

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Stämme

Für die Proteinexpression wurde der Vektor pZPARS-T7-32-NST-BT verwendet (Originalvektor pPICZa von Invitrogen, modifiziert durch Angelika Lueking) (Lueking *et al.*, 2002). Die Proteinexpression der klonierten Gene erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (rubidium-competent) (Invitrogen). Aufgrund der reduzierten Transformationseffizienz des BL21-Stammes von 10^7 - $10^8/\mu\text{g}$ DNA wurden in dieser Arbeit zum Klonieren die *E. coli* Stämme SCS1 (Stratagene) oder XL1-Blue verwendet, aufgrund ihrer guten Transformationseffizienz von $10^9/\mu\text{g}$ DNA.

2.1.2. Klonierung, Expression und Antikörperentwicklung aus differentiell exprimierten Genen

2.1.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion und DNA-Sequenzierung

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde ein DNA-Abschnitt mit einer thermostabilen Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, amplifiziert.

Die PCR beginnt mit einem Denaturierungsschritt, der standardmäßig 4 min bei 94°C erfolgte. Anschließend wurden 24-30 Standardzyklen gefahren. Dabei wurde die DNA bei hohen Temperaturen denaturiert ($94^\circ\text{C} / 30 \text{ s}$), spezifische Oligonukleotide wurden bei bestimmter Temperatur hybridisiert ($60^\circ\text{C} / 30 \text{ s}$) und die Strangsynthese fand bei dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase statt ($72^\circ\text{C} / 1 \text{ min } 20\text{s}$).

Bei einem Reaktionsansatz von $50 \mu\text{l}$ wurden benötigt:

1 x PCR-Puffer

0,2 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

4-200 ng Template

0,2 μM Oligo 1

0,2 μM Oligo 2

2,5 u Taq-Polymerase

und mit aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt.

Die differentiell exprimierten Gene wurden aus einer cDNA (von humanen Herzbiopsien) mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler mit folgenden Schritten:

94 °C 4 min
28 x:

94 °C	30 sec
60 °C	30 sec
72 °C	2,5 min

72°C 10 min

Die verwendeten spezifischen 5'-Primer hatten an ihrem Ende eine SallI-Schnittstelle und an ihrem 3'-Ende eine NotI-Schnittstelle. Die PCR-Produkte wurden auf 0,8-1 %igen Agarosegelen analysiert.

Die Sequenzierungen erfolgten vom 5'-Ende mit dem Primer pQE65 und wurden von der Firma AGOWA GmbH durchgeführt. Der Sequenzabgleich gegen bekannte Gene erfolgte über das BLAST-Programm (Altschul *et al.*, 1997).

2.1.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde in horizontalen Agarose-Gelelektrophoresen aufgetrennt. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren ist eine Auftrennung im elektrischen Feld möglich. Die Auftrennung im Agarose-Gel erfolgte durch die Größenunterschiede der einzelnen DNA-Proben, wobei die Geschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe war. Die Konzentration der Agarose in den Gelen variierte zwischen 0,8-2 % (w/v), wobei sie abhängig war von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Beim Laufen der Gele wurden diese in einen 0,5 % TBE-Laufpuffer (10 x TBE-Puffer: 0,9 mM Tris-HCL pH 8,0, 0,9 mM Borsäure, 20 mM EDTA) gelegt, um Kathode und Anode miteinander zu verbinden und ein elektrisches Feld aufzubauen, sowie die Temperatur beim Laufen gering zu halten.

Um die DNA zu visualisieren, wurde den Gelen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml beigemischt, das in die DNA interkaliert und durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ¼ eines vierfachen Ladepuffers vermischt. Der Ladepuffer enthielt Bromphenolblau, um die Lauffront des Puffers, die etwa bei 400 bp lag zu visualisieren, sowie 15 % Ficoll, wodurch die Viskosität der Probe erhöht wurde, sodass sie nicht aus den Geltaschen diffundierte. Parallel zu den Proben wurden Marker-Lösungen mit DNA-Fragmenten bekannter Größe und Masse geladen. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, und die Laufzeit betrug 20-30 min. Fotografiert wurden die Gele bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm.

2.1.2.2.1. Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde ein Gelelutions-Kit (Qiaex II) von Qiagen nach Vorschrift verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurden die gewünschten Fragmente unter langwelligem Licht ($\lambda=366$ nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

2.1.2.3. Restriktion und Ligation

Die Inserts und der Expressionvektor pZPARS-T7-32-NST-BT (Lueking *et al.*, 2002), wurden mit SalI (300 U)- und NotI (150 U)-Restriktionsenzymen geschnitten bei 37°C für 1-5 Stunden (Vektor:Insert = 1:3). Zur Verknüpfung von cDNA und Vektor-DNA über die Schnittstellen SalI und NotI wurde das Enzym T4-Ligase eingesetzt. Die Ligase katalysierte dabei Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten freien 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen von linearer, doppelsträngiger DNA. Es wurden 150-300 ng Insert in einem 10 µl Ligationsansatz mit 50-100 ng geschnittenem, aufgereinigtem Vektor und aqua bidest. vermischt und 45 s bei 70°C erhitzt. Auf Eis erfolgte dann die Zugabe von 1 x T4 Ligase-Puffer und 200 U T4-Ligase. Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz, in dem nur Vektor mit Enzym und aqua bidest. gegeben wurde, um eine Religation des Vektors ausschließen zu können, bzw. den Vektorhintergrund zu verdeutlichen. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Darauf folgend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen eiskaltem 100 %igem Ethanol für 20 min bei -80°C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde am Ende in 10 µl aqua bidest. aufgenommen.

2.1.2.4. Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Es wurden 50 ml LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) mit einer Kolonie des *E. coli* Stammes SCS-1 angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 1,2 l SOB-Medium mit 1 % Vorkultur beimpft und bis $OD_{600} = 0,4 - 0,5$ bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann 30 min auf Eis unter regelmäßigem Schütteln stehen gelassen und anschließend bei 5000 rpm 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 200 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm. Die Pellets wurden jeweils in 100 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen, wobei zwei resuspendierte Pellets vereinigt wurden. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension der Pellets in eiskaltem Glycerin, Überführung in 50 ml Greiner-Röhrchen, Auffüllen mit Glycerin auf 50 ml und Zentrifugation bei 4000 rpm (Beckmann J6-HC). Der Überstand wurde nun vorsichtig abgossen und die Pellets in der zurückfließenden Flüssigkeit resuspendiert und in vorgekühlte (auf Trockeneis) 0,5 ml Eppendorfgefäße als 65 µl Aliquots überführt, die dann in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Überprüfung der Kompetenz der Zellen wurde eine Transformation mit einem Kontrollplasmid (puc18) in einer definierten Konzentration (1 pg / Transformationsansatz) durchgeführt. Die Kompetenz sollte bei $10^8 - 10^{10}$ liegen.

2.1.2.5. Transformation

2.1.2.5.1. Elektroporation

Der Ligationsansatz wurde durch Elektroporation mit einem Gene Pulser (Bio-Rad) (siehe Herstellerprotokoll, wobei der Widerstand anstatt bei 400 Ω auf 200 Ω eingestellt worden ist) transformiert. Für die Elektroporation wurden 30 µl angetaute elektrokompetente SCS1-Zellen pro Transformation verwendet. Die Menge der eingesetzten DNA hing von der Konzentration ab, beispielsweise wurde bei der Transformation von Minipräp DNA 1 µl eingesetzt und von einem Ligationsansatz 5 µl. Die Reaktion erfolgte in einer vorgekühlten sterilen Elektroporationsküvette (gap 0,1 cm bei *E. coli*-Zellen). Der elektrische Puls erfolgte bei 1,67 kV, 25 µF und 200 Ω. Anschließend folgte die Regeneration der Zellen in 1 ml SOC-Medium bei 37°C im Schüttler für 1 h.

Die *E. coli* Transformanden wurden auf LB-Medium selektiert (0,5 % *yeast extract*, 1 % NaCl, 1 % Bactotrypton), das 2 % Glukose und 25 µg/ml Zeozin enthielt. Alle Transformanden wurden mittels PCR-Amplifizierung des spezifischen Inserts analysiert.

2.1.2.5.2. Hitzeschock

Die DNA wurde zu 50 µl chemisch-kompetenten Zellen des *E. coli* Stammes BL21(DE3)plysS, bzw. BL21Star(DE3)plysS (Invitrogen) zugegeben und 30 min auf Eis gehalten, um anschließend einen Hitzeschock 1 min bei 42°C durchzuführen. Anschließend wurde die Suspension mit 1 ml LB-Medium gemischt und zur Regeneration für mindestens 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für die Selektion und das Wachstum auf entsprechendes antibiotikahaltiges Medium ausplattiert (LB-Medium mit 2 % Glukose 25 µg/ml Zeozin und 34 µg/ml Chloramphenicol) und eine Kolonie in einer Übernachtskultur angezogen.

