

3. Material und Methoden

3.1 Patientinnenrekrutierung / Blutgewinnung

Nach erfolgreichem Ethikantrag wurden von 2001 bis 2006 in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Blutproben von über 200 Patientinnen mit Präeklampsie, HELLP-Syndrom und schwangerschaftsinduzierter Hypertonie gesammelt. Die Sammlung der Blutproben wurde im Rahmen eines DFG-Projekts in Assoziation mit Prof. F. C. Luft, Charité, Campus Buch, begonnen. Mehrere Mitglieder der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe“ waren an der Rekrutierung der Patientinnen beteiligt. Ab 2002 wurde mit der Probenbearbeitung im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit begonnen und weitere Patientinnen rekrutiert. Es erfolgte eine venöse Blutentnahme nach schriftlicher Einwilligung der Patientin zur Studienmitarbeit. Die EDTA-Röhrchen wurden dann bei -20° C gelagert. Klinische Daten zum Schwangerschaftsverlauf und zur Entbindung wurden aus dem Geburtendokumentationssystem Gebdat übernommen. Die Anamnesedaten wurden mittels Fragebogen erhoben. Informationen zu jetzigen und vorausgegangenen Schwangerschaftsverläufen, Vorerkrankungen (insbesondere kardiale, renale und vaskuläre Erkrankungen) und Risikofaktoren für Gefäßerkrankungen (Hyperlipoproteinämie, Rauchen und BMI) wurden erfragt.

Insgesamt wurden anhand von Fragebögen und Geburtenprotokollen folgende Informationen erhoben :

- Alter
- prägravid BMI
- Primipara oder Multipara
- Rauchgewohnheiten der Patientin
- Hypertonie, Nieren- oder Schilddrüsenerkrankungen, Diabetes mellitus oder vaskuläre Erkrankungen in der Vorgeschichte der Patientin
- Medikamentenanamnese der Patientin
- Erkrankungen und Symptome, die während der Schwangerschaft auftraten: Ödeme, Gestationsdiabetes, Hypertonie
- Gewichtszunahme während der Schwangerschaft
- Kindsdaten: Geschlecht, Gewicht, Nabelarterien-pH und APGAR nach der ersten Minute
- Geburtsmodus, Indikation der Schnittentbindung und Schwangerschaftswoche bei Geburt

Einschlusskriterien für die Patientinnen waren eine nach der 20. Schwangerschaftswoche aufgetretene Hypertonie mit diastolischen Blutdruckwerten (RR-Werten) von >90 mmHg und systolischen Blutdruckwerten von >140 mmHg. Bei der Präeklampsie zusätzlich eine Proteinurie bestimmt durch 24h-Sammelurin mit Protein $>0,3$ g oder einem 3-fach positiven Urinstix. Die Diagnose des HELLP-Syndroms beruhte auf der zusätzlichen Beobachtung von Veränderungen folgender Laborparameter: Anstieg von freiem Hämoglobin (Hb), Laktatdehydrogenase (LDH), Anstieg von ALAT, ASAT und Abfall der Thrombozyten.

Bei den Patientinnen mit einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung wurde bei Vorstellung in der Klinik im Rahmen der Aufnahme eine Ultraschalluntersuchung und Dopplersonographie durch erfahrene Untersucher durchgeführt. Dabei wurden als mütterliche Gefäße die Arteriae uterinae und als kindliche Gefäße die Arteria umbilicalis und die Arteria cerebri media untersucht. Die Auswertung der Dopplerbefunde erfolgte -unter Kenntnis des Gestationsalters- qualitativ anhand der erstellten Flusskurven und quantitativ anhand der folgenden Indizes:

- Der Resistance-Index RI nach Pourcelot vergleicht die Differenz zwischen der maximalen systolischen Geschwindigkeit V_{maxsyst} und der enddiastolischen Strömungsgeschwindigkeit V_{maxendd} , die Pulsatilität, mit der maximalen systolischen Strömungsgeschwindigkeit in einem Quotienten: $RI = \frac{V_{\text{maxsyst}} - V_{\text{maxendd}}}{V_{\text{maxsyst}}}$. Bei einer Zunahme des peripheren Widerstandes nimmt, da die enddiastolische Strömungsgeschwindigkeit stärker abnimmt, der Resistance-Index zu, bei abnehmendem Widerstand sinkt dieser Index.
- Der Pulsatilitäts-Index PI nach Gosling vergleicht die Differenz zwischen der maximalen und der minimalen Strömungsgeschwindigkeit eines Herzzyklus mit der über die Zeit gemittelten Geschwindigkeit V_M , abhängig vom Bestehen eines monophasischen oder triphasischen Pulses. Mit zunehmendem peripheren Widerstand wird die Pulsatilität im Vergleich zur gleichzeitig abnehmenden mittleren Strömungsgeschwindigkeit, und damit auch der Wert des Quotienten, immer größer. (nach: Kurt Huck, Kursbuch Doppler- und Duplexsonographie, 2.Auflage, Thieme-Verlag)

Die Dopplersonographie der Aa. uterinae hat eine gute Aussagekraft hinsichtlich des maternoplazentaren Gefäßwiderstandes bzw. der physiologischen Vasodilatation und läßt sich unter Umständen prädiktiv für die Entstehung einer fetalen Retardierung, eines schwangerschaftsinduzierten Hypertonus oder auch einer drohenden vorzeitigen Plazentalösung nutzen.

Die Aa. umbilicales spiegeln die Verhältnisse im plazentaren Strombett am besten wider. Erhöhte Flusswiderstände können sich in einem Nullfluss oder in einem Rückwärtsfluß zeigen.

In den Aa. cerebri mediae ist im Gegensatz zu den oben genannten Gefäßen eine Flussverminderung bis zur 36. SSW physiologisch. Findet man jedoch eine Reduktion des Gefäßwiderstandes, so muss von einem Kompensationsmechanismus („brain sparing effect“ bei uteroplazentarer Insuffizienz) ausgegangen werden. (nach: Kai Joachim Bühling, Wolfgang Friedmann, Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe, 1.Auflage, Urban & Fischer)

Die Rekrutierung des Vergleichskollektives erfolgte nach folgenden Kriterien:

Frauen mit mindestens einer vorangegangenen Schwangerschaft mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf ohne Präeklampsie, SIH, HELLP-Syndrom oder vorzeitiger Plazentalösung. Weitere Ausschlusskriterien waren essentielle Hypertonie, Diabetes mellitus, kardiale, renale oder andere schwere Vorerkrankungen.

Auch diese Patientinnen haben schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt. Die anamnestischen Daten wurden mittels Fragebogen erhoben. Das venöse Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen und ebenfalls bei -20° C gelagert.

3.2 DNA- Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Extraktion aus Vollblut (bei -20° C tiefgefrorene EDTA-Röhrchen) erfolgte nach zwei verschiedenen Protokollen:

a) Zur Erythrozytenlyse werden 4 ml Lösung A (Inhaltsdeklaration siehe Seite 26, Kapitel 3.7) auf 1 ml aufgetautes EDTA-Blut gegeben und die Lösung bei 3700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der rote Überstand wird vorsichtig dekantiert. Das verbleibende Pellet wird mit 350 µl der Lösung B (siehe Seite 26, Kapitel 3.7) versetzt und zur Resuspendierung gevortext. Es erfolgt eine Überführung in ein 2 ml Eppendorf Microtube und die Zugabe von 100 µl der Lösung C (siehe Seite 26, Kapitel 3.7) zur Deproteinisation. Die Lösung im Tube wird per Hand vorsichtig 15-mal über Kopf gemischt. Zur Extraktion wird die Lösung mit 600 µl Chloroform versetzt, über Kopf gemischt und bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und es wird 0,8 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Danach erfolgt eine zweimalige Waschung mit 70%igem Ethanol. Das DNA-Pellet wird bei 37° C getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

b) Die zweite von uns benutzte Methode zur DNA-Extraktion aus Vollblut war die Verwendung des DNA-Blood-Mini-Kit (QIAGEN). Nach Herstellerprotokoll wird mit Protease und Puffer lysiert, dann inkubiert. Die Lösung wird in spezielle Säulen überführt (QIAampSpinColumn), die DNA darin an eine spezielle Membran gebunden, mehrmalig mit verschiedenen Waschpuffern gereinigt und zentrifugiert und abschließend in beigefügtem Puffer oder Aqua dest. wieder gelöst.

