielle Kits, welche Polymerasen mit schnelleren Expansionsraten beinhalten, ab. Trotz allem ist eine signifikante Reduktion der Zykluszeiten häufig nur mit Hilfe von spezieller Ausrüstung und angepassten Prozessen zu erreichen, was in einem Standardlabor nicht immer einfach umzusetzen ist. Typische Endpunkt-PCR-Protokolle dauern daher nach wie vor eine Stunde oder länger.

Ein Grund, weshalb Fast PCR- oder Rapid PCR-Protokolle nicht im breiteren Maßstab angewendet werden, ist die Tatsache, dass die Umsetzung eines etablierten PCR-Protokolls in ein Fast-Protokoll häufig die Ausbeute und die Spezifität der PCR beeinträchtigt. Auch sind schnelle Protokolle oft mit sehr geringen Reaktionsvolumina verbunden (<5 µL), die sich allerdings selten für Standardanwendungen eignen. Der Einsatz spezieller Fast PCR-Mastermixe reduziert zwar die Laufzeit, ihr volles Potenzial kann jedoch nur in Kombination mit einem Fast Thermocycler ausgeschöpft werden. Der limitierende Faktor ist hierbei der Wärmetransfer vom Block in die Probe. Bisher wurde diese Einschränkung hauptsächlich durch dünnere Gefäßwände umgangen. Der Ansatz der Eppendorf Fast PCR-Consumables besteht im Einsatz eines alternativen Materials mit besseren Wärmetransfereigenschaften, um die Laufzeiten zu verkürzen.

Material und Methoden

Alle Experimente wurden auf Mastercycler® X50 Silberblock Modellen (X50s und X50i, Eppendorf) mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

Deckeltemperatur: 105°C, Energiespar-Modus an

Temperaturmodus: Schnell

Blockeinstellungen: Silver 96

Humane genomische DNA (Roche®) wurde als Template für die Fast PCR-Protokolle mit SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase (TaKaRa) oder dem 2x GeneAmp® Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems®) eingesetzt.

Der PCR Reaktions-Master Mix für die SpeedSTAR HS DNA Polymerase wurde mit Hilfe von 1x Fast Buffer I, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,5 µM eines jeden Primers, 30 ng DNA-Template und 0,25 U der DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 10 µL angesetzt. Der PCR Reaktions-Master Mix für den GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x) wurde mit Hilfe von 1x Fast PCR Master Mix, 0,2 µM eines jeden Primers und 20 ng DNA-Template in 10 µL Gesamtvolumen angesetzt.

Die folgenden Primer wurden zur Amplifikation einer 536 bp Sequenz des humanen β-Globin-Fragmentes eingesetzt:

Vorwärts-Primer 5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG-3'

Rückwärts-Primer 5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3'

Zyklus-Bedingungen:

	SpeedSTAR™ Protokoll	GeneAmp® Fast Protokoll
Initiale Denaturierung	94°C/60 s	96°C/15 s
Zyklen 35x	96°C/2 s 65°C/6 s	96°C/1 s 62°C/16 s
Auf die Zyklen folgende Elongation	72°C/60 s	72°C/10 s
Lagerung	10°C	10°C

PCR-Reaktionen wurden mit den folgenden Consumables durchgeführt:

Eppendorf	Fast PCR Tube Strips
Eppendorf	PCR Tube Strips
ThermoFisher Scientific®	ABI MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0,1 mL
Bio-Rad®	0,2 ml 8-Tube PCR Strips ohne Deckel, low profile
Analytik Jena®	8-Well-Strip (0,2 ml, low profile), transparent mit Deckel

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (GelRed®, Biotium®) nachgewiesen und mit Hilfe des Gel Doc XR+™ (Bio-Rad®) sichtbar gemacht.

Die ThermoFisher Scientific® GeneRuler™ 50 bp DNA-Leiter wurde als Größenmarker eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Signifikant reduzierte Laufzeiten können mit Hilfe von Fast PCR-Reagenzien auf Thermocyclern mit schnellen Temperieraten erzielt werden.

Verkürzte PCR-Laufzeiten bei erhöhter Ausbeute mit Eppendorf Fast PCR-Consumables

Im Gegensatz dazu benötigen Standard PCR-Consumables durch ihre schlechtere Wärmeleitfähigkeit eine höhere Laufzeit. Polypropylen, das Standardmaterial für PCR-Consumables, begrenzt die Geschwindigkeit des Wärmetransfers aus dem Thermoblock in die Probe sogar bei ultra-dünnwandigen Gefäßen. Dies führt unter Fast PCR-Bedingungen in der Regel zu niedrigeren Amplifikationsausbeuten bei ebenfalls verminderter Genauigkeit.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Umsetzung eines Standard PCR-Protokolls in ein Fast PCR-Protokoll unter Zuhilfenahme der Eppendorf Fast PCR Tube Strips aus Polyethylen (Abb. 1). PCR-Protokolle mit zwei verschiedenen Fast PCR-Reagenzien wurden erfolgreich auf dem Mastercycler X50s sowie dem X50i etabliert.



Abb. 1: Eppendorf Fast PCR Tube Strips

Während das Standard-Protokoll in der Regel eine Stunde benötigt, konnte das Fast PCR-Protokoll innerhalb von 12 min (SpeedSTAR) bzw. 16 min (GeneAmp) vollendet werden. Dies stellt eine Reduktion der Laufzeit von über 70 % dar.

Zusätzlich veranschaulicht der Vergleich zwischen Eppendorf Fast PCR Tube Strips, Standard PCR-Consumables und anderen Fast PCR-Consumables die überlegene PCR-Leistung der Eppendorf Fast PCR-Consumables aus Polyethylen anhand höherer Amplifikationsausbeuten (Abb. 2).

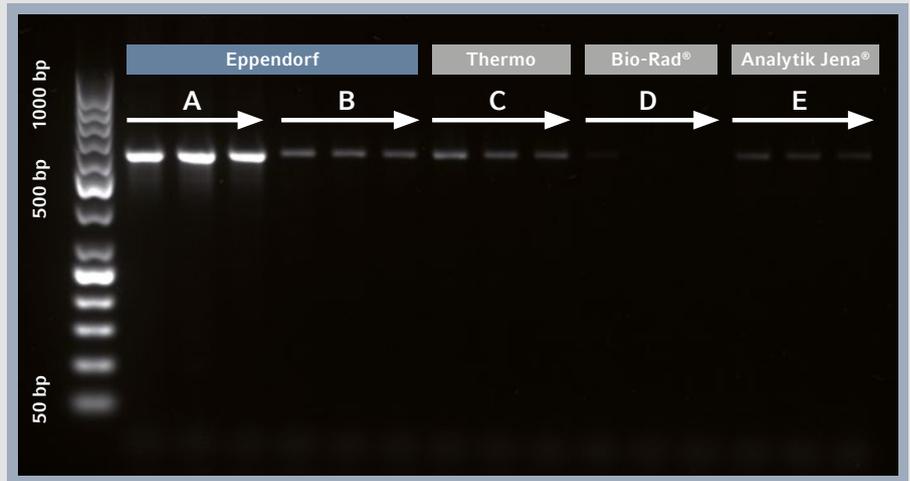
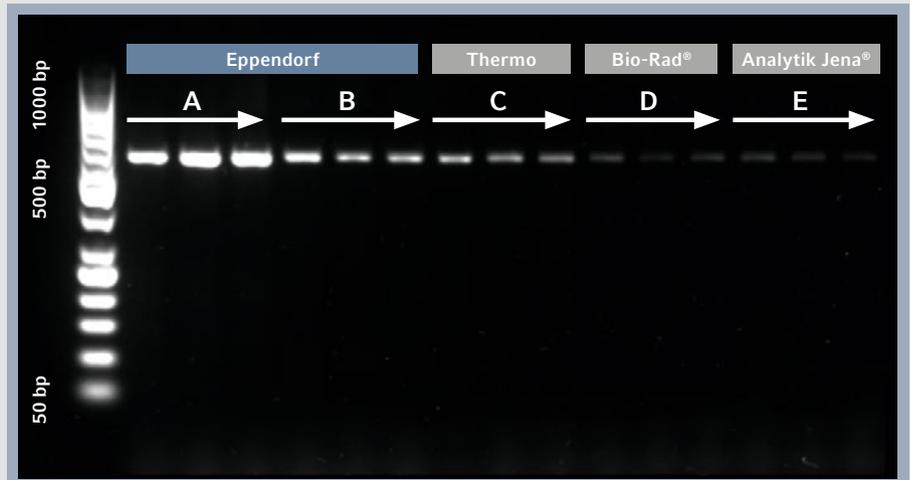


Abb. 2: SpeedSTAR Protokoll (oben), GeneAmp Fast PCR Protokoll (unten)

Fazit

Die überlegenen Wärmetransfer-Eigenschaften von Polyethylen ermöglichen die problemlose Umsetzung von Standard PCR-Protokollen zu Fast PCR-Protokollen bei gleichzeitig erhöhten Amplifikationsausbeuten. Gemeinsam mit Fast PCR-Reagenzien ist es möglich, den Vorteil von hohen Temperieraten auf schnellen Thermocyclern wie dem Mastercycler X50s bzw. X50i voll auszunutzen sowie die Zykluszeiten ohne arbeitsaufwendige Optimierung um mehr als 70 % zu reduzieren. Dies ermöglicht es dem Anwender, die Zeit bis zum PCR-Ergebnis zu verkürzen sowie den Probendurchsatz mit Hilfe von Thermoblocken und Consumables im Standardformat zu erhöhen und somit die Notwendigkeit für spezielle Gerätschaften zu eliminieren.

