

7. Material

7.1. Laborgeräte

Äkta/FPLC	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Beta-Counter 1450 MikroBeta	Perkin Ellmer Wallac GmbH, Freiburg
Cell Harvester	INOTECH, Schweiz
ELISA-Reader MRX	Dynatech, Denkendorf
Glasröhre	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Thermocycler PCR System 9700	Perkin Ellmer Wallac GmbH, Freiburg
Ultraschallgerät HD 200	Bandelin, Berlin
UV Stratalinker 1800	Stratagene, USA
Video-Dokumentationsgerät E.A.S.Y.RH	Herolab, Wiesloch

7.2. Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einwegkanülen	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einwegpasteurpipetten	Corning Incorporated, USA
Einwegspritzen	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
ELISA-Platten (Maxisorp)	Nunc, Wiesbaden
HiTrap Chelating HP-Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrap NHS-activated HP-Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kodak Scientific Imaging Film	Sigma, Deisenhofen
Kryotubes	Greiner, Nürtingen
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 und 0,5 ml)	Rapidozym, Berlin
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Superdex 200 10/300 GL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturplatten	Costar, Bodenheim

7.3. Reagenzien

³ H-Thymidin	ICN, Eschwege
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Antibiotika	Applichem, Darmstadt
Agar	Roth, Karlsruhe
Aluminium Hydroxide Fluid Gel	Reheis, Irland
APS	Roth, Karlsruhe
Brij 35	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Applichem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
chromogene Substrate	Bachem, Heidelberg
	Sigma, Deisenhofen
Concanavalin A	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Coomassie Blau R-250	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

DEPC	Roth, Karlsruhe
Dimethyl-Formamid	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker HyperLadder I	Bioline GmbH, Luckenwalde
DNA-Marker 1 kb DNA Ladder	Rapidozym, Berlin
dNTP	Rapidozym, Berlin
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Applichem, Darmstadt
EDTA	Applichem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt
FCS	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	Serva, Heidelberg
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Applichem, Darmstadt
IPTG	Roth, Karlsruhe
Ketaminhydrochlorid	Pharmacia, Erlangen
Kodak Readymatik, Fixierbad	Kodak, Frankreich
Kodak Readymatik, Entwicklungslösung	Kodak, Frankreich
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin
Phytohemagglutinin PHA-P	Sigma, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt/M
RPMI 1640	Gibco BRL, Karlsruhe
Salze	verschiedene
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Tween 80	Serva, Heidelberg
Xylazinhydrochlorid	Bayer Health Care, Leverkusen
Xylencyanol	Applichem, Darmstadt

7.4. Enzyme

<i>Alu</i> I	NEB, Frankfurt/M
Antitrypsin	Sigma, Deisenhofen
<i>Bam</i> H I	NEB, Frankfurt/M
Cathepsin G	Athens Research, USA
Chymotrypsin	Sigma, Deisenhofen
<i>Eco</i> R I	NEB, Frankfurt/M
<i>Eco</i> R V	NEB, Frankfurt/M
<i>Hae</i> III	NEB, Frankfurt/M
<i>Hind</i> III	NEB, Frankfurt/M
Humane Neutrophilen Elastase	Athens Research, USA
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
<i>Nde</i> I	NEB, Frankfurt/M
<i>Not</i> I	NEB, Frankfurt/M
Papain	Sigma, Deisenhofen
Porcine Pankreas Elastase	Sigma, Deisenhofen
<i>Pst</i> I	NEB, Frankfurt/M
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase out	Promega, Heidelberg
<i>Sac</i> I	NEB, Frankfurt/M

Shrimp Alkaline Phosphatase	USB Corporation, USA
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt/M
Taq-Polymerase	Rapidozym, Berlin
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
<i>Xba</i> I	NEB, Frankfurt/M
<i>Xho</i> I	NEB, Frankfurt/M

7.5. Kommerzielle Kits

Advantage® RT-for-PCR Kit	BD Bioscience, Hilden
BCA™-Protein Assay Kit	Pierce, USA
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD Bioscience, Hilden
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche, Mannheim
Nucleo Trap® Gel Extraction Kit	CLONTECH, Heidelberg
NucleoBond® Plasmid Midi Kit	CLONTECH, Heidelberg
NucleoSpin® Nucleic Acid Purification Kit	CLONTECH, Heidelberg
NucleoSpin® Plasmid Kit	CLONTECH, Heidelberg
OPTEIA™ (IL-10)	BD Bioscience, Hilden
pGEM-T Easy Vector System	Promega, Heidelberg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

