

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, D.)

Durchlichtmikroskop BX 60 (Olympus, Hamburg, D.)

Durchlichtmikroskop MZ 12 (Leica, Bensheim, D.)

Feinwaage AT20 / PM 200 (Mettler Toledo, Giessen, D.)

Geldokumentationsfotoanlage CP770 DW (Mitsubishi El. Corporation, Sunnyvale, USA)

Heizblock Ori-Block OV 3 (Techne, Minneapolis, USA)

Heizplatte (Leica)

Hybridisierungsöfen OV 2 (Biometra, Göttingen, D.)

Hybridisierungsöfen (Heraeus, Osterode, D.)

Kameramikroskop Axio cam HRc (Zeiss, Oberkochen, D.)

Kameramikroskop DC 200 (Leica)

Kryotom CM 1900 (Leica)

Kühlzentrifuge 5417 R (Eppendorf)

Laborwaage (Fischer)

Mikrotom 2050 Supercut, Reichert-Jung (Cambridge Instr. GmbH, Nussloch, D)

Netzgerät Consort E 132 (Peqlab, Erlangen, D.)

Netzgerät Power Supply (Peqlab)

PH-Meter MP 220 (Mettler Toledo)

Tischzentrifuge 5416 (Eppendorf)

Trockenschrank T 6060 (Heraeus)

UV-Transilluminator RH-5.1 (Herolab, Wiesloch, D.)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)

Wärmeschrank ULM 400 (Mettler, Schwabach, D.)

Wasserbad GFL 1052 (Leica)

Wasserbad L + Temperaturregler D1 (Haake, Karlsruhe, D.)

### 2.1.2. Kits

DIG RNA Labeling Kit 1 175 025 (Roche, Mannheim, D.)

Gel Extraction Kit Qiaquick (Qiagen, Hilden, D.)

NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, D.)

PCR-Purification Kit Qiaquick (Qiagen)

### 2.1.3. Sonstige Materialien

Deckgläser für Objektträger (Leica)

Einbettförmchen (Polysciences, inc., Warrington, USA)

Embryonenlöffel (Fine science tools, Heidelberg, D.)

Glasflaschen (Schott, Mainz, D.)

Küvetten UVette 220-1.60 nm (Eppendorf)

Micro Spin S 200 HR-Columns (Amersham, Freiburg, D.)

Objektträger (Leica/Roth/Marienfeld)

PCR Reaktionsgefäße und Deckel -8er Streifen- (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Pipetten (Eppendorf; Gilson, Middleton, USA)

Pipettenspitzen (Bio-Rad, München, D.; Biozym, Hessisch Oldendorf, D.; Gilson)

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml (Eppendorf)

Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Greiner, Frickenhausen, D.)

Rührspatel (Sarstedt, Nümbrecht, D.)

Thermo-Fotopapier K 65 HM-CE (Mitsubishi Electric, Corporation Sunnyvale, USA)

### 2.1.4. Reagenzien

3'(Triethoxysilyl)propylamin (Merck, Darmstadt, D.)

Aceton (Merck)

Agarose (Gibco BRL, Crewe, U.K.)

Ampicillin 100 mg/ml (Bayer, Leverkusen, D.)

Blocking Reagent (Roche)

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3 indolyl-phosphatase) (Roche)  
Calciumchlorid-Dihydrat (Merck)  
Chloroform (Merck)  
DDT (Dithiotriol) 1 M (Sigma, Taufkirchen, D.)  
DEPC (Diethyl-Pyrocabonate) (Sigma)  
Desoxynukleotidtriphosphate (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D.)  
Dextransulfat (Sigma)  
DIG-RNA-Labeling-Mix, 10 x konzentriert (Roche)  
DNA-Größenmarker 1000 bP + (MBI Fermentas)  
EDTA (Sigma)  
Ethanol p.a. (Merck)  
Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, GmbH, Karlsruhe, D.)  
Extran (Merck)  
Formamid (Merck)  
Glutaraldehyd 25 % (Merck)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) 30 % (Merck)  
HCl (Salzsäure) 1 M (Merck)  
Isopropanol (Merck)  
Jodacetamid (Sigma)  
Ladepuffer (MBI Fermentas)  
Levamisol (Sigma)  
Maleic Acid (Sigma)  
Methanol p.a. (Merck)  
NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (Roche)  
NEN-Blocking-Puffer (Perkin-Elmer/NEN, Boston, USA)  
Nuklease-freies Wasser W 4502 (Sigma)  
Proteinase K, 20 µg/µl (DEPC) (Roche)  
Roti-Phenol (Roth)  
SAP (Streptavidin-Alkalische Phosphatase)-conjugate (Roche)  
Sheep-Serum (Roche)  
Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Instruments GmbH)  
Transkriptionspuffer 10 x konz. (Roche)  
tRNA ( Typ 3 von baker`s yeast) (Sigma)  
Tween 20, 10 % (DEPC) (Sigma)

Tyramid-Biotin und Puffer (Tyramide reagent pack) (Perkin-Elmer/NEN)

Xylol (Roth)

$\alpha$ -Dig-POD, 1:600 (Roche)

### 2.1.5. Enzyme mit dazugehörigen Puffern

DNase I 10 U/ $\mu$ l (Roche)

PEG 4000 50 %(w/v) (MBI Fermentas)

Pfu/Taq-DNA-Polymerase 10 U/ $\mu$ l (hauseigen)

Proteinase K 20 mg/ml (Boehringer, Mannheim, D.)

Restriktionsenzyme (10 U/ $\mu$ l) und entsprechende 10 xPuffer (MBI Fermentas)

RNase-Inhibitor 40 U/ $\mu$ l (Roche)

Sp6-RNA-Polymerase 20 U/ $\mu$ l (Roche)

T7-RNA-Polymerase 20 U/ $\mu$ l (Roche)

### 2.1.6. Puffer und Lösungen

10 x PBS

(2 g KCl; 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 80 g NaCl; auf 1 l auffüllen; autoklavieren)

10 x PCR-Puffer

(750 mM Tris (pH 8,8); 200 mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ; 0,1 % Tween 20; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ )

10 x TN

(1 M Tris (pH 7,5); 1,5 M NaCl)

1 x SSC

(0,01 M Natriumcitrat; 0,15 M NaCl; pH 7,8 mit NaOH einstellen)

1 x TAE

(0,04 M Tris; 0,005 M Natriumacetat; 0,001 M EDTA; pH 8 mit Eisessig einstellen)

20 x SSC

(3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, auf pH 7,8 mit NaOH einstellen)

