

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Humanproben

Für Untersuchungen im ELISA wurden Serumproben von Menschen bezogen. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Probenherkunft und -anzahl.

Tabelle 5: Anzahl und Herkunft untersuchter Humanseren

Humanseren	Probenanzahl	Herkunft
gesunde Blutspender	20	Betriebsärztlicher Dienst Robert Koch-Institut/Berlin ^a
Schlachter	25	(Tacke et al., 2001) ^b
Empfänger porziner Inselzellen des Pankreas	35 (insgesamt 11 Patienten, 2-4 Seren je Patient)	(Paradis et al., 1999) ^b
Patienten mit kurzzeitiger Verbindung zu Bioreaktor (ausgekleidet mit porzinen Leberzellen)	18 (insgesamt 6 Patienten, 3 Seren je Patient)	(Irgang et al., 2003) ^b

^a: vermittelt über Dr. Ellerbrok, Robert Koch-Institut/Berlin

^b: vermittelt über Dr. Denner, Robert Koch-Institut/Berlin

3.1.2 Tiere und Tiermaterial

Für die Immunisierung von Mäusen wurden 16 sechs bis acht Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV; jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR]) bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Robert Koch-Instituts betreut. Für einen Vorversuch wurden sechs Balb/c Mäuse von Priv. Doz. Dr. Kerstin Borchers (Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

Zur Immunisierung von Kaninchen wurden zwei weibliche, fünf Monate alte Chinchilla Kaninchen verwendet, die ebenfalls aus dem BgVV stammten und in der Tierhaltung des Robert Koch-Instituts betreut wurden.

Blutproben vom Schwein stammten von Tieren unterschiedlicher Herkunft und verschiedenen Alters. Es handelte sich dabei um Proben von Miniaturschweinen von der Firma Ellegaard aus Dalmoose/Dänemark (DK), von experimentell transplantierten und an PTLD-erkrankten Miniaturschweinen vom Massachusetts General Hospital in Boston/USA und von konventionell gehaltenen Schlachttieren aus dem Raum Brandenburg (BB) vom Veterinäruntersuchungsamt in Frankfurt-Oder. Zusätzlich wurden von der Veterinärgesellschaft im Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP) in

Lüneburg Blutproben von Zuchtsauen, Jungsauen und Ferkeln bezogen. Außerdem standen Serumproben und “buffy coats” von den Nachkommen der Zuchtsauen zur Verfügung. Seren von drei PCMV-positiven und fünf PCMV-negativen Schweinen wurden von Dr. Widen aus Uppsala/Schweden (S) bezogen. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Proben.

Tabelle 6: Übersicht untersuchter Schweineseren

Herkunft	Anzahl	Hygienestatus	Alter
Miniaturschweine/DK	10	SPF	4-5 Mo
PTLD-Schweine/USA	4	SPF	k.A.
Schlachttiere/BB	100	konventionell	ca. 6 Mo
Zuchtsauen/BHZP	20	SPF	k.A.
Jungsauen/BHZP	10	SPF	6 Mo
Ferkel/BHZP	10	SPF	3 Wo
Nachkommentiere/BHZP	12	SPF	0-156 d*
PCMV-negative Tiere/S	5	k.A.	k.A.
PCMV-positive Tiere/S	3	k.A.	k.A.

d = Tage k.A. = keine Angaben Mo = Monate SPF = spezifiziert pathogen-frei

*von jedem Tier standen 8-9 Proben zur Verfügung, die innerhalb der ersten fünf Lebensmonate gesammelt wurden

Paraffinschnitte von Lymphknoten stammten von einem experimentell transplantierten, immunsupprimierten Miniaturschwein (Tier-Nr. 13432), das an PTLD erkrankt und gestorben war (Huang et al., 2001). Die Proben wurden von Christine Huang vom Massachusetts General Hospital in Boston/USA zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden Lymphknotenpräparate von einem Schlachtschwein vom Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) in Berlin bezogen.

Zytospins und Blutlymphozyten von PTLD-erkrankten Miniaturschweinen wurden ebenfalls von Christine Huang bereitgestellt.

3.1.3 Zellen

Eine B-Zelllinie vom Schwein (L23), die in Suspension vorlag, wurde von der europäischen Zellbank (ECACC) bezogen. Die Zellen waren mit PLHV-3 infiziert. Die Replikationsrate von PLHV-3 wurde durch verschiedene Reagenzien stimuliert (Chmielewicz, 2002).

