

Automatisierung des Bio-Plex Pro™-Analyseverfahrens

Karolin Keil, Lars Radke, Ulrich M. Tillich, Marcus Frohme*

Zusammenfassung

Für den simultanen Nachweis mehrerer Analyten innerhalb einer Probe ist die Bead-basierte Multiplexanalytik ein häufig verwendetes Verfahren und wird beispielsweise zur Quantifizierung von Proteinen genutzt. Die aufwendige Durchführung der Assays soll durch Automatisierung einerseits dem Anwender abgenommen werden, während andererseits die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analyse gesteigert wird. Die Automatisierung des Bio-Plex Pro™ Assays ist mit dem Pipettierroboter Tecan Freedom EVO 200 umgesetzt worden. Es ist ein Skript mit der Software Freedom EVOware® entwickelt worden, welches die Probenvorbereitung des Assays vollständig übernimmt. Für einen Vergleich der manuellen und automatisierten Methode sind die humanen Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α in einer achtstufigen Standardverdünnungsreihe und in unterschiedlich konzentrierten Proben gemessen worden. Die Berechnung der Streuungen (Standardabweichung und Variationskoeffizient) der einzelnen Standardverdünnungsreihen sowie der Vergleich von gemessenen und erwarteten Konzentrationen der automatisierten und manuellen Methode zeigen, dass die Automatisierung neben der zeitlichen Optimierung auch die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analyse verbessert.

Abstract

Bead-based multiplex analysis is frequently used for the simultaneous detection of multiple analytes within a sample. Such assays are commonly used to quantify proteins. The automation of the process relieves the user from the complex assay conductance and on the other hand increases the accuracy and reproducibility of the analysis. The automation of the Bio-Plex Pro™ assay has been successfully implemented with the pipetting-robot Tecan Freedom EVO 200. A script has been developed, using the Freedom EVOware® which has the ability to perform the complete assay procedure. For a comparison between manual and automated methods, the human cytokines IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF, IFN- γ and TNF- α were analysed by an eight-point standard dilution series and with samples of different concentrations. The calculation of the variances (standard deviation and coefficient of variation) of the single standard dilution series as well as the comparison of the observed and expected concentrations of the manual or automated method show the higher precision and reproducibility of the automated process in addition to its time-saving nature.

1. EINLEITUNG

Für biochemische Analyseverfahren werden häufig Detektionsmoleküle, wie beispielsweise Antikörper, an Partikel (sogenannte *Beads*) gekoppelt. Zum Einsatz kommen ebenfalls oft Multititerplatten mit meist 96 oder 384 Reaktionskavitäten (sogenannte *wells*), es gibt heute jedoch bereits Multititerplatten mit bis zu 3456 Wells pro Platte (Wölcke & Ullmann 2001). Bei der chemischen und biologischen Analytik, in der Forschung, der Qualitätskontrolle oder beim Arbeiten mit gefährlichen Substanzen wird zu-

nehmend auch die Automatisierung eingesetzt, sodass in immer mehr automatisierten Prozessen eine steigende Anzahl an Analysen, vor allem bei Horchdurchsatzverfahren bearbeitet werden (Franzen 1986). Im Labor können ganze Prozessketten von der Probenvorbereitung bis hin zur Datendokumentation oder nur die einzelnen Arbeitsschritte automatisiert werden. Dementsprechend kann dann zum Beispiel die manuelle Probenvorbereitung, die häufig das schwächste Glied einer Methode ist, als Fehlerquelle eliminiert werden (Schäfer 2000). Für das Automatisieren einer kompletten

Methode benötigt man ein System (zum Beispiel einen Pipettierroboter im Analytikbereich), das sich programmieren lässt und die Arbeitsschritte der Methode selbstständig nacheinander abarbeitet. Infolgedessen sollten Reproduzierbarkeit und Genauigkeit maximiert und Zeit für andere Arbeiten geschaffen werden (Tecan 2014). Eine automatisierbare Anwendung aus dem Bereich Multiplex-Analytik ist der Bio-Plex Pro™ Assay, durch den gleichzeitig mehrere Protein-Biomarker in einem Well einer 96-Well-Platte quantitativ bestimmt werden. Momentan bieten die Luminex-xMAP-Beads, mit

