

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Präparationen

5.1.1. Präparation von leichten Membranen und Synaptosomen

(Phelan und Gordon-Weeks, 1997)

Allgemeine Bemerkungen:

- a) alle Arbeitsschritte werden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt
- b) für sämtliche Zentrifugationsschritte werden Kühlzentrifugen verwendet. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 4°C durchgeführt.

Von der Dura mater befreites und grob zerkleinertes Rückenmark (frisch oder tiefgefroren, Schwein oder Ratte) wird zusammen mit Puffer 1 (10 ml Puffer/g Gewebe) in den Glaskolben eines Gewebe-Homogenisators gefüllt und unter Eiskühlung, über 12 Züge bei 900 Umdrehungen pro Minute, mit einem, in einem Potter S eingespannten, Teflon-Pistill (0.10 mm - 0.15 mm Toleranz) homogenisiert. Das Homogenat (H) wird in Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 min. bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand (S1) wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pellet (P1) wird in Puffer 1 aufgenommen, in den Glaskolben des Gewebe-Homogenisators überführt und für weitere 12 Züge, bei 900 rpm (rounds per minute), im Potter homogenisiert. Das Homogenat wird erneut in Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 min. bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand (S1[`]) wird abgenommen und mit dem Überstand aus der ersten Zentrifugation vereinigt (S1+S1[`]). Das Pellet (P1[`], hauptsächlich Zellkerne) wird verworfen. Die beiden vereinigten Überstände S1 + S1[`] werden für 15 min. bei 12 000 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand (S2, lösliche Proteine) wird abgenommen und verworfen, das Pellet (P2) in Puffer 1 (5 ml Puffer/g Gewebe) resuspendiert und ein weiteres Mal über 6 Züge, bei 900 rpm, im Potter homogenisiert. Das Homogenat wird für 20 min. bei 12 000 g zentrifugiert. Der Überstand (S2[`]) wird abgenommen und verworfen. Das Pellet (P2[`]) wird in Puffer 2 resuspendiert (1.5 ml Puffer/g Gewebe) und vorsichtig auf einen, zwischenzeitlich präparierten, diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten (0.85 M / 1.0 M / 1.2 M Sucrose) geschichtet. Die überschichteten Gradienten werden für 2 h bei 85 000 g zentrifugiert.

Während der Zentrifugation trennen sich die im P2[`] enthaltenen, subzellulären Bestandteile ihrer Dichte entsprechend auf. Das Myelin verbleibt auf der Oberfläche des Gradienten zurück, die leichten Membranen konzentrieren sich an der Phasengrenze 0.85 M / 1 M

Sucrose, Synaptosomen an der Phasengrenze 1.0 M / 1.2 M Sucrose, die Mitochondrien pelletieren am Boden der Zentrifugen-Röhrchen.

Die leichten Membranen und Synaptosomen werden mit einer geweiteten und abgeflamnten Pasteur-Pipette geerntet. Zur Entfernung der Sucrose wurden die einzelnen Fraktionen durch die Zugabe von PBS auf eine Sucrose-Konzentration von annähernd 0.32 M verdünnt und für 10 min. bei 10 000 g zentrifugiert. Die pelletierten subzellulären Bestandteile werden in Protease Inhibitor-haltigem PBS resuspendiert und bis zur Bestimmung ihrer Proteinkonzentration auf Eis gelagert.

Verwendete Lösungen:

Puffer 1:	Sucrose	0.32 M
	Hepes, pH 7.4	5 mM
	Protease Inhibitoren*	
Puffer 2:	Sucrose	0.32 M
	Tris-HCl pH 8.1	5 mM
	Protease Inhibitoren	
PBS:	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM

* Protease Inhibitor: Complete von der Fa. Roche, 1 kleine Tablette auf 25 ml Puffer, 1 große Tablette auf 50 ml Puffer.

5.1.2. Hyaluronidase-Extraktion nicht-löslicher Bestandteile subzellulärer Fraktionen

Jeweils 1 mg Protein aus jeder Fraktion der Synaptosomen-Präparation wurde für 30 min. bei 436 000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen, die Pellets in Protease Inhibitoren und 0.15 M NaCl haltigem 0.05 M $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ Puffer, pH 5.3 aufgenommen und mit einem Glas/Glas-Homogenisator (0.1mm Toleranz) per Hand resuspendiert. 250 µg Protein pro Fraktion wurden mit 50 U Hyaluronidase kombiniert und in einem Thermoschüttler für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Fraktionen für 10 min. bei 10 000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa konzentriert. Für die Analyse der Versican Immunreaktivität oder IB₄-Reaktivität im Westernblot wurden jeweils 15 µg Protein pro Fraktion verwendet.

5.1.3. Neurofilament-Präparation (Hayes et al., 1997)

Von der Dura mater befreites und grob zerkleinertes Schweine-Rückenmark wird zusammen mit dem gleichen Volumen isotonem Puffer für 5 x 5 sek. bei maximaler Geschwindigkeit im Waring blender homogenisiert. Das Homogenat wird für 30 min. bei 17 500 g zentrifugiert. Der Überstand (S1) wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pellet wird erneut in einem gleichen Volumen isotonem Puffer aufgenommen und ein weiteres Mal für 5 x 5 sek. bei maximaler Geschwindigkeit im Waring blender homogenisiert. Das Homogenat wird für 30 min. bei 17 500 g zentrifugiert. Der Überstand (S2) wird abgenommen, mit dem Überstand S1 vereinigt und direkt im Anschluss an die Zugabe eines äquivalenten Volumens Ernte-Puffer für 17 h bei 77 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, das gelatinöse Pellet in Start-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und auf eine mit Start-Puffer prä-äquilibrierte Mono-Q-Säule überführt. An die Säulenmatrix gebundene Proteine werden mit 90 ml eines linearen, reziproken Gradienten von 8-4 M Harnstoff und 0-500 mM NaCl und einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min. über insgesamt 90 Minuten in einen Fraktionssammler eluiert. Alle Fraktionen werden in Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa auf isotone Pufferbedingungen eingestellt und konzentriert.