7.6. Synthetische Oligonukleotide

Ce-Serpin

Forward-Primer	5' > CTg gTT CAT gTA gCg gCA <3'
Reverse-Primer	5' > CAg CCg gAA gTA gTA ATC <3'

A. viteae

SerpMotif forward	5' > gAR RAA ggA ACC gAA gCW gCA g <3'
SerpSig 1 forward	5' > gCT AAT CAT CCC TTC CTT TAT gCC <3'
SerpSig 2 forward	5' > TgC YgA TCA TCC HTT CCT WTT CgC CAT <3'
SerpSig 1 reverse	5' > gTA ggg AAg gAA ATA CgT TAG <3'
SerpSig 2 reverse	5' > AAg RCT AgT Agg DAA ggA WAA gCg gTA <3'

AvKlon 1

Forward-Primer 1	5' > CAg TCg TCg ATg CTA ACC <3
Forward-Primer 2	5' > ATT AAA CgA CAT CAA gCA TTC TCg CCg <3'
Reverse-Primer 2	5' > CgT TAC AAT CgT CAC TTT AAT AAA gAA gTA <3'
Forward-Primer 3	5' > ATT AAA CgA CAT CAA gCT <3'
Reverse-Primer 3	5' > TAA TTT gCT gTA gTT CgT <3'

Av-Serpin

Forward-Primer	5' > g gAA TTC TCA CCC gCg ACT ACA CCC CgA <3'
Reverse-Primer	5' > TTC TTT TCT TAT TTC TTC TCT gAg CTC gCC <3'

Et-Serpin

Forward-Primer	5' > CgC ggA TCC ATg gCT CTg TTg AgT AAg <3'
Reverse-Primer	5' > ggC CgT CgT gTC gTC ATT gAg CTC gCC <3'

SL	5' > ggT TTA ATT ACC CAA gTT TgA g <3'
T3	5' > ATT AAC CCT CAC TAA Ag <3'
T7	5' > AAT ACg ACT CAC TAT Ag <3
Oligo (dT) ₁₅	

7.7. Plasmide, cDNA/RNA und *E. coli*-Stämme

Plasmide

pGEM-T Easy	Promega, Heidelberg
pET 28a(+)	Novagen, Darmstadt
pBlueskript (SK+)	Stratagene, Heidelberg

cDNA

<i>A. viteae</i> -Weibchen-cDNA-Bank	Ralf Adam
<i>E. tenella</i> -Oocysten-RNA	Christian Klotz

E. coli-Stämme

BL21 (DE3)	Stratagene, Heidelberg
JM 109	Stratagene, Heidelberg
SOLR	Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg

7.8. Puffer und Lösungen

7.8.1. RT-PCR

DEPC Wasser	0,1% DEPC
-------------	-----------

7.8.2. Agarosegelelektrophorese

6 x Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin
10 x TAE Stock	48,4 g Tris-HCl 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 11,4 ml Eisessig ad 1 l dH ₂ O
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in dH ₂ O

7.8.3. Plasmidpräparation

TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
-------------------	-----------------------------

7.8.4. Medien

LB-Medium (flüssig)	10 g Trypton 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt ad 1 l dH ₂ O
LB-Medium (fest)	LB-Medium (flüssig) 1,5% Agar-Agar

LB/MgSO ₄ -Medium (fest)	LB-Medium (fest) 10 mM MgSO ₄
SOB-Medium, pH 7,0	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 M NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ ad 1 l dH ₂ O
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glukose
Top-Agar	LB-Medium (flüssig) 0,7% Agarose
YT-Medium	1 g NaCl 1 g Hefeextrakt 1,6 g Trypton ad 100 ml dH ₂ O
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in Dimethyl-Formamid
IPTG-Stammlösung	1 M in dH ₂ O

7.8.5. Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung (1000 x)	100 mg/ml in dH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung (1000 x)	50 mg/ml in dH ₂ O
Chloramphenicol-Stammlösung(1000 x)	34 mg/ml in dH ₂ O
Tetracyclin-Stammlösung (1000 x)	12,5 mg/ml in Ethanol abs.

