**Studienarbeit**

an der

Berufsakademie Sachsen

Staatliche Studienakademie Riesa

Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Kurs: 14BT-1 Studienrichtung: Biotechnologie

Thema: Konzeptionelle Integration eines Fluoreszenzdetektionsmoduls in ein automatisiertes Pipettiersystem zur Detektion fluoreszierender Biomoleküle

**Eingereicht von: Firma:**

Martin Schneider QuoData GmbH

Am Graben 2 Prellerstraße 14

01809 Dohna 01309 Dresden

**Betrieblicher Betreuer:** M. Sc. Martin Jähne

**Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Ort, Datum Unterschrift

# ****Abkürzungsverzeichnis****

|  |  |
| --- | --- |
| *E. coli* | *Escherichia Coli* |
| *M. musculus* | *Mus musculus* |
| *A. adeninivorans* | *Arxula adeninivorans* |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| DTT | Dithiothreitol |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| LB-Medium | Luria-Broth-Medium |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PK | Positivkontrolle |
| RT | Raumtemperatur |
| PDI | Protein-Disulfidisomerase |
| aPDI | Protein-Disulfidisomerase der *Arxula Adeninivorans* |
| mPDI | Protein-Disulfidisomerase der *Mus musculus* |
|  |  |

**Inhaltsverzeichnis**

[Abkürzungsverzeichnis I](#_Toc477195105)

[1 Einleitung 1](#_Toc477195106)

[0.9 Elektronenanregung 1](#_Toc477195107)

[1.0 Fluoreszenz 2](#_Toc477195108)

[1.1 Spektroskopie 3](#_Toc477195109)

[1.2 Fluoreszenzdetektion 4](#_Toc477195110)

[2 Zielstellung 8](#_Toc477195111)

[3 Material 9](#_Toc477195112)

[3.1 Chemikalien 9](#_Toc477195113)

[3.2 Puffer, Medien und Lösungen 9](#_Toc477195114)

[3.3 Plamide und Mikroorganismen 10](#_Toc477195115)

[3.4 Geräte 10](#_Toc477195116)

[4 Methoden 11](#_Toc477195117)

[4.1 Chemisch kompetente Zellen 11](#_Toc477195118)

[4.2 Transformation 11](#_Toc477195119)

[4.3 Miniprep 11](#_Toc477195120)

[4.3.1. Miniprep 11](#_Toc477195121)

[4.3.2 Miniprep via P1, P2, P3 11](#_Toc477195122)

[4.4 Agarose-Gelelektrophorese 11](#_Toc477195123)

[4.4.1 Restriktionsverdau 11](#_Toc477195124)

[4.4.2 Gießen des Agarosegels 11](#_Toc477195125)

[4.4.3 Durchführung der Elektrophorese 11](#_Toc477195126)

[4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung 11](#_Toc477195127)

[4.5 SDS-Page 11](#_Toc477195128)

[4.5.1 Probenvorbereitung 11](#_Toc477195129)

[4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels 11](#_Toc477195130)

[4.5.3 Gelelektrophorese 11](#_Toc477195131)

[5 Ergebnisse 12](#_Toc477195132)

[5.1 Transformation 12](#_Toc477195133)

[5.1.1 XL1 Blue 12](#_Toc477195134)

[5.1.2 BL21 12](#_Toc477195135)

[5.2 Miniprep nach Laborprotokoll 12](#_Toc477195136)

[5.3 Miniprep via P1, P2, P3 12](#_Toc477195137)

[5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 12](#_Toc477195138)

[5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone 12](#_Toc477195139)

[5.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 12](#_Toc477195140)

[6 Auswertung 13](#_Toc477195141)

[6.1 Transformation 13](#_Toc477195142)

[6.2 Miniprep nach Laborprotokoll 13](#_Toc477195143)

[6.3 Miniprep via P1, P2, P3 13](#_Toc477195144)

[6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 13](#_Toc477195145)

[6.5 SDS-Page der transformierten BL21-Zellen 13](#_Toc477195146)

[6.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 13](#_Toc477195147)

[7 Zusammenfassung 14](#_Toc477195148)

[Literaturverzeichnis 15](#_Toc477195149)

**Tabellenverzeichnis**

[Tabelle 3: Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer 9](#_Toc477195094)

[Tabelle 2: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep 9](#_Toc477195095)

[Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml 9](#_Toc477195096)

[Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels, ergibt 5 ml 10](#_Toc477195097)

**Abbildungsverzeichnis**

[Abbildung 1: Elektronenübergänge nach Atomorbital 1](#_Toc477195084)

[Abbildung 2: Prinzip der Fluoreszenz als Jablonski-Diagramm 2](#_Toc477195085)

[Abbildung 3: Allgemeines Anregungs- und Emissionspektrum eines Chromophoren (links) und der Zusammenhang zwischen Anregungswellenlänge (Ex1; Ex2) und der resultierenden Emissionsintensität (Em1; Em2) (rechts) 3](#_Toc477195086)

[Abbildung 4: Einteilung typischer spektroskopischer Methoden nach Atom- und Molekülspektroskopie 3](#_Toc477195087)

[Abbildung 5: Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers 5](#_Toc477195088)

[Abbildung 6: Schematischer Aufbau des SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometers 6](#_Toc477195089)

[Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers unter Nutzung eines dichroischen Spiegels 7](#_Toc477195090)

# 1 Einleitung

## 1.1 Elektronenanregung

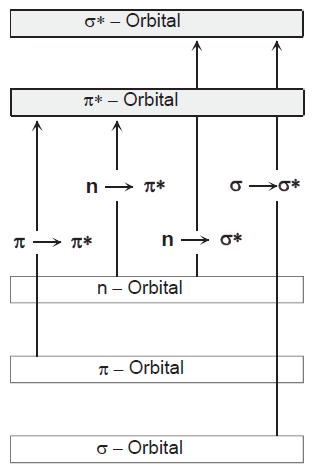


Abbildung : Elektronenübergänge nach Atomorbital

Es wird von einem Atom oder Molekül eine diskrete Energiemenge aufgenommen, die ein Elektron vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. [GEY, 2014]

Die diskreten Elektronenübergänge, die mit der Aufnahme bzw. Abgabe nur bestimmter Energiemengen verbunden sind, zeigt Abbildung 1. Die Übergänge σ→σ\* sind die energiereichsten. Sie treten im Vakuum-UV-Bereich bei gesättigten Kohlenwasserstoffen (z.B. Methan; λ = 210 nm) auf. Für Messungen unter 190 nm sind jedoch spezielle Spektrometer mit Vakuumküvetten erforderlich, weshalb diese Übergangsart für die Praxis kaum relevant ist. Beim *n* →σ\*-Übergang werden schon längere Wellenlängen absorbiert. Dies trifft für Verbindungen mit Heteroatomen zu. So zeigen Wasser bei 167 nm, Chloroform bei 173 nm sowie Methanol bei 184 nm noch Absorptionen im Vakuumbereich. Oberhalb von 200 nm besitzen Verbindungen wie CH3NH2 (λ= 215 nm) oder (CH3)3NH2 (λ = 227 nm) Absorptionsmaxima. [GEY, 2014]