Nach der Proteinbestimmung sämtlicher Fraktionen werden die Fraktionen in der SDS-PAGE (7.5 % Trenngel) auf ihre Reinheit analysiert. Fraktionen einzelner Neurofilamente mit ausreichender Qualität werden vereinigt, mit einem äquivalenten Volumen 2 mM DTT und 40 % (w/w) Glycerin gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

Isotoner Puffer:	$\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7	10 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	2 mM
	NaCl	150 mM
	Protease Inhibitoren	
Ernte Puffer:	$\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 7	10 mM
	Sucrose	1.7 M
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Protease Inhibitoren	
Start-Puffer:	Tris-HCl, pH 6.8	10 mM
	Harnstoff	8 M
	β -Mercaptoethanol	0.1 % (w/v)
End-Puffer:	Tris-HCl, pH 6.8	10 mM
	Harnstoff	4 M
	NaCl	500 mM
	β -Mercaptoethanol	0.1 % (w/v)

5.2. Proteinbestimmung

5.2.1. Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann

(Schaffner und Weissmann, 1973)

10 µl der Lösung, deren Proteingehalt ermittelt werden soll, werden in einem Eppendorfgefäß mit 260 µl H₂O, 30 µl Lösung A und 60 µl Lösung B vermischt. Die Lösung wird auf einen auf einer Glasfritte aufliegenden und vorher mit H₂O befeuchteten NC-Membranfilter (0.45 µm Dicke, 25 mm Durchmesser) pipettiert, unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und mit etwa 1 ml Lösung C nachgewaschen. Der Membranfilter wird zunächst für etwa 2 Minuten mit Lösung D gefärbt und anschließend durch das Waschen mit Lösung E wieder entfärbt. Der zurückbleibende, proteinhaltige Farbfleck auf der Membran wird mit einer Schere ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Lösung F für 1 h bei RT im Schüttler eluiert. Zur Bestimmung des Proteingehalts wird das Eluat bei 630 nm photometrisch vermessen.

Zur Kalibrierung der Messung wird eine Eichreihe mit BSA (0-10 µg Protein) erstellt. Die Proben der Eichreihe werden parallel zu den Proben unbekannter Proteinkonzentration im Photometer vermessen.

Verwendete Lösungen:

Lösung A:	Tris/HCl, pH 7.5	1 M
	SDS	1 % (w/v)
Lösung B:	TCA	60 % (w/v)
Lösung C:	TCA	6 % (w/v)
Lösung D:	Amidoschwarz 6 B	0.1 % (w/v)
	Methanol	45 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)
Lösung E:	Methanol	90 % (v/v)
	Eisessig	2 % (v/v)
Lösung F:	NaOH	25 mM
	EDTA	50 µM
	Ethanol	50 % (v/v)

5.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Ein Aliquot der Probe, deren Proteinkonzentration bestimmt werden soll, wird mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 500 μ l aufgefüllt. Anschließend werden 500 μ l Bradford-Reagenz hinzugefügt und die Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm photometrisch vermessen.

Zur Kalibrierung der Messung wird eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Dazu werden wässrige Lösungen von BSA mit 0 – 20 μ g BSA / 500 μ l Ansatz mit 500 μ l Bradford-Reagenz aufgefüllt und parallel zu den Proben unbekannter Proteinkonzentration im Photometer vermessen.

Über die Korrelation mit den Werten der Eichreihe wird die Proteinmenge und Konzentration der Probe ermittelt.

Bradford-Reagenz:	Coomassie Brilliant Blue G-250	0.01 % (w/v)
	Ethanol	4.7 % (w/v)
	Phosphorsäure	8.5 % (w/v)

Alternativ kann auch eine Lösung von 0.006 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 in 3 % (w/v) Perchlorsäure verwendet werden.

5.3. Gelelektrophorese

5.3.1. Diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Nahezu alle Proben werden mit den vertikalen Elektrophorese-Gelsystemen der Firma Biorad analysiert. Die Dimensionen der so genannten Minigele betragen 8.3 cm x 7.3 cm, die Dicke der Flachgele lässt sich durch die Wahl zwischen Abstandshaltern mit 0.075 oder 0.15 cm Dicke variieren. Auch die Anzahl der Proben, die während eines Laufes analysiert werden können, lässt sich über die Wahl zwischen Kämmen mit 10 oder 15 Zähnen variieren. Abhängig von der Wahl der Abstandshalter und des verwendeten Kamms können somit Proben mit einem Proteingehalt von 20 – 40 µg Protein pro Gelspur aufgetrennt werden.

Im Allgemeinen werden 7.5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (AA/Bis) haltige Trenngele und 3 % (w/v) AA/Bis haltige Sammelgele verwendet. Die zu analysierenden Proben werden zunächst durch die Zugabe von Probenpuffer und einer 10 minütigen Inkubation bei 60°C im Thermoschüttler denaturiert und anschließend mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10 bis 20 mA pro Gel.

Trenngel:	AA/Bis (37.5:1)	7.5 % (w/v)
	Tris/HCl pH 8.8	375 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
	APS	1 mg/ml
	TEMED	1 µl/ml
Sammelgel:	AA/Bis (37.5/1)	3 % (w/v)
	Tris/HCl pH 6.8	125 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
	APS	1 mg/ml
	TEMED	1 µl/ml
Elektrophorese-Puffer:	Tris/HCl pH 8.3	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
Probenpuffer:	Tris/HCl pH 6.8	62.5 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
	SDS	3 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.0025 % (w/v)

5.3.2. Coomassie Färbung von Acrylamidgelen (Hames, 1990)

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu visualisieren, wird das Polyacrylamidgel zunächst für 1 h bei RT in einer den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue enthaltenden Lösung geschüttelt. Im Anschluss daran wird das Gel in eine mit Entfärberlösung befüllte Schale überführt und solange entfärbt, bis nur noch die aufgetrennten Proteine zu sehen sind. Bei Bedarf wird das Acrylamidgel auf ein angefeuchtetes Filterpapier gelegt, mit Zellophan bedeckt und unter Zuhilfenahme einer Vakuumpumpe getrocknet.