3.1.4 Bakterienstämme

E. coli-Stamm

DH5 α	<u>Genotyp:</u>	F ⁻ <i>endA1 hsdR17(rk-,mk+) suPE44 thi-1 recAI gyrA, (Nalr)relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)
	<u>Herkunft:</u>	Invitrogen, Carlsbad/USA
Rosetta™	<u>Genotyp:</u>	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B-m_B) gal dcm lacY1</i> pRARE (Cm ^R)
	<u>Herkunft:</u>	Novagen, Madison/USA
Rosetta(DE3)pLacI	<u>Genotyp:</u>	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B-m_B) gal dcm lacY1</i> (DE3) pLacIRARE (Cm ^R)
	<u>Herkunft:</u>	Novagen, Madison/USA
TOP10	<u>Genotyp:</u>	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
	<u>Herkunft:</u>	Invitrogen, Carlsbad/USA

3.1.5 Nucleinsäuren, Nucleotide und Marker

Nucleinsäuren:

- DNA aus PLHV-positiven Proben (Tabelle 7)

Tabelle 7: Herkunft PLHV-positiver Proben

Probe	Virus	Organ	Herkunft
56a	PLHV-1	Milz (Schwein)	M. Domingo, Universidad de Barcelona/Spanien
546	PLHV-2	Tonsille (Wildschwein)	ILAT/Berlin
489	PLHV-3	Milz (Schlachtschwein)	Schlachthof Eberswalde/Brandenburg

- DNA aus Kalbsthymus (c = 120 ng/ μ l), Herkunft: Boehringer, Mannheim/D

Nucleotide:

Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in Expressionsvektoren wurden PCR mit modifizierten Oligonucleotiden (Tabelle 8) durchgeführt, denen durch Basenaustausch am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme (fett hervorgehoben) eingebaut wurde. Für Kolonie-PCR zur Identifizierung positiver Bakterienklone wurden neben den in Tabelle 8 genannten Primer auch Vektor-spezifische Primer verwendet (Tabelle 9). Die in beiden Tabellen genannten Primer fanden auch Anwendung bei Sequenzierungsreaktionen.

Tabelle 8: PCR-Primer für Klonierungszwecke

Primer	Sequenz (5'→3')	Ziel-Gen/Virus
417s	ACAATGGCAGGTAGCTTAAACTTA	gB/PLHV-1 ^a
417as	TAGATGCTTTTCCCAAGATAATGTA	
432s	ATTGTCCACTAACATTATGGAAAGC	gB/PLHV-1 ^b
464as	CACTGACCCTCTGAGCATAGTAGTT	
1469s	TGGTGC GAGCT CCAAGTAGCTCTCTATGCGCTT	gB1/PLHV-2
1469as	AAATGG CTCGAG CGATCTTGCAAACATGTCCAT	
1470s	AACAGGG GAGCT CGATGCTAAGAACAAACTGAAC	gB2/PLHV-2
1470as	AAAGTC CTCGAG CTCCAATAGTGTAATAATTAAG	
1472s	AACAGAG GAGCT CGAAGCAAGAAGTAGACTCAAT	gB2/PLHV-3
1472as	AAAGTC CTCGAG TTCCAATAGAGTAAATAATTAAG	
1583s	TAC GGATCC CAGGTGGCTCTTTATTCACTT	gB1/PLHV-1
1583as	GGAATTC TCTTGCAAACATGTCCATTAG	
1584s	AGGG GATCC GATGCTAAGAACAAACTGAAC	gB2/PLHV-1
1584as	AGAATTC CCTCCAATAGTGTAATAATTAAG	
1754s	TGTGGT GAGCT TTATGGATGCTGTTTCAGGT	gB1/PLHV-3
1754as	TGTTAC CTCGAG ATCAAATGGAGGGTTTGACC	
1891s	GGT GGATCC TTATGGATGCTGTTTCAGGT	gB1/PLHV-3
1891as	TAC GAATTC ATCAAATGGAGGGTTTGACC	
1892s	AGAG GATCC GGAAGCAAGAAGTAGACTCAAT	gB2/PLHV-3
1892as	GTC GAATTC TTCCAATAGAGTAAATAATTAAG	
1907s	GTTACC GAGCT CTACAATACTTTCAAATGAAGTCATCA	gM/PLHV-1
1907as	ATACAT CTCGAG AAATTCTGTTTCACTTTCCTCATCTAAA	
1908s	CAACAT GAGCT CATAGTCATATGTTTGTTATGCATCATG	gL/PLHV-1
1908as	ACCAGT CTCGAG TTGTTTCTGCTGTGCCTAGTATCTAC	
1909s	ATAATAG GAGCT CCCACCAATGGCACAATCTACTAAG	ORF52/PLHV-1
1909as	TATC CTCTCGAG ATTTGTAGCTCCCTTTATTTTGGG	
1910s	CAAAGT GAGCT CCAACGTAATATGGCTTACAGGAGG	ORF65/PLHV-1
1910as	ATACTA CTCGAG CGGTCTTCTTTTACCCAACTTT	
2097s	CCT GAATTC GGTGGCTCTTTATTCACTT	gB1/PLHV-1
1889as	TGG CTCGAG TGATCTTGCAAACATGTCCATTAG	
2098s	GCT GAATTC GCTAAGAACAAACTGAACA	gB2/PLHV-1
1890as	AAC CTCGAG CAATAGTGTAATAATTAAGGGCTAT	