* korrespondierender Autor

100 fluoreszenzoptisch unterscheidbaren Bead-Spezien, die höchste Vielfalt (Probst & Kroder 2007). Dabei handelt es sich um einen Immunoassay zur Untersuchung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Das grundsätzliche Verfahren ist hierbei dem eines Sandwich-ELISA, einer sensitiven und reproduzierbaren Standard-Methode, analog (Voller et al. 1978). Es kommt zuerst zu einer Reaktion zwischen magnetischen Beads und den Biomarkern, wobei diese an spezifische Antikörper auf den Beads binden (Abb. 1). Durch mehrere Waschschriffe werden ungebundene Proteine entfernt und es wird schließlich ein Detektionsantikörper hinzugegeben. Dadurch erfolgt die Bildung eines Sandwich-Komplexes, an den ein roter Fluoreszenzindikator gekoppelt wird. In einem Bio-Plex-System (oder einem gleichartigen Luminex-basierten Reader) wird die Messung durchgeführt. Die Daten werden als Median Fluorescence Intensity (MFI) und mithilfe einer Standardkurve als Konzentration in pg/µl ausgegeben. Die Konzentration des Bead-gebundenen Analyten verhält sich proportional zu der MFI (Bio-Rad Laboratories 2013). Mit dem Pipettierroboter Tecan Freedom EVO 200 soll dem Anwender die Probenvorbereitung und die Durchführung des Assays vollständig abgenommen werden. Hierbei handelt es sich um eine Liquid-Handling-Workstation, die neben einem Liquid Handling Arm (LiHA) zum Pipettieren von Flüssigkeiten und Suspensionen auch über einen Robotic Manipulation Arm (ROMA) verfügt, welcher der Bewegung von Multititerplatten dient. Durch den Einsatz eines Pipettierroboters kann eine große Anzahl an Proben bzw. Reaktionsansätzen parallel, miniaturisiert, reproduzierbar und kostengünstig bearbeitet werden (Mayr & Fuerst 2008). Der Roboter wird über die Software EVOware 2 standard gesteuert, welche über alle Befehle zur Steuerung der Roboterarme verfügt und auch die Integration neuer Carrier (Halterungen) und ihrer zugelassenen Labware (Laborutensilien) ermöglicht. Das mit der EVOware etablierte Skript umfasst die einzelnen Schritte des Assays, wobei mithilfe von Variablen und Subroutinen die essenzielle Variabilität gewahrt wird. Dazu gehören die

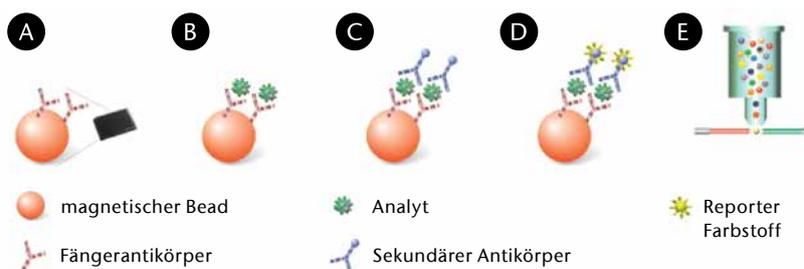


Abb. 1) Darstellung der Funktionsweise eines Bio-Plex Pro™ Assays in einzelnen Schritten. Zwischen jedem Schritt finden wiederholte Waschschriffe statt, um ungebundene Moleküle und Partikel zu entfernen. A) Magnetische Beads (Orange) mit Fängerantikörpern auf der Oberfläche werden in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. B) Die Analyten (meist Proteine) in den Proben binden spezifisch an die Fängerantikörper. C) Ein zweiter spezifischer Fängerantikörper wird in die Wells gegeben und bindet ebenfalls an den Analyten und bildet einen Sandwich-Komplex. D) Ein zugegebener Fluoreszenzfarbstoff bindet als Reporter-molekül an den sekundären Antikörper. E) Die Bead-Komplexe werden einzeln nacheinander analysiert. Dabei werden Beadsorte (und damit der jeweilige Analyt) identifiziert und die Menge an Reporter-molekülen quantifiziert [Abbildung bearbeitet nach 4].

