

3 Material

3.1 Reagenzien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acryl-Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	ICN Biochemicals, Aurora, OH/USA
Agarose	Firma Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
bovine Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Caesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethanol _{abs.}	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	Biospa, Berlin
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Otto Norwald KG, Hamburg
Heringssperma-DNA	Firma Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
IPTG	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LumaSafe Plus	Lumac LSC, Groningen, NL
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Methyl-2-Butanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxyd	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Calbiochem, La Jolla/USA
Paraplast	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tribromethanol	Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	ICN Biochemicals, Aurora, OH/USA
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Otto Norwald KG, Hamburg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.2 Lösungen, Puffer und Medien

Allgemeine Lösungen und Puffer

PBS:

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	8mM
KH ₂ PO ₄	1,5mM

TAE-Puffer (50fach):

TRIS	40mM
EDTA	1mM
Na-Acetat	20mM
	pH7,8

TE-Puffer:

Tris	10mM
EDTA	0,1mM
	pH8,0

20x SSC:

NaCl	75,3g
Na-Citrat	88,2g
	ad H ₂ O 1l

niedrigsalz Puffer:

NaCl	0,4M
Tris HCl	20mM
EDTA	1mM
	pH7,4

hochsalz Puffer:

NaCl	1M
TrisHCl	20mM
EDTA	1mM
	pH7,4

Tail-Puffer:

EDTA	10mM
Tris pH8,0	50mM
SDS	0,5%
Proteinase K	0,1mg/ml

Ladepuffer für Agarosegele:

Ficoll 400	10g
EDTA pH8	10ml
SDS 10%	5ml
Xylen-Zyanol	125mg

ACD:

Tri-Natriumcitrat	2,5g
Zitronensäure (Monohydrat)	1,37g
Glucose	2,0g
	ad H ₂ O

Cholatextrakt:

Na-Deoxycholat	1%
Tris	10mM
EDTA	5mM
100ml DTT	10mM

Tyrode-Puffer:

StockI:

NaCl	16g
KCl	0,4g
NaHCO ₃	2g
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	0,116g
	ad H ₂ O

3,3fach Lämmli:

Tris HCl	220mM
SDS	3,3%
Glycerol	3%
Bromphenolblau	Spatelspitze
PyroninJ	Spatelspitze
100ml β-Mercaptoethanol	10%

StockII:

MgCl ₂ x6H ₂ O	2,03g
	ad H ₂ O

TBST:

100ml Tris	10 mM
NaCl	150mM
Tween	0,1%
pH 7,6	

StockIII:

CaCl ₂ x6H ₂ O	2,19g
	ad H ₂ O 100ml

StockI	5ml
StockII	1ml
StockIII	2ml
Hepes (0,5M)	1ml
BSA	350mg
Glucose	0,1g
	ad H ₂ O 100ml

Trenngelpuffer für PAGE-Gele:

Tris	0,25M
SDS	0,2%
pH6,8	

Sammelgelpuffer für PAGE-Gele:

Tris	0,75M
SDS	0,2%
pH8,8	

X-Gal

Dimethylsulfoxid 2ml
X-Gal 100mg
sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

X-Gal-Färbelösung

MgCl₂ 2mM
K₄[Fe(CN)₆] 35mM
K₃[Fe(CN)₆] 35mM
Nonidet P-40 0,02%
Na-Deoxycholat 0,01%
X-Gal 1mg/ml

3.3 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium:

Trypton 10g/l
Hefeextrakt 5g/l
NaCl 5g/l
pH7,4

LB-Agarplatten:

Trypton 10g/l
Hefeextrakt 5g/l
NaCl 5g/l
Agar-Agar 15g/l

Alle Medien werden bei 121°C und 1bar 45min dampfsterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 45-50°C werden 5mg/l Ampicillin zugegeben.

3.4 Modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Calf intestinal phosphatase	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
<i>Af</i> III	New England Biolabs
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs
<i>Eco</i> V	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	New England Biolabs
<i>Nhe</i> I	New England Biolabs
<i>Not</i> I	New England Biolabs
<i>Sal</i> I	New England Biolabs
<i>Spe</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i> II	New England Biolabs

<i>StuI</i>	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

3.5 Reagenziensysteme

DNA Sequencing Kit	Perkin Elmer-Applied-Biosystems, Warrington/GB
ECL Western Blotting System	Pharmacia, Heidelberg
Qiagen Tip 100, 500	Qiagen, Hilden
QuickHyb	Stratagene, Texas/USA
QiaexII-System	Qiagen, Hilden
DNA Labelling Kit	Amersham, Buckinghamshire/GB

3.6 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxyadenosin-5'-triphosphat	PeqLab, Erlangen
Desoxycytosin-5'-triphosphat	PeqLab, Erlangen
Desoxyguanosin-5'-triphosphat	PeqLab, Erlangen
Desoxythymidin-5'-triphosphat	PeqLab, Erlangen
1kb DNA-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Smart-Ladder	Eurogentec, Seraing/Belgien

