

Material & Methoden für die
Molekular- & Zellbiologie

AKTUELL



Jetzt NEB Seedballs gratis mit Ihrer
Bestellung – Neue Habitate für Bienen
und Schmetterlinge

Seite 3



Wissenschaftlicher Artikel:

Development of a high-throughput data
analysis method for quantitative real-time
PCR (qPCR)

Seite 4-7

Produktempfehlung, Tipps & Tricks:

Zuverlässig und schnell, sensitiv und
präzise: Luna Universal qPCR & RT-qPCR
Reagenzien

Seite 8-9

Inhalt

Sonderaktion:

Neue Habitate für Schmetterlinge
und Bienen Seite 3

Wissenschaftlicher Artikel:

Development of a high-throughput
data analysis method for quantitative
real-time PCR (qPCR) Seite 4-5

Produktempfehlungen, Tipps & Tricks:

Zuverlässig und schnell, sensitiv
und präzise: Luna Universal qPCR
& RT-qPCR Reagenzien Seite 8-9

Monarch NAP Kits:
Optimale DNA / RNA
Aufreinigung Seite 10

Kompetente *E. coli*-Zellen
für Ihre Klonierung Seite 11

Multimedia:

NEB Podcast & NEB TV Seite 3

Herzlich willkommen zur Frühjahrsausgabe des NEB Aktuell!

Freuen Sie sich auch schon auf den Frühling? Dann geht es Ihnen wie den Bienen.

Wenn das Thermometer zuverlässig über zehn Grad klettert, werden die Bienenvölker rege und wollen vor die Tür. Unser Cover-Insekt braucht aber im Laufe des Jahres vielseitige Lande- und Futterplätze. Dazu wollen wir mit der *NEB-Seedballs Aktion* in diesem Heft einen kleinen Beitrag leisten. Unter dem Motto: „Grün geht vor!“ laden wir Sie zum urbanen Gärtnern ein.

Auch die Aktivitäten im Labor gehen leichter von der Hand, sobald die Sonne wieder höher kommt. Nutzen Sie die zusätzliche Motivation doch zu einer kleinen Testreihe mit den besten qPCR Reagenzien, der Luna-Serie. Wir haben auf den *Seiten 4 bis 9* für Sie alle Informationen zusammengetragen, die Ihnen schon vorab Lust auf einen Leistungsvergleich machen werden. Seien Sie gespannt, wie Ihr klassischer Mix gegen den jüngsten Spross aus den NEB Laboren abschneidet – entwickelt und getestet mit den neuesten Methoden.

Auch die weiteren Themen in diesem Heft stehen unter dem Schlagwort Innovation:

Bei den neuen Anwendungen für Restriktionsenzyme *auf Seite 3* ebenso wie bei der Vorstellung der effizienten Ultra II Library Kits *auf Seite 12*. Hier finden Sie Ihre zuverlässige Lösung für die Herstellung von DNA-Bibliotheken für die Hochdurchsatz-Sequenzierung, z.B. mit der enzymatischen FS-DNA-Fragmentierung als elegante und zuverlässige Lösung für die Verarbeitung multipler Proben – nicht nur in der Automatisierung.

Lassen Sie den Winter hinter sich und starten Sie mit uns in den Forschungsfrühling.

**Wir teilen mit Ihnen die Begeisterung für Qualität.
Ihr Team von New England Biolabs**

Besuchen Sie uns auf der Labvolution in Hannover, 21. - 23. Mai

Die Labvolution (Nachfolgerin der Biotechnica) bildet als europäische Fachmesse für innovative Laborausstattung und die Optimierung von Labor-Workflows das gesamte Spektrum der Laborwelt ab und zeigt neue Wege für Forscher und Wissenschaftler auf. NEB ist selbstverständlich auch in diesem Jahr wieder mit einem Stand für Sie vor Ort.

Besuchen Sie uns in Halle 19, Stand B77. Treffen Sie Ihren regionalen Ansprechpartner, sprechen Sie mit Kollegen aus unserem wissenschaftlichen Team und erfahren Sie mehr über unsere Produkte sowie deren optimale Einsatzmöglichkeiten in Ihrem Labor. Oder kommen Sie ganz ungezwungen, „einfach nur so“, an unseren Stand und nehmen am Gewinnspiel mit diversen nützlichen Preisen und beliebten Laborutensilien teil.

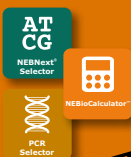
Fordern Sie noch heute Ihre kostenfreie Eintrittskarte bei uns an! Wir übernehmen gerne die Ticketkosten für Sie.

Wir freuen uns auf Sie!

FREE RESOURCES:

NEB Tools & Video Tutorials

www.neb.com/tools



NEB CUSTOMIZED SOLUTIONS
– WIR SIND IHR PROJEKT-PARTNER:

Kontaktieren Sie uns für Großmengen,
Sonderformulierungen etc.

custom.de@neb.com



Halle 19, Stand B77
21. – 23. Mai 2019

KOSTENFREIE
EINTRITTS-
KARTE

www.neb-online.de/labvolution

Neue Habitate für Schmetterlinge und Bienen – Erhalten Sie NEB Seedballs gratis mit Ihrer nächsten Bestellung!

Als forschendes Unternehmen wissen wir selbst zu gut, dass Laborarbeit und Umweltschutz manchmal schwer zu vereinen sind: Auf der einen Seite Sterilität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit – auf der anderen Seite Wiederverwendung, Verzicht oder der Austausch kritischer Materialien.

Doch schon mit vielen kleinen Taten kann man in der Summe etwas Großes bewirken! Daher haben wir im NEB Hauptquartier eine ökologische Abwasserkläranlage und ein zertifiziert energiesparendes Laborgebäude errichtet, kompostieren soviel wie möglich und nutzen beim Einsatz von unentbehrlicher Folie vollständig recyclingfähige PE-Folie aus nachwachsenden Rohstoffen.

Für die Laborarbeit haben wir außerdem die nachhaltigen Monarch Nukleinsäure-Aufreinigungskits entwickelt – weniger Plastik für Säulen und Flaschen und ressourcenfreundliche Umverpackungen (siehe Seite 10).

Jetzt können Sie mit uns zusammen einen weiteren bescheidenen Beitrag leisten:

Lassen Sie Wildblumen als Habitat für Bienen und Schmetterlinge wachsen!

Bestellen Sie jetzt ein mit dem NEB Seedballs-Zeichen gekennzeichnetes Produkt* und erhalten Sie einen kleinen Jutesack mit NEB Seedballs, d.h. kleine Bällchen aus Erde, Ton und Wildblumensamen. Den Seedballs legen Sie einfach an den gewünschten Zielort – der nächste Regen weicht den Ball auf und aktiviert das Saatgut – die Wildblumen fangen an zu keimen.

Mehr noch: Ziehen Sie Schmetterlinge groß und entlassen Sie diese in die Freiheit

Teilen Sie mit uns Ihre „gärtnerischen Erfahrungen“ als **Foto per Email oder Social Media Post** und nehmen Sie an der **Verlosung von 20 Schmetterling-Aufzuchtsets** teil. Erleben Sie, wie die heimischen Schmetterlingsraupen sich verpuppen und setzen Sie die Schmetterlinge in die Natur aus.



Abb. ähnlich.



*Bestellen Sie jetzt ein mit dem NEB Seedballs-Zeichen gekennzeichnetes Produkt. Geben Sie den **Promocode „Seedballs“** bei der Bestellung mit an. Die Aktion läuft bis zum 15.06.2019, bzw. so lange der Vorrat reicht. Limitiert auf eine Beilage pro Bestellung.

Alle weiteren Details zur Aktion sowie Hashtags für das Gewinnspiel etc. finden Sie unter:
www.neb-online.de/Seedballs



Moderne Anwendungen für Restriktionsenzyme jenseits klassischer Klonierung.