Die Elektronenübergänge *n*→π\* und π →π\* sind für die Fluoreszenz-Spektroskopie besonders wichtig. Vor allem π-Elektronen sind im Vergleich zu σ-Elektronen leicht anregbar. Moleküle, die durch diese Übergänge gekennzeichnet sind, zeigen meist signifikante UV/VIS-Spektren. [GEY, 2014]

## 1.2 Fluoreszenz

Als Floureszenz wird die spontane Emmision von Licht kurz nach der Anregung eines Materials bezeichnet. Erfolgt die Anregung durch absorbiertes Licht, ist das abgegebene Licht in der Regel energieärmer als das absorbierte Licht. Materialen, in denen Fluoreszenz auftritt, heißen Fluorophore, ist es Teil eines Organismus spricht man von dem Auftreten von Biofluoreszenz. [GEY, 2014]

Bei der Fluoreszenz wird ein Photon einer bestimmten Wellenlänge von dem Fluorophor absorbiert und mit dieser Energie ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Während dieses angeregten Zustandes verliert das Elektron durch molekulare Kollisionen oder Energieabgabe an benachbarte Moleküle ein wenig der aufgenommenen Energie und gibt dementsprechend bei der Lichtemission ein Photon mit einer größeren Wellenlänge ab, als für die Anregung absorbiert wurde. Diese Verschiebung wird Stokessche Regel genannt, der Abstand der Wellenlängen Stokes-Shift. Je größer der Stokes-Shift zwischen den Wellenlängen, desto weniger Überschneidungen zwischen dem zur Anregung verwendeten Licht und dem emittierten Licht treten auf, wodurch die Detektion der Emissionsstrahlung vereinfacht wird. Entspricht die emittierte Wellenlänge der absorbierten Wllenlänge, spricht man von Resonanzfloureszenz. Das Prinzip der Fluoreszenz ist in Abbildung 1 gezeigt. [GEY, 2014; THERMO FISHER, 2017]

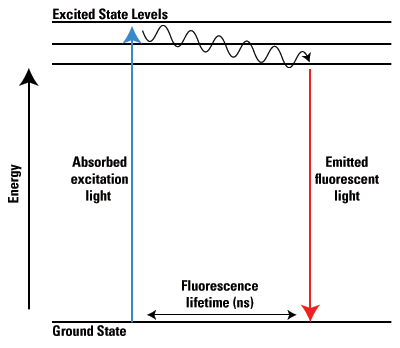


Abbildung : Prinzip der Fluoreszenz als Jablonski-Diagramm [THERMO FISHER, 2017]

Sowohl die Anregungs- als auch die emittierte Wellenlänge sind charakteristisch für den jeweiligen Fluorophor. Monoatomare Fluorophore weißen diskrete Wellenlänge auf, während polyatomare Moleküle breitere Anregungs- und Emissionsspektren zeigen. Die emittierte Wellenlänge ist dabei weitgehend unabhängig von der absorbierten Wellenlänge. Die Intensität der emittierten Strahlung ist abhängig von dem molaren Extinktionskoeffizient ε und der Quantenausbeute Φ. Der Extinktionskoeffizient beschreibt die Lichtmenge, die ein Fluorophor bei einer gegebenen Wellenlänge aufnehmen kann, die Quantenausbeute ist das Verhältnis der absorbierten und emittierten Photonen und ist fluorophorspezifisch. Anregungs- und Emissionsspektren von Fluorophoren können in einem Diagramm zusammengefasst werden (vergl. Abbildung 3). [THERMO FISHER, 2017]

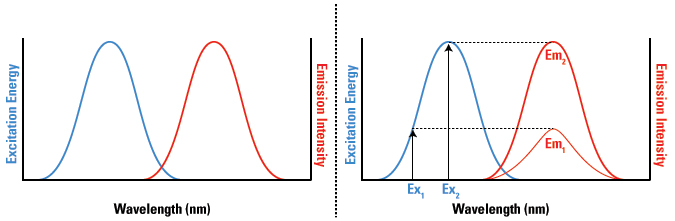


Abbildung : Allgemeines Anregungs- und Emissionspektrum eines Chromophoren (links) und der Zusammenhang zwischen Anregungswellenlänge (Ex1; Ex2) und der resultierenden Emissionsintensität (Em1; Em2) (rechts) [THERMO FISHER, 2017]

Anders als bei der Phosphoreszenz erfolgt bei dem Elektronenübergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand keine Umkehr des Elektronenspins. Dementsprechend erfolgt der Übergang schneller, die Lebenszeit der Fluoreszenz ist deutlich geringer als die der Phosphoreszenz. [GEY, 2014]

## 1.3 Spektroskopie

Die Spektroskopie beinhaltet die analytischen Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie basieren. Materie bezeichnet die Gesamtheit des zu analysierenden Probenmaterials, also Ionen, Moleküle oder Atom- und Molekülverbände. Elektromagnetische Strahlung ist eine sich mit Lichtgeschwindigkeit bewegende Energieart, die u.a. in Form von ultravioletter und sichtbarer Strahlung, Mikro- und Radiowellen oder auch Gamma- und Röntgenstrahlen messbar bzw. sichtbar ist. Die spektroskopischen Methoden werden nach Atom- und Molekülspektroskopie unterschieden (vergl. Abbildung 1). [GEY, 2014]

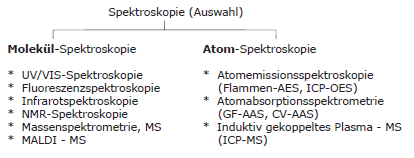


Abbildung : Einteilung typischer spektroskopischer Methoden nach Atom- und Molekülspektroskopie [GEY, 2014]

Methoden der Atomspektroskopie werden in der Bioanalytik vorrangig für die Bestimmung von Elementzusammensetzungen in biologischen Flüssigkeiten, wie Serum und Urin, oder für die Spezies-Bestimmung im Bereich der Toxikologie verwendet. [GEY, 2014]

Die molekülspektroskopischen Methoden werden in bioanalytischen bzw. biochemischen Labors für die Strukturaufklärung verwendet. Besonders die Massenspektrometrie (kurz: MS) hat sich aufgrund der vielen Kopplungsmöglichkeiten mit verschiedenen Chromatographie-Systemen und der Entwicklung von schonenden Ionisierungstechniken wie dem Elektrospray fest etabliert. Für biologische Anwendungen ist auch die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) von großer Bedeutung, da gerade für Oligosaccharide sehr aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können. [GEY, 2014]

Die UV/VIS und Floureszenzspektroskopie werden hauptsächlich für die Verfolgung und Auswertung biochemischer Reaktionen eingesetzt, besonders als Detektionssysteme für Chromatographie- und Elektrophoresesysteme im On-line-Betrieb finden diese Methoden Anwendung. [GEY, 2014]

