

Applications

Note 221 | Januar 2010

Photometrische Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität zur Untersuchung relativer Interaktionsstärken von Signaltransduktionsproteinen aus *Schistosoma mansoni* im Eppendorf BioPhotometer plus

Christin Buro, Svenja Beckmann, Thomas Quack und Christoph G. Grevelding,
Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität, 35392 Giessen, Deutschland

Zusammenfassung

Die Src-Tyrosinkinase SmTK3 ist an Prozessen zur Kontrolle mitotischer Aktivität und Differenzierung in *Schistosoma mansoni* beteiligt. Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybridsystems sind Interaktionspartner der SmTK3 gefunden worden, deren relative Interaktionsstärken über einen Hefe-Flüssigassay ermittelt werden sollten. Als Indikatorreaktion diente hierbei die Aktivität der β -Galaktosidase, wobei das Substrat σ -Nitrophenyl- β -D Galaktopyranosid (ONPG) zu ortho-Nitrophenol (ONP) und D-Galaktose umgesetzt wird. Die Zunahme an ONP wurde im Eppendorf BioPhotometer plus durch Messung der Absorption bei 405 nm gemessen. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten die relativen Interaktionsstärken potentieller SmTK3-Bindungspartner bestimmt werden. Als stärkster Partner konnte so eine Untereinheit eines Multienzymkomplexes identifiziert werden, welcher an Chromatin-Reorganisationsprozessen beteiligt ist.

Einleitung

Der Trematode *Schistosoma mansoni* ist ein human- und tierpathogener Parasit, welcher in den Tropen die Schistosomiasis bzw. Bilharziose verursacht, die nach der Malaria zweithäufigste durch einen Parasiten hervorgerufene Infektionskrankheit weltweit [1]. Schistosomen sind getrenntgeschlechtlich, wobei die adulten Stadien in Dauerkopula im Venensystem des Endwirts parasitieren. Eine Besonderheit der Schistosomenbiologie ist, dass erst durch einen Paarungskontakt mit dem Männchen Mitose- und Differenzierungsprozesse im Weibchen ausgelöst werden, in deren Folge sich die Reproduktionsorgane Ovar und Vitellarium entwickeln [2,3]. Im Zuge der Paarung legt das Weibchen täglich ca. 300 Eier, welche für die Pathogenität der Schistosomen verantwortlich sind [4]. Daher kann eine Aufklärung der paarungsinduzierten Entwicklung der weiblichen Gonaden für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien richtungsweisend sein. Ein Molekül, dessen Beteiligung an Mitose- und Differenzierungsprozessen in vorangegangenen Arbeiten nachgewiesen wurde, ist die Src-Tyrosinkinase SmTK3 [5,6].

Dieses Signaltransduktionsmolekül besitzt verschiedene funktionale Domänen wie eine SH4-Domäne, welche nach Myristylierung die Verankerung des Proteins an eine Plasmamembran ermöglicht. Diese Domäne ist C-terminal über die sogenannte „unique site“ mit einer SH3-Domäne verbunden, welche für die Bindung an Prolin-reiche Sequenzen von Bindungspartnern notwendig ist, die in einer Signalkaskade „downstream“ von Src-Kinasen agieren. Der SH3-Domäne folgt eine SH2-Domäne, welche an phosphorylierte Tyrosinreste von „upstream“ in einer Signalkaskade vorkommenden Interaktionspartnern bindet. C-terminal der SH2-Domäne schließt sich die katalytische Tyrosinkinase-Domäne an, die sowohl für Auto- als auch für Substratphosphorylierungen notwendig ist [7]. Aufgrund der zentralen Rolle der SmTK3 für die Gonadenentwicklung von *S.mansoni* war es von Interesse, Bindungspartner dieser Kinase zu identifizieren, deren Identität Aufschluss über Signaltransduktionswege liefert, an denen SmTK3 beteiligt ist.