Moderne Labore nutzen Restriktionsenzyme in einer Vielzahl von Anwendungen jenseits der bekannten Klonierung mittels Restriktions-Ligation. NEB ist dabei Ihr führender Partner mit der größten Auswahl und unerreichtem Know-how: Unsere Wissenschaftler haben besondere Enzymvarianten entwickelt, z.B. Nickingenzyme, die gezielt nur einen der beiden DNA Stränge schneiden. Außerdem bieten wir die größte Auswahl an Enzymen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden (TypIIs) und damit das Herzstück in DNA Assembly Methoden sind.

Schauen Sie die Folge 15 unserer Video-Serie „NEB TV – What's trending in Science“ und erfahren Sie mehr über den Einsatz von Restriktionsenzymen in:

- Digital Droplet PCRs
- Optical Mapping of gDNA
- Chromatin Confirmation Capture
- Isothermal Amplification
- Golden Gate Assembly



www.neb-online.de/nebTV

NEB TV
What's trending in science



Development of a high-throughput data analysis method for quantitative real-time PCR (qPCR)

by Gregory C. Patton, Ph.D., Andrew N. Gray, Ph.D., Nathan A. Tanner, Ph.D., Janine G. Borgaro, Ph.D., Yan Xu, Ph.D., Julie F. Menin, M.S. & Nicole M. Nichols, Ph.D., New England Biolabs, Inc.

Over the last 20 years, quantitative real-time PCR (qPCR) has become an essential technique in molecular biology for detecting and quantifying nucleic acids. Workflow simplicity and advances in instrumentation now permit sizeable quantities of data to be generated rapidly, with 96, 384, or even 1536 reactions in one qPCR experiment. The challenge lies in the details: qPCR experiments require thoughtful design and analysis to capture all relevant information, such that accurate and appropriate conclusions can be drawn.

Development of NEB's Luna® qPCR product line required repeated data collection on a series of test panels, each containing multiple targets. It became clear during early development that a more scalable approach to data analysis and visualization was required to better understand how changes in reagent composition impacted performance. In order to compare various amplicon panels over multiple qPCR runs, instruments, reagents and conditions, a high-throughput data analysis method termed "dots in boxes" was developed. The output of this analysis captures key assay characteristics, highlighted in MIQE guidelines, as a single data point for each qPCR target. This method of analysis permits multiple targets and conditions to be compared in one graph, allowing concise visualization and rapid evaluation of overall experimental success.

INTRODUCTION TO qPCR

qPCR is a powerful fluorescence-based technique that detects and quantifies nucleic acids in a variety of samples. In 1992, Higuchi et al. showcased the first example of real-time PCR by using a camera during the amplification reaction to continuously monitor the incorporation of ethidium bromide, an intercalating dye that fluoresces in the presence of double-stranded DNA under ultraviolet light (1). Currently, most qPCR experiments commonly employ the dsDNA intercalating dye SYBR® Green I or hydrolysis probes (e.g., TaqMan®) to monitor amplification (2). Plotting the measured fluorescence signal versus PCR cycle number results in a graphical representation of amplification. The point at which the fluorescence signal exceeds the background fluorescence level is known as the quantification cycle (C_q). Comparing C_q values permits evaluation of relative target abundance between two or more samples. Alternatively, C_q values can be used to calculate absolute target quantities via reference to an appropriate standard curve, derived from a series of known DNA or RNA dilutions. This technique can be more powerful than traditional PCR, allowing both qualitative information (pres-

ence or absence of a target sequence), as well as the quantitative data (nucleic acid quantity) to be determined without opening the reaction tube. Greater sensitivity and lower risk of carryover contamination has resulted in qPCR replacing end-point PCR in many applications. Today, the technique is used in a variety of fields, from molecular diagnostics to agricultural research, and in applications including mutation detection, genotyping, copy number variation and gene expression analysis.

MIQE GUIDELINES

Rapid adoption of qPCR and its relatively straightforward execution (mixing amplification reagents, primers and template) has led to the generation of an enormous amount of data, as evidenced by the numerous publications containing qPCR experiments. However, the ease of generating qPCR data has also proven to be the technique's greatest challenge (3). A diverse set of protocols, instruments, reagents and analysis methods can be found in the scientific literature, with many publications reporting invalid or conflicting data. The lack of consensus on best experimental practices for qPCR resulted in the establishment of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines by Bustin et al. (4). The MIQE guidelines established a set of qPCR performance metrics that should be determined and reported in peer-reviewed publications to ensure robust assay performance and reproducibility. These assay characteristics include:

- PCR efficiency
- Dynamic range
- Limit of detection (LOD)
- Target specificity
- Precision

One of the most important assay characteristics is PCR efficiency, which is a measure of product duplication at every amplification cycle. PCR efficiency is measured by amplifying multiple known concentrations of nucleic acid to obtain C_q values

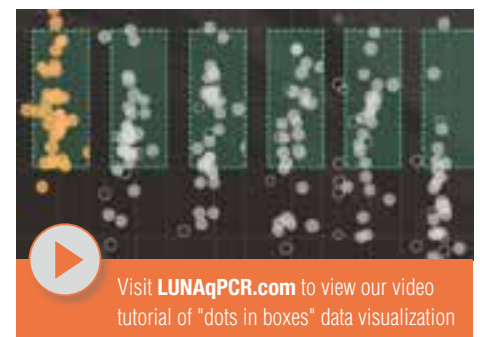
for each concentration. A standard curve is created by plotting the observed C_q values on the y-axis and the $\log_{10}$ of the template concentration on the x-axis. Efficiency is calculated using the equation: PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$. A slope of -3.32 represents 100% PCR efficiency and indicates doubling of the target amplicon at each PCR cycle.

The dynamic range establishes the upper and lower limits for quantification and should be linear for at least three $\log_{10}$ concentrations of template. Preferably, the dynamic range encompasses five to six orders of magnitude. Linearity over a dynamic range is reported by the R^2 coefficient of determination for the C_q values linear fit to the standard curve.

The limit of detection is often defined as the lowest concentration at which 95% of target sequences are detected in positive samples. An ideal Poisson distribution and single copy detection dictate the lowest theoretical LOD is 3 molecules per PCR. Its determination establishes the lower boundary for target detection with 95% confidence (5).

Target specificity should be confirmed by product size, sequencing or melt curve analysis, since primers may unexpectedly amplify off-target regions. In addition, some primer sets have a propensity to form primer dimers during amplification, resulting in inaccurate quantification or false positive results. In order to identify spurious amplification products, no-template controls (NTC) should be included in every qPCR run. As NTCs can identify both unintended amplification products as well as contamination, criteria should be established for using these controls to determine when data should be accepted or rejected.

The last factor that should be evaluated is assay precision. Multiple replicates of the same sample should typically have high concordance. Variation inherently increases as the copy number decreases, but also can be attributed to factors such as pipetting errors and instrumentation.



DOTS IN BOXES ANALYSIS OF qPCR DATA

The MIQE-highlighted metrics described above served as a guide for evaluating reagent performance during development of NEB's new Luna qPCR and RT-qPCR product line. To ensure strong performance across a range of amplicons, multiple test panels were created, with each panel containing a minimum of five targets that could be run in 96 or 384-well formats. Panels comprised of gDNA and cDNA targets were used to evaluate DNA-based qPCR master mixes, whereas RNA targets of varying abundance were used to assess RT-qPCR reagents. In general, targets spanned typical qPCR amplicon lengths (~70 to 200 bp), as well as GC content (~40 to 60%). Given the large data set that was created during development, data mining to decipher what



TABLE 1:
Criteria for developing quality score metrics for dots in boxes analysis

	Intercalating Dye Chemistry	Hydrolysis Probe Chemistry
Linearity	$R^2 \geq 0.98$	$R^2 \geq 0.98$
Reproducibility	Replicate curves shall not vary by more than 1 C_q .*	Replicate curves shall not vary by more than 1 C_q .*
RFU Consistency	Maximum plateau fluorescence signal for all curves shall be within 20% of the mean. Fluorescence signal shall not be jagged.	Increase of fluorescence signal shall be consistent for all curves, exhibiting parallel slopes. Fluorescence signal shall not be jagged.
Curve Steepness	Curves shall rise from baseline to plateau within 10 C_q values or less.	Curves shall rise from baseline to 50% maximum RFU within 10 C_q values or less.
Curve Shape	Curves shall exhibit a sigmoidal shape, resulting in a plateau of fluorescence signal.	Curves need not be sigmoidal, but shall appear to be reaching a horizontal asymptote by the last PCR cycle.

