

5. Material

5.1 Chemikalien

Falls nicht anders bezeichnet wurden alle Chemikalien von den Firmen Amersham Pharmacia, BioRad, Boehringer Mannheim, Fluka, Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Radioaktive Nukleotide wurden von der Firma NEN bezogen.

ECL-Lösung	Amersham Pharmacia
Glutathione 4B Sepharose	Amersham Pharmacia
NHS-Sepharose	Amersham Pharmacia
NiAc Sepharose	Qiagen
Protein A Sepharose	Fluka

5.2 Geräte

Agarosegelkammern (horizontal)	OWL
Agarosegelkammern (vertikal)	Stratagene
Color Video Kamera <i>AxioCamHRc</i>	Zeiss
DNA-Genchip Workstation	Affymetrix
Dounce-Homogenisierer <i>Potter-S</i>	B.Braun
Elektronenmikroskop <i>CEM 902A</i>	Zeiss
Elektroporator <i>GenepulserII</i>	BioRad
Feinwaage <i>CA770</i>	Kern
Fotoentwickler <i>SRX-101A</i>	Konica
Furchtkonditionierungskammer	Sandown Scientifics
Geldokumentation <i>GelDoc 2000</i>	BioRad
Geltrockner <i>Dryergel</i>	Hoefer
Glaswaren	Schott
Heizblock	HLC
Hybridisierungsöfen <i>HC-2000, HB-1000</i>	UVP
Kryostat <i>HM560</i>	Microm
Lichtmikroskop <i>Axiovert 200M</i>	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
Netzgeräte <i>PowerPac 200, 300</i>	BioRad
PCR-Thermocycler <i>PTC-200</i>	MJ Research
Peristaltische Pumpe <i>Minipuls-3</i>	Gilson
Plastikwaren	Eppendorf, Falcon, Franke
pH-Messgerät	inoLab
Phosphoimager <i>BAS1500</i>	Fuji
Pipetten	Gilson
Proteingelkammer (vertikal)	Biometra
Scanner	Canon

Schüttler/Inkubator <i>HT</i>	Infors AG
Sonifikator <i>Sonoplus</i>	Bandelin Electronics
Spektrophotometer <i>Ultrospec3100 pro</i>	Amersham Pharmacia
Speed-Vac <i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf
Stereomikroskop <i>Stemi 2000C</i>	Zeiss
Sznitillationsmessgerät <i>LS6000SC</i>	Beckman Coulter
Taumler <i>Polymax 1040</i>	Heidolph
Ultrazentrifuge <i>Optima LE-80K</i>	Beckman Coulter
UV-Crosslinker	UVP
Vakuumpumpe	Vacuubrand
Verhaltens-Aufbauten (außer Furchtkond.kammer)	Sonderanfertigungen Univ. Zürich
Vibratom <i>VT1000S</i>	Leica
Vortexer	IKA
Wasserbäder	GFL
Western-Blot Kammer <i>Mini-Protean</i>	BioRad
Zentrifugen <i>5417R</i>	Eppendorf
<i>Minifuge T</i>	Heraeus
<i>HiCen 21</i>	Herolab
<i>30F</i>	Hettich

5.3 Computersoftware

AnalySIS	Soft Imaging System
EthoVision 2.14	Noldus
Microarray Suite 5.0	Affymetrix
Office10	Microsoft
Photoshop 7.0	Adobe
SigmaPlot 4.0	SPSS
Stat View 5.0.1	SAS Institute Inc.
TINA 2.09g	raytest
Vector NTI	InforMax
Wintrack 2.4	© David Wolfer, www.dpwolfer.ch/wintrack