Anzahl der verwendeten Typen von Beads und Antikörpern, sowie die zu untersuchende Probenanzahl in Einfach- und Doppelbestimmung. Durch die Automatisierung des Bio-Plex Pro™ Assays sollen die aufwendige manuelle Probenvorbereitung sowie ihre Fehleranfälligkeit reduziert werden und die Reproduzierbarkeit gesteigert werden. Die außerdem gewonnene Zeit kann genutzt werden, um sich Mehrwertaufgaben und der Datenauswertung widmen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Automatisierung für die Probenvorbereitung des Assays am Pipettierroboter Tecan Freedom Evo 200 ist mit der Software Freedom EVOware® standard 2.0 anhand des *Bio-Plex Pro™ Assays – Cytokine, Chemokine, and Growth Factors Instruction Manual* (vom 28.01.2013) von Bio-Rad etabliert worden. Dafür sind auf dem Arbeitsbereich des Pipettierroboters die HydroFlex™-Waschstation und die nötigen Carrier (Halterungen) für Laborutensilien (wie z. B. Reaktionsgefäße) integriert worden. Für die Durchführung des Assays, sowohl manuell als auch automatisiert, sind verschiedene Fertigungssysteme verwendet worden (Bio-Plex® Validation Kit 4.0, Bio-Plex Calibration Kit, Bio-Plex Pro™ Reagent Kit). Die Messung erfolgt mit dem Bio-Plex® 200 (Bio-Rad) unter Verwendung der Software Bio-Plex Manager 6.1. Mittels Bio-Plex® 200 können bis zu 100 verschiedene Analyten in einer Probe analysiert werden. Der Assay wird auf einer Mikrotiterplatte im

96-Well-Format durchgeführt, sodass neben einer Standardreihe Platz für bis zu 72 Proben ist. Um diese Variabilität mit der automatisierten Methode abbilden zu können, werden die Probenanzahl und die Anzahl an Beadsorten abgefragt. Für die Auswahl der Anzahl an Beads und Detektionsantikörpern werden im Skript Subroutinen verwendet. Über Variablen wird die Menge zu pipettierender Lösungen (Bead-Suspension, Antikörperlösungen und Fluoreszenzfarbstoff) an die Probenanzahl angepasst. Des Weiteren können Proben zur Erhöhung der Messsicherheit in Replikaten gemessen werden. Nach vollständiger Implementierung des Skripts (d. h. Fehlerkorrektur und Optimierung einzelner Schritte) wird der Assay manuell und automatisiert durchgeführt. Dabei werden eine achtstufige Standardverdünnungsreihe in Doppelmessung und zwei Proben unterschiedlicher Konzentration in Dreifachmessung betrachtet. Die Proben wurden aus dem gelösten Standard in den Verdünnungen 1:1500 (C1) und 1:30 (C2) hergestellt. Auf diese Weise wird die Messgenauigkeit im mittleren und niedrigen Messbereich bestimmt, dem die Proben zugeordnet werden können.

3. ERGEBNISSE

Zunächst wird der zeitliche Aufwand zwischen der manuellen und automatisierten Methode verglichen (Abb. 2). Dafür werden die Gesamtdauer des Assays, die Inkubationszeit, die Messzeit und die Zeit, die der Anwender selbst aktiv arbeiten muss, betrachtet.

Die Messzeit und die Inkubationszeit können durch die Automatisierung nicht verkürzt werden. Allerdings kann der aktive Arbeitsaufwand deutlich verringert werden. Je nachdem wie geübt der Anwender ist, werden zwei bis drei Stunden bei der manuellen Durchführung benötigt. Der Pipettierroboter benötigt für alle Arbeitsschritte nur eine Stunde. Für den Anwender beträgt in der automatisierten Methode die aktive Arbeitszeit sogar nur eine halbe Stunde, in welcher der Roboter vorbereitet, gestartet und zwischenzeitlich kontrolliert werden muss.