5 x NTE

(2,5 M NaCl; 50 mM Tris(pH 8,0); 25 mM EDTA(pH 8,0))

6 x Ladepuffer

(60 % Glycerol; 60 mM EDTA; 0,09 % Bromphenolblau; 0,09 % Xylencyanol)

LiCl, 4 M  
MgCl<sub>2</sub>, 1 M  
NaAc, 3 M  
NaCl, 5 M  
NaOH, 5 M  
PFA 4 % in PBS

### 2.1.7. Bakterienstamm,-medien und Vektor

Bakterienstamm: *Escherichia coli* Stamm TOP 10

LB Medium

(10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen; pH 7,5; autoklavieren)

LB-Agar

(LB-Medium; 1,5 % Bacto-Agar (w/v); autoklavieren)

Vektor: pTA-gfp (hauseigen)

### 2.1.8. Computerprogramme

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop 7,0; Corel Draw 11, Windows Paint

Betriebssystem: Windows 2000 Professional und XP

Digitale Photographie: Axio Vision 4; Leica DC Viewer

Gelfotodokumentation: EASY Win32

Literaturverwaltung: Endnote 6,0

Sequenzalignment und -auswertung: Seqman (DNA-Star)

Software für den *In-Situ*-Automaten: Gemini

Tabellen- und Diagrammbearbeitung: Microsoft Excel 2000, Microsoft Powerpoint 2000

Textbearbeitung: Microsoft Word 2000

## 2.1.9. Datenbanken

COmparative Regulatory Genomics (CORG): <http://www.corg.molgen.mpg.de>

Ensembl Genome Browser: <http://www.ensembl.org>

Gene Nest: <http://www.genenest.molgen.mpg.de>

Gene Ontology (GO): <http://www.geneontology.org>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

Mouse Genome Informatics (MGI): <http://www.informatics.jax.org>

Online Mendelian Inheritance in Man (Omim): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

Scirus: <http://www.scirus.de>

Unigene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR werden spezifische DNA-Sequenzen enzymatisch vermehrt. Die Grenzen des gewünschten DNA-Abschnittes werden durch sogenannte Oligonucleotid-Primer festgelegt.

Für den PCR-Ansatz wurden als Template cDNA, genomische DNA, bzw. das Endprodukt aus der Primäramplifikation verwendet.

- Template:  
cDNA, bzw. gDNA: 100-200 ng  
oder aus Primäramplifikation: 1 µl
- 5 µl 10xPCR-Puffer
- 1 µl dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 12,5 mM)
- 1,5 µl spezifischer Forward-Primer(= Sense-Primer) (10 µM)
- 1,5 µl spezifischer Reverse-Primer(= Antisense-Primer) (10 µM)
- 1 µl Pfu/Taq-DNA-Polymerase (10 U/µl)
- ad 50 µl A. bidest

Durch den auf Denaturierungstemperatur vorgeheizten Cycler erfolgte eine Hot-Start-PCR.

| Tab. 1     |          |        | Tab. 2     |          |        |
|------------|----------|--------|------------|----------|--------|
| Temperatur | Zeit     | Zyklen | Temperatur | Zeit     | Zyklen |
| 94 °C      | 3 min    |        | 94 °C      | 3 min    |        |
| 94 °C      | 30 sek   | 35     | 94 °C      | 30 sek   | 40     |
| xx °C      | 30 sek   |        | xx °C      | 30 sek   |        |
| 68 °C      | 1.30 min |        | 68 °C      | 1.30 min |        |
| 68 °C      | 10 min   |        | 68 °C      | 10 min   |        |

#### Tab. 2.1./2.2.: Primär-/Reamplifikation

Die Tabellen zeigen die angewendeten PCR-Programme (Tab. 2.1. Primäramplifikation. Tab. 2.2 Reamplifikation) Die Annealing-Temperatur (xx °C) lag zwischen 52 °C und 62 °C, je nach Länge der Primer.

#### Primer:

Die spezifischen Primer für die jeweiligen Sequenzen sind der Tabelle 2.3. zu entnehmen. Die Länge der Primer lag um die 25 bP, das PCR-Produkt wurde, wenn möglich etwa 700 bP lang gewählt.

#### 2.2.1.2. PCR-Aufreinigung

Wurde bei der PCR nur ein Fragment amplifiziert, konnte dies mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers aufgereinigt werden.

Bei einer suboptimalen PCR (mehrere Produkte) isolierte man diese im präparativen Maßstab voneinander. Dazu wurde DNA in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und die Nukleinsäuren mit Hilfe des Gelextraction Kits Qiaquick (Qiagen) nach der mitgelieferten Anleitung aufgereinigt.

#### 2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA- oder RNA-Konzentrationen erfolgte entweder durch Konzentrationsmessung einer geeigneten Verdünnung im Biophotometer oder durch Abschätzung mit Hilfe eines Mengenstandards in der Gelelektrophorese.

