

2 Material

2.1 Geräte

Im Nachfolgenden sind die standardmäßig verwendeten Laborgeräte aufgelistet.

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Begasungsbrutschrank Modell INC153	Memmert GmbH & Co. KG
BioPhotometer Plus	Eppendorf AG
CD-Spektrometer Jasco J-710 CD S	Jasco Inc
Chemie-Pumpstand	VACUUBRAND GmbH & Co. KG
Chromatographiesäule Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences
CO ₂ -Inkubatoren	Binder GmbH
Entwicklermaschine CAWOMAT 2000 IR	CAWO Photochemisches Werk GmbH
Flüssigchromatographieanlage ÄKTApurifier	GE Healthcare Life Sciences
Forma Orbital Shaker Model 420 Series	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank (-20°C) Liebherr Premium BioFresh	Liebherr GmbH
Gefrierschrank (-80°C) FORMA 900S-RIFS	Thermo Fisher Scientific
Gel-Dokumentations-System E-Box VX2	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co. KG
Heizplatte	Gesellschaft für Labortechnik mbH
inverses Epifluoreszenzmikroskop Olympus-CKX41	Olympus Europa SE & Co. KG
Kühlschrank Liebherr Comfort	Liebherr GmbH
Kühlschrank Liebherr Medline	Liebherr GmbH
Labor-pH/mV/°C-Meter mit Mikroprozessor	HANNA Instruments Deutschland GmbH
Laserscanning Mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems GmbH

Magnetrührer Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Magnetrührer HI 180	HANNA Instruments Deutschland GmbH
Manuelle Pipetten Pipetman P, Neo (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson International B.V.
Mikroliterrotor 24x2 ml und PCR-Rotor	Thermo Electron Corporation
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss
Mikrowelle 800 Watt	SEVERIN Elektrogeräte GmbH
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	Labnet International Inc.
Multipipette Plus	Eppendorf AG
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Orbital-Schüttler POS-300	Grant Instruments Ltd.
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer Mini-Protean Tetra Cell	BioRad Laboratories GmbH
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH
Rotator PTR-30	Grant Instruments Ltd.
Schüttler ST5	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
SDS-Gelgießkammer	BioRad Laboratories GmbH
Sicherheitswerkbank NuAire NU-437-400E	INTEGRA Biosciences GmbH
Sicherheitswerkbänke HERAsafe	Thermo Fisher Scientific
Spannungsgerät Pegpower 300	Peqlab Biotechnologie GmbH
Spannungsgerät PowerPac Basic	BioRad Laboratories GmbH
Sterilbank UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermoblock	Eppendorf AG
Thermocycler TProfessional standard gradient 96	Biometra GmbH
Thermodrucker DPU-414	Seiko Instruments Inc.
Thermodrucker P95D	Mitsubishi Chemical Europe GmbH

Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
ThermoMixer MHR 11	HLC BioTech
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2200	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Ultraschallhomogenisator Sonopuls mini20	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AZ 02	HLC BioTech
Vortexer PV-1	Grant Instruments Ltd.
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad 1002-1013	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zentrifuge 5417 C/R	Eppendorf AG
Zentrifuge Allegra X-22	Beckman Coulter GmbH
Zentrifuge ROTINA 380/380 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

2.2 Verbrauchsmaterialien

Nachfolgend sind die standardgemäß verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-Well Zellkultur-Platten	SARSTEDT AG & Co.
8-Well Glasboden-Platten (170 µm)	Ibidi GmbH
96-Well Rundboden-Platten	SARSTEDT AG & Co.
Bechergläser (50 ml)	VWR International GmbH
Erlenmeyerkolben (25 ml, 50 ml)	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH
Erlenmeyerkolben (250 ml, 500 ml)	DURAN Group GmbH
Filter-Aufsatz (250 ml)	TPP Techno Plastic Products AG
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	SARSTEDT AG & Co.
PCR-Tubes	BioRad Laboratories GmbH
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	SARSTEDT AG & Co.

Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl)	SARSTEDT AG & Co.
Pipettenspitzen (1000 µl)	Ratiolab GmbH
PVDF-Membran 0,2 µm	Karl Roth GmbH & Co. KG
Schraubverschluss-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co.
T75 Zellkultur-Flaschen	SARSTEDT AG & Co.

2.3 Chemikalien

Im Folgenden sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose, low EEO	Applichem GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Applichem GmbH
Bromphenolblau	Applichem GmbH
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem GmbH
Coomassie Brilliant blue G-250	Applichem GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Applichem GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Applichem GmbH
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific
dNTPs	New England Biolabs GmbH
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Applichem GmbH
Ethanol (absolut)	VWR Prolabo
Ethanol (vergällt)	Applichem GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem GmbH
GelRed	GeneOn GmbH
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare Life Sciences
Glycerol	Applichem GmbH
Glycin	Applichem GmbH
HDGreen Plus	Intas Science Imaging Instruments GmbH

High Fidelity ^{PLUS} Reaction Buffer (5x)	Roche Diagnostics GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Applichem GmbH
Lipofectamine 2000	Invitrogen AG
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Applichem GmbH
Milchpulver	Applichem GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Karl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Karl Roth GmbH & Co. KG
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Applichem GmbH
NEBuffer 4	New England Biolabs GmbH
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem GmbH
Salzsäure (HCl)	Applichem GmbH
β-Mercaptoethanol	Applichem GmbH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem GmbH
ZnSO ₄	Applichem GmbH

2.4 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Folgenden aufgeführt. Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockierlösung	TBS-T 5 % Milchpulver (w/v)
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,01 % SDS (w/v) 20 % Methanol (v/v)

CD-Puffer	20 mM NaH_2PO_4 20 mM Na_2SO_4 10 μM ZnSO_4
Cleavage-Puffer	1 mM DTT 1 mM EDTA 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7,5
Coomassie-Entfärber	10 % Essigsäure 40 % Ethanol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant blue G-250 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Ethanol
Gelfiltrationspuffer	2 mM β -Mercaptoethanol PBS
LB (Luria-Bertani) -Agar	LB-Medium 15 g/l Agar
LB (Luria-Bertani) -Medium	10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt pH 7,5
Lysepuffer	1 mM DTT 150 mM NaCl 1 mM PMSF 50 mM Tris-HCl pH 7,5
PBS	2,7 mM KCl 2 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (v/v) Np-40 1 % (v/v) Natrium-deoxycholat 1 mM DTT 1 × Protease-Inhibitor Cocktail 1 mM PMSF
Sammelgel-Puffer	0,2 % SDS 125 mM Tris-HCl
SDS-Laufpuffer (1 x)	192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM Tris
SDS-Probenpuffer (5 x)	5 mM EDTA 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 15 % (w/v) SDS 60 mM Tris-HCl
TAE-Puffer	1 mM EDTA 40 mM Tris-Acetate
TBS	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
TBS-T	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20 (v/v)
Trenngel-Puffer	0,2 % SDS (w/v) 375 mM Tris

2.5 Antibiotika

Die Antibiotika wurden den Kultivierungsmedien für Bakterien in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Tabelle 5: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Konzentration
Ampicillin	Applichem GmbH	100 µg/ml
Carbenicillin	Applichem GmbH	100 µg/ml
Kanamycin	Applichem GmbH	50 µg/ml

2.6 Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*) XL2-Blue™ wurden zur Vervielfältigung von Plasmiden verwendet. *E. coli* SoluBL21™ wurden für die heterologe Proteinexpression eingesetzt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C in LB-Medium bzw. auf LB-Agar-Platten der Firma Applichem. Das LB-Medium bzw. das LB-Agar wurden gemäß Tabelle 5 mit Antibiotika versetzt.

Tabelle 6: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> XL2-Blue™	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac [F0 proAB lacqZ_M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
<i>E. coli</i> SoluBL21™	F- ompT hsd S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Genlantis

2.7 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind im Folgenden aufgelistet. Alle verwendeten Zelllinien weisen ein adhärentes Wachstumsverhalten auf.

Tabelle 7: Zelllinien

Zelllinie	Gewebe/Organismus/Charakteristika	ATCC-Nummer
293T	embryonales Nierengewebe, <i>Homo sapiens</i>	CRL-11268
HeLa	Zervix-Adenokarzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-2

2.8 Nährmedien und Medienzusätze

Die Nährmedien und Medienzusätze, die zur Kultivierung eukaryotischer Zellen verwendet wurden, sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8: Nährmedien und Medienzusätze

Nährmedium/Medienzusatz	Inhaltsstoffe/Beschreibung	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic	10000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin sulfate, 25 µg/ml Amphotericin B	Life Technologies
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotic-Antimycotic	Life Technologies
FCS	fötales Kälberserum, Medienzusatz	Life Technologies
FRET-Medium	HBSS + 10 % FCS + 10 mM HEPES + 2 mM L-Glutamin + 1 mM MgCl ₂ + 1 mM CaCl ₂ + 10 mM Natriumlactat + 10 µl/ml OxiRace	
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution, Einsatz bei FRET-Experimenten	PAN-Biotech GmbH
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Medienzusatz	Life Technologies

L-Glutamin	Aminosäure, Medienzusatz	Life Technologies
OptiMEM	Modifikation von MEM (Eagle) mit reduziertem Serum- und Proteinanteil, Transfektionsmedium	Life Technologies

2.9 Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs- (s. Tabelle 9) und Expressionsvektoren (s. Tabelle 9 und Tabelle 10) aufgelistet.

Tabelle 9: Klonierungsvektoren

Plasmid	Charakteristika	Hersteller
pCDNA3.1(+)	eukaryotischer Expressionsvektor, amp^r , neo^r	Invitrogen/Life Technologies
pET41	prokaryotischer Expressionsvektor, kan^r	Merck Millipore

Tabelle 10: prokaryotische Expressionsvektoren

Plasmid	codiert für	Referenz
pET41-GST-PreSc-Survivin F101A L102A	GST-PreSc-Survivin F101A L102A	Bachelorarbeit Leonel Zebaze
pET41-GST-PreSc-Survivin F93P L96A L98A	GST-PreSc-Survivin F93P L96A L98A	diese Arbeit
pET41-GST-PreSc-Survivin K129A	GST-PreSc-Survivin K129A	diese Arbeit
pET41-GST-PreSc-Survivin K129E	GST-PreSc-Survivin K129E	Bachelorarbeit Leonel Zebaze
pET41-GST-PreSc-Survivin K129Q	GST-PreSc-Survivin K129Q	Bachelorarbeit Leonel Zebaze
pET41-GST-PreSc-	GST-PreSc-Survivin K129R	Bachelorarbeit

Analyse des tumorrelevanten Proteins Survivin
Molekulare Charakterisierung der Dimerisierung
Vallet, C.

2015, XXIII, 100 S. 35 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08540-7