

8. Anhang

8.1. Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien für die In-vitro-Maturation, -Fertilisation und -Kultivierung

1.) Spüllösung (modifizierte PBS-Lösung)

modifizierte PBS-Lösung	
500 ml	Phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO (PBS) (Fa. Biochrom, Berlin)
500 mg	Glucose (Fa. Merck, Darmstadt)
18 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)
10 mg	Penicillin (Fa. Sigma, Steinheim)
20 mg	Streptomycin (Fa. Sigma, Steinheim)
5,6 mg	Heparin (Fa. Sigma, Steinheim)
150 mg	Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Sigma, Steinheim)

Die Spüllösung wurde am Tag vor der Verwendung frisch hergestellt und im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

2.) Grundmedium (Maturations- und Kultivierungsmedium)

TCM (Maturations- und Kulturmedium)	
100 ml	Ampuwa Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
220 mg	NaHCO ₃ (Fa. Roth, Karlsruhe)
5 mg	Gentamicin-Sulfat (Fa. Sigma, Steinheim)
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)
1510 mg	Medium 199 Hepes Modification (Fa. Sigma, Steinheim)

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde alle 14 Tage frisch hergestellt, steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

3.) Stammlösung für das Kapazitationsmedium

Sperm-Stock	
125 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
261,25 mg	NaHCO ₃ (Fa. Roth, Karlsruhe)
36 mg	CaCl ₂ x2H ₂ O (Fa. Roth, Karlsruhe)
725 mg	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
28,75 mg	KCl (Fa. Serva, Heidelberg)
4,5 mg	NaH ₂ PO ₄ (Fa. Serva, Bad Homburg)
297,5 mg	Medium 199 Hapes Modification (Fa. Sigma, Steinheim)
38,75 mg	MgCl ₂ x6H ₂ O (Fa. Roth, Karlsruhe)
1,25 mg	Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe)
460 µl	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Das Medium wird alle 4 Wochen frisch hergestellt, steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

4.) Stammlösung für das Befruchtungsmedium

TL-Stock	
100 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
210 mg	NaHCO ₃ (Fa. Roth, Karlsruhe)
30 mg	CaCl ₂ x2H ₂ O (Fa. Roth, Karlsruhe)
666 mg	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
23,5 mg	KCl (Fa. Serva, Heidelberg)
4 mg	NaH ₂ PO ₄ (Fa. Serva, Bad Homburg)
10 mg	MgCl ₂ x6H ₂ O (Fa. Roth, Karlsruhe)
1 mg	Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe)
186 µl	Na-Laktat-Sirup (Fa. Sigma, Steinheim)

Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt. Das Medium wird alle 4 Wochen frisch hergestellt, steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

5.) Kapazitationsmedium

Kapazitationsmedium	
10 ml	Sperm-Stock
60 mg	Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Sigma, Steinheim)
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Sigma, Steinheim)

Das Medium wurde am Abend vor der Verwendung hergestellt und im Brutschrank bei 39°C und 5% CO₂ bis zur Verwendung gelagert.

6.) Befruchtungsmedium

Befruchtungsmedium	
10 ml	TL-Stock
60 mg	Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Sigma, Steinheim)
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)

Das Medium wurde am Abend vor der Verwendung hergestellt und im Brutschrank bei 39°C und 5% CO₂ bis zur Verwendung gelagert.

Vor der Verwendung wurden jeweils 100 µl Heparin-Stock-Lösung, 100 µl Gentamicin-Stock-Lösung und 360 µl Hypotaurin-Epinephrin-Stock-Lösung dem Befruchtungsmedium zugegeben. Die Herstellung dieser Zusätze wird im Folgenden erläutert.

7.) Heparin-Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

Heparin-Stock-Lösung	
5 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
5 mg	Heparin (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde steril filtriert und in Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) á 100 µl abgefüllt und anschließend eingefroren.

8.) Gentamycin-Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

Gentamycin-Stock-Lösung	
2,5 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
12,5 mg	Gentamicin-Sulfat (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde steril filtriert und in Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) á 100 µl abgefüllt und anschließend eingefroren.