| AC-Number | EST       | Forward-Primer 5'-3'                | (T7-) Reverse-Primer 5'-3'  | T7-Reverse-Primer 5'-3' der Semi-nested PCR                              |
|-----------|-----------|-------------------------------------|---|--|
| AA260005  | X         | CTT CAG GCT CAC GTT GTG TAC         | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TAT AAA TCT<br>TCA AAT ACG GTT GC |  |
| AA770975  | X         | CAG ATC TCA TAA ATA TGC TAC TC      | GAA TGT ATG GGC ATA CTT ATT ATT C                                     |  |
| AA793588  | X         | GGA TGG CTA TTA AGA CTG TAC         | GAT AAT ACC ACT TAG CCT AGC   |  |
| AB023957  | X         | CTG ACA AGG AGA TCT GTG GAG         | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCT CAA GT<br>TGC ACC ATG AC      |  |
| AF030433  | X         | Niehrs,C.                           |   |  |
| AI121797  | X         | CAG TAG CTA TAT ACA AAA CAT C       | GCT TCT ATT TTG TAA CAC ACC   |  |
| AI481510  | X         | CCT TCA ACA AAT GTT TTA TTG TC      | CTT GCA TCT CTT AGA GTA TC  |  |
| AI615325  | X         | CAA GTG GGA TAC CTA AGT CTT C       | CAT CCA CGG GCC TCG TCT AC  |  |
| AI746846  | X         | CAG AAA AGT CCT GCA GAA TGC ACT C   | GGT AAG AAT CTA TTA ATG AGC CAG C                                     | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCA GCA TT<br>TTT CTG GCT GGG CAC    |
| AI747200  | X         | CTA GGT TGT GCT GTG TAT TTC         | CGG TCT CTA TGA TGA GAA TGT G   |  |
| AI838923  | X         | CCA CAC CAC ATA TGG AAT TTA ATT C   | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TTT GGA CA<br>ATA ACC CCC AAT C   |  |
| AI848841  | X         | CAT AGT AGT CAT CAA GTC TTT C       | GCA CTA GGT CAC CAT GTT C   | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TAG GTC AC<br>ATG TTC ACA CC         |
| AI849305  | X         | CAA TGC ATG GAT GAG GGA TGT C       | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACG CTT AT<br>TCT GAA GAA CAC     |  |
| AI852765  | NM_016696 | CCC AAG GAC TGT CTT GGC C           | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAG TCT TT<br>TGA GCC CAT C       |  |
| AI854020  | ?         | ACA ACT TCA GGG TCA CTG GAG AAC AAC | GCG TCC TAG TCT CCA CAG CAT AGG                                       | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT A AG GAT TT<br>CAC ATT GAG ACT TCC   |
| AI854299  | X         | CCA GAC ATT TTA TTC AAA ACG TTA GC  | GAA TGT GCA AGG CTC AAT TCC   |  |
| AJ009862  | X         | CGT CAG ACA TTC GGG AAG CAG         | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TTC AGC TG<br>ACT TGC AGG AGC     |  |
| AW061016  | X         | CGA GGC ATT TAT TTA CAG CGG TAC     | CGA AAC CCG AAC TGG GAG AGA AC  |  |
| AW122703  | AK084569  | GAT GAC GGG GAC CTC AAC AGC CTG G   | GCA GTT TGC CTG AAC TGA ACT CGA C                                     | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAT GTG AA<br>ACA GAA TTG AAA CCT G  |
| AW124306  | NM_146162 | CGG TCT GGA TTC TGA CGC             | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACA TCC GA<br>GAG CTG AGG         |  |
| AW124651  | X         | GCT TAC ACT ATA CAG GGA GAA GAC ACG | GAC CAC AGG CTA AAA TGC CCA CAG                                       | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAT GCC AT<br>GAT CGA TGA ACC ACC TG |
| D10837    | X         | CCC AAG CTA GTC TAA CCA AAC         | CCA TGA GCT AAA CCT TAA TCC   |  |
| D64141    | X         | CTG CAG GCT CAC AGA CTG CC          | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TAA TCA TT<br>AAA GCC TTT AAC     |  |
| D83966    | X         | CAG CCA GAC GAC CTG CTC AC          | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TTA AAT ACT<br>GGC TTC AAG TAT C  |  |
| J02980    | V         | ATT GGG GCC AAC CTT GAC CAC TGT GCC | CTG TCC GGC TGG AGT GTT CTT CCC AGC                                   | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGT GGC TT<br>CTG GGA GTC TCA TCC TG |
| J03023    | X         | CAC TAG AGC ATG GGT ACC GTA TGC     | CAG CTA TAG ATT GAA TTC AGT CAT TCC                                   |  |
| J04953    | X         | CCT GCA CAC CTC ATG AGC TTG         | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGC TTG CC<br>TAT GAT GTC         |  |
| L13171    | X         | CCA GTT ACC ATC CCA GTG TCC         | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGC CAG CC<br>GTT ACA GAG C       |  |



