

2 Materialien und Chemikalien

2.1 Materialien und Geräte

Adhesive Sealing Sheets	ABgene, Hamburg
Agarplatten, 22.4 x 22.4 cm	Genetix, Christchurch, Dorset, UK
ABT PCR-Platten	ABgene, Hamburg
BioAnalyzer 2100 und RNA 6000 LabChip®	Agilent Technologies, Böblingen
CCD Kamera	Photometrics, USA
Elektroporator (Gene Pulser II)	Bio-Rad Laboratories, München
Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvette, 0.2 cm)	Bio-Rad Laboratories, München
Eraser, Image Eraser (für BAS)	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Eraser, Image Eraser (für PhosphorImager)	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Freezer, -80°C	Forma, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach
Falcon Tubes (50 ml, 15 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gel-Blotting-Papier GB004	Schleicher&Schüll GmbH, Dassel
Gel-Dokumentation (Ethidiumbromid-Gele)	Herolab GmbH, Wiesloch
Glasfaser-Filterplättchen, 2.5 cm	GF/C, Whatman GmbH, Göttingen
Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Microtiterplatten, 384 well	Genetix, Christchurch, Dorset, UK
Mehrkanal-Pipetten	Eppendorf, Köln
Nylon-Filter, 22.2 x 22.2 cm, Hybond-N ⁺ Transfer Membrane	Amersham Pharmacia Biotech Europe, GmbH, Freiburg
Plate Sealers	Bio-Stat Diagnostics, Stockport, UK
PCR-Maschinen PTC100, 200, 225	MJ Research Inc., Watertown, 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-Reservoirs	Costar, Wiesbaden
Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Q-Fill II-Maschine und Zubehör	Genetix, Christchurch, Dorset, UK
Replikatoren (384 pin)	Genetix, Christchurch, Dorset, UK

Rollerflaschen für die Hybridisierung	hergestellt am MPI
Saran-Folie	Dow Chemical, USA
Schüttel-Inkubator	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttler, Rocky	Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Scanner	
BAS-1800 (Fuji)	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
PhosphorImager 445 SI, Version 4.0	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Scintillator (Liquid Scintillation Counter)	(LKB Wallac); Perkin Elmer, Köln
Screens	
Image Plate BAS-IP MS 2325 (Fuji)	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Phosphor Storage Screen	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Spectrophotometer	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Sterilfiltrationsgefäße	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
UVette®	Eppendorf, Köln
Vacuum-Blotter, Modell 785	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Vortexer, Vortex Genie® 2	Scientific Industries, New York, USA
Whatman Papier (3MM Blotting Paper)	Whatman GmbH, Göttingen
Zellkulturflaschen (5ml, 250ml)	Cellstar, Greiner, Frickenhausen
Zentrifugen	
Mini Spin plus	Eppendorf, Köln
5810R	Eppendorf, Köln

2.1.1 Software

BASReader Version 2.13h	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
BioAnalyzer Software 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Easy Win32	Herolab GmbH, Wiesloch
Image Quant Tools, Version 2.00 build 030	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Scanner Control Software	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
(für PhosphorImager) Version 4.0 build 15	
TINA2.10g	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Visual Grid®, Version 2.01	GPC Biotech AG, Martinsried
Visual Grid®, Version 3.4.1.921	GPC Biotech AG, Martinsried
XDigitise	entwickelt am MPI

2.1.2 Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools

Multiple Alignment	http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html
BCM Searchlauncher	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
ExPASy Proteomics tools	http://au.expasy.org/tools/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Calculator	http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html
Swiss-Prot	http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/swissfetch?