Mehr Details finden Sie in der Application Note 400; erhältlich unter www.eppendorf.com/appnote400

Kostengünstige DNA-Bestimmung mit Qubit™-Assays im Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence

MARTIN ARMBRECHT, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Für diese Application Note wurden verschiedene Konzentrationen von dsDNA-Proben mit dem Qubit dsDNA-Assay im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence bestimmt. Für die Messungen wurden die UVette® und die Eppendorf µCuvette® G1.0 verwendet. Um die Probenkonzentration zu bestimmen, sind verschiedene Regressionsmöglichkeiten der Standardkurve angewendet worden. Zusätzlich wurden die Resultate mit parallel im Qubit-Gerät durchgeführten Messungen der gleichen Proben verglichen. Wir zeigen, dass der Qubit-Assay sowohl mit der UVette als auch der Eppendorf µCuvette G1.0 verwendet werden kann. In beiden Fällen lassen sich die Assays mit erheblich geringerem Probenvolumen als im Qubit-Gerät durchführen. Bei Verwendung des BioSpectrometer fluorescence mit der UVette wird nur die Hälfte an Qubit-Reagenz benötigt und somit die Reichweite des Kits verdoppelt.

Einleitung

Neben der klassischen Methode, Nukleinsäure-Konzentrationen über Absorptionsmessungen bei 260 nm zu bestimmen, haben sich auch Quantifizierungsmethoden mittels Fluoreszenz etabliert. Absorptionsmessungen sind zwar einfacher durchzuführen, da man die Probe direkt und ohne Standardkurve bestimmen kann, andererseits stößt man bei der photometrischen Methode hinsichtlich Genauigkeit und Präzision gerade bei sehr gering konzentrierten Proben an die mögliche Nachweisgrenze.

Eine gebräuchliche Anwendung zur Bestimmung von z.B. dsDNA sind die Qubit-Methoden von Thermo Fisher Scientific, welche auf einem System aus Fluores-

zenz-Farbstoff und Fluorimeter beruhen. Einige der Qubit-Assays, wie der Qubit dsDNA HS Assay Kit, können auch unabhängig vom Qubit-Fluorimeter im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence durchgeführt werden. Zur Optimierung der Methode im BioSpectrometer wurden hierzu verschiedene Evaluierungsschritte unternommen, wie zum Beispiel die Anwendung verschiedener Regressionsanalysen der Standardkurve. Entsprechende Messungen wurden sowohl in der UVette als auch in der Eppendorf µCuvette G1.0 durchgeführt und die Qualität der jeweiligen Messergebnisse mit der des Qubit-Fluorimeters verglichen [1].

Die wichtigsten Ergebnisse hierzu sollen hier vorgestellt werden.

Methoden

Für die Messungen im Qubit-Gerät werden die im Kit mitgelieferten dsDNA-Standards verwendet und entsprechend hergestellt (0 und 500 ng/mL). Die Bedienung des Qubits erfolgt analog zu den Angaben in der Kit-Versuchsvorschrift. Im BioSpectrometer werden ebenfalls die im Kit enthaltenen Standards verwendet. Durch entsprechende Verdünnungen mit dem Qubit-Puffer werden weitere Konzentrationsstufen hergestellt (0, 50, 100, 250, 500 ng/mL). Dadurch können verschiedene Regressionsmöglichkeiten der Standardkurve am BioSpectrometer erprobt werden. Es werden jeweils vier Messreihen mit unterschiedlichen Probenkonzentrationen (s. Tabelle 1) hergestellt. Jede Konzentrationsstufe wird jeweils fünfmal gemessen.

Abhängig vom Messsystem werden unterschiedliche Proben- bzw. Standardvolumina hergestellt (s. Tabelle 2).

Die Bedienung des Qubit erfolgt analog zu den Angaben in der Kit-Versuchsvorschrift. Für die Messung am BioSpectrometer wird die vorprogrammierte Qubit-HS Methode verwendet [1,2]. Für eine Messung in der UVette werden je 100 µL und für die µCuvette je 5 µL eingesetzt.

Ergebnisse

Die Methodenevaluierung des Qubit dsDNA HS Assay Kit am BioSpectrometer fluorescence zeigt, dass sowohl die UVette als auch die µCuvette verwendet werden können. Die Regressionsanalysen [1] für die UVette machen deutlich, dass wie beim Qubit eine 2-Punkt Kalibrierung (Lineare Interpolation) ausreichend ist.

Abbildung 1 zeigt einen entsprechenden Vergleich zwischen Messungen in der UVette (BioSpectrometer) und dem Qubit-System. Dabei werden jeweils die Präzision der Messreihe (A) und die Abweichung vom Zielwert (B) miteinander verglichen.

Die UVette-Ergebnisse sind im Vergleich zum Qubit bezüglich Präzision (Abb. 1A) absolut vergleichbar und in Hinblick auf das Erreichen des Zielwertes sogar besser als die Messungen im Qubit (Abb. 1B).

Dabei kann bei Messungen in der UVette die Hälfte der verwendeten Reagenzien eingespart werden. Statt 200 µL werden für die UVette nur 100 µL benötigt.

Auch die µCuvette kann für den Assay verwendet werden. Hier zeigt die Methodenevaluierung, dass die besten Ergebnisse bei quadratischer Regression erzielt werden [1]. Die Ergebnisse bezüglich Präzision und Abweichung vom Zielwert sind in Abbildung 2A bzw. 2B dargestellt.

Ausgangskonzentration [µg/mL]	Endkonzentration [ng/mL] (nach 1:20 Verdünnung mit Qubit-Reagenz)
10	500
5	250
2	100
1	50

Tabelle 1

	Proben- oder Standardvolumen [µL]	Puffervolumen für Verdünnung [µL]	Messvolumen [µL]
Qubit™	10	190	200
Eppendorf BioSpectrometer® + UVette®	5	95	100
Eppendorf BioSpectrometer® + Eppendorf µCuvette® G1.0	2	38	5 (40*)

Tabelle 2: Messvolumina in den verschiedenen Messsystemen

*Zur Vermeidung von Pipettierfehlern werden bei der µCuvette Proben und Standards in einem 40 µL Ansatz hergestellt. Für die eigentliche Messung werden aber nur 5 µL benötigt.

Kostengünstige DNA-Bestimmung mit Qubit™-Assays im Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence

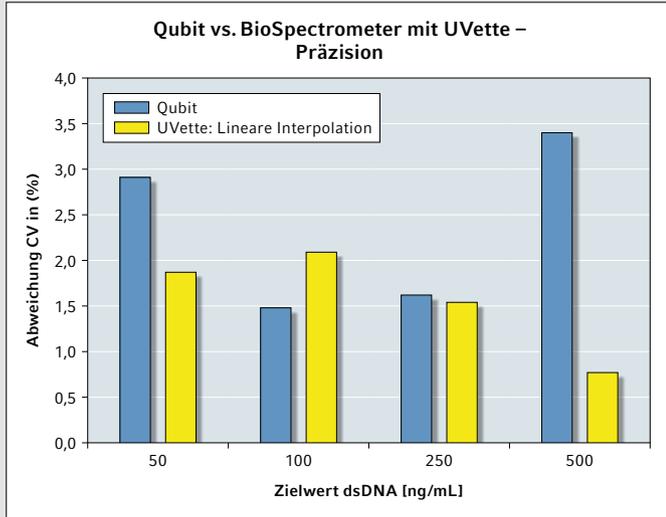


Abb. 1A: Präzision der Messreihe bei verschiedenen Konzentrationsstufen

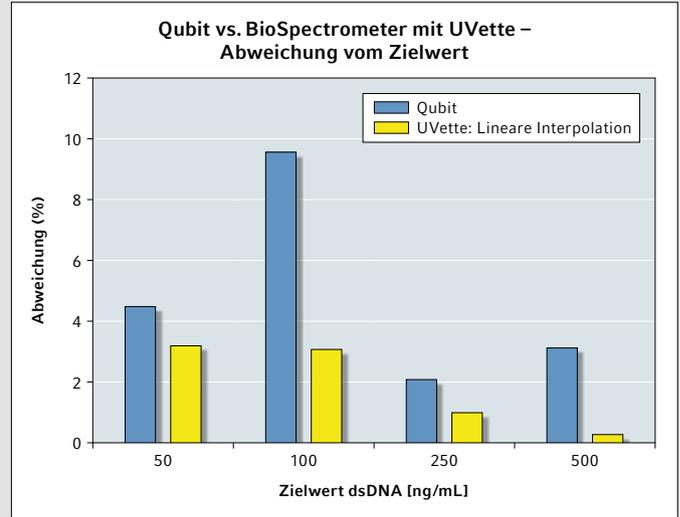


Abb. 1B: Jeweilige Abweichung von Zielwert/dsDNA Konzentration [%]