* At extremely low input (e.g., single copy), the lack of amplification due to the Poisson distribution is taken into consideration.

changes impacted performance became challenging, and it was clear that a better, more scalable approach to data visualization was needed.

The fundamental performance criteria outlined in the MIQE publication therefore served as a

basis for the development of a high-throughput data analysis method termed "dots in boxes" (Figure 1). For each amplicon, PCR efficiency, dynamic range, target specificity and precision was captured as a single data point plotted in two dimensions, with the PCR efficiency plotted on the y-axis and the delta C_q (ΔC_q) as the x-axis. ΔC_q is the difference between the C_q values of the NTC and the lowest template dilution. Setting guidelines around the typical accepted values for these two plotted parameters (PCR efficiency of 90 to 110% and ΔC_q of 3 or greater) created a graphical box, highlighting where successful qPCR experiments (dots) should fall.

While this simple dot plot was informative on its own, it wasn't sufficient to capture all of the relevant details of each qPCR experiment. In order to represent additional information, such as the linearity of the dynamic range (R^2), the overall quality of the qPCR data was scored on a scale of 1 to 5, with 5 representing the highest quality. This scoring method was built upon previous work by Hall et al. (6). Additional performance criteria captured using the 5-point quality score included precision (reproducibility), fluorescence signal consistency, curve steepness and sigmoidal curve shape. Parameters for these five criteria were established to identify when the quality score should be penalized. Scoring criteria differed slightly for probe-based chemistry compared to intercalating dye-based detection (Table 1) due to differences in typical curve shape.

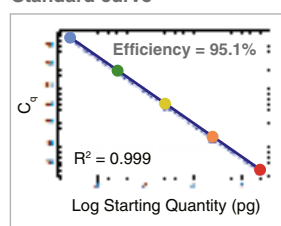
Once assigned, the quality score for each amplicon was represented by the dot size and opacity. The higher the quality score, the larger the dot. Additionally, quality scores of 4 and 5 were represented as solid dots while a score of 3 or less was captured as an open circle for simple visual screening of performance. Amplicons falling in the box and receiving a quality score of 4 or 5 represented high quality, reliable qPCR data. The dots in boxes method allowed multiple targets and conditions to be plotted on a single graph and compared quickly, creating an efficient, high-throughput visual method for data analysis.



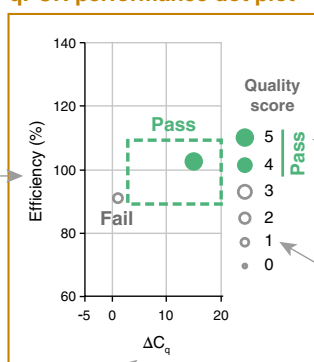
FIGURE 1:
Breaking it down: how we translate qPCR data into dots in boxes

NEB has developed a method to better evaluate the large amount of qPCR data generated in an experiment. The output of this analysis is known as a dot plot, and captures the key features of a successful, high-quality qPCR experiment as a single point. This method of analysis allows many targets and conditions to be compared in a single graph. For each experiment, triplicate reactions are set up across a five-log range of input template concentrations (Amplification plot, bottom-left). Three non-template control (NTC) reactions are also included, for a total of 18 reactions per condition/target. Efficiency (%) is calculated (Standard curve, top-left) and is plotted against ΔC_q (dot plot, center), which is the difference between the average C_q of the NTC and lowest template dilution. This parameter captures both detection of the lowest input and non-template amplification. Acceptable performance criteria are defined as an Efficiency of 90–110% and a ΔC_q of ≥ 3 (green box). Other performance criteria are captured using a 5-point Quality Score (top-right). Quality Score is represented by the size and fill of the plotted dot, with experiments that pass all performance criteria represented by a solid dot within the box.

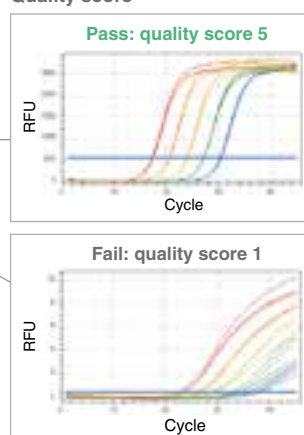
Standard curve



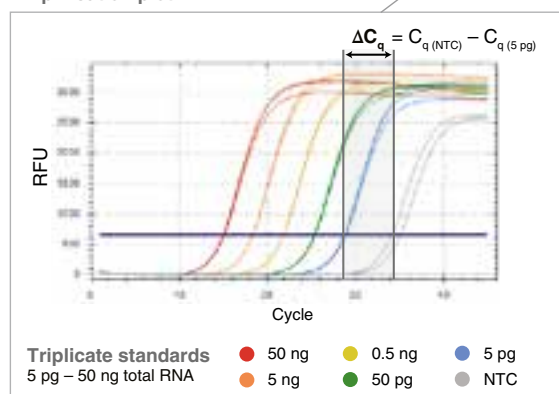
qPCR performance dot plot



Quality score



Amplification plot



Quality score metrics

1. R^2 (standard curve)
2. C_q reproducibility
3. Fluorescence consistency (RFU_{max})
4. Curve steepness
5. Curve shape

To rigorously test qPCR performance, experiments were designed to simultaneously evaluate efficiency over a broad dynamic range of input concentrations; sensitivity by assessing low-input detection; and specificity by assessing off-target amplification. To accomplish this, qPCR efficiency was measured over a five-log dilution of template with data collected in triplicate for each dilution and a NTC. For genomic targets, an average of ~2 copies per reaction was routinely tested to assess the limits of low input detection. Since the ΔC_q incorporates both the C_q of the lowest input and that of the NTC ($\Delta C_q = C_{q(NTC)} - C_{q(\text{lowest input})}$), it allows sensitivity and specificity to be captured in a single variable. Inability to amplify the lowest template dilution results in a ΔC_q of 0 in most cases, since curves failing to cross the threshold are automatically given a C_q value corresponding to the total number of amplification cycles. The presence of non-specific or contaminating amplification in NTC reactions also reduces the ΔC_q , such that either lack of low-input amplification or excessive off-target amplification can push the ΔC_q below the passing (≥ 3) threshold. Target

specificity was also evaluated using denaturation or melt curves for all intercalating dye-based qPCR assays, although this information was not captured in the dot plot.

Pairing dots in boxes with an existing custom laboratory information management system (LIMS) permitted the performance of reagents to be screened and tracked on all amplicon panels. The LIMS, previously established for the development of NEB's Q5® High-Fidelity DNA Polymerase products, was modified to capture all relevant experimental details. The database connected results from each qPCR experiment (e.g., C_q values, PCR efficiency, and linearity) to the contents of each well in that experiment (e.g., target, template concentration, primer concentration, qPCR master mix, additives, etc.) such that performance could be linked to reaction variables and conditions. Additional details including the operator, real-time PCR instrument ID, and cycling conditions were also recorded. Tableau®, an analytics software package, was used to analyze the data and to create graphical displays of the dot plots. An example outcome is shown in Figure

2A. Here, the impact of known PCR additives and the concentration ranges that were beneficial to performance were quickly assessed on a development lot of the DNA dye-based master mix. Additive D resulted in the best performance on this particular panel of five amplicons. Unfortunately, improved performance on one particular qPCR panel did not necessarily translate to positive performance across all panels evaluated. Thus, the development process was by necessity methodical and iterative. This made the ability to analyze and visualize large sets of results, covering multiple test panels, formulations and experimental conditions, all the more crucial. Dots in boxes thus played a critical role in the development of NEB's Luna products, driving reagent optimization by quickly identifying compositions with increased performance across all test panels. Successful compositions were built upon and fine-tuned, progressively improving the percentage of amplicons that fell in the box with high quality scores (Figure 2B), and thus overall performance. As a result, the final Luna qPCR formulations exhibit robust performance on diverse targets from a wide range sample types and sources.



