

III. Material und Methoden

1 Immunhistochemische Untersuchung

1.1 Gewebe für Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression von MUC2 und p53 wurde an Schnitten formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebe durchgeführt. Die Gewebeproben wurden von den pathologischen Instituten des Klinikum Benjamin Franklin Berlin, des Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin, der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf und der Universität Erlangen zur Verfügung gestellt.

Es wurden je zwanzig Gewebeschnitte von muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen der Brust, des Ovars, des Dickdarms und des Pankreas untersucht.

1.2 Histologische Typisierung der Gewebe

Die histologische Typisierung und Zuordnung der Karzinome zur muzinösen bzw. nichtmuzinösen Gruppe wurde nach der internationalen histologischen Klassifikation von Tumoren der WHO vorgenommen. Muzinöse Karzinome der Brust sind hiernach definiert als Tumore, die große Mengen an extrazellulärem epitheliale Muzin enthalten, sowohl makroskopisch sichtbar, als auch mikroskopisch intra- und extrazellulär¹³⁴. Tumore des Ovars wurden als muzinös definiert, wenn muzingefüllte Zellen einen herausragenden Anteil der epithelialen Komponente ausmachen¹³⁵.

Karzinome des Pankreas und des Kolon wurden nur in die Gruppe der muzinösen Karzinome aufgenommen, wenn mehr als die Hälfte des Tumorumfanges aus Muzin-„seen“ bestand. Dies entspricht der WHO-Definition von muzinösen Kolonkarzinomen¹³⁶. Mit Anwendung dieser Definition auf Pankreaskarzinome wurde eine Untergruppe der Pankreastumore selektiert mit einem besonders ausgeprägten muzinösen Phänotyp.

1.3 Tumorstadien und Differenzierung

Die nichtmuzinösen Brustkarzinome und muzinösen Ovarialkarzinome entsprachen dem Stadium pT1 bis pT3 nach der UICC-Klassifikation maligner Tumoren. Alle

übrigen Tumore waren vom Stadium pT1 bis pT4. Der Differenzierungsgrad (*grading*) der Tumoren reichte von I (hochdifferenziert) bis III (undifferenziert).

1.4 Immunhistochemische Färbung mit der ABC-Methode

Benachbarte 3µm Paraffinschnitte eines Tumors wurden jeweils mit einem anti-MUC2 und einem anti-p53 Antikörper gefärbt. Vor der Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit 0.6% H₂O₂ in Methanol für zehn Minuten blockiert. Zwischen jedem Arbeitsgang wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gespült.

Nach Inkubation mit dem primären und einem biotinkonjugierten zweiten Antikörper wurde für dreißig Minuten ein AB-Komplex, bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase, aufgetragen. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde 3,3-Diaminobenzidin als Substrat in 0.6% H₂O₂ für etwa zehn Sekunden appliziert. Nach einer Gegenfärbung in Hämatoxylin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließend Xylol dehydriert.

Als Kontrolle der unspezifischen Färbung dienten Schnitte, bei denen der erste Antikörper durch PBS ersetzt wurde. Ein Schnitt, von dem bekannt war, dass er ein starkes Signal liefert, wurde als Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Färbung bei jeder Färbereihe mitgeführt.

1.5 Färbung mit dem anti-MUC2 Antikörper 4F1

Der Antikörper 4F1 reagiert mit Epitopen der VNTR-Region des Proteingerüsts von MUC2¹³⁷.

Um die Zugänglichkeit des 4F1-Epitops zu erhöhen, wurden die Schnitte nach der o.g. Vorbereitung durch Inkubation in 1mM Natriumperjodat für drei Stunden bei Raumtemperatur deglykosyliert. Danach wurden sie dreißig Minuten bei Raumtemperatur mit 20% fetalem Kälberserum in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem 4F1-Antikörper erfolgte bei einer Endkonzentration von 10 µg/ml in PBS mit 5% Rinderserumalbumin für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser primäre Antikörper wurde detektiert mit einem biotinyliertem anti-Maus-IgM Antikörper aus der Ziege als zweitem Antikörper

in einer Endkonzentration 5,2 µg/ml in PBS mit 20% fetalem Kälberserum. Die weitere immunhistochemische Färbung erfolgte nach der ABC-Methode (Punkt 1.4)