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R-250	0.1 % (w/v)
	Isopropanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

Die Entfärberlösung enthält keinen Farbstoff, besitzt ansonsten aber dieselbe Zusammensetzung wie die Färbelösung.

5.4. Westernblotting

5.4.1. Westernblotting mit dem Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984)

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proben, die im Westernblot auf ihre Lektin- oder Immunreaktivität untersucht werden sollen, werden zunächst mit Hilfe des von Kyhse-Anderson entwickelten Semidry-Verfahrens auf eine Nitrocellulose (NC) - Membran geblottet.

Unmittelbar vor dem Blotten werden 5 passend zurechtgeschnittene Filterpapiere in Transferpuffer getaucht und nacheinander auf die als Anode fungierende Oberfläche (z. B. Karbonglas) der Blotapparatur gelegt. Um zwischen den Filterpapieren eingeschlossene Luftblasen zu entfernen, wird jedes frisch aufgelegte Filterpapier mit einem Glasstab abgerollt. Nachdem alle Filterpapiere aufgelegt sind, wird eine, ebenfalls passend zurechtgeschnittene und mit Wasser befeuchtete, NC-Membran auf die aufliegenden Filterpapiere gelegt. Anschließend wird das zu blottende Acrylamidgel auf die Membran gelegt und mit ebenfalls 5 - kurz zuvor - in Transferpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Auch hierbei wird nach dem Auflegen jedes einzelnen Filterpapiers die Oberfläche mit einem Glasstab abgerollt. Nach dem Zusammenbauen des so genannten Blot-Sandwiches, wird der als Kathode fungierende Deckel der Blot-Apparatur aufgelegt und beide Elektroden an ein Netzgerät angeschlossen. Um die Effizienz des Proteintransfers zu verstärken, wird die Oberfläche der Blotapparatur mit Gewichten von bis zu 3 kg beschwert. Geblottet wird für 3 h mit 1 mA/cm^2 Gel.

Transferpuffer:	Tris	47.9 mM
	Glycin	38.9 mM
	SDS	0.038 % (w/v)
	Methanol	20 % (w/v)

5.4.2. Ponceau S – Färbung von geblotteten Proteinen (Salinovich und Montelaro, 1986)

Um den Erfolg des Transfers von Proteinen aus dem Acrylamidgel auf die NC-Membran zu überprüfen, wird die Membran für 5 Minuten unter leichtem Schütteln in eine Ponceau S-haltige Färbelösung gelegt. Überschüssiges Ponceau wird durch das Spülen der Membran mit H₂O bidest. entfernt.

Färbelösung:	Ponceau S	0.2 % (w/v)
	Essigsäure	5 % (v/v)

5.4.3. Analyse der IB₄-Reaktivität im Westernblot

Die NC-Membran wird zunächst für 2 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4°C mit 1 % BSA haltigem TBS blockiert. Im Anschluss daran wird die Membran für 2 h, unter Schütteln bei RT mit IB₄-PO (1: 500 000) in durch bivalente Kationen supplementierten TBS inkubiert, insgesamt 3 mal für je 10 min. mit bivalente Kationen supplementierten TBS-T gewaschen und unter Verwendung eines chemilumineszierenden Substrats entwickelt.

Verwendete Lösungen:

TBS:	Tris/HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	150 mM
TBS, supplementiert:	TBS, pH 7.4	
	CaCl ₂	0.1 mM
	MnCl ₂	0.1 mM
	MgCl ₂	0.1 mM
TBS-T, supplementiert:	TBS, pH 7.4	
	Tween 20	0.1 % (w/v)
	CaCl ₂	0.1 mM
	MnCl ₂	0.1 mM
	MgCl ₂	0.1 mM

5.4.4. Analyse der Versican Immunreaktivität im Westernblot

Unter Verwendung des monoklonalen Maus anti-GHAP Antikörpers

Die NC-Membran mit den geblotteten Proteinen wurde zunächst unter leichtem Schütteln entweder für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blotto blockiert. Anschließend wurde die Membran jeweils unter leichtem Schütteln zunächst für 2 h bei RT mit dem anti-GHAP Antikörper (1:250 in Blotto) inkubiert, insgesamt dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und für weitere 2 h bei RT mit einem anti-Maus Peroxidase-konjugierten Antikörper (1:1000 in Blotto) inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit TBS-T wurde der Blot unter Verwendung eines chemilumineszierenden Substrates entwickelt.

Verwendete Lösungen:

Blotto:	Magermilch	5 % (w/v)
	TBS, pH 7.4	
	Tween 20	0.1 % (w/v)
	Na ₃ N*	0.02 % (w/v)
TBS-T:	TBS, pH 7.4	
	Tween 20	0.1 % (w/v)

* für Peroxidase-konjugierte Antikörper ausschließlich Na₃N freies Blotto verwenden

5.5. Affinitätschromatographie

1.25 mg Protein aus der leichten Membranfraktion werden für 10 min. in der Tischzentrifuge bei 10 000g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, das Pellet in Puffer 1 resuspendiert und unter starkem Schütteln für 1 h bei RT extrahiert. Nicht-gelöste Bestandteile werden über eine 10 minütige Zentrifugation bei 10 000 g in der Tischzentrifuge abgetrennt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Der Überstand wird nach Zugabe von 25 µl biotinyliertem IB₄ (50 µg) über 16 h bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wird zunächst die SDS-Konzentration der Lösung durch die Addition eines äquivalenten Volumens SDS-freien Puffers 1 halbiert, 750 µl Streptavidin-Agarose* hinzugegeben und die daraus resultierende Suspension für 3 h bei 4°C und 1000 rpm im Vibramax geschüttelt. Die Streptavidin-Agarose wird durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 1000 g pelletiert, der Überstand wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Streptavidin-Agarose wird zwei Mal hintereinander in Puffer 2 aufgenommen und für jeweils 15 min. bei 4°C und 1000 rpm im Vibramax gewaschen. Die Überstände der beiden Waschschriffe werden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur spezifischen Freisetzung des IB₄-bindenden Glykoproteins wird die Streptavidin-Agarose für 30 min. mit Puffer 3 bei 4°C und 1000 rpm im Vibramax geschüttelt. Der Überstand wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Freisetzung unspezifisch gebundener Proteine wird die Streptavidin-Agarose abschließend mit 4 x Probenpuffer für 5 min. bei 1000 rpm im Vibramax geschüttelt und per Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wird ebenfalls abgenommen und zusammen mit allen anderen zwischenzeitlich gesammelten Überständen in Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa bis auf ein Volumen von ca. 20 µl konzentriert. Zur weiteren Analyse werden die Konzentrate entweder in der SDS-PAGE oder im Westernblot untersucht.

