

# 3 MATERIAL

## 3.1 Biologisches Material

### 3.1.1 cDNS Klone

Die cDNS-Klone, die für die Expressionsanalysen mit cDNS-Mikroarrays verwendet wurden, stammen überwiegend aus Augen-spezifischen Subtraktionsbanken, die durch cDNS-Klone aus dem RZPD ergänzt wurden. Die „Vorwärts-Subtraktionsbank“ mit der Bezeichnung 16/5-SSH war für Transkripte angereichert, die in den Augen von Norrie Knockout Mäusen fehlen oder im Vergleich zum Wildtyp geringer exprimiert sind. Die subtrahierten und angereicherten cDNS-Fragmente dieser Bank wurden in zwei verschiedenen Ansätzen transformiert, wobei eine unterschiedliche Anzahl von Klonen gepickt wurde (96 und 3072). Die „Reverse-Subtraktionsbank“ (5/16) wurde in der entgegengesetzten Orientierung angefertigt und ist für Transkripte angereichert, die in den Augen von ND-Knockout Mäusen stärker exprimiert sind als im Wildtyp. Das Set der in den Subtraktionsbanken enthaltenen Augen- und Retina-spezifischen Gene wurde sukzessive vervollständigt, wofür die ergänzenden Klone aus der UniGene-Datenbank ausgewählt und aus dem RZPD als Glycerin-Dauerkultur bestellt wurden (Anhang 11.2). Darunter sind insgesamt 31 verschiedene Haushaltsgene, die durch 111 Klone repräsentiert sind (siehe Anhang 11.1). Gene, die in Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen stehen, sind größten Teils nur durch einen Klon vertreten (Anhang 11.2).

Tabelle 3.1: Verwendete cDNS-Klone zur Generierung von Elementen

Anzahl der Klone	Bezeichnung der Bibliothek
96	cDNS-Subtraktionsbank <sup>1</sup> , (erster Transformationsansatz) Bezeichnung 16/5-SSH (Tester=Wildtyp Maus #16, 2 Jahre; Treiber= ND Knockout Maus #5, 2 Jahre)
3072	cDNS-Subtraktionsbank <sup>1</sup> 16/5-SSH (zweiter Transformationsansatz)
1632	cDNS-Subtraktionsbank <sup>1</sup> Bezeichnung 5/16 (Tester=ND Knockout Maus #5, 2 Jahre; Treiber= Wildtyp Maus #16, 2 Jahre)
1278	cDNS-Klon-Kollektion der IMAGEp998 cDNS-Bank <sup>2</sup> (Haushaltsgene, Augen- und Retina-spezifische Gene, Apoptose-spezifische Gene)
15 + 2	Pflanzen-spezifische cDNS Klone <sup>3 + 4</sup> (Gerste und Mauerblümchen)

<sup>1</sup> S. Lenzner, MPI für Molekulare Genetik

<sup>2</sup> RZPD Berlin, siehe Anhang A und B

<sup>3</sup> F. Thümmeler, Ls. f. Pflanzenbau und -züchtung

<sup>4</sup> H. Eickhoff, MPI für Molekulare Genetik

### 3.1.2 Gesamt-RNS aus Mausaugen

#### 3.1.2.1 Norrie Knockout und Wildtyp Mäuse

Für die Analyse des Genexpressionsmusters an Augen von Norrie Knockout Mäusen [Berger *et al.*, 1996] wurde Gesamt-RNS verwendet, die aus ganzen Augen von Mutanten und gleichaltrigen Wildtyp Mäusen isoliert wurde. Die RNS einer hemizygoten Norrie Knockout Maus ist mit (–) gekennzeichnet, die einer Wildtyp Maus mit (+). Für methodisch-technische Optimierungen wurde gepoolte Gesamt-RNS aus Augen von Wildtypmäusen verschiedener Altersstufen verwendet.