FIGURE 2:

Dots in boxes enables visual screening of reagent optimization

Data was collected for qPCR targets varying in length and GC content, using Jurkat genomic DNA as input. Results were evaluated for efficiency, low input detection and lack of non-template amplification (where ΔC_q = average C_q of non-template control – average C_q of lowest input). In addition, consistency, reproducibility and overall curve quality were assessed (Quality Score, Table 1).

A) In this example, additives A through D were screened on five amplicons, each represented by a colored dot, to examine their effect on qPCR performance. Additive D resulted in successful amplification of all targets while Additive B was detrimental to amplification, resulting in low PCR efficiencies. B) Dots in boxes permitted large volumes of data to be compared over multiple master mix compositions, ultimately driving reagent optimization. Progression of performance is displayed for several predecessors of the Luna Universal qPCR Master Mix (NEB #M3003). Mixes with successful qPCR performance were built upon to establish the final composition of the Luna products.

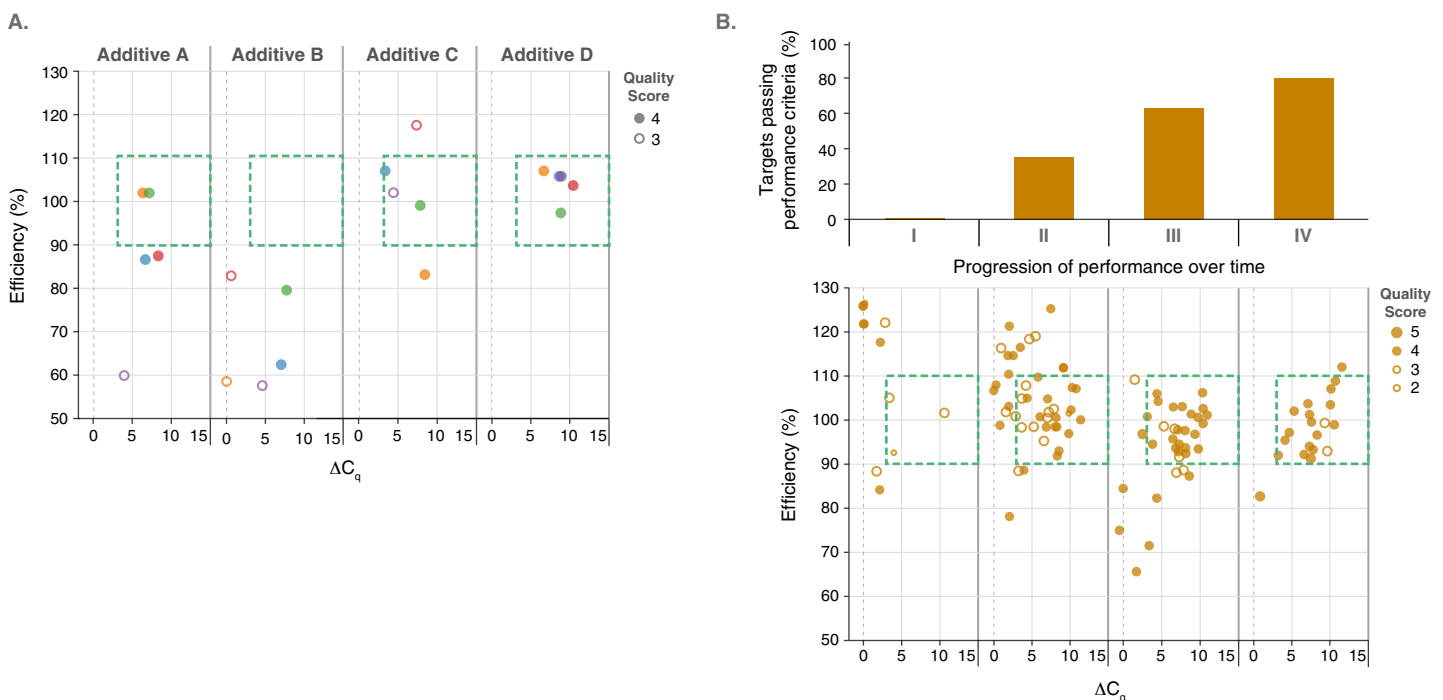
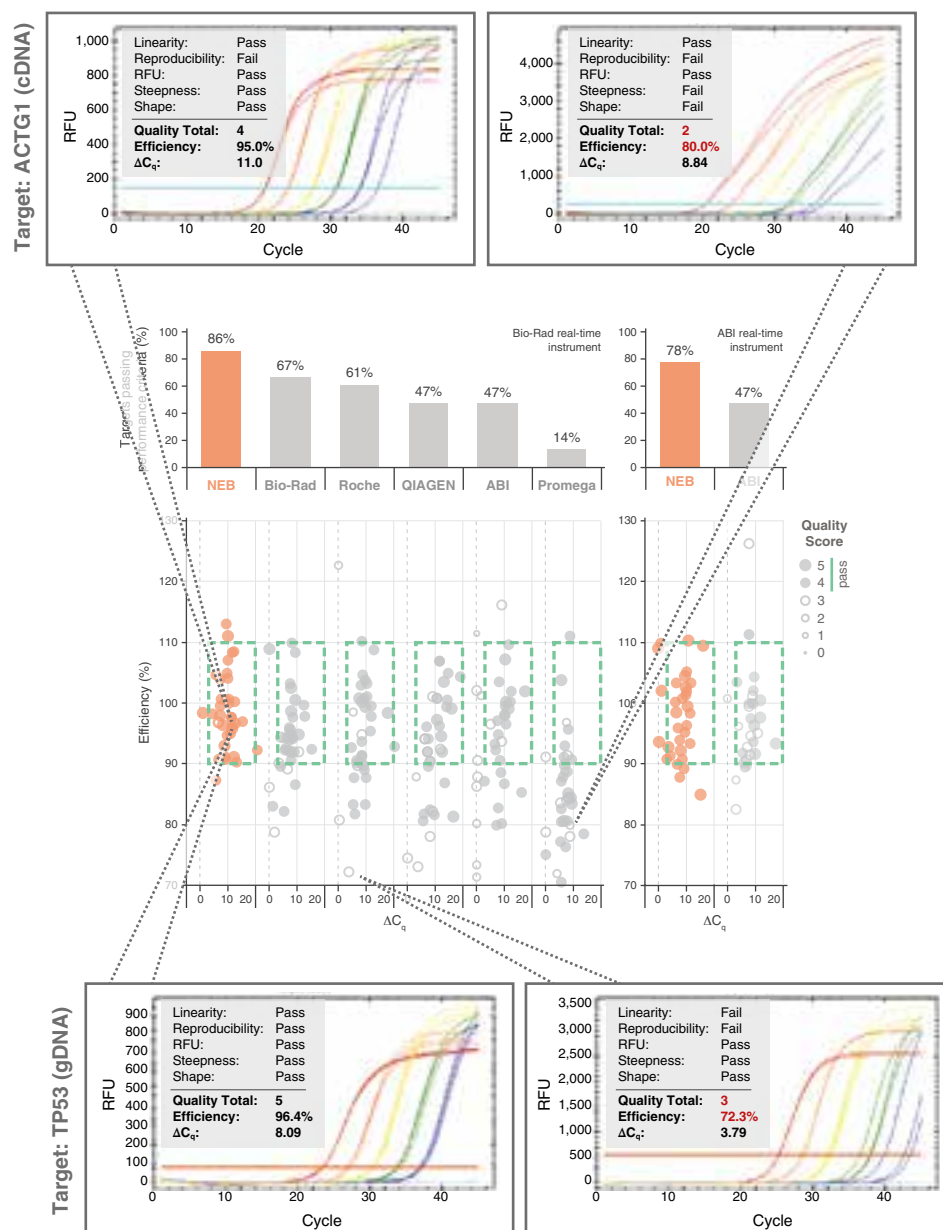