* in 0.01 M Na_xH_xPO₄, pH 7.2; 0.15 M NaCl; 0.02 % (w/v) Na₃N

Verwendete Lösungen:

Puffer 1:	SDS	1 % (w/v)
	TBS, pH 7.4	
	CaCl ₂	0.1 mM
	MnCl ₂	0.1 mM
	MgCl ₂	0.1 mM
Puffer 2:	TBS, pH 7.4	
	CaCl ₂	0.1 mM
	MnCl ₂	0.1 mM
	MgCl ₂	0.1 mM
Puffer 3:	SDS	0.5 % (w/v)
	EDTA	2 mM
CaCl ₂	PBS, pH 7.4	
	0.1 mM	
	MnCl ₂	0.1 mM
	MgCl ₂	0.1 mM

Alle Puffer werden durch Protease Inhibitoren komplettiert.

5.6. MALDI-Massenspektrometrie

5.6.1. Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen

(Rosenfeld et al., 1992)

Die mit Coomassie gefärbten Proteinbanden werden mit einem Skalpell aus dem Acrylamidgel herausgeschnitten, in kleine würfelförmige Stückchen zerteilt und zur weiteren Behandlung in 0.5 ml fassende EppendorfgeläÙe überführt. In den EppendorfgeläÙen werden die Proteine dann durch verschiedene - im Folgenden aufgelistete - Arbeitsschritte auf den bevorstehenden tryptischen Verdau vorbereitet. Dabei werden im wesentlichen die an die Proteine angelagerten Farbstoffmoleküle (Coomassie Blue) vom Protein eluiert (Schritte 1-3 im Protokoll), existierende Disulfidbrücken reduziert (Schritt 4) und daraus resultierende Cysteine carbamidomethyliert (Schritt 7). Danach werden die Proteine mit Trypsin verdaut (Schritte 13-15) und die daraus resultierenden Fragmente aus dem Gel eluiert (Schritte 17-24).

Protokoll für den tryptischen Verdau von Proteinen in der Gelmatrix

1. Die im Eppendorf-GeläÙ befindlichen Gelstückchen werden für 15 min. mit 7.5 μl einer 1:1 Mischung aus Acetonitril und 100 mM NH_4HCO_3 pro 1 mm^3 Gel unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert
2. Die Lösung wird durch das doppelte Volumen (15 μl pro 1 mm^3 Gel) reinen Acetonitrils ersetzt und für 10 min. unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert
3. Das GeläÙ wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, die Gelstückchen bis zur Trockne in einer Lyophile einrotiert
4. Die Gelstückchen werden für 30 min. bei 56°C unter leichtem Schütteln mit 100 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 inkubiert (7.5 μl pro 1 mm^3 Gel)
5. Das GeläÙ wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen
6. Pro 1 mm^3 Gel werden 15 μl reines Acetonitril dazugeben und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert
7. Das Acetonitril wird durch 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 ersetzt (7.5 μl pro 1 mm^3 Gelstück) und für 20 min. bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert
8. Das GeläÙ wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen
9. Es werden 30 μl NH_4HCO_3 pro 1 mm^3 Gel dazugegeben und für 15 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert

10. Das Gefäß wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen
11. Pro 1 mm³ Gel werden 15 µl reines Acetonitril dazugegeben und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert
12. Das Gefäß wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, die Gelstückchen werden bis zur Trockne in einer Lyophile einrotiert
13. Es werden 5 µl einer 12.5ng/µl Trypsin haltigen 25mM NH₄HCO₃ Lösung pro 1 mm³ Gel hinzugegeben und der Ansatz für 30 min. auf Eis inkubiert
14. Das Gefäß wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, anschließend werden soviel 25 mM NH₄HCO₃ hinzugefügt, dass die Gelstückchen gerade eben bedeckt sind. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert
15. Am nächsten Morgen wird das Gefäß kurz zentrifugiert und für weitere 15 min. unter Schütteln bei 37°C inkubiert
16. Es wird 1µl für eine erste Messung abgenommen
17. Pro 1 mm³ Gel werden 20µl 100 mM NH₄HCO₃ hinzu gegeben und der Ansatz für weitere 15 min. bei 37°C inkubiert
18. Ein äquivalentes Volumen Acetonitril wird hinzu gegeben und der Ansatz für weitere 15 min. bei 37°C inkubiert
19. Das Gefäß wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert
20. Pro 1 mm³ Gel werden 20µl Acetonitril zugegeben und für 10 min. inkubiert
21. Der Überstand wird abgenommen und ebenfalls in das neue Eppendorfgefäß pipettiert
22. Pro 1mm³ Gel werden 20 µl 10% Ameisensäure zugeben und für 15 min. unter Schütteln bei 37°C inkubiert
23. Nach der Zugabe eines äquivalenten Volumens Acetonitril wird der Ansatz für weitere 15 min. bei 37°C inkubiert
24. Das Gefäß wird kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit den gesammelten Überständen aus Schritt 19 und 21 vereinigt
25. Die vereinigten Überstände werden lyophilisiert und bis zur chromatographischen Reinigung im ZIP-Tip (s.u.) bei – 20°C gelagert