Tabelle 3.2: Gesamt-RNS des ganzen Auges von ND-Knockout Mäusen und gleichaltrigen Wildtyp Mäusen

<b>Alter in Monaten</b>	<b>Bezeichnung ND-Knockout Maus</b>	<b>Bezeichnung Wildtyp Maus</b>
0,5	115/1-	115/2+
0,5	924/5-	217/3+
0,5	217/2-	124/3+
1	53/3-	30+
1	92/3-	53/1+
1	323/2-	323/1+
3	123/8-	183+
3	123/7-	202+
3	201-	204+
6	179-	193+
6	176-	20+
6	192-	194+
12	96-	95 +
12	101-	110+
12	109-	103+
18	93-	121+
18	87-	72+
18	111-	84+
24	38-	5+
24	70-	12+
24	71-	22+

### 3.1.3 Vollständige cDNS

Die vollständigen cDNS wurden mittels RT-PCR von Gesamt-RNS aus Augen von Wildtypmäusen oder durch PCR auf SMART-RACE Produkten generiert. Mit diesen cDNS wurde das Redundanz-Screening durchgeführt. Die Primer-Sequenzen mit denen die cDNS hergestellt wurden, sind unter 3.4.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Vollständige cDNS und Angabe der Länge

Bezeichnung der cDNS	Länge des Amplikons
Arrestin ( <i>Sag</i> )	1482 bp
Blaues Zapfen Pigment ( <i>Bcp</i> )	1007 bp
Fas Apoptose-inhibierendes Molekül ( <i>faim</i> )	8346 bp
Klon 90 (noch unbekannt)	1026 bp
Myelin-Homolog	2442 bp
Norrie-Gen ( <i>nd</i> )	1317 bp
Phosduzin ( <i>Pdc</i> )	1158 bp
Phosphodiesterase ( <i>Pde</i> )	2623 bp
Retinoschisis ( <i>Xlrs</i> )	5565 bp
Synaphin-Homolog	1700 bp
Ubiquitin-konjugierendes Enzym ( <i>ube</i> )	1410 bp

### 3.1.4 SMART-amplifizierte cDNS

SMART-amplifizierte cDNS wurden anhand von Gesamt-RNS aus ganzen Augen von ND-Knockout Mäusen bzw. Wildtyp Mäusen hergestellt. Von jüngeren Stadien (0,5 bis 6 Monate) wurde jeweils die RNS aus den Augen von drei ND- bzw. Wildtyp Mäusen gepoolt und zur SMART-cDNS Synthese eingesetzt. Von älteren Stadien wurde die RNS nicht gepoolt.

Tabelle 3.4: Aus Gesamt-RNS des ganzen Auges amplifizierte SMART-cDNS. Dazu wurden die aufgeführten Tiere verwendet. Von jüngeren Tieren wurden die RNS vor der SMART-Synthese gepoolt.

Alter der Maus in Monaten	Bezeichnung ND-Knockout Maus	Bezeichnung Wildtyp Maus
0,5	Pool von 3 Tieren	Pool von 3 Tieren
1	Pool von 3 Tieren	Pool von 3 Tieren
3	Pool von 3 Tieren	Pool von 3 Tieren
6	Pool von 3 Tieren	Pool von 3 Tieren
12	96-	95+
12	101-	103+
12	109-	110+
18	93-	72+
18	87-	84+
18	111-	121+
24	11-	5+
24	70-	12+
24	71-	22+

### 3.1.5 cDNS-Pools

Die Kloninserts wurden durch Insert-flankierende Primer (NpP1 und NpP2R, siehe Abbildung 3.1) in einer PCR-Reaktion amplifiziert und zu einem Pool zusammengefaßt.