3.7 Filter und Membranen

Nitrozellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
Whatman P81 Chromatographiepapier	Brandel, Gaithersburg, USA
Zeta-Probe	BioRad, Hercules, CA/USA
Elu-Tips	Schleicher & Schüll, Dassel

3.8 Radioaktive Substanzen

[α - ³² P]Adenosin-5'-triphosphat	New England Nuclear, Boston, MA/USA
[γ - ³² P]Adenosin-5'-triphosphat	New England Nuclear, Boston, MA/USA

3.9 Zellen und Organismen

DH5 α	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
DH10B	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

3.10 Antikörper und Immunreagentien

Anti-G α _{q/11} Antikörper	Santa Cruz, Santa Cruz, CA/USA
Anti-G α ₁₂ Antikörper	Charles River, Kisslegg
Anti-G α ₁₃ Antikörper	Santa Cruz, Santa Cruz, CA/USA
Anti-Kaninchen IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-vWillebrandt-Faktor Antikörper	Dako, Dänemark
CD4	Pharmingen
CD8	Pharmingen
CD21	Pharmingen
CD23	Pharmingen
B220	Pharmingen

3.11 Chirurgisches Nähmaterial

Catgut	Catgut GmbH, Markneukirchen
--------	-----------------------------

3.12 Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

Supplemente für die Zellkultur

DMEM high glucose	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
PBS	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
1x Trypsin/EDTA	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Transfektionsmedium	10mM HEPES in PBS
β -Mercaptoethanol	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
nicht essentielle Aminosäuren	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Glutamin	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
LIF	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
FCS	Biospa, Berlin
Nukleosidlösung	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
G418 Natriumsalz	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Gancyclovir	Syntex Cymeven

Heparin	Roche, Mannheim
ECGS	Sigma, Deisenhofen
Mitomycin C	Boehringer, Mannheim
Dispase	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt

3.13 Medien für die Zellkultur

Nukleosidlösung	80mg Adenosin 85mg Guanosin 73mg Cytidin 73mg Uridin 24mg Thymidin
-----------------	--

Die Substanzen werden bei 40°C in H₂O gelöst, serilfiltriert und bei 4°C gelagert.

ES-Zellmedium

500ml DMEM
0,1mM Glutamin
0,2mM nicht essentielle Aminosäuren
0,1mM β-Mercaptoethanol
1600u LIF
6ml Nukleosidlösung
1fach Penicillin/Streptomycin

Feedermedium

500ml DMEM
10% FCS
0,1mM Glutamin
0,2mM nicht essentielle Aminosäuren
0,1mM β-Mercaptoethanol
1fach Penicillin/Streptomycin

Endothelzell-Medium

8ml DMEM
1ml FCS
100µl ECGS
20µl Heparin
0,2ml Penicillin/Streptomycin
100µl Glutamin
100µl nicht essentielle Aminosäuren

3.14 Hormone und Narkotika

Pregnant Mares Serum (PMS)	Sigma, Deisenhofen
Human Choriongonadotropin (HCG)	Sigma, Deisenhofen
Pentobarbital	Sigma, Deisenhofen
Ketenast	Medistar, Holzwickede
Xylazin	Parke-Davis GmbH, Berlin

3.15 Materialien für die Mikroinjektion und den Embryotransfer

Injektionskapillaren	Eppendorf, Hamburg
Haltekapillaren	Eppendorf, Hamburg
Transferkapillaren	Eppendorf, Hamburg
Injektionskammer	Nunc, Wiesbaden
Injektionsmikroskop	Leica, Nussloch
Injektionsmedium (M2)	Sigma, Deisenhofen
Mikromanipulator	Leica, Nussloch
Mikrotropfenkultur (M16)	Sigma, Deisenhofen
Paraffinöl	Sigma, Deisenhofen
Wundclips	Clay Adams
Applikator	Clay Adams

3.16 Verwendete Primer

PFL13A	5' TTC AGT TTA CAG TTA CAG TTG AGC 3'
PFL13B	5' TCC CAG TAG GTG CGT CAG TAC C 3'
13Seq1	5' GCA CTC TTA CAG ACT CCC AC 3'
13Seq11	5' CTG AGT GGT TAA GGA GTC ACC 3'
13Seqlox3.2	5' GCC ACA GAG GGA TTC AGC AC 3'
TK	5' CTT CCT CTT GAA AAA ACC ACA CTG C 3'
3'f	5' CTG TGC TCT TGT TGT TCC G 3'
3'r	5' AGA GGA CAG GAC AGG GTG TGT GAC AG 3'
lox f	5' TCA CAA GTG ACT ACT TGA GTC TG 3'
lox r	5' GCT GTG TTC AGT CTG CCT TAA TGC 3'