FIGURE 3:
Luna qPCR products outperform other commercially-available reagents

qPCR reagents from NEB and other manufacturers were tested across 16–18 qPCR targets varying in length and GC content, using either Jurkat genomic DNA or Jurkat-derived cDNA as input (10 genomic DNA targets and 8 cDNA targets on Bio-Rad® real-time instrument, 9 genomic and 7 cDNA targets on ABI instrument). For each testing condition, data was collected by 2 users and according to manufacturers' specifications. Results were evaluated as described in Figure 2. Representative curves are shown for two targets, ACTG1 (top) and TP53 (bottom), to demonstrate the correlation of dots in boxes with typical qPCR data. Results for NEB and other major manufacturers are shown: Bio-Rad, SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix; Roche®, FastStart™ SYBR Green Master; QIAGEN®, QuantiTect® SYBR Green PCR Kit; ABI, PowerUP™ SYBR Green Master Mix; Promega®, GoTaq® qPCR Master Mix. Luna Universal qPCR Master Mix from NEB outperformed all other reagents tested.



DOTS IN BOXES AS A COMPARISON TOOL

Dots in boxes also permitted large-scale performance comparisons between the Luna Universal qPCR and RT-qPCR reagents to various other commercial product offerings. Each commercial mix was challenged against test panels containing a range of targets. Amplicon panels used during the development were tested with a commercial primer/probe sets and a variety of commercial mixes. Data was collected by two separate users and experiments were performed according to each manufacturer's specific product recommendations. The results for the Luna Universal qPCR Master Mix (NEB #M3003) are shown in Figure 3. Luna generates the highest quality qPCR data of all reagents tested, with 86% of all amplicons tested falling in the box with high quality scores. Strong performance was selected for each Luna product; dots in boxes performance comparisons for each Luna product can be found at LUNAqPCR.com.

CONCLUSION

Dots in boxes is a powerful, high-throughput data analysis method based on the MIQE guidelines. It enables rapid, concise comparison of qPCR performance across many targets and for multiple reagents, conditions and/or protocols, permitting an overview of qPCR performance over thousands of reactions where such visualization was not previously possible. Combining the dots in boxes analysis method, a range of target test panels, and a custom LIMS enabled us to create and mine large data sets for information, identify critical variables that affect amplification in qPCR, and harness this information to optimize qPCR reagents. The dots in boxes analysis tool was thus invaluable in development of the Luna qPCR and RT-qPCR reagents, and will continue to benefit future qPCR evaluation and development efforts.

References

- Higuchi, R., et al. (1992) *Biotechnology* 10, 413-417.
- Navarro, E., et al. (2015) *Clin. Chim. Acta* 439, 231-250.
- Bustin, S.A., and Nolan, T. (2004) *J. Biomol. Tech.* 3, 155-156.
- Bustin, S.A., et al. (2009) *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Wittwer, C.T., et al. (2004) *Washington: ASM Press*. 71-84.
- Hall, A.T., et al. (2013) *PLOS One* 8: e73845.



Besuchen Sie www.neb-online.de/luna und finden Sie dort weitere Tipps & Tricks, Video Tutorials und mehr...

Zuverlässig und schnell – sensitiv und präzise:

Nutzen Sie Luna Universal qPCR & RT-qPCR Reagenzien!

Für Ihre qPCR-Experimente empfehlen wir Ihnen die LUNA Universal (RT)-qPCR Reagenzien! Diese nutzen modernste, **einzigartige Enzymtechnologie** und sind auf beste Performance optimiert:

Die Luna qPCR Reaktionsmische basieren auf einer aptamer-basierten Hot Start *Taq* DNA Polymerase und wurden mit einem neuartigen passiven Referenz-Farbstoff versehen, der zusätzliche Komponenten überflüssig macht. Durch diesen besonderen Farbstoff ist Luna mit **allen gängigen Plattformen** inkl. ROX-abhängigen Geräten **kompatibel**.

Performance! Performance! Performance!

Während der Produktentwicklung haben wir eigens ein neuartiges Testverfahren eingeführt, dass es erlaubt, abertausende von qPCR-Daten auf unterschiedlichem Probenmaterial, Pufferbedingungen etc. auszuwerten (siehe auch Artikel Seite 4-7).

Die **reverse Transkriptase** in den Luna RT-qPCR Kits ist ein **in silico neuentwickeltes WarmStart Enzym**, das robuste Leistung und hohe Thermostabilität für die anschließende qPCR bietet – die derzeit beste RTase! Diese RTase finden Sie in den bequemen One-Step RT-qPCR Kits oder als Supermix Kit für flexible Two-Step Ansätze. (S.9).

Fazit:

Mit den Luna-Produkten erhalten Sie Reagenzien, die entlang der renommierten **MIQE-Richtlinien für beste qPCR-Praxis*** umfassend optimiert und getestet wurden und die hinsichtlich Performance, Sensibilität und Zuverlässigkeit allen Konkurrenzprodukten überlegen sind!

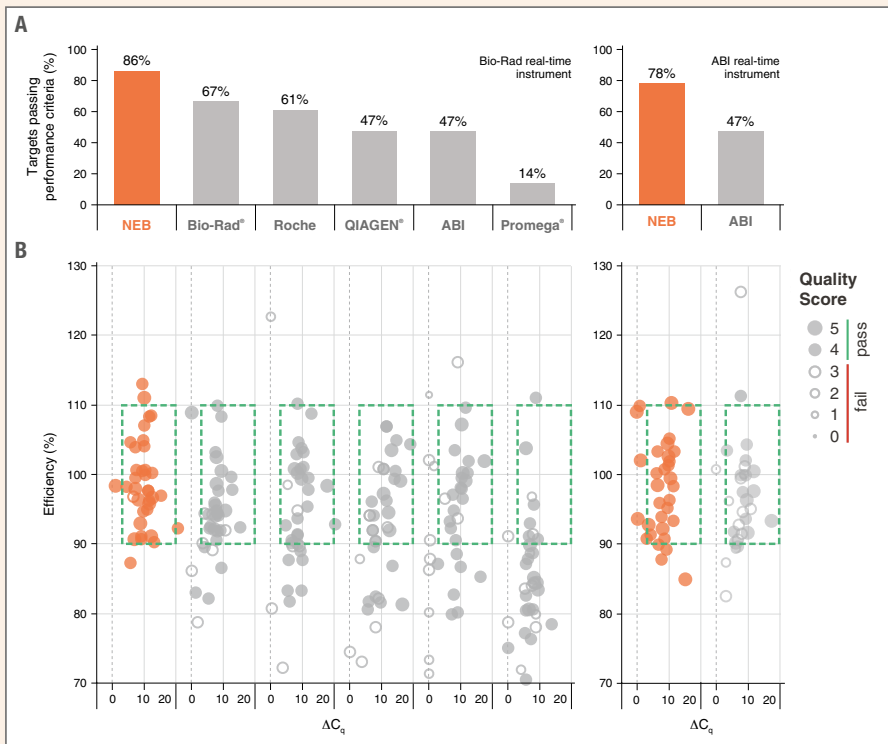
Überzeugen Sie sich selbst und bestellen Sie ein kostenfreies Testmuster!



Ihre Vorteile:

- Kompatibel mit allen gängigen qPCR-Geräten und sowohl für farbstoff- als auch für sondenbasierte Detektion verfügbar
- Beste „MIQE-validierte“ Performance im Vergleich zu herkömmlichen Systemen dank neuartiger Enzymtechnologie:
 - Höchste Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten
 - Exzellente Sensitivität und Genauigkeit auf allen Templates (egal, ob AT-reich, GC-reich,...)
 - Schnelle und einfache Protokolle
- Ein gut sichtbarer inerte blauer Farbstoff dient Ihnen als Schutz vor Pipettierfehlern.
- Optional: Möglichkeit zum UDG Verdau (#M0372) als Schutz vor Übertragskontamination
- Günstiger Preis pro Reaktion

Exzellente Sensitivität, Reproduzierbarkeit und MIQE-konforme Performance im Vergleich zum Wettbewerb am Beispiel Luna Universal qPCR Master Mix (#M3003).