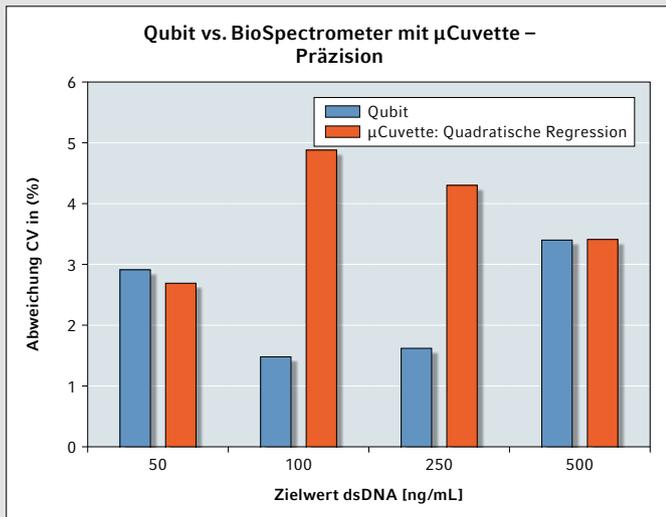


Abb. 2A: Präzision der Messreihe bei verschiedenen Konzentrationsstufen

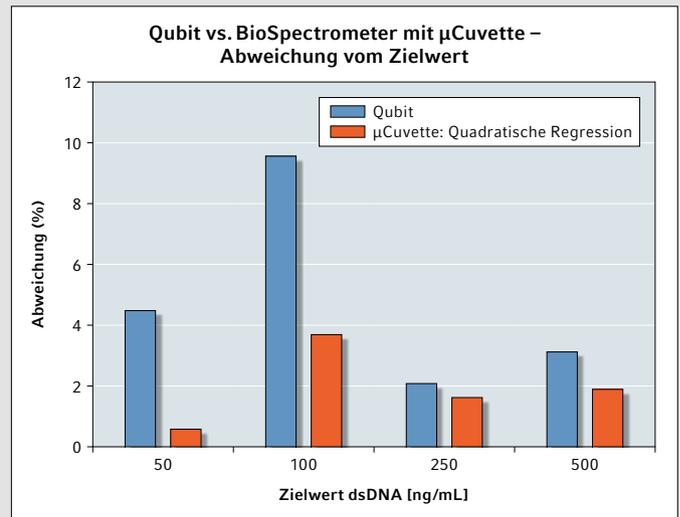


Abb. 2B: Jeweilige Abweichung von Zielwert/dsDNA Konzentration [%]

Auch Messungen in der µCuvette sind bei fast allen Konzentrationsstufen bezüglich Präzision vergleichbar mit den Qubit-Messungen (Abb. 2A) und bei Erreichen des Zielwertes sogar etwas besser (Abb. 2B).

Auch wenn für die Standardkurve vier Standards eingeplant werden müssen, können trotzdem erhebliche Mengen an Reagenzien eingespart werden, da nur 40 µL für eine Messung benötigt werden.

Fazit

1. Bei Verwendung der UVette reicht wie beim Qubit eine 2-Punkt Kalibrierung aus. Die Ergebnisse sind dabei vergleichbar und sogar besser im Vergleich zum Qubit.

2. Im Vergleich zum Qubit wird bei Verwendung der UVette nur die Hälfte der Reagenzien benötigt. Somit erhält der Kit eine doppelte Reichweite bei Verwendung im BioSpectrometer und bei Einsatz der UVette.

3. Auch bei Einsatz der µCuvette zeigen sich vergleichbare Ergebnisse im Vergleich zu den Qubit-Messungen.

4. Es werden bei der µCuvette zwar mindestens vier Standards benötigt, aber dafür können die größten Mengen an Reagenzien eingespart werden.

Mehr Details zur Auswertung finden Sie in der Eppendorf Application Note 402 [1] oder in dem Short Protocol 036 [2].

Literatur

[1] Armbrrecht M. Economic DNA Determination in the Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence Using Qubit™ Assay kits. *Eppendorf Application Note No. 402 (2018)*. Download unter www.eppendorf.com/appnote402

[2] Armbrrecht M. Using the Qubit™ dsDNA HS Kit on the Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence. *Eppendorf Short Protocol No. 036*. Download unter www.eppendorf.com/sp36

Eppendorf Amber Conical Tubes: maximaler Probenschutz bei guter Sichtbarkeit

RAFAL GRZESKOWIAK, EPPENDORF AG, HAMBURG

SANDRINE HAMELS, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES S.A., NAMUR, BELGIEN

Zusammenfassung

Der Umgang mit lichtempfindlichen Reagenzien sowie deren Lagerung findet im Allgemeinen in ambrafarbenen Kunststoffgefäßen statt, von denen die meisten jedoch einen deutlichen Nachteil haben: Sie sind undurchsichtig und lassen somit keinen direkten Blick auf die Probe zu. In dieser Application Note werden sowohl der Lichtschutz der Proben (Fluoreszein-Wiedergewinnungstest) als auch deren Sichtbarkeit (Transmissionsspektrum) in verschiedenen ambrafarbenen konischen Gefäßen (15 mL, 50 mL) untersucht.

Sämtliche untersuchten Gefäße wiesen gute Lichtschutzeigenschaften auf. Allerdings erbrachten ausschließlich die Eppendorf Amber Conical Tubes eine ausreichende Probensichtbarkeit (im Wellenlängenbereich über 550 nm). Sie bieten daher einen klaren Vorteil bei dem Umgang mit der Probe sowie bei der Vermeidung von Kontaminationen.

Einleitung

Für die Handhabung und Lagerung von lichtempfindlichen Reagenzien werden im Allgemeinen ambrafarbene Kunststoffgefäße eingesetzt. Diese Gefäße sind zumeist weitestgehend undurchsichtig, um die Reagenzien vor Degradation zu schützen. Die mangelnde Sichtbarkeit der Probe innerhalb der Gefäße erschwert

das adäquate Handling deutlich, insbesondere bei größeren Gefäßen wie den 15 mL und 50 mL Varianten. Dieser Nachteil wird jedoch meistens in Kauf genommen, um ein frühzeitiges Ausbleichen der Reagenzien und damit eine Gefährdung der Experimente zu vermeiden. In dieser Application Note haben wir sowohl den Lichtschutz der Proben (Fluoreszein-Wiedergewinnungstest) als auch die Sichtbarkeit der Probe (Transmissionsspektrum) in verschiedenen ambrafarbenen konischen Gefäßen untersucht.

Material und Methoden

Lichtschutz der Proben:

Fluoreszein-Wiedergewinnung

Ambrafarbene konische Gefäße verschiedener Hersteller (Eppendorf, Gr, V, Ar, Lc) wurden mit 30 mL einer 30 nM Fluoreszeinlösung (0,1 M NaOH) befüllt und über einen Zeitraum von 92 Stunden bei durchschnittlichen Lichtbedingungen oder im Dunkeln inkubiert. Standard (farblose) Eppendorf Conical Tubes 50 mL wurden als Negativkontrolle eingesetzt (kein Lichtschutz), und Standard (farblose), in Aluminiumfolie gewickelte Eppendorf Conical Tubes 50 mL, dienten als Positivkontrolle (maximaler Lichtschutz). Nach der Inkubation wurden 190 µL jeder Probe einer Fluoreszenz-

messung in Dreifachbestimmung unterzogen (Fluoroskan Ascent™, ThermoFisher Scientific). Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Sichtbarkeit der Proben:

Messung des Transmissionsspektrums

Aus jedem 50 mL ambrafarbenen konischen Gefäß (Eppendorf, Gr, V, Ar und Lc) wurden zwei 5 x 5 mm Wandabschnitte entnommen, und Messungen der Absorptionsspektren (200 nm bis 650 nm) wurden im Eppendorf BioSpectrometer vorgenommen. Blank-Probe: Messung ohne Wandabschnitt (Luft). Die Absorptionsdaten (A) wurden mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung in den prozentualen Durchlässigkeitsgrad umgerechnet:

$$A = 2 - \log_{10} \%T.$$

Ergebnisse und Diskussion

Die ambrafarbenen konischen Gefäße verschiedener Hersteller zeigen signifikante Unterschiede in Bezug auf Farbintensität und Opazität. Die Farbpalette variiert von Mittelbraun bis Schwarz bei nahezu kompletter Unsichtbarkeit der Probe (Abb. 1).

Eppendorf Amber Conical Tubes zeigen hingegen signifikant weniger Farbintensität, und sie sind die einzigen transparenten Gefäße. Diese Transparenz stellt beim Umgang mit der Probe einen überragenden Vorteil dar. Sie ermöglicht dem Anwender, die Eintauchtiefe von Pipettenspitzen eng zu kontrollieren sowie den Füllstand genau einzusehen und somit Pipettenkontaminationen zu vermeiden.

