

2 Material

2.1 Stammlösungen und Puffer

10x Dephosphorylierungspuffer

0,5 M Tris-Cl pH 8,5; 50 mM MgCl₂

0,5 M IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)

5,96 g IPTG in 50 ml ddH₂O; steril filtriert

Lysispuffer

50 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA

10 mM MgSO₄

2,46 g MgSO₄ 7H₂O/l in ddH₂O; autoklaviert

3 M Na-Azetat

408,1 g/l NaCl in 800 ml ddH₂O; mit Eisessig auf pH 5,2 eingestellt; ad 1000 ml mit ddH₂O; steril filtriert

3 M Na-Azetat mit Dextranblau

3 M Na-Azetat pH 5,2; 12,5 mg/ml Dextranblau; steril filtriert

10% Na-Azid

10 g Na-Azid in 100 ml ddH₂O; steril filtriert

20% PEG

20 g Polyethylenglykol 8000 in 100 ml 2,5 M NaCl pH 8,0; steril filtriert

10x Restriktionsenzym-puffer H

500 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 M NaCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythritol

SM-Puffer

5,8 g NaCl; 2,0 g MgSO₄; 50 ml 1 M Tris-Cl pH 7,5; 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine; ad 1000 ml mit ddH₂O; autoklaviert

10x STE

1 M NaCl; 200 mM Tris-Cl pH 7,5; 100 mM EDTA, autoklaviert

10x Taq-Polymerase-Puffer

500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 100 mM Tris-Cl pH 9,0

TBS

20 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl

TBST

TBS + 0,05% (v/v) Tween 20

TE

10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA; autoklaviert

Tris-Cl pH 8,2

20 mM Tris-Cl pH 8,2

x-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactopyranosid)

40 mg/ml x-gal in DMF; steril filtriert

2.2 Lösungen und Puffer für die Agarosegelelektrophorese

5x TBE

54 g/l Tris Base; 27,5 g/l Borsäure; 20 ml/l 5 mM EDTA pH 8,0

50x TAE

2 M Tris Base; 57,1 ml/l Eisessig; 50 mM EDTA pH 8,5

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml in ddH₂O

6x Ladepuffer

30% Glycerol; 0,1% Orange G

2.3 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Alle Nährmedien werden auf einen pH von 7,0 eingestellt und vor Gebrauch 20 min. bei 120°C autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (Antibiotika, Glukose, Maltose, Vitamine) werden steril filtriert und erst nach dem Autoklavieren bei geeigneter Temperatur dem Medium zugegeben.

Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl

LB-Agar

LB-Flüssigmedium + 20 g/l Agar

LB-Top-Agar

LB-Flüssigmedium + 0,7% (w/v) Agarose

LB-Medium + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ (Flüssigmedium/Agar/Top-Agar)

Vor dem Autoklavieren 2 ml/l 10 mM MgSO₄ hinzugeben

Nach dem Autoklavieren (handwarm) mit 10 ml/l 20%iger Maltose versetzen

LB-Ampicillin-Agar

LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin

LB-Kanamycin-Agar

LB-Agar + 50 µg/ml Kanamycin

LB-Tetrazyklin-Agar

LB-Agar + 15 µg/ml Tetrazyklin

2 x YT-Flüssigmedium

16 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl

2 x YT-Ampicillin-Flüssigmedium

2 x YT-Flüssigmedium + 100 µg/ml Ampicillin

2 x YT-Ampicillin/Kanamycin-Flüssigmedium

2 x YT-Ampicillin Flüssigmedium + 25 µg/ml Kanamycin

2 x YT-Ampicillin-Agar

2 x YT-Ampicillin-Flüssigmedium + 20 g/l Agar

Minimalmedium

Zu 200 ml handwarmer, autoklavierter, 2%iger Agarose hinzugeben: 20 ml 10x M9-Salze;

200 µl 0,1 M CaCl₂; 400 µl 1 M MgSO₄; 2 ml 2%ige Glukose; 2 ml 1 M Thiamin

Hydrochlorid

Antibiotika-Stammlösungen**Ampicillin**

50 mg/ml in ddH₂O

Kanamycin

50 mg/ml in ddH₂O

Tetrazyklin5 mg/ml in ddH₂O**2.4 Bakterienstämme****E. coli XL1-Blue MRF'** (Stratagene, La Jolla, CA)