Das Hefe-2-Hybridsystem (Yeast Two-Hybrid; Y2H) ist ein in der Molekularbiologie oft genutztes System zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen [8]. Seine Funktion basiert auf einer über Transkriptionsfaktoren (TF) vermittelten, induzierbaren Reportergenaktivität. Hierfür wird u.a. Gal4 eingesetzt, ein Hefe-TF, der aus einer Aktivierungs- (AD) und einer DNA-Bindedomäne (BD) besteht [9]. Eine Bindung dieses TF an die DNA erfolgt durch die BD im Bereich der „upstream activating sequence“, eines Minimalpromotors, der Reportergen voransteht. Die AD ist für die Transkriptionsinitiation verantwortlich. Nur wenn beide Domänen vorhanden und in physikalischer Nähe zueinander stehen, ist der Gal4-TF in der Lage, die Transkription von Reportergenen zu initiieren.

Für einen Y2H-Ansatz werden die beiden Domänen des Gal4-TF getrennt und in verschiedene Vektoren kloniert. Der Gal4-BD-kodierende Vektor enthält zusätzlich die kodierende Sequenz eines bekannten Gens (bait), für welches Interaktionsstudien durchgeführt werden sollen. Zusätzlich verfügt dieser Vektor über einen Wachstumsselektionsmarker für die Aminosäure Tryptophan. Der zweite Vektor umfasst die Gal4-AD sowie die Sequenz eines potentiellen Interaktionspartners (prey). Dabei kann es sich um ein bekanntes Protein oder um ein unbekanntes Protein einer cDNA-Bank handeln. Mit Hilfe von Y2H cDNA-Banken können potentielle Interaktionspartner über ein Y2H-Screening mit einem bait-Konstrukt gesucht werden. Der Vektor, der für das prey-Konstrukt verwendet wird, besitzt ferner einen Wachstumsselektionsmarker für die Aminosäure Leucin. Interaktionsstudien werden mit Hefen durchgeführt, die auxotroph für die genannten essentiellen Aminosäuren sind. So ist es möglich, nach einer Transformation von Hefen auf das Vorhandensein beider Vektoren zu selektionieren. Die Reportergenaktivitäten (weitere Aminosäure-Selektionsmarker oder Enzyme) indizieren schließlich die Interaktion möglicher Partner.

Um Protein-Protein-Interaktionen quantifizieren zu können, wird das Reportergen *lacZ* genutzt, welches in das Genom der eingesetzten Hefestämme integriert wurde und unter der Kontrolle eines Minimalpromotors steht, der von Gal4 aktiviert wird. Das *lacZ*-Gen kodiert für die β -Galaktosidase (β -Gal), welche unter anderem das Substrat ONPG (σ -Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) in σ -Nitrophenol und D-Galaktose spaltet, wobei eine gelbliche Färbung der Lösung entsteht, deren Intensität von der Enzymaktivität abhängt und spektralphotometrisch messbar ist. Dadurch lassen sich relative Interaktionsstärken zweier Proteine bestimmen, da das Reportergen *lacZ* nur bei einem rekonstituierten Gal4-TF exprimiert wird. Je stärker die Interaktion der bait- und prey-Proteine ist, desto mehr β -Gal wird exprimiert und desto stärker ist der Substratumsatz.

Die Umsetzung des ONPGs zu σ -Nitrophenol wurde im BioPhotometer plus bei 405 nm gemessen. Mit Hilfe eines Y2H-Screenings einer *Schistosoma* cDNA-Bank wurden Interaktionspartner der Src-Tyrosinkinase SmTK3 gefunden [10], deren relative Interaktionsstärken mit Hilfe eines β -Gal-Flüssigassays in dieser Studie quantifiziert werden sollten.

Materials und Methods

Klonierung der *S. mansoni* Y2H-cDNA-Bank

Als Grundlage für die Klonierung einer Gal4-basierten Y2H-cDNA-Bank wurde das Matchmaker™ III- System genutzt [11]. Mittels reverser Transkription und Oligo(d)T-Primern erfolgte zunächst die Umschreibung von mRNA aus adulten Schistosomen in cDNA. Anschließend wurde diese cDNA über das Restriktionsenzym *Sma*I „in frame“ mit der Gal4-AD in den prey-Vektor pGADT7-Rec [11] kloniert, der über den Wachstumsselektionsmarker Leu-2 verfügt [10].