Die Wiedergewinnungsraten der Fluoreszeinproben (Lichtschutz der Proben) nach 92 Stunden Inkubation in farblosen sowie ambrafarbenen Eppendorf Conical Tubes 50 mL sind in Abb. 2 dargestellt. Verglichen mit der farblosen Variante zeigen die Eppendorf Amber Tubes sehr hohe Wiedergewinnungsraten der Fluoreszeinproben und bieten somit nahezu 100% Schutz. Die Wiedergewinnungsraten der Fluoreszeinproben, welche in den anderen ambrafarbenen Gefäßen inkubiert wurden, sind vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

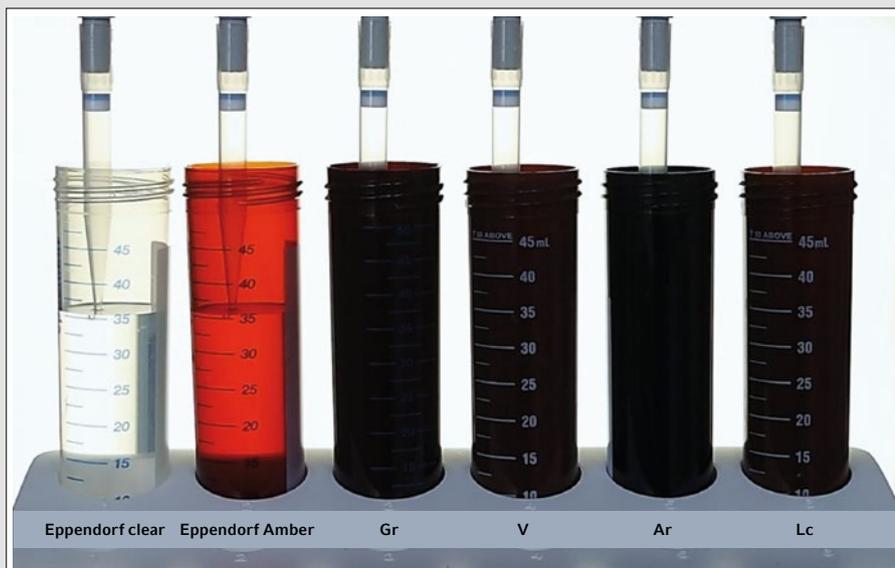


Abb. 1: Sichtbarkeit der Proben und des Pipettierens in verschiedenen ambrafarbenen konischen Gefäßen

Eppendorf Amber Conical Tubes: maximaler Probenschutz bei guter Sichtbarkeit

Die Analyse der Kontrollen bestätigt, dass Fluoreszein ausreichend lichtempfindlich ist (Negativkontrolle: niedrige Wiedergewinnungsraten der bei Tageslicht in farblosen Gefäßen inkubierten Proben), wohingegen unter Lichtschutz keinerlei unspezifischer Abbau des Fluoreszeins beobachtet werden konnte (Positivkontrolle: normale Wiedergewinnungsraten in mit Aluminiumfolie abgedeckten Gefäßen).

Um sicherzustellen, dass die Messungen nicht durch ein mögliches Auslaugen fluoreszenzaktiver Substanzen aus den ambrafarbenen Gefäßen beeinflusst werden, wurde ein zusätzliches Kontrollexperiment durchgeführt.

Hierfür wurde ausschließlich Fluoreszein-Verdünnungslösung (0,1 M NaOH) für 92 Stunden in den Gefäßen inkubiert. Dabei konnte keinerlei Anstieg der Fluoreszenz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3 werden die Transmissionsspektren (Prozentsatz der Lichtdurchlässigkeit bei verschiedenen Wellenlängen) der ambrafarbenen konischen Gefäße miteinander verglichen. Die guten Lichtschutzeigenschaften aller hier untersuchten Gefäße korrelieren mit dem Prozentsatz der Lichtdurchlässigkeit, welcher in dem Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und etwa 550 nm nahezu 0 % beträgt.

Dies stellt den aktiven Bereich der meisten in den Life Sciences sowie bei diagnostischen und anderen Anwendungen verwendeten Anfärbungen und Fluorophoren dar. Über 550 nm zeigen die Eppendorf Amber Conical Tubes einen mäßigen Anstieg der Lichtdurchlässigkeit – dies ermöglicht eine gute Sichtbarkeit der Probe und korreliert mit der hellbraunen Farbe des Gefäßes. Dieses Transmissionsspektrum ist vergleichbar mit jenem der ambrafarbenen Glasgefäße, welche in den Life Sciences sowie in pharmazeutischen und chemischen Laboren routinemäßig zum Einsatz kommen. Es bewegt sich innerhalb der entsprechenden standardmäßigen Grenzen dieser Branche [2].

Fazit

Sämtliche in dieser Application Note getesteten 50 mL ambrafarbenen konischen Gefäße bieten einen guten Schutz für lichtempfindliche Proben. Das wird anhand der hohen (nahezu 100 %) Wiedergewinnungsraten innerhalb der Fluoreszeinproben nach 92 h Inkubation unter normalen Lichtverhältnissen ersichtlich. Dieses Ergebnis wird auch durch die mit nahezu 0 % sehr niedrige Lichtdurchlässigkeit im energiereichen Längenwellenbereich zwischen 200 nm und etwa 550 nm bestätigt. Allerdings sind die Eppendorf Amber Conical Tubes derzeit die einzigen Gefäße, welche im Wellenlängenbereich über 550 nm transparent sind und damit zusätzlich den lange gewünschten Vorteil der guten Probensichtbarkeit bieten. Ein gutes Handling, bessere Möglichkeiten zur Kontaminationsvermeidung und Schutz der lichtsensitiven Probe schließen sich damit nicht mehr gegenseitig aus.

Literatur

[1] Glass Containers for Pharmaceutical Use (3.2.1) p. 363; *European Pharmacopeia* 7.0; 01/2008

[2] Spectral Transmission for Colored Glass Containers; 4 (660) Containers—Glass / *Physical Tests*; USP Guidelines 36

Die vollständige Fassung dieser Application Note können Sie herunterladen unter www.eppendorf.com/appnote403

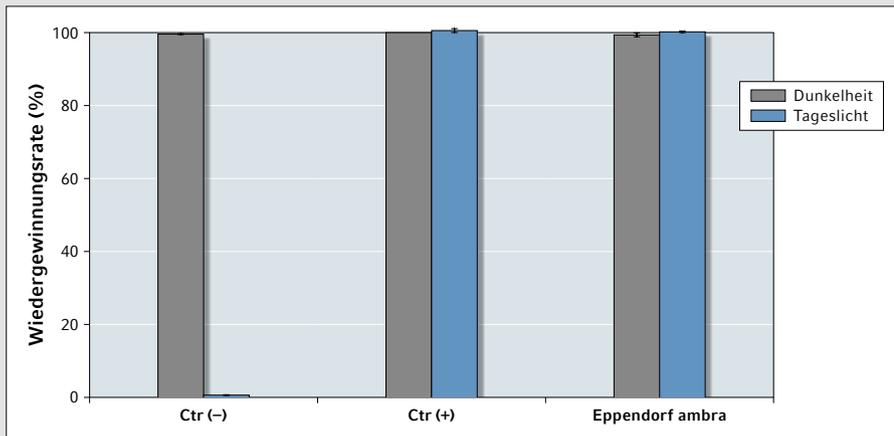


Abb. 2: Fluoreszein-Wiedergewinnungsrate (Prozent) nach 92 Stunden Inkubation in 50 mL ambrafarbenen konischen Gefäßen bei Tageslicht oder im Dunkeln. Ctr (-): Eppendorf 50 mL Conical Tubes (farblos); Ctr (+): Eppendorf 50 mL Conical Tubes (farblos), in Aluminiumfolie gewickelt

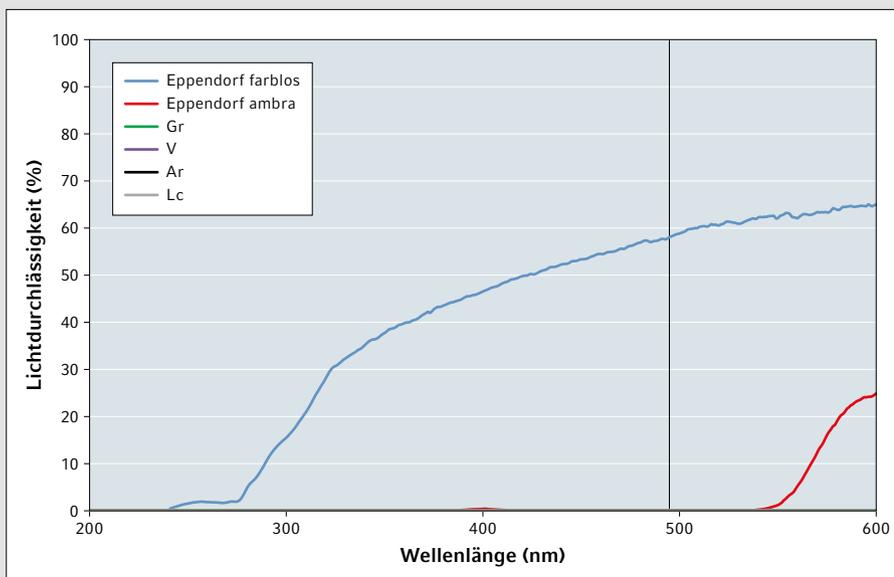


Abb. 3: Transmissionsspektren (Prozent der Lichtdurchlässigkeit als Funktion der Wellenlänge) der ambrafarbenen konischen Gefäße. Das Anregungsmaximum von Fluoreszein (λ_{ex}) ist als durchgehende schwarze Linie dargestellt.