Die gewonnene DNA wird bis zur Weiterverwendung bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3 Amplifizierung des DNA-Abschnittes

Mittels der erstmalig 1987 von Mullis et al.⁷² beschriebenen PCR erfolgte die Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, abgekürzt PCR („polymerase chain reaction“) ist die enzymatische Vermehrung von DNA oder RNA zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Diese Primer werden im Überschuss bei Hybridisierungstemperaturen zu einer DNA-Präparation gegeben. Die DNA-Polymerase (hitzestabil, meist Taq-Polymerase) heftet Nucleotide an die 3'OH-Primer-Enden und synthetisiert eine komplementäre DNA-Sequenz. Nach der anschließenden Denaturierung folgt die wiederholte Hybridisierung, DNA-Strangsynthese und Denaturierung. Es handelt sich also um eine Kettenreaktion, bei der eine kleine Menge einer gegebenen DNA-Sequenz um das Millionenfache amplifiziert werden kann.

(nach: Rolf Knippers, Molekulare Genetik, 8. Auflage, Thieme, 2001)

Das verwendete Protokoll für die Amplifizierung des DNA-Abschnittes mittels PCR ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 2: PCR-Protokoll

Substanz	in μl	Konzentration der Ausgangssubstanz
Aqua dest.	29,6	
PCR-Puffer	5,0	25 mM
dNTP-Mix	4,0	10 mM
Primer sense Intron 4	0,5	50 μM
Primer antisense Intron 4	0,5	50 μM
Q-Solution	10,0	
Taq	0,4	
Gesamt	48	

dNTP=Deoxyribonucleotide

Aus den aufgelisteten Substanzen wird ein Mastermix je nach Probenanzahl hergestellt. Da eine cold-start-PCR durchgeführt wird, werden alle Komponenten bis zum Start der PCR konsequent auf Eis gestellt. Der Mastermix wird gevortext, dann je 38 μl in mit 2 μl Template-DNA befüllte 0,2 ml PCR-Tubes pipettiert. Abschließend werden noch 10 μl Q-Solution (Modifizierung des Schmelzverhaltens der DNA) dazugegeben. Die Tubes werden nochmals kurz gevortext und dann in den Thermal Cycler, den PCR-Apparat, gestellt, welcher nach programmiertem Muster (siehe Protokoll) den Temperaturwechsel durchführt.

PCR- Programm :

1. 2 min. 94° C
2. 2 min. 94° C Denaturierung
3. 1 min. 56° C Hybridisierung
4. 2 min. 72° C Elongation

Schritt 2-4 insg. 35x

5. 2 min. 72° C

dann 10° C bis zur Herausnahme der Proben

Gesamtzeit : ca. 3 h

Primer Intron 4 sense: 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TT 3'

(Basen 5111-5130 des eNOS-Gens)

Primer Intron 4 antisense: 5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'

(Basen 5530-5511 des eNOS-Gens)

Länge der Primer: je 20 Basen

Die gewählten Primer flankieren die 27-basenpaarhaltige repetitive Sequenz im Intron 4.

Dieses PCR-Protokoll wurde mit Hilfe eines Standardprotokolles entworfen und dann in Optimierungsreaktionen mit sowohl ansteigenden Temperaturen (mit Hilfe der Gradient Cycler Funktion) als auch mit ansteigenden Konzentrationen von Primer, Puffer, dNTP, Q-Solution und TaqPolymerase verbessert. Auf Mg-Chlorid, einem häufigen PCR-Zusatz, wurde verzichtet, da sowohl der PCR-Puffer als auch die Q-Solution ausreichend Magnesiumchlorid enthalten.