5.6.2. Probenvorbereitung für die MALDI-Messungen

Herstellung einer Nitrocellulose-haltigen Dünnschichtmatrix zur Messung von Verdauüberständen (Shevchenko et al., 1996)

Zunächst wird eine gesättigte Lösung von 4-Hydroxy- α -Cyano-Zimtsäure (HCCA) in Aceton hergestellt. Parallel dazu wird Nitrocellulose (10mg/ml) in einem 1:1 Gemisch von Aceton/Isopropanol gelöst. Anschließend werden 4 Teile HCCA mit 1 Teil der NC-haltigen Lösung gemischt und 0.5 μ l dieser so genannten FENC (Fast evaporation/Nitrocellulose)-Lösung auf den MALDI-Probenteller pipettiert. Nach dem Trocknen werden 0.9 μ l einer 10 % (v/v) Ameisensäure auf die Dünnschichtmatrix pipettiert und 0.6 μ l aus dem Verdauüberstand in diesen Tropfen hineinpipettiert. Nach dem Trocknen (ca. 30 min. bei RT) wird der Auftragspunkt mit 5 μ l einer 0.1 % Trifluoressigsäure gewaschen. Damit ist die Probe für die Messung im Massenspektrometer präpariert.

Entsalzung der getrockneten tryptischen Peptide mittels minaturisierter Chromatographie - Säulen (ZIP-Tip-Prozedur)

Ein Zip-Tip ist eine 10 μ l fassende Pipettenspitze, deren Ende mit einem Chromatographie-Bett versehen wurde. Das Bett besteht aus aliphatischen C₁₈-Kohlenwasserstoffketten, die kovalent an Kieselsäure gebunden sind. Beim Aufziehen von Peptidhaltigen wässrigen Lösungen in die Pipettenspitze werden die Peptide, aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, an die Kohlenwasserstoffe adsorbiert. Damit hat man die Möglichkeit, Salze und andere Verunreinigungen durch das Spülen mit wässrigen Lösungen abzutrennen und die gebundenen Peptide durch die schrittweise Erhöhung des Anteils an organischen Lösungsmittel von der Säule zu eluieren. Ein ausführliches Protokoll ist im Folgenden dargestellt.

Protokoll zur Probenvorbereitung für die MALDI-Messung:

1. Die lyophilisierten tryptischen Peptide werden im Eppendorfgefäß mit 1 μ l eines aus 50 % (v/v) Methanol/ 5 % (v/v) Ameisensäure zusammengesetzten Tropfens beschichtet
2. 9 μ l einer 5 % (v/v) Ameisensäure werden hinzugefügt, die Peptide für 10 sek. im Ultraschallbad resuspendiert
3. Äquilibration der Zip-Tip Säulen: Eine 10 μ l Pipette wird auf ihr maximales Fassungsvermögen eingestellt und nacheinander mit jeweils 3 x 70 % (v/v) Methanol/

- 5 % (v/v) Ameisensäure, 5 % (v/v) Ameisensäure und 5 % (v/v) Methanol/ 5 % (v/v) Ameisensäure gespült
4. Die gelösten tryptischen Peptide werden durch das 20-fache, langsame Aufziehen mit der Pipette an das Chromatographie-Bett gebunden
 5. Gebundene Peptide durch jeweils 3 maliges Aufziehen von a) 5 % (v/v) Ameisensäure und b) 5 % (v/v) Methanol/ 5 % (v/v) Ameisensäure gewaschen
 6. Zur Elution wird die Pipette auf 4 µl eingestellt und durch die schrittweise Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel gebundene Peptide von der Säule eluiert: a) 30 % (v/v) Methanol/ 50 % (v/v) Ameisensäure, b) 50 % (v/v) Methanol/ 30 % (v/v) Ameisensäure, c) 70 % (v/v) Methanol/ 5 % (v/v) Ameisensäure (Wichtig: alle drei Eluate in separate Eppendorfgläser pipettieren)
 7. Den MALDI-Probenhalter mit einer FENC-haltigen Dünnschichtmatrix beschichten, jeweils 0.5 µl aus jedem Eluat mit 0.5 µl DHB mischen und auf die getrocknete Matrix auftragen
 8. Nach dem Trocknen die Oberfläche einmal mit 5 µl H₂O bidest. spülen

5.6.3. Durchführung der MALDI-Messungen

Die Proben werden in einem Bruker REFLEX-Massenspektrometer unter kontinuierlicher Extraktion analysiert, d. h. die desorbierten Peptidionen werden unmittelbar nach ihrem Übergang in die Gasphase beschleunigt. Die Beschleunigungsspannung beträgt – 28.5 kV, die Reflektorspannung – 30 kV. Um einzelne Peptide auszuwählen, deren Fragmentationsspektrum aufgezeichnet werden soll, wird ein so genanntes "Ion Gate" (Anwendung zum Setzen von Zeitfenstern) zugeschaltet. Für die Aufnahme der Fragmentationsspektren (post source decay, PSD) wird die Reflektorspannung über zwölf Schritte von – 30 kV bis auf – 1.27 kV abgesenkt. Die erhaltenen Teilspektren werden nach der sogenannten FAST-Methode (Bruker-Daltonik, Bremen) zu einem einzigen Fragmentationsspektrum zusammengesetzt.

Alle Messungen werden intern, d. h. mit Hilfe von Peptid-Fragmenten aus dem tryptischen Eigenverdau, kalibriert.