## 1.4 Fluoreszenzdetektion

Die Nutzung von fluoreszenten Tracermolekülen ist aufgrund steigender Vielseitigkeit, Sensitivität und Quantifizierbarkeit für viele biologische Anwendungen der Standard geworden, unter anderem werden fluoreszierende Moleküle für die Detektion und Lokalisierung von Proteinen, Identifikation von Proteinkomplexen und die Überwachung von biologischen Prozessen in vivo eingesetzt. [THERMO FISHER, 2017]

Mithilfe der Fluoreszenzdetektion können abhängig von den verwendeten Methoden und Apparaten verschiedene Parameter der Probe quantifiziert werden, einschließlich:

* Zellzahl
* Menge der an Zellen oder sogar Zellkompartimenten lokalisierten Fluorophore
* Geschwindigkeit der Genexpression und Proteinsynthese
* Zellmobilität
* DNA-, RNA- oder Proteingehalt
* Enzymaktivitäten
* Zellvitalität

Für die Fluoreszenzdetektion gibt es verschiedene technische Ansätze, die sich für verschiedene Methoden eignen. Alle Ansätze benötigen folgende Komponenten:

* Eine Lichtquelle für die Anregung. Typischerweise werden Laser. Photodioden oder Lampen abhängig von der benötigten Wellenlänge verwendet.
* Den Fluorophor oder die Probe, in einem für die Strahlung durchdringbaren Gefäß.
* Filter, um spezielle Wellenlängen zu isolieren.
* Einen Detektor, der die gemessene Emission in ein auswertbares, meist elektronisches Signal umwandelt.

Abhängig von den durchzuführenden Versuchen und den zu quantifizierenden Parametern werden verschiedene technische Umsetzungen der Fluoreszenzdetektion verwendet. Die verbreitetsten Gerätetypen sind:

* Fluoreszenz-Mikroskope für die zwei- und dreidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren.
* Fluoreszenz-Scanner für die zweidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren
* Durchflusszytometer zur Untersuchung der Fluoreszenz einzelner Zellen in einer flüssigen Probe.
* Fluorometer oder Fluorimeter zur Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenz von Proben. Wichtige Vertreter sind die Microplate Reader, mit deren Hilfe mehrere auf Mikrotiterplatten aufgebrachte Proben in schneller Folge untersucht werden können.

Die Fluoreszenzspektroskopie beruht auf der Anregung der Probe mittels einer Lichtquelle und der Messung der von der Probe emittierten Strahlung. Eine vereinfachte Messanordnung ist in Abbildung 5 gezeigt. [THERMO FISHER, 2017]

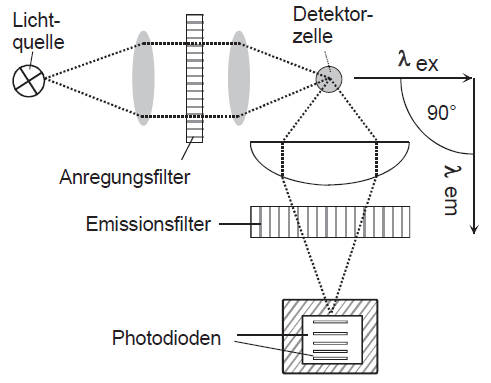


Abbildung : Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers [GEY, 2014]

Das Probenmaterial in der Küvette wird von der Lichtquelle über ein optisches System mit Anregungsfilter mit Licht einer vorgegebenen Wellenlänge (λex) bestrahlt. Das von der Probe emittierte Licht wird senkrecht zur Strahlungsebene der Anregungsstrahlung über einen Emissionsfilter mit einer bestimmten Emissionswellenlänge (λem) auf den Photodioden detektiert, um die Anregungsstrahlung nicht ebenfalls zu erfassen. Auf den Photodioden wird die erfasste Strahlung in ein elektrisches Signal umgewandelt, das an einen Rechner zur Auswertung übergeben werden kann. Varianten mit Monochromatoren anstelle der Anregungs- und Emissionsfilter können kontinuierliche Fluoreszenzspektren aufnehmen und werden als Spektralfluorometer bezeichnet. [GEY, 2014]

Für die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben werden Fluorometer mit speziellen Einsätzen für Mikrotiterplatten (MTPs) verwendet. Bei der Messung der Fluoreszenz in einem Well der Mikrotiterplatte ist die Erfassung der Emmisionsstrahlung senkrecht zur Anregungsstrahlung nicht möglich, deshalb gibt es verschiedene optische Anordnungen mit dem Ziel, die Anregungs- und Emissionsstrahlung zu trennen. In dem SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometer wird die in Abbildung 6 gezeigte Anordnung mit Filterschlitten für verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen eingesetzt. [KECK, 2017]