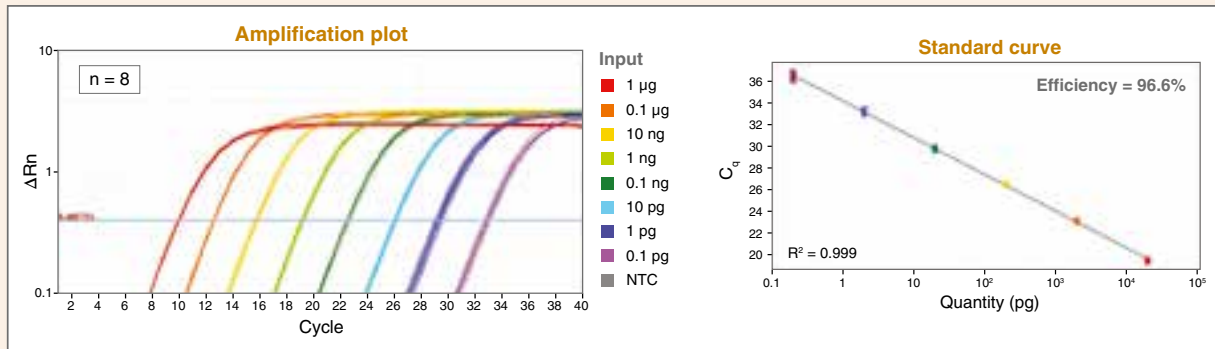


In unseren qPCR und RT-qPCR Tests wurden Targets mit unterschiedlicher Häufigkeit, Länge und %GC-Anteilen verwendet (Panel), um die Luna-Leistung mit herkömmlichen Reagenzien anderer Hersteller zu vergleichen. Jedes Panel wurde von zwei verschiedenen Anwendern jeweils in Triplikaten nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Balkendiagramm (A) zeigt, welcher Anteil (in Prozent) der Targets unsere Qualitätskriterien erfüllt haben. Alle weiteren Details finden Sie im Original-Artikel auf den Seiten 4-7.

Ein gut sichtbarer inerte blauer Farbstoff schützt Sie vor Pipettierfehlern!

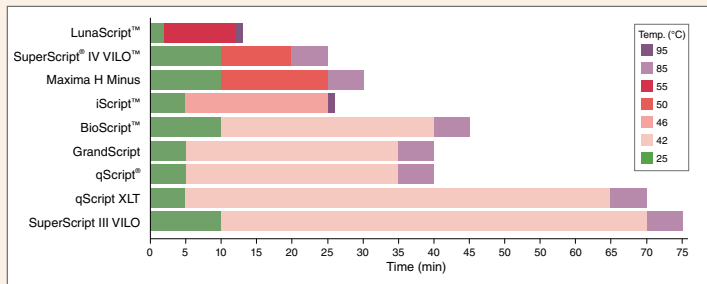


NEBs Luna Universal **One-Step RT-qPCR Kits** bieten außergewöhnliche Sensitivität, Reproduzierbarkeit und RT-qPCR Performance. Beispiel hier: #E3005S

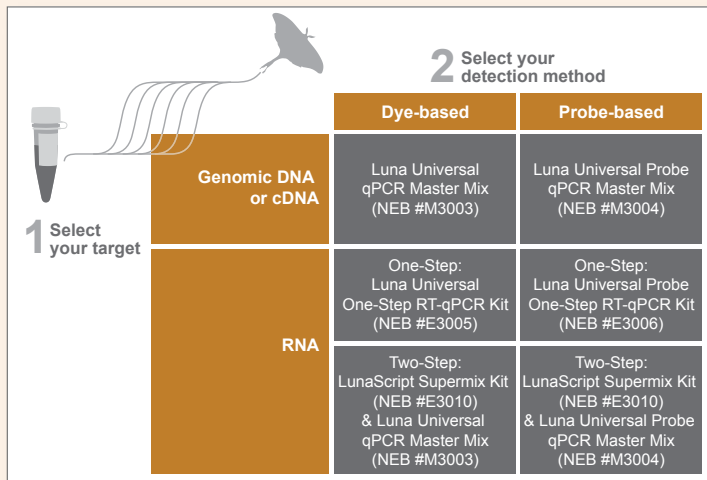


RT-qPCR gegen humane GAPDH RNA mittels Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit über 8-log Verdünnungsstufen der Input-RNA (0,1 pg - 1 μg Jurkat Gesamt-RNA) und 8 Replikaten pro Verdünnung. Reaktionsansatz und Temperaturzyklus nach Protokollangaben, inklusive einem 10-minütigen RT-Schritt bei 55°C für die thermostabile Luna WarmStar® Reverse Transcriptase. NTC = Kontrolle ohne RNA Template.

Für beste **Two-Step RT-qPCRs** empfehlen wir das LunaScript RT SuperMix Kit (#E3010): das schnellste und „heißeste“ cDNA Synthese System für beste Performance – auch bei eventuellen RNA-Sekundärstrukturen!



So einfach finden Sie Ihr LUNA Produkt:



Jetzt testen!

Sie haben LUNA Universal qPCR und RT-qPCR Produkte noch nicht getestet? Überzeugen Sie sich selbst und erfahren Sie die exzellente Luna-Performance auf Ihrem eigenen Material!

Bestellen Sie noch heute Ihr kostenfreies Testmuster unter: www.neb-online.de/luna

Geben Sie uns anschließend Ihr Feedback und erhalten Sie einen NEBCool Laborbankkühler oder einen NEB Timer als Dankeschön!



PRODUKT	ART. NR.	GRÖSSE	PREIS
Luna Universal qPCR Master Mix	M3003S/L/X/E	200/500/1000/2500 rxns (20 μl vol)	105 € / 237 € / 424 € / 948 €
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	M3004S/L/X/E	200/500/1000/2500 rxns (20 μl vol)	88 € / 198 € / 364 € / 812 €
Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit	E3005S/L/X/E	200 / 500/1000/2500 rxns (20 μl vol)	218 € / 498 € / 869 € / 1924 €
Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit	E3006S/L/X/E	200/500/1000/2500 rxns (20 μl vol)	198 € / 448 € / 788 € / 1738 €
LunaScript RT SuperMix Kit	E3010S/L	25/100 rxns (20 μl vol)	125 € / 420 €
Optional:			
Antarctic Thermolabile UDG (für Verdau von alten qPCR Amplifikaten)	M0372S/L	100/500 units	76 € / 304 €



Jetzt NEB Seedballs gratis mit Ihrer Bestellung! Siehe S. 3

Optimale DNA/RNA Aufreinigung mit den nachhaltigen Monarch Kits

Die Monarch Nukleinsäure-Aufreinigungskits von NEB ermöglichen Ihnen eine einfache und schnelle Aufreinigung von hochqualitativer DNA oder RNA für den Einsatz in den unterschiedlichsten Anwendungen und Methoden. Möglich wird das durch die schnellen und anwenderfreundlichen Protokolle sowie die optimierten Puffer und Säulchen-Designs. Sie können sich daher ganz entspannt auf nachfolgende Experimente konzentrieren, die Ihre Forschung weiter vorantreiben.

Alle Monarch Kits stehen auch für Nachhaltigkeit: das dünnwandige Säulen- und Flaschen-

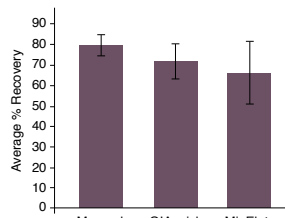
Design ermöglicht den Einsatz von deutlich weniger Kunststoff. Die Verpackung ist aus recyceltem Material und wiederverwendbar.