Die Gesamtdauer der automatisierten Methode ermöglicht somit eine Zeitersparnis von einer Stunde gegenüber der manuellen Durchführung. Die aktive Arbeitszeit wird sogar um zwei Stunden verkürzt, dies entspricht einer Einsparung von 23% bzw. sogar 80%.

Als nächstes wurde die Präzision eines automatisierten und zwei manuell durchgeführter Assays verglichen. Hierfür werden die pipettierten Volumina (letztlich Konzentrationen in pg/µl) gegenüber den gemessenen Fluoreszenzintensitäten aus den achtstufigen Standardverdünnungsreihen doppelt-logarithmisch dargestellt (Abb. 3–5).

Beim manuellen Assay eines ungeübten Anwenders sind größere Standardabweichungen besonders deutlich im Bereich der geringsten Konzentrationen zu erkennen. Dabei weisen IL-2 und IL-4 die geringsten Abweichungen auf und TNF-α sowie GM-CSF die höchsten (Abb. 3A). Das Ergebnis eines erfahrenen Anwenders zeigt eine deutliche Verbesserung in der Präzision gegenüber dem ungeübten Anwender (Abb. 3B). Dennoch fallen auch hier die größeren Standardabweichungen im Bereich der kleinsten pipettierten Volumina auf (entsprechend den Konzentrationen bei IL-2 und IL-4). Die automatisierte Durchführung zeigt die geringsten Standardabweichungen (Abb. 3C), jedoch auch hier mit der größten Abweichung bei der kleinsten pipettierten Menge (entsprechend der geringsten Konzentration TNF-α).

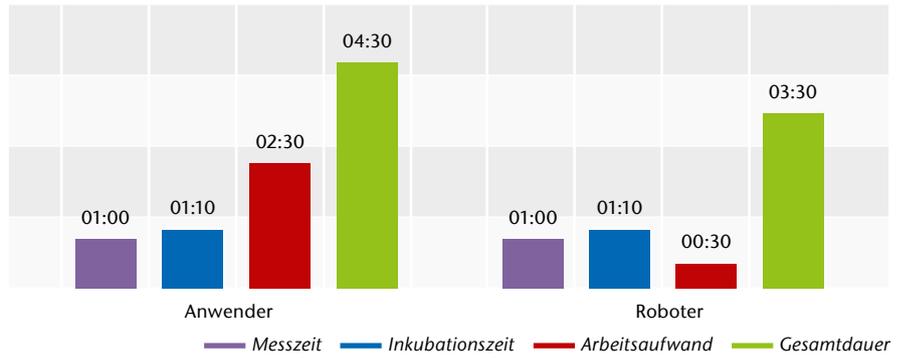


Abb. 2) Vergleich des zeitlichen Aufwands für die manuelle Durchführung des Prozesses und die Automatisierung (Zeitangabe in h). Die Gesamtdauer der automatisierten Methode bringt eine Zeitersparnis von einer Stunde gegenüber der manuellen Durchführung. Die aktive Arbeitszeit wird sogar um zwei Stunden verkürzt.