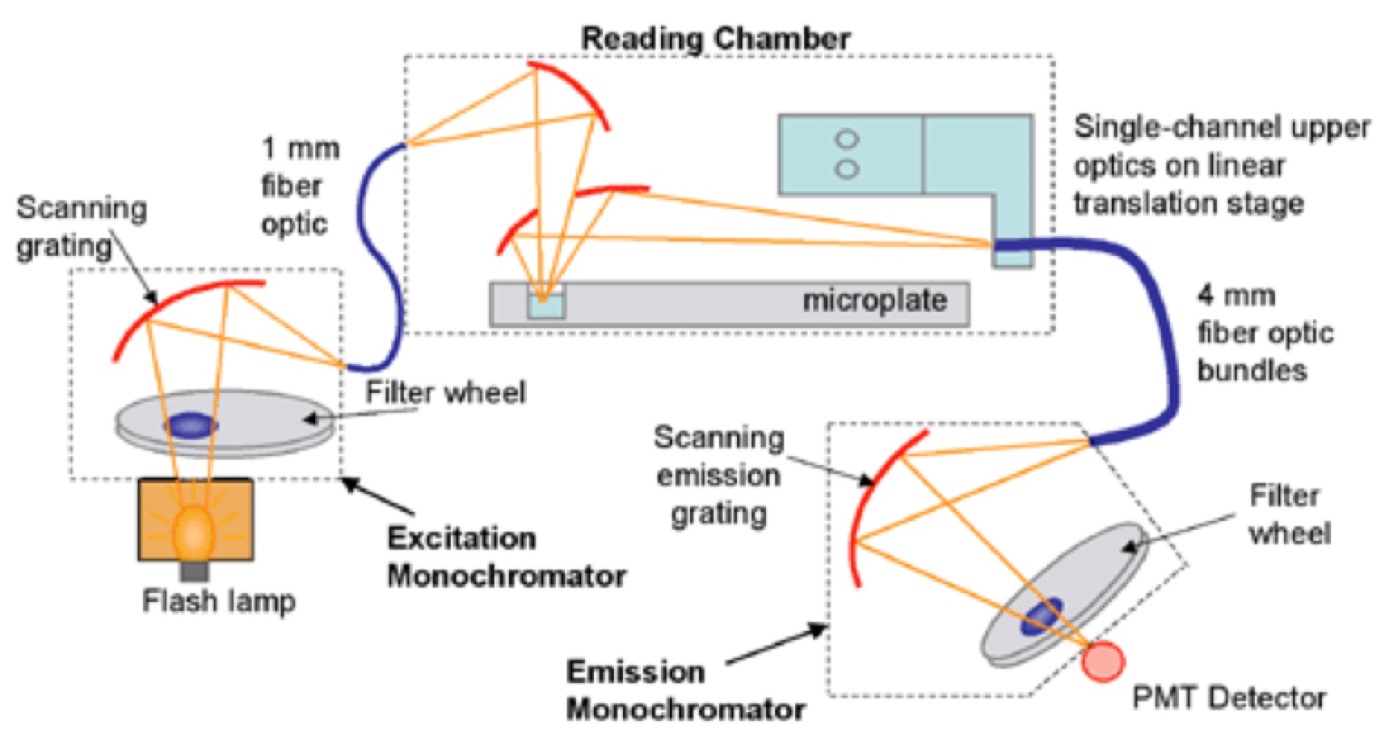


Abbildung : Schematischer Aufbau des SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometers [KECK, 2017]

Das anregende Licht wird durch einen Filter auf eine bestimmte Wellenlänge beschränkt und über einen Hohlspiegel in ein Glasfaserkabel konzentriert. Über einen weiteren Hohlspiegel über der auszulesenden Mikrotiterplatte wird das Licht auf das jeweilige Well konzentriert. Dabei passiert die Strahlung einen Hohlspiegel mit einer Öffnung für die anregende Strahlung, der die emittierte Strahlung in einem weiteren Glasfaserkabel konzentriert und über einen Hohlspiegel und einen weiteren Filter auf die Photodiode konzentriert. Ein Nachteil dieser Konstruktion ist die Erfassung von auf der Probe reflektierter Anregungsstrahlung. Ist der Stokes-Shift zwischen der anregenden und der emittierten Wellenlänge zu gering, können Teile der Anregungsstrahlung fälschlich als Fluoreszenz-Aktivität erfasst werden. [Keck, 2017]

Ein weiterer möglicher Aufbau unter Nutzung eines dichroitischen Filters ist in Abbildung 7 dargestellt. Als Anregungsquelle wird ein Laser genutzt, in Kombination mit einem Anregungsfilter. Über eine Linse wird die anregende Strahlung (Grün) auf einen dichroischen Spiegel konzentriert, der die Strahlung auf eine Linse über der Probe reflektiert. Die Linse konzentriert gleichzeitig die Anregungsstrahlung auf die Probe und sammelt die von der Probe emittierte Strahlung (Rot und Blau) auf dem Spiegel. Die emittierten Wellenlängen werden nicht reflektiert und passieren den Spiegel. Über einen Emissionsfilter werden die erwarteten Wellenlängen von Hintergrundstrahlung befreit und mithilfe einer Linse auf die Photodiode fokussiert. Aufgrund des dichroischen Spiegels kann kein von der Probe reflektiertes Licht der Anregungsquelle auf der Photodiode erfasst werden, allerdings kann ein Teil der emittierten Strahlung (Rot) ebenfalls von der Photodiode abgeschirmt werden, falls der Stokes-Shift nicht groß genug ist. Weiterhin ist die Wellenlängenselektivität der Spiegel in ihrer speziellen Beschichtung begründet und damit nicht anpassbar. Eine Anpassung der genutzten Anregungs- und Emissionswellenlängen ist dementsprechend erschwert und häufig mit der Anschaffung eines neuen dichroischen Spiegels verbunden. [McGUINESS, 2010]

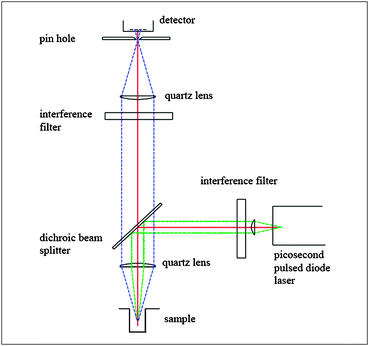


Abbildung : Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers unter Nutzung eines dichroischen Spiegels [McGUINESS, 2010]

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren für die Analyse von Zellen, die einzeln in einem hohen Tempo an einer Spannungsquelle oder einen Lichtstrahl vorbeifliesen. Vorteil der Methode ist die Möglichkeit, jede Zelle individuell untersuchen und, mit einem nachgeschalteten Sortiermechanismus, sogar anhand der Messwerte trennen zu können. Durchflusszytometer mit einer Fluss-Sortierung werden FACS genannt, kurz für fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierer. Anwendung findet dieses Verfahren zum Beispiel bei der Bestimmung der Vitalitätsbestimmung von Zellen, bei der Analyse von Proteinen und Chromosomen in einer Zelle oder der Überwachung von Zellfunktionen. [FOLDER, 2014]

Bei der Durchflusszytometrie befindet sich die Probe in einer Durchflussküvette. Exemplarisch für diesen Gerätetyp ist der schematische Aufbau des CyAn ADP High-Performance Flow Cytometer in Abbildung 8 gezeigt.

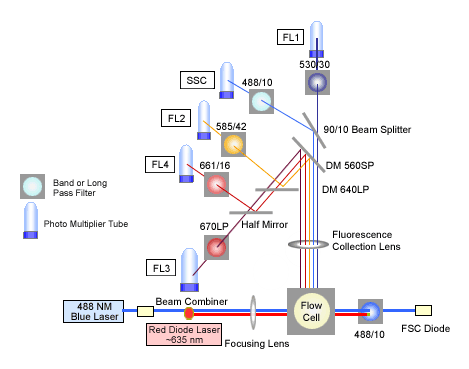


Abbildung : Schematischer Aufbau des CyAn ADP Durchflusszytometers [FOLDER, 2014]

Aktuelle Durchflusszytometer wie das CyAn ADP besitzen mehrere Lichtquellen, um verschiedene Fluoreszenzmarker gleichzeitig aktivieren zu können. Dementsprechend wird das emittierte Licht mit mehreren dichroischen Spiegeln der Wellenlänge nach aufgetrennt und auf mehrere Photodioden konzentriert. Weiterhin wird hinter der Durchflussküvette die Intensität der anregenden Strahlung gemessen und als Forward-Scatter-Wert (FSC) gemessen. Anhand dieses Wertes kann das Passieren einer Zelle detektiert werden und gleichzeitig Aussagen zu deren Volumen getroffen werden. Des Weiteren wird aus der emittierten Strahlung die von der Probe gebrochene anregende Strahlung isoliert und als Sidewards-Scatter-Wert (SSC) erfasst. Dieser Wert gibt Auskunft über die Granularität der Zelle und die Struktur des Zellkerns. [HOLSCHBACH, 2013]

## 1.5 Liquid Handling Systeme

Liquid Handling Systeme sind Geräte zur halb- oder vollautomatischen Bearbeitung von Flüssigkeiten. Wichtige Formen der Liquid Handling Systeme sind:

* Elektronische Pipetten
* Pipettierroboter
* Pipettierstationen

Elektronische Pipetten können einstellbare Volumen aufnehmen und abgeben. Im Gegensatz zu herkömmlichen Pipetten können die elektronischen Pipetten das aufgenommene Volumen stufenweise verteilt abgeben, selbstständig mischen oder abhängig von der Flüssigkeit Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit regulieren.