7.8.6. SDS-PAGE

2 x Probenpuffer	10% Glycin 100 mM Tris-HCl 3% SDS 5% β-Mercaptoethanol 0,002% Bromphenolblau
Laufpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0,1% SDS
Puffer L, pH 8,4	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS
Puffer M, pH 6.8	0,5 M Tris-HCl 0,4% SDS
APS	10% Ammoniumpersulfat
Sammelgel, 6%	1,25 ml Puffer M 0,75 ml Acrylamid-Lösung

	2 ml dH ₂ O 5 µl TEMED 50 µl APS
Trenngel, 10%	2,5 ml Puffer L 3,3 ml Acrylamid-Lösung 4.1 ml dH ₂ O 10 µl TEMED 100 µl APS
Trenngel, 12%	2,5 ml Puffer L 4 ml Acrylamid-Lösung 3,5 ml dH ₂ O 10 µl TEMED 100 µl APS
Coomassie-Färbelösung	10% Essigsäure 20% Ethanol 0,2% Coomassie R250
Coomassie-Entfärbelösung	10% Essigsäure 20% Ethanol
7.8.7. Western-Blot	
Transferpuffer Tank-Blot	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 10% Methanol
Transferpuffer Semi-Dry-Blot	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol
TBS, pH 7,4	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl
TBS+Triton	TBS 0,2% Triton X-100
Entwicklungspuffer, pH 9,5	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Entwicklungslösung	33 µl BCIP 66 µl NBT ad 10 ml Entwicklungspuffer
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
NBT-Stammlösung	50 mg/ml in 70% Dimethylformamid
7.8.8. Plaque Screening	
MS 1-Puffer, pH 7,5	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl
MS 3-Puffer, pH 9,5	0,1 M Tris-HCl

	0,1 M NaCl
20 x SSC, pH 7	175,2 g NaCl 88,4 g Natrium-Citrat
Waschpuffer, pH 7,5	0,3 % Tween 20 in MS 1-Puffer
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer, pH 7,4	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl
Detektionspuffer, pH 9,5	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl
SM-Puffer	5,8 g NaCl 2 g MgSO ₄ 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 5 ml 2% Gelatine ad 1 l dH ₂ O

7.8.9. Löslichkeitstest von Proteinen

PBS, pH 7,4	171 mM NaCl 3,4 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Puffer I	PBS 0,1% Triton X-100
Puffer II	PBS 0,1% CTAB
Puffer III	PBS 15 mM Imidazol
Puffer IV, pH 8	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl

7.8.10. Proteinaufreinigung

rCe-Serpin, rEt-Serpin

Lysispuffer, pH 8	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl
Waschpuffer I, pH 8	6 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl 20 mM Imidazol
Waschpuffer II, pH 8	4 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄

	10 mM Tris-HCl
	20 mM Imidazol
Waschpuffer III, pH 8	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer, pH 8	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl 250 mM Imidazol
rAv-Serpin	
Lysispuffer, pH 7,4	PBS 10 mM Imidazol
Elutionspuffer, pH 3	PBS 20 mM Imidazol
natives <i>A. viteae</i>-Serpin	
Kopplungspuffer, pH 8,3	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl
Waschpuffer A, pH 8,3	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl
Waschpuffer B, pH 4	0,1 M Natrium-Acetat 0,5 M NaCl
Elutionspuffer, pH 2	0,2 M KCl
Dialysepuffer, pH 7,4	PBS

7.8.11. Aktivitätstests

Protease-Puffer

Trypsin-Puffer	1 mM HCl
Chymotrypsin-Puffer	1 mM HCl
Cathepsin G-, HNE-Puffer, pH 5,5	50 mM Natrium-Acetat 150 mM NaCl
PPE-Puffer, pH 8	100 mM Tris-HCl
Papain-Puffer, pH 6,8	0,2 M K ₂ HPO ₄ 0,2 M KH ₂ PO ₄ 4 mM EDTA 4 mM DTT 0,01% Brij 35

7.10. Tiere

BALB/c-Mäuse

OVA –Mäuse, Stamm TGN Do 11.10

Meriones unguiculatus

C. elegans

A. viteae

E. tenella-Merozoiten

BGVV, Berlin

Dr. Kamradt, DRFZ Berlin

hauseigene Zucht

Caenorhabditis genetic centre, USA

hauseigener Zyklus

Christian Klotz