

2. Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: *Enhanced Chemolumineszenz* (ECL) Reagenzien, Ficoll 400, Glutathion-Sepharose[®] 4B, Protein A-Sepharose[®] CL-4B, Protein G-Sepharose[®], NAP[™]-5 Säulen, Hybond-C Nitrozellulose Membran, Hybond-P Polyvenylidendifluorid (PVDF) Membran, Thermo Sequenase *fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*

Biochrom KG, Berlin: fötale Kälberseren (FKS), PBSd, Trypsin (1:250 Trockensubstanz)

BioRad GmbH, München: Gefärbte SDS-PAGE Standard-Proteinmischung („*broad range*“)

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf: Long Ranger[®] Gellösung (50 % Konzentrat)

Boehringer Mannheim GmbH: 2,2'-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolinsulfonat] (ABTS), „*Maus-Hybridoma-Subtyping Kit*“, Polyethylenglykol (PEG 1500, 50 % w/v in 75 mM HE-PES)

Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden : AG490, Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-Galaktopyranosid (BADG), Bisindolylmaleimid I (BIM), 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), Genistein, Mowiol[®] 4-88, Pansorbin[®], Pertussistoxin, Wortmannin

Eastman Kodak Company, Stuttgart: Röntgenfilme (X-OMAT AR), Filmentwickler und Filmfixierer

Fluka, Taufkirchen: Bromphenolblau, Calciumchlorid, Coomassie Brilliant Blau R250, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Natriumsalicylat

Genomed, Bad Oeynhausen: JetStar Plasmidisolationssäulen und -puffer (*Plasmid Purification Maxi Kit*)

ICN, Eschwege: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), spezielle Zellkulturmedien (phosphatfreies DMEM, methioninfreies DMEM, MEM ohne Magnesiumsulfat)

LifeTechnologies (Gibco BRL, Invitrogen Corporation), Karlsruhe: Agarose Electrophoresis Grade, Borsäure, 2'-Desoxyribonucleosid-5'triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), LipofectAMINE[™] Reagent, Natriumbikarbonat, Penizillin-Streptomycin (100-fach Konzentrat für die Zellkultur), Zellkulturmedien (DMEM, RPMI 1640, RPMI 1640 ohne Bikarbonat)

Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen: HistoBond® Adhäsions-Objektträger

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

E. Merck AG, Darmstadt: Ameisensäure, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ampicillin, Chromatographiepapier 3MM CHR (Whatman), Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Formaldehyd, Formamid, Kaliumhydrogenkarbonat, Natriumacetat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Pyridin, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Triton X-100, Zellulose-Dünnschichtchromatographie-Platten (Glas, 20×20 cm)

PerbioScience (Pierce), Bonn: EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin

Promega GmbH, Mannheim: *Dual-Luciferase reporter assay system*, Riboprobe® *in vitro* Transkription System, RNasin®, Kaninchen Reticulozyten Lysate, Hunde Microsomen Membranen, Aminosäure-Mischung ohne Methionin

R&D Systems GmbH, Wiesbaden: rekombinantes, humanes MIP-1 α , RANTES, Fractalkine (Chemokindomäne) und TNF- α

C. Roth GmbH, Karlsruhe: Agar-Agar, Albumin Fraktion V (BSA), Ammoniumhydrogenkarbonat, Borsäure, Chloroform, Citronensäure Monohydrat, Dialyseschläuche (ZelluTrans/Roth®), Diethylether, Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glaswolle, Glycerin, Glycin, Hefe-Extrakt, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Isoamylalkohol, Isopropanol, Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Kaliumacetat, β -Mercaptoethanol, 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), Methanol, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumazid, Rothiphorese® Gel 30 (30 %ige Acrylamidstammlösung), Natriumhydroxid, Pepton aus Casein, Phenol, Rotiszint®eco plus, Salzsäure, Trichloressigsäure, Tween®-20