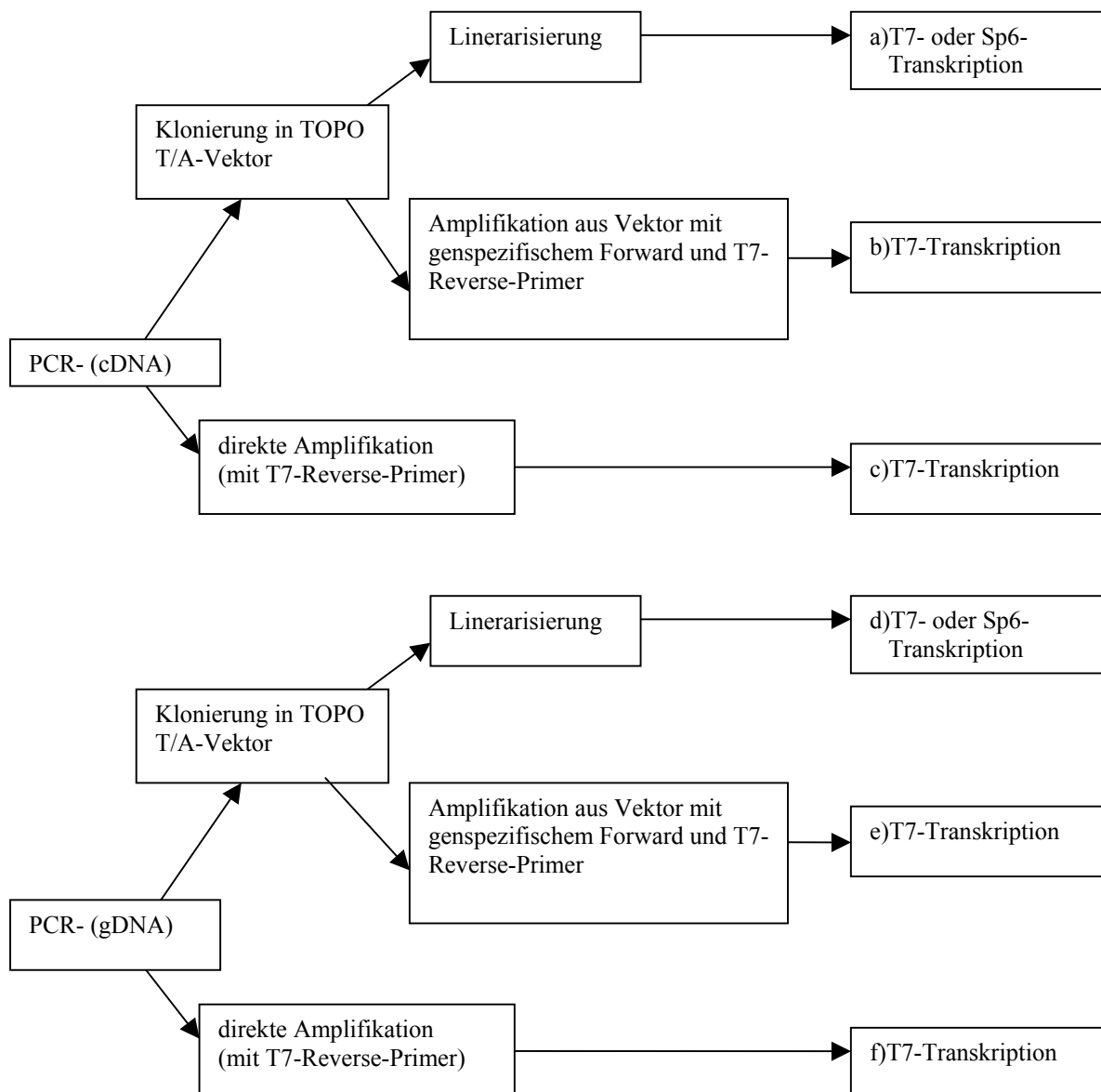
| AC-Number | EST       | Forward-Primer 5'-3'                    | (T7-) Reverse-Primer 5'-3'   | T7-Reverse-Primer 5'-3' der Semi-nested PCR                             |
|-----------|-----------|---|--|---|
| L20232    | X         | Seitz, V.                               |  |   |
| M12379    | NM_009382 | GAA CCC AGC CAT CAG CGT CGC             | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACA GAG AA<br>TGA AGT CCA GGG      |   |
| M29009    | X         | CCT CCA CCT ATT GAC AAT GGG             | GAT TAG GAG TTT TGA ATG  |   |
| M31131    | X         | CGC AGC TGG TTG CAG ATA AAG G           | CTG GTA CAC AAC ACA GAC GC   |   |
| M36579    | X         | CAG ATG AAG CTG CAT TCC                 | GTT GCT ATA TAG GAG CAC G  |   |
| M68513    | X         | CAG TTG ATG TTG GAC TGC TGG C           | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAT TCC ATT<br>TTA AGG CAT TTG GAC |   |
| M69260    | X         | GGC TCT GTG TGG TGG AAA CTA G           | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TAG TAG AA<br>TTT GGT GAT TTC      |   |
| M89798    | X         | McMahon, AP                             |  |   |
| M99054    | X         | CAT GTG GAG ATA AGC CCC AAA GAA ATG ACC | ATT GAA TAG CAG TGA CAG TAA GAC TTG AC                                 | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGA AAG CC<br>GTT CCC AAG AAA GCT C |
| U13705    | X         | CTC CCA CTG CAG AAC TCC TGG GCT C       | AAA TAT GAG GGT GTT GTG CCA AG   | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CCA CAG TG<br>TTC AGA CAC ACA G     |
| U20238    | X         | CGC ACC TTC TTC AGT GTG C               | CCT GTT GGG CTC ACA GAG AC   |   |
| U28960    | X         | CCC CAC TGA AGA CAC TGC TGC             | CTG TGG CAC CGG GAC CAC TAA C  |   |
| U38501    | X         | CGA TAG CAT CTG TAA CAA G               | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG CGG CCG CT<br>CTT CAT ATG          |   |
| U44389    | X         | CCC AGG CTT TGT GGA CAC ACC             | CCA TTG TAA AGG AGC TTC CCG  |   |
| U49513    | X         | CCA ACC CCA GTG ATC GGA GAG TTC         | CAG CTG GGT CCT TAC AAA CAC AGA C                                      |   |
| U67840    | X         | CTA CCT GGA GAA CTC GGC TTC             | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTC TAT CTA<br>CAC TTA TTT ACA C   |   |
| X13986    | X         | Seitz, V.                               |  |   |
| X14961    | NM_010174 | CCT TTG TCG GTA CTA CCT GG              | GGT TCT GCT TTA TTG ACC  |   |
| X54511    | X         | CCC ATT CTC TCG AGG GAC G               | CTC AAG GAT GTT GA CTT TCC   |   |
| X61385    | X         | GCA TTC GGT ACT TAC CGG G               | CCA GCT GAA GAA GTT TTG GCT GCA AAA GC                                 |   |
| X66473    | X         | GAC GTG GGC TAC GTG ACC TAC GAC CTC CTG | AAT GTT TGA TGA GTG GAT AGC TCG GTG G                                  | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TGG GTT AA<br>TAC ATG CAT GTG AAC   |
| X72795    | X         | Seitz, V.                               |  |   |
| X76291    | X         | McMahon, AP                             |  |   |
| Y15001    | X         | Seitz, V.                               |  |   |
| Z19543    | X         | CTG CAA TCC TCC TGC CTC AGC             | GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAC ACA GG<br>AAT TTC ACA TTT C    |   |

**Tab. 2.3.: Primerliste**

Es wurden alle verwendeten Primer und Sequenzen aufgelistet.

## 2.2.1.4. Sondenherstellung

Die Sonden wurden auf unterschiedliche Weise hergestellt. Anfangs wurden sie in einen Vektor inkloniert und anschließend linearisiert. Später wurden sie direkt, bzw. aus dem Vektor heraus amplifiziert, da dies effizienter war. Den Schritten folgte jeweils die Transkription.



**Abb. 2.1.: Darstellung der unterschiedlichen Vorgehensweisen zur Herstellung von Sonden:**  
a, b, d und e stellen die Wege der Sondenherstellung durch Klonieren von DNA-Fragmenten dar.  
c und f geben die Wege der Sondenherstellung durch direkte Amplifikation des T7-Promotors am Reverse-Primer wieder.

#### 2.2.1.4.1. Sondenherstellung durch Klonieren von DNA-Fragmenten (in Abb. 2.1. Weg a),b),d) und e))

Bei der Klonierung werden DNA-Fragmente in Vektoren eingebracht. Diese Vektoren können von kompetenten *Escherichia-coli*-Bakterien aufgenommen werden und durch Kultivierung der entsprechenden Zellen vermehrt werden.

Für die Ligation (Einbringen des PCR-Produktes in einen linearisierten Vektor) wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in 30 µl A. bidest gelöst. Für den Ligationsansatz wurde das Fragment in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:3 bis 1:6 eingesetzt.

- PCR-Produkt [ $N_{\text{PCR-Produkt}} / N_{\text{Vektor}} \approx 1:3$  bis 1:6]
  - 1 µl pTA1 Vektor (50 ng/µl)
  - 1 µl T4 Ligase Puffer
  - 1 µl PEG 4000
  - 1 µl T4 DNA-Ligase
  - ad 10 µl A. bidest
- Die Ligation erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 16 °C.

Bei der Transformation (Einbringen des Vektors in das Bakterium) wurden dem Ligationsansatz 100 µl kompetente Bakterien zugefügt und dieser für 30 Minuten auf Eis belassen. Es folgte eine max. zweiminütige Inkubationszeit im Wasserbad bei 42 °C. Dabei erfolgte die Aufnahme des Vektors in die kompetenten Zellen. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz für weitere zwei Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurden 900 µl flüssiges L-Medium hinzugefügt und die Zellen zur Vermehrung für eine Stunde bei 37 °C bei 184 UpM geschüttelt. Danach wurden 100 µl auf einer mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versehenen LB-Medium Platte ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden ebenso auf eine neue Platte ausgestrichen.

