

2 Material

2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Feststoffe und Lösungen wurden – sofern nicht anders angegeben - in analysenreiner Qualität von den Firmen Merck, Pharmacia und Sigma bezogen.

Entkalkungslösung	1 l dest. Wasser, 85 ml 25-32% HCL, 70 ml 85% Ameisensäure, 70 g AlCl x 6 H ₂ O mischen
IHC-Waschpuffer (TBS)	0.9 g Tris-Base, 6.85 g Tris-HCL, 10.5 g NaCl auf einen Liter aufgefüllt
PBS-Puffer	130 mM NaCl, 10 mM Natrium-Phosphatpuffer (14.6 g Na ₂ HPO ₄ pro Liter) pH 7.4
PBS/BSA/MS	PBS-Puffer mit 3% BSA (w/v) und 3% Mausserum, wurde für Immunhistochemie verwendet
4% PFA/PBS	2 g Paraformaldehyd werden in 50 ml PBS bei 50°C so lange gerührt, bis sich eine klare Lösung bildet und mit 1 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt
20 x SSPE	174 g NaCl, 27.6 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O und 7.4 g EDTA auf einen Liter Aqua dest., pH Wert mit 10N NaOH auf 7.4 einstellen
0.01 M Zitratpuffer	2.1 g Zitrat auf einen Liter Aqua dest., mit 2 m NaOH auf pH 6 einstellen

2.1.1 Lösung für die Fuchsinfärbung

Entwicklungs- (E-)Puffer	8.7 g NaCl, 1.5 g Tris HCl, 4.9 g Tris Base auf einen Liter Aqua dest., pH mit 1N NaOH auf 9.75 eingestellt
Levamisol	20 mg Levamisol in 500 µl Aqua dest. lösen
Naphtol-Lösung	12.5 mg Naphtol-AS-Biphosphat in 150 µl Dimethylformamid lösen (immer frisch ansetzen)
Natriumnitrit-Lösung	12 mg NaNO ₂ in 250µl Aqua dest. lösen (immer frisch ansetzen)
Neufuchsin	5 g Neufuchsin in 100 ml 2 N HCl lösen (bei 4°C im Dunklen aufbewahren)
Propandiol	21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol auf einen Liter Aqua dest. (bei 4° C aufbewahren)
5 ml Färbelösung	25 µl NaNO ₂ Lösung und 10 µl Fuchsin-Lösung mischen, eine Minute schütteln und in eine Mischung aus 3.5 ml E-Puffer, 1.25 ml Propandiol und 50 µl Levamisol geben; 30 µl Naphtol-Lösung zugeben und mit ca. 100 µl 2 N HCl den pH –Wert auf 8.8 einstellen

2.2 Antikörper und Antiseren

Antikörper	Spezies	eingesetzte Konzentration	Vorbehandlung	Hersteller
<u>Primärantikörper*:</u>				
α m TGF β_1	Huhn polyklonal	257 μ g/ml	Mikrowelle	R+D-Systems
α m IL-1 β	Kaninchen polyklonal	776 μ g/ml	keine	Endogen
α m IL-6	Maus Klon 32C11	20 μ g/ml	Mikrowelle	DRFZ Eigenproduktion
α m IL-10	Maus Klon SXC2	20 μ g/ml	Mikrowelle	DRFZ Eigenproduktion
α h IGF I	Kaninchen polyklonal	405 μ g/ml	keine	TEBU
α m IL-4	Maus Klon IIBII	211 μ g/ml	Pronase	DRFZ Eigenproduktion
<u>Sekundärantikörper:</u>				
α Dig-FITC	Schaf Fab Fragment	1:200		Roche
<u>Tertiärantikörper:</u>				
α FITC-AP	Schaf Fab Fragment	1:200		Roche

*Primärantikörper alle mit Digoxigenin markiert

2.3 STR/ort Mäuse

Es standen 38 STR/ort Mäuse zur Verfügung. Die ersten Mäuse wurden von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln Germany bezogen.