Sigma-Aldrich, Taufkirchen: 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochloridhydrat (DAPI), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Digitonin, L-Glutathion, Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) 50-fach Konzentrat, Hypoxanthin-Thymidin (HT) 50-fach Konzentrat, Inkomplettes Freundsches Adjuvans, Mineralöl, SDS-PAGE Standard-Proteinmischungen (SDS-6H und Dalton Mark VII-L™), Natriumfluorid (NaF), Natriumorthovanadat (Na₃VO₄), Ninhydrin, Paraformaldehyd, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), O-Phospho-L-Serin, O-Phospho-L-Threonin, O-Phospho-L-Tyrosin, Propidiumjodid, Staurosporin

Radiochemikalien:

[³²P]Orthophosphat, *high concentration*, HCl-free (ICN, Eschwege)

[³⁵S]Methionin/Cystein; EXPRE³⁵S³⁵S *Protein Labeling Mix*, [³⁵S] (NEN, Köln)

L-[³⁵S]Methionin, *Redivue* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

[³⁵S]Natriumsulfat (NEN Life Science Products, Köln)

[¹²⁵I]RANTES human, rekombinant (NEN Life Science Products, Köln)

2.2 Bakterien***E. coli* DH5α**

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten, die Amplifikation von Plasmid-DNA und die Herstellung rekombinanter Fusionsproteine.

Genotyp: F⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*r_K*⁻, *m_K*⁺), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ(*argF-lacZya*) U169, Φ80*lacZ*ΔM15, λ-

***E. coli* TOP10/P3**

Das P3 Episom enthaltender *E. coli* Stamm. Für die Selektion, Klonierung und Amplifikation von Plasmiden, die das tRNA Suppressor F Gen (*supF*) enthalten (z.B. pcDNA1).

Genotyp: F⁻, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS*⁻, *mcrBC*), Φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R), *endA1*, *nupG*, {P3: Kan^R, Amp^R (amber), Tet^R (amber)}

2.3 Plasmide und Cosmide

- **pcDNA3.1**©(-) (Invitrogen Corporation, Karlsruhe)
- **pGEX-4T-1** (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- **pRL-TK** (Promega, Mannheim)

Von Jana Droese im Rahmen einer Dissertation (FG Prof. Bernd Dörken, unter Leitung von Dr. Armin Rehm, MDC und Robert-Rössle-Klinik, Berlin) hergestellte und freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmide mit verschiedenen Serin→Alanin Austauschmutationen von US28:

- **US28S1-2A**, Serine an den Aminosäurepositionen 315 und 319 durch Alanine ersetzt
- **US28S3-5A**, Serine an den Aminosäurepositionen 323, 325 und 327 durch Alanine ersetzt
- **US28S6-8A**, Serine an den Aminosäurepositionen 330, 331 und 333 durch Alanine ersetzt
- **US28S9-12A**, Serine an den Positionen 338, 339, 343 und 350 durch Alanine ersetzt
- **US28S3-8A**, Serine an den Aminosäurepositionen 323 bis 333 durch Alanine ersetzt
- **US28S3-12A**, Serine an den Aminosäurepositionen 323 bis 350 durch Alanine ersetzt
- **US28S1-12A**, Serine an den Aminosäurepositionen 315 bis 350 durch Alanine ersetzt

Dr. Martin Oppermann (Institut für Immunologie, Universität Göttingen) stellte im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise folgende Plasmide zur Verfügung:

- Humaner CC-Chemokinrezeptor 5 aminoterminal mit einem FLAG-Epitop versehen (**FLAG-CCR5**) im pEF-BOS-Plasmid
- Bovine G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2 (**GRK2**) und die Kinasefunktion defiziente Mutante **GRK2-K220R** jeweils im pcDNA1-Plasmid (s. *E. coli* TOP10/P3, Abschnitt 2.2)

Philipp Reiterer (AG Dr. Martin Lipp, MDC, Berlin) stellte freundlicherweise zur Verfügung:

- Humaner CC-Chemokinrezeptor 7 (**CCR7**) und humaner CXC-Chemokinrezeptor 5 (**CXCR5**) jeweils im pcDNA3-Vektor

Durch AG Dr. Claus Scheidereit (MDC, Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- **6NF-κBtkluc.neo** (Bergmann *et al.*, 1998)

Aus der Plasmidsammlung der AG Dr. Martin Lipp, MDC, Berlin:

- Humaner CXC-Chemokinrezeptor 4 (**CXCR4**) mit einem carboxyterminalen myc-Epitop

Prof. Dr. Regine Heilbronn (Institut für Infektionsmedizin, Abteilung Virologie, UKBF, Freie Universität Berlin) stellte eine Cosmid-Bank, welche das Genom des HCMV Laborstammes AD169 (GenBank Accession Number X17403) enthält zur Verfügung.