CHRISTIAN HABERLANDT, EPPENDORF AG

CCCadvanced® FN 1 motifs Zellkulturartikel

Seit der bahnbrechenden Entdeckung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) durch Shinya Yamanaka im Jahr 2006 hat der Einsatz pluripotenter Stammzellen (PSCs) Hochkonjunktur.

Dank ihrer umfangreichen Selbsterneuerungseigenschaften sowie ihrer Fähigkeit, sich in zahlreiche unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, bieten PSCs, und insbesondere hiPSCs, zahlreiche vielversprechende Anwendungen, z. B. in der regenerativen Medizin. Neue gebrauchsfertige Zellkulturgefäße für die Kultivierung von Stammzellen sollen die dringend notwendige Reproduzierbarkeit von Experimenten erhöhen.

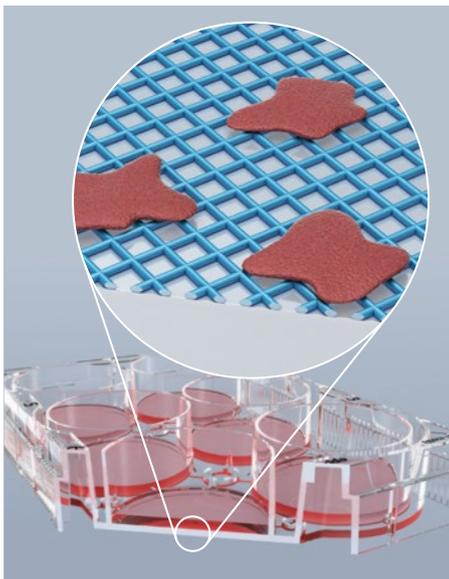
Die größte Herausforderung bei der iPSC-Kultivierung ist es, ihre Eigenschaften bis zur gezielten Induktion zu erhalten. Dazu ist u. a. eine Wachstumsfläche unverzichtbar, welche die extrazelluläre Matrix nachahmt.

Oftmals werden dazu biologische Beschichtungen verwendet, deren Zusammensetzung naturgemäß komplex und undefiniert sind. Eine Folge: eine häufig verminderte Reproduzierbarkeit von Experimenten. Verstärkt wird dies u. a. durch Variationen zwischen verschiedenen Produktionschargen des Beschichtungsmediums und durch ein erhöhtes Kontaminationsrisiko beim Selbstbeschichten von Gefäßen.

Aus diesen Gründen sind gebrauchsfertige, vollsynthetische Kultursysteme, welche frei von tierischen und humanen Komponenten sind, für definierte und reproduzierbare Kulturbedingungen in Forschung und Produktion von großem Interesse.

Entsprechende Zellkulturgefäße für iPSCs gab es bisher allerdings nicht auf dem Markt. Die neuen gebrauchsfertigen CCCadvanced FN 1 motifs Zellkulturartikel von Eppendorf sind mit synthetischen, von Fibronektin abgeleiteten Motiven beschichtet und unterstützen die langfristige hiPSC-Expansion. Zudem sind sie auch für andere Stammzelltypen, andere ECM-abhängige Zellen und Kultur unter xeno-freien restriktiven Kulturbedingungen geeignet.

Ausführliche Informationen unter www.eppendorf.com/ccs-advanced



Tipp

Vorteile für Ihre Stammzellkultur

Wie reproduzierbar sind Ihre iPSC- oder MSC-Kulturen und nachgelagerte Analysen heute? Wenn Sie derzeit biologische oder selbstbeschichtete Zellkulturgefäße nutzen, ist hier sicher Raum für signifikante Verbesserung und Zeitersparnis. Synthetische Oberflächen wie die neuen CCCadvanced Zellkulturgefäße bieten naturgemäß ein hohes Maß an Konsistenz zwischen verschiedenen Fertigungschargen. Dadurch, dass sie direkt gebrauchsfertig sind, sparen Sie Zeit und senken zudem, verglichen mit selbstbeschichteten Gefäßen, das Kontaminationsrisiko signifikant. Dies trägt ebenfalls zu einer erhöhten Reproduzierbarkeit bei.

Für zentrale Einkäufer bietet die neue Oberfläche ebenfalls diverse Vorteile: Durch die, verglichen mit vielen anderen Beschichtungen, große Bandbreite an erfolgreich getesteten kompatiblen Zellen, Medien und Dissoziationsreagenzien können viele Applikationen abgedeckt werden. Die enorm lange und einfache Lagerfähigkeit von drei Jahren bei Raumtemperatur sichert eine größere Investition ab und spart zudem Kapazitäten in Kühlräumen.



Jetzt mehr Informationen und ein kostenloses Sample anfordern unter www.eppendorf.com/ccs-advanced



QR-Code scannen für mehr Informationen!

BARBRO PATTERSON, EPPENDORF AG

Rundum sorglos mit unserem Technischen Service

Alles aus einer Hand! Damit Sie Ihre Eppendorf-Laborgeräte möglichst produktiv und über lange Betriebszeiten nutzen können, bieten wir als Hersteller auch einen umfassenden und gründlichen technischen Support. Dieser beinhaltet von der Standorterfassung bis zur Installation, Wartung, Zertifizierung und Reparatur zahlreiche unterstützende Dienstleistungen.



Zentrifugenwartung durch hochqualifizierte und herstellergeschulte Eppendorf-Service-techniker

Wartung und Zertifizierung

Mit unseren Programmen zur Vorbeugenden Wartung beugen Sie unerwarteten und unliebsamen Geräteausfallzeiten und damit verbundenen Kosten wirksam vor, da Probleme rechtzeitig erkannt und behoben werden können.

Unsere Zertifizierungspakete umfassen Services zur Kalibrierung, Verifizierung sowie Installations- und Funktionsqualifizierung (IQ/OQ) um sicherzustellen, dass Ihre Systeme gleichbleibende und verlässliche Resultate erbringen.

Zur Einhaltung Ihrer Laborrichtlinien unterstützen wir Sie mit der entsprechenden Dokumentation.

Eppendorf Performance Pläne

Bei regelmäßiger Durchführung sorgen unsere Performance Pläne dafür, dass Ihre Liquid-Handling-, Sample-Handling- und Cell-Handling-Instrumente über Jahre im besten Zustand sind und die Herstellerspezifikationen für Genauigkeit und Präzision erfüllen.



Eppendorf Servicetechniker bei einer Multikanal-Temperaturverifizierung des Mastercycler® X50s

Unsere Serviceprogramme für Ihre Eppendorf-Laborgeräte:

- > ESSENTIAL CHECK: Überprüfung der wichtigsten Funktionen des Geräts
- > ADVANCED MAINTENANCE: Vorbeugendes Serviceprogramm zur Einhaltung von Herstellerspezifikationen
- > PREMIUM SERVICE: Rundum-sorglos-Paket durch umfassenden Dienstleistungsvertrag über Wartung und Reparatur
- > Installationsqualifizierung (IQ): Dokumentierte Verifizierung, dass die installierte Anlage mit dem genehmigten Design und den Empfehlungen des Herstellers übereinstimmt
- > Funktionsqualifizierung (OQ): Dokumentierte Verifizierung, dass die installierte Anlage im Rahmen der vorgesehenen Spezifikationen den Erwartungen gemäß funktioniert



Weitere Info und Serviceanfragen unter www.eppendorf.com/epServices

HANAË KÖNIG, EPPENDORF AG

Reinigung und Wartung Ihrer Laborgeräte

Laborinstrumente sind täglich Kontaminationen, aggressiven Chemikalien und der Bedienung durch verschiedene Anwender ausgesetzt. Bei mangelnder Wartung führt dies zum Teileverschleiß oder zu verminderter Genauigkeit und Präzision. Unsere Anleitungen und Videos zu Reinigungs- und Routinewartungsschritten, die Sie selbst durchführen können, helfen Ihnen, die Lebensdauer Ihrer Laborgeräte zu verlängern.

Laborgeräte brauchen regelmäßig Wartung. Die sensiblen Geräte sollen genaue und präzise Ergebnisse liefern. Pipetten enthalten z. B. viele Teile aus unterschiedlichen Materialien wie Metall, Polymeren und Silikon. Der Kontakt mit Probenflüssigkeit kann Kontamination in der Pipette sowie Kreuzkontamination zwischen verschiedenen Proben verursachen. Auch der Einsatz starker Chemikalien kann Teile der Pipette in Mitleidenschaft ziehen und zu Korrosion führen.