(Jerpseth et al., 1992)

Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F'proAB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]^cVerwendung: Wirtsstamm für λ -Phagen, alle Anwendungen (Titer, Blau-Weiß-Selektion, Amplifizierung, Screening mit Serum) außer Screening mit filamentösen scFv-tragenden Phagen**E. coli XL1-Blue MR** (Stratagene, La Jolla, CA)

(Jerpseth et al., 1992)

Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lacVerwendung: Wirtsstamm für λ -Phagen → Screening mit filamentösen scFv-tragenden Phagen, keine Ausbildung von F'-Pili, keine Blau-Weiß-Selektion**E. coli SOLR** (Stratagene, La Jolla, CA)

(Hay & Short, 1992)

Genotyp: E14⁻(McrA⁻), $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$, sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC::Tn5, (Kan^r), lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ^R , [F'proAB lac^qZ Δ M15]^c

Verwendung: Wirtsstamm für verpackte Phagmide nach Excision

E. coli TG-1 (Pharmacia & Upjohn, Peapack, NJ)

(Gibson, 1984)

Genotyp: K12 Δ (lac-pro), supE, thi, hsd5/F', traD36, proAB, lacI^q, lac Z Δ M15

Verwendung: Wirtsstamm für filamentöse scFv exprimierende M13 Phagen

2.5 Bakteriophagen**Lambda ZAP® II** (Stratagene, La Jolla, CA)

(Short et al., 1988)

Phagen-Expressionsvektor mit einer Kapazität von bis zu 10 kb und 6 Klonierungsstellen innerhalb des lacZ-Gens. Der Vektor eignet sich für die Erstellung von cDNA-Expressionsbanken und das Screening mit Antikörpern oder Nukleinsäureproben. Eine Excision des pBluescript-Plasmids samt Insert ist möglich.

ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage (Stratagene, La Jolla, CA)

(Hay & Short, 1992)

Helferphage mit Mutationen in den Genen I und II. Er wird für Excisionen des pBluescript-Plasmids aus λ -ZAP® II-Bibliotheken verwendet.

Konzentration $\sim 1 \times 10^{10}$ pfu/ml

M13K07 Helper Phage (Pharmacia, Peapack, NJ)

(Vieira & Messing, 1987)

Helferphagen mit defektem Replikationsursprung, eingesetzt für die Gewinnung von filamentösen, Fusionsprotein-tragenden Phagen.

Konzentration $\sim 5 \times 10^{11}$ pfu/ml

2.6 Zelllinien

BT-474

(Lasfargues et al., 1978)

Humane Mammakarzinom-Zelllinie, etabliert aus einem invasiven, duktalem Karzinom einer 60-jährigen Patientin.

8701-BC

(Minafra et al., 1989)

Humane Mammakarzinom-Zelllinie, etabliert aus einem invasiven, duktalem Karzinom einer 72-jährigen Patientin mit extensiver Lymphknoteninfiltration.

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. Minafra, Institut für Histologie und Embryologie, Universität Palermo, Italien)

184 A1

Humane Brustepithel-Zelllinie

2.7 DNA-/RNA-Produkte

100 Base-Pair ladder (Pharmacia, Peapack, NJ)

1 μ g/ μ l; 20 Banden von 100 bp bis 2000 bp; 800 bp-Bande ergibt im Gel ein zweifach stärkeres Signal

DNA-Quantification Standards Phage λ DNA (Life Technologies, Rockville, MD)

DNA-Standards von 15 ng, 31 ng, 63 ng, 125 ng, 250 ng, 500 ng in je 6 μ l

Salmon Sperm DNA (Stratagene, La Jolla, CA)

Molekulargewicht 300-2000 bp; Konzentration 10 mg/ml

GenePool™ cDNA -Human Normal Breast (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
-Human Breast Tumor

cDNA aus DNase- behandelter Gesamt-RNA; Konzentration 1-6 ng/μl; Volumen 40 μl

Human Mammary Gland Poly A⁺ RNA (Clontech, Palo Alto, CA)