5.4 Puffer und Lösungen

<u>Ammoniumacetat-Lösung, 0,3 M</u>	0,2% (w/v) BSA
23,12 g Ammoniumacetat	in PBS
in 1 l H ₂ O	<u>Immunogold-Antikörperverdünnungslösung A</u>
<u>Ampicillin-Stocklösung</u>	0,5% (w/v) BSA
100 mg/ml Ampicillin	0,1% (w/v) <i>Cold water fish gelatine</i>
in H ₂ O, sterilfiltriert	in PBS
<u>Antikörperverdünnungslösung (DAB)</u>	<u>Immunogold-Antikörperverdünnungslösung</u>
1% (v/v) Pferde-Serum	<u>B</u>

0,2% (w/v) BSA-C	8 Vol H ₂ O
0,1% (w/v) <i>Cold water fish gelatine</i>	<u>DNA-Probenpuffer, 10x</u>
in PBS	20% (w/v) Ficoll
<u>APS-Lösung, 10%</u>	100 mM EDTA
10 g Ammoniumpersulfat	0,25% (w/v) Bromphenolblau
in 100 ml H ₂ O	0,25% (w/v) Xylencyanol
<u>Blockierlösung (DAB)</u>	in H ₂ O
10% (v/v) Pferde-Serum	<u>DTT-Lösung, 1M</u>
0,2% (w/v) BSA	1,54 g Dithiotreitol
in PBS	in H ₂ O
<u>Immunogold-Blockierlösung</u>	<u>DTT-Lösung, 500 mM</u>
5% (v/v) Ziegen-Serum	0,77 g Diethiotreitol
0,5% (w/v) BSA	in H ₂ O
0,1% (w/v) <i>Cold water fish gelatine</i>	<u>EDTA-Lösung, 200 mM</u>
in PBS	7,44 g/l EDTA
<u>BSA-Stocklösung</u>	in H ₂ O, pH 8
5 mg/ml BSA	<u>Ethanol-Lösung, 70%</u>
in PBS	70 % (v/v) Ethanol abs.
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u>	in H ₂ O
10% (v/v) Essigsäure	<u>Ethidiumbromidlösung</u>
50% (v/v) Ethanol	10 mg/ml Ethidiumbromid
in H ₂ O	in H ₂ O
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	<u>Glycerin-Lösung</u>
0,125 (w/v) Coomassie Brilliant Blue	1 mM HEPES, pH 7,4
R 250	10% (v/v) Glycerin
10% (v/v) Essigsäure	in H ₂ O
50% (v/v) Ethanol	<u>Glykogen-Lösung</u>
in H ₂ O	10 mg/ml Glykogen
<u>Denhardt, 100x</u>	in H ₂ O
5 g Ficoll	<u>Goldchloridlösung, 0,05%</u>
5 g Polyvinylpyrrolidon	5 mg Goldchlorid
5 g BSA	in 10 ml H ₂ O
in 500 ml H ₂ O	<u>HCL-Lösung, 0,1 M</u>
<u>DEPC-H₂O</u>	4,65 g/l HCl
0,1 % DEPC in H ₂ O	in H ₂ O
über Nacht bei 37°C,	<u>HEPES-Puffer, 1 mM</u>
autoklavieren	1 mM HEPES, pH 7,4
<u>DNA-Größenstandard</u>	in H ₂ O
1 Vol 1kb, 100bp DNA <i>Ladder</i>	<u>Hybridisierungslösung</u>
(Invitrogen)	<u>(in situ Hybridisierung)</u>
1 Vol 10x DNA-Probenpuffer	4x SSC
	50% (v/v) Formamid

1x Denhardt
5% (w/v) Dextransulfat
0,5 mg/ml Heringssperma-ssDNA
0,25 mg/ml Hefe tRNA

Hybridisierungslösung

(Northern Blot)

