

## 8 Anhang

### 8.1 Chemikalien und Reagenzien

Bromphenolblau	Bromma, Schweden
5,6- Carboxy- Rhodamin (Rox)	TIB MolBiol, Berlin
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen™, Karlsruhe
Ethanol (RNase-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Invitrogen™, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Molekulargewichts-Standards	Gibco BRL®, Eggenstein und Fermentas, St. Leon-Rot
Platinum® <i>Taq</i> DNA- Polymerase	Invitrogen™, Karlsruhe
Primer, Sonden	TIB Molbiol, Berlin
Tris-HCl	Merck, Darmstadt

### 8.2 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer „ohne“ (Phosphat-buffered saline)	Eigenherstellung RKI
8,0 g NaCl	
0,2 g KCl	
1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
ad 1l Aqua bidest. pH 7,2	
TAE-Puffer (50x)	Eigenherstellung RKI
242 g Tris- HCl	
57,1 ml Eisessig	
100 ml 0,5 M EDTA	

ad 1 l Aqua bidest. pH 8	
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Eigenherstellung RKI
Ladepuffer (6x) für Gelelektrophorese	Eigenherstellung RKI
10 mM Tris-HCl, pH 7,5	
2 mM EDTA	
15% (v/v) Glycerin	
0,1% Bromphenolblau	
10 x NH <sub>4</sub> -PCR-Puffer	Invitek, Berlin
<b>8.3 Technische Geräte</b>	
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Japan
Digitalkamera Power Shot A95	Canon, Amsterdam
Gelelektrophorese Ampergerät ST 304	Gibco BRL®, Eggenstein
Lichtmikroskop ID 03	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle Privileg 8520	Privileg, Fürth
Pipettboy	Tec No Mara AG, Zürich
Pipetten	Gilson Abimed Analysen Technik, Langenfeld
	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heraeus, Hanau
Vortexer Typ REAX 2000	Heidolph, München
Zentrifugen	
Laborzentrifuge Labofuge 400e	Heraus, Hanau
Laborzentrifuge Heraeus Sepatech	Heraeus, Hanau
Laborzentrifuge Centrifuge 5402 PA	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zykler Gene Amp PCR- System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
<b>8.4 Verbrauchsmaterialien</b>	
Cryo Tubes (1, 2 ml)	Nunc™, Wiesbaden
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP, Schweiz

Lochplatten für TaqMan- PCR (96 Well)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Weiterstadt
Optical Tubes und Caps für TaqMan- PCR	Applied Biosystems, Weiterstadt
Parafilm	American National Can, USA
Pipetten für Zellkultur (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Nunc™, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Rapidozym GmbH, Luckenwalde
6,- 24-, 96- Well-Platten	TPP, Schweiz
Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen Nunclon (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc™, Wiesbaden

## 8.5 Protokolle für die Histologie

### 8.5.1 Hämalaun & Eosin-Färbung

#### 1. Entparaffinierung und Rehydratisierung:

Xylol:	5 min
Xylol:	2 min
Xylol:	2 min
100%iger Alkohol:	2 min
96%iger Alkohol:	2 min
80%iger Alkohol:	1 min
70%iger Alkohol:	1 min
Aqua dest.:	1 min

2. Zur Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) für 3 min

3. Zum Bläuen 10 min fließend wässern.

4. Zur Gegenfärbung: wäßriges Eosin für 5 min.

5. Fließend wässern für 5 s.

6. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:

70%iger Alkohol :	1 min
80%iger Alkohol:	1 min
96%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	1 min

100%iger Alkohol: 2 min

Xylol: 1 min

Xylol: 3 min

Xylol: 3 min

7. Eindecken in Eukitt (Kindler, Freiburg)

### 8.5.2 Giemsa-Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe 8.5.1)

2. Giemsalösung für 25 min.

3. Aqua dest. für wenige s.

4. Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure bis ein rötlicher Schimmer entsteht.

5. 90%iger Alkohol für wenige s.

6. Isopropanol: 5 min

Isopropanol: 5 min

7. Xylol: 5 min

8. Eindecken in Eukitt (Kindler, Freiburg)

### 8.5.3 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe 8.5.1)

2. 0,5%ige Perjodsäure für 10 min.

3. Aqua dest. fließend für 10 min.

4. Schiff's Reagenz für 15 min.

5. Aqua dest. für wenige s.

6. Leitungswasser fließend für 10 min.

7. Zur Gegenfärbung: Hämalaun nach Mayer für 30 s.

8. Zum Bläuen: Leitungswasser für 10 min.

9. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:

70%iger Alkohol : 1 min

80%iger Alkohol: 1 min

96%iger Alkohol: 1 min

100%iger Alkohol: 1 min

100%iger Alkohol: 2 min

Xylol: 1 min

Xylol: 3 min

Xylol: 3 min

10. Eindecken in Eukitt (Kindler, Freiburg)

#### **8.5.4 Ziehl-Neelsen-Färbung**

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe 8.5.1)

2. Hämalan nach Mayer für 20-30 min.

3. Leitungswasser fließend für 30 min.

4. Karbolfuchsin bei 37 °C für 30-60 min

5. Entfärben in Salzsäure-Alkohol (100 ml 70%iger Alkohol + 0,25 ml Salzsäure) bis keine Schlieren mehr abgehen.

6. 70%iger Alkohol für 2-3 min.

7. Wässern in Leitungswasser für 30 min.

8. Aufsteigende Alkoholreihe:

50%iger Alkohol: 45 s

70%iger Alkohol : 45 s

80%iger Alkohol: 1 min

96%iger Alkohol: 1 min

96%iger Alkohol: 1 min

Xylol: 2 min

Xylol: 2 min

9. Eindecken in Eukitt (Kindler, Freiburg)

#### **8.5.5 Berliner-Blau-Färbung (Eisennachweis nach Perls)**

1. Entparaffinieren in Aqua dest.

2. Kaliumferrozyanit 10% für 5 min.

3. Salzsäure 20% und Kaliumferrozyanit 20% 1:1 für 30 min.

4. 3 x in Aqua dest. spülen.

5. Kernfärbung mit Kernechtrot für 5 min.

6. 3 x in Aqua dest. spülen.

7. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:

70%iger Alkohol : 1 min

80%iger Alkohol: 1 min

96%iger Alkohol: 1 min

100%iger Alkohol: 1 min

100%iger Alkohol: 2 min

Xylol: 1 min

Xylol: 3 min

Xylol: 3 min

8. Eindecken in Eukitt (Kindler, Freiburg)