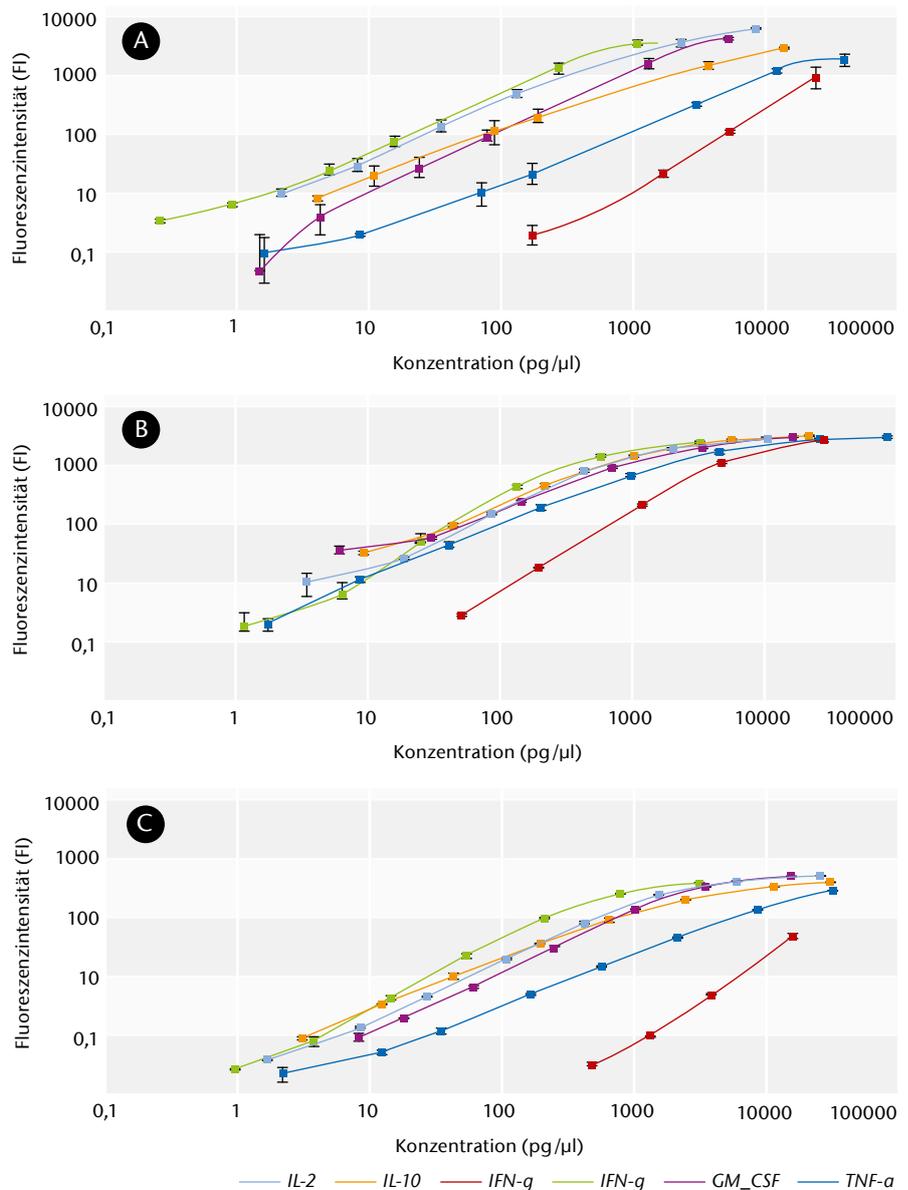


Abb. 3) Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen [pg/µl] einer achtstufigen Standardverdünnungsreihe gegenüber der gemessenen Fluoreszenzintensität (doppelt-logarithmisch). Die Standardabweichungen werden als Fehlerindikatoren (schwarz) dargestellt. A) Assay wird durch einen ungeübten Anwender manuell durchgeführt. Größere Streuungen treten insbesondere in den unteren Messbereichen der Analyten GM-CSF und TNF-α auf. Aufgrund eines Fehlers werden die Werte der vierten Verdünnungsstufe (zwischen 100 und 1000 pg/µl) nicht dargestellt. B) Assay wird manuell von einem geübten Anwender durchgeführt. Die Standardabweichungen sind geringer als bei einem ungeübten Anwender. Allerdings treten auch hier sichtbare Streuungen im Bereich der kleinsten pipettierten Volumina bzw. Konzentrationen auf. C) Automatisierter Assay mit sehr geringen Standardabweichungen bei allen Messwerten.

Da die Standardabweichung nicht normiert ist, werden die Variationskoeffizienten (%CV) der manuellen und automatisierten Prozesse miteinander verglichen. Der %CV gibt die Standardabweichung als prozentualen Wert bezogen auf den Mittelwert der Messwerte an. Die acht Konzentrationen (S1–S8) der Standardverdünnungsreihe sind gegen die Analyten in einem Dotplot aufgetragen (Abb. 4), wobei die Größe der Fläche mit dem %CV korreliert.

Die größten Werte nimmt der Variationskoeffizient bei der manuellen Durchführung durch den ungeübten Anwender an. Hier liegt der höchste Wert bei 38,82% (S1/(1)) während der Roboter den kleinsten Wert mit 0,22% (S1/(3)) erreicht.

