

### 3 Material

#### 3.1 Reagenzien

Tabelle 1: verwendete Reagenzien

Substrat	Hersteller	Firmensitz
Agarose (NEEO, Ultra-Qualität)	Carl Roth	Karlsruhe
BPB (Bromphenolblau)	Merck	Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma	Deisenhofen
dNTP-Set (100 mM)	Amersham Bioscience	Freiburg
EDTA (Titrplex III)	Merck	Darmstadt
Ethanol $\geq 99,8\%$	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Carl Roth	Karlsruhe
Färbelösung Hemacolor <sup>®</sup>	Merck	Darmstadt
Fixierlösung Hemacolor <sup>®</sup>	Merck	Darmstadt
Formaldehyd 37%	Sigma	Deisenhofen
Formamid	Sigma	Deisenhofen
Gene Ruler 100 bp DNA ladder; 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Fermentas	St. Leon-Rot
Glycerin	Merck	Darmstadt
iTaq-Puffer (10x)	Bio-Rad	München
Mass Ruler (6x) Loading Dye Solution	Fermentas	St. Leon-Rot
MgCl <sub>2</sub> Solution (50 mM)	Bio-Rad	München
Mineralöl	Sigma	Deisenhofen
M-MLV RT-Puffer (5x)	Promega	Mannheim
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natronlauge (1 M)	Merck	Darmstadt
PBS (Dulbecco) (1x)	Biochrom	Berlin
Random Hexamere (pd (N) <sub>6</sub> )	Amersham Bioscience	Freiburg
RNAlater <sup>®</sup>	Sigma	Deisenhofen
RNA 6000 ladder 150 ng/ $\mu\text{l}$	Ambion	Berlin
TAE-Puffer (10x)	Carl Roth	Karlsruhe

### 3.2 Enzyme

Tabelle 2: verwendete Enzyme

<b>Methode</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
DNA-Verdau	RQ1 RNase-free DNase (1 U/ $\mu$ l)	Promega	Mannheim
PCR	iTaq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Bio-Rad	München
Real-Time PCR	2x SensiMix (dt)	Quantace	Watford, England
Reverse Transkription	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	Promega	Mannheim

### 3.3 Kits

Tabelle 3: verwendete Kits

<b>Methode</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
DNA-Aufreinigung	Invisorb <sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit	Invitek	Berlin
DNA-Quantifizierung	PICO Green <sup>®</sup> dsDNA Quantitation Kit	Molecular Probes	Karlsruhe
RNA-Extraktion	Invisorb <sup>®</sup> Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek	Berlin
RNA-Gel	RNA 6000 Nano Reagents & Supplies	Agilent	Waldbronn
Sequenzierung	ABI PRISM <sup>®</sup> BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Darmstadt

### 3.4 Geräte

Tabelle 4: verwendete Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent	Waldbronn
Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg
Gelkammer	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	München
Gelkammer	Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-100	Amersham Biosciences	Freiburg
Mikroskop	Axiolab <sup>®</sup>	Carl Zeiss	Göttingen
Mikrowelle	Microstar MD6459	MTC-Medion	Mühlheim

Fortsetzung von Tabelle 4

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Fluorometer	Fluostar Optima	BMG Labtech	Offenburg
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	Research	Eppendorf	Hamburg
Real-time Cycler	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research	Mortlake, Australien
Spannungsgerät	GPS 200/400	Amersham Biosciences	Freiburg
Ultraschallgerät	Scanner 100 Vet	Pie Data Elektronik	Dorsten
Videodokumentationsanlage	Gene Genius	Syngene	Cambridge, England
Wärmeblock	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus	Hanau
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus	Hanau

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Produktname/Größe</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Bürstchen	Cytobrush GT <sup>®</sup>	Medscand	Malmö, Schweden
Fluorometer-Platten	µ Clear-Platte, Kaminform	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Küvetten	UVette, 220-1600 nm	Eppendorf	Hamburg
Objekträger	Super frost plus	Menzel	Braunschweig
Pipettenspitzen, ohne Filter	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Carl Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen, mit Filter	Safeseal TIPS (5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße	PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße	mit Graduierung 1,5 ml	Carl Roth	Karlsruhe
Reaktionsgefäße (Rotor Gene 3000)	Strip Tubes 0,1 ml	LTF-Labortechnik	Wasserburg
RNA Chips	RNA 6000 Nano Chips	Agilent	Waldbronn

### 3.6 Primersequenzen

Die zur Amplifikation verwendeten Primer 18S rRNA, bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  wurden selbst designed und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Sowohl die Stock-(200  $\mu$ M), als auch die Arbeitslösung (20  $\mu$ M) wurden mit PCR-H<sub>2</sub>O hergestellt. In Tabelle 6 sind die Primersequenzen aufgeführt.

Tabelle 6: Primersequenzen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Größe
18S rRNA (AF176811)	for GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A rev GAC ACT CAG CTA AGA GCA TCG A	317 bp
bGCP-2 (AF179249)	for TGA GAC TGC TAT CCA GCC G rev AGA TCA CTG ACC GTT TTG GG	193 bp
COX-1 (AF004943)	for CAG ATG CGG AGT TTC TGA GTC G rev GGG TAG TGC ATC AGC ACG G	313 bp
COX-2 (NM_174445)	for CTC TTC CTC CTG TGC CTG AT rev CTG AGT ATC TTT GAC TGT GGG AG	359 bp
Haptoglobin (AJ271156)	for TGG TCT CCC AGC ATA ACC TC rev TTG ATG AGC CCA ATG TCT ACC	217 bp
IL-1 $\beta$ (M37211)	for CAA GGA GAG GAA AGA GAC A rev TGA GAA GTG CTG ATG TAC CA	236 bp
IL-6 (X57317)	for TCC AGA ACG AGT ATG AGG rev CAT CCG AAT AGC TCT CAG	236 bp
IL-8 (NM_173925)	for CGA TGC CAA TGC ATA AAA AC rev CTT TTC CTT GGG GTT TAG GC	153 bp
TNF $\alpha$ (AF011926)	for CAA GTA ACA AGC CGG TAG CC rev GCT GGA AGA CTC CTC CCT G	364 bp

### 3.7 Primerspezifische Temperaturoptima

Die optimale Annealingtemperatur für die einzelnen Primerpaare wurde mit Hilfe einer konventionellen Gradienten-PCR ermittelt (siehe Kapitel 4.7). In Tabelle 7 sind die Temperaturoptima (°C) sowie die produktspezifischen Schmelzpunkte (°C) dargestellt.

Tabelle 7: primerspezifische Temperaturoptima (°C) sowie Schmelzpunkte (°C)

<b>Primer</b>	<b>Temperaturoptimum</b>	<b>Schmelzpunkt</b>
18S rRNA	61 °C	85 °C
bGCP-2	61°C	92 °C
COX-1	60 °C	85,5 °C
COX-2	60 °C	81,3 °C
Haptoglobin	60 °C	82,1 °C
IL-1 $\beta$	56 °C	81,1 °C
IL-6	56°C	81,25 °C
IL-8	56 °C	79 °C
TNF $\alpha$	60 °C	86,75 °C

### 3.8 Puffer und Lösungen

Es wurde durch Umkehrosmose und Ionenaustausch Reinstwasser gewonnen. Dieses wird in der vorliegenden Arbeit als H<sub>2</sub>O bezeichnet. Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in H<sub>2</sub>O gelöst. In Tabelle 8 sind alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 8: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung	
BPB-Glycerin-Lösung	BPB (gesättigte Lösung)	15 µl
	RNA-H <sub>2</sub> O	85 µl
	Glycerin	100 µl
1% DNA-Agarose-Gel	1% (w/v) Agarose	50 ml
	(in 1x TAE-Puffer in Mikrowelle aufgeschmolzen)	
	Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	5 µl
Ethanol 70% (v/v)	Ethanol (>99,8%)	35 ml
	RNA-H <sub>2</sub> O	15 ml
MOPS-Puffer (10x)	MOPS	0,2 M
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	10 mM
MOPS-Puffer (1x)	MOPS-Puffer (10x)	100 ml
	RNA-H <sub>2</sub> O	900 ml
PCR-H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	100 ml
	bei 121°C 20 min autoklavieren	
RNA-Gel-Probenpuffer, Ansatz pro Probe	Formamid	9,4 µl
	Formaldehyd (37%)	3,1 µl
	MOPS-Puffer (10x)	1,3 µl
	Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml)	0,13 µl
	BPB-Lösung/Glycerin	0,75 µl
	gesättigte BPB-Lösung	0,25 µl
1% denaturierendes RNA-Agarose-Gel	Agarose	0,6 g
	MOPS-Puffer (10x)	6 ml
	RNA-H <sub>2</sub> O	44 ml
	(in Mikrowelle aufgeschmolzen)	
RNA-H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	1 l
	DEPC	1 ml
	bei 121°C 20 min autoklavieren	
TAE-Puffer (1x)	TAE-Puffer (10x)	100 ml
	H <sub>2</sub> O	900 ml