2.1.3. Proteinexpression in *Escherichia coli*

Eine 200 ml LB-Kultur, die 25 µg/ml Zeozin und 34 µg/ml Chloramphenicol enthielt, wurde mit einer 20 ml Übernachtskultur der vektorenhaltenden BL21(DE3)plysS (vgl. 2.1.2.5.2.) (gleiche Zusammensetzung, aber ohne 2 % Glukose) beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.0 auf dem Schüttler inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 1 mM IPTG (*Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid*) für 4-5 Stunden, anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt. Für die darauffolgende native Proteinaufarbeitung (vgl. 2.1.7.1.) wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2100 g für 5 min pelletiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

2.1.4. Proteinanalyse

2.1.4.1. Proteinisolierung aus Gewebe

Die einzelnen Gewebearten (Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Pankreas und Skelettmuskulatur) wurden aus einer Maus entnommen und das Gewebe in einem Verhältnis von 1 g Gewebe / 1,5 ml Puffer aufgenommen und mit einem Potter

homogenisiert. Danach wurde das Gemisch 30 min bei 16.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (Reagenz von Biorad).

2.1.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde erst eine Verdünnungsreihe eines Standards erstellt. Dazu wurde in einer Mikrotiter-Platte in der Vertiefung / *well* A2-A12 50 µl PBS vorgelegt. In A1 wurden anschließend 100 µl 2 % BSA-Lösung gegeben, die bis A12 durchgehend immer 1:2 verdünnt wurde. Danach wurden aus jedem dieser *wells* 5 µl, sowie von den zu bestimmenden Proben, die vorher 1:100 verdünnt wurden (weil eine hohe Konzentration zu erwarten war) und zusätzlich 5 µl PBS, das als Blindwert dienen sollte, in neue *wells* überführt. In diese *wells* wurde jeweils 25 µl Bio-Rad-Lösung A und 200 µl Bio-Rad-Lösung B zugegeben und 10 min inkubiert, bevor die optische Dichte am ELISA-Reader bei 595 nm bestimmt werden konnte. Die Meßwerte der Verdünnungsreihe des Standards wurden in einem Koordinatensystem über der jeweiligen Konzentration aufgetragen. Mittels der sich ergebenden Eichkurve wurde aus den Meßwerten der Proteinproben die zugehörige Konzentration bestimmt.

2.1.4.3. SDS-PAGE

Die aufgereinigten Proteine wurden auf 15 %ige, bzw. 12,5 %ige SDS-PAGEs aufgetragen und nach der Elektrophorese mittels Inkubation mit einer Coomassie-Färbelösung für mindestens 30 min und anschließender Entfärbung mit einem Ethanol (20%)-Essig (10%)-Gemisch sichtbar gemacht.

2.1.4.4. Western-Blot-Analyse

Für die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die Proteine eines SDS-PAGE elektrophoretisch mit einem Elektrobloetter (T77 SeminPhor, Pharmacia Biotech) auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Verwendet wurden hydrophobe PVDF-Membranen und eine halbtrockene Blotapparatur. Die für das Blotten verwendeten Filterpapiere und die Membran wurden in Gelgröße zugeschnitten. Auf drei Lagen in Blotpuffer getränktem Filterpapier lag die zuerst mit Ethanol und dann mit Wasser aktivierte und in Blotpuffer geschwenkte Membran. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und auf das Gel wiederum drei Lagen mit getränktem Filterpapier. Vor dem Anlegen des

Stroms wurden Luftblasen entfernt, um ein gleichmäßiges und vollständiges Übertragen der Banden zu gewährleisten. Die Menge des angelegten Stroms errechnet sich aus der Größe des Gels: $x \text{ mA} = \text{Gellänge} * \text{Gelbreite} * 0,8$. Der Blotvorgang erfolgte eine Stunde. Anschließend fand die Hybridisierung der Membran statt.

Vor der Hybridisierung mit Plasma oder Antikörpern wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit einer Blockierungslösung für 2 h (2 % BSA in TBS + 0,1 % Tween oder 3 % Milchpulver in TBS + 0,1 % Tween) abgesättigt.

Die Inkubation der Membran mit Plasma erfolgte über Nacht, wobei das Plasma 1:100 in Blockierungslösung verdünnt wurde. Die Antikörper wurden für die Inkubation, die 1 h erfolgte, ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt. Zwischen dem Wechseln der Lösungen wurde die Membran jeweils 2 x 20 min mit TBS (+ 0,1 % Tween) gewaschen. Die anschließende Detektion war abhängig vom konjugierten Antikörper. Bei Verwendung eines HRP-Antikörpers wurde mit dem NEN-Substrat (Chemielumineszenz) detektiert, bei Einsatz eines AP-konjugierten Antikörpers wurde mit Bcip/ NBT Alkaline Phosphatase Substrat detektiert, bei dem eine Farbreaktion nach Dephosphorylierung erfolgte.

2.1.5. Phage Display

Beim Phage Display wurde das Antikörpergen so in einen Bakteriophagen kloniert, dass es zusammen mit einem viruseigenen Protein (P3) in die apikale Hülle des Bakteriophagen eingebaut wurde (vgl. Abb. 7). Innerhalb des Bakteriophagen befand sich das Phagen genom als zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA).

Für die Vermehrung der Phagen wurden Bakterien (TG1) infiziert, wobei das Virus über F-Pili an *E. coli* F+-Zellen gebunden hat.

Nach Infektion der Zelle wurde die injizierte einzelsträngige DNA (ssDNA) in eine doppelsträngige Form (dsDNA) überführt und vermehrt. Phagenvektoren gehen später zur Produktion neuer ssDNA über, die in Partikel verpackt werden und die Zelle verlassen. Phagemid-Vektoren werden dagegen durch Superinfektion mit Helferphagen als ssDNA verpackt.

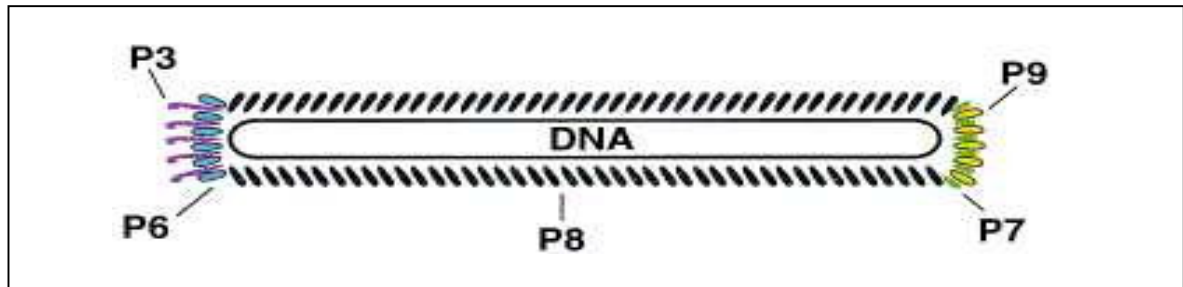


Abb. 7: Bakteriophage mit den wichtigsten Hüllproteinen P8 und P3.

Das P3, das aus fünf Kopien besteht, diente in dieser Arbeit dazu, die Antikörper auf der Oberfläche des Phagen zu präsentieren. (nach Sidhu, 2001).

2.1.5.1. Detaillierte Übersicht über den Ablauf des Phage Display

Übersicht zum Ablauf des Phage Display:

1. Spezifische Phagen einer Phagen-Bibliothek binden an ein Antigen, das an einer festen Oberfläche gekoppelt ist.
2. Nichthaftende Phagen werden gewaschen.
3. Gebundene Phagen werden losgelöst und Bakterien mit ihnen infiziert, um die Phagen zu vermehren.
4. Die Prozedur der Selektion wird 4-5 mal wiederholt (vgl. Abb. 5).

1.Tag

Eine auf 37 °C vorgewärmte 200 ml 2YT Kultur (1 % Glu, 100 µg/ml Amp) wurde mit einem Phagenglyzerinstock (enthielt Phagen in Bakterien) beimpft. Die Kultur wurde bis Erreichung der $OD_{600} = 0,4$ geschüttelt. 2 x 25 ml Kulturen wurden mit je 25 µl Helferphagen (KM13, Konz. $1,5 \times 10^{14}$, Endkonz. 2×10^{11}) infiziert, um die Phagen aus den Bakterien auszuschleusen. Um die Bakterien zu infizieren wurden sie 30 min bei 37°C, ohne zu schütteln, inkubiert.

Die Lösungen wurden bei 3300 g zentrifugiert, in 100 ml 2YT (100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Kan und 0,1 % Glu) resuspendiert und mindestens 16 h bei 30°C schüttelnd inkubiert.

Parallel dazu wurden pro Protein 120 µl Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) mit 2 x 1 ml PBST und 1 x 1 ml PBS gewaschen, anschließend mit jeweils 500 µl Biotin-getagtem Protein beladen und 1 h inkubiert (vgl. Abb. 8). Danach wurden die Proteine, die nicht gebunden hatten und sich im Überstand befanden zur möglichen Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die beladenen Beads wurden dann 1 h mit PTM (2 % Milch in PBS mit 1 % Tween20) geblockt, erneut gewaschen und im Ausgangsvolumen von 120 μ l PBS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Gleichzeitig mußte eine TG1-Kultur über Nacht herangezogen werden.