RNA aus Brustdrüsen-Normalgewebe; Konzentration 1mg/ml

2.8 Primer

Die Primer wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Eurogentech (Seraing, Belgien) bezogen. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

T3 (Stratagene, La Jolla, CA)

5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3' 20-mer

T7 (Stratagene, La Jolla, CA)

5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' 22-mer

Mitofilin For

5' TCCAGATCACCATGCTCAATGC 3' 22-mer

Mitofilin Back

5' GTAGATGAAGCTGCCGATGC 3' 20-mer

Rheb 400 For

5' CCAAGATTCTGCCAAAGCTTCCCTTC 3' 27-mer

Rheb 400 Back

5' GATCGCGATCCTGGGCTACCGGTCTG 3' 26-mer

CD30 For-EcoR I

5' CCGCCGGAATTCCGCAGCTGCCTTCCCCGTGGAGGAGAGAGC 3' 42-mer

CD30 Back-Not I

5' ATAAGAATGCGGCCGCTATGCGCGTCCTCCTCGCCGCGCTGGGACTG 3'
47-mer

2.9 Enzyme

Enzym	Konzentration	Firma
EcoR I	10U/ μ l	Roche Diagnostics, Mannheim
Not I	10U/ μ l	Roche Diagnostics, Mannheim
Xho I	10U/ μ l	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq Polymerase	5U/ μ l	Pharmacia, Peapack, NJ
Uracil DNA Glycosylase	1U/ μ l	Roche Diagnostics, Mannheim
Shrimp Alkalische Phosphatase	1U/ μ l	Roche Diagnostics, Mannheim

2.10 Antikörper

Kaninchen anti-Maus IgG Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Monoklonaler Brückenantikörper für APAAP; 3,5 mg/ml

Maus anti-Alkalische Phosphatase Hybridomüberstand

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Hämatologischen Labor der Medizinischen Klinik I der Universität zu Köln. Der Überstand wird mit 50 mg/100 ml Alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen) versetzt.

Maus anti-M13 Antikörper (Pharmacia, Peapack, NJ)

Monoklonaler Antikörper gegen das M13-Phagen-Oberflächenprotein gp 8, aufgereinigt aus Maus-Aszites; 1mg/ml

Schaf anti-M13 Antikörper (Pharmacia, Peapack, NJ)

Polyklonaler Antikörper gegen das M13-Phagen-Oberflächenprotein gp 8, aufgereinigt aus Schaf-Serum; 1 mg/ml

Ki-4 (Roche Diagnostics, Mannheim)

Muriner, monoklonaler, rekombinant hergestellter Antikörper mit Spezifität für das CD30-Antigen; 1mg/ml

Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Ziege anti-Maus (Fab')₂-Fragment (dianova, Hamburg)

0,6 mg/ml

TaqStart™ Anti-Taq Antikörper (Clontech, Palo Alto, CA)

Antikörper gegen Taq-DNA-Polymerase, der das Enzym bis zum ersten Denaturierungsschritt der PCR inhibiert.; 1,1 mg/ml

2.11 Kit-Systeme

RNeasy Mini (Qiagen, Hilden)

Isolierung von Gesamt-RNA

QIA Prep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

Isolierung von Plasmid-DNA

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder enzymatischen Reaktionen (bis 10 kb)

QIAEX II DNA Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder enzymatischen Reaktionen (bis 50 kb)

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied

Biosystems, Foster City, CA)

DNA-Sequenzierung

ProSTAR™ HF Single Tube RT-PCR System (High Fidelity) (Stratagene, La Jolla, CA)

Amplifizierung von Gensequenzen aus RNA

LightCycler™-DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim)

Quantifizierung der Genexpression mittels PCR

ZAP®-cDNA/Gigapack Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA)

Bestehend aus: Uni-ZAP® XR Vector Kit

ZAP®-cDNA Synthesis Kit

Gigapack® III Gold Packaging Extract

Erstellung von cDNA-Expressionsbanken

Lambda ZAP® II Undigested Vector Kit (Stratagene, La Jolla, CA)

Klonierung bestimmter DNA-Sequenzen in λ -Phagen