3.4 Sichtbarmachen des PCR-Produktes

Im Anschluß an die PCR werden 6 µl des Intron 4-PCR-Produktes mit 6 µl Ladepuffer vermischt und in die Taschen eines 0,8%igen Agarosegels zur Kontrolle aufgetragen. Wenn Banden in ausreichender Qualität erscheinen, wird das PCR-Produkt wiederum auf ein spezielles hochauflösendes 2%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen, welches eine genauere Differenzierung benachbarter Banden erlaubt. Die Gelelektrophorese (80-100 V, Puffer 1x TBE) erfolgt in einer Mini-Gelelektrophoresekammer mit einer Laufzeit von 60-90 Minuten. Die DNA-Banden werden anschließend unter dem UV-Licht eines Transilluminators sichtbar gemacht und photographiert.

Als Größenmarker dient eine 100 bp-DNA-Leiter, welche ebenso wie eine Negativ-Kontrolle (6 µl Aqua dest. und 6 µl Färbelösung) mitläuft.

Die erwarteten Banden befinden sich bei einer Länge von 420 und/oder 393 Basenpaaren.

Ein 420 bp-Fragment (eNOS 4B, homozygot) wird sichtbar, wenn die 27-bp-Repetition im Intron 4 fünfmal vorhanden ist und eine Bande bei 393 bp (eNOS 4A, homozygot), wenn die repetitive Sequenz lediglich viermal vorhanden ist.

Eine Doppelbande bei 420 bp und 393 bp (eNOS 4A/B) zeugt vom Vorhandensein von zwei verschiedenen Allelen in einem Gen (Heterozygotie) mit sowohl fünfmaliger als auch viermaliger Wiederholung der repetitiven Sequenz.

3.5 Kontrollsequenzierung des amplifizierten Genabschnittes

Nach erfolgreicher PCR erfolgt dann stichprobenartig sowohl bei Patientinnen-DNA als auch bei Kontrollgruppen-DNA die Kontrolle des PCR-Ergebnisses und des richtigen Bandenablesens mittels Sequenzierung des amplifizierten Genabschnittes mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Die automatische Sequenzierung beruht auf der Verwendung fluoreszenz-markierter Didesoxyribonucleosidtriphosphate.

Beim Cyclesequencing findet eine DNA-Replikationsreaktion aus einem Gemisch statt, welches die zu sequenzierende Einzelstrang-DNA, das Enzym DNA-Polymerase, kurze DNA-Primer, die den Replikationsstart ermöglichen, und die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) enthält. Durch das Vorliegen eines Didesoxynucleosid-Analogon wird dieses ebenfalls in die wachsende DNA-Kette eingebaut. Aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe, welche die Bindung des nächsten Nucleotids blockiert, wird die Verlängerung der Kette an diesem Punkt gestoppt.

Diese Methode produziert eine Sammlung von verschiedenen DNA-Kopien, die an jeder Position in der Ausgangs-DNA abbrechen und sich somit in ihrer Länge um jeweils ein Nucleotid unterscheiden. Dieses Sequenzierprinzip, auf dem fast alle Sequenzierverfahren beruhen, nennt man auch Kettenabbruchprinzip nach F. Sanger ⁷³.

Die Syntheseprodukte mit eingebauten fluoreszierenden Nucleotiden in vier Farben wandern dann im Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld (Elektrophorese) an einem Laserstrahl vorbei, der die Fluoreszenzen anregt. Diese Signale werden durch einen Detektor aufgenommen und von einem Computer analysiert, welcher die Fluoreszenzpeaks den einzelnen Nucleotiden zuordnet und somit in DNA-Sequenzen übersetzt.

Diese können dann auf einem Bildschirm sichtbar gemacht werden oder auf Disketten gespeichert werden.

Zu Beginn der Sequenzierung werden die entstandenen PCR-Produkte mit Hilfe des Qiagen-Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, um Verunreinigungen durch Primer oder dNTP zu verhindern.

Die so aufgereinigten Proben werden dem Cyclesequencing zugeführt, für welches folgender Versuchsansatz benötigt wird:

Aqua dest.	1,4 µl
PCR-Produkt (Template)	6,0 µl
Primer (sense/antisense)	0,6 µl in einer Konzentration von 10 pM
Big Dye Cycle Seq. Premix	2,0 µl

Für jedes Template werden also zwei Sequenzieransätze benötigt, je eines für den sense-Primer, eines für den antisense-Primer. Hierbei wird der PCR-Primer in einer niedrigeren Konzentration verwendet. Die 10 µl-Ansätze werden in PCR-Tubes gefüllt, gevortext und dann in den Thermal Cycler gestellt.