##### 2.2.1.4.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Durch diese Präparation ist es möglich, gereinigte Plasmide zu erhalten, die anschließend z.B. für Sequenzierungen oder eine Amplifikation des einklonierten Fragmentes eingesetzt werden können. Es wurden dafür 2 ml L-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schütteltisch bei ca. 180 UpM inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert.

#### 2.2.1.4.1.2. Plasmidlinearisierung (in Abb. 2.1. Weg a) und d))

Zu einer Ausgangsmenge von 30 µg Plasmid wurden 10 µl Puffer und 3 µl Restriktionsenzym zugegeben. Die Reagenzien wurden mit A. bidest auf 100 µl aufgefüllt, gemischt, abzentrifugiert und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde zusätzlich 1 µl Restriktionsenzym hinzugegeben und der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Proteinase K und Auffüllen des Volumens auf 500 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O, folgte erneut eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C.

#### 2.2.1.4.1.3. Phenol/Chloroform-DNA-Aufreinigung

Zu einem Ansatz, bestehend aus 500 µl DNA + Proteinase K in DEPC-H<sub>2</sub>O, wurden zusätzlich 500 µl Phenol pipettiert, gemischt und anschließend bei 12.000 UpM zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. In dieses Gefäß wurden dann 500 µl einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 50:48:2) gegeben und gut gemischt. Nach einem erneuten fünfminütigen Zentrifugationsschritt und Umpipettieren der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, wurde als letzter Aufreinigungsschritt Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:2), wie im Schritt zuvor erläutert, hinzugegeben. Zuletzt wurde das nun gereinigte Plasmid in der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 µl NaAc (3 M) zugegeben und gut geschüttelt. Dann wurde 1 ml 100 %-igen EtOH p.a. zupipettiert, gefolgt von einem 30-minütigen Inkubationsschritt bei -20° C. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt von 25 min bei 13.000 UpM, konnte man meist die DNA als weißes Pellet am Boden des Gefäßes sehen. Das Reaktionsgefäß wurde umgedreht und „ausgeklopft“ Währenddessen sollte das Pellet sich nicht lösen.

Nach Zugabe von 1 ml 70 %-igem EtOH in DEPC-H<sub>2</sub>O (Waschschritt) und 20-minütigem Zentrifugieren bei 13.000 UpM , wurde der Überstand durch Ausklopfen wieder verworfen. Dieser Waschschritt wurde wiederholt und das Reaktionsgefäß danach 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde final in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 2.2.1.4.2. Sondenherstellung durch Kolonie-PCR (in Abb. 2.1. Weg b) und e))

Bei dieser Form der Sondenherstellung wird nach Ligation und Transformation, wie im Punkt 2.2.1.4.1. erläutert, eine Kolonie von der Platte gepickt und als Template für die PCR eingesetzt. Auch hier werden genspezifische Forward und T7-Reverse-Primer eingesetzt.

#### 2.2.1.4.3. Sondenherstellung durch T7-Promotor am Reverse-Primer (in Abb. 2.1. Weg c) und f))

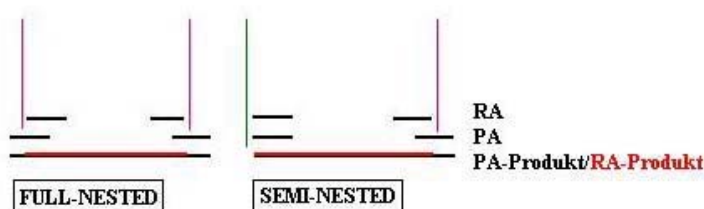
Mit dieser Methode wird das Einklonieren der PCR-Fragmente umgangen.

Der T7-Promotor wurde an das 5'-Ende der Reverse-Primer-Sequenz gehängt und in der PCR mitamplifiziert. In der später folgenden Transkription diente dieser der T7-RNA-Polymerase als Matrize.

T7-Promotor: 5'-GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-'3

#### Nested PCR:

Bei der Nested-PCR werden in der Reamplifikation Primer verwendet, die im Vergleich zu den Primäramplifikationsprimern nach innen gerückt sind. Bei der Full-Nested-PCR betrifft dies Forward- und Reverse-Primer, bei der Semi-Nested-PCR nur einen der beiden Primer (Abb.2.2.).



#### **Abb.2.2.: Darstellung der Nested-PCR**

Das PCR-Produkt wird jeweils von den Primern begrenzt.

PA: Primäramplifikation

RA: Reamplifikation

#### 2.2.1.5. Gelelektrophorese

Diese Methode ermöglicht es, Nukleinsäuren ihrer Länge nach aufzutrennen und durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die Nukleinsäuren bei angelegter Spannung in Richtung Anode. Entsprechend ihrer Molekülmasse laufen sie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit innerhalb des Gels. Durch die gleichzeitige Auftrennung von Größenstandards ist die Größenbestimmung der erhaltenen

Banden möglich. Da DNA-Lösung und Elektrophoresepuffer eine ähnliche Dichte haben, werden für das Beladen der Geltaschen die DNA-Proben mit einem Ladepuffer versetzt, der ihre Dichte erhöht.

Es wurde für das Gel 1 % Agarose in 1xTAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 0,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 10 ml Gel versetzt. Vor dem Auftragen wurden 5 µl Probe mit 1 µl 6 x-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 30 – 45 min. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.1.6. DNA-Sequenzierung (nach der Didesoxymethode von F.Sanger,1977)

Es wurden zwei unterschiedliche Ziele durch das Sequenzieren verfolgt:

- Sequenzieren von PCR-Fragmenten zur Kontrolle ihrer richtigen Amplifikation während der PCR
- Sequenzieren von Plasmiden zur Feststellung der Orientierung der Inserts

Als Template wurden 10 ng pro 100 bp PCR-Produkt, bzw. 100-200 ng mit EcoRI geschnittenes Plasmid eingesetzt.

Für ein PCR-Produkt wurde der spezifische Forward-Primer und ein Standard-T7-Primer (Sequenz: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-'3) als Reverse-Primer eingesetzt. Plasmide wurden mit einem Sp6- (Sequenz: 5'-AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA-'3) und T7-Standardprimer sequenziert.