Zentrifugen, wenngleich sie schwer und robust sind, unterliegen bei der Zentrifugation hohen Kräften und häufig auch aus Gefäßen evaporierenden chemischen Dämpfen. Einige Reinigungs- und Wartungsschritte wie z. B. das Fetten des Rotors, die Reinigung der Rotorkavitäten oder der Zentrifugeninnenkammer können Sie selbst durchführen.

Informieren Sie sich jetzt im Eppendorf Handling Solutions-Bereich über die sach-

gerechte Reinigung von Pipetten und Zentrifugen. Eine Reihe von Artikeln und Videos begleitet Sie Schritt für Schritt durch den Reinigungsprozess. Nutzen Sie folgende Links, um mehr zu erfahren:

- > Pipetten: www.eppendorf.com/bn50/pipette
- > Zentrifugen: www.eppendorf.com/bn50/centrifuge

Qualitätsmanagement-Systeme erfordern immer häufiger regelmäßige Wartungs- und Zertifizierungsservices für Pipetten, Zentrifugen und Rotoren, um ein sicheres Arbeitsumfeld und den Betrieb gemäß Herstellerangaben sicherzustellen. Unsere Performance Pläne (s. auch S. 10) unterstützen Sie beim Aufrechterhalten eines einwandfreien Betriebes Ihrer Geräte sowie bei der Einhaltung Ihrer Laborrichtlinien anhand von entsprechenden Zertifizierungsdokumenten.

www.eppendorf.com/epServices



News

Was unsere Leser sagen

Regelmäßig erhalten wir Feedback von unseren geschätzten Lesern. Wir freuen uns, dass viele von Ihnen den BioNews-Inhalt informativ und nützlich und in vielen Fällen auch erfreulich und inspirierend finden.

Hier einige Leserstimmen:

„Mir hat das Kreuzworträtsel viel Spaß gemacht! Auch den Artikel über das Pipettieren fand ich toll! Gerade kürzlich haben wir bei uns im Labor diskutiert, wann und wie man revers pipettiert und dass wir nie wirklich gelernt haben, wie man korrekt pipettiert. Ich werde diese Ausgabe garantiert auch den anderen Kollegen in meinem Labor zeigen!“ (Charlotte C., Großbritannien)

„Kompliment an Eppendorf für die stetige Verbesserung von Produkten. Das macht uns Wissenschaftlern das Leben viel leichter. Ich finde das VisioNize-System ganz interessant und praktisch. Wie oft gibt es Versuche, die über Nacht laufen, aber keine Möglichkeit, diese zu überwachen. Mit diesem System könnten wir alles über das Smartphone überwachen.“ (Rashell W., Jamaica)

„Obwohl ich drei Vorträge für eine kurz bevorstehende Konferenz vorzubereiten hatte, war mein ‚Verlangen‘ nach einer personalisierten Pipette dermaßen groß, dass ich erst einmal das Kreuzworträtsel lösen musste (übrigens ein ungeklärtes Phänomen, warum man andere Dinge erledigt anstelle der vordringlichen Aufgaben)!“ (Helen O., Großbritannien)

„Nein, ich habe meine Kollegin nicht gebeten, mich mal kurz zu kneifen. Ich weiß, dass ich nicht träume, auch wenn es sich so anfühlt. Ich bekomme meine ganz persönliche Pipette! Das klingt so herrlich verrückt. Das ist das Salz in der Suppe des Arbeitslebens. Das bringt Farbe in den gar nicht so grauen Alltag des Forschens! [...] You made my day!“ (K. Henriette R., Deutschland)

Möchten auch Sie uns Feedback geben? Dann senden Sie uns einfach eine E-Mail an bionews@eppendorf.de

HANAË KÖNIG & TANJA MUSIOL, EPPENDORF AG

Fünf Möglichkeiten, PCR-Durchläufe zu optimieren und zu beschleunigen

In fast jedem Labor weltweit werden täglich mehrere PCR-Reaktionen durchgeführt. PCR ist momentan die schnellste und sicherste Methode, DNA zu vervielfältigen. Dennoch birgt diese Standardmethode Tücken und unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren. Der Bedarf, PCR-Durchläufe zu beschleunigen und zu optimieren, ist somit allgegenwärtig und kann auf verschiedene Weise angegangen werden. Wir zeigen in diesem Artikel fünf Möglichkeiten auf.

Bei der fast schon als narrensicher geltenden PCR verlässt man sich meist auf kommerziell erhältliche Kits, die optimale Ausbeute bei schneller Durchführung versprechen. Die Probenvorbereitung sowie sämtliche Geräte und Verbrauchsmaterialien im gesamten PCR-Ablauf haben jedoch einen oft unterschätzten Einfluss auf das Ergebnis.

Jede PCR-Reaktion ist anders, jedes Primerpaar und jede DNA-Probe haben andere Anforderungen an die Temperatur, und meist bedeutet ein Optimierungsschritt auch, einen gesamten PCR-Durchlauf abzuwarten. Schnellere Durchführung der PCRs und höherer Durchsatz in Experimenten und Analysen sind gefragt. Das bedeutet jedoch auch, dass die Optimierung schneller vorgenommen werden muss.

1. Das richtige Material steigert Heiz- und Kühlraten

Wärmeleitende Materialien, die zur Lagerung des PCR-Blocks im PCR-Gerät genutzt werden, führen zu höheren Heiz- und Kühlraten. Aluminium ist das Standardmaterial. Bei einem mit Silber legierten Block ist die Heizrate doppelt so hoch (Tab. 1).

Thermoblock	Aluminium	Silber
Heizrate	5 °C/s	10 °C/s
Kühlrate	2,3 °C/s	5 °C/s

Tab. 1: Heiz- und Kühlraten je nach für den Thermoblock verwendetem Material

Schnelleres Erreichen der Temperatur führt automatisch auch zu einem schnelleren PCR-Durchlauf. Wichtig ist, dass die Temperaturen zuverlässig mit geringster Abweichung und minimalem Over- und Undershoot erreicht werden. Um zu gewährleisten, dass die Temperaturen zuverlässig erreicht werden und Ihr PCR-Gerät optimal funktioniert, sollte es regelmäßig und am besten durch einen akkreditierten Service mit dem sogenannten Temperature Verification System (TVS) kontrolliert werden.

2. Neue Technologien maximieren Optimierungsmöglichkeiten

Seit der Entdeckung der PCR hat sich der Markt für PCR-Geräte rasant entwickelt.

Eine bahnbrechende Neuerung war die Möglichkeit, Temperaturgradienten zu programmieren, um so in jeder Reihe des PCR-Blocks eine andere Temperatur zu erreichen. Dies hat die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur revolutioniert und massiv beschleunigt.

Um jedoch auch die optimale Denaturierungstemperatur festzulegen, bedurfte es eines weiteren PCR-Durchlaufs. Im Mastercycler X50 ist es erstmals möglich, einen 2D-Gradienten zu programmieren (Abb. 1).

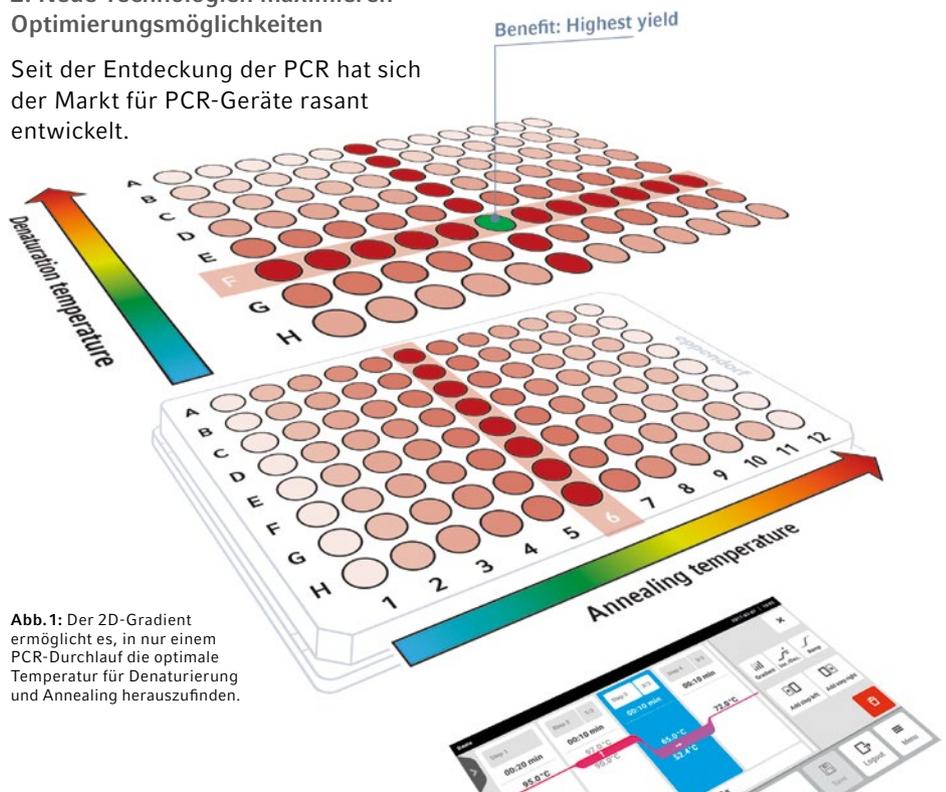


Abb. 1: Der 2D-Gradient ermöglicht es, in nur einem PCR-Durchlauf die optimale Temperatur für Denaturierung und Annealing herauszufinden.

