

Fortschritte der Anatomie, Embryologie und Reproduktionsbiologie

Herausgeber

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Henning M. Beier
em. Direktor des Instituts für Anatomie und Reproduktionsbiologie
der RWTH Aachen

Manon Queudeville

**Uteroglobineexpression in präimplantativen
Kaninchenembryonen**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2008

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7545-7

ISSN 1436-8803

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Meinem Großvater,
Antoine Queudeville,
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden.....	4
2.1.	Tierexperimenteller Teil	4
2.1.1	Versuchstiere und ihre Haltung	4
2.1.2	Applizierte Substanzen.....	4
2.1.3	Organentnahme und Aufbereitung für die nachfolgende Analytik	5
2.1.3.1	Aufbereitung der Embryonen	5
2.1.3.2	Aufbereitung der Uteri.....	6
2.2.	Molekularbiologische Methoden	6
2.2.1	Verwendete Chemikalien und Enzyme.....	6
2.2.2	Verwendete Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen.....	7
2.2.3	Uteroglobin	7
2.2.3.1	RNA-Isolierung.....	7
2.2.3.1.1	RNA-Isolierung aus Kaninchenembryonen.....	7
2.2.3.1.2	RNA-Isolierung aus Kaninchenendometrium.....	8
2.2.3.1.3	Gelelektrophorese und Northern Blotting	9
2.2.3.2	PCR zum Nachweis von Uteroglobin-mRNA	10
2.2.3.2.1	cDNA-Synthese	10
2.2.3.2.2	Real Time RT-PCR.....	11
2.2.4	Primer und Plasmide	12
2.2.4.1	Primer	12
2.2.4.2	pUK22-Plasmide	12
2.2.5	Plasmidisolierung und Synthese von Sonden für den Northern Blot und die in situ Hybridisierung	13
2.2.5.1	Klonierung in Vektoren.....	13
2.2.5.2	Transformation von Bakterien.....	14
2.2.5.3	Plasmidisolierung aus Bakterien	15
2.2.5.4	DNA-Aufreinigung	15
2.2.5.5	Restriktionsverdau der pUK22-Plasmide	16

2.2.5.6	Reinigung von linearisierten Uteroglobin-Plasmiden durch Fällungsreaktion und Gelelektrophorese.....	16
2.2.5.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelbanden	17
2.2.5.8	Optische Dichtemessung und Sequenzierung	18
2.2.5.9	In vitro Transkription	19
2.2.6	Northern Blot und Northern Hybridisierungen.....	20
2.2.6.1	Uteroglobin-Northern Blot	20
2.2.6.2	Uteroglobin-Northern Hybridisierung.....	20
2.2.6.3	Detektion der spezifisch gebundenen Digoxigenin-markierten Sonden auf dem Blot	21
2.2.7	In situ Hybridisierungen	22
2.2.7.1	RNA-Färbung.....	22
2.2.7.2	In situ Hybridisierungen an Kaninchenembryonen.....	22
2.2.7.2.1	Detektion mit Anti-Digoxigenin-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat	25
2.2.7.2.2	Detektion mit Anti-Digoxigenin-Fluoreszein	25
2.2.7.2.3	Anzahl der zur in situ Hybridisierung verwendeten Embryonen.....	26
2.2.7.3	In situ Hybridisierungen am Kaninchenendometrium.....	26
2.2.7.3.1	RNase-freie APES-beschichtete Objektträger	26
2.2.7.3.2	Kryoschnitte.....	26
2.2.7.3.3	Serra-fixierte Paraffinschnitte	27
3	Zielsetzung.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1.	Sondenherstellung.....	30
4.2.	RNA-Färbung.....	31
4.3.	In situ Hybridisierung an Kaninchenembryonen.....	32
4.4.	In situ Hybridisierung an Kaninchenendometrium.....	37
4.5.	Uteroglobinnachweis im Kaninchenembryo mittels konventioneller PCR und Northern Blot	38
4.6.	Uteroglobinnachweis im Kaninchenembryo mittels Real Time-PCR.....	41
5	Diskussion.....	45

6	Zusammenfassung / Summary	52
6.1.	Uteroglobineexpression in präimplantativen Kaninchenembryonen	52
6.2.	Uteroglobin expression in preimplantation rabbit embryos	53
7	Literaturverzeichnis	56
8	Anhang.....	62
8.1.	Abbildungsverzeichnis	62
8.2.	Verwendete Chemikalien und Enzyme	63
8.2.1	Allgemeine Chemikalien und Arzneimittel	63
8.2.2	Antikörper, Enzyme, Kits, Hybridisierungspuffer und Agarose	66
8.2.3	Kulturmedien für die Escherichia coli Stämme	68
8.3.	Verwendete technische Geräte.....	68
9	Danksagung	70
10	Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung.....	71
11	Lebenslauf.....	72