Für eine Sequenzierreaktion wurden folgende Reagenzien in einem 0,2 ml PCR-Gefäß gemischt:

- 1-8 µl Template
- 1 µl (für Plasmide: 2 µl) des spezifischen Primers, bzw. des Sp6-Primer (je 10 pmol/µl)
- 1 µl (für Plasmide: 2 µl) des T7 Primers (10 pmol/µl)
- 2 µl Big Dye Terminator-Mix
- ad 10 µl A. bidest

Die anschließende Sequenzierung erfolgte im PCR-Cycler bei folgendem Programm:

| PCR-Produkte: |        |        | Plasmide:  |        |        |
|---------------|--------|--------|------------|--------|--------|
| Temperatur    | Zeit   | Zyklen | Temperatur | Zeit   | Zyklen |
| 96 °C         | 3 min  | 25     | 96 °C      | 3 min  | 35     |
| 96 °C         | 10 sek |        | 96 °C      | 20 sek |        |
| 50 °C         | 5 sek  |        | 50 °C      | 10 sek |        |
| 60 °C         | 4 min  |        | 60 °C      | 4 min  |        |

**Tab. 2.4.: Sequenzierungsprogramm**

Bei der Reaktion wurden die im Big Dye Terminator-Mix in geringer Anzahl vorhandenen fluoreszierenden Didesoxynukleotide (ddA, ddT, ddG, ddC) nach Zufallsprinzip in die Fragmente eingebaut. Da nach jedem Einbau eines solchen Nukleotides die Amplifikation abbricht, befinden sich am Ende in der Sequenzier-Reaktion verschieden lange DNA-Fragmente als Produkte.

Im Anschluss folgte eine Ethanol-fällung der Nukleinsäuren. Dazu wurde der Ansatz mit 25 µl 100 % EtOH p.a. gemischt und 60 min bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und die gefällte DNA mit 200 µl 70 % EtOH p.a. gewaschen. Die DNA wurde durch nochmaliges Zentrifugieren bei 4000 UpM und 4 °C für 20 min erneut abzentrifugiert und der Waschschrift wiederholt. Abschließend wurde der Überstand verworfen und die DNA an der Luft getrocknet.

Die gefällten PCR-Produkte wurden in der hauseigenen Sequenzierabteilung über Kapillaren aufgetrennt. Hierbei wird die Länge der einzelnen Fragmente im Zusammenhang mit dem für das terminale Nukleotid sequenzspezifischen Farbstoffes ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Auswertung der graphisch dargestellten Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Seq-Man (DNA-Star).

#### 2.2.1.7. Transkription von RNA-Sonden

Es wurden nicht-radioaktive Sonden durch den Einbau von Digoxigenin (Dig) markierten Nukleotiden hergestellt. Für die Transkription wurden die folgenden Reagenzien in einem Reaktionsgefäß pipettiert:

- 100-200 ng PCR-Produkt, bzw. 1 µg linearisiertes Plasmid
- 2 µl 10x Dig-RNA-labeling Mix
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA-Polymerase (T7 bzw. Sp6).

Der Ansatz wurde mit DEPC-behandelten A. bidest auf 20 µl aufgefüllt. Nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden 2 µl DNase zur Entfernung der Template-DNA hinzugefügt. Nach erneutem Inkubieren für 15 min bei 37 °C, wurde die Reaktion mit 0,2 µl EDTA (pH 8,0) gestoppt und auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 4M LiCl versetzt. Nach intensivem Mischen wurden 300 µl eisgekühlter 100 % EtOH zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , folgte ein Zentrifugationsschritt von 20 min bei 1300 UpM und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die entstandene RNA, meist als weißes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar, wurde mit 75 % EtOH p.a. in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Nach erneutem zehnmütigen Zentrifugieren bei 1300 UpM und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wurde der Überstand unter Beobachtung des RNA-Pellets verworfen. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und davon 5  $\mu\text{l}$  zur Kontrolle mittels der Gelelektrophorese beurteilt. Die restliche Sonde wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.2. Histologische Methoden

### 2.2.2.1. Herstellung silanisierter Objektträger

Für die Gewebeschnitte sollten RNase-freie und möglichst gut haftende Objektträger verwendet werden, deshalb wurden die Objektträger silanisiert.

Die Objektträger wurden in 15 % Extran in A. demin. über Nacht vorgereinigt. Nach zweimaligem Spülen mit Leitungswasser und einmal A. bidest, wurden sie bei  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 h ausgebacken. Danach folgten verschiedene Inkubationsschritte für jeweils 5 min.:

- 3 % 3' (Triethoxysilyl)-propylamin in Aceton
- Aceton
- Aceton, p.a.
- A. bidest

Final wurden die Objektträger über Nacht bei  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

### 2.2.2.2. Vorbehandlung und Einbettung des Gewebes ( Embryonen)

Ganze Embryonen, bzw. Extremitäten wurden direkt nach der Präparation in 4 % PFA in PBS bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 h fixiert. Danach wurden sie zweimal für 10 min mit PBS-DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden sie in 30 % Sucrose überführt und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  belassen, damit die Sucrose in das Gewebe eindringen konnte. Am nächsten Tag wurde der Boden von Kryoförmchen ca. 1 cm luftblasenfrei mit Kryomedium bedeckt. Das Gewebe wurde auf einem Embryonenlöffel in das Medium überführt und vollständig eingebettet. Je nach gewünschter Orientierung wurde es mit Hilfe eines Glasstabes ausgerichtet. Anschließend



wurden die einzelnen Förmchen auf Trockeneis gestellt. Nach vollständigem Durchfrieren wurden sie bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt.

#### 2.2.2.4. Anfertigung von Kryoschnitten

Die Kammer des Kryotoms wurde auf  $-25\text{ °C}$  und der Bereich des Messerblocks auf  $-20\text{ °C}$  eingestellt. Der Kryoblock wurde auf die dafür vorgesehene Platte des Hebelarms mit frischem Kryomedium angeklebt und durch die Innentemperatur des Kryotoms anschließend innerhalb fünf bis zehn Minuten angefroren. Nach Ausrichten des Kryoblockes konnten  $12\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte von ganzen Embryonen und oberen Extremitäten angefertigt werden, die auf silanisierte Objektträger gezogen wurden. Die Objektträger wurden zum Trocknen für 30 min auf eine  $37\text{ °C}$ -warme Heizplatte gelegt. Für die Aufbewahrung in Boxen, wurde diesen mit Zellstoff eingewickeltes Calciumchlorid in Pulverform zugefügt. Dieses soll eventuelle Gewebsschädigungen durch entstehendes Kondensationswasser verhindern. Die Boxen wurden bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 2.3. Material und Methoden der *In-Situ*-Hybridisierung mit Hilfe des TECAN Genesis RSP 150



Abb2.3.: Der Tecan Genesis RSP 150

### 2.3.1. Material und zugehörige Geräte

Die für die *In-Situ*-Hybridisierung benötigten Reagenzien sind im Punkt 2.1.4. aufgeführt.