Pipettierroboter sind meist Roboterarme, die entweder eine integrierte Pipette haben oder Kolbenhubpipetten halten können. Die Roboter können programmiert werden, um Pipettiervorgänge automatisch und vom Menschen unabhängig durchzuführen. Ebenfalls möglich ist eine Fernsteuerung des Pipettiervorgangs, beispielsweise für die Ausführung von nicht-zyklischen Pipettiervorgängen mit Gefahrstoffen. [Andrew Alliance, 2015]

Pipettierstationen oder Liquid Handling Workstations sind Stationen mit einem oder mehr Pipettierrobotern, die zusätzlich noch weitere Geräte zur Prozessierung von Flüssigkeiten haben. Sie sind meist modifizierbar und flexibel gestaltet, um sie individuellen Anforderungen anzupassen. Es können zum Beispiel Sensoren, Schüttler, Heiz- oder Kühlgeräte oder Verpackungs- und Beschriftungsmodule eingebaut werden. [Tecan, 2015]

Die meisten Pipettierroboter und Pipettierstationen haben Computerschnittstellen für die Programmierung und Kommunikation. Elektronische Pipetten haben meist ein eingebautes Display mit Tasten und eine nicht modifizierbare Programmierung.

# **2 Zielstellung**

Ziel dieser Arbeit war die theoretische Ausarbeitung eines automatischen Liquid-Handling-Systems mit integrierter Fluoreszenzmessung für die Überwachung und Auswertung von biologischen Assays. Dafür sollten die folgenden Schritte durchgeführt werden:

* Recherche zum Thema Fluoreszenzdetektion und automatisiertem Liquid Handling
* Recherche zu aktuellen Messsytemen für Fluoreszenzquantifikation
* Recherche zu kommerziellen Integrationen von Microplate Readern in Pipettierstationen
* Entwicklung weiterer Möglichkeiten zur Kopplung von Liquid-Handling-Systemen mit einem Modul zur Fluoreszenzquantifikation

# 3 Aktuelle Messsysteme

## 3.1 Fluorometer

Aufgrund der weiten Verbreitung der Fluorometer für die Überwachung und Quantifizierung verschiedener biologischer Prozesse mittels Fluoreszenzmarkern existiert derzeit eine große Vielfalt verschiedener Modelle auf dem Markt. Die Proben werden auf verschiedene Arten festgehalten werden, unter anderem in Küvetten, Kapillaren, Petrischalen oder Mikrotiterplatten. Um eine erhöhte Funktionalität zu erreichen, werden die Fluorometer teilweise mit den Funktionen anderer Messgeräte ausgestattet, besonders verbreitet sind Kombinationen von Spektralphotometern und Fluorometern, mit denen sowohl Absorptionsspektroskopie als auch Fluoreszenzspektroskopie betrieben werden kann. Ein aktueller Vertreter dieses Gerätetyps ist der EnSpire Multimode Plate Reader von PerkinElmer mit einem Neupreis von etwa 50000 € [PERKINELMER, 2011]. Dieses Gerät verwendet jeweils zwei Monochromatoren für die Filterung der Anregungs- und Emissionsstrahlung, um eine höhere Trennschärfe der gewählten Wellenlänge zu erreichen. Weitere Vertreter dieses Gerätetyps sind die Geräte der SpectraMax™-Reihe von Molecular Devices, der Safire 2 Multimode Microplate Reader von Tecan oder der Fluoroskan von Thermo Scientific [TECAN A, 2017; MOLECULAR DEVICES, 2017; THERMO SCIENTIFIC, 2009]. Die genannten Geräte besitzen weiterhin integrierte Heizelemente, Schüttler und mit Ausnahme einiger der SpectraMax-Geräte Dispenser für die präzise und automatisierte Zugabe von Reagenzien in die zu untersuchenden Platten, beispielsweise für die Untersuchung einer Reaktionskinetik.

Normale Fluorimeter für die Messung der Fluoreszenz der, in einer Küvette vorliegenden, Probe sind meist deutlich einfacher ausgestattet. Dementsprechend gibt es auch viele kleinere Anbieter und ein großes Spektrum von angebotenen Modellen. Es werden unter anderem tragbare, batteriebetriebene Modelle wie das AccuLite 470 von Biotium Inc. oder das Handheld Fluorometer 480/530nm von Biotrend Chemikalien GmbH angeboten, auch Komplettlösungen für bestimmte Verfahren wie die Bestimmung von DNA- RNA-Gehalt einer Probe werden angeboten. Als ein Vertreter dieses Typs ist das Qubit® 3.0 Fluorometer von Thermo Scientific zu nennen, das einen integrierten Prozessor und Speicher besitzt und alle Messwerte automatisch auswertet und abspeichert. [THERMO SCIENTIFIC, 2016]. Stationäre Fluorimeter unterscheiden sich meist in der Messgenauigkeit oder der Messgeschwindigkeit. Ebenfalls gibt es Modelle, die eine höhere Sensitivität versprechen oder durch mehr Monochromatoren ein schmaleres Anregungsspektrum erzeugen, wie den Aqualog® von Horiba Scientific. Ein weiteres Feature ist die Möglichkeit, anstatt der Küvette für die Probe eine Durchflusszelle zu integrieren oder Titrationsmodul anzuschließen, um durch eine kontinuierliche Messung Veränderungen in der Probe zu erfassen [HORIBA, 2013]. Die bekanntesten Hersteller für Fluorometer sind Tecan, Thermo Scientific, Molecular Devices, Promega, Beckman Coulter, Bio-Rad und BioTek Instruments. Aufgrund der großen Vielfalt der angebotenen Modelle jeder dieser Hersteller wird auf eine Angabe von Beispielgeräten verzichtet.