Klonierung der bait-Sequenz von SmTK3

Um putative „downstream“ Interaktionspartner der Src-Kinase SmTK3 zu identifizieren, wurde ein bait-Konstrukt kloniert, das aus der „unique site“ und der SH3-Domäne (US-SH3-bait) bestand [10]. Als Basis hierfür diente der Gal4-BD-Vektor pGBKT9 [11].

Co-Transformation der Hefen

Die Co-Transformation von Hefezellen (AH109, Clontech) mit bait- und prey-Vektoren erfolgte mittels Lithium-Acetat [12]. Dabei wurden jeweils 0,1 μ g prey und bait Plasmid-DNA mit Träger-DNA gemischt und anschließend 100 μ L kompetente Zellen zu diesem Gemisch gegeben. Zur besseren Aufnahme der Plasmid-DNA wurde eine 40 %ige PEG/LiAc-Lösung (Polyethylenglycol-Lithium-Acetat-Lösung) verwendet. Das Zell-DNA-Gemisch wurde für 30 Minuten bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 μ L Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden die Zellen für 15 Minuten auf 42 °C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Zellen in 200 μ L 1x TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zelllösung wurde auf entsprechende Selektionsplatten aufgestrichen und bei 30 °C für 2-4 Tage inkubiert.

β -Galaktosidase-Flüssigassay

Hefezellen, die mit den bait- und prey-Plasmiden transformiert worden waren, wurden in 5 mL Selektionsmedium über Nacht (ü/N) angezogen und bei 30 °C sowie 200 rpm inkubiert. 2 mL dieser Kultur wurden in Vollmedium (1xYPD) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert.

Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in 1,5 mL Z-Puffer resuspendiert sowie erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden in 300 µL Z-Puffer aufgenommen, wodurch sich eine Einengung des Volumens von 1,5 mL auf 300 µL ergab und damit ein Konzentrierungsfaktor von 5 ($1,5/0,3 = 5$). Zwei Aliquots von je 100 µL wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Als Referenzwerte wurden sechs Aliquots Z-Puffer (je 100 µL) mitgeführt. Anschließend wurden die Hefezellen durch „Freeze&Thaw“-Zyklen aufgeschlossen, um die Enzymaktivität der β -Gal messen zu können. Zum Starten der enzymatischen Farbreaktion wurden 700 µL Z-Puffer mit 1,9 µL β -Mercaptoethanol sowie 160 µL ONPG-Lösung (gelöst in Z-Puffer) zu den Proben gegeben. Bis zur deutlichen Färbung der Lösung wurden die Proben bei 30 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 400 µL 1 M Na_2CO_3 . Nach Klärung der Proben durch Zentrifugation wurden die Absorptionen inklusive eines Referenzansatzes im Eppendorf BioPhotometer plus entgegen der Empfehlung von Clontech anstatt bei 420 nm bei 405 nm gemessen. Vorherige Vergleichsmessungen bei 420 nm (Photometer eines anderen Herstellers) und 405 nm (BioPhotometer plus) hatten bereits gezeigt, dass die geringen Unterschiede in den Wellenlängen keinen Einfluss auf das Endergebnis haben.

Die Berechnung der β -Gal-Einheiten (units) erfolgte nach folgender Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase - Aktivität} = \frac{1000 \times \text{OD}_{405}}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

Die berechneten β -Gal-Einheiten entsprechen dabei der Menge an Enzym, die pro Minute und pro Hefezelle 1 µmol ONPG spaltet [13]. Der OD_{405} -Wert resultiert aus der gemessenen Absorption des σ -Nitrophenols, t entspricht der Inkubationszeit in Minuten, V dem eingesetzten Volumen von 0,1 mL mit Konzentrierungsfaktor von 5, und der OD_{600} -Wert der gemessenen Absorption der \bar{u} /N-Flüssigkultur bei 600 nm. Damit kann eine Aussage über die relativen Bindungsstärken für Protein-Protein-Interaktionen getroffen werden.