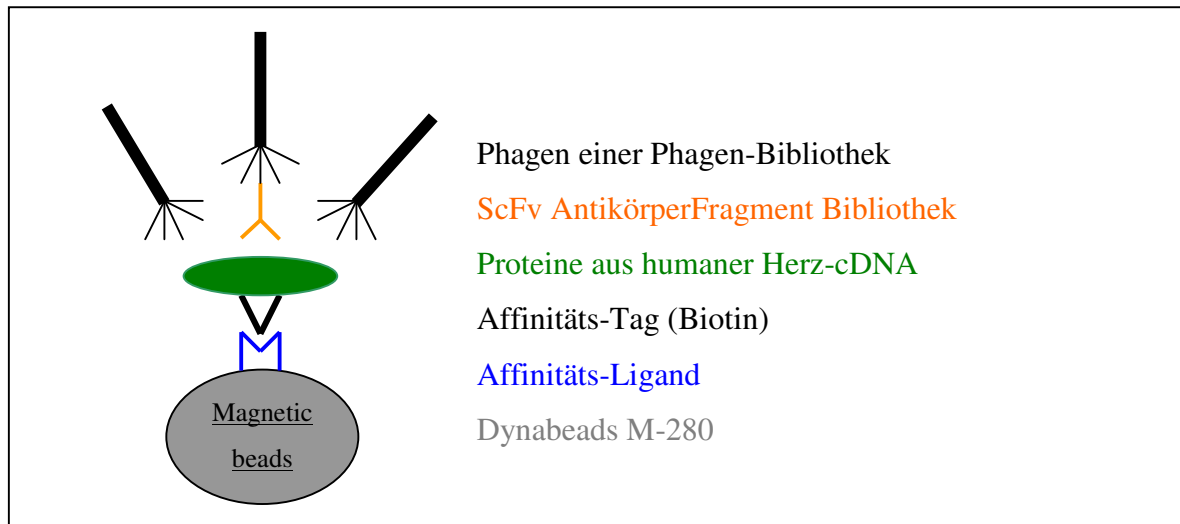


Abb. 8: Schematische Darstellung für eine Hochdurchsatz Selektionsstrategie.

Selektion einer Phage Display Bibliothek mit humanen scFv Antikörper-Fragmenten, die den Biotin-Tag der spezifischen Proteine der humanen Herz-cDNA erkennen.

2. Tag

Die Phagen, die über Nacht angezogen wurden, wurden 15 min bei 10800 g abzentrifugiert. Der Überstand (100 ml) wurde auf 4 Falcon-Röhrchen verteilt und jeweils 20 ml PEG/NaCl zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde erneut bei 10800 g abzentrifugiert für 30 min und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde wiederum für 10 min in einer Mikrozentrifuge bei 11600 g abzentrifugiert, um die bakteriellen Reste zu entfernen. Der Überstand wurde aufbewahrt und 2 ml 2 x PTM und 200 μ l gewaschene Beads zugegeben und 1 h für eine Präselektion auf dem Rotationsmischer inkubiert.

3. Tag

1. Antikörper-Selektion.

Auf einer Cliniplate wurden vorgelegt:

1. Reihe: 200 μ l geblockte Phagen, wobei vorher 10 μ l pro Protein für Phagentiterbestimmung abgenommen wurden.

2. Reihe: 180 μ l PBST

3. und 4. Reihe: 200 μ l PBST

In die 2. Reihe wurden 20 μ l beladene Beads zupipettiert. Die Cliniplate wurde in den Magnetroboter (GPP) gestellt, in dem das Waschen und die Inkubation der magnetischen Beads erfolgte (vgl. Abb. 9).

20 ml 2YT wurden mit 200 μ l TG1-ü/N-Kultur beimpft und bis zur OD_{600} von 0,2 - 0,4 inkubiert.

Nach der Selektion am Magnet-Roboter wurden jeweils 10 μ l Phagen abgenommen und auf eine, für die Bestimmung des Phagentiters vorbereitete, Cliniplate übertragen. Mittels Magnet-Roboter wurden die selektierten Phagen in eine frische TG1-Kultur überführt und danach 30 min bei 37°C ohne zu schütteln inkubiert. Da die Phagen über die Pili der Bakterien die Zellen und infizierten.

Im Anschluß wurden aus jedem *well* 100 μ l abgenommen und aufbewahrt. In jedes *well* wurden dann 80 μ l frisches Medium (2YT) zugegeben, sowie 20 μ l 10 x Amp/Glu und ü/N bei 37°C geschüttelt.

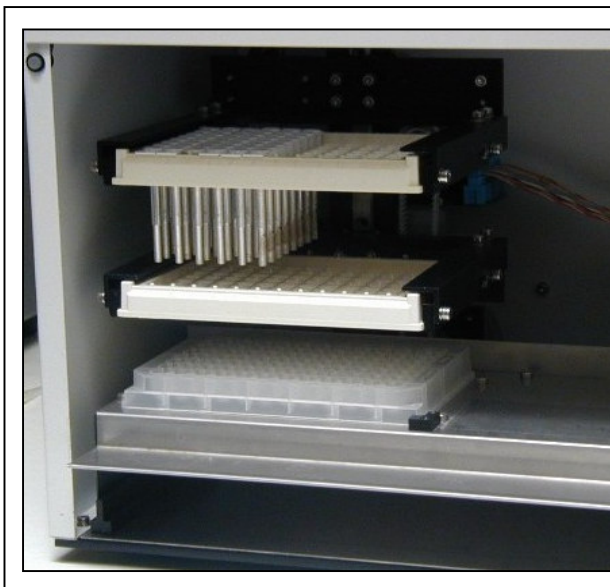


Abb. 9: Magnet-Roboter.

Anhand dieses Roboters wurden die magnetischen, mit Protein und entsprechenden Phagen beladenen, Beads aus den Mikrotiter-Platten genommen, um sie, beispielsweise zum Waschen, in neue Mikrotiter-Platten zu überführen.

2.1.5.1.1. Bestimmung des Phagentiters

Nach jeder Selektionsrunde und nach einer Phagenpräparation wurde der Titer der Phagen zur Kontrolle bestimmt. Dazu wurde auf einer Mikrotiterplatte 90 μ l PBST pro *well* vorgelegt und in die erste Reihe die Phagen pipettiert. Die Phagen mit den gebundenen

Proteinen wurden in jeweils 1:10 Verdünnungen bis 10^{-6} verdünnt und die Phagen-Bibliothek bis 10^{-11} , da die Diversität vor der Selektion deutlich höher war. In jedes *well* wurden 100 μ l der TG1-Kultur ($OD_{600} = 0,4$) zugegeben und 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Verdünnungen auf 2YT- (2 % Glu, 100 μ l/ml Amp) Platten aufgetropft (jeweils 10 μ l) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der erwartete Titer betrug 10^{13} Phagen/ml ($10^{11}/10 \mu$ l).

4. Tag

Eine Cliniplatte wurde mit 180 μ l 2YT, 1 % Glukose und 100 μ g/ml Ampicillin befüllt und mit 20 μ l aus der ü/N-Kultur beimpft. Der Rest wurde als Glycerolstock weggefroren.

Bei 37°C wurde bis $OD_{600} = 0,1$ inkubiert (ca. 45 min) und mit 10 μ l Helferphagen (Endkonz. 10^{10}) infiziert. Damit die Helferphagen die Bakterien infizieren konnten, wurde die Platte 30 min bei RT stehen gelassen. Die Kulturlösung wurde dann auf eine Mikrofilterplatte überführt und mittels einer Vakuumpumpe das Medium abgesaugt. Der Durchfluss konnte verworfen werden und die Pellets auf der Filterplatte wurden mit je 200 μ l 2YT (0,1 % Glukose, 100 μ g/ml Amp, 60 μ g/ml Kan) resuspendiert. Es folgte die Überführung der Kultur auf eine neue Cliniplatte, die über Nacht (mind. 16 h) bei 30°C und 1400 rpm geschüttelt wurde.

5.Tag

Beginn der 2. Selektionsrunde.

Die ü/N-Kultur wurde auf eine Mikrofilterplatte überführt und Vakuum filtriert. Die Phagen befanden sich im Durchfluss. 100 μ l dieser Phagen wurden auf eine neue Platte für die 2. Selektion überführt, 100 μ l 2 x PTM zum Blocken zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. (Nur nach der 1. Selektion wurden 10 μ l der Phagen für die spätere Titerbestimmung abgenommen).

Währenddessen wurde die Platte mit PBST (200 μ l bzw. 180 μ l) sowie beladenen Beads befüllt, wobei zu beachten war, dass diesmal ein zusätzlicher Waschschrift erfolgte.