Tabelle 3.5: cDNS-Pools und darin enthaltene Kloninserts

Pool-Nummer	Bezeichnung des Kloninserts
I	38, 42, 65, 78, 96, 164, 294, 332, 439
II	22, 29, 36, 42, 306, 353, 361
III	31, 41, 51, 56, 76, 80
IV	30, 40, 58, 59, 82, 83, 91, 94
V	4, 13, 14, 15, 34, 43, 48, 50, 53, 62, 66, 77, 85
VI	7, 16, 19, 20, 27, 45, 46, 64, 74, 81, 196, 230
VII	8, 9, 25, 32, 33, 35, 39, 47, 52, 71, 79, 86
VIII	115, 117, 144, 176, 183, 186, 231, 288, 362, 432
IX	503, 504, 568, 639, 662, 669, 676, 731, 732, 765, 779, 784
X	786, 906, 912, 939, 946, 956, 977, 1023, 1052, 1053, 1062, 1066, 1078
XI	510, 708, 750, 850, 969, 975
XII	571, 619, 747, 836, 868, 928, 942
XIII	1101, 1150, 1152, 1208, 1233, 1266, 1279, 1350
XIV	1101, 1103, 1114, 1124, 1246, 1258, 1282, 1311, 1349, 1372, 1377
XV	1132, 1146, 1155, 1157, 1183, 1207, 1231, 1279, 1294
XVI	1198, 1213, 1278, 1293, 1307, 1312, 1335, 1355, 1384, 1385
XVII	1419, 1465, 1510, 1596, 1603, 1686, 1730, 1783, 1822, 1865, 1970, 1985, 1992, 2003
XVIII	1410, 1418, 1559, 1562, 1592, 1604, 1607, 1638, 1663, 1687
XIX	1461, 1468, 1537, 1539, 1618, 1624, 1688, 1725, 1727, 1772, 2008, 2015, 2016
XX	1560, 1802, 1806, 1923, 1995, 2007
XXI	1745, 1784, 1882, 1940, 1943, 1950, 1962, 1975, 1990, 2006, 2013
XXII	1845, 1848, 1857, 1859, 1861, 1869, 1896, 1906, 1915, 1919, 1927, 1949, 1956

### 3.1.6 Produkte der cDNS-Subtraktionen

Für die subtraktiv-suppressive Hybridisierung wurden SMART-amplifizierte cDNS von den Gesamt-RNS aus den Augen von zwei 2 Jahre alten Mäusen verwendet (Wildtyp Maus, Bezeichnung #5; ND-Knockout Maus #16). Die Vorwärts-Subtraktionsbank mit der Bezeichnung 16/5-SSH (Tester: #16, Treiber: #5) wurde für Transkripte angereichert, die in den Augen von ND-Mäusen fehlen oder im Vergleich zum Wildtyp geringer exprimiert sind. Dahingegen ist die Reverse-Subtraktionsbank 5/16-SSH (Tester: #5, Treiber: #16) für Transkripte angereichert, die in der Knockout Maus höher exprimiert sind als im Wildtyp.

Tabelle 3.6: Subtraktionsprodukte und deren Orientierung

Bezeichnung	Tester	Treiber
16/5-SSH	Wildtyp Maus #16	ND-Knockout #5
5/16-SSH	ND-Knockout Maus #5	Wildtyp #16

## 3.2 Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt wurden Enzyme bei Gibco, NEB und bei MBI-Fermentas bestellt.

Tabelle 3.7: Verwendete Enzyme, Bezugsquelle und Artikelnummern

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
AmpliTaq (5 U/μl)	Perkin Elmer	N 808-0160
E.coli DNA-Ligase (5 U/μl)	NEB	M 0205 S
E.coli DNA-Polymerase I (10 U/μl)	NEB	M 0210 S
Eag I (10 U/μl)	NEB	R 0505 S
MPI-Taq Polymerase (20 U/μl)	MPI	
Ribonuclease H (2 U/μl)	Gibco BRL	18021-071
Rsa I (10 U/μl)	Gibco BRL	15424-013
Sma I (10 U/μl)	Gibco BRL	15228-018
Superscript II RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Gibco BRL	18064-022

## 3.3 Kits

Die verwendeten Kits wurden von den aufgeführten Herstellern bezogen. Die jeweils enthaltenen Komponenten dieser Kits, die in dieser Arbeit zur Verwendung kamen, sind nicht extra aufgeführt und sind den zugehörigen Beipackzetteln zu entnehmen.