Einstellungen am BioPhotometer plus:

Zur Bestimmung der optischen Dichte der Hefe-Kultur wurde die Methode OD_{600} am BioPhotometer plus genutzt.

Als Nullwert (blank) wurde Kulturmedium ohne Zellen verwendet. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 1 beispielhaft gezeigt.

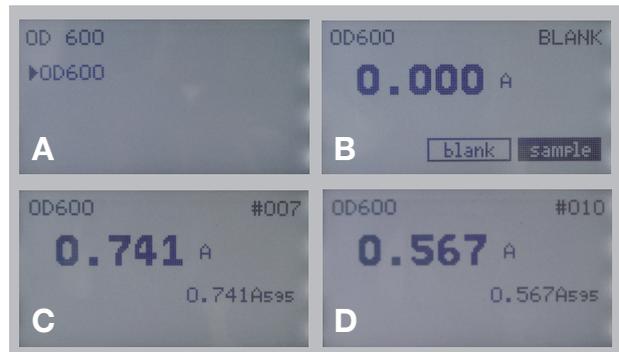


Abb. 1: Bestimmung der optischen Dichte von Hefekulturen bei 600 nm.

- A) Auswahl der Methode „OD₆₀₀“
- B) Nullwertbestimmung durch Messen von Kulturmedium ohne Zellen
- C) Bestimmung der optischen Dichte (Beispiel 1),
- D) Bestimmung der optischen Dichte (Beispiel 2)

Die Absorption von ONP zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde im Eppendorf BioPhotometer plus bei 405 nm durchgeführt. Hierzu wurde über den Bereich „Absorbance“ die Wellenlänge 405 nm ausgewählt und die Absorptionen der jeweiligen Proben nach Bestimmung des Nullwertes gemessen (beispielhaft gezeigt in Abbildung 2). Die Bestimmungen wurden in Eppendorf UVetten® durchgeführt.



Abb. 2: Bestimmung der Absorption bei 405 nm.

- A) Auswahl der Wellenlänge über die Taste „Absorbance“
- B) Nullwertbestimmung
- C) Absorption der Probe bei 405 nm (Beispiel 1)
- D) Absorption der Probe bei 405 nm (Beispiel 2)

Ergebnisse und Diskussion

Für die Entschlüsselung von Signalwegen, an denen die Src-Tyrosinkinase SmTK3 beteiligt ist, wurde ein Y2H-Screening durchgeführt. Um Interaktionspartner zu finden, die „downstream“ dieser Tyrosinkinase agieren, wurde die SH3-Domäne mit der N-terminal gelegenen „unique site“ (US-SH3) als bait verwendet. Bei diesem Screening wurden 39 prey-Klone gefunden und sequenziert. Anhand anschließender Datenbankanalysen wurden die Klone in 9 Homologiegruppen eingeteilt. Diese umfassten Diaphanous-Proteine, den eukaryontischen Translation-Initiationsfaktor eIF4 γ 2, die BAF60-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, eine YME1-ähnliche Metalloprotease und eine mRNA (Guanin-7) Methyltransferase. Weiterhin konnten Klone mit Homologie zu einer Quinolinat-Phosphoribosyltransferase, einem SH3-Bindeprotein aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) und einem Smad-Protein (Hrsmad 2/3) aus der Seescheide *Halocynthia roretzi* identifiziert werden. Für weitere 18 Klone konnte *in silico* nur eine sehr schwache Ähnlichkeit zu Pericentrin B des Menschen festgestellt werden [10].

Für die Bestätigung der gefundenen Interaktionen und zur weiteren Untersuchung der Beiträge der „unique site“ und der SH3-Domäne zu den Interaktionsstärken, wurde je ein repräsentativer Klon aus jeder Homologiegruppe mit einem SH3-bait- oder einem US-SH3-bait-Konstrukt in den Hefestamm AH109 retransformiert und unter Selektionsbedingungen angezogen. Als Negativkontrolle wurden Zellen des Stammes AH109 verwendet, die ausschließlich mit dem US-SH3-bait-Konstrukt transformiert wurden. Unter Selektionsbedingungen auf Reporterogenaktivität wuchsen im Gegensatz zur Negativkontrolle nur Hefen, die gleichzeitig mit bait- und prey-Klonen transformiert worden waren. Die relativen Aktivitäten der durch die Interaktionen der prey- und bait-Proteine induzierten und exprimierten β -Gal wurden über eine Substratumsetzung von ONPG bei einer Absorption von 405 nm bestimmt. Hierfür wurde das Eppendorf BioPhotometer plus eingesetzt.