(fett hervorgehoben sind die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme)

^a: Primer für *nested* PCR (1. Runde) zur Amplifikation von PLHV-1-gB1 (2. Runde mit Primerpaar 2097s/1889as)

^b: Primer für *nested* PCR (1. Runde) zur Amplifikation von PLHV-1-gB2 (2. Runde mit Primerpaar 2098s/1890as)

Tabelle 9: Vektor-spezifische Primer für Kolonie-PCR

Primer	Sequenz (5'→3')	Vektor
1970	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	pGEX-6P-1
191	CCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGG	
1971s	TGGATGGAGCTCCAGGTAATGTTCTACTTTGCC	pTriEx-1.1
1971as	AAATGGCTCGAGGACCGAGCAAACATGTCCGTC	
Unifor	CTATCAACAGGTTGAACTG	pUni/V5-His-TOPO®
Unirev	CAGTCGAGGCTGATAGCGAGCT	
Trxfor	TTCCTCGACGCTAACCTG	pBAD/Thio-E™

DNA-Marker:

ϕ X174 DNA- <i>Hae</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA- <i>Hind</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA- <i>Bst</i> EII Digest	New England Biolabs, Beverly/USA

Protein-Marker:

Mark12™ Unstained Standard	Invitrogen, Carlsbad/USA
Protein Ladder, 10-200 kDa	Fermentas, Vilnius/Litauen

3.1.6 Antikörper und Konjugate

Monoklonale Antikörper:

Maus anti-Histidin	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-GST	Amersham, Buckinghamshire/UK
Maus anti-PLHV-1-gB1	BfAV, Tübingen/D
Maus anti-X63	BfAV, Tübingen/D
Maus anti-38/17C1	BfAV, Tübingen/D
Maus anti-38/15H7	BfAV, Tübingen/D

Konjugate:

Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L), AP-konj.	Amersham, Buckinghamshire/UK
Ziege anti-Maus IgG (H+L), AP-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Maus IgG (H+L), FITC-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Mensch IgG (H+L), AP-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Schwein IgG (H+L), AP-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Maus IgG (H+L), POX-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Mensch IgG (H+L), POX-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege anti-Schwein IgG (H+L), POX-konj.	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA

3.1.7 Enzyme

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA
Expand High Fidelity DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim/D
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Eco</i> RV	New England Biolabs, Beverly/USA
Proteinase K	Qiagen, Valencia/USA
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Sac</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly/USA
Benzonase Nuklease	Novagen, Madison/USA
rLysozym [™] Solution	Novagen, Madison/USA

3.1.8 Klonierungsvektoren

pTriEx-1.1	Novagen, Madison/USA
pGEX-6P-1	Amersham, Buckinghamshire/UK
pUni/V5-His-TOPO [®]	Invitrogen, Carlsbad/USA
pBAD/Thio-E [™]	Invitrogen, Carlsbad/USA

3.1.9 Reaktionssets (Kits)

ABI Prism [®] BigDye [™] Terminators v 3.0 CycleSequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
AmpliTaq Gold [™]	Applied Biosystems, Foster City/USA
AntigenPlus [™] Puffer Set	Novagen, Madison/USA
Echo [™] Cloning System	Invitrogen, Carlsbad/USA
Expand [™] High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
GST Gene Fusion System	Amersham, Buckinghamshire/UK
Multicolor Detection Set	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg/D
Protein Refolding Kit	Novagen, Madison/USA
Qiagen Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Valencia/USA
UltraVision Detection System	Dianova, Hamburg/D