2.1.3 Kits

cDNA Size Fractionation Columns	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Dynabeads [®] mRNA Purification Kit	Dynal, Hamburg
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Prime-It [®] II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam Zui doost, Netherlands
ProbeQuant [™] G-50 Micro Columns	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript [™] Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Oligotex [™] mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM [®] BigDye [™] Terminator	
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder [™]	Qiagen, Hilden

2.2 Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Ammoniumacetat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ampicillin-Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AttoPhos	JBL Scientific, San Luis Obispo, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Betain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
DEA	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Denhardt`s Solution	USB, Cleveland, Ohio, USA
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
EDTA (Titriplex® III)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucose (D-+-Glucose Monohydrat)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Glycerin	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Glycogen	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IPTG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Kaliumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	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
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Sarcosyl (Sodium-N-Lauroylsarcosin-Na-Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Tris Base	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Tris/HCl	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
TRIZol	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2xYT Agar	BIO 101, Vista, CA, USA
2xYT Broth	BIO 101, Vista, CA, USA
Yeast tRNA	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Wasserstoffperoxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

2.2.1 Nucleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim

2.2.2 radioaktive Nucleotide

$[\alpha^{33}\text{P}]$ dATP, $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP, $[\gamma^{33}\text{P}]$ dATP	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
--	---

2.3 Materialien und Chemikalien für die Zellkultur

Ampicillin / Streptomycin für Zellkultur (10.000 μM / 10.000 U/ml)	Biochrome AG, Berlin
FCS	Biochrome AG, Berlin
Humanserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Interleukin 2, human, rekombinant	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Pipetten für die Zellkultur	Nalge Nunc International
RPMI1640 mit Glutamax-1	Invitrogen, Groningen, Netherlands
Zellkulturflaschen CellStar	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.4 Enzyme / Restriktionsendonucleasen

AMV-RT	Invitrogen, Groningen, Netherlands
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
<i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>SalI</i>	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i> large fragment, Klenow)	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
Proteinase K	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
T4 DNA-Ligase	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
Polynucleotid Kinase	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus

2.5 Größenstandards

2.5.1 DNA-Größenstandards

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung linearer DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnittene λ -Phagen-DNA (*HindIII*, NEB GmbH, Schwalbach/Taunus), sowie synthetische Standards (Kb ladder, Stratagene, Amsterdam, Netherlands; Gene Ruler, MBI Fermentas, St. Leon-Rot; 100 bp ladder, NEB GmbH, Schwalbach/Taunus) verwendet.

Fragment	Größe (bp)				
	100 bp ladder (bp) (ng/0.5 μ g)	<i>HindIII</i> (bp)	Kb ladder (bp) (ng/0.5 μ g)	Gene Ruler (bp) (ng/0.5 μ g)	Φ X174/ <i>BsuRI</i> (bp) (ng/0.5 μ g)
1	1.517 (45)	23.130	12.000 (50)	3.000	1.353 (125.6)
2	1.200 (35)	9.416	10.000 (50)	2.000	1.078 (100)
3	1.000 (95)	6.557	9.000 (50)	1.500	872 (80.9)
4	900 (27)	4.361	8.000 (50)	1.200	603 (65)
5	800 (24)	2.322	7.000 (50)	1.031	310 (28.8)
6	700 (21)	2.027	6.000 (40)	900	281 (26.1)
7	600 (18)	564	5.000 (42)	800	271 (25.1)
8	500/517 (97)	125	4.000 (42)	700	234 (21.7)
9	400 (38)		3.000 (43)	600	194 (18)
10	300 (29)		2.000 (40)	500 (51)	118 (10.9)
11	200 (25)		1.500 (10)	400	72 (6.7)
12	100 (48)		1.000 (8)	300	
13			750 (8)	200	
14			500 (7)	100	
15			250 (10)		

Tab. 2-1 Verwendete Größenstandards und deren Fragmentgrößen

2.5.2 RNA-Größenstandard

Zur Größenbestimmung von im Gel aufgetrennter RNA wurde die RNA-Ladder (NEB GmbH, Schwalbach/Taunus) verwendet. Sie enthält ein Set aus 7 RNA-Molekülen, die per *in vitro*-Transkription von 7 linearen DNA-Templates hergestellt wurden. Die Größen der Fragmente betragen 9.000, 7.000, 5.000, 3.000, 2.000, 1.000 und 500 bp.