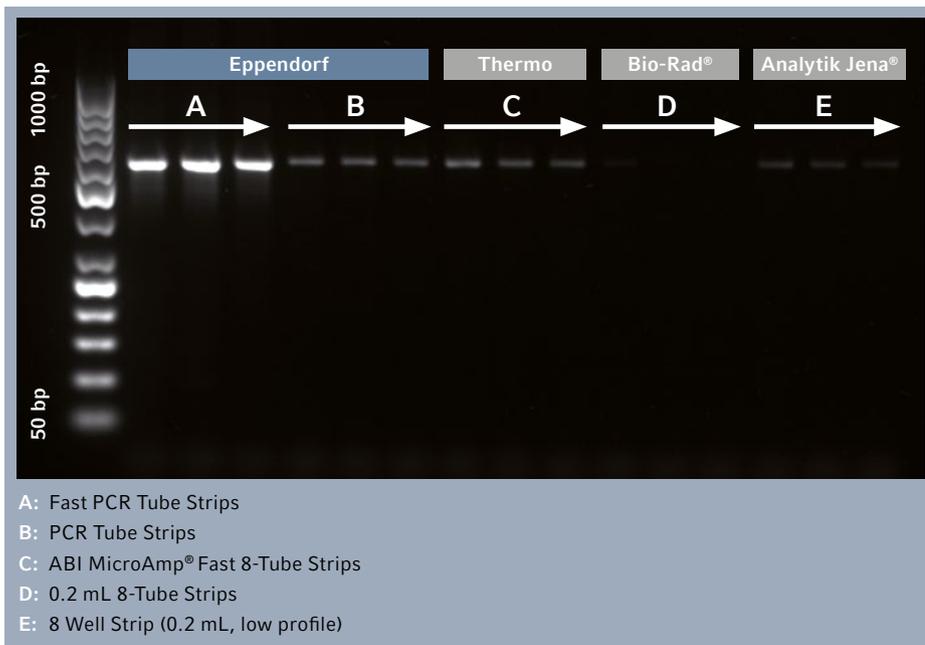


Abb. 2: GeneAmp Fast PCR Protocol. Die Verwendung von Eppendorf Fast PCR-Consumables führt bei gleichzeitiger Verwendung des GeneAmp Fast PCR Protocol zu einer massiv höheren DNA-Ausbeute im Vergleich zum Wettbewerb. 20 ng DNA in 10 µL PCR-Ansatz

So kann in jeder Reihe eine andere Denaturierungstemperatur und in jeder Zeile eine andere Annealingtemperatur eingestellt werden. Unvollständige Denaturierung und mispriming werden durch die optimale Temperatur vermieden. Dies ermöglicht, in nur einem PCR-Durchlauf die Temperaturen festzulegen, die zu maximaler Ausbeute und optimaler PCR-Reproduzierbarkeit führen [1].

3. Optimierte Verbrauchsmaterialien beschleunigen PCR-Durchläufe

Eine weitere Möglichkeit, PCR-Durchläufe zu beschleunigen, liegt darin, speziell entwickelte Fast PCR-Kits zusammen mit Fast PCR-Consumables zu verwenden. Diese haben eine besonders dünne Wand bei gleichbleibender Stabilität und ermöglichen so schnelleres Heizen und Kühlen der Probe. Die Temperatur innerhalb der Probe wird gleichmäßiger erreicht und mittels des Fast PCR-Kits benötigt ein PCR-Durchlauf nur 16 Minuten [2]. Darüber hinaus führt die Verwendung von Fast PCR-Consumables zu einer höheren DNA-Ausbeute (Abb. 2).

4. Im Hochdurchsatz PCR-Labor erhöht eine zentrale Steuerung der Geräte die Geschwindigkeit

Werden mehrere PCR-Geräte zeitgleich mit dem gleichen Programm benötigt, wie dies oft in PCR-Routinelaboren der Fall ist, erleichtert eine zentrale Steuerung

mehrerer Geräte die Arbeit. Es können teilweise bis zu 50 eco-Module in einem Netzwerk verbunden und über eine Software-Applikation gesteuert werden (Eppendorf CycleManager X50 verknüpft mit Mastercycler X50). So können z. B. 20 Geräte mit einem und 30 Geräte mit einem anderen Programm zeitgleich gestartet werden. Für Labore mit geringem Durchsatz lassen sich bis zu neun eco-Module an einen Master anschließen und von diesem steuern. Dies spart Zeit in der Programmierung der Geräte.

5. Tipps und Tricks zur PCR-Optimierung

Es ist möglich, PCR-Abläufe auch mit Anpassungen des Primerdesigns, der Zusammensetzung des PCR-Mastermixes und der Probenvorbereitung zu optimieren. Des Weiteren kann die Anpassung der Denaturierungs- und Annealingtemperatur sowie der Elongationsdauer entscheidend sein für die Menge an DNA sowie deren Reinheit und Qualität. Es lohnt sich, alle Möglichkeiten zu testen, bevor ein neues Kit gekauft oder neue Primer bestellt werden. Tipps und Tricks zur PCR-Optimierung sowie spannende Hintergrundinformationen und lehrreiche Fakten gibt es online unter

www.eppendorf.com/bn50/pcr

In Artikeln und Videos erfahren Sie Wissenswertes und können Ihren Arbeitsalltag einfacher und schneller gestalten.

Fazit

Es gibt viele Möglichkeiten, um PCR-Durchläufe zu verbessern – von der Vorbereitung über die Verbrauchsmaterialien und die Geräte bis hin zu neuen Technologien. Wir haben in diesem Artikel einige davon aufzeigen können. Auch wenn das Herausfinden der optimalen Kombination ein wenig Zeit kostet, wird die anfängliche Mühe belohnt – mit Zeit- und Kosteneinsparung sowie dem guten Gefühl, sich auf jede PCR verlassen zu können.

[1] Phang A, Schommartz T. Ultimate PCR Optimization with Eppendorf Mastercycler® X50 2D-gradient. *Eppendorf Application Note 387*. www.eppendorf.com/appnote387

[2] Isermann K, Phang A. Reduced PCR runtimes and increased yields using Eppendorf Fast PCR Consumables. *Eppendorf Application Note 400*. www.eppendorf.com/appnote400. Eine Kurzversion dieser Application Note finden Sie in dieser Ausgabe in der Application Note S. 3–4.

CAROLYN TAUBERT UND BERRIT HOFF, EPPENDORF AG

Willkommen in Hamburg: Flavio Donato & Andrea Ablasser



**eppendorf
& Science**
PRIZE FOR
NEURO
BIOLOGY

Flavio Donato im
Eppendorf Training Centre



Erinnerung an Hamburg: Andrea
Ablasser mit personalisierter Pipette

Der italienische Wissenschaftler Flavio Donato, Ph.D., vom Kavli Institute der Norwegian University of Science and Technology in Trondheim, Norwegen, besuchte Eppendorf im Sommer 2018. Dr. Donato erhielt den *Eppendorf & Science Prize for Neurobiology 2017* für seine Forschungsarbeit an Mechanismen der Reifung neuronaler Netzwerke, die im Gehirn an der Verarbeitung von räumlicher Information beteiligt sind.

Nach dem Besuch unserer Produktion erklärte Flavio: „Jeder einzelnen Pipettenspitze, die ich in meinem Leben verwendet habe, zolle ich Respekt, nachdem ich gesehen habe, wieviel Technologie und Sorgfalt in die Produktion einfließt!“

2019 wird Flavio Donato sein eigenes Labor am Biozentrum der Universität Basel in der Schweiz eröffnen, wo er erforschen wird, wie neurale Schaltkreise während der Kindesentwicklung die Fähigkeit zum Lernen und zur Gedächtnisbildung erwerben.

Mehr Informationen unter www.eppendorf.com/prize

Auch Dr. Andrea Ablasser, Preisträgerin des *Eppendorf Award for Young European Investigators 2018*, war zu Gast bei Eppendorf. Andrea Ablasser ist Assistant Professor am Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Schweiz. Sie erhielt den Eppendorf Award für die Erforschung eines wesentlichen Schrittes in der angeborenen Immunabwehr, bei dem eine Abwehrreaktion getriggert wird, sobald Zellen von Mikroorganismen angegriffen werden. Ihre Arbeit erklärt Mechanismen, durch die Zellen über das Eindringen von Fremd-DNA informiert werden. Sie konnte auch nachweisen, dass derselbe Mechanismus in alternden Zellen ausgelöst wird und so zur Seneszenz beiträgt.