Tabelle 3.8: Verwendete Kits, Bezugsquelle und Artikelnummern

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
3DNA Submicro Expression Array Detection Kit Cy3	Genisphere	A100731
3DNA Submicro Expression Array Detection Kit Cy5	Genisphere	A100741
Advantage PCR Polymerase Kit	Clontech	K 1910-Y
Atlas Glass Fluorescent Labeling Kit	Clontech	K1037-1
CyScribe	Amersham	RPN 6200
Decalabel Kit	MBI-Fermentas	K0622
MICROMAX TSA Labeling and Detection Kit	NEN	MPS 521
Nicktranslation Kit	Roche	976776
QiaQuick-PCR Purification Kit	Qiagen	2.8104
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech	K 1052-1
Spot-Report Array Validation Kit	Stratagene	252005
T7 Megascript Kit	Ambion	1334

## 3.4 Längenstandards, Vektor und Primer

### 3.4.1 Nukleinsäure Längenstandards

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von amplifizierten PCR-Produkten wurden die folgenden Längenstandards eingesetzt, um deren Größe zu beurteilen.

Tabelle 3.9: Verwendete Längenstandards, Bezugsquelle und Artikelnummer

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	MBI-Fermentas	SM0323
Low DNA Mass Ladder	Gibco BRL	10068-013
Puc18/Ddel	MBI-Fermentas	SM0303

### 3.4.2 Vektor

Die Lage der Insert flankierenden Nested-Primer (NpP1 und 2R), der Adaptoren und der M13-Sequenzen ist auf dem Vektor (Abbildung 3.1) gezeigt.

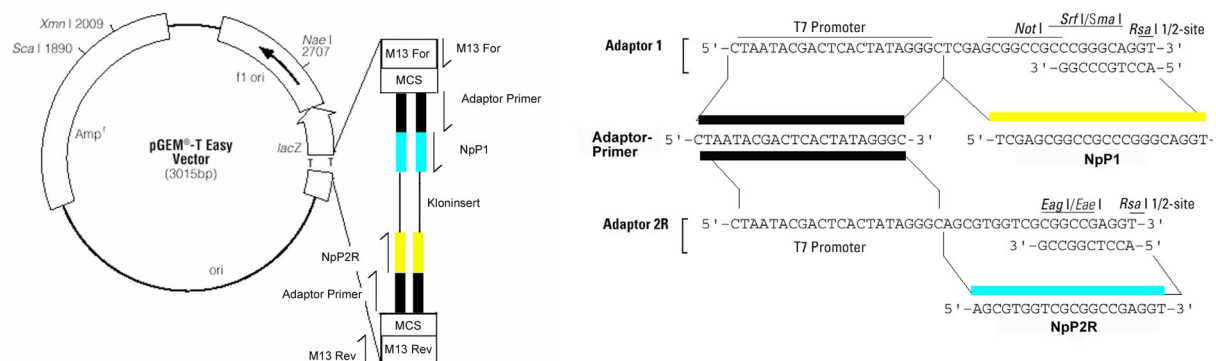


Abbildung 3.1: Vektor und Sequenzen.

Links: pGEM-T Easy Vektor mit einem Kloninsert, das in der SSH generiert wurde. Das Insert wird von den Nested-Primern NpP1 und NpP2R und den Adaptor-Sequenzen flankiert. Rechts: Sequenzen der Nested- und Adaptor-Primer.

### 3.4.3 Primer

Zur Amplifikation wurden die folgenden Primer (PCR-Startmoleküle) in PCR-Reaktionen eingesetzt. Einige Primer wurden mit einer Aminomodifikation bestellt, sie trugen an ihrem 5'-Ende eine NH<sub>2</sub>-Gruppe und einen C<sub>6</sub>-Linker und sind mit (\*) gekennzeichnet.