Eine neue TG1 Kultur wurde aus der ü/N-Kultur (Lagerung bei 4°C für maximal 1 Woche) beimpft.

Die beladene Cliniplatte wurde in den Magnet-Roboter gestellt. Die weiteren Schritte entsprachen der 1. Selektionsrunde.

2.1.5.2. Polyklonaler ELISA

Beim polyklonalen ELISA wurden die Phagen aus allen Selektionsrunden getestet. Pro Selektion wurden 4 µl Beads benötigt, d.h. pro Protein 16 µl. Die Beads wurden mit Protein und PTM beladen, 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1 x PTM geblockt.

Die *wells* der MT-Platte wurden mit 200 µl PBST befüllt, zu dem jeweils 4 µl Protein bzw. PTM-beladene Beads zugegeben wurden. Die Affinitäts-/ Spezifitätskontrolle erfolgte über den Vergleich der Phagenbindung zwischen PTM- und Protein-Beads. Im Magnet-Roboter wurden die Phagen aus allen Selektionsrunden in die Platte mit den neubeladenen Beads übertragen.

Ob Phagen an die Proteine oder möglicherweise auch an das PTM gebunden haben, wurde mit dem Antikörper α -M13 nachgewiesen. Dazu wurde eine zusätzliche MT-Platte mit dem Antikörper vorbereitet. Der Antikörper wurde 1:5000 in 1 x PTM verdünnt. Zusätzlich wurden noch 3 Waschplatten benötigt, die pro Vertiefung 200 µl PBST enthielten, sowie eine Substratplatte.

Vorgang der Selektion:

Die beladenen Beads wurden in die Phagenplatte pipettiert und dort 30 min inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Dann erfolgte eine 30 minütige Inkubation in der α -M13-Platte, mit darauffolgenden 2 Waschschritten und 30 minütiger Inkubation im Substrat. Am ELISA-Reader wurde die OD bei 405 nm gemessen.

2.1.5.3. Monoklonaler ELISA

Die Phagemid tragenden Klone der 4. Selektion, die positiv im polyklonalen ELISA waren, wurden im Medium präinkubiert (2YT, 100 µg/ml Amp, 1 % Glu). Anschließend wurden Helferphagen zugegeben, um die defizienten Phagemide zu komplementieren und Phagenpartikel zu produzieren. Die so gewonnenen Phagenlösungen wurden bis 10^{-11} verdünnt, und eine TG1-Kultur infiziert (wobei jeder Phage eine Zelle infizieren sollte) und ausplattiert.

Es wurden pro Protein 48 Kolonien gepickt und daraus erneut Phagen produziert (siehe 2.1.5.1.). Eine Cliniplatte wurde mit Phagen befüllt und in einer weiteren Platte wurde in den *wells* auf der linken Hälfte proteinbeladene Beads und auf der rechten Hälfte PTM beladene Beads zugegeben. Zusätzlich wurden 3 Waschplatten, eine α -M13-Platte und eine Substratplatte verwendet. Die Inkubationen erfolgten wie beim polyklonalen ELISA.

2.1.5.4. Phagenpräparation

Für das Testen der Phagen auf den Proteinfiltren der hEX1-Bibliothek, wurden die Phagen präpariert, um einen höheren Titer zu erzielen.

Aus einem Glyzerinstock erfolgte die Anzucht monoklonaler Phagen in einer 20 ml Kultur (2YT, 2 % Glu, 100 μ g/ml Amp), die über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert wurde.

0,5 ml der ü/N-Kultur wurden in 50 ml überimpft und bei 37°C bis $OD_{600} = 0,4$ inkubiert (ca. 2 h). Die Kultur wurde auf zwei Falconröhrchen verteilt und mit Helferphagen (M13K07) infiziert, wobei die Endkonzentration 5×10^9 /ml betragen sollte. Die Inkubation erfolgte bei 30°C ohne zu schütteln. Die so freigesetzten Phagen wurden bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert und die Pellets danach in 100 ml 2YT, 100 μ g/ml Amp und 60 μ g/ml Kan resuspendiert. Die Kultur inkubierte über Nacht bei 30°C und 300 rpm.

Am folgenden Tag wurde eine Kolonie einer ausplattierten TG1-Kultur in 20 ml 2YT (ohne Zusätze) bei 37°C angeimpft für eine neue über-Nacht-Kultur.

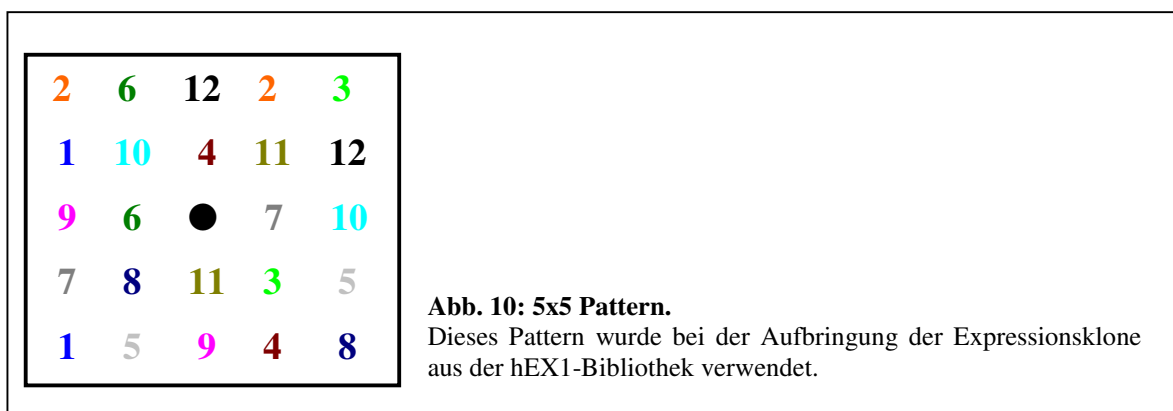
Die am Tag zuvor angezogene Phagenkultur (100 ml) wurde auf 4 Falconröhrchen aufgeteilt und bei 4000 rpm und 4°C, 30 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand behalten und das Pellet (in dem die Bakterienzellen sich befanden) verworfen. 1 Volumen 20 % PEG, 2,5 M NaCl wurde zu 4 Volumen Überstand gegeben und 1 h auf Eis gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 4000 rpm. Der Überstand sollte möglichst vollständig entfernt werden. Die Pellets wurden in jeweils 1 ml PBS aufgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Durch eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm wurden restliche Bakterien, die sich im Pellet befanden, entfernt. Zu 4 Volumen Überstand wurden wiederum jeweils 1 Volumen PEG-Lösung gegeben (250 μ l PEG pro Eppendorfgefäß) und zum Fällen für 20 min auf Eis gestellt.

0,5 ml der TG1-Übernachtkultur wurde in der Zwischenzeit in 50 ml 2YT überimpft und für 1 h 45 min bei 37°C hochwachsen gelassen.

Die Phagen wurden abzentrifugiert bei 14000 rpm 5 min, und in insgesamt 1 ml PBS resuspendiert. Um die letzten Bakterienreste zu entfernen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 14000 rpm für 5 min.

2.1.6. Proteinexpressions-Bibliothek

Die verwendete Proteinexpressions-Bibliothek ist aus humanem fötalen Gehirngewebe erstellt worden (Büssow *et al.*, 1998). Für die Klonierung der cDNA wurde der *E. coli*-Vektor pQE30NST benutzt. Die cDNA wurde mit einem oligo(dT) Primer synthetisiert. Die Reinigung kann mittels eines RGSHis₆-Tags erfolgen, den jedes Protein trägt. Diese selektierten Klone, die sich in 384er Mikrotiterplatten befinden (Plattenummerierung: 505-603), wurden vom Ressourcen Zentrum (RZPD) auf 23x23 cm große PVDF-Membranen gespottet und prozessiert. Insgesamt besteht die Bibliothek aus 37830 Expressionsklonen, wobei ein Filter maximal 27648 Klone enthält (72x384-*well* Mikrotiterplatten, die jeweils doppelt gespottet werden) und somit die gesamte Bibliothek aus zwei Filtern (Set 8 und 9) besteht. Auf dem Set 9 befinden sich demnach die Klone von den Mikrotiterplatten 577-627, wobei die Proteine sich ab Platte 604 wiederholen, sodass die Proteine auf dem Set 9 2,5 fach vorkommen. Auf jedem Filter sind 48x48 Quadrate mit 24 Klonen. Jede Mikrotiterplatte wurde zweimal auf die Filter gespottet, sodass jeder Klon in wenigstens zwei Positionen auf den Filtern zu finden ist. Die Klone sind doppelt in einem Block von 5x5 Klonen gespottet:



2.1.6.1. Screening von autoimmunem DCM-Plasma und Kontrollplasma

Für das Plasmascreening wurden 10 Patientenplasmen und 6 Kontrollplasmen auf Hochdichte-Proteinfiltern, die die hEX1-Bibliothek enthalten, untersucht. Die DCM-Verifizierung der Patientenplasmen, sowie ihrer Eluate aus der Immunadsorptionstherapie, erfolgte anhand von Rattenkardiomyozyten (vgl. 1.3.2.) am Universitätsklinikum Greifswald, um zu bestätigen, dass bei den Patienten eine autoimmune Form der Erkrankung vorliegt.