Wie Flavio Donato einige Wochen zuvor präsentierte auch Andrea Ablasser ihre Forschungsarbeit einem interessierten Publikum von Eppendorf-Mitarbeitern. Sie besichtigte anschließend verschiedene Produktionsbereiche, das Eppendorf Training Centre sowie unser „Museum“. Beeindruckt von Besuchsprogramm und Eppendorf-Spirit freute auch sie sich besonders über eine Pipette mit Laseraufdruck ihres Namens.

Mehr Informationen unter www.eppendorf.com/award

Warenzeichenhinweise

Amazon® is a registered trademark of Amazon Technologies, Inc., USA. Analytik Jena® is a registered trademark of Analytik Jena®, Germany. Applied Biosystems®, GeneAmp®, MicroAmp® are registered trademarks of Applied Biosystems LLC, USA. ThermoFisher Scientific® is a registered trademark of ThermoFisher Scientific, Inc., USA. Bio-Rad® is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc., USA. GelRed® is a registered trademark of Biotium, Inc., USA. Mettler Toledo® and ISM® are registered trademarks of Mettler-Toledo GmbH, Switzerland. Roche® is a registered trademark of F. Hoffmann-La Roche AG, Switzerland. Sigma-Aldrich® is a registered trademark of Merck KGaA, Germany. SpeedSTAR® is a registered trademark of Takara Bio Inc., Japan. Fluoroskan Ascent™ and GeneRuler™ are trademarks of ThermoFisher Scientific, Inc., USA. Qubit™ is a trademark of Molecular Probes, Inc., USA. Gel Doc XR+™ is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc., USA.

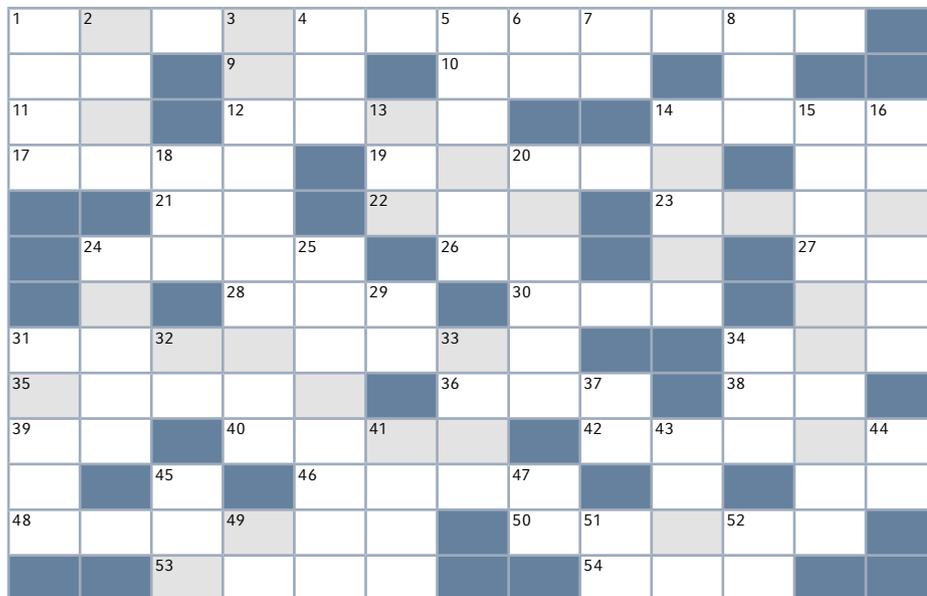
Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, BioBLU®, CCCadvanced®, Combitips advanced®, CryoCube®, Eppendorf BioSpectrometer®, Eppendorf µCuvette®, Eppendorf Research®, epPoints®, the epServices® logo, Mastercycler®, Multipipette®, UVette®, ViscoTip® are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. BioFlo® is a registered trademark of Eppendorf, Inc., USA. New Brunswick™ is a trademark of Eppendorf AG, Germany. U.S. Design Patents are listed on www.eppendorf.com/ip

Pipetten-3er-Pack zu gewinnen

Die Lösung des Jubiläums-Preisrätsels aus BioNews Nr. 48 lautete „Happy BioNews Anniversary“. Über je eine personalisierte Pipette freuen sich die 5 Hauptgewinner Younghyun Wy (Korea), Katharina-Henriette Rasp (Deutschland), Julie Wilson (Großbritannien), Joanna Michalska (Polen) und Gaston Bonenfant (USA).

Viel Glück bei unserem neuen Rätsel!

Bringen Sie alle Buchstaben in den grau hinterlegten Feldern in die korrekte Reihenfolge und schicken Sie uns die richtige Antwort bis zum **30. Juni 2019**.



Einfach eine E-Mail an bionews@eppendorf.de senden oder online teilnehmen unter www.eppendorf.com/bn-service

Unter allen richtigen Einsendungen verlosen wir wieder attraktive Preise. Die Gewinner werden schriftlich benachrichtigt. Eine Barauszahlung ist nicht möglich. Der Rechtsweg ist ausgeschlossen. Eppendorf-Mitarbeiter und deren Angehörige dürfen nicht teilnehmen. Der Gewinner des ersten Preises wird in Ausgabe 52 veröffentlicht.

1. Preis:

3 Eppendorf Research® plus Pipetten (im 3er-Pack Ihrer Wahl)

2. bis 5. Preis:

je 1 Amazon® Gutschein im Wert von 50,00 Euro

6. bis 15. Preis:

je 400 Bonus epPoints®

(Registrierung bei epPoints erforderlich)

WAAGERECHT

- 1 Figur aus 1001 Nacht
- 9 Mündet bei Venedig ins Meer
- 10 Papageiengattung
- 11 Neue Art von Intelligenz (engl. Abk.)
- 12 One small ... for man
- 14 Sehr wichtige Personen (Abk.)
- 17 Gewässer, See (Engl.)
- 19 Musikalisches Werk in Italienisch
- 21 Notaufnahme (engl. Abk.)
- 22 Fleur de ...
- 23 Gut, vorteilhaft (Engl.)
- 24 Programmiersprache
- 26 Chemisches Symbol für Rhenium
- 27 Nashville ist die Hauptstadt (Abk.)
- 28 Börsengang (engl. Abk.)
- 30 Abk. aus der Spektroskopie, ergänzt UV
- 31 Weißwein von der Loire
- 34 Weiblicher Vorname

- 35 Wichtige Computertaste
- 36 Einflussreicher englischer Musiker (Nachname)
- 38 Caracas ist die Hauptstadt (Abk.)
- 39 Nachsatz in einem Brief
- 40 Weiblicher Vorname
- 42 Staat im englischen Sprachgebrauch
- 46 Showformat
- 48 Beweis in der Kriminalistik (Plur.)
- 50 Solche Gefäße schützen lichtempfindliche Proben (Engl.)
- 53 Weltfußballverband (Abk.)
- 54 Reisehilfe, Karte (Engl.)

SENKRECHT

- 1 Engl. Sänger und Songwriter
- 2 Trendige Superfood-Samen
- 3 Stellt Leistungsfähigkeit Ihres Eppendorf-Equipments sicher
- 4 So können Lines, Topics, Dogs oder Pants sein
- 5 Jemand wie Jay-Z
- 6 Edelgas (Abk.)
- 7 Pretoria ist Regierungssitz dieses Landes (Iso-Kürzel)
- 8 Einheit der Druckauflösung
- 13 Griechische Göttin der Morgenröte
- 14 Wichtiger Nerv
- 15 Misst die Lichtintensität
- 16 Größte Stadt Australiens
- 18 Papageienart in Neuseeland
- 20 So viele Freunde braucht ein englisches Fußballteam
- 24 Nietenhose

- 25 Drink vor dem Dinner
- 29 Das ist französisches Gold, oder? (fragt der Engländer)
- 31 Retro-Fotofilter
- 32 Teil der Bibel (Abk.)
- 33 Tatsächlich existierend
- 34 Frauenname
- 37 Open source oder Operating System (Abk.)
- 41 US-Raumfahrtbehörde
- 43 Blechblasinstrument
- 44 Liebenswerter Alien
- 45 Gebirgszug in Marokko
- 47 1000 Ampere (Abk.)
- 49 Vorsilbe für zwei
- 51 1000 davon bilden einen Meter
- 52 Vorsilbe für Tips, Motion, Services und mehr

Lösungshinweis für das Gewinnspiel BioNews Nr. 50:

N N L S B

Einsendeschluss für das Gewinnspiel: **30. Juni 2019**. Online teilnehmen unter

www.eppendorf.com/bn-service oder das Lösungswort per E-Mail an bionews@eppendorf.de senden!



Publish your research in the Science family of journals

The Science family of journals (*Science*, *Science Advances*, *Science Immunology*, *Science Robotics*, *Science Signaling*, and *Science Translational Medicine*) are among the most highly-regarded journals in the world for quality and selectivity. Our peer-reviewed journals are committed to publishing cutting-edge research, incisive scientific commentary, and insights on what's important to the scientific world at the highest standards.

Submit your research today!

Learn more at [ScienceMag.org/journals](https://www.sciencemag.org/journals)

Science
JOURNALS AAAS