2.4 Zellen

Primärzellkulturen und Humanes Zytomegalievirus

Humane embryonale Lungenfibroblastenzellen und Humanes Zytomegalievirus, Stamm AD169, wurden freundlicherweise von Dr. Susanna Prösch (Institut für Virologie, Charité, Humboldt Universität, Berlin) zu Verfügung gestellt.

Zelllinien

COS-1	SV40 transformierte, Grüne Meerkatzen-Nierenzellen (<i>Cercopithecus aethiops</i>); fibroblastenartig	ATCC CRL-1650
COS-7	SV40 transformierte, Grüne Meerkatzen-Nierenzellen; fibroblastenartig	ATCC CRL-1651
HEK293A	Ad 5 transformierte, humane, embryonale Nierenzelllinie; epithelial	Quantum Biotech. Inc. (ATCC CRL-1573)
HeLa	humane Cervix-Karzinomzelllinie; epithelial	ATCC CCL-2
X63-Ag8.653	murine Myelomzelllinie; lymphoblastoid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch AG Dr. Uwe Karsten, MDC, Berlin)	ATCC CRL-1580

2.5 Oligonukleotide

Die Oligodesoxynukleotid-Primer für die Polymerase Kettenreaktionen wurden von der Firma BioTeZ GmbH, Berlin-Buch bezogen:

US28gex-s: 5'-CCGCGTGGATCCATGACACCGACGACGACCGCG-3' (*Bam*H I)

US28gex-as: 5'-ACGATGAATTCAGTTGCCGATGGAACCGAAGAGAAAG-3' (*Eco*R I)

US28wt-s: 5'-GCTCTAGAGCCATGACACCGACGACGACG-3' (*Xba* I)

US28wt-as: 5'-CCCAAGCTTGGGGTATGAAAAGGCCGAGGTAGCGGC-3' (*Hind* III)

Y16F-s: 5'-ACGACCGCGGA^{ACTC}ACTCACGACGGAGTTTGACTTTGATGAAGACGCG
ACTCCT-3' (*Sac* II)

Y16A-s: 5'-ACGACCGCGGA^{ACTC}ACTCACGACGGAGTTTGACGCGGATGAAGACGCG
ACTCCT-3' (*Sac* II)

ST/A-as: 5'-CCCAAGCTTTTATTACGGTATAATTTGTGCGACGCGACACACCTC
GTCGGCCAGCGCGTCCGGCAGCTGCCTCTCTTCG-3' (*Hind* III)

Für die Sequenzierung nach dem zyklischen Thermo-Sequenase Verfahren mittels fluoreszenz-markierter Primer wurden folgende Oligonukleotide der Firma MWG-Biotech (Ebersberg), verwendet:

T7-Primer (IRD800 fluoreszenzmarkiert): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

BGH-Primer (IRD700 fluoreszenzmarkiert): 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

GEX-5'-Primer (IRD800 fluoreszenzmarkiert): 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

GEX-3'-Primer (IRD800 fluoreszenzmarkiert): 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

2.6 Enzyme

Invitek GmbH, Berlin: Combi*Pol* DNA Polymerase Mix

NEB GmbH, Frankfurt a.M.: Alkalische Phosphatase (CIP), Endo H_f (rekombinantes Fusionsprotein aus Endoglykosidase H und *maltose binding protein*), Restriktionsendonukleasen

Roche Diagnostics, Mannheim: T4 DNA-Ligase, Neuraminidase (Acylneuraminylhydrolase, EC 3.2.1.18), O-Glykosidase (Endo- α -N-acetylgalaktosaminidase, EC 3.2.1.97), DNase I, RNase A