Durch die Verwendung einer cDNA aus einem frühen Entwicklungsstadium des humanen Gehirns wurde gewährleistet, dass ein erheblicher Teil an möglichen Proteinen oder Proteinstrukturen, die auf den Proteinfiltern exprimiert sind, von Autoantikörpern aus dem Plasma von DCM-Patienten erkannt werden können.

2.1.6.1.1. Behandlung der Filtermembranen der hEX1-Bibliothek

Die Proteinfilter wurden vom RZPD in getrocknetem Zustand geliefert, sodass die Membranen zur Reaktivierung zuerst in 100 % technischem Ethanol und dann in aqua bidest. gelegt werden mußten. Anschließend wurden sie in TBST-T überführt und die Kolonien mit einem Zellstoff-Tuch entfernt. Die Filter wurden 2 x 10 min in TBST-T gewaschen, dann kurz zweimal in TBS gelegt und schließlich für 2 h in 3 % Milchpulver/TBST geblockt.

Das Plasma wurde 1:20 in einer 2 % BSA/TBST-Lösung verdünnt und die Filter damit über Nacht inkubiert. Dazu wurde jeweils ein Set (Filter 8 und 9) in eine Folie eingeschweißt, um die Menge des Plasmas so gering wie möglich halten zu können. Am nächsten Tag wurden die Filter 3 x 30 min in TBST gewaschen. Der erste Antikörper (anti human IgG aus Maus, Sigma) wurde 1:5000 in 2 % BSA/TBST verdünnt und inkubierte für 1 h auf den Filtern. Anschließend erfolgten wieder Waschschrte von 3 x 30 min mit TBST. Der zweite Antikörper (anti Maus-AP konjugiert, aus Ziege) wurde ebenfalls 1:5000 verdünnt und 1 h auf den Filtern inkubiert. Es erfolgte erneutes Waschen mit TBST (2 x 30 min), anschließendes Schwenken für 30 min in TBS und danach in Attophospuffer für die gleiche Zeit, um die Filter an den veränderten pH-Wert anzupassen. Zur Detektion erfolgte eine Inkubation mit Attophos von 5-10 min, wobei das Attophos-Reagenz 1:80 in Attophospuffer verdünnt wurde. Nach Zugabe des Attophos Substrates wurden die Filter auf eine Plastikfolie gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt, um das Austrocknen der Filter

zu vermeiden. Anschließend wurden die Filter mit einer CCD-Kamera (FUJIFILM, LAS-100) aufgenommen. Die darauffolgende Auswertung der Signale erfolgte mit VisualGrid (GPC).

Als Kontrolle, und um Hintergrundsignale zu minimieren, wurde ein Filterset gleich, ohne vorherige Inkubation mit Plasma, mit dem ersten Antikörper anti human-IgG inkubiert und anschließend mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper. Die detektierten Klone flossen nicht in die weitere Analyse mit ein.

2.1.6.2. Rearray und Induktion von Klonen aus der hEX1-Bibliothek

Es wurden 228 Klone, die beim Plasmascreening in mindestens zwei Plasmen positiv waren, unabhängig, ob Patient oder Kontrolle, aus der hEX1-Bibliothek in eine 1,5 ml Flüssigkultur (LB-Medium, 1 x HMFM, 100 µg/µl Amp, 15 µg/µl Kan, 2 % Glu) überpickt.

Die Klone wuchsen über Nacht an und es wurden am folgenden Tag 100 µl abgenommen und in eine 900 µl SB-Kultur (1 x SB-Medium (stock 4fach) 1 x KPB-Puffer (stock 20fach), 100 µg/µl Amp, 15 µg/µl Kan, 20 µg/ml Thiamin) überführt. Nach 2 h Präinkubation wurde anschließend der OD-Wert am ELISA-Reader Soft Max Pro, bei einer Wellenlänge von 600 nm, ermittelt. Wenn die Kultur einen OD₆₀₀-Wert von 0,6 hatte, wurde mit 1mM IPTG, 4 h schüttelnd induziert. Vor der Aufreinigung der Proteine wurden die Kulturen bei minus 20°C aufbewahrt.

Zur Kontrolle wurden die Proteine auf ein SDS-PAGE aufgetragen (vgl. Abb. 21), wobei von jeder Probe 20 µl abgenommen und diese mit jeweils 8 µl Lämmli-Probenpuffer und 2 µl DTT für 5 min aufgekocht wurden, um die Proteine zu denaturieren.

Die am häufigsten auftretenden Proteine (vgl. Tab. 3 und 4) wurden mittels Western-Blot-Analyse auf eine PVDF-Membran transferiert und die Bindung der Proteine an das entsprechende Plasma nachgewiesen.

Die Detektion erfolgte mit denselben Antikörpern, die auch bei den großen Proteinfiltren verwendet wurden. Beim Substrat handelte es sich aber um BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrat (SIGMA FAST 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat/Nitro Blue Tetrazolium Tabletten), die in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst wurden.

Des Weiteren wurden die Proteine in 384-well-Mikrotiterplatten überführt, um sie auf beschichtete Glasobjektträger (Mikroarrays/Chips) zu spotten.

2.1.7. Proteinaufarbeitung

2.1.7.1. Native Proteinaufreinigung

Für eine native Aufreinigung der Proteine aus der hEX1-Bibliothek wurden diese in entsprechendem LB-Medium über Nacht angezogen und danach bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer und 0,1 mM PMSF resuspendiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Die Menge des eingesetzten Lysispuffers richtete sich nach der Größe der Kultur, bei einer 100 ml Kultur wurde ungefähr 1 ml Puffer zugegeben. Die Kultur wurde anschließend zum besseren Aufschluss der Zellen mit Ultraschall behandelt bis die Lösung nicht mehr viskos war. Das Lysat wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 20.000 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände der jeweiligen Proteine wurden in einem Röhrchen vereinigt und entsprechende Mengen an NiNTA-Agarose zugegeben. Bei einer 100 ml Kultur waren es 50-80 µl NiNTA. Die Inkubation erfolgte bei 4°C auf dem Rotierer. Anschließend wurde das Lysat zusammen mit dem NiNTA auf eine Säule, mit Zellstoff abgedichtet, gegeben. Es folgten 3 Durchgänge mit Waschpuffer (3 Volumen des Lysates) und anschließend die Elution, wobei mehrfach derselbe Elutionspuffer über die Säule gegeben wurde, um eine effektivere Ausbeute zu erhalten.

2.1.7.2. Denaturierende Proteinaufreinigung

Die eingefrorenen *E. coli* Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 150 µl Puffer A (pH 8.0) lysiert und durch Vortexen resuspendiert. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation. Die lysierten Zellen wurden 30 min bei 6200 rpm abzentrifugiert und der Überstand in Filterplatten überführt (Millipore Multiscreen MADVN6550) und der Durchfluss direkt in neue Filterplatten vakuumfiltriert. Pro *well* wurden 25 µl 50 % NiNTA-Agarose zugegeben, die vorher in Puffer A äquilibriert wurden. Die Platten wurden dann mit Folie geschlossen und 1 h auf den Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert. Danach wurde durch Filtration die Flüssigkeit entfernt und insgesamt dreimal mit 100 µl Puffer C (pH 6.3) gewaschen. Nach Zugabe des Puffers C wurden die Platten jeweils 5 min geschüttelt und anschließend der Puffer durch Filtration entfernt. Die gebundenen Proteine wurden schließlich mit 50 µl Puffer E (pH 4.5) 10 min inkubiert und dann in eine neue Mikrotiterplatte filtriert. Danach wurden die Proteine auf ein SDS-PAGE aufgetragen, bzw. auf eine PVDF-Membran übertragen.

2.1.8. Spotten der aufgereinigten hEX1-Proteine auf Glasobjektträger

Bei der Auswertung der großen PVDF-Membranen nach dem Plasmascreening mit Detektion durch IgG blieben 48 Proteine übrig, die vorwiegend (vgl. Tab. 3) in den Patientenplasmen auftraten. Bei den Versuchen mit dem IgG3-Antikörper waren es 32 Proteine. Diese Proteine wurden auf die FAST-Slides (Schleicher und Schüll), die eine Nitrozellulose-Oberfläche besitzen, doppelt auf je drei Feldern aufgebracht. Die Proteine wurden in einer 6 x 6 Anordnung gespottet (vgl. Abb. 11).

18	18	12	12	6	6
17	17	11	11	5	5
16	16	10	10	4	4
15	15	9	9	3	3
14	14	8	8	2	2
13	13	7	7	1	1

Abb. 11: 6x6 Pattern.
Das Pattern wurde bei der Aufbringung der Expressionsklone auf den Proteinmikroarrays verwendet.