1.6 Färbung mit dem anti-p53 Antikörper CM1

Vor der Inkubation mit dem CM1 Antikörper, einem polyklonalen Kaninchen IgG (Medac, Hamburg), wurden die Schnitte zehn Minuten bei 100°C im Wasserbad mit *Target Unmasking Fluid* (TUF, Dianova, Hamburg) behandelt, um die Zugänglichkeit des Antigens zu verbessern und unspezifische Hintergrundfärbung zu vermindern (Baas 1994). Unspezifische Bindungstellen wurden mit 20% Schweineserum in PBS für dreißig Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Schnitte mit dem CM1 Antikörper in einer Endkonzentration von 30 ng/ml in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde biotinylierter Schwein anti-Kaninchen-IgG Antikörper in einer Endkonzentration von 2,3 µg/ml verwendet. Die weitere immunhistochemische Färbung erfolgte nach der ABC-Methode (Punkt 1.4)

1.7 Auswertung der Immunhistochemie

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von mindestens zwei unabhängigen Beobachtern beurteilt. Nach der Anzahl gefärbter Zellen wurden die Schnitte in fünf Gruppen eingeteilt: 0, <25% , <50%, <75% und >75% gefärbte Zellen, entsprechend 0-5 Punkten. Die Intensität der Färbung wurde eingeteilt in 0 (keine Färbung), 1 (gelb), 2 (hellbraun) und 3 (dunkelbraun).

Die Auswertungsergebnisse wurden entsprechend den beiden Auswertungskriterien in ein Diagramm eingetragen in welchem drei Bereiche definiert wurden die starke, mittlere und schwache Färbung repräsentieren.

Für die statistische Auswertung nach dem Mann-Whithney U-Test wurde aus den Werten für Prozentzahl gefärbter Zellen (in der Skala von 1-5) und Intensität das Produkt gebildet.

2 Untersuchung von Humanseren

2.1 Herstellung von rekombinantem smuc41-Protein

Smuc41, ein 836 Basenpaare langes cDNA-Fragment welches für ein Peptid von 278 Aminosäureresten aus der zentralen repetitiven Region von MUC2 kodiert, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.R. Gum, wurde in zwei verschiedene Expressionsvektoren einkloniert⁶².

2.1.1 Das pQE Protein-Expressionssystem (Qiagen)

Das pQE-Expressionssystem besteht aus dem von E.Coli abgeleiteten Bakterienstamm M15, dem Repressorplasmid pREP4, der über ein lacI Gen verfügt und dem Expressionsvektor pQE 30. Dadurch, dass viele Kopien des pREP4-Plasmids pro Bakterie vorhanden sind, wird ein hoher Spiegel von lacI Gen kodierten lac Repressoren erreicht, und eine genaue Regulation der Proteinexpression gewährleistet. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt mit Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), welches den Repressor inaktiviert und dadurch den Promotor zugänglich macht. In dem Expressionsvektor pQE befindet sich vor der Klonierungsstelle, in die das zu exprimierende Plasmid eingefügt wird, eine Sequenz die für 6 Histidinreste kodiert. Über diesen Histidin-„Schwanz“, der sich zu Beginn des fertigen Peptides befindet, kann das Peptid an eine Nickelaffinitätssäule gebunden und aus Bakterienlysat gereinigt werden.

2.1.2 Herstellung einer Expressionskultur von M15(pREP4)pQE30/smuc41

Eine M15(pREP4)pQE30 Kolonie bzw. 50 μ l einer Bakterienvorkultur wurden in 10 ml LB-Kulturmedium mit Ampicillin (200 μ g/ml) und Kanamycin (25 μ g/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde in einen 1l-Erlenmeyerkolben mit 300 ml LB plus Antibiotika überführt. Diese 300 ml Kultur wurde bei 37°C etwa 3,5 h geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0.8-0.9. Nach der Induktion mit sterilfiltriertem 1mM IPTG wurde die Kultur weitere 3,5h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann 15 min bei 4°C und 4000x g abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde bei -20°C eingefroren. Bis zum Abzentrifugieren der Kultur wurde unter streng sterilen Bedingungen gearbeitet. Zum Lysieren wurde das Bakteriensediment in 2 ml Puffer B mit 8 M Harnstoff resuspendiert und 1 h bei 4°C geschüttelt. Das Bakterienlysat wurde 30 min bei 10 000x g zentrifugiert.