Zusätzlich ist der Durchschnitt des %CV der einzelnen Anwender und des Roboters ermittelt worden. Dabei zeigt sich, dass ein erfahrener Anwender (mittlerer %CV von 5,16) eine deutlich geringere Abweichung erreicht als ein unerfahrener (mittlerer %CV von 13,18). Die geringste mittlere Streuung wurde mit der automatisierten Durchführung erhalten (mittlerer %CV 3,95).

Schließlich wurden die gemessenen Konzentrationen der hergestellten Proben der automatisierten und manuellen Durchführung den Erwartungswerten gegenübergestellt (Abb. 5). Hierbei wird deutlich, dass die Ergebnisse der automatisierten Durchführung näher an den erwarteten Konzentrationen liegen als die bei einer manuellen Ausführung.

4. DISKUSSION

Für die Beurteilung des Nutzens einer Automatisierung des Bio-Plex Pro™-Analyseverfahrens wurden sowohl technische Aspekte, wie die Messgenauigkeit, als auch die Zeitersparnis untersucht.

Beim Vergleich des zeitlichen Aufwands für den manuell durchgeführten mit dem automatisierten Prozess konnte gezeigt werden, dass sich die Automatisierung des Verfahrens lohnt. Sowohl die Gesamtdauer für die Durchführung des Assays als auch die Zeit, in der der Anwender selbst aktiv ist, wurden erheblich reduziert. Der

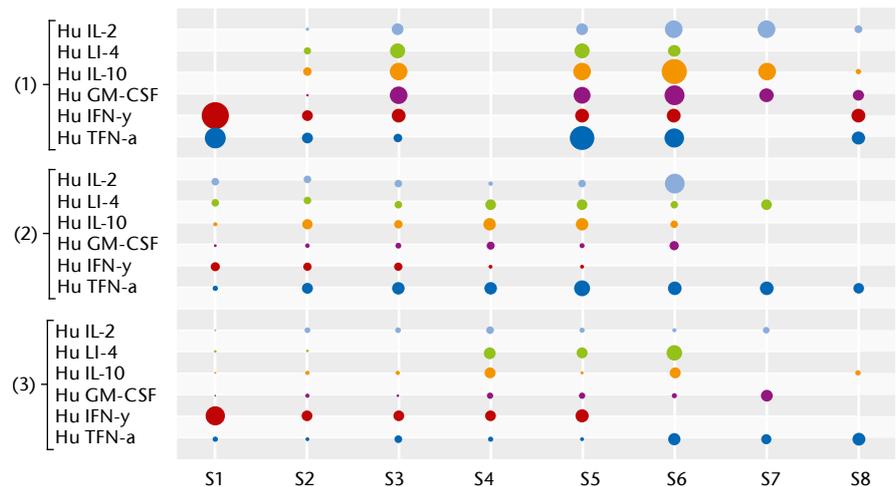


Abb. 4) Vergleich der Variationskoeffizienten (%CV) der beiden manuellen gegenüber der automatisiert hergestellten Standardverdünnungsreihe. Die Variationskoeffizienten %CV werden über die Fläche der Punkte dargestellt. Dargestellt sind die manuellen Versuchsdurchführungen des ungeübten Anwenders (1), des geübten Anwenders (2) und des automatisierten Versuchs (3). Im manuellen Versuch (1) können erneut die Werte für S4 aufgrund eines Fehlers nicht berechnet werden. Weitere nicht dargestellte %CV konnten nicht berechnet werden, da bei der Messung der jeweiligen Konzentrationsstufe die untere oder obere Nachweisgrenze überschritten wurde oder eine der Replikatmessungen ausgefallen ist.