## 3.2 Durchflusszytometer

Durchflusszytometer sind vor allem in biologischen Versuchen nötig, in denen es um die Veränderung und Überwachung von Zellen geht, wie der Transformation von Bakterien oder einem Cytotoxizitätsuntersuchung. Es wird unterteilt in Durchflusszytometer mit Zellsortierung (FACS) und Zytometer ohne Sortierfunktion. FACS werden besonders für die Selektion transformierter Zellen verwendet und sind aufgrund der zusätzlichen Funktionalität in der Regel teurer als ein vergleichbares Durchflusszytometer ohne Sortierfunktion. Der schematische Aufbau eines FACS ist in Abbildung 9 gezeigt. [FOLDER, 2014]

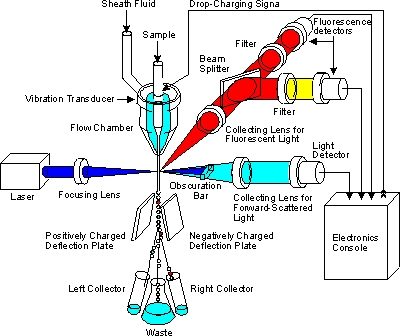


Abbildung : Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit Zellsortierung [UEB, 2017]

Die Probe mit den Zellen wird mit einer Mantelflüssigkeit umgeben und in eine enge Durchflusskammer geleitet, um die Zellen zu vereinzeln. Weiterhin wird die Vibration der Probenleitung eine Bildung von Tröpfchen induziert, die jeweils kaum größer als die Zellen sind. Die Zellen durchlaufen den fokussierten Lichtstrahl der Anregungsquelle und es erfolgt die Fluoreszenzdetektion. Daraufhin werden die als positiv erkannten Zellen mit einem elektrischen Impuls polarisiert und mithilfe eines elektromagnetischen Feldes von den negativen Zellen getrennt und in ein gesondertes Auffanggefäß überführt. Bei modernen FACS-Geräten können wie in der Abbildung gezeigt mehr als ein Auffanggefäß verwendet werden, um Zellen nach mehr Kriterien zu trennen. [UEB, 2017]

Weiterhin unterscheiden sich die Durchflusszytometer durch die Anzahl der Anregungswellenlängen, mit denen die Probe gleichzeitig bestrahlt werden kann, und in der Anzahl der gleichzeitig erfassbaren Emissionswellenlängen. Je mehr Anregungswellenlängen zur Verfügung stehen, desto mehr Marker können gleichzeitig untersucht werden, allerdings besteht dabei immer das Risiko von Überlagerungen der emittierten Strahlungen untereinander oder mit den Anregungsstrahlungen, wodurch die gemessenen Strahlungsintensitäten verfälscht würden. Moderne Durchflusszytometer bieten ein bis fünf Anregungswellenlängen und bis zu fünfzig Kanäle für die Messung der emittierten Strahlung. [HOLSCHBACH, 2013]

Auch bei den Fluorometern gibt es bei den Durchflusszytometern eine große Auswahl an Herstellern und Modellen, die für spezielle Anwendungen angepasst sind. Bekannte Hersteller sind Thermo Scientific, Bio-Rad, Beckman Coulter und MilliporeSigma. Eine Übersicht der von den genannten Herstellern aktuellen angebotenen Modelle ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle : Übersicht aktueller Durchflusszytometer mit maximaler Anzahl der Anregungslaser Detektionskanäle

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Modell | Hersteller | Anregungslaser | Detektionskanäle | Probendurchsatz |
| Attune NxT | Thermo Sc. | 4 | 16 | ≤ 17 µl/s |
| ZE5™ | Bio-Rad | 5 | 28 | ≤ 2,5 µl/s |
| CytoFLEX | Beckman Coulter | 3 | 13 | ≤ 4 µl/s |
| Guava® easyCyte | Millipore  Sigma | 3 | 14 | ≤ 1,2 µl/s |

Jedes der aufgeführten Geräte kann Proben aus Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäßen und Petrischalen aufnehmen, besitzt integrierte Waschroutinen gegen Probenverschleppungen innerhalb der Leitungen und wird mit Software zur Auswertung der Messwerte ausgeliefert. Weiterhin bietet das Attune NxT von Thermo Scientific aufgrund einer schallunterstützten Probenfokussierung Schutz gegen Verstopfungen der Durchflusskammer, das ZE5 bietet eine Funktion zur vollautomatischen Kalibrierung und das Guava® easyCyte von MilliporeSigma benötigt weniger Probenvolumen pro Analyse. [FISHER SCIENTIFIC A, 2017; BIORAD, 2017; BECKMAN, 2017; MERCK, 2017]

# 4 Integration von Fluoreszenzdetektionssystemen in Liquid-Handling-Systeme

## 4.1 Kommerzielle Systeme

Für die automatisierte Durchführung aus Auswertung von Versuchen mit Fluoreszenzdetektion stellen einige Anbieter von Fluorometern ein gekoppeltes System mit einem Liquid-Handling-System bereit. Da diese Verfahren meist einen hohen Probendurchsatz erfordern, werden Fluorometer verwendet, die Mikrotiterplatten als Probengefäß akzeptieren. Eine einfache Kopplungsmethode verwendet Thermo Scientific bei der Kombination des CV 2000 Liquid Handling Systems mit dem Varioskan Fluorometer. Die Mikrotiterplatte befindet sich auf dem Einzugsteller des Fluoreszenzreaders und kann von dem Roboterarm der Pipettierstation erreicht und bearbeitet werden. Es ist ebenfalls möglich, über einen internen Dispenser des Fluorometers Reagenzien zuzugeben. In dem Fluorometer kann die Platte und kontrollierten Bedingungen inkubiert werden. Das Fluorometer wird über die Software der Pipettierstation angesteuert. Es ist allerdings nicht vorgesehen, die Mikrotiterplatte aus dem Fluorometer zu entfernen und auf den eigentlichen Arbeitsbereich der Pipettierstation zu überführen. Sollen mehrere Platten bearbeitet und ausgelesen werden, muss an das Fluorometer ein Microplate Stacker wie der RapidStak™ von Thermo Scientific angeschlossen werden. [THERMO SCIENTIFIC B, 2017; THERMO SCIENTIFIC, 2014; THERMO SCIENTIFIC, 2009]

Analog zu diesem gekoppelten System von Thermo Scientific bietet Tecan die Tecan Freedom Evo® Serie und die Tecan Fluent® Serie als Liquid Handling Systeme an, die mit den vier von Tecan hergestellten Multimode Readern, unter anderem dem Tecan Spark®, kompatibel sind. Das Fluorometer wird innerhalb des Arbeitsbereiches der Pipettierstation platziert und an das Liquid Handling System angeschlossen. Die Bearbeitung der Platte erfolgt analog zu dem im ersten Absatz beschriebenen System von Thermo Scientific, allerdings sollte für diese Systeme ein Microplate Stacker von Tecan verwendet werden, wie der Connect™. Die Ansteuerung des Fluorometers erfolgt über die jeweilige Software des Liquid Handling Systems. Zu dieser Anordnung ist weiterhin zu erwähnen, dass von den vier kompatiblen Multimode Readern ausschließlich der Tecan Spark® zur Steuerung des O2- und CO2-Gehaltes während der Inkubation in der Lage ist. [TECAN A, 2017; TECAN B, 2017; TECAN C, 2017]

Ein weiteres gekoppeltes System wird von PerkinElmer angeboten. Bei dieser Anordnung werden die Janus® Workstation und der EnSpire® Multimode Plate Reader verbunden. Anders als bei den bisher genannten Systemen befindet sich der Reader dabei nicht im Arbeitsbereich der Pipettierstation. Die Anordnung ist in Abbildung 10 gezeigt.