Die Proteine wurden jeweils in folgenden Verdünnungsstufen auf FAST-Slides aufgebracht:

Versuch mit IgG-Antikörper:

Unverdünnt, 1:2, 1:5, 1:10

Versuch mit IgG3-Antikörper:

Unverdünnt, 1:2, 1:5

Zudem wurden zwei Standardwerte, in Form von IgG (1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:5000) und IgG3 (1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000) auf die Slides gespottet, sowie als Kontrolle der Puffer, in dem die Proteine gelöst waren und BSA (bovines Serum Albumin). Das Plasma wurde, im Gegensatz zu den großen Filtern 1:100 verdünnt eingesetzt, da die Empfindlichkeit der Slides wesentlich höher war als es bei den PVDF-Membranen der hEX1-Bibliothek der Fall gewesen ist.

2.1.8.1. Hybridisierung der Chips mit DCM-Patientenplasma und Kontrollplasma

Die Proteinmikroarrays, die aus den beiden Versuchen mit den großen Filtern entstanden waren, wurden mit Ausnahme des zweiten Antikörpers gleich behandelt:

Die Slides wurden nach dem Spotten in 3 % fötalem Kälber-Serum (FKS), verdünnt in PBS mit 0,1 % Tween für 2 Stunden geblockt. Das Plasma inkubierte auf den Slides über Nacht unter einem Deckgläschen und war dabei 1:100 in dem FKS-Blockierungspuffer verdünnt. Anschließend wurden die Mikroarrays in Blockierungspuffer 2 x 30 min gewaschen. Der erste Antikörper (anti-human IgG aus Maus, Sigma; bzw. anti-human IgG3 aus Maus, Sigma) wurde 1:5000, bzw. 1:400 in 3 % FKS verdünnt und für eine Stunde auf den Mikroarrays ebenfalls unter einem Deckgläschen inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift und anschließend die Zugabe vom 2. Antikörper anti-Maus-IgG, Cy-5 konjugiert aus Ziege, der 1:800 in 3 % FKS verdünnt wurde. Nach den sich anschließenden letzten beiden Waschvorgängen wurden die Mikroarrays kurz mit aqua bidest. gespült. Für das folgende Einscannen der Mikroarrays in den ScanArrayer mußten diese völlig getrocknet sein. Das Scannen erfolgte mit einer Auflösung von 10 µm. Die Auswertung der Mikroarrays erfolgte mit der Software GenePixPro4.1

2.2. Material

2.2.1. Geräte

- Kühl- und Tiefkühlschrank (-20°C); Bosch
- Zentrifugen:
 - Mini Spin plus 5810R; Eppendorf, Köln
 - Avanti J20; Beckmann
 - Avanti J25; Beckmann
 - Sigma Zentrifuge 4K15C; Sigma Laboratory Centrifuges
- Elektroporator (Gene Pulser II); Bio-Rad Laboratories, München
- Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvette, 0.2 cm); Bio-Rad Laboratories, München
- Tiefkühlschrank, -80°C; Forma, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach
- Gel-Dokumentation (Ethidiumbromid-Gele); Herolab GmbH, Wiesloch
- Inkubator BBD 6220; Heraeus Instruments
- Schüttelinkubator 37°C; New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
- Schüttelinkubator Tritramax; Heidolph
- PCR-Maschinen PTC100, 200, 225; MJ Research Inc., Watertown, USA
- Power Supply; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Q-Fill II-Maschine und Zubehör; Genetix, Christchurch, Dorset, UK
- Maschine zum Einbinden von Mikrotiterplattenblöcken; Tippy Pack (binding machine), Spot, Manfred Pütz GmbH, Kerpen
- Maschine zum Einschweißen von Mikrotiterplattenblöcken; Lady Pack (shrink wrap), Pactur Bologna, Italien
- Wasserbad; Köttermann
- Vakuumpumpe: Millipore
- Elektrophoresekammern; Eigenbau im Haus
- Schüttler für Filter; Rocky, Fröbel Labortechnik, Wasserburg
- Multiple Gel Caster for SDSpolyacrylamide Gels; Hoefer SE 215, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Vortex Genie 2-Mixer; Bender und Hohbein AG Zürich, Switzerland
- Spectrophotometer; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
- Blot-Apparatur, TransBlot SD transfer cell; BioRad Laboratories, München
- Laserscanner für Filter; Eigenbau im Haus
- Fuji Camera DDC LAS-1000, raytest; Photometrics, USA
- Laserscanner für Slides/ ScanArray 4000; Packard Bioscience, Meriden CT USA
- QArray: Spotting-Roboter für Slides; Genetix, Christchurch, Dorset, UK
- Magnetrührer; Stuart Scientific, UK
- Thermoblock Digi-Block; Vertrieb durch NeoLab, Heidelberg
- Präzisionswaage PB1501; Mettler Toledo, Schweiz
- Sealboy 320;
- Ultraschall-Desintegrator Sonifier W250; Branson

2.2.2. Chemikalien, Enzyme und Antikörper

2.2.2.1. Chemikalien:

- Agarose, Invitrogen, Groningen, Netherlands
- Ammoniumacetat, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Ammoniumpersulfate, BIO-RAD Laboratories GmbH, München
- Ampicillin-Na-Salz, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Attophos, JBL Scientific, San Luis Obispo, USA
- 29 % acrylamide, 0.8 % bisacrylamide Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Bacto Agar, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Bacto Tryptone, Difco Laboratories, Detroit, USA

- Bacto Yeast Extract, Difco Laboratories, Detroit, USA
- BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen
- Betain, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Bovine Serum Albumin Fraction V, PAA Laboratories GmbH, Linz Österreich
- Bromphenolblau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- BSA, NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
- Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce, Rockford Illinois USA
- Diethanolamin (DEA), Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Diethylpyrrolidinium-carbonate (DEPC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Nukleotide (dNTPs), Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, reiburg
- DTT, Serva, Heidelberg
- EDTA (Titriplex® III), Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Essigsäure, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Ethanol, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Ethidiumbromid (10mg/ml), Sigma, Deisenhofen
- Foetal bovine serum (FKS), Hitze inaktiviert, Gibco, Karlsruhe
- GeneRuler 1kb DNA ladder, ready-to-use, 0,1 mg/ ml, MBI Fermentas, St.Leon-Rot
- Glucose (D-+-Glucose Monohydrat), Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Glycerin, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Glycogen, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
- Guanidine Hydrochloride, Sigma, Deisenhofen
- HEPES, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Isopropanol, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Isoamylalkohol, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Kaliumchlorid, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Kanamycin-Sulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Kresol Rot, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Magnesiumchlorid, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- MOPS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Natriumacetat (tri-Na-Acetat-Dihydrat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Natriumchlorid, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Natriumcitrat (Tri-Sodiumcitrat-Dihydrat), Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Natriumhydroxid, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Rainbow markers RPN756, Amersham Life Science, Freiburg
- Salzsäure, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Sarcosyl (Sodium-N-Lauroylsarcosin-Na-Salz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Sigma Fast 5 Bromo-4-chloro-3-Indolyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Tablets (Bcip/ NBT Alkaline Phosphatase Substrate), Sigma, Deisenhofen
- SDS (Sodiumdodecylsulfat), Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- TEMED, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
- Tris Base, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Tris/HCl, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Triton X-100, Sigma, Deisenhofen
- Tryptone, Bacto, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- 2xYT Agar BIO 101, Vista, CA, USA
- 2xYT Broth BIO 101, Vista, CA, USA
- Urea, Merck, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Yeast extract, Difco Laboratories, Detroit, USA
- Zeozin, Invitrogen

2.2.2.2. Enzyme:

Taq DNA Polymerase, Herstellung im Haus

Taq DNA-Polymerase, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim

T4 DNA-Ligase NEB GmbH, Schwalbach/Taunus

EcoRI, *NotI*, *SalI* NEB GmbH, Schwalbach/Taunus

Sall: 5' ...G^AT C G A C... 3'

3' ...C A G C T^AG... 5'

NotI 5' ...G C^AG G C C G C... 3'

3' ...C G C C G G^AC G... 5'

EcoRI: 5' ...G^AA A T T C... 3'

3' ...C T T A A^G... 5'

2.2.2.3. Antikörper:

Anti human-IgG (1:5000) (aus Maus), Sigma

Anti human-IgG3 (1:400) (aus Maus), Sigma

Anti RGSHis₆ (1:2000) (aus Maus), Sigma

Anti Maus-AP (1:5000) (aus Ziege), Sigma

Anti Maus-AP (aus goat), Dianova/Jackson Immunoresearch

Anti-Maus-CY3 (1:800) (aus Ziege), Dianova/Jackson Immunoresearch 315-165-003

Anti-Maus-FITC (1:800) (aus Ziege), Sigma

Anti-M13 (1:5000) (aus Maus), Amersham

Streptavidin-HRP (1:2000), Roche

Anorganische Salze, Säuren, Basen und Alkohol waren *pro analysis quality* von Merck, Darmstadt. Alle Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden mit doppelt ionisiertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt.