2.6 Nährmedien

2.6.1 flüssige Nährmedien

SOB (für Herstellung kompetenter Zellen) (1 l)

Bacto Tryptone	2	%	20	g
Bacto Yeast Extract	0.5	%	5	g
NaCl	10	mM	0.584	g
KCl	2.5	mM	0.186	g
MgCl ₂	10	mM	0.952	g
MgSO ₄	10	mM	2.46	g

autoklavieren

SOC (für Herstellung kompetenter Zellen)

SOB mit 20 mM Glucose

autoklavieren

2YT Broth (1 l)

Bacto Tryptone	16	g
Bacto Yeast Extract	10	g
NaCl	5	g
Agar	15	g

autoklavieren

2.6.2 feste Nährmedien

2YT Agar (1 l)

Bacto Tryptone	16	g
Bacto Yeast Extract	10	g
NaCl	5	g
Agar	15	g

autoklavieren

2.7 Stämme, Zell-Linien und Vektoren

2.7.1 Bakterien-Stämme

Stamm	Marker/Resistenz	Referenz
<i>E. coli</i> SCS1 pSE111	<i>hsdR17r_K⁻m_K⁺ recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 supE44</i>	Stratagene, Amsterdam Zui doost, Netherlands

Tab. 2-2 Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

E. coli SCS1 pSE111 ist keine lac Mutante.

2.7.2 Zell-Linien

	Jurkat (TIB 152) (Weiss, A. <i>et al.</i> , 1984(c))	NKL (Robertson, M. J. <i>et al.</i> , 1996)
Gewebe	T-Lymphocyte akute T-Zell-Leukämie	Natural Killer-Lymphocyte akute NK-Zell-Leukämie CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ “ <i>large granular lymphocyte (LGL) leukemia</i> ”
Produkte	IL2, IFN γ	IL2, IFN α , TNF
Morphologie	Lymphoblast	ähneln der Morphologie einer normalen aktivierten NK-Zelle
Ag-Expression	CD3	CD2, CD6; CD11a, CD26, CD27, CD29, CD38, CD43, CD58, CD81, CD94, CD95; Klasse II MHC
nicht exprimiert		CD3, CD4; CD5, CD8, CD14, CD19, CD20, CD28 α/β or γ/δ T-Zell-Rezeptor
Karyotyp	46, XY, -2, -18, del(2)(p21p23), del(18)(p11.2)	47, XY, add(1)(q42), +6, del(6)(q15q23), del(17)(p11)

Tab. 2-3 Die verwendeten Zell-Linien Jurkat und NKL und ihre Eigenschaften

2.7.3 Vektoren

Vektor	Resistenz/Eigenschaft	Referenz
pQE30NST	Amp ^r	(Büssow, K. <i>et al.</i> , 1998)
pSE111	Km ^r	

Tab. 2-4 Vektoren und ihre Eigenschaften

2.8 Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	µg/ml	Lösungsmittel
Ampicillin	100	70% Ethanol
Kanamycin	15	A. bidest.

Tab. 2-5 Antibiotika, einzusetzende Konzentrationen und Lösungsmittel

2.9 Oligonucleotide

2.9.1 Primer für die PCR und Sequenzierung

Oligonucleotid	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur
NST-for (30-mer)	GGA TCT ATC AAC AGG AGT CCA AGC TCA GCT	65°C
NST-rev (30-mer)	TCA CCA TCA CGG ATC CTA TTT AGG TGA CAC	65°C
pQE65 (24-mer)	TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG	65°C
pQE276 (20-mer)	GGC AAC CGA GCG TTC TGA AC	65°C