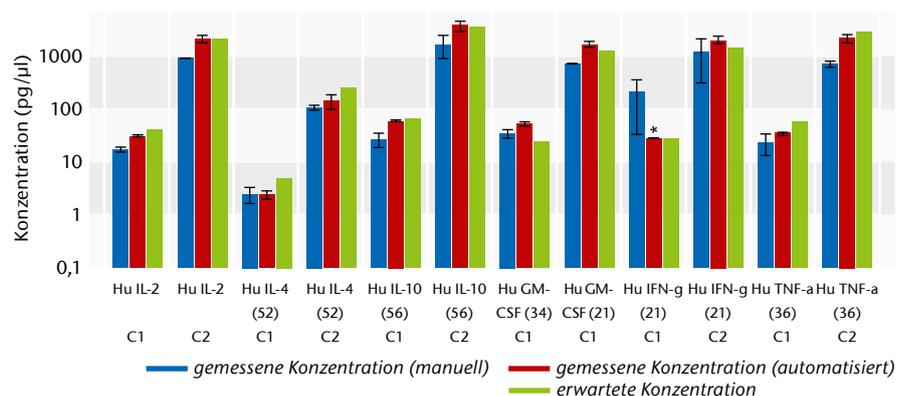


Abb. 5) Die gemessenen Konzentrationen aus dem manuellen und automatisierten Versuch im Vergleich zu der erwarteten Konzentration. Die Konzentrationen wurden logarithmisch aufgetragen. Zusätzlich wurden die Standardabweichungen der gemessenen Konzentrationen als Fehlerindikatoren (schwarz) eingefügt. * IFN-γ ist nur in Einfachmessung bestimmt worden.

Anwender muss anstatt 2,5 Stunden Arbeitsaufwand nur ca. 0,5 Stunden investieren, da der Roboter die restliche Zeit selbstständig arbeitet. Dadurch wird dem Anwender mit der Automatisierung mehr Zeit verschafft, in der er sich mit anderen Aufgaben befassen kann. Selbst wenn der Anwender nicht sofort nach Beendigung des Skripts zur Stelle ist, wird der Assay mit einem lichtundurchlässigen Deckel auf einem Schüttler gelagert, sodass es zu keiner Beeinträchtigung der lichtsensitiven Fluoreszenzfarbstoffe kommt oder sich die Bead-Analyt-Komplexe ablagern.

Beim manuellen Pipettieren vieler Proben ist es möglich, dass die erste Probe bereits 30 Minuten inkubiert, bis die letzte Probe auf die Platte pipettiert wird. Der Roboter hingegen pipettiert

schneller und trägt zudem mehrere Proben gleichzeitig auf. Dies trägt erheblich zur Verringerung der Intraassay-Varianz (Streuung innerhalb des Assays) bei.

Um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit miteinander zu vergleichen, sind die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der achtstufigen Standardverdünnungsreihen sowie die gemessenen gegenüber den erwarteten Konzentrationen betrachtet worden. Durch den Vergleich der manuellen und automatisierten Standardabweichungen wurde gezeigt, dass die Streuung bei der Automatisierung merklich geringer ist als bei der manuellen Durchführung. Dieses Ergebnis konnte durch die Berechnung der Variationskoeffizienten bestätigt werden. Es zeigte sich, dass mit der

Automatisierung eine Verbesserung der mittleren Variationskoeffizienten von ca. 30% selbst gegenüber einem geübten Anwender erreicht worden ist. Somit liefert die automatisierte Methode qualitativ bessere Ergebnisse. Der Vergleich der gemessenen Werte mit den erwarteten bestärkt das Ergebnis aus dem Vergleich der Standardverdünnungsreihe. Es wird deutlich, dass die Werte, die durch den automatisierten Prozess generiert wurden, näher an den Erwartungswerten lagen und eine niedrigere Standardabweichung auftrat. Somit wird durch die automatisierte Methode auch die quantitative Bestimmung von Proben verbessert. In allen Durchführungen war die Präzision bei hohen und mittleren Analytkonzentrationen besser als bei niedrigen. Dies zeigt sich bei der Betrachtung der Variationskoeffizienten in Abbildung 4, aber auch beim Vergleich der gemessenen Konzentrationen der Proben C1 und C2 (siehe Abbildung 5). Insbesondere bei der automatisierten Durchführung ist die Abweichung zwischen gemessener und erwarteter Konzentration für die höher konzentrierte Probe C2 (1:30 Verdünnung) immer geringer als bei der niedrig konzentrierten Probe C1. Zum einen lässt sich diese Fehleranfälligkeit durch die statistische Ungleichverteilung der Moleküle in niedrigkonzentrierten Proben erklären. Zum anderen steigt mit der geringer werdenden Steigung der Kalibrierkurven im unteren Messbereich die Fehleranfälligkeit bei der Quantifizierung an. Fehler in diesem Bereich ließen sich über die Erhöhung der Messsensitivität (höhere Spannung der Photomultiplier im Messgerät) einstellen, jedoch wird dadurch der dynamische Messbereich eingeschränkt. Durch die Automatisierung entstehen nur geringfügig höhere Kosten, die durch den Stromverbrauch und den Verbrauch von teureren Pipettenspitzen für den Roboter entstehen. Im Gegenzug werden durch die eingesparte Arbeitszeit Ressourcen für andere Tätigkeiten geschaffen. Durch die höhere Genauigkeit der automatisierten Methode kann das Potenzial der Methode besser ausgeschöpft werden und die in die Fertigungssysteme investierten Gelder werden in qualitativ bessere Ergebnisse überführt.