50% Formamid
5x SSPE
5x Denhardt
0,1% (w/v) SDS
100 µg/ml Heringssperma-DNA

Imidazol-Lösung, 1 M

6,81 g Imidazol-HCl
in 100 ml H₂O

IPTG-Stocklösung

1 M IPTG in H₂O

Kainat-Stocklösung

4 mg/ml Kainat
in PBS

Kaliumchlorid-Stocklösung

3 M KCl
in H₂O

Kanamycin-Stocklösung

50 mg/ml Kanamycin
in H₂O, sterilfiltriert

Kopplungspuffer

0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl
in H₂O, pH 7,5

Lithiumacetat-Lösung, 1 M

6,6 g Lithiumacetat
in 100 ml H₂O, autoklavieren

Lithiumchlorid-Lösung, 8 M

33,92 g Lithiumchlorid
in 100 ml H₂O

Luria-Bertani (LB)-Medium

10g/l Pepton
5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl
auf pH 7,0 mit NaOH einstellen
in H₂O, autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium, autoklaviert

100 µg/ml Ampicillin

LB-Kanamycin-Medium

LB-Medium, autoklaviert

25 µg/ml Kanamycin

LB-Ampicillin-Agaroseplatten

15 g Agar

100 µg/ml Ampicillin

1 l LB-Medium

autoklavieren

LB-Kanamycin-Agaroseplatten

15 g Agar

1 l LB-Medium, autoklaviert

25 µg/ml Kanamycin

Lyse-Puffer B (denaturierend)

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-HCl

8 M Urea

mit NaOH auf pH 8 einstellen

in H₂O

Magermilch-Lösung, 5%

5% (w/v) Magermilchpulver
in PBS-T

MgCl₂-Lösung, 2 M

19 g Magnesiumchlorid

in 1 l H₂O, autoklavieren

10x MOPS-Puffer

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

pH 7,0, in DEPC-H₂O

Natriumacetat-Lösung, 3 M, pH 5,2

246 g/l Natriumacetat

in H₂O, mit Essigsäure auf pH 5,2

einstellen

Natriumacetat-Lösung, 150 mM

36,91 g/l Natriumacetat

in H₂O

Natriumacetat-Lösung, 100 mM

8,2 g/l Natriumacetat

in H₂O

Natriumborhydrid-Lösung, 1%

1% (w/v) Natriumborhydrid
in PBS

Natriumcarbonat-Lösung, 150 mM
15,9 g/l Natriumcarbonat
in H₂O

Natriumchlorid-Lösung, 500 mM
29,2 g/l NaCl
in H₂O

Natriumthiosulfat-Lösung
100 mM Natriumthiosulfat
200 mM Hepes
in H₂O, pH 7,4

Osmium-Lösung, 1%
1% (w/v) Osmium
in PBS

Paraformaldehyd-Lösung, 4%
4% (w/v) Paraformaldehyd
in PBS, pH 7,4, filtrieren

PBS
1,9 mM NaH₂PO₄
8,1 mM Na₂HPO₄
154 mM NaCl
in H₂O, pH ~7,4, autoklavieren

PBS-T
0,1% (v/v) Tween
in PBS

Proteingrößenstandard
MBI Fermentas „pargeruler“
Gibco „Benchmark prestained“
(beide unverdünnt eingesetzt)

Puffer C (denaturierend)
100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
mit HCl auf pH 6,3 einstellen
in H₂O

Puffer D (denaturierend)
100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
mit HCl auf pH 5,9 einstellen
in H₂O

RIPA-Puffer
50 mM Tris-Cl, pH 7,5
120 mM NaCl
0,5% (v/v) Igepal
0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat

RNA-Probenpuffer
20 µl 10x MOPS-Puffer
30 µl Formaldehyd
100 µl Formamid
1 µl Ethidiumbromidlösung

RNAse-Puffer
500 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 8 (1,58 g/l)
1 mM EDTA (37 mg/l)
in H₂O

SDS-Laufpuffer
25 mM Tris-Base
192 mM Glycin)
0,1% (w/v) SDS
in H₂O

SDS-Lösung, 10%
100 g Natriumdodecylsulfat
in 1 l H₂O

SDS-Probenpuffer, 2x/5x
100/250 mM Tris-HCl, pH 6,8
4/10% (w/v) SDS
20/50% (w/v) Glycerin
200/500 mM DTT
in H₂O