Sigma-Aldrich, Taufkirchen : α -NAGA (α -N-Acetylgalctosaminidase, EC 3.2.1.49)

2.7 Antikörper und Streptavidin-Konjugate

Erläuterungen:

(H+L): polyklonale Ak, spezifisch für Epitope der schweren und leichten (*heavy* + *light*) Kette

F(ab')₂: Ak-Fragmente, aus den Antigen-bindenden (ab) Anteilen des Ak-Moleküls bestehend

AG Dr. M. Lipp (MDC): Maus anti-*myc*-Epitop (Hybridom 9E10), Ratte anti-humanes-CXCR5 (Hybridom 8B2) und Ratte anti-humanes-CCR7 (Hybridom 3D12).

Labor Dr. A. Rehm (MDC und RRK): Kaninchen-Antikörperserum spezifisch für die schweren Ketten von humanen MHC Klasse I-Molekülen (dHC70)

Cell Signalling (NEB GmbH, Frankfurt/a.M.): Kaninchen anti-Phospho-ERK1/-2, Kaninchen anti-ERK1/-2, Kaninchen anti-Phospho-p38, Kaninchen anti-Phospho-SAPK/JNK, Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen IgG

Jackson Immunoresearch Laboratories (Dianova, Hamburg):

Ziege anti-Maus IgG + IgM (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Fluorescein-gekoppelt

Esel anti-Maus IgG (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Phycoerythrin-gekoppelt

Ratte anti-Maus IgG (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Biotin-gekoppelt

Ziege anti-Ratte IgG (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Fluorescein-gekoppelt

Esel anti-Ratte IgG (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Phycoerythrin-gekoppelt

Maus anti-Ratte IgG (H+L) F(ab')₂-Fragmente, Biotin-gekoppelt

Streptavidin, Peroxidase-gekoppelt

Molecular Probes: Alexa Fluor[®] 488 und Alexa Fluor[®] 568, jeweils Streptavidin-gekoppelt

Sigma-Aldrich (Taufkirchen): Anti-FLAG[®] monoklonale Antikörper M2 und M5

Southern Biotechnology (Biozol GmbH, Eching): Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Maus-Ig (H+L), Maus IgG2b (Antikörper zur Isotypenkontrolle)

2.8 Geräte und sonstige Materialien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Elektrophoreseeinheit (MultiPhor II), Gelrockner (Hoefer SE 1160 *DryGel* Sr.), Netzgeräte (EPS 601 und EPS 3500), Spektrophotometer (Ultrospec 3000)

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen: Reinluftbank für die Zellkultur

Beckman Instruments GmbH, Heidelberg: Zentrifugen (GS-6KR und J2-MC)

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg: Durchflußzytometer (FACSCalibur[™], FACScan[™])

Berthold GmbH, Bad Wildbad: Gammazähler (Wallac 1470 WIZARD[®]), Luminometer (Luminat LB 9507)

Biometra, Göttingen: PCR-*Thermocycler* Trioblock

BioRad GmbH, München: SDS-PAGE Mini-Gelsystem (Mini-Protean), Western Blot Apparatur (Trans-Blot[®] SD)

Canberra-Packard GmbH, Frankfurt/M.: Betazähler (Tri-Carb[™] *Liquid Scintillation Analyzers Model* 1900 TR)

Dynatech: ELISA-Reader MR 5000

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml

Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokyo, Japan: Fujix BAS 2000 *Image Analyzer, Imaging Plate* BAS-IP MP 2025P und 2040P

Greiner GmbH, Nürtingen: Mikrobiologische Zellkulturschalen Ø 10 cm, sterile 10 ml Röhrrchen

Heraeus, Hanau: Brutschränke, Kühltschzentrifuge Biofuge fresco

IEC (Thermo Life Science GmbH, Egelsbach): MicroMax[®] Tischzentrifuge

Leica, Bensheim: Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE

MembraPure GmbH, Bodenheim: Membrex BF Vakuumfiltereinheiten 125 und 500 ml

MWG-Biotech GmbH, Ebersberg: DNA Sequenzieranlage (Li-Cor LONG READIR 4200)

Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe: sterile, RNase-/DNase-freie Filter-Pipettenspitzen

Nunc GmbH, Wiesbaden: Einfrierröhrrchen *Cryotube* 2 ml, 96-Loch Mikrotiterplatten (MaxiSorp[™])

PALL (VWR International GmbH, Darmstadt): Acrodisc[®] sterile Spritzenfilter, 25 mm, 0,45 µm Porengröße

Strehlau und Kruse GdB, Freiburg: SDS-PAGE Apparatur (13 × 16 cm Gele)

TPP: Zellkulturschalen und -flaschen, sterile 10 ml und 50 ml Zentrifugenröhrrchen

Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen: AxioCam[™] color Digitalkamera für die Mikroskopie

Software : Axiovision 2.0.5 (Carl Zeiss Vision GmbH), GraphPad Prism 2.00 (GraphPad Software Inc.), TINA 2.0 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH), WinList 3.0 (Verity Software House Inc.). Für Sequenzanalysen und Sequenzvergleiche ist das HUSAR-Paket Version 6.0 des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg mit den jeweils aktuell verfügbaren Protein- und Nukleinsäuredatenbanken verwendet worden.

2.9 Medien

2.9.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (zur Anzucht von *E.coli*-Stämmen)

Hefe-Extrakt 5 g
Bacto-Trypton 10 g
NaCl 5 g
ad 1 l ddH₂O, autoklaviert

LBA-Medium (zur Vektorselektion)

100 mg Ampicillin / 1 l LB-Medium

Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 15 g Agar-Agar auf 1 l Medium hergestellt. Der Agar löste sich durch das Autoklavieren (20 min bei 120 °C, 2 bar).

TYM-Medium

Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v)
 Bacto-Trypton 2 % (w/v)
 NaCl 100 mM
 Magnesiumsulfat 10 mM
 ddH₂O , autoklaviert

2.9.2 Medien für die Säugetier-Zellkultur

Bindungsmedium (BM), für Internalisierungsexperimente

RPMI 1640 ohne Bikarbonat
 BSA 0,2 %
 HEPES 10 mM
 pH 7,4; Sterilfiltration

HAT-Medium (Selektionsmedium für die Hybridom-Zellkultur)

DMEM (mit 4500 mg/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 2 mM L-Glutamin)
 20 % FKS (Hybridomzellen getestet)
 Penicillin, Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)
 10 µM β-Mercaptoethanol
 HAT (5 mM Hypoxanthin, 20 µM Aminopterin, 0,8 mM Thymidin)

Saures Medium, Waschmedium bei Internalisierungsexperimenten

RPMI 1640 ohne Bikarbonat
 BSA 0,2 %
 MES 10 mM
 pH 2,5 (HCl); Sterilfiltration

2.10 Puffer und Lösungen

ABTS-Lösung, für ELISA

100 ml Zitronensäure (50 mM, pH 4,0)
 50 mg ABTS
 direkt vor Gebrauch: 36 µl H₂O₂ (30 %-ig) pro 21 ml ABTS-Lösung

Coomassie-Entfärbelösung (SDS-PAGE)

ddH₂O 70 %
 Isopropanol 20 %
 Essigsäure 10 %

Coomassie-Färbelösung, SDS-PAGE

Coomassie-Brilliant Blue R250	0,25 %
Methanol	20 %
Essigsäure in ddH ₂ O	10 %

Elutionspuffer, Elution von Proteinen aus getrockneten Polyacrylamidgelen

Ammoniumhydrogenkarbonat	50 mM
SDS	0,1 %
2-Mercaptoethanol	0,1 %

2× HBS Puffer, für die Calciumphosphat-Transfektion

HEPES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
pH 7,1	

HEPES-Puffer, Waschen von Zellen

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
pH 7,2	

Laufpuffer, SDS-PAGE

Tris Base	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 %
resultierender pH-Wert bei ~ 6,8	

Lysepuffer, für die Zellextraktion mit Detergenz

PBSd	pH 7,2
Triton X-100	1 %
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM (Zugabe frisch vor Gebrauch)

bei der Lyse von [³²P]Orthophosphat markierten Zellen zusätzlich frisch vor Gebrauch:

Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	10 mM

Mowiolösung, für die Mikroskopie

0,2 M Tris, pH 8,5	24 ml
Glycerin	12 g
Mowiol 4-88	4,8 g
30-40 min bei 50 °C rühren, Abzentrifugiert (10 min), Lagerung bei 4 °C	

Puffer P1, P2, P3 für den alkalischen Schnellaufschluß von Bakterien:

P1 (Zellsuspension):

50 mM Tris
10 mM EDTA
HCl ad pH 8,0
100 mg/l RNase A
Lagerung bei 4 °C

P2 (Zellyse):

200 mM NaOH
1,0 % SDS (w/v)

P3 (Neutralisierung):

3,1 M Kaliumacetat
Essigsäure ad pH 5,5

PBSd

NaCl 0,14 M
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ 8,1 mM
KH₂PO₄ 1,5 mM
pH 7,2

PBST Puffer, für das Waschen von Immunblots

PBSd
0,1 % Tween-20

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gellösungen SDS-PAGE (37 ml)	Trenngel 10%	Trenngel 13%	Sammelgel
ddH ₂ O	15,0 ml	11,3 ml	6,1 ml
Puffer	9,5 ml	9,5 ml	2,5 ml
Acrylamidlösung (Rotiphorese [®] Gel 30, 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	12,5 ml	16,3 ml	1,3 ml
10% SDS (ddH ₂ O, w/v)	375 µl	375 µl	100 µl
10% APS (ddH ₂ O, w/v)	125 µl	125 µl	50 µl
TEMED	23 µl	19 µl	10 µl

Polyacrylamid-Harnstoffgele, für die DNA-Sequenzierung (66 cm Gele)

ddH₂O 32 ml
10× TBE (Long Run) 5 ml
Harnstoff 21 g
Long Ranger[®] 4,3 ml
Gellösung (50 %ig)
DMSO 0,5 ml
10% APS (ddH₂O, w/v) 350 µl
TEMED 50 µl

10× DNA-Probenpuffer, für die Agarosegelelektrophorese

Ficoll 400	30 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylene-Cyanol FF	0,25 %
Glycerin	30 %

2× Protein-Probenpuffer, für die SDS-PAGE

Tris/HCl	125 mM , pH 6.8
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerin	40 %
2-Mercaptoethanol	10 %, frisch vor Gebrauch zugesetzt

RNase-freies Wasser

0,2 ml DEPC, 100 ml ddH₂O, kräftig schütteln damit sich das DEPC vollständig löst, über Nacht bei RT, autoklaviert

Sammelgelpuffer, SDS-PAGE

0,5 M Tris, pH 6,8 (HCl)

TAE-Puffer (50×), für die Agarosegelelektrophorese

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,2 g
ad 1l ddH ₂ O	

TBST Puffer, für das Waschen von Immunlots

Tris	20 mM
NaCl	140 mM
Tween-20	0,1 %
pH 7,6 (HCl)	

10× TBE Puffer (Long Run), für die DNA-Sequenzierung

Tris	1340 mM
Borsäure	450 mM
EDTA	25 mM

Transferpuffer, Western-Blot

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
resultierender pH-Wert bei ~ 8,3 (nicht einstellen!)	

Transformationspuffer (TFP) zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

TFP I		TFP II	
ddH ₂ O	75 ml	ddH ₂ O	75 ml
KCl	0,75 g	MOPS	0,21 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,0 g	KCl	0,08 g
Kaliumacetat	0,3 g	CaCl ₂	1,1 g
CaCl ₂	0,15 g	Glycerin	15 ml
Glycerin	15 ml	pH 6,8 mit 0,5 M NaOH	
pH 5,5 mit 0,2 M Eisessig,		Sterilfiltration	
ddH ₂ O auf 100 ml, Sterilfiltration			

Trenngelbutter, SDS-PAGE

1,5 M Tris, pH 8,8 (HCl)

Trypsin-EDTA Lösung (für die Zellkultur)

1,25 g Trypsin (1:250 Trockensubstanz)

0,25 g EDTA

ad 500 ml PBSd, Sterilfiltration