9.) Hypotaurin-Epinephrin-Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

Hypotaurin-Epinephrin-Stock-Lösung	
<i>Lösung 1</i>	
20 ml	NaCl 0,9% (Fa. Roth, Karlsruhe)
2,19 mg	Hypotaurin (Fa. Sigma, Steinheim)
<i>Lösung 2</i>	
50 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa [®] , Fa. Fresenius, Bad Homburg)
50 mg	Na-Meta-bi-sulfit (Fa. Sigma, Steinheim)
113 µl	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)
30 µl	konz. HCL (Fa. Roth, Karlsruhe)
<i>Lösung 3</i>	
40 ml	Lösung 2
1,83 mg	Epinephrin (Fa. Sigma, Steinheim)
<i>Lösung 4 (Endlösung)</i>	
10 ml	Lösung 1
4 ml	Lösung 3
16 ml	NaCl 0,9% (Fa. Roth, Karlsruhe)

Die Herstellung der Lösung erfolgte unter Lichtschutz. Die fertige Lösung 4 wurde steril filtriert und in Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) á 360 µl abgefüllt. Die Tubes wurden mit Alufolie umwickelt und eingefroren.

10.) FSH-Lösung als Zusatz zum Maturationsmedium

FSH (Ovagen®, Fa. Bondico, Alkmaar, Holland)
Reines Produkt in Tubes à 120 µl abfüllen und einfrieren.

11.) Herstellung von östrischem Kuhserum als Zusatz zum Grundmedium

Blutentnahme bei 4-10 östrischen Kühen oder Rindern



Stehenlassen des Blutes zur Gerinnung (mind. 1 Stunde)



Zentrifugation des Blutes bei 500 x g für 20 Minuten



Abgießen und Poolen des Serumüberstandes



erneute Zentrifugation bei 500 x g für 20 Minuten



Abgießen des Überstandes in ein Becherglas



Inaktivierung des Serums bei 56°C für 30 Minuten



Abkühlen des Serums bei Raumtemperatur



Abfüllen des Serums in Vaccutainer und Tiefgefrieren bei -20°C

Je nach Gebrauch wurde ein Teil der Vaccutainer aufgetaut und in Portionen von 500 bzw. 1000 µl in sterile Tubes abgefüllt und erneut eingefroren.

Alle Versuche wurden mit einer ECS-Charge durchgeführt.

8.2. Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die zellphysiologischen Untersuchungen

1.) HOECHST 33258 zur Anfärbung von Chromatin

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 3 Teile Glycerol (Fa. Serva, Heidelberg) und 1 Teil PBS- (Fa. Biochrom, Berlin) vermischt. Pro ml Stammlösung wurden 2,5 µg Farbstoff Hoechst 33258 (Fa. Sigma, Steinheim) zugegeben.

2.) Paraformaldehyd (3%) zur Fixation

Zu 100 ml PBS-Lösung wurden 3 g Paraformaldehyd (Fa. Sigma, Steinheim) zugegeben. Die entstandene Lösung wurde auf 56-60°C erwärmt. Es wurde tropfenweise 1 N Natronlauge (Fa. Roth, Karlsruhe) zugegeben bis die Lösung klar war. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

3.) PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺

Zur Herstellung der Lösung wurde gemäß der Anweisung des Herstellers eine Tablette PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Fa. Sigma, Steinheim) in 200 ml destilliertem Wasser. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

4.) Trypsin-EDTA-Lösung zur Entfernung des Cumulus oophorus

Die fertige Stammlösung Trypsin-EDTA vom Hersteller (Fa. Sigma, Steinheim) wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit Hanks' Lösung verdünnt. Die Hanks' Lösung wurde zuvor wie folgt angesetzt:

Hanks' Lösung	
1 l	Aqua dest.
9,5 g	Hanks' balanced salts (Fa. Sigma, Steinheim)
0,35 g	NaHCO ₃ (Fa. Roth, Karlsruhe)
0,60 g	Penicillin (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde steril filtriert und anschließend wurden jeweils 1000 µl Lösung in sterilen Tubes abgefüllt und eingefroren.

5.) Polyvinylalkohol

Zur Herstellung der verwendungsfähigen Lösung wurden 30 mg Polyvinylalkohol (Fa. Sigma, Steinheim) in 10 ml PBS-Lösung nach DULBECCO (Fa. Biochrom, Berlin) gelöst, steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

8.3. Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die biochemischen Untersuchungen

1.) Trenngel

Zur Herstellung des 12 %igen Trenngels für die SDS-PAGE wurden folgende Komponenten verwendet:

12 ml	Stammlösung Acrylamid-Biacrylamid
1,9 ml	TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
10 ml	H ₂ O
300 µl	Stammlösung SDS (10%)
300 µl	Ammoniumperoxidsulfat (10%)
20 µl	TeMed

2.) Sammelgel

Zur Herstellung eines 5%igen Sammelgels wurden folgende Komponenten verwendet:

1,25 ml	Stammlösung Acrylamid-Biacrylamid
1,9 ml	TRIS-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
4,25 ml	H ₂ O
75 µl	Stammlösung SDS
150 µl	Ammoniumperoxidsulfat
10 µl	TeMed