Zu dem Automaten gehören ein Wasserbad Eco line 003 (Lauda), ein Wasserbad T1200 (Lauda) und ein Temperaturmesser E 20 (Lauda).

### 2.3.2. Methoden

#### 2.3.2.1. Ansetzen der Puffer

→ Die Puffer wurden alle in DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

##### PBST:

- 900 ml DEPC-H<sub>2</sub>O
- 100 ml 10x PBS (DEPC)
- 5 ml 10 % Tween 20 (DEPC)

##### 1x TNT:

- 100 ml 10x TN
- 0,05 % Tween 20
- A. bidest ad 1000 ml

##### 1x NTET

- 5x NTE (2,5 M NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 25 mM EDTA (pH 8,0)
- 10 % Tween 20 (DEPC)

##### TNB:

- 130 ml 1x TNT
- 0,5 % NEN-Blocking-Puffer

##### Jodacetamid:

- 65 ml NTET
- 241 mg Jodacetamid

##### α-Dig-POD, 1:600:

- 26 ml TNB
- 43,3 µl α-Dig-POD

##### MetOH/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

- 0,6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in MetOH

##### Schaf-Serum:

- 48 ml TNT
- 4 % Schaf-Serum in 1xTNT, sterilfiltriert

##### HCl:

- 0,2 M HCl
- 0,05 % Tween
- in DEPC-H<sub>2</sub>O

##### Maleat (MNT):

- 100 mM Maleic Acid
- 150 mM NaCl
- 0,05 % Tween 20
- pH 7,5 in A. bidest

##### PFA:

- 4 % PFA
- 0,05 % Tween 20
- in PBS

##### SAP (Streptavidin-Alkalische Phosphatase):

- SAP 1:750 in Maleatpuffer

##### PFA + Glutaraldehyd:

- 4 % PFA
- 0,05 % Tween 20
- 1 % Glutaraldehyd
- in PBS

##### 0,1x SSC:

- 0,1x SSC
- 0,05 % Tween 20
- in A. bidest

#### Proteinase K:

- 50 ml PBST
- 5 ml Proteinase K

#### Formamid 1:

- 50 % Formamid
- 2x SSC
- 0,05 % Tween20
- in A. bidest

#### Formamid 2:

- 50 % Formamid
- 1x SSC
- 0,05 % Tween20
- in A. bidest

#### TMN (=Substratpuffer):

- 0,1 M Tris, pH 9,5
- 0,1 M MgCl<sub>2</sub>
- 50 mM Levamisol
- in A. bidest

#### Substrat:

- 5 µl/ ml NBT
- 3,75 µl/ ml BCIP
- in TMN-Puffer

#### 5x SSC:

- 5x SSC
- 0,05 % Tween 20
- in A. bidest

#### 50x Denhardt:

- 1 % Ficole
- 1 % Polyvinylpyrrolidone
- 1 % BSA
- in DEPC-H<sub>2</sub>O
- Aliquots bei -20 °C lagern

#### Tyramid-Biotin:

- Tyramid-Biotin 1:50
- In Amplifikationspuffer aus dem Kit lösen

#### Probenpuffer:

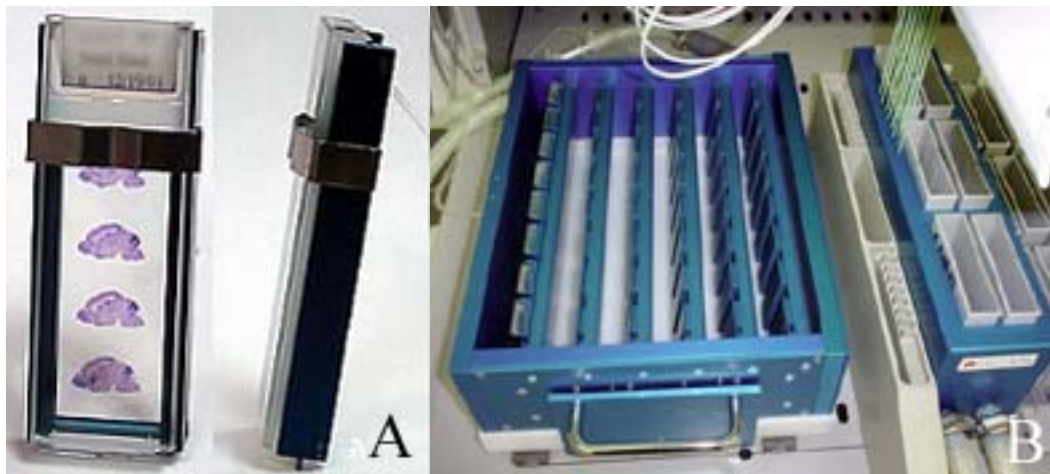
- 15 ml Hybmix:
- 20 g Dextransulfat
- 12 ml 5 M NaCl (DEPC)
- 4 ml 1 M Tris (pH 9)
- 2 ml 0,5 M EDTA (DEPC) (pH 8,0)
- vorsichtig erwärmen, lösen, dann abkühlen lassen
- + 4 ml 50x Denhardt
- + 100 mg tRNA (yeast), gelöst in 4 ml 0,1 M Tris (pH 8,0)
- ad 100 ml DEPC-H<sub>2</sub>O
- + 100 ml Formamid
- Aliquots à 200 ml bei -20 °C lagern
- 10 mM DDT (Dithiotriol)

### 2.3.2.2. *In-Situ*-Hybridisierung (*ISH*)

Mit Hilfe der *ISH* kann man nachweisen, an welchem Ort sich eine, zu einem bestimmten Gen gehörende, mRNA befindet. Während der *ISH* entsteht ein Doppelstrang aus der Sonde mit der komplementären mRNA. Durch die Detektion der Dig-markierten RNA-Sonde wird die gewebs- oder zellspezifische Expression sichtbar gemacht.