2.1.3 Reinigung von smuc41-Protein über Nickelaffinitätssäule

Der Überstand vom Bakterienlysat wurde mit 4 ml Ni-Agarose 1 h bei 4°C geschüttelt. Die Lysat-Ni-Agarose-Mischung wurde in eine Säule überführt und der Durchlauf aufgefangen. Die ungebundenen Proteine wurden mit 5 x 10 ml Puffer C plus 0.5% (v/v) Triton-X von der Säule gewaschen. Anschließend erfolgte einmal Waschen mit 10 ml Puffer C. Das gebundene Peptid wurde dann mit 6 ml Puffer C plus 100 mM EDTA eluiert und das Eluat in 12 Fraktionen à 500 µl aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 2 x 10 ml Puffer C gewaschen.

2.1.4 Das pET Protein-Expressionsystem (Novagen)

Das pET-Expressionssystem besteht aus BLR, einem E.Coli Stamm mit Chloramphenicolresistenz und dem Gen für T7 Polymerase, dem Bakteriophagen DE3, der ein IPTG-induzierbaren lacUV5 Promotor für das T7 RNA-Polymerasegen besitzt und dem Plasmid pLysS. Das Plasmid pLysS beinhaltet das T7-Lysozymgen und bewirkt eine Zellyse, wenn durch einen Einfrieren/Auftauen-Zyklus oder durch 0,1% Triton die innere Bakterienmembran zerstört wird. Sowohl der Phage DE3 als auch der Vektor pET24a besitzen ein lacI Gen, das über den lac Repressor die Expression der T7-Polymerase inhibiert. Erst durch Induktion mit IPTG kommt es zur Aktivierung des lacUV5 Promotors, Expression der T7-Polymerase und zur Transkription des Zielgens smuc41.

Im Anschluss an die Klonierungstelle weist der Vektor einen Bereich auf, der für eine Sequenz von elf Aminosäuren kodiert, das sogenannte *T7-tag*, sowie ein Kanamycinresistenzgen. Über das *T7-tag*, das sich am Ende des synthetisierten Proteins befindet, kann das Protein über eine Affinitätssäule gereinigt werden. Antikörper gegen die *T7-tag* Sequenz sind kovalent an ein Agarosegel gebunden das als Säulenmatrix dient. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgt bei einem pH von 2.2.

2.1.5 Herstellung einer Expressionskultur von BLR(DE3)pLysS pET24a+(smuc41)

Aus einer Glycerinkultur die bei -70°C gelagert wurde, wurde mit einer sterilen Öse in Luria broth base Kulturmedium (LB) mit Tetracyclin ($15\mu\text{g/ml}$), Chloramphenicol ($34\mu\text{g/ml}$) und Kanamycin ($30\mu\text{g/ml}$) überimpft. Diese Vorkultur wurde 12 h bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden $100\ \mu\text{l}$ in 10 ml LB mit Antibiotika (Konz. s.o.) überimpft und 12 h bei 37°C geschüttelt.

Diese 10 ml Bakterienkultur wurde in 300 ml LB mit Antibiotika in o.g. Konzentration in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben gegeben und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.6-0.7 wachsen gelassen. Nach Induktion mit 1 mM sterilfiltriertem IPTG wurde die Kultur weitere 2,5 h unter Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Kultur auf Eis gestellt und 10 min bei 4°C und $5000\ \times\ \text{g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 75 ml 50 mM Tris, 2 mM EDTA pH8 resuspendiert. Bis zu diesem Arbeitsschritt wurde unter streng sterilen Bedingungen gearbeitet.

Die Bakteriensuspension wurde erneut 10 min bei 4°C und $5000\ \times\ \text{g}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Sediment in 30 ml Waschpuffer in einem Glashomogenisator resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin dreimal für 10 s mit Ultraschall behandelt bis die Suspension nicht mehr viskös war. Bei dem Beschallen wurde streng darauf geachtet, dass sich die Probe nicht aufheizt.

Das Zellysate wurde dann 20 min bei $100\ 000\ \times\ \text{g}$ bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über die Immunitätssäule gereinigt.

2.1.6 Reinigung von smuc41 Protein über Immunitätssäule

Die Agarosesäule, der Zellysateüberstand und die Lösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht. Zum Äquilibrieren wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer gespült. Der Zellysateüberstand wurde auf die Säule gegeben und der Durchlauf bei 4°C verwahrt. Daraufhin wurde ungebundenes Protein mit 10 ml Waschpuffer von der Säule gewaschen. Die Waschlösung wurde ebenfalls bei 4°C verwahrt. Für die

Elution in fünf Fraktionen wurden fünf 1.5 ml-Reaktionsgefäße mit je 150 µl Neutralisationspuffer vorbereitet. Das gebundene smuc41-Protein wurde dann mit 5 ml Elutionspuffer eluiert und Fraktionen à 1 ml pro Reaktionsgefäß aufgefangen. Jede Fraktion wurde mit dem Neutralisationspuffer vermischt und auf Eis gestellt.