Das Ergebnis der Bestimmung der relativen Interaktionsstärken der beiden SmTK3-Konstrukte mit ihren potentiellen Bindungspartnern ist in Abbildung 3 zusammengefasst. Dabei konnten für alle Klone Interaktionen mit beiden Konstrukten detektiert werden. Für die Negativkontrolle wurde wie erwartet keine Interaktion festgestellt. Sowohl für das SH3-bait- als auch das US-SH3-bait-Konstrukt konnte die stärkste Interaktion mit der BAF60-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes (SWI/SNF-BAF60) ermittelt werden. Bei diesem Protein handelt es sich um eine Untereinheit eines Multiproteinkomplexes, der an Reorganisationsprozessen von Chromatin beteiligt ist [14].

Neueste Studien haben gezeigt, dass Tyrosinphosphorylierungen durch Src-Kinasen auch im Nukleus stattfinden können und dort eine Rolle bei Chromatinstrukturierungsprozessen spielen, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst werden [15]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Src-Kinase SmTK3 die BAF60 Untereinheit von *S. mansoni* im Kern phosphorylieren könnte und somit Prozesse der Chromatinstrukturierung beeinflusst. Weiter zeigen die Ergebnisse des β -Gal-Flüssigassays, dass die „unique site“ der SmTK3 wesentlich zur Bindungseffizienz dieser Kinase mit der überwiegenden Mehrheit ihrer Partner beiträgt, da für fast alle Interaktionspartner der SmTK3 eine Verstärkung der relativen Interaktionen bei vorhandener „unique site“ zu erkennen ist.

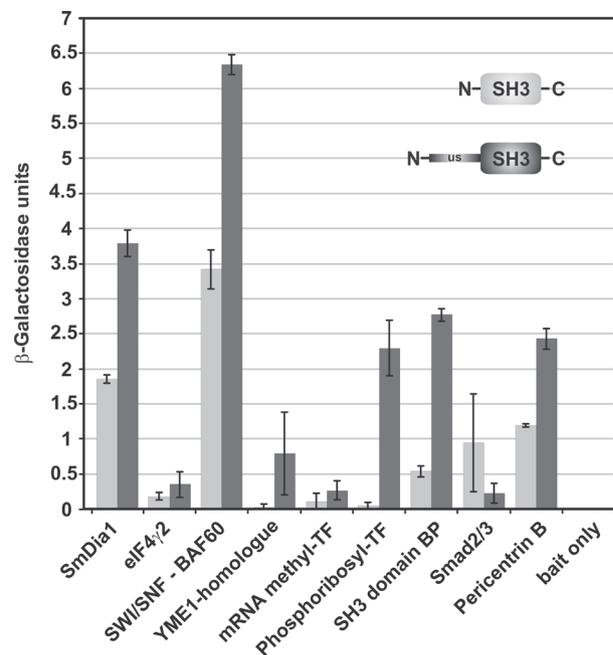


Abb. 3: Ergebnis des β -Gal-Flüssigassays zur Quantifizierung der relativen Interaktionsstärken der SmTK3 mit den im Y2H-Screening identifizierten Interaktionspartnern.