Tab. 2-6 Primer für die PCR und Sequenzierung

2.9.2 Oligonucleotide für die Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierungen

Oligo	Sequenz	Oligo	Sequenz	Oligo	Sequenz	Oligo	Sequenz
o5	NGGAATGGAN	o102	NGGGGCTGGN	o185	NCTCACCATN	o302	NCCTGAAGAN
o7	NCACACACAN	o103	NAGGACCTGN	o187	NGAAGAGGAN	o304	NCACAGAGGN
o8	NCCCTCATCN	o104	NCCTGGCCAN	o189	NCCATCTCCN	o305	NAGAAAAATN
o9	NTGATGATGN	o105	NTGCTGGAGN	o192	NTGAAGAAAN	o306	NCTGGCACAN
o10	NGGAGTGGAN	o106	NGCTGCTGCN	o196	NCCTGGTCAN	o307	NAGATGGTGN
o12	NCCAGCCTGN	o107	NCCTGGGCTN	o197	NAGGGACCAN	o308	NAAGATGAGN
o15	NCAGCCTCCN	o108	NAGCAGGAGN	o199	NCTTCCTGGN	o309	NATTTTTAAN
o16	NAGCCTGGGN	o109	NTGGAGGAGN	o201	NGTACCAGCN	o310	NTCCAAGAAAN
o30	NTTTTAAAAAN	o110	NTGGAGAAGN	o203	NCCCTCCAGN	o311	NAGCACAGAN
o34	NGCCACCTGN	o111	NCCTGGGCAN	o204	NAGTGGCTGN	o313	NCCAAGAGCN
o35	NAAGGAAAAN	o112	NGCTGGGGCN	o205	NCTGAGCTGN	o315	NGCACAGTAN
o37	NCCTCCCTGN	o114	NCCTCAGCCN	o206	NAGCCCAAGN	o318	NAGAAAACAN
o38	NAGGACCTGN	o115	NGAAGGAGGN	o207	NTTCTTCCN	o319	NCCTGTGACN
o39	NAGAAGAGAN	o116	NGCTCCTGGN	o209	NGCCATGGAN	o320	NCCTGGGAGN
o41	NCATCCTGGN	o119	NCTCCAGCCN	o211	NTTCATCTAN	o322	NCAAAGAAAN
o42	NTTTGTTTTN	o120	NTGCTGGTGN	o212	NCAGCCACCN	o323	NCTTTTCCAN
o48	NTTGGGTCCN	o121	NTGGAGCAGN	o213	NAAGAAAAATN	o324	NAAAATATTN
o49	NGATGAGAAN	o122	NTGGCCCTGN	o214	NTGTTATTTN	o325	NCTTCCCCAN
o50	NAAGAGAAN	o123	NGGAGGAAGN	o215	NTCACTGTGN	o326	NGAGAGAAAN
o52	NTGCTGGCCN	o125	NAGCTGGAGN	o219	NAGGGAGTGN	o327	NCCCCCAGCN
o53	NTGGCAGTGN	o130	NGGAAGGAGN	o224	NTGGGGGAGN	o329	NACAAAAATN
o55	NCACCTGGAN	o131	NCCTGGAGGN	o227	NTCTCTCCCN	o331	NAAATGCTGN
o58	NGAAGACAGN	o133	NTTCTGGAN	o228	NAGCTCACCN	o334	NCACCAGGAN
o59	NAGCCAGAAN	o134	NGAGGAGAAN	o229	NCCAAGGTGN	o335	NAAAAAGGAN
o60	NGCAGAAGCN	o135	NCCAGGAGGN	o231	NTTGTTTTCN	o336	NTCTCTGCAN
o61	NCTTCTTTTN	o136	NCTGGAGCAN	o232	NTGCTGTGTN	o337	NCTTCCGCAN
o62	NCTGGGCTGN	o137	NGAGCTGGGN	o233	NCCAGAACCN	o338	NCCTGCTGN