Tabelle 3.10: Sequenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz
Bcp-For	5'- GAA TAT CTC TTC GGT GGG GC
Bcp-Rev	5'- AGT GAG GGC CAA CTT TGC TA
Faim-For	5'- GGG CCA GCA GCA CCA TTT TAT TTT AC
Faim-Rev	5'- GCT GTT TGG GAC GTA GCA TT
Klon 90-For	5'- GGA CTG GAC ACA GGG ACT TG
Klon 90-Rev	5'- TAG AGG TGG CCC TCC AGT CT
M13-For*	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GTG
M13-Rev*	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC
Myl-For	5'- GCC TCT GAA GCA GGA GAC AC
Myl-Rev	5'- GGG AAG CAT CTC GAA TCA CT
Norrie-For	5'- TGG GTC GCT TAA ACA ACA GTC
Norrie-Rev	5'- AGG AGT CCC GCT GTC ACA TA
NpP1*	5'- TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T
NpP1-Rev	5'- ACC TGC CCG GGC GGC CGC TCG A
NpP2R*	5'- AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT
NpP2R-Rev	5'- ACC TCG GCC GCG ACC ACG CT
Oligo(dT)/T7-Promotor	5'- AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC TTT TTT TTT TTT TTT
Pde6b-For	5'-CAG TGA GGA ACA GGT ACG CA
Pde6b-Rev	5'- AGG CAG AGT CCG TAT GCA GT
Pdc-For	5'-TCA GTG GAC AGC GAT TCT CA
Pdc-Rev	5'- GCC CAA ATA AAA ATG CCA AG
Sag-For	5'- CTG ATA GGA TTG CAC CAG GTC
Sag-Rev	5'- ATT TCT GGG AGG AAT GCT CA
Syna-For	5'- TCC AGC TTA CGA CTA GCA AAA G
Syna-Rev	5'- TCT CAA GTG AAA GGG GCC ACA AAA GAA TG
Ube-For	5'- ATC CCA GGG AAG GTA GTG GT
Ube-Rev	5'- TTG AGG TAA AGA GAA TGG TTT GG
Xlrs1-For	5'- GAC CAA GGA CAA GGA GAA AAT GC
Xlrs1-Rev	5'- TGA TCC AAA GGT AGC CAG AAT

### 3.5 Fein- und Biochemikalien

Verwendete Fein- und Biochemikalien wurden entweder MB-grade oder in p.A.-Qualität bestellt.

Tabelle 3.11: Verwendete Fein- und Biochemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
1-Methyl-2-pyrrolidinone	Aldrich	32.863-4
1,4-Phenylen-Diisothiocyanat (PDC)	Sigma	P-0158
10x PCR-Puffer	Perkin Elmer	N8080129
Aceton	Merck	1.00014
Agarose ultrapure	Gibco BRL	15510-027
Ammoniumacetat (3M)	Ambion	9070G
Ammoniumsulfat	Sigma	A-2939
Ampicillin	Sigma	A-5918
Ampullen-Wasser	Upjohn-Pharmacia	13451