Mit Monarch erhalten Sie somit schnelle, zuverlässige und leistungsstarke Aufreinigung bei größtmöglicher Nachhaltigkeit.

Übrigens: Sie können bei Bedarf jeden Puffer, Säule oder andere Komponenten auch separat nachbestellen!

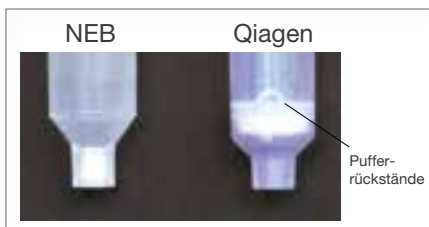


Mit dem **Monarch DNA Gel Extraction Kit #T1020** erhalten Sie höher konzentrierte DNA für nachfolgende Applikationen

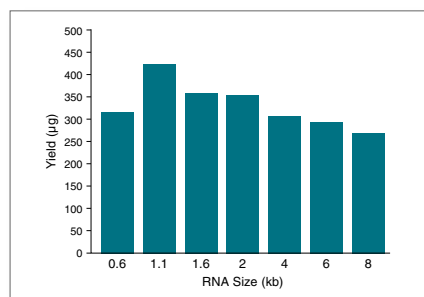


	Monarch	QIAquick®	MinElute®
A _{260/280}	1.9+/-0.08	1.9+/-0.08	1.9+/-0.04
Yield (µg)	0.80+/-0.05	0.72+/-0.09	0.66+/-0.13
Conc. (ng/µl)	144.9+/-9.6	25.7+/-3.1	73.8+/-14.2

Optimierte Monarch DNA Säulchen



Mit dem **Monarch RNA Cleanup Kit (500 µg) #T2050** reinigen Sie große Mengen (>250 µg) RNA auf (z.B. nach IVT)



Das Monarch **Total RNA Miniprep Kit (#T2010)** ist bereits validiert auf folgenden Proben:

- HeLa Cells
- HEK 293 Cells
- NIH 3T3 Cells
- Human Blood
- Rat Blood
- BMC's
- Rat Liver
- Rat Spleen
- Rat Kidney
- Rat Brain
- Rat Muscle
- Mouse Muscle
- Mouse Heart
- Mouse Kidney
- *S. cerevisiae*
- *E. coli*
- *B. cereus*
- Corn Leaf
- Tomato Leaf
- Plasma
- Serum
- Saliva
- Buccal Cells
- *D. Melanogaster*
- Zebrafish larvae
- Nucleated Blood

Weitere Informationen zu Probemengen, RIN und Protokollen finden Sie unter neb.com/T2010.

Ihre Vorteile:

DNA Kits

(T1010, T1020, T1030)

- Erhältlich für Plasmid Miniprep, Gel-Extraktion und PCR-Cleanup
- Optimiertes Säulchendesign verhindert Pufferrückstände
- Schnellere, einfachere Protokolle für exzellente DNA Qualität
- Hochkonzentrierte DNA dank Elution kleinen Volumina (ab 6 µl)

Ihre Vorteile:

RNA MiniPrep Kit

(T2010)

- Ein „universelles“ Kit für Gesamt-RNA Präparationen aus „allen“ Zellen, Gewebe, Blut, Pflanzen, Bakterien
- Kit inkl. Proteinase K, gDNA-Säulchen/ DNaseI, RNA-Protection Reagent
- Aufreinigung aller RNAs (inkl. small RNAs <200 nt) mit hoher Qualität (RIN > 8)
- Elutionsvolumen 30 bis 100 µl

Ihre Vorteile:

RNA Cleanup Kits

(T2030, T2040, T2050)

- Schnelle Protokolle für hochreine RNA in Minuten
- Elution bereits ab 6 µl (NEB #T2030) bzw. 20 µl (NEB #T2040)
- Bindet bis zu 500 µl RNA (NEB #T2050)
- Optional: Protokoll zur Aufreinigung von small RNAs (Cutoff > 15 nt) verfügbar

Jetzt bestellen:

PRODUKT	ART. NR.	GRÖSSE	PREIS
Monarch Plasmid Miniprep Kit	T1010S/L	50 / 250 preps	64 €* / 276 €*
Monarch DNA Gel Extraction Kit	T1020S/L	50 / 250 preps	75 €* / 338 €*
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5µg)	T1030S/L	50 / 250 preps	75 €* / 338 €*
Monarch Total RNA Miniprep Kit	T2010S	50 preps	248 €
Monarch RNA Cleanup Kit (10 µg)	T2030S/L	10/100 preps	52/284 €
Monarch RNA Cleanup Kit (50 µg)	T2040S/L	10/100 preps	50 / 280 €
Monarch RNA Cleanup Kit (500 µg)	T2050S/L	10/100 preps	58/440 €

*Die Monarch DNA Kits bieten wir Ihnen zum Dauerniedrigpreis an, der nicht weiter rabattiert werden kann.



Bestellen Sie noch heute Ihr kostenfreies Testmuster unter: www.neb-online.de/monarch

Jetzt NEB Seedballs gratis mit Ihrer Bestellung! Siehe S. 3



Kompetente *E. coli*-Zellen – Günstiger als selbstgemacht! Optimale Zellen für Ihre Klonierungen

Die eigene Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen ist besonders zeit- und materialaufwendig und zudem mit großen Qualitätsschwankungen behaftet.

Als Alternative mit Erfolgsgarantie bietet Ihnen NEB eine große Auswahl an „ready-to-use“ kompetenten *E. coli*-Zellen zu besonders fairen Preisen.

Neben den beliebten NEB 5-alpha und NEB 10-beta Klonierungsstämmen ist auch der schnell wachsende NEB Turbo besonders attraktiv.

Wenn Sie nicht sicher sind, welcher Stamm für Sie der Beste ist, dann testen Sie doch einfach unseren Cloning Sampler (bestehend aus je zwei Tubes mit NEB 5-alpha, 10-beta, Stable und Turbo-Stämmen).



	NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2987)	NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2984)	NEB 5-alpha F' / ⁺ Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2992)	NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (NEB #C3019)	NEB Stable Competent <i>E. coli</i> (NEB #C3040)
EIGENSCHAFTEN					
vielseitig	•				•
schnelles Wachstum (< 8 h)		•			
Klonierung von toxischen ORF		•	•		•
große Plasmide/BAC cloning				•	•
Klonierung retroviraler/Lentiviraler Vektoren etc.					•
endA ⁻	•	•	•	•	•
RecA ⁻	•		•	•	•
FORMATE					
chemisch kompetent	•	•	•	•	•
elektrokompetent	•	•		•	
Subklonierung	•				
96-well, 384-well oder 12x8-tube strips Formate	•				

Ihre Vorteile:

- Exzellente Transformationseffizienz (1-3 × 10⁹ cfu/μg)
- Kompatibel mit NEBuilder HiFi DNA Assembly, Golden Gate Assembly sowie traditionellen Klonierungen
- Frei von tierischem Material
- T1 Phage Resistenz (fhuA2)
- Inkl. Medium und Kontrollplasmid
- Großmengen in kundenspezifischen Sonderabpackungen verfügbar

Jetzt bestellen:

Cloning Competent *E. coli* Sampler zum Einführungspreis – bis 15.06.2019

PRODUKT	ART. NR.	MENGE	PREIS
Cloning Competent <i>E. coli</i> Sampler	C1010S	8 tubes	77 €
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	C2987I/H	6 x 0,2 ml / 20 x 0,05 ml	153 € / 197 €
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (Multiwell-Format)	C2987P/U/R	96-well (20 μl) / 96-well (50 μl) / 384-well	493 € / 742 € / 1096 €
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (subcloning efficiency)	C2988J	6 x 0,4 ml	71 €
NEB 5-alpha Electrocompetent <i>E. coli</i>	C2989K	6 x 0,1 ml	184 €
NEB 5-alpha F' I ⁺ Competent <i>E. coli</i>	C2992I/H	6 x 0,2 ml / 20 x 0,05 ml	154 € / 197 €
NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (Für schnellstes Wachstum)	C2984I/H	6 x 0,2 ml / 20 x 0,05 ml	198 € / 261 €
NEB Turbo Electrocompetent <i>E. coli</i>	C2986K	6 x 0,1 ml	244 €
NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (Für große Plasmide)	C3019I/H	6 x 0,2 ml / 20 x 0,05 ml	179 € / 231 €
NEB 10-beta Electrocompetent <i>E. coli</i>	C3020K	6 x 0,1 ml	214 €
NEB Stable Competent <i>E. coli</i> (Für lentivirale/repetitive DNA)	C3040I/H	6 x 0,2 ml / 20 x 0,05 ml	245 € / 318 €

Unsere Nähe – Ihr Vorteil:

Dank NEBs europäischem Zentrallager in Frankfurt/Main senden wir Ihnen auch Ihre kompetenten Zellen im schnellen 24h Service* – ohne Trockeneis- oder Gefahrgutzuschläge!