3.1.10 Filterpapier, Membranen und Säulen

Microcon YM10 Zentrifugensäulen	Millipore, Bedford/USA
Immobilon™-P Transfer-Membran	Millipore, Bedford/USA
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Einbeck/D

3.1.11 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt/D
Acrylamid-Bis 30% (37,5:1)	Merck, Darmstadt/D
Agarose	Life Technologies, Paisley/UK
Albumin	Roth, Karlsruhe/D
Amidoschwarz 10 B	Serva, Heidelberg/D
Ammoniumpersulfat (APS)	Life Technologies, Paisley/UK
Ampicillin	Sigma, St. Louis/USA
Arabinose	Sigma, St. Louis/USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit/USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit/USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit/USA
Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Fluka, Buchs/CH
Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258)	Molecular Probes, Eugene/USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
n-Butanol	Merck, Darmstadt/D
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt/D
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt/D
Chloramphenicol	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Diethanolamin	Merck, Darmstadt/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D Sigma, St. Louis/USA

Material

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma, St. Louis/USA
p-Dinitrophenylphosphat Tabletten	Calbiochem, San Diego/USA
D-MEM	Life Technologies, Paisley/USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg/D
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Paisley/USA
Glukose	Merck, Darmstadt/D
L-Glutamin	Sigma, St. Louis/USA
Glutathion (reduziert)	Amersham, Buckinghamshire/UK
Glutathion Sepharose 4B	Amersham, Buckinghamshire/UK
Glycerol (87%)	Merck, Darmstadt/D
Glycin	Merck, Darmstadt/D
Guanidiumchlorid	Sigma, St. Louis/USA
Hämatoxylin-Monohydrat	Merck, Darmstadt/D
Halothan	Rebopharm, Bocholt/D
Harnstoff	Sigma, St. Louis/USA
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg/D
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kalialaun	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma, St. Louis/USA
Kanamycin	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt/D
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt/D
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad/USA Serva, Heidelberg/D
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D

Material

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Natriumjodat	Merck, Darmstadt/D
Natriumpyruvat	Sigma, St. Louis/USA
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Valencia/USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt/USA
Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma, St. Louis/USA
Ponceau S Solution (0,1%)	Sigma, St. Louis/USA
Poly-L-Lysin (0,01%)	Sigma, St. Louis/USA
Roti®-Blue	Roth, Karlsruhe/D
RPMI 1640	Life Technologies, Paisley/USA
Salzsäure (HCl), rauchend	Merck, Darmstadt/D
Stickstoff	Linde, Wiesbaden/D
Sucrose	Merck, Darmstadt/D
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis/USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt/D
Triton X-100	Merck, Darmstadt/D
Trypanblau	Serva, Heidelberg/D
Trypsin	Life Technologies, Paisley/USA
Tween 20	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D
Xylol	Riedel-de Haen, Seelze/D

3.1.12 Puffer und Lösungen

Kulturmedien für Bakterien

LB-Agar	17 g/l	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium, sterilfiltriert
LB-Flüssigmedium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Bacto-Yeast-Extrakt
	10 g/l	NaCl
		pH 7.5, sterilfiltriert
SOC-Medium		Invitrogen, Carlsbad/USA

Kulturmedien für Zellen

adhärente Zellen	5%	FKS in D-MEM
------------------	----	--------------

Material

Suspensionszellen	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	0.05 mM	Mercaptoethanol
	10%	FKS
	1%	Penicillin-Streptomycin in RPMI 1640

PCR

MgCl ₂		Applied Biosystems, Foster City/USA
Nukleotidmix (dNTP)		Applied Biosystems, Foster City/USA Roche Diagnostics, Mannheim/D
PCR-Puffer		Applied Biosystems, Foster City/USA Roche Diagnostics, Mannheim/D

Agarosegelelektrophorese

Elektrophoresepuffer	2x	TBE, verdünnt mit ddH ₂ O
	0.4 µg/ml	Ethidiumbromid
Ethidiumbromid-Lösung	10 g/l	Ethidiumbromid in ddH ₂ O
Probenpuffer	7 Teile	70% Sucrose
	5 Teile	Bromphenolblau-Lösung gesättigt in ddH ₂ O

Proteinreinigung

BugBuster [®] Protein Extraction Reagent		Novagen, Madison/USA
Dialysepuffer (Protein Refolding Kit)		Novagen, Madison/USA
Glutathion Elutionspuffer	10 mM	Glutathion (reduziert)
	50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
Lysispuffer (Protein Refolding Kit)		Novagen, Madison/USA
Puffer A	6 M	Guanidiumchlorid
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄
	0.01 M	Tris-HCl, pH 8.0
Puffer C	8 M	Harnstoff
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄
	0.01 M	Tris-HCl, pH 6.3

Material

Puffer D	8 M	Harnstoff
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄
	0.01 M	Tris-HCl, pH 5.9
Puffer E	8 M	Harnstoff
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄
	0.01 M	Tris-HCl, pH 4.5
<u>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</u>		
Ammoniumpersulfat-Lösung	10% (w/v)	APS in ddH ₂ O
Coomassie-Blau-Lösung	20 ml	Methanol p.A.
	60 ml	ddH ₂ O
	20 ml	Roti [®] -Blue (5x)
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	100 ml	Methanol p.A.
	20 ml	Essigsäure
	280 ml	ddH ₂ O
Elektrophoresepuffer	50 mM	Tris
	384 mM	Glycin
	1% (w/v)	SDS in ddH ₂ O, pH 8.5
Sammelgelpuffer	1.0 M	Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 6.8
SDS-Lösung	10% (w/v)	SDS in ddH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2x)	250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	4% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerol
	0.006% (v/v)	Bromphenolblau
	1% (v/v)	β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
Trenngelpuffer	1.5 M	Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 8.8
<u>Western Blot</u>		
Amidoschwarz-Entfärbelösung	900 ml	Methanol p.A.
	200 ml	Essigsäure
	900 ml	ddH ₂ O
Amidoschwarz-Lösung	0.2 g	Amidoschwarz 10 B
	90 ml	Methanol p.A.
	20 ml	Essigsäure
	90 ml	ddH ₂ O

Material

AP-Detektionspuffer	0.1 M	Tris-HCl
	0.1 M	NaCl
	2.5 mM	MgCl ₂ in ddH ₂ O, pH 9.5
Blockpuffer	1x	AP-Puffer, pH 7.4
	0.05% (v/v)	Tween 20
	1-3% (w/v)	Albumin in ddH ₂ O
Transferpuffer	10 ml	Methanol p.A.
	30 ml	Elektrophoresepuffer
	50 ml	ddH ₂ O
Waschpuffer	1x	AP-Puffer, pH 7.4
	0.05% (v/v)	Tween 20 in ddH ₂ O
<u>ELISA</u>		
Blockpuffer	0.05% (v/v)	Tween 20
	1% (w/v)	Albumin in PBS
Probenverdünnungspuffer	0.2% (w/v)	Albumin in PBS
Substratpuffer	10 mM	Diethanolamin
	0.5 mM	MgCl in ddH ₂ O, pH 9.5
Waschpuffer (PBST)	0.05% (v/v)	Tween 20 in PBS
<u>Immunfluoreszenztest</u>		
Blockpuffer	3%	FKS
	0.1%	Tween 20 in PBS
Trypanblau-Lösung	0.2%	Trypanblau in PBS
<u>Immunhistochemie</u>		
Citratpuffer	9 ml	0.1 M Citronensäure
	41 ml	0.1 M Natriumcitrat
	450 ml	ddH ₂ O
DAKO® Fluorescent Mounting Medium		DAKO Corp., Carpinteria/USA

Material

Mayers Hämalaun	1 g	Hämatoxylin-Monohydrat
	0.2 g	Natriumjodat
	50 g	Kalialaun in 1l ddH ₂ O lösen, über Nacht rühren
	50 g	Chloralhydrat und
	1 g	Citronensäure-Monohydrat hinzufügen, rühren

Sonstige Puffer und Lösungen

AP-Puffer (10x)	1.0 M	Tris-HCl, 7.4
	1.0 M	NaCl
	25 mM	MgCl ₂
AP-Puffer (5x)	1.0 M	Tris-HCl, pH 9.5
	1.0 M	NaCl
	50 mM	MgCl ₂ in ddH ₂ O
Citronensäure	0.1 M	Citronensäure in ddH ₂ O
Messlösung für Fluorometer	0.1 µg/ml	Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoff in 1x TNE-Puffer, pH 7.4
Natriumcitrat	0.1 M	Natriumcitrat in ddH ₂ O
NEB1 Puffer		New England Biolabs, Beverly/USA
NEB <i>Eco</i> RI Puffer		New England Biolabs, Beverly/USA
PBS	140 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O
	2 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7.4
Sucrose-Lösung	70% (w/v)	Sucrose in ddH ₂ O
TBE-Puffer (10x)		Life Technologies, Paisley/UK
TNE-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl, pH 7.4
	10 mM	EDTA
	1 M	NaCl

3.1.13 Geräte und Laborhilfsmittel

ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
----------------------------------	-------------------------------------

Material

ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Analysenwaage		Sartorius, Göttingen/D
Fluorometer (TD-360 Mini)		Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationsanlage		INTAS, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C	Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA
	-20°C	Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresesysteme, horizontal		Biometra, Göttingen/D
Gelelektrophoresesysteme, vertikal		Hofer Scientific Instrument, San Francisco/USA
Gelgießapparatur		Hofer Scientific Instrument, San Francisco/USA
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)		Brand, Wertheim/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß
Magnetrührer		IKA-Werk, Staufen im Breisgau/D
Mehrkanalpipette		Biohit, Helsinki/SN
Mikroliterspritze		Hamilton, Nevada/USA
Mikroskope		Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/J
Mikrowelle		Sharp Electronics Corp., USA
Multiskan Plus		Titertek, Huntsville/USA
Neubauer-Zählkammer		Kühn & Bayer, Nidderau/D
pH-Messgerät		Beckman, Palo Alto/USA
Photometer		Dr. Lange, Berlin/D
Pipetten		Gilson, Columbus/USA Eppendorf, Hamburg/D
QIAvac 6S-Apparatur		Qiagen, Valencia/USA
Rotator		Rettberg, Göttingen/D

Schüttler	New Brunswick Scientific, New Jersey/USA Kühner AG, Birsfelden/CH
Schwenkplattform	Biometra, Göttingen/D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D Hoefer Scientific Instruments, San Francisco /USA Life Technologies, Paisley/USA
SpeedVac-Zentrifuge	Savant, Hicksville/USA
Thermozykler	Applied Biosystems, Foster City/USA Biometra, Göttingen/D
Thermogefäß	Nippon Sanso Corp., Tokio/J
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd/D
UV-Handlampe	Novodirect, Karlsruhe/D
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	GFL, Burgwedel/D Haake, Karlsruhe/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D Sorvall, Newtown/USA
Zytozentrifuge	Shandon, USA

3.1.14 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth, Karlsruhe/D
Einwegskalpelle	Rüttgers, Solingen/D
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde/DK
Kryogefäße	Nunc, Roskilde/DK
Mikro-Haematokrit Kapillaren	Merck, Darmstadt/D
Ni-NTA His Sorb™ Mikrotiterplatten	Qiagen, Valencia/USA
Objektträger	Roth, Karlsruhe/D

Material

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)		Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Pipettenspitzen		Süd Laborbedarf, Gauting/D
Plastikdeckel für Mikrotiterplatten		Greiner, Nürtingen/D
Plastikküvetten		Sarstedt, Nümbrecht/D
Polypropylen-Säulen	1 ml	Qiagen, Valencia/USA
Reaktionsgefäße	0.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml, 50 ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
Servapor® Dialyseschlauch (Ø 16 mm)		Serva, Heidelberg/D
Spritzen und Kanülen (Sterican)		Braun Melsungen, Melsungen/D

3.1.15 Software

Auto Assembler 2.1	Applied Biosystems, Foster City/USA
Endnote 5	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
Factura 2.2	Applied Biosystems, Foster City/USA
FileMaker 4.0 und 5.0	FileMaker Inc., Santa Clara/USA
Freehand 8.0	Macromedia Inc., San Francisco/USA
MacVector 7.0	Symantec Corp., Cupertino/USA
MS Office 2001	Microsoft Corp., Redmond/USA
Netscape Navigator 4.5	Netscape Communications Corp., Mountain View/USA
Photoshop 5.0	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
Primer Premier 4.0	Premier Biosoft International, Palo Alto/USA
SPSS	SPSS Incorp., Chicago/USA