5.6.4. Massenspektrometrisch basierte Datenbank-Recherche zur Identifizierung von Versican

Die aus dem Molekülmassenspektrum ausgewählten Molekülmassen werden unter Verwendung der beiden Analyseprogramme Mascot (<http://www.matrixscience.com>) und ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu>) mit den theoretisch vorhergesagten Peptidmassen tryptischer Peptide von Proteinsequenzen aus der NCBIInr- Datenbank abgeglichen. Der Abgleich zwischen den ausgewählten Molekülmassen und den Software-unterstützten, virtuell erzeugten tryptischen Peptiden der Datenbank wird unter Angabe folgender Kriterien durchgeführt:

- Taxonomie: Säugetier
- Massenbereich: 0-500 kDa
- pI-Bereich: 0-14
- Suche nach: Einem einzelnen Protein
- Feste Modifikationen: Carbamidomethylierung von C
- Variable Modifikationen: Oxidation von M
- Protease: Trypsin, C-terminal von K oder R (sofern der nächste Rest kein P ist)
- Anzahl d. max. überlesenden Schnittstellen: 2
- Ladungszustand der Moleküle: MH^+
- Toleranz (der Monoisotope, kDa): 0.10Da

Aufgrund der Liste der Molekülmassen, die sich tryptischen Peptide eines Kandidatenproteins zuordnen lassen, können potentielle Peptide identifiziert und für die Aufnahme eines Fragmentationenspektrums ausgewählt werden. Mit Hilfe geeigneter Programme, wie z. B. Mac Bio Spec, lassen sich über die Eingabe der vermuteten Aminosäuresequenz des ausgewählten Peptids die Massen sämtlicher, theoretisch zu erwartender Fragmente (Ionen der A-, B-, C- Serie und X-, Y-, Z- Serie) berechnen. Über einen Vergleich der theoretisch berechneten Massen – vor allem den Massen der B- und Y-Ionen - und den im Fragmentationenspektrum auftretenden Massen lässt sich dann ermitteln, ob die beiden Sequenzen identisch sind oder nicht.

5.7. *In situ* - Hybridisierung

5.7.1. RNA-Präparation aus Ratten-DRG's

Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, werden alle für die RNA-Extraktion verwendeten Materialien und Lösungen unter Schütteln über Nacht mit 0.1 % (v/v) DEPC haltigem Wasser behandelt und am nächsten Tag für 20 min. autoklaviert.

20 tiefgefrorene Ratten-DRGs (L4) werden zusammen mit 1 ml 37 °C warmem Trizol in den Glaskolben eines Glas-Teflon-Homogenisators (0.1 mm Toleranz) überführt und über 12 Züge bei 900 rpm homogenisiert. Das Homogenat wird in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für ca. 5 min. bei RT gelagert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wird die Lösung kurz auf dem Vortexer geschüttelt, für weitere 3 min. bei RT gelagert und anschließend für 5 min. bei RT und 12.000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere RNA haltige Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml fassendes Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 500 µl Isopropanol wird die Lösung zunächst für 15 min. auf Eis gelagert und anschließend für 15 min. bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen, das Pellet in 1 ml 70 % igem Ethanol aufgenommen und erneut für 15 min. bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, die RNA bei RT getrocknet (Deckel offenlassen, damit das restliche Ethanol verdunstet) und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration ($A_{260/280}$ nm, 1 Absorptionseinheit entspricht etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA) wird die RNA bis zur weiteren Verwendung bei - 70°C gelagert.

5.7.2. cDNA-Synthese (RT-PCR)

10 µg Gesamt-RNA aus dem DRG werden in Gegenwart von 500 ng "zufälliger" Primer (random hexamers) für 5 min. bei 70°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Die reverse Transkription wird in 1 x RT-Puffer mit insgesamt 800 nM dNTPs (200 nM pro dNTP) in Gegenwart von 4 mM DTT, 30 U RNase Inhibitor und 200 U M-MLV (moloney murine leukemia virus)-RT bei 42°C über 90 min. durchgeführt. Zur Inaktivierung wird der Ansatz für 10 min. bei 70°C inkubiert und anschließend direkt bei -20°C tiefgefroren.

5.7.3. PCR

Für eine PCR werden generell 2 µg cDNA eingesetzt. Die PCR wird in Gegenwart von 1 x PCR-Puffer, je 400 nM Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer, 800 nM dNTPs (200 nM pro NTP) und 2.5 U Taq-Polymerase durchgeführt. Bei den verwendeten Primern handelt es sich im Allgemeinen um 20mere, die sich in ihrem GC-Gehalt nur geringfügig voneinander unterscheiden. Die optimale Anlagerungstemperatur für die jeweils eingesetzten Primer wird anhand der $2 \times [A+T] + 4 \times [G+C]$ Regel berechnet. Die Zusammenstellung der Temperaturzyklen erfolgt generell nach: 2 min., 94°C; 40 x [20 sec., 94°C; 30 sec., X°C; 72°C, 30 sec.]; 7 min., 72°C mit X = optimale Anlagerungstemperatur.

Im Anschluss an die PCR wird ein 5 µl Aliquot aus dem Ansatz entnommen und zur Kontrolle in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Sofern nur ein einziges Fragment erwarteter Größe erkennbar ist, wird das PCR-Produkt ohne weitere Aufreinigung direkt in einen TOPO-Vektor (pcDNA 3.1, Invitrogen) inseriert. Sind mehrere Fragmente erkennbar, wird der komplette PCR-Ansatz zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, das Fragment mit der erwarteten Größe aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und dann ebenfalls in einen TOPO-Vektor inseriert.

5.7.4. Herstellung der Präparate für die *in-situ* Hybridisierung

Männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 250-300g werden über die intraperitoneale Injektion von 60 mg Narcoren pro kg Gewicht tief narkotisiert. Den Tieren wird die Bauchwand eröffnet, das Zwerchfell und die Rippenbögen durchtrennt, der Thorax eröffnet und das noch schlagende Herz freigelegt. Der rechte Herzvorhof wird eröffnet, der linke kanüliert. Unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe (Flußrate 5 ml/min.) wird das Kreislaufsystem mit eiskaltem PBS (pH 7.2-7.4) gespült. Sofern die aus dem rechten Vorhof austretende Flüssigkeit klar erscheint, wird das PBS durch die Fixierungslösung (4 % PFA in PBS, pH 7.2-7.4) ausgetauscht und die Blutgefäße mit etwa 50 ml Fixativ transkardial perfundiert.