Die Objektträger (Slides) mit den sich darauf befindenden Schnitten wurden in spezielle Objektträgerhalter (Flow-through hybridisations chambers) eingebaut (siehe Abb.2.4.A). Diese bestanden aus einem Metallrahmen, auf den der Objektträger gelegt wurde. Zwischen diesem und einer dicken Glasplatte, die oben eine Tasche ausgespart hatte, wurde ein dünner Platzhalter (Spacer) an den Längsrändern eingelegt. Die Konstruktion hielt durch zwei Metallklammern zusammen. In die Taschen wurden die unterschiedlichen Flüssigkeiten gefüllt, die durch

Adhäsionskräfte in der Kammer gehalten wurden und kontrolliert durch die Kammer nach unten laufen konnten, wenn sie eine neue Flüssigkeit ersetzte.



**Abb. 2.4.: Objektträgerhalter und -kasten**

A: Objektträger in zusammengebautem Halter. B: Objektträgerhalter in der ersten Reihe des Temperaturkontrollierten Kastens. (Quelle: <http://www.genepaint.org>)

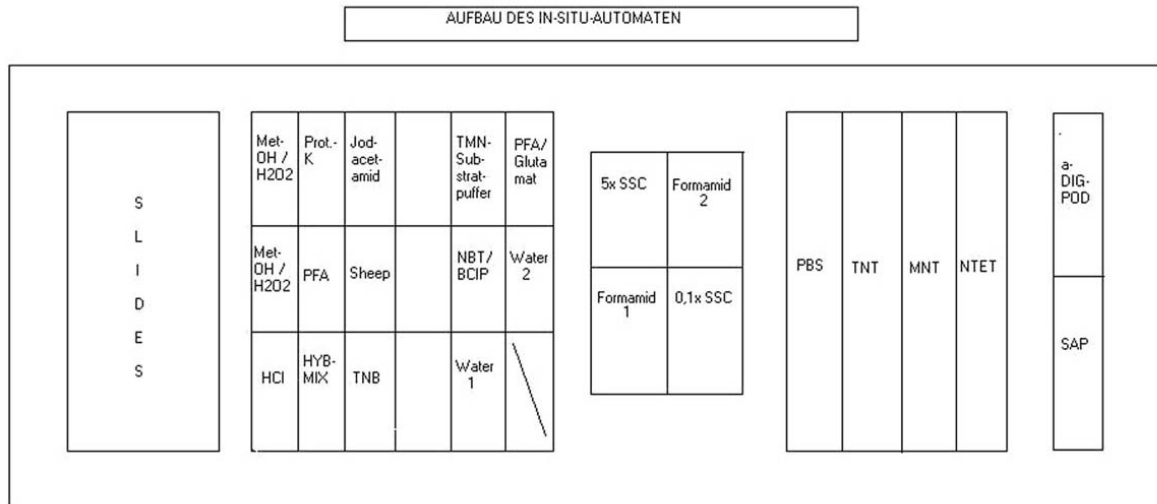
Die Objektträgerhalter wurden in einen Temperatur-kontrollierten Kasten (Abb. 2.4. B) auf dem Stecksystem des Automaten platziert (Abb. 2.5.). Die Flüssigkeiten wurden nun alle durch ein Computer-kontrolliertes Programm über den acht Pipettiernadeln fassenden Automatenarm zugegeben. Auch die Temperaturen der Wasserbäder und Kästen konnten über dieses Programm gesteuert werden. Der Sondenauftrag erfolgte manuell. Die komplette Prozedur mit 48 Objektträgern dauerte ca. 23 Stunden.

**Tab. 2.5.: Protokoll des Automaten**

| Tag 1  |         |        |              |            |
|--------|---------|--------|--------------|------------|
| Zyklen | Volumen | Zeit   | Reagenz      | Temperatur |
| 5      | 250 µl  | 6 min  |              | 24 °C      |
| 8      | 300 µl  |        | PBS          |            |
| 2      | 300 µl  | 4 min  | 0,2 M HCL    |            |
| 4      | 300 µl  |        | PBS          |            |
| 2      | 300 µl  | 8 min  | Proteinase K |            |
| 8      | 250 µl  |        | PBS          |            |
| 2      | 300 µl  | 10 min | 4 % PFA      |            |
| 8      | 300 µl  |        | PBS          | ↓          |
| 2      | 200 µl  |        | Hyb-Mix      | 64-65 °C   |
| 1      | 250 µl  | 6 h    | Sonden       | 66 °C      |
|        |         |        |              |            |
|        |         |        |              |            |

| Tag 2  |         |         |                     |            |
|--------|---------|---------|---------------------|------------|
| Zyklen | Volumen | Zeit    | Reagenz             | Temperatur |
| 4      | 300 µl  | 5 min   | 5x SSC              | 62-63 °C   |
| 6      | 350 µl  | 8 min   | Formamid 1          | 64 °C      |
| 4      | 350 µl  | 15 min  | Formamid 2          | ↓          |
| 5      | 300 µl  | 6 min   | 0,1x SSC            | ↓          |
| 3      | 300 µl  | 2 min   | NTET                | 22 °C      |
| 3      | 300 µl  | 5 min   | 20 mM Jodacetamid   |            |
| 4      | 300 µl  | 2 min   | NTE                 |            |
| 2      | 200 µl  | 45 min  | 4 % Schaf-Serum     |            |
| 9      | 200 µl  | 9 min   | TNT                 |            |
| 3      | 250 µl  | 20 min  | TNB                 |            |
| 2      | 200 µl  | 45 min  | antiDIG POD (1:600) |            |
| 8      | 200 µl  |         | TNT                 |            |
| 1      | 250 µl  | 30 min  | Tyramid-Biotin      |            |
| 8      | 300 µl  |         | MNT                 |            |
| 2      | 200 µl  | 30 min  | SAP                 |            |
| 8      | 300 µl  |         | MNT                 |            |
| 8      | 200 µl  |         | TNT                 |            |
| 2      | 200 µl  | 2 min   | TMN                 |            |
| 3      | 200 µl  | 20 min  | BCIP / NBT          |            |
| 4      | 250 µl  |         | H <sub>2</sub> O    |            |
| 2      | 200 µl  | 1 min   | TNT                 |            |
| 2      | 200 µl  | 7,5 min | 4 % PFA+ 1 % G/A    | ↓          |
| 2      | 300 µl  |         | PBS                 |            |
| 4      | 200 µl  |         | H <sub>2</sub> O    |            |
|        |         |         |                     |            |
|        |         |         |                     |            |

### 2.3.3. Aufbau des Automaten



**Abb. 2.5.: Aufbau des Automaten**

Dieser Aufbau bezieht sich auf die Gefäße, die sich auf der Steckplatte des Automaten befinden (Ansicht von oben auf die Steckplatte). Alle Gefäße wurden vor Gebrauch über Nacht mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefüllt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O ausgespült, um ein möglichst RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten.