

2 Material

2.1 Antikörper

Antikörper und Bindungsmoleküle	Klon	Verwendungszweck WB: Western Blot FACS: Durchflusszytometrische Analyse IF: Immunfluoreszenz TZS: T-Zell Stimulation	Lieferant
anti-CD16/32 mAk	2.4G2	Block	eigene Hybridome
anti-CD44-Cy5	IM7	FACS	eigene Hybridome
anti-TCRβ-FITC (Cy5)	H57-579	FACS	eigene Hybridome
anti-TCRγδ mAk-FITC (Cy5)	GL.3	FACS	eigene Hybridome
anti-B220 mAk-PE	RA3-6B2	FACS	eigene Hybridome
anti-IFNγ mAk	R4-6A2, IgG ₁	ELISA	eigene Hybridome
anti-CD4 mAk-Cy5 (PE, FITC)	YTS191.1	FACS	eigene Hybridome
anti-CD8α mAk-PE (Cy5)	YTS169	FACS	eigene Hybridome
anti-CD62L mAk-Cy5	Mel-14	FACS	eigene Hybridome
rat-IgG ₁ Isotyp Kontrolle mAk	R3-34	Block	PharMingen, San Diego, USA
anti-CD3ε-FITC (PE)		FACS	PharMingen, San Diego, USA
anti-CD25-PE (Cy5)	PC61	FACS	PharMingen, San Diego, USA
anti-NK1.1-PE (Cy5)	RG-60.2	FACS	PharMingen, San Diego, USA
anti-IgM-PE	JES61A12	FACS	Beckton Dickinson Co
anti-IL2	R3-34	ELISA	eigene Hybridome
anti-CD3ε mAk	145-2C11	TZS	eigene Hybridome
anti-CD28 mAk	37.51	TZS	eigene Hybridome
anti-human myc mAk	1-9E10.2	WB	ATCC
anti-human myc-Cy3 mAk	1-9E10.2	IF	ATCC
anti-IL2 (PE)		FACS	PharMingen, San Diego, USA
anti-IFNγ mAk (FITC)		FACS	eigene Hybridome
anti-CD4 (micro beads)		Zellsortierung	Milteny Biotech
anti-CD8 (micro beads)		Zellsortierung	Milteny Biotech
anti-FITC (micro beads)		Zellsortierung	Milteny Biotech
anti-mouse Ak (HPO)		WB	PharMingen, San Diego, USA
anti-rabbit Ak (HPO)		WB	PharMingen, San Diego, USA
goat-anti-mouse AK-Cy3	JES65H4	IF	Dianova, Hamburg, Dtl.
anti-IL2-Biotin		ELISA	eigene Hybridome
anti-γδ-FCR		Block FACS	eigene Hybridome
Streptavidin-FITC		FACS	PharMingen
Streptavidin-Alkalische Phosphatase		ELISA	PharMingen
AnnexinV-Cy5		Apoptosenachweis	BD PharMingen

2.2 Sequenzen von verwendeten Oligonukleotiden

Zur Detektion von	Oligonukleotid-Sequenzen für Southern-Blot-Analysen ³² P Markierung
Slfn5	5'- GTG ACG CTC TTC TGA TTT CCC CGA AC - 3'
Slfn 8-10	5'- CCT CTA CAC CAT CCT TGG GGA GCA GG - 3'
Slfn 1-4	5'- TTC TGC TGY GCA GTR TTC KC - 3'
β-Aktin	FW 5'- TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAC - 3' REV 5'- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3

Bezeichnung der amplifizierten Genfragmente	Oligonukleotid-Sequenzen
neue Kasette für pBluescript SKII +/-	FW 5'- AAT TCA GAT CTA CCA TGG CCA GCG CAT CAA TGC AGA -3' REV 5'- GGC CGC GTT AAC CCA GGT CCT CCT CTG AGA TCA GCT -3'
Slfn 1 Genfragment	FW 5'- TAC CAT GGC CAT CAC CGA TGA AGG GAC CCC TG - 3' REV 5'- GAC CGT TAA CCA GAC ATG AGG AGC TTG ATC CAT TCC-3'
Slfn 4 Genfragment	FW 5'- TAC CAT GGC CAT CAC TGT CGA TCA GGA CAC GGA C - 3' REV 5'- GAC CGT TAA CCG ATT CGA ATA TGA GTT AAG ACA TTT -3'
Slfn 8 - N - Tag Genfragment	FW 5'- TAC CAC CCG GGC ACA TCC CTC CTT AGC AGT GA - 3' REV 5'- GAC CTG TAA CAT GCC TCC GTT GAG CTA TGC CCC TC -3'
Slfn 8 - O - Tag Genfragment	FW 5'- CGG ACC ACC CGG GAG ACA CAT CCC TCC TTA GCA GTG -3' REV 5'- GGC CGC GTT AAC TCA GCA TGC CTC CGT TGA GCT ATG -3'
Slfn 9 Genfragment	FW 5'- ACC AGC CGG CAA GAG ACA TAT CTC TCC TTA GTG GTG -3' REV 5'- GGC CGC GTT AAC TCA GCA TGC CAC CAT TGA GCT ATG -3'
Slfn 10 Genfragment	FW 5'- ACC AGC CGG CAA GAG ACA CAT CCC TCC TTA GAA GTG -3' REV 5'- GGC CGC GTT AAC TCA GCA TGC CAC TGT TGA GCT AT -3'
Slfn 5 Genfragment	FW 5'- TAC GTA TGG CCA TGA GTT TCC TGG AGG - 3' REV 5'- GGG GTA GTT AAC TCA AAA CAC AAC CTT TAC -3
CD2 VA Primer für Identifizierung von transgenen Mäuse	FW 5'- CCA AAG AAT TCT ACG TAC CCA TC - 3' REV 5'- GTT TTC TGC TGC CCC ATG GCC -3'

<i>Gene</i>	<i>Oligonukleotid-Sequenzen für Northern Blot-Analysen</i>
Slfn1	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn2	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn3	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn4	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn5	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn8	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn9	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
Slfn10	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3

<i>Bezeichnung der Gene, deren Expression durch quantitative PCR analysiert wurden</i>	<i>Oligonukleotidsequenzen für quantitative PCR-Analysen</i>
β-Aktin	FW 5'- TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAC - 3' REV 5'- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3
Nfil3	FW 5'- GCT CTT TCT CCA CTT ACT CCC ACT CC - 3' REV 5'- CCT GTT GTT CGT CTT CCC CAT C - 3'
Gadd45α	FW 5'- GCA GAG CAG AAG ACC GAA AGG A - 3' REV 5'- CGT ACA CGC CGA CCG TAA TG - 3'
Carbanh 6	FW 5'- GCC TAG CTG TGT TAG CCG TCT TGT - 3' REV 5'- CGA GCC TGG GTA GGT GTA ATA GTG G - 3'
myc	FW 5'- CAC GGC CTT CTC TCC TTC CTC - 3' REV 5'- CCT CTT CTC CAC AGA CAC CAC ATC - 3'
Gadd153	FW 5'- TTG GGG GCA CCT ATA TCT CAT CC - 3' REV 5'- CTT CCT TGC TCT TCC TCC TCT TCC - 3
Slugh	FW 5'- GAA GCC CAA CTA CAG CGA ACT GG - 3' REV 5'- CTG GGT AAA GGA GAG TGG AGT GGA G - 3'
Ndr1	FW 5'- GCT GAG GTG AAG CCT CTG GTG - 3' REV 5'- GGG GTT GTA GCA GGT CTT GTG G - 3'
Jund1	FW 5'- GCG CAA GCT GGA GCG TAT CT - 3' REV 5'- CTG TTG ACG TGG CTG AGG ACT TT - 3'
p21 WAF	FW 5'- GTG GCC TTG TCG CTG TCT TG - 3' REV 5'- CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG - 3
XBP-1	FW 5'- ACA CGC TTG GGA ATG GAC AC - 3' REV 5'- CCA TGG GAA GAT GTT CTG GG - 3
p53	FW 5'- CTC CCT CTG AGC CAG GAG ACA TT - 3' REV 5'- AGG GCT TCA CTT GGG CCT TC - 3
Bcl-2	FW 5'- GGA GAG CGT CAA CAG GGA GAT G - 3' REV 5'- GGG TCT TCA GAG ACA GCC AGG AG - 3

Bcl-X_L	FW 5'-GGC CAC CTA TCT GAA TGA ATG ACC ACC T - 3' REV 5'-AGT GAG CCC AGC AGA ACC ACA C - 3
Bak	FW 5'-GAG AGA GAA GAA GCG GTG GAT GAG - 3' REV 5'-GAA TCT TCT TCA GCT CCG ACT CCA C - 3
Bax	FW 5'-CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CC - 3' REV 5'-AGC AAA GTA GAA GAG GGC AAC CAC - 3
Bad	FW 5'-GGC AGC CAC CAA CAG TCA TC - 3' REV 5'-CCT CCA TCC CTT CAT CCT CCT C - 3
Slfn1	FW 5'-CCA GAT GTC TCT GTT GGG AA - 3' REV 5'-GCT AAG ACA TGA GGA GCT TG - 3
Slfn2	FW 5'-CAA GCC ATC TTT GGG CTG CC - 3' REV 5'-CTC TGG AAG AGC AGT CAG TG - 3
Slfn3	FW 5'-CGA ACT TGT ACA GAA GAA TCA A - 3' REV 5'-GTA AAC CTC TTC ACA CAG CCA - 3
Slfn4	FW 5'-GCA GTT CCT CAA ATC CAG AC - 3' REV 5'-GTA AAC CTC TTC ACA CAG CTG - 3
Slfn5	FW 5'-GAT TCT TGG TGA CTC TGA CTC GC - 3' REV 5'-CTC TTT GGT GAG AAC CCA GTG G - 3
Slfn8 (B6)	FW 5'-AGG CAT GTA TCA AAT ACA GGC CT - 3' REV 5'-ACT GAG CCC CCA TTG GTC TCA A - 3
Slfn8 (129)	FW 5'-AGA AGG CAT TTA TCG AAT ACA GT - 3' REV 5'-ACT GAG CCC CCA CTG GTC TTG T - 3
Slfn9 (B6)	FW 5'-GGC ATA TAT ATC AAA TGC AGT CCG - 3' REV 5'-ACT GAG CCC CCA CTG GTC TTG T - 3
Slfn9 (129)	FW 5'-AGA AGG CAT ATA TCA AAT GCA GT - 3' REV 5'-ACT GAG CTC CCA CTG GTC TCG A - 3
Slfn10 (B6)	FW 5'-GGG CAA GAA GAG ATG TGT TAA G - 3' REV 5'-GAG CCC CCA TTA GTC TCA ATA C - 3
Slfn10 (129)	FW 5'-AAG GGC AAG AAG AGA GAT GTG TTA AG - 3' REV 5'-GAG CCC CCA TTA GTC TCA ATA C - 3

2.3 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Lieferant</i>
Acrylamide/Bisacrylamid	BioRad, CA
Albumin bovine fraction V	Serva, Heidelberg
Ammoniumacetat	ICN Biomedical Inc., USA
Ammoniumchlorid	Riedel-de Hain
Ammoniumsulfat	Merck, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, CA
Bacto™ Agar	Difco, USA
Bromphenol Blau	ICN Biomedical Inc., USA
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
Brefeldin A	Sigma, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chlorform	Sigma, Deutschland

Chlorsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
Cyprobay	Biochrom, Berlin
Chloroquin	Merck, Darmstadt
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Diphtheria Toxin	CALBIOCHEM, Canada
Dextransulfat	Sigma, Deutschland
DEPC	Sigma, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deutschland
EDTA	Sigma, Deutschland
EDTA disodium	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetal Bovine Serum Albumin	GibcoBRL, Gaithersburg, USA
Formaldehyd	Sigma, Deutschland
Formamid	Sigma, Deutschland
Glycine	Riedel-de-Hain
Glycerol	Sigma, Deutschland
Heringsperma DNA (denaturiertes)	GibcoBrl, Gaithersburg, USA
HEPES	Biochrom AG
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma, Deutschland
Kalium-Dihydrogenphosphat	Sigma, Deutschland
Lithiumchlorid	Sigma, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG
Magermilchpulver (skim milk powder)	Fluka
Manganchlorid-Tetrahydrat	Sigma, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Sigma, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Phenol	Rotilab
PBS (Pulver)	Biochrom AG
Phosphat	Merck, Darmstadt
Propidiumjodid	Sigma, Deutschland
PMA	Sigma, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, Deutschland
Radioaktive Substrate: $\alpha^{32}\text{P} - \text{dCTP}$	Perkin Elmer
$\gamma^{32}\text{P} - \text{ATP}$	Perkin Elmer
^3H-Thymidin	Perkin Elmer
Rubidiumchlorid	Sigma, Deutschland
Sodiumdodezylsulfat	Sigma, Deutschland
Sea Plaque[®] GTG[®] Agarose	Cambrex Bioscience, USA
Seakem[®] LE Agarose	Cambrex Bioscience, USA

Staurosporine	Calbiochem
Saponin	Sigma, Deutschland
TEMED	Biorad
TWEEN 20	Sigma, Deutschland
TritonX 100	Sigma, Deutschland
Trizol Reagents	Invitrogene
Tryphan-Blau	Biochrom AG
Xylencyanole FF	Sigma, Deutschland

2.4 Enzyme

<i>Enzyme, Inhibitoren und Größenstandards</i>	<i>Lieferant</i>
<u>DNA-, RNA-und Protein-modifizierende Enzyme:</u>	
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB
T4-Polynukleotid Kinase	Biolabs
T4-DNA Ligase	NEB
Taq-Polymerase	NEB
Biotherm TM DNA-Polymerase	GeneCraft
DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Biolabs
Pfu-Polymerase	Stratagene
Turbo Pfu-Polymerase	Stratagene
DNase I	Invitrogene
Proteinase K	Sigma
RNase A	Quiagen
Superscript TM II RNase H - Reverse Transkriptase (Die dazugehörigen Puffer werden vom den jeweiligen Anbietern mitgeliefert.)	Invitrogene
<u>Restriktionsenzyme:</u>	
AlwI, BamHI, BclI, BglI, BglII, ClaI, DraI, EaeI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, MseI, MscI, NaeI, NcoI, NheI, NotI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SacII, SalI, SmaI, SnaBI, SpeI, StuI, XbaI, XhoI, XmaI, XmnI, (Die dazugehörigen Puffer wurden vom Anbieter mitgeliefert.)	NEB
<u>Inhibitoren:</u>	
RNase-out-Inhibitor	Invitrogene
p38 MAPK-Inhibitor SB203580	Calbiochem
Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK	Promega
Caspase-Inhibitor FITC-VAD-FMK in situ	Promega
Staurosporine	Calbiochem
Thapsigargin	Calbiochem
<u>Größenstandards für DNA-und Proteingele:</u>	
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Gibco BRL Life Technology
1Kb plus DNA-Ladder	Gibco BRL Life Technology
100bp DNA-Ladder	NEB
<u>weitere Materialien:</u>	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP Lösungen	Invitrogene

2.5 Reaktionskits

<i>Reaktionskit</i>	<i>Lieferant</i>
CalPhos Mammalian Transfection Kit	CLONTECH, USA
PCR-Script™ Amp Cloning Kit	Stratagene, USA
Prime-It® II Random Primer labeling Kit	Stratagene, USA
Qiagene® Maxi Plasmid Kit	Qiagen, Deutschland
QIA prep® Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Deutschland
QIAquick® Gel Extraktion Kit (250)	Qiagen, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogene, USA
ECL Wesern blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Deutschland
Sybr®Green PCR Master Mix	AB Applied Biosystem
SMART™ RACE cDNA Amplifikation	Clontech, Palo Alto, USA
Amplifikationsreaktionskit für Microarrays	Agilent Technologies, USA

2.6 Zellkulturmedien, Medienzusätze, Bakterienmedien

Zellkulturmedien:

Dulbecco's DMEM
 Dulbecco's RPMI 1640
 DMEM PAA
 OPTIMEM 1

Anbieter

Gibco/PAA
 Gibco
 PAA Laboratories, Osterreich
 Gibco

komplettes DMEM bzw. RPMI-Medium:

20 mM HEPES
 2 mM L-Glutamin
 1 mM Natriumpyruvat
 10% hitze-inaktiviertes FCS
 5% Horse Serum bzw Calf Serum
 5*10⁻⁵M 2-Mercaptoethanol

und Pen/Strep in den entsprechenden Mengen
 wahlweise auch nicht-essentielle Aminosäuren

Medien für Bakterienzellkultur:

LB-Medium: 1,0% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1,0% (w/v) NaCl
 pH 7,0

Medienzusätze:

HEPES-Buffer 1M
 Natrium-Pyruvat
 L-Glutamine
 MEM-non essentiell Aminoacids
 2-Mercaptoethanol
 Fetal Bovine Serum
 Fetal Bovine Serum
 Horse Serum

Biochrom AG
 Biochrom AG
 Biochrom AG
 Gibco BRL
 Gibco
 Biochrom AG
 Sigma
 PAA

Antibiotika:

Penicillin/Streptomycin
 Ampicillin
 Kanamycin

Biochrom AG
 Sigma
 Sigma

weiter Lösungen:

10x Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG
Dulbecco´s 1xPBS	Biochrom AG
Percoll Separating Solution	Biochrom AG
Lympholyte® M	Cedarlane Laboratories, Kanada
Trizol® Reagent	Invitrogene

2.7 Puffer und Lösungen

2.7.1 Puffer und Lösungen für Elektrophoresen, Southern-, Northern- und Western-Blots

6x Agarose Auftragspuffer (nach Sambrook et al 1989) (Southern Blot)

Glycerin	3ml (30% v/v)
Bromphenolblau	25 mg (0,25% w/v)
Xylencyanol FF	25 mg (0,25% w/v)
destilliertes Wasser	auf 10 ml auffüllen

6x Formaldehyd Auftragspuffer (Northern Blot)

Bromphenolblau	25 mg (0,25% w/v)
Xylencyanol FF	25 mg (0,25% w/v)
0,5 M EDTA (pH 8)	20 µl (1 mM)
50 % Glycerol	5 ml (100 %)
DEPC behandeltem H ₂ O	auf 10 ml auffüllen

Polyacrylamidamid Probenpuffer (Western Blot)

8 % SDS	1,6 g
0,25 M Tris (pH6,8)	0,61 g
40 % Glycerin	8 ml
20 % Mercaptoethanol	4 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Auf 10 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

Trenngelpuffer (für SDS-Polyacrylamidgele)

Tris	90,75 g
10 % SDS	5 ml
Auf pH 8,8 einstellen und mit destilliertem H ₂ O auf 500 ml auffüllen.	

Sammelgelpuffer (SGP: für SDS-Polyacrylamidgele)

Tris	30,25 g
10 % SDS	20 ml
Auf pH 6,8 einstellen und mit destilliertem H ₂ O auf 500 ml auffüllen	

10x Laufpuffer (für SDS-Polyacrylamidgele)

Tris	30,25 g
Glycine	144 g
10 % SDS	100 ml
Auf 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen.	

20x Blotting-Puffer (Western-Blot)

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	69 g in 1 l dest. H ₂ O lösen
---	--

Acrylamidstock

Aqua bidest.	350 ml
Bis Acrylamid	3,9 g
Acrylamid	146,1 g

Mit dest. H₂O auf 500 ml auffüllen.

Herstellung von Polyacrylamidgelen

Ammoniumpyrosulfat

10 % in dest. H₂O

Trenngel: (Reagenzien in ml für 5 Minigele)

	7,50%	10%	12%
Aqua Bidest.	17,5	12,5	10,5
Trenngelpuffer	7,5	7,5	7,5
Acrylamide	0,05	0,1	0,12
APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,015	0,015	0,015

Sammelgel: (Reagenzien in ml für 5 Minigele)

Aqua Bidest.	9
Sammelgelpuffer	3,75
Acrylamide	2,25
APS	76,5 µl
TEMED	22,5 µl

10x TBST (0,1%)

NaCl:

88 g

1 M Tris HCl (pH7):

200 ml

Tween20 :

10 ml

Mit dest. H₂O auf 1 l auffüllen.

Block-Puffer für Western-Blots

10x TBST:

5 ml

Magermilchpulver:

2,5 g

Mit dest. H₂O auf 50 ml auffüllen.

50x TAE (Laufpuffer für Agarosegelelektrophorese)

Tris:

242 g

Essigsäure:

57,1 ml

0,5 M EDTA (pH 8,0)

100 ml

mit dest. H₂O auf 1 l auffüllen.

1x TAE wurde durch eine 1:50 Verdünnung hergestellt und für die Herstellung von 1% igen Agarosegelen genutzt (4 g Agarose mit 400 ml TAE vermischen, aufkochen, mit Ethidiumbromidlösung versetzen und giessen)

20x SSC (Standard-Salz-Citrat-Lösung für Northern- und Southern-Blot-Analysen)

6 M NaCl

500 ml

0,6 M Na-Citrat

500 ml

10x MOPS-Puffer (für denaturierende RNA Formaldehyd-Gele):

MOPS

83,7 g

125 mM Natriumacetat (mit 2 N NaOH auf pH 7,0 einstellen)

800 ml (in DEPC H₂O)

0,5 M EDTA (pH8,0)

20 ml

DEPC behandeltes Wasser

auf 1 l auffüllen

Der Puffer wurde anschliessend mittels eines 0,2 µm Filters steril filtriert.

Church-Hybridisierungspuffer (Southern):

1 % BSA

1 mM EDTA

0,5 M NaPO₄ (pH7,5)

7% SDS

Hybridisierungslösungen für Northern- und Southern-Blot-Analysen

1 M NaCl

1% SDS

10 % Dextransulfat

100 µg/ml Heringssperma-DNA

2.7.2 Puffer und Lösungen für Transfektion und retrovirale Transduktion

100 x Polybrene-Lösung (retrovirale Transduktion):	4-8 mg Polybrene (Hexadimethrin-Bromid, Fluka) werden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert
2x HBS-Puffer (Calcium-Phosphat-Transfektion):	274 mM NaCl 10 mM KCl 1,4 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Glukose 24 mM HEPES pH 7,05 (mit NaOH exakt einstellen)
2,5 mM Chloroquin	

2.7.3 Puffer und Lösungen für ELISA

Bindungspuffer	1x PBS
Waschpuffer	1x PBS; 0,1% BSA; 0,05% Tween20
Blockpuffer	1x PBS; 1% BSA
Detektionspuffer	1x PBS; 0,1% BSA
Substratpuffer/Diethanolaminpuffer (pH 9,8)	48,5 ml Diethanolamin 400 mg MgCl ₂ x6H ₂ O 100 mg NaN ₃ (0,02%) mit 5N HCl auf pH 9.8 einstellen
Stopplösung	0,5M EDTA (pH 8,0)

2.7.4 Färbungs-, Bindungs- und Permeabilisierungspuffer

Propidiumiodid (PI)-Färbelösung (10 ml):	0,1% Triton X-100 in 1xPBS 2 mg DNase-freie RNase A 200 µl einer 1 mg/ml PI-Lösung
1x FACS-Puffer:	2% BSA 1x PBS
10x Annexin V-Bindungspuffer:	0,1 M HEPES (pH 7,4) 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂
1x Saponin-Puffer :	0,5% Saponin 0,1% BSA in 1x PBS gelöst

2.7.5 Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

4 % PFA (Paraformaldehyd)	8 g PFA unter Verwendung 1 N NaOH in 100 ml Wasser lösen Zugabe von 100 ml 2xPBS
Permeabilisierungspuffer	0,1 % Triton X-100
Blockpuffer	1xPBS 0,05 % Tween20 0,5 % BSA

2.7.6 Puffer und Lösungen für die Zellyse oder dem Mausschwanzverdau

Puffer zum Verdauen von Mauschwänzen:	1 M Tris HCl 500 mM EDTA 10 % SDS 35 µl Proteinase K (von 10 mg/ml Stock)
Zellysispuffer:	120 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,5 % NP40
Erythrozyten-Lysispuffer :	4,15g NH ₄ Cl ₂ 0,02g EDTA mit destillierten H ₂ O auf 500 ml auffüllen

2.8 Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Lieferant oder Literatur</i>
pCMV-Myc	Clontech
pBluescript ® II SK(+/-)	Invitrogene
pMSCV2.2-IRES-GFP	Dr. Bill Sha, University of Berkley, USA
pM13	Dr. Bill Sha, University of Berkley, USA
Lawrist7-Cosmidbibliothek (129/Ola mice) RZPD Nr. 121	RZPD, Berlin, Deutschland
hCD2VA-Expressionsvektor	Zhumabekov et al., 1995

2.9 Mausstämme

<i>Stamm</i>	<i>Lieferant</i>
C57 BL/6 (B6)	Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)
C57 BL/6 (B6)	Federal Institute for Health Protection of Consumer and Veterinary Medicine, Berlin
p53KO ^{-/-}	Max-Dellbrück-Institut, Berlin (bereitgestellt durch Dr. Liangping Li)
Mauszucht und -pflege wurde von Mitarbeitern und Tierpflegern nach den geltenden Tierschutzgesetzen durchgeführt.	

2.10 Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Zelltyp</i>
NIH 3T3	Fibroblasten
M1	myoblastische Leukämiezellen 1
sEnd.1	Endothelzellen
BW54z17	Thymomazelllinie
Phoenix eco	Verpackungszelllinie

2.11 Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Literatur</i>
DH5a	F'φ 80d LacZΔM15 endA1 recA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) supE44 thi-1λ-gyr A96 (Nal ^r) relA1D (LacZYA-argF) h169	(Hanahan, 1983).
TOP10 F-	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74deoR recA1 araD139 ara-leu)7697galUgalK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
XL-Blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI _q ZAM15Tn10 (Tet _r)]	(Bullock et al., 1987)
L.m.OVA	<i>Listeria monocytogenes</i> -Stamm mit rekombinant-exprimierenden Ovalbumin	

2.12 Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>
Kühlschränke	Liebherr premium 4°C	Liebherr
	Liebherr premium -20°C	Liebherr
	Forma Scientific -80°C	Forma Scientific
Stickstoffbehälter	Chromas ®	Messer Griesheim
	Biosafe ®	Messer Griesheim
	Apollo Biosafe ®	Messer Griesheim
Inkubatoren	NUAIRE US Autoflow	Sarstedt
	Lab-Therm	Kühner Schweiz
Zentrifugen	Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Megafuge 3.0R Tischzentrifuge	Kendro Laboratory Products
	Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
	Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech
	Superspeed Zentrifuge J-TB 0560	Beckman Coultert
	Zentriuge® Sorvall RC-5B Refrigerated	DuPont Instruments
Mikroskope	Floureszenzmikroskop DMRB	Leica
	DMIL (inverses Mikroskop)	Leica
	Konvokales Mikroskop	Leica
Sterilbank	LaminAir HB2448	Kendro Heraeus Instruments
Rollheizöfen mit Schüttler	OV5	Biometra
Heizblock	Grant B-1 Block Thermostat	Grant
Blockthermostat	BT 100	Kleinfeld Labortechnik
GFL Schüttelwasserbad	GFL 1083	GFL
Wasserbad	MAG	Lauda
Wasserbadinkubator	TWBS	Inlabo
Trockenschrank	T6060	Heraeus Instruments
Brutschrank	BP500	Memmert
PCR-Maschine	Gen Amp ® PCR System 9700	PE Perkin Elmer
Vakuum Pumpe	Hydro Tech™ Vacuum pump	Biorad
Gel dryer System	Model 583	Biorad
Radioaktiver Counter	Series 900 mini monitor	Multi Med Kirchheim
MS1 Minishaker	IKA ®	IKA works INC/USA
UV-Stratalinker	® 2406	Stratagene
Shaker Polymax	1040	Heidolph
Rocking Platform		Biometra
Spektrometer	DU ® 640	Beckmann USA
	Spectra MAX 250	Molecular Devices, Dt.
	Power Pac 200	Biorad
Stromversorgungsgeräte	Power Pac 300	Biorad
	M 805	Siemens
Mikrowelle		Biorad
Gene Pulser ® II		Biometra
Pulse controller II		Biometra
FACScalibur		Becton Dickenson
Bio Photonics	Gel Print 2000	MWG Biotech
Transilluminator	TI 2	Biometra
Digital Graphic printer	UP-D860E	Sony
Monitor	14C	Philips
Microplate Scintillation and Luminescence counter	β-counter TopCount NXTTM	Packard Bioscience
Harvester	Filtermate 196	Packard Bioscience
RT-PCR	7000 Sequence detection System	Applied Biosystem USA
Elektrophoresekammern:		
	Agarosegele:	OWL-Separationssystem Separationssystem

SDS-Page-Gele:	Mini-Protean 3 Cell	Biorad
	Mini Trans Blot Modul	Biorad
Western-Blot-Vorrichtung	Elektrophoresis UNIT	Hoefer, San Francisco, USA
DNA-Microarray	TE Series TRANSPHOR	Agilent Technologies
Laserscanner		

2.13 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
<u>Filme:</u>	
Gelreader 110 mm x20 m TYPE UPP-110 HD	Sony, Japan
Biomax MS Double Emulsion Film	Kodak, Japan
Hyperfilm MP verschieden Größen	Amersham LIFE SCIENCE
Hyperfilm™ ECL™ Chemiluminescence	Amersham Pharmacia Biotech Uppsala
<u>Filter:</u>	
Steritop 0,22 µm 150 ml, 500 ml	Millipore
Weißrandfilter FP 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Unifilter 96-well A (Cell-Harvester)	
<u>Zellkulturplatten:</u>	
6, 12, 24 Loch Zellkultur Kluster	Costar, USA
96 Loch Zellkultur-Kluster	NUNC Brand Products, Dänemark
60 x 15 mm / 100 x 20 mm	Becton Dickenson, USA
60 x 15 mm / 100 x 20 mm	Sarstedt, Deutschland
Glasboden-Mikrowellen Petrischalen	Mat Tek Corporation, USA
<u>Zellkulturflaschen:</u>	
75 cm ² / 150 cm ²	TPP, Schweiz
25 cm ² / 75 cm ² / 175 cm ²	Becton Dickenson, USA
<u>Röhrchen:</u>	
15 ml, 50 ml Röhrchen	Becton Dickenson, USA
15 ml, 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
14 ml Röhrchen (Polypropylen)	Becton Dickenson, USA
5 ml Polysterene FACS-Röhrchen	Becton Dickenson, USA
5 ml Polypropylene FACS-Röhrchen	Becton Dickenson, USA
<u>Pipetten/Pipettenspitzen:</u>	
Plastikpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Sarstedt, Deutschland
Plastikpipetten (25 ml, 50 ml)	Becton Dickenson, USA
Cellstar Plastikpipetten (5 ml)	Greiner bio one
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml) (Safeseal TIPS Premium, DNase, RNase frei)	Biozyme, Österreich
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Deutschland
0,5 ml; 1 ml; 2,5 ml; 10 ml Combitips	Eppendorf, Deutschland
<u>Reaktionsgefäße:</u>	
0,5 ml; 1,5 ml; 1 ml; 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Deutschland
0,2 ml Thermo tubes	Abgene, USA
Thermo-Fast 96 Well Platte	Abgene, USA
1,5 ml; 2 ml Einfrier Röhrchen	Nalge NUNC, Dänemark

Glasmaterial:

50 ml, 100 ml Erlenmeyerkolben
500 ml, 1 l Erlenmeyerkolben
2 l Erlenmeyerkolben
40 ml, 100 ml, 150 ml, 250 ml, 400 ml
600 ml, 1 l Bechergläser
50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml Meßzylinder
25 ml, 50 ml Glasflaschen
100 ml Glasflaschen
250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l Glasflaschen
230 mm Pasteurpipetten

Schott Duran Deutschland
Fischerbrand
Merk VWR Brand
Fischerbrand

Hirschmann EM Deutschland
Schott Duran Deutschland
Fischerbrand
Schott Duran Deutschland
Roth

weitere Materialien:

1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Omnifix Kanülen
Frischhaltefolie
Entsorgungsbeutel 305 x 500 mm
Tough-Tags Microtubes
Tough-Spots Microtubes
Parafilm "M" Laboratory Film
Puderfreie Latex-Handschuhe L/XL
Einmalgesichtsmaske
TOPSeals™-A 96 Microplates
Lab-Teck ChamberSlides w/cover RS Glas
Objektträger, steril
50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 l Plastikmeßzylinder
0,1 mm, 0,025 mm² Neubauer Zählkammer

Braun, Deutschland
Roth
Merck
DIVERSIFIED Biotech USA
DIVERSIFIED Biotech USA
Chicago American National Can
Kimberly Clark
Heiland
Packard

Nalge NUNC, Dänemark
Brand, Dänemark
Blau Brand Deutschland

Pipetten :

Multipette ® plus
Pipettensatz:
Pipetman 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1ml
Pipettboy acu

Eppendorf

Gilson, Frankreich
INTEGRA Bioscience