2.2.3. Oligonukleotide

pQE65: 5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG-3'; Annealingtemperatur 65°C

pQE276: 5'-GGC AAC CGA GCG TTC TGA AC-3'; Annealingtemperatur 65°C

AOX-5': 5'-TTG CGA CTG GTT CCA ATT GAC AAG-3'

AOX-3': 5'-CAT CTC TCA GGC AAA TGG CAT TCT G-3'

Primer für die Amplifizierung aus der Herz-cDNA (alle Sequenzen von 5' nach 3'):

ACTS-3': TTTGCGGCCGCGATGGAGAGAGAAGGCAT

ACTS-5': AAAGTCGACCTGTGACGACGAGGAGAC

ATPMB-3': TTTGCGGCCGCGATGGTCTCCTTCAGGGGT

ATPMB-5': AAAGTCGACCGATGGTACAGAAGGCTTGG

CALR-3': TTTGCGGCCGCCATTTGTTTCTCTGCTGCCTT

CALR5': AAAGTCGACCCCGTGCCGCTGCTGCTC

CD81-3': TTTGCGGCCGCCAGAGCTGCGGGGCC

CD81-5': AAAGTCGACCGCCGCCATGGGAGTGGA

COX6C-3': TTTGCGGCCGCGAAGAAATCTTTATATTCCAAG

COX6C-5': AAAGTCGACCGCTCCCGAAGTTTTGCCAAA

CS1-3': TTTGCGGCCGCGACAATTTCTTTTCATAGGTCT

CS1-5': AAAGTCGACCATGCTATCACATAATACTATGA

CVHSP-3': TTTGCGGCCGCACTCAGATTTTGATCTCCG

CVHSP-5': AAAGTCGACCAGCCACAGAACCTCTTCC

COX5B-3': AAAGCGGCCGCGTGTCTCAGTGTGCCAGCT

COX5B-5': AAAGTCGACCCTTCGCGGAGCTGGAACG

FABP-3': TTTGCGGCCGCGCAGAGTAGTAGTCAGCAAC

FABP-5': AAAGTCGACCCTGGGCACCTGGAAGCTAG

GDI-1-3': TTTGCGGCCGCGGGCTGGGGGCGGCC

GDI-1-5': AAAGTCGACCGACGAGGAATACGATGTGA

KCRS-3': TTTGCGGCCGCTTACTTCTTTTAGTCCACG
 KCRS-5': AAAGTCGACCGCCAGTATCTTTTCTAAGTT
 LEP-3': TTTGCGGCCGCAAGAGTGACCTTCAAGGCCT
 LEP-5': AAAGTCGACCCATTGGGGAACCCTGTGCG
 MGP-3': TTTGCGGCCGCTCAGTCTCATTTGGCCCC
 MGP-5': AAAGTCGACCATGAAGAGCCTGATCCTTCTT
 MYL2-3': TTTGCGGCCGCGCAGCAGCGAGCCCC
 MYL2-5': AAAGTCGACCTTCAACAGACCCAAATCC
 NDUF3-3': TTTGCGGCCGCAAGAATACATCAGAAAAGGAAA
 NDUF3-5': AAAGTCGACCGCCATGAACATGGACATG
 PPLA-3': TTTGCGGCCGCCAGAACTTCAGAGAAGCATC
 PPLA-5': AAAGTCGACCGAGAAAGTCCAATACCTCAC
 PTGDS-3': TTTGCGGCCGCCAGCTTCAGCCCTGGGG
 PTGDS-5': AAAGTCGACCATGGCTACTCATCACACGCT
 REQ-3': AAAGCGGCCGCGGTGGCCACATCAAGAGGA
 REQ-5': AAAGTCACCGCGGCTGTGGTGGAGAAT
 SCL4A5-3': AAAGCGGCCGCACTGGCAAAAAATGGCGC
 SCL4A5-5': AAAGTCGACCGGGGCTTCCTTCCTCAAG
 SELEN BP1-3': AAAGCGGCCGCTCAGAGCTACAATCGCCC
 SELEN BP1-5': AAAGTCGACCATGGCTACGAAATGTGGGAA
 SMPX-3': TTTGCGGCCGCTACTACTGTTTCAGCTTTGGGG
 SMPX-5': AAAGTCGACCAATATGTCGAAACAGCCAGTTT
 VAMP2-3': TTTGCGGCCGCGAGGGCAGACTCCTCGGGG
 VAMP2-5': AAAGTCGACCCCGCCATGTCTGTCTACC
 ZNF9-3': TTTGCGGCCGCAATCAGAAAAGGAGGGGCG
 ZNF9-5': AAAGTCGACCAGCAGCAATGAGTGCTTCAA

2.2.4. Kits

- QIAEX II Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden
- QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden
- Plasmid Mini-, Midi-, Maxi Kit; Qiagen, Hilden
- NucleoSpin, Plasmid; Macherey-Nagel, Rapidozym, Berlin
- Dynabeads® mRNA Purification Kit; Dynal, Hamburg
- High Pure PCR Product Purification Kit; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim

2.2.5. Weitere Materialien

- 3MM Blottingpapier; Whatman GmbH, Göttingen
- Adhesive Sealing Sheets; ABgene, Hamburg
- Agarplatten, 22.4 x 22.4 cm; Genetix, Christchurch, Dorset, UK
- Falcon Tubes (50 ml, 15 ml) Greiner bio one, Frickenhausen
- Fast Slides; Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel
- Filterplatten, 96-well MADV N 65; Millipore GmbH, Eschborn
- Folien zum Auflegen der Filter
- Kryoröhrchen; Greiner bio-one, Frickenhausen
- Mehrkanal-Pipetten; Eppendorf, Hamburg
- Mikrotiterplatten, 384 well; Genetix, Christchurch, Dorset, UK
- Multiscreen-Filterplatten; Millipore GmbH, Eschborn
- Parafilm; Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA
- Petrischalen, Bio Assay Dish; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Pipetten (1000, 200, 20, 10, 2 µl); Gilson, Frankreich, Vertrieb durch Abimed Analysen Technik GmbH, Langenfeld
- Pipettier-Reservoir; Costar, Wiesbaden
- Plastik-Boxen für die Hybridisierung; Bio-Stat Diagnostics, Stockport, UK

- PVDF-Membranen, 22.2 x 22.2 cm Immobilon P; Millipore GmbH Eschborn
- Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml); Greiner bio-one, Frickenhausen
- Reaktionsgefäße, 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; Eppendorf, Hamburg
- Replikatoren (384 pin); Genetix, Christchurch, Dorset, UK
- Saranfolie; Dow Chemical Company
- Sterilfilter 0,2µm; Sarstedt, Nümbrecht

2.2.6. Software

GenePixPro4.1, Axon instruments, Inc. Union City, Californien
BioAnalyzer Software 2100 Agilent Technologies, Böblingen
Visual Grid®, Version 2.01 GPC Biotech AG, Martinsried
Visual Grid®, Version 3.4.1.921 GPC Biotech AG, Martinsried
Vector NTI 6; InforMax, Inc., Oxford, UK

2.2.7. Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools

BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Swiss-Prot <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/swissfetch?>

2.2.8. Puffer und Medien

Attosphosphor

1 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCL, pH 9.5

5 mM Attophoslösung (100 ml) (Substrat für Alkalische Phosphatase bei hEX1-Filtern)

2,4 M DEA Puffer
290 mg Attophos

2,4 M DEA Puffer, pH 9.5

126,2 g DEA (Diethanolamin)
0,0005 % einer 0,1 % Natriumazid-Lösung (NaN₃)
0,23 mM einer 1 M MgCl₂
pH mit 37 % HCl einstellen, autoklavieren

→ 5 mM Attophoslösung wird 1:80 in Attosphosphor verdünnt

1x PBS

0.137 M NaCl
0.0027 M KCl
0.012 M Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄
pH 7.5

TBS

10 mM Tris-HCl, pH7.5
150 mM NaCl

TBS-T

TBS
0,1 % (v/v) Tween 20

TBST-T

20 mM Tris-HCl, pH 7.4
0,5 M NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
0,5 % (v/v) Triton X-100

Blocking-Puffer

- a) 3 % Milchpulver in TBST lösen für Western-Blots
- b) 2 % BSA (bovines Serum Albumin) in TBST lösen für Western-Blots
- c) 3 % FKS (fötales Kälber Serum) in PBST lösen für Protein-Chips
- d) 1 x PTM (2 % Milchpulver, 1 % Tween20 in PBS) für Phage Display

Medium für Expressionsinduktion (für 1000 ml)

50 ml 20 x KPB-Puffer
250 ml 4 x SB-Medium
2 ml Ampicillin (50 mg/ml stock)
1 ml Thiamin (20 mg/ml stock)
500 µl Kanamycin (30 mg/ml stock)

20 x Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (KPB)

17 mM KH_2PO_4
72 mM K_2HPO_4

Lysispuffer A für denaturierende Proteinaufarbeitung

6 M Guanidin-HCl
0.1 M NaH_2PO_4
0.01 M Tris-Cl, pH 8.0

Waschpuffer C für denaturierende Proteinaufarbeitung

8 M Harnstoff
0.1 M NaH_2PO_4
0.01 M Tris-Cl, pH 6.3
pH mit NaOH einstellen

Elutionspuffer E für denaturierende Proteinaufarbeitung

8 M Harnstoff
0.1 M NaH_2PO_4
0.01 M Tris-Cl, pH 4.5

Lysispuffer für native Proteinaufarbeitung

50 mM Na-P Puffer pH 8,0
300 mM NaCl
10 mM Imidazol

Waschpuffer für native Proteinaufarbeitung

50 mM Na-P Puffer pH 8,0
300 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer für native Proteinaufarbeitung

50 mM Na-P Puffer pH 8,0
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

4 x SDS-Ladepuffer

0,2 M Tris-HCl pH 6,8
8 % SDS
40 % (w/v) Glycerol
0,4 % Bromophenol blue

0,1 M DTT oder β -Mercaptoethanol wurde separat zu den Proteinproben gegeben.