Abbildung : Kopplung der Janus Workstation (links) mit dem EnSpire Multimode Plate Reader (rechts) mit Stacker [PERKINELMER, 2011]

Der Fluoreszenzreader befindet sich außerhalb der Workstation. Beide Komponenten sind über eine Brücke für den Transport von Mikrotiterplatten miteinander verbunden. Über diese Brücke können Mikrotiterplatten von dem Reader in den Arbeitsbereich der Pipettierstation transportiert und dort bearbeitet oder gelagert werden. Die Inkubation der Platte kann demzufolge sowohl innerhalb des Fluorometers als auch durch entsprechende Module in der Piptettierstation erfolgen. Die Steuerung des Fluorometers erfolgt über die Software des Liquid Handling Systems.

Für alle hier genannten Systeme gilt, dass die Bedienung ausschließlich über die Software des jeweiligen Liquid Handling Systems erfolgt. Dementsprechend ist es nicht möglich, Geräte verschiedener Hersteller miteinander zu kombinieren.

## 4.2 Alternative Konzeptionen

Ein großer Nachteil der vorgestellten kommerziellen Systeme aus Liquid Handling und Fluoreszenzdetektion ist die Beschränkung der Komponenten auf Geräte der gleichen Firma, deren Kompatibilität durch den Hersteller gegeben wird. Im Hinblick auf die Hardware könnte theoretisch jede Pipettierstation mit jedem beliebigen Fluorometer ausgestattet und betrieben werden, solange die Software der Station die Festlegung eigener Plattenpositionen und –Formate erlaubt und die Größe des Fluorometers die Größe des Arbeitsbereiches nicht übersteigt. Weiterhin muss die Halterung des Fluorometers mit dem Probengefäß, für die meisten Anwendungen eine Mikrotiterplatte, ausfahrbar sein, um für den Roboterarm des Liquid Handling Systems erreichbar zu sein. Wie bei den vorgestellten kommerziellen Systemen von Thermo Fischer und Tecan könnte die Mikrotiterplatte auf der Halterung des Fluorometers liegen und von der Pipettierstation bearbeitet werden, um anschließend in dem Fluorometer inkubiert und ausgelesen zu werden. [HUANG, 2002]

Bei der Kombination von zwei Geräten unterschiedlicher Hersteller ist allerdings zu beachten, dass die Hersteller verschiedene Kommunikationsprotokolle für die Steuerung ihrer Geräte verwenden und dementsprechend die Steuerung eines Gerätes mit einer Fremdsoftware nur dann möglich ist, wenn diese Protokolle bekannt sind. Sind die Protokolle bekannt, kann eine eigene Software zur simultanen Steuerung des Fluorometers und der Pipettierstation geschrieben werden und ein vollautomatischer Betrieb gewährleistet werden. Allerdings würden bei der Verwendung einer eigenen Software die Vorteile der firmeneigenen Software wie automatische Kalibrierungsfunktionen oder integrierte Korrekturmethoden für Messwerte verloren gehen oder müssten manuell in die eigene Software integriert werden. Weiterhin wäre der Aufwand für das Schreiben einer neuen Software auf der Basis der Kommunikationsprotokolle ein beträchtlicher zeitlicher Aufwand, da grundlegende Befehle wie einfache Pipettierschritte zuerst in die zugrundeliegenden Befehle auf Hardwareebene, wie das Ansprechen des Pumpenmotors und der Ventile, aufgeteilt werden müssten. Weiterhin müssten ausgedehnte Versuche zum Verhalten der Hardware auf Befehle durchgeführt werden, um zum Beispiel zu ermitteln in welchem Bereich der Roboterarm bewegt werden kann oder welche Fehlermeldungen bestimmte Probleme auslösen. [HUANG, 2002; SCHAUMONT, 2010]

Für die Programmierung bietet es sich daher an, Geräte zu verwenden, deren Software eine Programmieroberfläche bietet. Ein Beispiel für eine Software, die eine solche Oberfläche und Standardbibliotheken für die Steuerung bietet, ist Cavro® Express Robotics, die mit einigen Liquid Handling Systemen von Tecan mitgeliefert wird. Mit dieser Software ist die Programmierung von z.B. der Miniprep-Reihe von Tecan mit Visual Basic möglich. Bieten beide Geräte Bibliotheken in derselben Programmiersprache, kann auf Grundlage der Bibliotheken eine Steuerungssoftware in dieser Sprache geschrieben werden und somit der Arbeitsaufwand deutlich reduziert werden. Ist die Verwendung einer einheitlichen Programmiersprache nicht möglich, können für beide Geräte in der jeweiligen Sprache Codeabschnitte für wichtige Teilprozeduren erstellt werden und dann von einer zentralen Software an den jeweiligen Stellen des Gesamtprozesses aufgerufen und ausgeführt werden. [SCHAUMONT, 2010; TECAN, 2003]

Huang et al. (2002) haben bei der Entwicklung eines automatisierten gekoppelten Systems aus Liquid Handling und Fluoreszenzdetektion den FL600 Microplate Flourescence Reader und das Precision 2000 Pipettiersystem von BioTek Instruments verwendet. Es wurde bei diesen Versuchen auf die Entwicklung einer zentralen Steuersoftware verzichtet und stattdessen die mitgelieferte KC4-Software für das Fluorometer und die precision power Software für die Pipettierstation verwendet. Die mit dem Pipettiersystem vorbereiteten Platten wurden manuell in den Fluorometer überführt und ausgelesen. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass auf die aufwändige Entwicklung einer Steuerungssoftware verzichtet werden kann. Dieser Versuchsaufbau erfordert nicht, dass sich das Fluorometer innerhalb der Pipettierstation befindet und bietet somit eine effektivere Platznutzung innerhalb der Station. Es können von der Station mehrere Platten simultan vorbereitet werden und dann schnell und effektiv manuell ausgewertet werden. Allerdings ist dieser Versuchsaufbau nicht vollautomatisch und dementsprechend nicht für die selbstständige Durchführung von zum Beispiel Langzeituntersuchungen außerhalb des Labors geeignet. [HUANG, 2002]

Auf dem Versuchsaufbau von Huang et al. aufbauend könnte die Durchführung vollautomatisiert werden, indem die von der Pipettierstation vorbereitete Platte mittels eines Roboterarms in das Fluorometer überführt wird. Der Vorteil dieses Konzept gegenüber dem Aufbau gegenüber dem von Tecan und Thermo Scientific verwendeten Modell ist die bessere Ausnutzung der Arbeitsfläche der Pipettierstation und die Möglichkeit, mehrere Mikrotiterplatten gleichzeitig zu bearbeiten und nacheinander auszulesen. Weiterhin kann der Versuchsaufbau durch den Roboterarm erheblich erweitert werden, da die Platte mittels des Arms auch in verschiedene andere Laborgeräte, wie Zentrifugen oder spezielle Inkubationseinheiten, überführt werden kann. Mit diesem Aufbau könnten auch komplexe und zeitaufwändige Prozesse parallel ausgeführt werden und die Arbeitseffizienz würde steigen. Ein Problem bei diesem ist Steuerung des Prozesses, da auch der Roboterarm entsprechend in die Steuerungssoftware integriert werden müsste. Für bekannte Prozesse mit experimentell bestimmten Zeitabschnitten könnte daher eine einfache Zeitschaltung der einzelnen Arbeitsschritte jedes Geräts erstellt werden, die ohne eine Kommunikation der Geräte untereinander die Ausführung des Gesamtprozesses ermöglicht. Ein Vertreter der Roboterarme, deren Software eine solche Zeitschaltung vorsieht, ist der PlateCrane EX™ Mikroplate Handler von Hudson Robotics, der für alle gängigen Plattenformate geeignet ist. Dieser Roboterarm bietet weiterhin eine Halterung für bis zu 450 Mikrotiterplatten für Versuche mit langer Laufzeit und hohem Durchsatz. [HUDSON ROBOTICS A, 2017]