Die Säule wurde nach der Elution mit 10 ml Waschpuffer gewaschen anschließend mit Waschpuffer und 0.02% NaN₃ aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

Proben von nichtinduziertem sowie induziertem Zelllysatüberstand, vom Durchlauf, der Waschlösung und den fünf Eluatfraktionen wurden nach Zugabe von Probenpuffer und nach Proteindenaturierung für 5 min bei 100°C mit SDS-PAGE getrennt.

2.1.7 Herstellung von mit Bakterienlysate präadsorbiertem Serum

Es wurde Bakterienlysate von zweimal je einer 300 ml Expressionskultur von M15(pREP4)32.2 B hergestellt wie unter Punkt 2.1.2 beschrieben (S.21). Der Überstand des zentrifugierten Lysats wurde 36 h gegen dreimal 5 l PBS dialysiert. Dann wurden jeweils 30 µl Serum mit 570 µl PBS und 1700 µl dialysiertem Lysat in ein Greinerröhrchen pipettiert und 12 h bei 4°C geschüttelt. Daraufhin wurde das nun präadsorbierte Serum für 30 min bei 4°C mit 100000 g zentrifugiert. Der präadsorbierte Überstand wurde bei der Verdünnung 1:100 für Western Blot verwendet.

2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinproben nach dem Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE in vertikalen Gelapparaturen. Es wurden Acrylamidkonzentrationen von 10% (w/v) für das Trenngel und von 3% (w/v) für das Sammelgel gewählt. Die Polymerisation wurde jeweils durch Zugabe von Ammoniumpersulfat gestartet. Das Trenngel wurde zwischen zwei vertikale 10.2 x 7.3 cm große Glasplatten im Abstand von 0.2 cm bis zu einer Höhe von 6.5 cm gegossen und die Oberfläche des Trenngels mit 1x Trenngelpuffer überschichtet. Nach dreißigminütigem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Gelkammern mit Laufpuffer

gefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 150 V.

Sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen, und das Gel auf einer der beiden Glasplatten für 15 min in 4°C kalten Blotpuffer gelegt.

2.3 Western Blot

In einer Schale mit kaltem Blotpuffer wurde luftblasenfrei ein 9 x 6.5 cm großes Filterpapier auf einen Zelluloseschwamm gelegt. Auf das Filterpapier wurde das Gel gebracht und mit einer 9 x 6.5 cm großen, vorher vollständig in 70% Ethanol benetzten PVDF-Folie bedeckt. Auf die Folie wurden ein zweites, gleichgroßes Filterpapier und ein weiterer Schwamm gelegt.

Diese Anordnung wurde in eine Halterung eingespannt und vertikal in die mit kaltem Blotpuffer gefüllte Blotkammer gehängt, so dass das Gel zur Kathode ausgerichtet war und die PVDF-Folie zur Anode, damit die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Folie übertragen werden.

Die Blotkammer wurde unter Kühlung mit Eis für 2 h 15 min an einen Strom von 200 mA angeschlossen. Nach dem Blotvorgang wurde die PVDF-Folie in 5% (w/v) Magermilch in PBST bei Raumtemperatur für 1 h unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler blockiert. Danach wurde die Blotmembran kurz in PBST gespült.

Die Inkubation mit dem anti-MUC2 Antikörper 4F1 erfolgte in einer Endkonzentration von 10 µg/ml in PBST mit 3% (w/v) Rinderserumalbumin bei 4°C über Nacht.

Die Inkubation mit Seren von Tumorpatienten erfolgte in einer Verdünnung von 1: 20 in PBST bei 4°C über Nacht.

2.3.1 Blotentwicklung mit Alkalischer Phosphatase

Als zweiter Antikörper für 4F1 diente ein alkalische Phosphatase (AP)-konjugierter anti-Maus-IgG Antikörper aus der Ziege (DAKO), der in einer Endkonzentration von 1.2 mg/ml appliziert wurde. Für die Detektion der Humansenen wurde ein AP-konjugierter anti-Human-IgG Antikörper aus der Ziege verwendet in einer Endkonzentration von 0.6 mg/ml. Beide Antikörper wurden in PBST für 2 h bei RT appliziert. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurde die Blotmembran viermal für

je 10 min in reichlich PBST gewaschen. Der Blot wurde nach der Inkubation in den 2. Antikörpern für 2 min in der NBT/BCIP-Lösung entwickelt.