o63	NTGGAGAGAN	o138	NGGAGCAGCN	o234	NAATGAGGAN	o339	NAAGACAAN
o64	NTGGGGCAGN	o139	NCAGCCTCCN	o235	NCGTCTCCTN	o340	NGGGAACCCN
o65	NTTGAAAAAN	o140	NAGCTGCTGN	o236	NTGCTCCTGN	o341	NAGAAGTACN
o67	NACCCCTGN	o142	NCCTGGCTGN	o237	NGTGGTGGTN	o342	NAATAAAAAN
o68	NTTTGCAGAN	o143	NGCTGGGCCN	o241	NTTCTGGAAN	o343	NAGCTCAGCN
o69	NTGGGAGAGN	o144	NGCCCTGGGN	o247	NTTTCAGAAN	o344	NAAGGGAAN
o70	NGGACACCTN	o145	NCCTGGAAGN	o249	NCTACTGGGN	o345	NAATGGAAN
o73	NGGAGACCCN	o146	NGAGGAGGAN	o250	NTTCTGCAN	o346	NGCCGCCGCN
o74	NGACCTGCTN	o147	NAAGGAGAAN	o251	NTTGCCTTTN	o348	NAACTGCTCN
o75	NCTGCTGCTN	o148	NCAGCCCTGN	o252	NCTCCCACAN	o349	NAGGAAGGCN
o76	NGGAGCTGGN	o149	NCCTGCTGCN	o253	NAGCTCACTN	o350	NATTTGGAAN
o77	NCAGCCTGGN	o150	NGGAGGTGGN	o254	NTGGGATGGN	o351	NCAGGAGAGN
o78	NTGAAGAAGN	o151	NAGGAAGAGN	o255	NAGAAGCCCN	o353	NGAAAAACAN
o80	NAGGAGGAGN	o152	NCCTCCTGCN	o256	NGCTGGGTGN	o358	NCTCCAAAAN
o82	NGCTGCTGGN	o155	NTCCTGGAGN	o257	NCAGACACCN	o364	NAGACACAGN
o83	NAGGAGAAGN	o156	NTGGAGTGN	o258	NCCTTTGCTN	o372	NCATGCTGAN
o84	NCCTGGAGCN	o158	NGGAGAAGAN	o259	NCCCTGTCCN	o379	NCCCTTCCCN
o85	NCTGGAAGAN	o159	NTGCTGCTGN	o260	NGAGGCGGAN	o381	NCCAGAGGCN
o86	NCCAGCCCN	o160	NCTGCAGCCN	o261	NGAAGCAGAN	o383	NACAAAGCAN
o87	NCTCCTGCTN	o162	NAGGAGGAAN	o262	NTTCTCTGN	o384	NCTGGTGGCN
o88	NAGGAGCAGN	o163	NGGCCCTGGN	o265	NATGAGCAGN	o385	NATCTGTGAN
o89	NCTTCTGGN	o164	NGCTGGTGGN	o267	NGCCAGGACN	o386	NCCATCTTCN
o90	NCTGGAGGAN	o165	NTGCAGCTGN	o268	NCATGGCCCN	o387	NAGAGAAGCN
o93	NGAAGAGGAN	o166	NCCCTGCTGN	o291	NCCTCCTCCN	o388	NATTTCTCAN
o94	NGGCTGGGGN	o168	NGAGGAAGAN	o292	NAAGAAGAAN	o389	NCCCTGACCN
o96	NAGCAGCAGN	o177	NGGCCAAGGN	o293	NCTGCAGGAN	o401	NCCAGGGAAN
o97	NGCTGCAGCN	o180	NCTGGGGCCN	o295	NCCCAGGAGN	o402	NCCTCCAGN
o98	NCTCCTGGAN	o181	NCCCTGCCCN	o296	NAAGGAAAAN	o403	NCAGGGCAGN
o100	NAGCAGCTGN	o183	NCAGCCTGAN	o298	NATTTTAAAN	o404	NACCAGCAGN
o101	NTCCTCCTGN			o299	NCAGTAATAN		