-> Produktionsstrecke Hudson B

# 5 Ergebnisse

# 6 Auswertung

# 7 Zusammenfassung

# Literaturverzeichnis

|  |  |
| --- | --- |
| 7 | ANDREW ALLIANCE (2015): Better Pipetting, In: <http://www.andrewalliance.com/>  15.05.2015 |
| 5 | FOLDER, S. (2014): Flow cytometrie, In:  <https://www.ucl.ac.uk/wibr/scientific-support/flow-cytometry1>  14.03.2017 13:25 |
| 1 | GEY, M.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage, 2014 |
| 6 | HOLSCHBACH, M. (2013): Durchflusszytometrie, Messprinzip und Aufbau. In:  <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/>  14.03.2017 13:30 |
| 15 | HORIBA SCIENTIFIC (2013): Aqualog, In:  <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/Aqualog-Nov13.pdf>  20.03.2017 |
| 2 | KECK BIOPHYSICS RESOURCE (2017): Fluorescence Plate Reader. In: <http://keck.med.yale.edu/biophysics/technologies/platereader/platereader.aspx>  13.03.2017 18:30 |
| 3 | McGUINESS et al. (2010): Detection of single nucleotide polymorphisms using a DNA Holliday junction nanoswitch—a high-throughput fluorescence lifetime assay. In:  Mol. BioSyst, Vol. 6, 2010 |
| 11 | MOLECULAR DEVICES (2017): Multi-Mode Reader, In:  <https://www.moleculardevices.com/systems/microplate-readers/multi-mode-readers>  20.03.2017 10:41 |
| 10 | MORGAN, H. et al. (2013): Non-Invasive Label-Free Studies of Receptor Activation in Lonza Primary & Mesenchymal stem cells using the EnSpire Multimode Plate Reader & Janus Automated Workstation, In:  <http://www.perkinelmer.de/lab-solutions/resources/docs/PST_44-153169PST_Labelfree_Receptor_Activation_EnSpire_LabelFree_JANUS.pdf>  20.03.2017 10:28 |
| 9 | PERKINELMER (2011): EnSpire Multimode Plate Reader, In:  <http://www.perkinelmer.de/lab-solutions/resources/docs/44-129435BRO_EnSpire.pdf>  19.03.2017 |
| 8 | TECAN (2015): Phaseout, In: <http://www.tecan.com/phaseout>  17.05.2015 |
| 12 | TECAN A (2017): Spark Multimode Reader, In:  <http://ww3.tecan.com/mandant/files/doc/718/BR_Spark_Complete_398983_V1-0.pdf>  20.03.2017 10:56 |
| 4 | THERMO FISHER (2017): Fluorescent Probes. In:  <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>  12.03.2017 14:20 |
| 13 | THERMO SCIENTIFIC (2009): Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader, In: <http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/19201/varioskan.pdf>  20.03.2017 |
| 14 | THERMO SCIENTIFIC (2016): Qubit Fluorometer vs. Quantus Fluorometer, In:  <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/qubit-vs-quantas-fluorometer-app-note.pdf>  20.03.2017 11:24 |
| 17 | THERMO SCIENTIFIC A (2017): Acoustic Focusing Technology Overview, In:  <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometers/acoustic-focusing-technology-overview.html>  31.03.2017 |
| 16 | UEB (2017): Flow Cytometry, In:  <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/basic-principles>  21.03.2017 12:10 |
| 17 | MERCK (2017): Guava® easyCyte Instrument Specifications, In:  <http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/cell-analysis/guava-easycyte-flow-cytometers/specifications/7syb.qB.D6MAAAFBV7o7FnRb,nav>  21.03.2017 14:05 |
| 18 | BECKMAN (2017): CytoFLEX (B-R-V), In:  <http://www.beckman.de/coulter-flow-cytometry/instruments/flow-cytometers/platform/cytoflex>  21.03.2017 14:09 |
| 19 | BIORAD (2017): ZE5 Cell Analyser, In:  <http://www.bio-rad.com/en-fr/product/ze5-cell-analyzer>  21.03.2017 |
| 20 | TECAN B (2017): Fluent Laboratory Automation Solution, In:  <http://ww3.tecan.com/mandant/files/doc/669/BR_Fluent_Specification_Sheet_398328_V1-5.pdf>  22.03.2017 10:41 |
| 21 | THERMO SCIENTIFIC (2014): RapidStak Microplate Stacker, In:  <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/RapidStak_SpecSheet_2014.pdf>  22.03.2017 13:42 |
| 22 | THERMO SCIENTIFIC B (2017): CV 2000 Liquid Handling System, In:  <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/CV2000-Brochure.pdf>  22.03.2017 13:46 |
| 23 | TECAN C (2017): Comparison of Absorbance- and Multimode Readers, In:  <http://lifesciences.tecan.com/products/reader_and_washer/microplate_readers/reader_comparison?p=%20Multimode%20Reader%20Guide>  22.03.2017 14:14 |
| 24 | HUANG, D. et al. (2002): High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format, In:  Journal Of Agricultural And Food Chemistry, Vol. 50, 2002 |
| 25 | TECAN (2003): MiniPrep Operator’s Guide, In:  <http://www.yeec.com/uploadimages1/forum/2006-3/20063251094580338.pdf>  23.03.2017 14:21 |
| 26 | SCHAUMONT, P. (2010): A Practical Introduction to Hardware/Software Codesign, Springer Verlag, New York, 1. Auflage, 2010 |
| 27 | TECAN (2003): Tecan MiniPrep Robots, In:  <http://www.massetrecovery.com/pictures7/tecan.pdf>  23.03.2017 14:23 |
| 28 | RODRIGUEZ-PUENTE, S. (2013): A simple and effective calibration method to determine the accuracy of liquid-handling nano-dispenser devices, In:  Acta Crystallographica Section F Vol. 69(3), 2013 |
| 29 | HUDSON ROBOTICS A (2017): PlateCrane EX Microplate Handler, In:  http://hudsonrobotics.com/products/microplate-handling/platecrane-ex/  24.03.2017 17:00 |
| 30 | HUDSON ROBOTICS B (2017): LabLinx Microplate Delivery System, In:  http://hudsonrobotics.com/products/microplate-handling/lablinx/  24.03.2017 17:05 |