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
Bromphenolblau	Fluka	18040
BSA	Sigma	A-9418
Cy3-dUTP (1 mM)	Amersham	PA 53022
Cy3-dUTP (1 mM) Renaissance	NEN	NEL 578
Cy3-monoreaktiver Farbstoff	Amersham	PA 23001
Cy5-dUTP (1 mM)	Amersham	PA 55022
Cy5-dUTP (1 mM) Renaissance	NEN	NEL 579
Cy5-monoreaktiver Farbstoff	Amersham	PA 25001
Denhardt's 50x	Sigma	D-2532
DEPC	Sigma	D-5758
DMSO	Merck	1.02950
dNTP-Set	Roche Diagnostics	1969064
EDTA (Titriplex)	Merck	1.08418
Ethanol, 96 %	Merck	1.00986
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics	146003920-25
Formaldehyd	Fluka	47608
Formamid, deionisiert	Sigma	P-040.1
Glykogen, aus Muscheln	Merck	1.11372
Glyzerin, 87%	Merck	1.04094
Hefe t-RNA	Sigma	R-8759
Hefeextrakt	Difco	0127-17-9
Heringssperma DNS	Roche	223646
IPTG	Sigma	I-5502
Isopropanol	Merck	1.09634
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05833
Maus-Cot1 DNS	Gibco BRL	18440-016
Mercaptoethanol	Merck	805-740
Methanol	Merck	1.06009
N,N-Dimethyl-formamid	Fluka	442568
NaCO <sub>3</sub>	Merck	1.06392
Natriumacetat	Merck	1.06268
Natriumborat	Merck	1.00165
Natriumchlorid	Merck	1.06400
Natriumcitrat	Merck	1.06448
Natriumhydroxid	Merck	1.06495
Nicotinadenin-Dinukleotid	Merck	124542
Nuklease-freies Wasser	Ambion	9938
Oligo(dT) <sub>12-18</sub>	Amersham Pharmacia	27-7858-01
pd(N) <sub>6</sub>	Amersham Pharmacia	27-2166-01
Perfect Hybridization Buffer	Sigma	H-7033
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Ambion	9730
Poly(dA)	Amersham Pharmacia	27-7988-01
Pyridin	Sigma	P-3776
RNAasin	Amersham Pharmacia	27-0815-01
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva	20760
Succinyl-Anhydrid	Aldrich	23.969-0
Trehalose	Sigma	T-5251
Tris(hydroxymethyl)aminoethan	Merck	1.08382
Trypton	Difco	0123-17
X-Gal	Appligene	130262
Xylencyanol	Merck	1.10590
Ziegen-Serum	Dianova	005-000-002



## 3.6 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurde Millipore-Wasser zum Ansetzen der Lösungen und Puffer verwendet. Sämtliche Lösungen, die in Kontakt mit Mikroarrays kamen, wurden sterilfiltriert. Autoklaviert wurde, wenn es die Anwendung erforderte und die Lösung zuließ.

Tabelle 3.12: Verwendete Lösungen und Puffer.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Molarität bzw. prozentualer Anteil / Komponente</b>	
<u>5fach Markierungsmix</u>	0,25 mM 0,25 mM 0,25 mM 0,8 mM	dATP dGTP dCTP Cy3- oder Cy5-dUTP
<u>10x MOPS, pH 7,0</u>	0,2 M 50 mM 10 mM	3-Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat EDTA (pH 8,0)
<u>10X PBS</u>	1,37 M 2,7 mM 100 mM	NaCl KCl Na-Phosphat (pH 7,4)
<u>10x TBE</u>	1,34 M 45 mM 25 mM	Tris(hydroxymethyl)aminoethan Borsäure Na <sub>2</sub> EDTA
<u>10X TE (pH 7,6)</u>	100 mM 10 mM	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA (pH 8,0)
<u>20x SSC, pH 7,0</u>	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat
<u>Acrylamid-Stammlösung</u>	0,1% w/v	lineares Acrylamid in Wasser
<u>Aktivierungslösung</u>	10% v/v 0,45% w/v 90% v/v	Pyridin 1,4-Phenylen-Diisothiocyanat N,N-Dimethyl-formamid
<u>Anti-FI-HRP-Konjugat-Lösung</u>	100 mM 150 mM 0,5% w/v 10% v/v 1% v/v	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl Blockierungs-Reagenz <sup>5</sup> Ziegen-Serum Anti-FI-HRP-Konjugat <sup>5</sup>
<u>Blockierungslösung</u>	1% w/v 100 mM 10 mM 0,5% v/v	BSA NaCl Natriumcitrat SDS

<sup>5</sup> MICROMAX TSA Labeling und Detection Kit

<b>Bezeichnung</b>	<b>Molarität bzw. prozentualer Anteil / Komponente</b>	
<u>Deaktivierungslösung</u>	1,74% w/v 93% v/v 69 mM	Succinyl-Anhydrid 1-Methyl-2-Pyrrolidinon Na-Borat (pH 8,0)
<u>DEPC-Wasser:</u>	0,02% v/v	DEPC, 2 Std. bei 37°C inkubieren, 2x autoklavieren
<u>dNTP-Mix, 1 mM</u>	jeweils mM	1 dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<u>dNTP-Mix, 4 mM</u>	jeweils mM	4 dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<u>Eberwine-Zweitstrang-Puffer</u>	200 mM 900 mM 46 mM 1,5 mM 100 mM	Tris, pH 6,9 KCl MgCl <sub>2</sub> Nicotinadenin-Dinukleotid Ammoniumsulfat
<u>Gelladepuffer</u>	5 M 10% w/v 10% w/v 0,5% w/v 0,05% w/v 0,05% w/v 20% v/v	Harnstoff Saccharose Ficoll SDS Xylencyanol Bromphenolblau Glyzerin
<u>Hybridisierungspuffer A (HybA)</u>	50% v/v 900 mM 90 mM 10% v/v 0,5% v/v 1% v/v	Formamid NaCl Natriumcitrat 50X Denhardt's SDS NEPR-Lösung
<u>Hybridisierungspuffer B (HybB)</u>	900 mM 90 mM 10% v/v 0,5% v/v 1% v/v	NaCl Natriumcitrat 50X Denhardt's SDS NEPR-Lösung
<u>Hybridisierungspuffer C (HybC)</u>	10% v/v 7% v/v 1% v/v	SDS PEG 8000 NEPR-Lösung
<u>Hybridisierungspuffer D (HybD)</u>	450 mM 45 mM 1% v/v	NaCl Natriumcitrat NEPR-Lösung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Molarität bzw. prozentualer Anteil / Komponente</b>	
<u>LB-Ampicillin-Medium</u>	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1 % (w/v) 0,1% v/v	Trypton Hefeextrakt NaCl Ampicillin
<u>Mix B</u>	je 0,33 mM	dATP, dCTP, dGTP
<u>Monoreaktive-Farbstoff-DMSO-Lösung</u>	5 mM	Cy3- oder Cy5-monoreaktiver Farbstoff in 45 µl DMSO
<u>mRNS-Spike</u>	1% v/v 0,1% v/v 0,01% v/v	A. Thaliana mRNS (cab), (10 ng/µl) <sup>6</sup> A. Thaliana mRNS (rca), (10 ng/µl) <sup>6</sup> A. Thaliana mRNS (rbcl), (10 ng/µl) <sup>6</sup>
<u>NEPR-Lösung</u>	70% v/v 7,5% v/v 7,5% v/v 7,5% v/v 7,5% v/v	Heringssperma DNS NpP1 (1µg/µl) NpP2R (1µg/µl) NpP1-Rev (1µg/µl) NpP2R-Rev (1µg/µl)
<u>Niedrig(dT)-dNTP-Mix</u>	je 4 mM 3 mM	dATP, dCTP, dGTP dTTP
<u>Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol – basisch</u>	6,5% v/v	Tris, pH 9 in Phenol Chloroform:Isoamyl 25:24:1
<u>Stopp-Lösung 1</u>	100 mM 1 mM	NaOH EDTA (pH 8,0)
<u>Stopp-Lösung 2</u>	1 M 2 mM	NaOH EDTA (pH 8,0)
<u>Streptavidin -HRP-Konjugat-Lösung</u>	100 mM 150 mM 0,5% w/v 10% v/v 1% v/v	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl Blockierungs-Reagenz <sup>7</sup> Ziegen-Serum Streptavidin-HRP-Konjugat <sup>7</sup>
<u>TN-Puffer</u>	100 mM 150 mM	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl
<u>TNB-Lösung</u>	100 mM 150 mM 0,5% w/v	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl Blockierungs-Reagenz <sup>7</sup>
<u>TNB 10% Ziegen IgG</u>	100 mM 150 mM 0,5% w/v 10% v/v	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl Blockierungs-Reagenz <sup>7</sup> Ziegen-Serum