SET-Puffer
10 mM Tris-HCl, pH 8
1 mM EDTA
150 mM NaCl
in H₂O, autoklavieren

SOB
20 g Pepton
5 g Hefe Extrakt
0,5 g NaCl
25 mM KCl
in 1 l H₂O, mit NaOH auf pH 7,0
einstellen, autoklavieren,
+ 5 ml 2 M MgCl₂-Lösung

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
2% (w/v) SDS
0,7 (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch
dazu geben)
in H₂O

SSPE, 20x

3,6 M NaCl
0,2 M NaH₂PO₄
20 mM EDTA pH 8,0
auf pH 7,4 mit NaOH einstellen

SSC, 20x

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat (Dihydrat)
in H₂O, pH 7,0

TAE, 1x

40 mM Tris-Base
1 mM EDTA
mit Essigsäure auf pH 8,4
einstellen

TAIL-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0
50 mM EDTA pH 8,0
100 mM NaCl
0,5% SDS
0,5 mg/ml Proteinase K

Transfer-Puffer

25 mM Tris-Base
192 mM Glycin
0,01% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol
in H₂O

Transformation Buffer

55 mM MnCl₂·4H₂O
15 mM CaCl₂·H₂O
250 mM KCl
in 800 ml H₂O lösen, mit KOH auf pH
6,7
20 ml 0,5 M PIPES-Puffer
ad 1 l H₂O, sterilfiltrieren

Triethanolamin-Lösung, 0,1 M, pH 8

14,92 g/l Triethanolamin

in H₂O, pH 8

Tris-HCl

1 M, pH 6,8 (157,6 g/l)
in H₂O, mit HCl einstellen
1,5 M, pH 8 (236,4 g/l)
in H₂O, mit HCl einstellen
100 mM, pH 8 (15,76 g/l)
in H₂O, mit HCl einstellen
10 mM, pH 7,4 (1,58 g/l)
in H₂O, mit HCl einstellen

TritonX-100-Lösung, 10%

10% (v/v) TritonX-100
in 1x SET

Uranylacetat-Lösung, 5%

5% (w/v) Uranylacetat
in H₂O

Vorspül-Lösung

0,9% (w/v) NaCl
0,01% (w/v) Heparin
in H₂O

5.5 Nukleinsäuren

5.5.1 Vektoren

pQE30	Qiagen
pGEX-KG	Amersham Pharmacia
pSPORTarg3.1	AG Kuhl
pSPORT	Invitrogen
pGW1-PSD-95-Myc	Kim et al., 1995
pUC19	Invitrogen