*bei Bestelleingang Mo.-Do. bis 16:00 Uhr.

**SONDER-
PREIS**

Einführungspreis bis zum 15.06.2019.
– Kein Promocode notwendig –

Jetzt NEB Seedballs
gratis mit Ihrer
Bestellung!
Siehe S. 3



Kompetente Zellen für Expression und Sonderanwendungen finden Sie unter:  www.neb-online.de/compcells

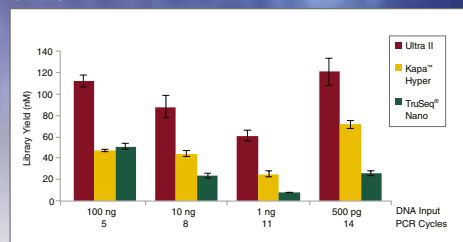
NEBNext Ultra II: Besser und einfacher können Sie keine NGS Library erstellen

„Mit weniger Ausgangsmaterial jetzt noch schneller bessere Resultate erzielen!“

So kann man die Vorteile der NEBNext Ultra II DNA und RNA Library Prep Kits für Illumina zusammenfassen. Denn mit optimierten Reagenzien, speziell formulierten Puffern und verbesserten Arbeitsabläufen setzt NEB den Maßstab im Bereich NGS Library Preparation.

Erhalten Sie mit geringem Input-Material oder reduzierter Anzahl an notwendigen PCR-Zyklen komplexe Libraries.

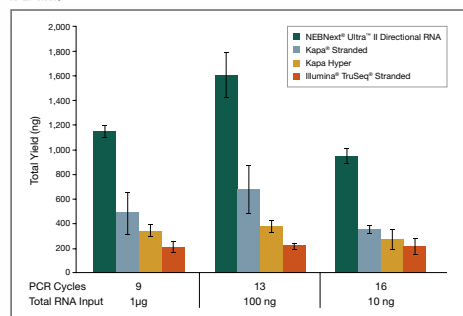
DNA:



Mit dem NEBNext Ultra II DNA Kit (#E7645) erhalten Sie auch bei geringsten DNA-Input-Mengen und PCR-Zyklen die höchsten Library-Ausbeuten mit geringsten Duplikatraten.

Alle Produktdetails unter www.neb.com/E7645

RNA:



Das NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (#E7760) ist den Mitbewerbern in Ausbeute, Coverage und geringen Duplikatraten deutlich überlegen. Hier abgebildet sind die Ausbeuten der Library-Prep im Bezug zur RNA-Menge und PCR-Zykluszahl.

Alle Produktdetails unter www.neb.com/E7760

Wir bieten Ihnen die NEBNext Ultra II Kits mit und ohne SPRIselect Cleanup Beads sowie die DNA Kits mit und ohne Fragmentierungssystem (FS) an. Ebenfalls ist ein SingleCell/Low Input Kit für geringste RNA Input-Mengen erhältlich. NEBNext Ultra II Kits sind bereits für diverse Roboter-Plattformen automatisiert.

Kurzum:

Es gibt keine bessere und einfachere Art besonders gute NGS-Libraries zu erstellen.

Kontaktieren Sie uns gerne für ein kostenfreies Testmuster!

Ihr Vorteil

- Maximale Ausbeuten, beste Coverage und niedrige Duplikatraten
- Geringe Input-Mengen ausreichend:
 - RNA Single Cell/Low Input: ab 2 pg - 200 ng
 - RNA Workflow: 10 ng-1 µg
 - DNA Workflow: 100 pg-1 µg
- Verbesserte Protokolle mit weniger Pipettierschritten für verkürzte Arbeitszeiten: (DNA ca. 1:40 h; RNA <5:30 h)

Eine vollständige Produktübersicht inkl. technischer Details und kostenfreie Testmuster finden Sie unter:

www.neb-online.de/ultra2

Jetzt NEB Seedballs gratis mit Ihrer Bestellung! Siehe S. 3



Der neue NEB Catalog & Technical Reference 2019/20 kommt!

Einige Kunden nennen ihn auch „die Bibel der Molekularbiologie“ – Freuen Sie sich auf die Neuauflage des kostenfreien NEB Katalogs 2019/20:

- Finden Sie auf 400 Seiten das optimale Produkt für Ihr Experiment
- Ca. 100 Seiten technische Tipps und Tricks für Ihre tägliche Laborarbeit
- Das Nachschlagewerk der modernen Molekularbiologie
- Jederzeit lesbar, auch ohne Strom oder Internetverbindung ☺
- CO₂-klimaneutral produziert auf nachhaltigem FSC-Papier
- Versand ab Mitte Mai 2019



Helfen Sie uns beim umweltfreundlichen Versand – Ist Ihre dienstliche Postanschrift noch aktuell?

Wir versenden nach bestem Wissen und Gewissen einen Katalog pro Labor bzw. Arbeitsgruppe. Für Ihre kostenfreie persönliche Ausgabe gehen Sie auf Nummer sicher und bestellen Ihr Exemplar vor – teilen Sie uns dazu bitte auch eventuelle Änderungen Ihrer Dienstanschrift mit.

Gerne nehmen wir Bestellungen für mehrere Ausgaben z.B. für Studentenkurse, Ausbildung und Lehre entgegen.

Wenn Sie hingegen unsere digitalen Angebote wie Website und eNews etc. bevorzugen, dann melden Sie sich gerne auch vom Katalogmailing ab.

So helfen Sie uns dabei, unnötige Katalogsendungen zu vermeiden!

Nutzen Sie dazu: www.neb-online.de/Katalog oder die beigelegte Fax-Antwort



New England Biolabs GmbH
Brüningstr. 50, Geb B852
D-65926 Frankfurt am Main

Telefon: +49 (0) 69/305-23 14-0
Telefax: +49 (0) 69/305-23 14-9
E-Mail: info.de@neb.com

Hotline: Deutschland: 0800/246 5227

Österreich: 00800/246 522 77

www.neb-online.de



Impressum:

NEB Aktuell erscheint dreimal im Jahr. Sollten Sie Anregungen oder Fragen haben, die in der nächsten Ausgabe erscheinen könnten, kontaktieren Sie bitte die Marketing & Sales Abteilung von NEB.

Bei Irrtümern oder Druckfehlern keine Haftung. Sonderpreise sind nicht weiter rabattierbar. Alle Aktionen dieses Heftes sind nur gültig bei Angabe des jeweiligen Promo-Codes bei Bestelleingang und bis zum 30.06.2019, sofern nicht anderweitig gekennzeichnet. Die vollständigen Bedingungen für alle Aktionen finden Sie unter www.neb-online.de. Es gelten die allgemeinen Geschäftsbedingungen der New England Biolabs GmbH. Alle Preise freibleibend zzgl. der gesetzlichen MwSt.

Bei Bestelleingang werktags (Mo-Do) bis 16:00 Uhr erhalten Sie Ihre Ware am nächsten Tag! Bestellungen, die vor einem Wochenende/Feiertag eingehen, werden am kommenden Montag/Worktag versendet.