15 % SDS-Polyacrylamidgel

a) Trenngel

H₂O (17,2ml)
0,1% SDS
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8 (18,8ml)
29 % Acrylamid, 0,8% Bis; Endkonzentration 15 %
0,1 % APS
TEMED

b) Sammelgel

0,1 % SDS
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8
Acrylamid
0,1 % APS
TEMED

Coomassie blue-Färbelösung

1,25 g Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) werden in 225 ml technischem Ethanol gelöst. 225 ml destilliertes Wasser und 50 ml Eisessig werden zugegeben. Die Lösung wird 2 h gerührt und dann durch einen Faltenfilter (No. 595, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert.

Entfärber-Lösung für SDS-PAGE

20 % Ethanol
10 % Eisessig
Mit aqua bidest. auf 100 % auffüllen (bei 1 l wären es 700 ml)

Blotpuffer

20 mM Tris-Cl pH 8
20 % Methanol
150 mM Glycin

Puffer für Proteinisolierung aus Gewebe

50 mM HEPES pH 7,4
150 mM NaCl
10 % Glycerin
1 % NP-40
1 mM EGTA
20 mM NaF
1 mM DTT
frisch zugeben 1,5 mM MgCl₂

Proteininhibitoren, Endkonzentration im Homogenat:

2 mM PMSF
10 μ g/ml Leupeptin
12,5 μ g/ml Pepstatin
1 μ g/ml Aprotinin
50 μ g/ml Antipain

Substrat für Western-Blots

Horseradish peroxidase (HRP)

NEN: Western-Blot Chemiluminescence Reagent Plus

Die beiden Lösungen werden zu gleichen Teilen gemischt und ca. 0,125 ml pro cm² Membran inkubiert für 1 min.

Nach Auftragen auf die Membran erfolgt die oxidative Degradation des Luminols, woraus eine Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm resultiert.

Alkalische Phosphatase (AP)

BCIP/NBT: Sigma Fat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium

1 Tablette wird in 10 ml aqua bidest. aufgenommen.

20 x SSC

3 M NaCl

0,3 M Na₃-Citrat

pH 7,0

Bindesilan

1 ml Ethanol abs.

1 µl 96 % Essigsäure

3 µl Bindesilan

→ 100 µl auf einem Slide verteilen

Polyacrylamid (PAA)-Lösung (8 %)

160 µl 30 % PAA / 1 % Bis

435 µl aqua dest.

3 µl 10 % APS

1 µl TEMED

PCR für hEX1-Bibliothek

1 x PCR-Puffer

2,5 mM dNTPs

10 µM Primer pQE65

10 µM Primer pQE276

0,1 U Pfu/Taq-Polymerase (1:35)

→ Auffüllen mit sterilem aqua bidest. auf 50 µl.

10 x PCR-Puffer

0,5 M KCl

1 % Tween 20

15 mM MgCl₂

0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

steril filtrieren durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße

PCR-Programm für pQE-Primer

94°C	4 min	} 28 x
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	2,5 min	
72°C	10 min	

TBE-Puffer

90 mM Tris-Borate, pH 8,0

1 mM EDTA

Tris-Glycin-Laufpuffer (5x)

0,125 M Tris-Base

1,25 M Glycin

0,5 % SDS

Miniprep

Nach den Angaben des Herstellers QIAGEN

Resuspensionspuffer (P1), 4°C

50 mM Tris-Cl, pH 8.0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A

Lysispuffer (P2)

200 mM NaOH

1 % SDS

Neutralisationspuffer (P3)

3 M Kaliumacetat, pH 5.5

Equilibrationspuffer (QBT)

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

15 % Isopropanol

0,15 % Triton X-100

Waschpuffer (QC)

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

0,15 % Triton X-100

Elutionspuffer (QF)

1,25 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

0,15 % Triton X-100

TE

10 mM Tris-Cl, pH 8.0

1 mM EDTA

PEG/NaCl

20 % PEG 6000

2,5 M NaCl

Substrat für polyklonalen ELISA, Ansatz für eine 96er Mikrotiter-Platte

10 ml 50 mM Na₃Citrat

10 ml 50 mM Citric-Acid

1 ABTS-Tablette darin lösen

10 µl H₂O₂ zugeben

Hybridisierung der Mikroarrays

3 % fötales Kälberserum

1 x PBS

0,1 % Tween

40 % (w/v) Glukose

400 g D-+-Glukose Monohydrat werden in 1 l destilliertem H₂O gelöst und autoklaviert.

Nährmedien

LB (Luria-Bertani): 1 % Pepton, 0,5 % Yeast extract, 1 % NaCl, pH 7,2. Die Kultivierungen erfolgten bei 37°C auf Festmedium, unter Zusatz von 1,5 % Agar, bzw. in Flüssigkulturen. Für Gefrierkulturen wurden 1 ml einer Flüssigkultur mit Glycerin versetzt (Endkonz.: 25 % (v/v)) und bei -70°C aufbewahrt.

Zur Selektion, Isolation und Anzucht von Transformanten wurden dem Medium entsprechende Antibiotika zugegeben: Zeozin (25 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (15 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), IPTG (Isopropylthiogalaktosid, Endkonz.: 1 mM) (für Proteininduktion), 2 % Glukose (für Zellwachstum).

2YT-Agar

46 g 2 × YT-Broth Agar-Gemisch (16 g Tryptone, 10 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g Agar) wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C sterilisiert.

2YT-Flüssigmedium

31 g 2 × YT-Broth-Gemisch (16 g Tryptone, 10 g Yeast Extract, 5 g NaCl) wurden in destiliiertem Wasser gelöst und durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C sterilisiert. Glukose und Antibiotika wurden nach Autoklavieren zugegeben.

SOB

20 g/l Tryptone
5 g/l Yeast extract
10 mM NaCl
10 mM KCl
autoklaviert

SOC

20 g/l Tryptone
5 g/l Yeast extract
10 mM NaCl
10 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose
sterilfiltrierte 40 %ige Glukose nach Autoklavieren hinzugeben.

HMFM**Komponente A** (für 3.2 l)

MgSO₄ x 7 H₂O 3.6 g (4 mM)
Tri-Sodiumcitrat x 2 H₂O 18.0 g (15 mM)
(NH₄)SO₄ 36.0 g (68 mM)
Glycerol (100 %) 1760.0 g (36 %)
640 ml aliquotieren und autoklavieren

Komponente B (10x Salzlösung) (für 800 ml)

KH₂PO₄ 72 g (0,13 M)
K₂HPO₄ 188 g (0,27 M)
160 ml aliquotieren und autoklavieren
Komponenten A und B werden vor dem Einsatz gemischt.
(pH 7,0)

SB-Medium

12 g/l Bacto-Trypton
24 g/l Yeast Extrakt
0,4 % (v/v) Glyzerin

Eine 20 × Kaliumphosphat-Lösung (KPB) und eine 20/19 × Lösung der übriggebliebenen Zusätze wird separat autoklaviert und dann im Verhältnis 1:19 gemischt.

YPD-Medium (für Hefe)

1 % Yeast-Extrakt
1 % Bacto-Trypton
2 % Glucose, wird erst nach dem autoklavieren zugegeben.

Stämme

E. coli **XL1Blue**: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (tet)^r]
Stratagene, Amsterdam Zui doost, Netherlands

E. coli **SCS1**: *pSE111 hsdR17rK-mk + recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 supE44* Stratagene, Amsterdam Zui doost, Netherlands

E. coli **SCS1 pSE111** ist keine lac Mutante.

Vektor Resistenz/Eigenschaft Referenz

pQE30NST Amp^r (Büssow, K. *et al.*, 1998)

pZPARS-T7-32-NST-BT, Invitrogen, modifiziert durch Angelika Lueking (Lueking *et al.*, 2000; 2003)