5.5.2 Oligonukleotide

TDI-1	CATTTGTGCCCAATCCCCCTTACGG
TDI-2	TATGGAGGAATCCTGGGAGCCGGGA
TDI-3	CCCTGCCAGGCACTTCCTCTCTGTAATC
Actin for	GCTCGTCGTCGTCGACAACGGCTC
Actin rev	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC
Arg3.1 genom for	CTCCTGCAGACACAGCAGATCCAG
Arg3.1 genom rev	CGTGGTTTCATGCTGGCTTGTC
CaMKII for	TCACCACTATGCTGGCCACC
CaMKII rev	CTTCGTCTAGGACTCAAAGTC
GAPDH for	GCCCACTGAAGGGCATCTTG
GAPDH rev	GGTCTGGGATGGAAATTGTG
Homer1a for	CCATTATCTATGTGGAAAAAG
Homer1a rev	ACAGAAAACGGGTTAACAAAAG
PSD-95 NcoI down	ATCGCCATGGACCGCTACCAAGATGAAGAC
PSD-95 SH3 XhoI up	TCACTCGAGGTGCACTTCCATCTGGGTCAC
Sequenz 1 (Ebp2) for	CTTCTGGTCCTGGTTCTGAGG
Sequenz 1 rev	TCACCATGCCCTCTACAAG
Sequenz 2 (MRP8) for	TCACCATGCCCTCTACAAG
Sequenz 2 rev	CCCTAGGCCAGATCTGC
Sequenz 3 (pp32) for	CCAGGTCATGTACCTCGATG
Sequenz 3 rev	TTCATCTTCCACTAGCTGGGC
Sequenz 5 (PAM) for	CGTGATTGACTTCAAGCCTC
Sequenz 5 rev	CACACGTGTGAGATGTAAGG
Sequenz 6 (cGMP-PDE) for	CAGCCAAGCAAGCTGCTTCC
Sequenz 6 rev	CTTATTA ACTCAGAACTCAGGAC
Sequenz 7 (c-fos) for	ACGACCAATATTA ACTAAG
Sequenz 7 rev	CCTCGACAATGCATGATCAG
Sequenz 8 (KIF3B) for	TACTGTCCTGGGAGCAGAAG
Sequenz 8 rev	CTTAGAGACACACCCAGAGC

Sequenz 9 (myc-rel oncog.) for	GATCAAGACCGAGGCTTCTCC
Sequenz 9 rev	CTTCTTTAGCAACTGCTGCTGC
Sequenz 10 (SOCS3) for	GATGCGGCCGCGGCAGCTGTGTGTTGGGGTGG
Sequenz 10 rev	GATGTGCGACGAGTTTTTCAAGCATCTTCAG
Sequenz 11 (NP220) for	AGAACTTAGCCGCTATCCTGATG
Sequenz 11 rev	CATCTGACGAAACATATCTC
T7 term (Sequenzierungsprimer)	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

5.6 Enzyme

Sämtliche Restriktionsendonukleasen inklusive der jeweiligen Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas oder NEBiolabs bezogen.

Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Roche
Pfu-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Sigma
RNase A	Roth
RNase H	Invitrogen
Taq-Polymerase MBI	MBI
T4-DNA-Ligase	Roche
T4-DNA Polymerase	MBI

5.7 Kits

ABC-Elite Kit	Vector
Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RediprimeII DNA Labelling Kit	Amersham Pharmacia
Riboprobe system	Promega
RNA Transcript Labeling Kit	Affymetrix
RNeasy total RNA Kit	Qiagen
Sigma Fast DAB tablets	Sigma

5.8 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Herkunft	Verdünnung	Verdünnung
			Immunhistochemie	Western Blot
Arg3.1/Arc	Kaninchen	Eurogentec	1:750	1:2000
CaMKII	Maus	Chemicon Int.	1:1000	1:5000

GRIP	Maus	Transduction-Labs	-	1:2000
NR1	Maus	Nils Brose, MPI Göttingen	1:250	1:1000
PSD-95	Maus	Affinity-Bioreagents	-	1:750
Synaptophysin	Maus	Chemicon	-	1:500

Sekundäre Antikörper

Sämtliche sekundären Antikörper wurden von der Firma Vector bezogen. Die biotinylierten Antikörper für die DAB-Färbungen wurden im Verhältnis 1:1000, die HRP-gekoppelten Antikörper für die ECL-Detektion im Verhältnis 1:3000 eingesetzt.

5.9 Bakterienstämme

BL21	Stratagene
DH10B	Stratagene
M15	Qiagen
XL1-Blue	Stratagene

5.10 Sonstiges

Deckgläschen	Roth
Duralose Membran	Stratagene
Filterpapier	Schleicher und Schüll
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll
Objektträger	Roth
Oligonukleotid-DNA-Genchips <i>MG744</i>	Affymetrix
Rasielklingen	Wilkinson
Röntgenfilme	Kodak
<i>BioMax MP, MR, MS, X-Omat Blue</i>	
Saranfolie	DOW