Programm für das Cyclesequencing :

1. 3,00 min. 96 ° C

2. 0,35 min. 96 ° C

3. 0,15 min. 56 ° C

4. 3,00 min. 60 ° C

Schritt 2-4 insg. 26x

dann 10° C bis zur Herausnahme der Proben

Nach dem Cyclesequencing werden die mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllten Cyclesequencing-Produkte auf Sephadex-Säulen aufgetragen. In die Sephadex-Säule werden vorher 600 µl Sephadex-Lösung (2,4 g Sephadex + 28,8 g Aqua dest., vortexend vermischt) pipettiert und das Wasser nach einer mindestens halbstündigen Wartezeit wieder abzentrifugiert. Nach dem Auftragen des Cyclesequencing-Produkts auf die feste Säule wird nochmals zentrifugiert.

Der gereinigte Überstand wird dann in PCR-Mikrotubes gefüllt und kurz für zwei Minuten bei 96° C in den Thermal Cycler gestellt. Dann wird der Tube-Inhalt mittels Pipette in ein 0,5 ml-Sample Tube überführt und mit einem passenden Gummideckel verschlossen.

Anschließend wird der automatische Sequenzierer geöffnet, das Rack mit je bis zu 48 oder 96 Proben bestückt und wieder eingelegt. Nach dem Schreiben des Programmes erfolgt dann die automatische Sequenzanalyse, welche pro Probe ca. eine Stunde dauert.

3.6 Statistische Auswertung

Die mittels Fragebogen und Geburtenprotokoll erhobenen Angaben zu Schwangerschaftsverlauf, Geburt und anamnestischen Risiken sind zur statistischen Auswertung in einer SPSS-Datei (SPSS 13.0, Firma SPSS Inc.) kodiert.

Abschließend werden auch die genetischen Ergebnisse kodiert in diese bereits vorliegende SPSS-Datei eingetragen und mittels statistischer Verfahren die Genotyphäufigkeiten (4A/A, 4B/B, 4A/B, 4B/C) im erkrankten und im Kontrollkollektiv berechnet. Der Vergleich der Genotyp-Häufigkeiten und die Berechnung der Signifikanz erfolgt mit dem exakten Test nach Fisher.

Auch die klinischen Parameter werden sowohl in den beiden Patientengruppen (SIH, PE) und der Kontrollgruppe als auch in den drei Genotypgruppen auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wird bei dem Vergleich von Mittelwerten oder Medianen der drei Gruppen als parametrischer Test die Varianzanalyse, als nichtparametrischer Test der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Bei der Angabe von prozentualen Häufigkeiten wird der Chi-Quadrat-Test oder bei abweichenden Bedingungen der exakte Test nach Fisher benutzt.

Ein p-Wert kleiner 0,05 wird dabei als statistisch signifikant betrachtet.

Alle statistischen Tests wurden mit der SPSS Software Version 13.0 durchgeführt.

3.7 Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung A: 109,5 g Succhrose in 600 ml Aqua dest. auflösen

5,0 ml 1,0 M $MgCl_2$

10,0 ml Triton X 100

10,0 ml 1,0 M Tris-HCl pH 8,0

Gesamtmenge mit Aqua dest. auf 1 000 ml auffüllen und autoklavieren

Lösung B: 40,0 ml 1,0 M Tris-HCl pH 8,0

12,0 ml 0,5 M Na-EDTA

15,0 ml 1,0 M NaCl

Gesamtmenge auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren

danach 5 ml 20 % SDS im Wasserbad hinzufügen

Lösung C: 100 g Natriumperchlorat in 60 ml Aqua dest. auflösen,

dann mit Aqua dest. auf 142 ml auffüllen

Tris-EDTA-Puffer: 10mM Tris-Base

(TE-Puffer) 1mM EDTA

pH 7,4

TBE-Puffer: 10x: 108 g Tris-Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA

[1 x TBE: 100 ml 10x TBE und 900 ml Aqua dest

0,6x TBE: 120 ml 10x TBE und 1880 ml Aqua dest

0,5x TBE: 50 ml 10x TBE und 950 ml Aqua dest.]