Tab. 2-7 Für die Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierung verwendete Oligos

2.10 Lösungen

5 mM AttoPhos-Lösung (Digoxigenin-Hybridisierung)

DEA Puffer (2.4 M) 100 ml

AttoPhos 290 mg

steril filtrieren (5 µm Filter, Schleicher&Schüll)

AttoPhos-Lösung (Digoxigenin-Hybridisierung)

Tris/MgCl₂ (1 mM) 80 ml pH 9.5

AttoPhos-Lösung (5 mM) 20 ml

CHURCH-Puffer

SDS (10%) 500 ml

Na₂HPO₄ (0.5 M, pH 7.2) 500 ml

EDTA (0.5 M, pH 8.0) 2 ml

CTG

dCTP 100 µM

dTTP 100 µM

dGTP 100 µM

2.4 M DEA-Puffer (Digoxigenin-Hybridisierung)

Diethanolamin 2.4 M 126.2 g

Sodiumacid-Lösung (0.1%) 0.0005 % 25 ml

MgCl₂ (1M) 0.23 mM 115 µl

Σ 500 ml pH 9.2

Denaturierungspuffer (Prozessieren der *in situ*-Filter)

NaOH 1.5 M

NaCl 0.5 M

Gel-Ladepuffer

Bromphenolblau	0.25	%
Xylen Cyanol FF	0.25	%
Glycerin	30	%

bei 4°C lagern

Glucose 40%

400 g D+-Glucose Monohydrat werden in A. bidest. gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

HMFM**Komponente A** (für 3.2 l)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3.6	g
Tri-Sodiumcitrat x 2 H ₂ O	18.0	g
(NH ₄)SO ₄	36.0	g
Glycerol (100%)	1760.0	g

640 ml aliquotieren und autoklavieren

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

KH ₂ PO ₄	72	g
K ₂ HPO ₄	188	g

160 ml aliquotieren und autoklavieren

Komponenten A und B werden vor dem Einsatz gemischt.

LS-Puffer

Hepes	50	µl
TM-Puffer	50	µl
OL	14	µl

Neutralisierungspuffer (Prozessieren der *in situ*-Filter)

NaCl	1.5	M	
Tris	1	M	pH 7.5

OL (Hexanucleotide)

pdN6 (45 OD)	1:8	
Tris/HCl (pH 8.0)	1	mM
EDTA (pH 8.0)	1	mM

PCR-Puffer (10x) (500 ml)

KCl	(2.5 M)	0.5	M	100	ml	
Tween20	(10%)	1	%	50	ml	
MgCl ₂	(1 M)	15	mM	7.5	ml	
Tris Base	(1 M)	350	mM	17	ml	
Tris/HCl	(1 M)	150	mM	75	ml	pH 8.3

sterilfiltrieren

Proteinase K-Lösung (Prozessieren der *in situ*-Filter)

Tris/HCl, pH 8.5		50	mM		
EDTA		50	mM		
NaCl		100	mM		
N-Lauroyl-Sarcosin		1	%		
Proteinase K		1	g/18 ml		

Proteinase K-Puffer (Prozessieren der *in situ*-Filter)

Tris/HCl, pH 8.5		50	mM		
EDTA		50	mM		
NaCl		100	mM		
N-Lauroyl-Sarcosin		1	%		

radioaktive Markierung eines Größenstandards (20 µl Ansatz)

Größenstandard	(1 µg/µl)	1	µl
dATP	(1 mM)	1	µl
dGTP	(1 mM)	1	µl
dTTP	(1 mM)	1	µl
<i>filling in</i> Klenow-Puffer (10x)		2	µl
A. bidest.		12.5	µl
Klenow-Enzym	(1 U/µl)	1	µl
[α ³² P]dCTP	(1 µCi)	0.5	µl

SSarc (30 l)

SSC (20x, pH 7.0)	4	M	6	l	
Sarcosyl (30%)	7.2	M	7.2	l	
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	4	mM	240	ml	
A. bidest.			16.8	l	pH 8.0

SSarc (1:10)

SSarc wird 1:10 in A. bidest. verdünnt, auf 1 l Lösung werden 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 zugegeben.

SSC (20x)

NaCl	3	M		
Di-natriumcitrat	0.3	M	pH 7.0	

TAE

Tris-Acetat	40	mM		
EDTA	1	mM	pH 8.0	

TBE

Tris-Borat	90	mM		
EDTA	1	mM	pH 8.0	

TE

Tris/HCl	10	mM		
EDTA	1	mM	pH 8.0	

TEN-Puffer

Tris/HCl	10	mM		
NaCl	25	mM		
EDTA	1	mM	pH 8.0	

TM-Puffer

Tris/HCl	250	mM	pH 8.0
MgCl ₂	25	mM	
β-Mercaptoethanol	50	mM	

Tris/MgCl₂ (Digoxigenin-Hybridisierung)

Tris	0.1	M	
MgCl ₂	1	mM	pH 9.5

Wasch-Lösung (10x) (Digoxigenin-Hybridisierung) (1 l)

Na ₂ HPO ₂	(0.5 M)	200	mM	400	ml	
SDS	(10 %)	1	%	100	ml	pH 7.2

Waschpuffer (Backgroundhybridisierung) (1 l)

Na ₂ HPO ₄	(0.5 M)	20	mM	40	ml	
SDS	(10%)	0.1	%	10	ml	
EDTA	(0.5 M)	1	mM	2	ml	pH 8.0