



---

	MgSO <sub>4</sub> ; 10mM HEPES pH 7,6; 100U/ml Penicillin (GIBCO BRL); 100µg/ml Streptomycin (GIBCO BRL).
Blocklösung (Immunfluoreszenz)	10% (v/v) Serum (Ziege, SIGMA); 0,2% (w/v) BSA; 0,3% (w/v) Triton X-100.
10x DNA-Auftragspuffer:	0,5mg/ml Bromphenolblau; 0,5mg/ml Xylencyanol FF; 10mg/ml Ficoll (Type 400); 30% (w/v) Glycerol
Lysispuffer (Zellen): EGTA; (Immunpräzipitation) Glycerin; 1mM PMSF	120mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM 5mM DTT; 0,5% NP-40, 10 % 1x Complete (BOEHRINGER).
Lysispuffer (Oozyten):	5mM Pefabloc (BOEHRINGER); 1mM NaEDTA; 10µg/ml Leupeptin (SIGMA); 10µg/ml Pepstatin (SIGMA); 10µg/ml Aprotinin (SIGMA) in 1x PBS.
Methanol-Transferpuffer:	3,03g/l Tris/HCl; 14,4g/l Glycin, pH 8,3; 20% (v/v) Methanol.
ND96-Lösung:	96mM NaCl; 2mM KCl; 1,8mM CaCl <sub>2</sub> ; 1mM MgCl <sub>2</sub> ; 5mM HEPES, pH 7,4.
Northern- Hybridisierungslösung:	7% SDS; 10% PEG 6000; 1,5x SSPE; 0,12mg/ml Lachs-Sperma-DNA.
Northern-Waschlösung I:	2x SSC; 0,05% SDS.
Northern-Waschlösung II:	0,1x SSC; 0,1% SDS.
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 7,4mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;

1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

3x SDS-Probenpuffer: 150mM Tris/HCl, pH 6,8; 6% (w/v) SDS; 30% Glycerol; 0,3% (w/v) Bromphenolblau. Bei Proben, die unter reduzierenden Bedingungen behandelt wurden, wurde 5% (v/v) β-Mercaptoethanol zugefügt.

SDS-Transferpuffer: 25mM Tris/HCl, pH 8,4; 0,5mM DTT; 0,02% (w/v) SDS

SOC-Medium: 20g/l Bacto Pepton; 5g/l Bacto Hefeextrakt; 0,5g/l NaCl, 2,5mM KCl, pH 7,0 mit NaOH; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 20mM Glukose.

20x SSC: 3M NaCl; 0,3M Natriumcitrat pH 7,0.

20x TAE: 0,8M Tris; 0,2M NaAcetat; 20mM NaEDTA, pH mit Essigsäure ad 7,8.

10x TBS: 30g/l Tris-HCl; 90g/l NaCl; 2g/l KCl, pH 7,4.

TE-Puffer: 1mM NaEDTA; 10mM Tris-HCl, pH 8.

Western-Blocklösung: 5% Magermilchpulver; 0,1% (v/v) NP-40, 1xTBS.

Western-Waschlösung: 0,1% (v/v) NP-40, 1xTBS.

## 2.4 Bakterienkultur

### 2.4.1 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von DNA im prokaryontischen System wurden folgende Abkömmlinge des *Escherichia coli* Sicherheitsstammes K12 verwendet.

XL1-Blue:	<i>endA1</i> , <i>hsdR12</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac^-</i> , $F^-$ , <i>proAB</i> , <i>lac1<sup>q</sup></i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>tet<sup>r</sup></i> , <i>recA1</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987).
DH5α:	$F^-$ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$ , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , $\lambda^-$ , <i>hsdR12</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983).

### 2.4.2 Medien

LB-Medium:	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 10g/l NaCl; pH 7,2.
LB-Agar:	LB-Medium + 15g/l Agar
LB/Amp-Medium:	LB-Medium + 150μg/ml Ampicillin
LB/Amp-Agar:	LB-Agar + 150μg/ml Ampicillin

### 2.5 Plasmidvektoren

- PTLN: Dieser Vektor ist ein Abkömmling des Vektors pSP64T (Krieg *et al.*, 1984), der zur Expressionssteigerung die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des  $\beta$ -Globingens aus *Xenopus* enthält. Die Modifikationen bestehen aus einem veränderten Polylinkerbereich und weiteren Restriktionsstellen zur Linearisierung hinter dem 3'-untranslatierten Bereich (Lorenz *et al.*, 1996).
- PTLB: Hierbei handelt es sich um eine Variante von pTLN, bei der die Polylinkerregion die umgekehrte Orientierung hat.
- PCI-neo: Dieser Vektor der Firma PROMEGA (Madison, USA) wurde zur Expression in Säugerkulturzellen verwendet. Die klonierten Gene stehen unter der Kontrolle des CMV-Promotors und Enhancers.
- PFROG: Dieser eukaryontische Expressionsvektor ist ein Derivat des Vektors pCDNAIII der Firma INVITROGEN (NV Leek, Niederlande). Vor und nach dem Polylinkerbereich wurden die untranslatierten Regionen des  $\beta$ -Globingens aus *Xenopus* eingefügt. Desweiteren wurden Restriktionsstellen zur Linearisierung für die Herstellung von cRNA