Agarosegel: 0,8%: 50,0 ml 0,5x TBE-Puffer

0,4 g Agarose als Pulver

1,0 μ l Ethidiumbromid nach dem Erhitzen der Lösung in der Mikrowelle

(600 W, 100 s) hinzufügen

Gel in Kammer gießen, Kämme einsetzen, ca. 1 h trocknen lassen,
Kämme entfernen und DNA-Ladepuffer-Mischung in die Laschen
einfüllen

1,2%: 100,0 ml 0,5x TBE-Puffer

1,2 g Agarose

2,0 µl Ethidiumbromid

2 %: 50,0 ml 1x TBE-Puffer

1,0 g high-melting-Agarose

2,0 µl Ethidiumbromid

Ladepuffer: 5,0 ml Glycerol

0,025 g Bromphenolblau

0,025 g Xylencyanol

20,0 µl 0,5M EDTA

mit sterilem Aqua dest. auf 10 ml auffüllen

100 bp-Leiter: 11,0 µl steriles Aqua dest.

2,5 µl 6x Loading Buffer

1,5 µl Leiter-DNA

3.8 Verwendete Reagenzien

Tabelle 3: Angabe der verwendeten Reagenzien und der Herstellerfirmen

Verwendete Reagenzien	Firma, Ort
100 bp DNA Ladder	Cembrex, über Biozym
6x Gel Loading Buffer	Cembrex, über Biozym
Agarose SeaKem LE Agarose, 500g	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Aqua dest.	Selbst autoklaviert
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenol Blue	Sigma
Borsäure pro analysii	MERCK KGaA Darmstadt, Deutschland
Chloroform p.a	MERCK
dTTP, dGTP, dATP, dCTP, je 100 mM	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA, 250g	Sigma
EthylendiaminTetraaceticacid	
Ethanol, 70%, p.a.	Riedel de Haën Laborchemikalien & Co KG, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid Ethidium Bromide Solution 10 mg/ ml 10ml	Bio-Rad Laboratories
Isopropanol	MERCK
Lauryl Sulfate SDS Sodium Salt	MERCK
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a	MERCK
MetaPhorAgarose 125 g	Biozym
Na-Perchlorat	Sigma
PCR-Puffer,10x, mit 15 mM MgCl	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Primer Intron 4 sense antisense	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin, Deutschland
Q-Solution, 5x	QIAGEN
QIAmp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Sephadex TM G-50 Fine DNA- Grade	Amersham Biosciences Europe GmbH, Deutschland
Succhrose	Sigma
Taq DNA-Polymerase , 5 U/µl	QIAGEN
Tris-Base, 10 mM Trishydroxymethyl-Aminomethan	MERCK
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	MERCK
Xylene cyanole	Sigma

3.9 Verwendete Hilfsmittel und technische Geräte

Tabelle 4: verwendete Hilfsmittel mit Herstellerangaben

Verwendete Hilfsmittel und techn. Geräte	Firma, Ort
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen mit Deckel 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ., USA
Transilluminator TI 3	Biometra GmbH, Düsseldorf
Gel-Elektrophoresekammer ComPhor L Mini und Gelelektrophoresekämme	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Genetic Analyzer Septa for 0,5 ml Tubes und 0,5 ml Sample Tubes	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kühlschrank + Gefrierschrank – 20°C	Liebherr- Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Kurzzeitwecker	Kleinfeld Labortechnik, Deutschland
Labor-pH-Meter 766 Calimatic und pH-Einstabmesskette SE 100	Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland
Latex-freie Handschuhe	Kimberly- Clark, Roswell, USA
Magnetrührwerk MR 2 000, Heizgerät HG 2 002	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
PCR-Softstrips 0,2 ml	Biozym
Peltier Thermal Cycler mit Gradienten-Funktion, PTC-200	Biozym
Pipetten, diverse Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Power Supply für Gelelektrophorese	Biozym
Reaktionsgefäße mit Deckel : 0,65 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Vortexer	Heidolph
Waage SAC 51	SCALTEC INSTRUMENTS GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wärmebad	Medax