Das fixierte Tier wird auf die Bauchseite gelegt. Nacheinander werden zunächst das Haar- und Hautkleid und die Skelettmuskulatur zwischen dem Becken und Rippenbereich entlang der Wirbelsäule entfernt. Nach der Freilegung des Ischiasnerves zu beiden Seiten des Rückenmarks wird sein Verlauf bis zu den DRGs verfolgt und jedes der drei vom Ischiasnerv innervierten DRGs einzeln herauspräpariert.

Die frisch präparierten DRGs werden zunächst für 2 h bei RT nachfixiert und anschließend durch die Überführung und jeweils 2 h Lagerung bei RT in einer aufsteigenden Sucrosereihe (10, 20 und 30 % Sucrose) kryoprotectiert. Die DRGs werden in - von Eppendorfgefäßen abgetrennten - Deckeln in Tissue Tek eingebettet (in flüssigen Stickstoff) und entweder bis zur weiteren Verwendung bei - 70°C gelagert oder direkt am Kryostaten (Temperatur am Objekt: -22°C; Temperatur in der Box: -24°C) geschnitten (20 µm) und auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Das fertige Präparat wird zunächst für 5 min. an der Luft getrocknet und anschließend wie folgt weiterbehandelt:

1.	4 % PFA in PBS	20 min.	RT
2.	PBS	5 min.	RT
3.	30 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
4.	50 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
5.	70 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
6.	90 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
7.	100 % Ethanol	2 min.	RT

Bis zur Hybridisierung werden die Präparate in absolutem Ethanol und 4°C gelagert (maximal ein halbes Jahr).

5.7.5. Herstellung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Für die Herstellung der Sonden wird eine PCR durchgeführt und das dabei amplifizierte Produkt erwarteter Größe in einen pcR T7 TOPO-Vektor insertiert und anschließend kloniert. Da das Plasmid nur über einen T7 Promoter verfügt, wird die Orientierung des Inserts über eine Restriktionsanalyse überprüft. Als zusätzliche Kontrolle wird jeweils ein positiver Klon für jede Orientierung sequenziert.

Zur Vorbereitung der *in vitro*-Transkription werden die Plasmide mit einer geeigneten Endonuclease unmittelbar hinter dem 3`Ende des Inserts linearisiert. Das linearisierte Plasmid wird gefällt und gewaschen und nach dem Trocknen in DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen.

5.7.6. *in vitro* Transkription

Der Transkriptionsansatz enthält:

- 16 µl linearisierte DNA (2 µg)
- 6 µl 5x Transkriptionspuffer
- 3 µl DTT (100 mM)
- 3 µl DIG-NTP-Mix
- 1 µl RNase Inhibitor (36.5U/µl)
- 1 µl T7 RNA-Polymerase

Die Transkription wird für 2 h bei 37°C im Thermoschüttler durchgeführt.

Zur Abschätzung der Transkriptionsausbeute wird 1 µl des Ansatzes in einem 2 % Agarosegel (20 min., 130V) kontrolliert.

Zu jedem Ansatz werden 2 µl RNase freie DNase (10 U/µl) pipettiert und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Um zu kontrollieren, ob die DNA vollständig abgebaut ist, wird ein Aliquot des Ansatzes im Agarosegel aufgetrennt.

Zu jedem Ansatz werden 4 µl 0.5 M EDTA pH 8, 4 µl 4M LiCl sowie 125 µl absoluter Ethanol hinzugefügt. Anschließend werden alle Ansätze für 30 min. bei 15.300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und über 5 min. im Heizblock bei 37°C getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

5.7.7. Bestimmung der DIG-Markierung

Von je 1µl jedes Transkriptionsansatzes sowie einer DIG markierten Standard-RNA wird eine Verdünnungsreihe in 50 µg/ml Heringssperma-DNA Lösung von 1:1000 (110 pg), 1:2000 (55 pg), 1:10000 (11pg), 1:20000 (5.5 pg) sowie 1:100000 (1.1 pg) hergestellt. Jeweils 1 µl jeder Verdünnung wird auf eine ungeladene Nylonmembran pipettiert und nach dem Trocknen im Stratalinker UV-vernetzt. Die Membran kann bis zur weiteren Verwendung trocken gelagert werden.

Die Membran wird in Puffer P1 für 1 min. bei RT inkubiert und anschließend für 30 min. in Puffer P2 blockiert. Anschließend wird die Membran unter Schütteln bei RT für 1 h mit dem Anti-DIG Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in Puffer P2 inkubiert. Die Membran wird zweimal für je 10 min. bei RT mit Puffer P1 gewaschen, kurz in Puffer P3 äquilibriert und schließlich für 1 h bei RT oder gegebenenfalls auch über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Die Farbreaktion wird mit TE-Puffer gestoppt.

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

DIG-NTP-Mix:	2 µl ATP Li-Salz	100 mM
	2 µl CTP Li-Salz	100 mM
	2 µl GTP Li-Salz	100 mM
	1.3 µl UTP Li-Salz	100 mM
	0.7 µl DIG-UTP Li-Salz	10 mM
	ad 20 µl RNase freies H ₂ O, Lagerung bei - 20°C.	

BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat p-Toluidinsalz):

1 g BCIP wird in dem Substanzgefäß mit etwas DMF gelöst. Die Lösung wird in einen 25 ml fassenden Meßzylinder pipettiert und mit DMF bis auf 20 ml aufgefüllt. Die Lösung (50 mg BCIP/ml) wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid):

1 g NBT wird in dem Substanzgefäß mit etwas 70 % igem (v/v) DMF gelöst. Die Lösung wird in einem 25 ml fassenden Meßzylinder pipettiert und mit 70 % igem DMF bis auf 13.3 ml aufgefüllt. Die Lösung (75 mg NBT/ml) wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

Färbelösung: P3 mit 4.5 µl/ml NBT-Lösung und 3.5 µl/ml BCIP

Puffer 1: 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5 und 30 ml 5 M NaCl werden in einem Meßzylinder mit DEPC behandeltem H₂O bis auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt und nach dem Umfüllen in verschließbare Glasflaschen autoklaviert.

Puffer 2: 1.25 g Blockierungs-Reagenz werden mit 250 ml Puffer 1 in eine Glasflasche gegeben und zunächst bis zum Schäumen in der Mikrowelle bei 600 W erhitzt. Anschließend wird das Blockierungs-Reagenz unter Rühren bei RT gelöst.

Puffer 3: 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 9.5 und 20 ml 5 M NaCl werden zunächst mit 800 ml DEPC behandeltem H₂O gemischt und nach der Zugabe von 50 ml 1 M MgCl₂ mit DEPC behandeltem H₂O bis auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

20 x SSC (NaCl haltiger Citrat-Puffer):

3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7. Die Salze werden eingewogen, mit H₂O aufgefüllt, DEPC behandelt und autoklaviert.

TE (Tris/EDTA)-Puffer:

10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5 und 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8 werden mit DEPC behandeltem H₂O bis auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt, in eine verschließbare Glasflasche überführt und autoklaviert.

5.7.8. *In situ*-Hybridisierung

Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, ausschließlich RNase freie Reagenzien verwenden und alle Lösungen und Puffer (sofern sie keine freien -NH₂-Gruppen enthalten) vorher mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeln.

Proteinase K Behandlung

1.	Lufttrocknen	5-10 min.	RT
2.	2 x SSC	5 min.	rehydrieren
3.	2 x SSC	20 min.	70°C
4.	DEPC-H ₂ O	1 min.	RT
5.	Proteinase K (4µg/ml H ₂ O)	2 min.	RT
6.	0.2 % (w/v) Glycin in PBS	2 min.	RT

Fixieren und Dehydrieren

1.	4 % PFA in PBS	20 min.	RT
2.	PBS	5 min.	RT
3.	30 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
4.	50 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
5.	70 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
6.	90 % (v/v) Ethanol	2 min.	RT
7.	100 % Ethanol	2 min.	RT
8.	Lufttrocknung	30 min.	RT

in situ-Hybridisierung

Zunächst wird eine Gefrierdose oder auch eine Glasschale mit Kleenex ausgelegt und mit etwa 1 ml/cm² Equilibrierungslösung (50 % Formamid in 5 x SSC) befeuchtet. Anschließend werden 100 µl Hybridisierungslösung auf jeden einzelnen Objektträger pipettiert, die Objektträger mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt und - auf Waage - in die Gefrierdose bzw. Glasschale gelegt. Die Gefrierdose bzw. Glasschale wird verschlossen und bei 42°C über mindestens 15 h inkubiert.

Hybridisierungslösung:	Formamid	50 % (v/v)
	Tween 20	0.1 % (v/v)
	5 x SSC	
	Heringssperma DNA	100µg/ml
	Heparin	50µg/ml
	DIG-markierte RNA	0.5µg/ml

Nach der Inkubation werden die Objektträger aus dem Gefäß genommen und zwecks Entfernung der Deckgläschen mehrmals hintereinander in ein mit Waschlösung gefülltes Becherglas eingetaucht. Die Objektträger werden in die Färbegestelle gelegt und in der Färbeschale unter leichtem Schütteln bei 37°C für insgesamt 3h unter zweimaligem Wechsel der Waschlösung inkubiert.

Waschlösung:	Formamid	50 % (v/v)
	2 x SSC	

Nachweis der Hybride

Die Objektträger werden in der Färbeschale für 2 x 1 min in Puffer 1 inkubiert und danach für 30 min. in Puffer 2 bei RT blockiert. Nachdem sämtliche Lösung von den Objektträgern abgetropft ist (Kleenex) werden sie in einer, mit in Puffer 1 getränktem Kleenex ausgelegten, Gefrierdose oder Glasschale mit je 100 µl Antikörperlösung überschichtet, mit Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Deckgläschen, durch das mehrmalige Eintauchen in Puffer 1, entfernt, in eine Färbeschale gestellt und für 3 x je 10 min. bei RT mit Puffer 1 gewaschen. Danach werden die Objektträger für 1 min. bei RT mit Puffer 3 inkubiert.

Anschließend werden die Objektträger in abgedunkelten Färbeschalen bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach der Farbentwicklung der Positivkontrollen und wird durch die Überführung der Objektträger in TE-Puffer (TE mehrmals wechseln, Präparate über Nacht in TE stehenlassen) gestoppt. Zur Dokumentation werden die Präparate mit 50 % (v/v) Glycerin haltiger Gelatine eingedeckt.

Antikörperlösung: anti-DIG-AP, 1: 5000 in Puffer 2

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

- Levamisol: Als Stocklösung wird 1 M Levamisol in H₂O angesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.
- Färbelösung: 700 µl BCIP (50 mg/ml), 1.2 ml NBT (75 mg/ml) und 200 µl Levamisol (1M Stocklösung) werden unter Rühren mit Puffer P3 bis auf ein Volumen von 200 ml aufgefüllt und direkt verwendet.
- Proteinase K: 10 mg/ml DEPC behandeltem H₂O; die Lösung wird aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.
- 4 % PFA in PBS: 40 g PFA werden zunächst unter Rühren in 800 ml H₂O auf 60-65°C erwärmt und anschließend unter der tropfenweisen Zugabe von 1 N NaOH gelöst. Nachdem die Lösung bis auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden 100 ml 10 x PBS hinzu gegeben und der pH-Wert der Lösung mit Hilfe von 1 N NaOH oder 1 N HCl auf 7.2-7.4 justiert. Die Lösung wird mit H₂O bis auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Alternativ kann die Lösung auch aliquotiert und bei - 20°C eingefroren werden.
- Heparin: 50 mg/ml Socklösung in DEPC behandeltem H₂O, steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.
- Heringssperma-DNA: 10 mg/ml TE-Puffer Stocklösung. Wird durch Autoklavieren denaturiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.
- Glycerin/Gelatin: 1 g Gelatine werden zusammen mit 5 ml Wasser in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend werden unter Rühren 5 ml Glycerin hinzu gegeben und die Lösung bis auf RT abgekühlt. Dabei verfestigt sich die Lösung. Kurz vor der Benutzung wird die Lösung im Wasserbad bei 37°C verflüssigt.