In der Abbildung sind die errechneten Einheiten der β -Gal-Aktivitäten der prey-Klone aus dem Y2H-Screening mit der SH3-Domäne (hellgraue Säulen) bzw. der SH3-Domäne in Kombination mit der „unique site“ (dunkelgraue Säulen) der Tyrosinkinase SmTK3 dargestellt. Für den Assay wurden repräsentative prey-Klone zunächst mit den bait-Konstrukten in AH109-Hefezellen co-transformiert und anschließend für den Assay verwendet ($n = 6$). Die dafür verwendeten prey-Klone sind Diaphanous (SmDia1), der eukaryontische Translation-Initiationsfaktor (eIF4 γ 2), die BAF60-Untereinheit des SWI/SNF Komplexes (SWI/SNF-BAF60), die YME1-ähnliche Metalloprotease (YME1-homologue), die mRNA (Guanin-7) Methyltransferase (RNA methyl-TF), die Quinolinat-Phosphoribosyltransferase (Phosphoribosyl-TF), das SH3-Bindeprotein (SH3 domain BP), das Smad-Protein (Smad2/3) und Pericentrin B. Als Negativkontrolle wurden AH109-Zellen nur mit dem bait-Plasmid US-SH3 transformiert (bait only).

Fazit

Mit Hilfe von Y2H-Screenings lassen sich relativ leicht Protein-Protein-Interaktionen identifizieren, um potentielle Bindungspartner für bestimmte Proteine zu finden. Die Interaktion kann über den enzymatischen Nachweis mittels β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden, indem das Spaltprodukt ortho-Nitrophenol (ONP) bei 405 nm photometrisch gemessen wird.

Das Eppendorf BioPhotometer plus besticht dabei durch seine übersichtliche Ergebnisdarstellung und seine klar verständliche Bedienung.

Die vom Hersteller (Clontech) empfohlene Messung des ONP bei 420 nm konnte ohne signifikante Beeinträchtigung der Messergebnisse bei 405 nm durchgeführt werden.

Referenzen

- [1] Lucius, R. & Loos-Frank, B. (1997) Parasitologie - Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Erstaufgabe
- [2] Kunz, W. (2001) Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol.* 17, 227 – 231
- [3] Grevelding, C.G. (2004) *Schistosoma*. *Curr. Biol.* 14, R545
- [4] Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleigh, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., McManus, D.P. (2002) Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1212 – 1220
- [5] Kapp, K., Knobloch, J., Schübler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2004) The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 171 - 182
- [6] Knobloch J., Kunz W., Grevelding C.G. (2006) Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1261-1272
- [7] Krauss, G. (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Wiley-VCH, Weinheim
- [8] BioTeach (2008) The Yeast Two Hybrid Assay - An Exercise in Experimental Eloquence. BioTeach, www.bioteach.ubc.ca
- [9] Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10, 286 - 292
- [10] Quack, T., Knobloch, J., Beckmann, S., Vicogne, J., Dissous, C., Grevelding, C.G. (2009) The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK3 and the GTPase SmRho 1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS ONE*, 4 (9): e6998
- [11] Clontech (2007) Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual. Clontech, www.clontech.com
- [12] Clontech (2002) Yeast Protocols Handbook. Clontech, www.clontech.com
- [13] Miller, J.H. (1992) In a Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- [14] Mohrmann, L. & Verrijzer, C.P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1681, 59 - 73
- [15] Takahashi, A., Obata, Y., Fukumoto, Y., Nakayama, Y., Kasahara, K. et al. (2009) Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp. Cell. Res.* 315, 1117 – 1141

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestell-Nr.
BioPhotometer plus, 230 V / 50-60 Hz	6132 000.008
Thermodrucker DPU 414	6131 011.006
Thermopapier, 5 Rollen	0013 021.566
UVette®, einzeln verpackt, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack, 200 Stück	0030 106.318
Küvettenständer, für 16 Küvetten	4308 078.006
BioPhotometer Data Transfer Software	6132 854.007

UVette® ist eine eingetragene Marke der Eppendorf AG.

Matchmaker™ ist eine Marke von Clontech Laboratories Inc.

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland
 Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: vertrieb@eppendorf.de · www.eppendorf.de
 Eppendorf Austria · Ignaz Köck Straße 10/2. OG · 1210 Wien · Österreich
 Tel: +43 1 890 13 64-0 · Fax: +43 (0)1 890 13 64-20 · E-mail: office@eppendorf.at · www.eppendorf.at
 Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz
 Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch · www.eppendorf.ch

Application Support Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com