<sup>6</sup> Spot-Report Array Validation Kit

<sup>7</sup> MICROMAX TSA Labeling und Detection Kit

<b>Bezeichnung</b>	<b>Molarität bzw. prozentualer Anteil / Komponente</b>	
<u>TNT-Puffer</u>	100 mM 150 mM 0,05% v/v	Tris-HCl (pH 7,6) NaCl Tween-20
<u>Trehalose-Stammlösung</u>	1,7 M	Trehalose in DEPC
<u>Wachlösung 1</u>	75 mM 7,5 mM 0,01% v/v	NaCl Natriumcitrat SDS
<u>Waschlösung 2</u>	9 mM 0,9 mM	NaCl Natriumcitrat
<u>Waschlösung I</u>	150 mM 15 mM 0,03% v/v	NaCl Natriumcitrat SDS
<u>Waschlösung II</u>	30 mM 3 mM	NaCl Natriumcitrat
<u>Zweitstrang-Puffer</u>	200 mM 900 mM 46 mM 1,5 mM 100 mM	Tris KCl MgCl <sub>2</sub> Nicotin-Adenin Dinukleotid Ammoniumsulfat

### 3.7 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den angegebenen Herstellern bezogen.

Tabelle 3.13: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien und Bezugsquelle

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
12er Strips	Perkin Elmer	N 801-0534
96er PCR-Platten	Perkin Elmer	N 801-05060
96er U-Bodenplatten	Roth	9291.1
96er V-Bodenplatten	Roth	9292.1
AutoSeq G-50	Amersham Pharmacia	27-5340-01
BlueCap Röhrchen (15 ml)	Greiner	188261
BlueCap Röhrchen (50 ml)	Greiner	227270
ChromaSpin TE30	Clontech	K 1321-2
Einsätze für Glaskammern	Roth	H 552.1
GAPS-Coated Slides	Corning Costar	2549
Glaskammer (250 ml)	Roth	H 554.1
InSitu-PCR Glass Slides	Perkin Elmer	N 804-0502
Klebefolie	Greiner	676001
Microcon YM-100	Millipore	42412
Microcon YM-30	Millipore	42409
Phase-Lock-Gel Tubes	Eppendorf	0032 005.004
Poly-L-Lysin Slides	Sigma	P 0425
RNA 6000 LabChip Kit	Agilent Technologies	5065-4476

## 3.8 EDV-Programme

Die folgenden EDV-Programme mit jeweiliger Versions-Nummer wurden verwendet.

Tabelle 3.14: Verwendete EDV-Programme, Version und Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer A.02.01	Agilent Technologies
Cluster 2.11	Mike Eisen, Stanford
IP-Lab Spectrum 3.2	Scanalytics
Mac OS 9	Apple
Matlab 5.3	MathWorks
MicroArray Suite 1.3	Scanalytics
Microsoft Office 98 dt	Microsoft
Perl 5.0	Perl.com
Photoshop 6	Adobe
Primer3 v0.2	Whitehead Institute
TreeView 1.50	Mike Eisen, Stanford

## 3.9 Geräte

Die folgenden Gerätschaften von den jeweiligen Herstellern kamen zum Einsatz.

Tabelle 3.15: Genutzte Geräte und Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
418 Arrayscanner	Affymetrix
428 Arrayscanner	Affymetrix
96-Pin-Replikator	Nunc
AgaGel Maxi	Biometra
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Biofuge Stratos	Heraeus
Exsikkator	Roth
Fotodokumentation	Mitsubishi
G24 Environmental Inkubator Shaker	New Brunswick
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer
Hybridisierungskammern	MPI-Werkstatt
Laserscanner	Beecher Instruments
Netzgerät Pherostab 0652	Biotech Fisher
PCR-Maschine PTC-225	MJ-Research
Roboter zum Transfer von DNS	Beecher Instruments
Rotor für Biofuge Stratos # 3084	Heraeus
Rotor für Zentrifuge 5810 R A-4-62	Eppendorf
Transilluminator	UVP, Inc.
Trockenschrank	Memmert
Trockenschrank EU 53	Jouan
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf