

8 Materialien

8.1 Reagenzien

8.1.1 Reagenzien für die Blutentnahme, Isolierung von PBMC, Magnetische Zellseparation und Durchflusszytometrie

antiCD 14-PerCP, #345786	BD Biosciences, Heidelberg
antiIgG _{2a} -FITC, #349051	BD Biosciences, Heidelberg
antiIgG _{2a} -PerCP, #349054	BD Biosciences, Heidelberg
antiTLR 2	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
antiTLR 4	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
antiTLR 2-FITC	Biocarta, Hamburg
antiTLR 4-FITC, Clone HTA 125	Biocarta, Hamburg
antiTLR 2	Apotech, Epalinges, CH
antiTLR 4	Apotech, Epalinges, CH
<i>Beriglobin</i> ®, humanes Immunglobulin	Chiron Behring, Marburg
Bovines Serumalbumin, BSA, Fraktion V	Serva, Heidelberg
CD14 <i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD19 <i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
<i>FACS Sheath</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACS Rinse</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACS Safe</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Lösung, <i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom, Berlin
Liquemin®N 25000 I.E.	Roche, Mannheim
Phosphatpuffer (PBS) ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen

8.1.2 Reagenzien für die Stimulationen mit Pam-3-Cys und LTA sowie den TNF- α -ELISA

Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>DuoSet</i> ® ELISA, humanes TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Lipoteichonsäure (LTA), <i>Staphylococcus aureus</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Dr. med. R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin
Medium <i>RPMI 1640</i>	Biochrom AG, Berlin
Tri-acyliertes Lipopeptid (Pam-3-Cys)	EMC microcollections GmbH, Tübingen
Phosphatpuffer (PBS) ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Substratlösungen A und B	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Tween 20 pure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

8.1.3 Reagenzien für die RNA-Extraktion, DNase-Verdau, Reverse Transkription, cDNA-Quantifizierung und Gelelektrophorese

2-Hydroxyethylmercaptan (β -Mercaptoethanol)	Sigma, Deisenhofen
50 x TAE-Puffer	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Agarose, Ultra Pure	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
<i>AMV Reverse Transcriptase</i>	Promega, Mannheim
DNA-Standard, <i>Molecular Weight Marker XIII</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I, 1U/ μ l	Invitrogen, Mannheim
Ethanol, absolut, unvergällt	J. T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid, 10 mg/ml Ultra Pure	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Oligo-dT-Primer	Tib Molbiol, Berlin
<i>OliGreen® ssDNA Quantitation Kit</i>	Molecular Probes, Leiden, NL
<i>Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit</i>	Qiagen, Hilden
Natriumdiphosphat, Na ₄ P ₂ O ₇	Merck, Darmstadt
<i>Random Primers</i>	Promega, Mannheim
<i>Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor</i>	Promega, Mannheim
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen, Hilden
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega, Mannheim
<i>SuperScript™II RT Kit</i>	Invitrogen, Mannheim

8.1.4 Reagenzien für die real-time-PCR

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
<i>SureMaster LightCycler Kit</i>	Congen Biotechnologie GmbH, Berlin
Oligonukleotide	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
<i>TaqMan™</i> Sonden	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin

Tabelle 8: Oligonukleotide

Gen	GenBank®- Nummer	Name des Primers	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Länge des Primers in bp	Quelle
<i>Toll-like</i> Rezeptor 2 (TLR2)	NM 003264.2	TLR2 for	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG	21	[22]
		TLR2 rev	AGGCGGACATCCTGAACCT	19	
<i>Toll-like</i> Rezeptor 4 (TLR4)	NM 003266.2	TLR4 II for	GCAGTGAGGATGATGCCAGGAT	22	<i>Primer Premier®</i>
		TLR4 II rev	CCCAGCTTTCTGGTCTCACG	20	
<i>Toll-like</i> Rezeptor 9 (TLR9)	NM 017442.2	TLR9 for	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA	21	[22]
		TLR9 rev	AAGCTCGTT GTACACCCAGTCT	22	
β_2 -Mikroglobulin (β_2 M)	NM 004048.1	β_2 M for	GAGTATGCCTGCCGTGTG	18	[117]
		β_2 M rev	AATCCAAATGCGGCATCT	18	
Glyceraldehyd-3- Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	NM 002046.2	GAPDH for	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	19	[117]
		GAPDH rev	GAAGATGGTGATGGGATTC	20	
		OdT	TTTTTTTTTTTTTTTT	15	

Tabelle 9: TaqMan™ Sonden

Gen	GenBank®- Nummer	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Gekoppeltes Fluorochrom	Länge der Sonde in bp	Quelle
<i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR2)	2 NM 003264.2	TCCATCCCATGTGCGTGG CC	5' FAM ¹ 3' TAMRA ²	20	[22]
<i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR4)	4 NM 003266.2	TGTCTGCCTCGCGCCTGGC	5' FAM 3' TAMRA	19	[22]
<i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR9)	9 NM 017442.2	ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGA CAAA	5' FAM 3' TAMRA	26	[22]
β ₂ -Mikroglobulin (β ₂ M)	NM 004048.1	CCTCCATGATGCTGCTTACATG TCTC	5' FAM 3' TAMRA	26	[117]
Glyceraldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	NM 002046.2	CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC	5' FAM 3' TAMRA	20	[117]

8.1.5 Reagenzien für die Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE

Phadia CAP System™ IgE FEIA

Phadia Diagnostics, Uppsala, SWE

Phadia CAP System™ SXI FEIA

Phadia Diagnostics, Uppsala, SWE

8.2 Materialien und Geräte

Analysewaage *MCI analytic AC120S*

Sartorius GmbH, Göttingen

Agarosegelkammern

Bio-Rad Laboratories, München

Autoklav 24

Melag Medizintechnik, Berlin

autoMACS

Miltenyi, Bergisch Gladbach

ELISA-Mikrotiterplatten, 96-Loch, Flachboden

Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden

FACScan

BD Biosciences, Heidelberg

LightCycler

Roche, Mannheim

LightCycler Glaskapillaren

Roche, Mannheim

LightCycler Kühlblock

Roche, Mannheim

Mikroskop *Axiovert 10*

Carl Zeiss AG, Oberkochen

¹ FAM: 6-Carboxyfluorescein

²TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin

Mikrotiterplatten <i>Cellstar</i> ®, 96-Loch, für Suspensionskulturen	Greiner Labortechnik, Solingen
Mikrotiterplatten-Leser <i>Fluoro 320</i> (ELISA)	MWG Biotech, Ebersberg
Mikrotiterplatten-Leser <i>MRX</i> (cDNA)	Dynex Technologies, Denkendorf
pH-Meter <i>MV 870</i>	Präcitronic, Dresden
Plattenzentrifuge	Heraeus Sepatech, Osterode/Harz
Präzisionswaage <i>Sartorius universal</i>	Sartorius GmbH, Göttingen
Thermomixer <i>5436</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge <i>5417C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank	Melag Medizintechnik, Berlin
Schüttler <i>MTS4</i>	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Spannungsgerät <i>Power Pac 300</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Ultraviolett Transilluminator	UVP, Cambridge, UK
Vortexer <i>REAX 2000</i>	Heidolph, München
Zellzählgerät <i>Casy® ITT</i>	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge <i>Minifuge RF</i>	Heraeus Sepatech, Osterode/Harz

8.3 Verwendete Computerprogramme

<i>CellQuest</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Revelation</i> Version G.32	Dynex Technologies, Denkendorf
<i>Excel 2000</i>	Microsoft Corporations, Unterschleißheim
<i>Grab It</i> , Version 2.0	UVP, Cambridge, UK
<i>KC 4</i> , Kineticalc for Windows, Version 2.5	Bio-Tek Instruments, St. Quentin en Y., F
<i>LightCycler</i> Software, Version 3.5	Roche, Mannheim
<i>PrimerPremier</i>	Biosoft International, Palo Alto, USA
<i>SPSS 10.1</i> für Windows	Microsoft Corporations, Unterschleißheim
<i>Word 2000</i>	Microsoft Corporations, Unterschleißheim