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Mit der Automatisierung des Bio-Plex Pro™-Analyseverfahrens ist die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Assays gesteigert und eine zeitliche Optimierung erreicht worden. Mit der Verwendung des Skripts können Pipettierfehler in der Probenvorbereitung und das Risiko einer Kontamination stark gesenkt werden. Weiterhin bezieht sich die zeitliche Optimierung sowohl auf die Reduzierung der Gesamtdauer bei der Durchführung des Assays als auch den Arbeitsaufwand des Anwenders. Somit kann die gewonnene Zeit für Mehrwertaufgaben genutzt werden. Im Allgemeinen ist durch die Automatisierung selbst ein unerfahrener Anwender, mithilfe der entsprechenden SOP (*Anleitung zur Nutzung des Skripts, BioPlexAssay am Pipettierroboter Tecan Freedom EVO 200*), in der Lage, den Assay durchzuführen und sowohl qualitative als auch quantitative Ergebnisse zu erhalten. Eine Erweiterung des Skripts auf die Vollautomatisierung des Verfahrens wird möglich, wenn der Bio-Plex® 200 in den Arbeitsbereich des Roboters integriert wird. Außerdem kann das Skript einfach angepasst bzw. erweitert werden, falls Änderungen an dem Analyseverfahren vorgenommen werden.

LITERATUR

- Bio-Rad Laboratories (2013) Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays. Instruction Manual. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014905.pdf>. Accessed 06 Nov 2014
- Franzen K (1986) Der nächste Schritt in der Laborautomatisierung – Der Roboter. *Fresenius Z Anal Chem* 323(6):556–559. doi: 10.1007/BF00504497
- Mayr LM, Fuerst P (2008) The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen* 13(6):443–448. doi: 10.1177/1087057108319644
- Probst MCO, Kroder MJ (2007) Bead-basierte Multiplexanalytik. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (eds) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, Basel, ISBN: 978-3-8055-7928-5, pp 191–207. doi: 10.1159/000097615
- Schäfer R (2000) Steuerung von Analyseautomaten und Labormanagement im analytischen Labor. *GIT Lab Fachz* 44(12):404–409
- Tecan (2014) Freedom EVOware®. <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1458&ID=1084&Menu=1&Item=21.7.1>. Accessed 04 Feb 2014
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 31(6):507–520. doi: 10.1136/jcp.31.6.507
- Wölcke J, Ullmann D (2001) Miniaturized HTS technologies – uHTS. *Drug Discov Today* 6(12):637–646. doi: 10.1016/S1359-6446(01)01807-4

Wesentliche Ergebnisse entstanden im Rahmen einer Bachelorarbeit der Erstautorin in der Abteilung für Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik der Technischen Hochschule Wildau.

AUTOREN

Karolin Keil, B. Sc.
Technische Hochschule Wildau
Biosystemtechnik / Bioinformatik

Lars Radke, M. Sc.
Technische Hochschule Wildau
Biosystemtechnik / Bioinformatik

Ulrich M. Tillich, M. Sc.
Technische Hochschule Wildau
Biosystemtechnik / Bioinformatik

Prof. Dr. Marcus Frohme
Technische Hochschule Wildau
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
marcus.frohme@th-wildau.de