2.3.2 Blotentwicklung mit Peroxidase/Lumineszenz

Der 4F1-Antikörper wurde mit einem biotinylierten anti-Maus-IgM Antikörper aus der Ziege in einer Endkonzentration von 52 ng/ml in PBST für 2 h bei Raumtemperatur detektiert. Als zweiter Antikörper wurde der Blot für die Detektion der Humansenen mit biotinyliertem anti-human IgA,IgG,IgM Antikörper in PBST über 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit dem biotinylierten 2. Antikörper wurde die Membran für 1 h mit einem Extravidin-Peroxidase Konjugat bei RT inkubiert. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde die Membran 5 min in einer Lumineszenzlösung (Pierce) inkubiert und die Lumineszenz durch belichten eines Films für 30-60 s mit der Membran dokumentiert.

3 Chemikalien

Acrylamid	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin	Merck
Bisacrylamid	Sigma
5-Bromo-4Chloro-3-Indolylphosphat-Toluidin (BCIP)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chloramphenicol	Boehringer Mannheim GmbH
Corbit Balsam	Hecht-Mertens, I.
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Lumineszenzlösung	Pierce
Glycin	Merck
Iodoacetamid	Sigma
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Serva
Luria agar	Gibco
Luria broth base	Gibco
Magermilch	„Glücksklee“
Mayers Hämalaun	Merck
Methanol	Merck
Natrium-meta-perjodat	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Nitrobluetetrazolium (NBT)	Sigma
Perhydrol (30% Wasserstoffperoxid)	Merck
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Saccharose	Sigma
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tetracyclin	Boehringer Mannheim GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH
Xylol	Baker

4 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid (30%)	60 g Acrylamid 1.6 g Bisacrylamid aqua dest. ad 200 ml , filtrieren
Alkalische Phosphatase-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl 100 mM Tris-Cl pH 9.5
APS 10%	1g APS ad 10 ml aqua dest.
BCIP-Stocklösung	5% BCIP (w/v) in 100% DMF

Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8.3
Elutionspuffer 10x	1 M Zitronensäure pH 2.2
Laufpuffer	0.025 M Tris 0.192 M Glycin 0.1% SDS pH 8.3
NBT/BCIP-Entwicklungslösg.	66 µl NBT-Stock 33 µl BCIP-Stock ad 10 ml AP-Puffer 30 min haltbar
NBT-Stocklösung	5% (w/v) in 70% (v/v) DMF
Neutralisationspuffer 10x	2 M Tris Base
PBS (phosphate buffered saline)	8 g NaCl 0.2 g KCl 1.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g KH_2PO_4 aqua dest. ad 1l
PBST	PBS, 0.1% Tween
Probenpuffer 5x	5 g SDS 25 g Sucrose 0.6 g Tris 0.1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau ad 5 ml aqua dest., pH 6.8 erst unmittelbar vor Gebrauch 30 mg/ml DTT zugeben
Sammelgelpuffer 4x	6 g Tris 48 ml 1 M HCl ad 100 ml aqua dest., pH 6.8
SDS 1%	1 g SDS, ad 100 ml aqua dest.

Trenngelpuffer 5x	45.5 g	Tris
	60 ml	1 M HCl
	ad 100 ml aqua dest., pH 8.8, filtrieren	
Waschpuffer 10x	42.9 mM	Na ₂ HPO ₄
	14.7 mM	KH ₂ PO ₄
	27 mM	KCl
	1.37 M	NaCl
	2% (v/v)	Tween-20
	0.02% (w/v)	NaN ₃
	pH 7.3	

4 sonstige Materialien

Dialyseschläuche	Medicell International Ltd.
Filterpapier 3mm	Whatman
PVDF-Folie	Millipore
Röntgenfilm	FMAT plus DG
Sterilfilter	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen	Greiner

5 Geräte

Blotkammer	Biorad
Elektrophoresekammer	Biorad
Photometer	Pharmacia Biotech
Schüttler	Köttermann
Wasserbadschüttler	Gyrotory Model G76, New Brunswick Scientific
Zentrifugen	CH-J2, Beckman
	Centrikon T-2050, Kontron (Ultrazentrifuge)
	Varifuge RF, Heraeus