

Aus dem
Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Versuche zur Gewinnung muriner monoklonaler
Antikörper zum Tierartennachweis in
Lebensmitteln unter Verwendung verschiedener
Immunisierungs-Antigenaufbereitungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Matthias Buchholz
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2003
Journal-Nr. 2691

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: **Prof. Dr. M. F. G. Schmidt**

Erster Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Dritter Gutachter: Prof. Dr. E. Hellmann

Keywords: Food analysis, spp. Identification, ELISA, monoclonal antibodies, antigens

Tag der Promotion: 7. März 2003

***Für meine Frau
Tina-Christin
und meine Kinder
Lisa-Marleen und Lennart***

INHALTSVERZEICHNIS

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	1
<u>1</u> <u>EINLEITUNG und ZIELSTELLUNG</u>	6
<u>2</u> <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	7
2.1 Grundlagen der Proteinchemie	7
2.1.1 Aufbau, Struktur, Bindungen von Proteinen.....	7
2.1.2 Denaturierung und Veränderung von Proteinstrukturen.....	7
2.1.3 Ausblick auf Epitopveränderungen.....	8
2.2 Grundlagen der Immunologie	9
2.2.1 Bedeutung, Aufbau und Funktionsprinzip des Immunsystems.....	9
2.2.2 Antikörper und Antikörpervielfalt.....	10
2.2.3 Wechselwirkungen von Antikörper und Antigen.....	12
2.2.4 Hybridomatechnologie.....	13
2.3 Immunologische Untersuchungsverfahren	14
2.3.1 Agargel-Präzipitations-Test.....	15
2.3.2 Enzyme-linked-immunosorbent-Assay (ELISA).....	17
2.4 Elektrophoretische Untersuchungsmethoden	19
2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	19
2.4.2 SDS-Elektrophorese.....	20
2.5 Kombinierte Untersuchungsverfahren	21
2.5.1 Immunelektrophorese.....	21
2.5.2 Elektroimmunodiffusion.....	22
2.6 DNA-Analysemethoden	22
2.6.1 PCR-Analyse (Polymerase-Kettenreaktion).....	22
2.6.2 Hybridisierungstechnik (DNA-Sonden).....	23
2.7 Andere Methoden zur Speziesidentifizierung	24
2.7.1 Fettanalyse.....	24
2.7.2 Anserin/Carnosin-Verhältnis.....	24
<u>3</u> <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	25
3.1 Material	26
3.1.1 Ausgangsmaterial zur Herstellung der Impfantigene.....	26
3.1.2 Ausgangsmaterial zur Herstellung der Testantigene.....	26
3.1.3 Kaninchen-Antiseren.....	26
3.1.4 Kommerzieller ELISA-Test.....	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Herstellung der Impfantigene.....	27

3.2.1.1	Antigenaufbereitung 1, Lyophilisat.....	27
3.2.1.2	Antigenaufbereitung 2, nach RAVESTEIN u. DRIEDONKS (1986).....	28
3.2.1.3	Antigenaufbereitung 3, nach HITCHCOCK et al. (1981).....	28
3.2.1.4	Antigenaufbereitung 4, Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration	29
3.2.1.5	Überprüfung der Proteinkonzentrate auf ihre Eignung zur Immunisierung	30
3.2.1.5.1	Prinzip.....	30
3.2.1.5.2	Ausrüstung, Puffer und Reagenzien.....	30
3.2.1.5.3	Durchführung.....	32
3.2.1.5.4	Auswertung.....	33
3.2.2	Antigenherstellung zur Spezifitätsüberprüfung gewonnener Antikörper.....	33
3.2.3	Immunisierung.....	33
3.2.3.1	Immunisierung mit den Antigenen 1 bis 3.....	33
3.2.3.2	Immunisierung mit Antigen 4	34
3.2.4	Zellkultivierung und Zellfusion	34
3.2.4.1	Prinzip.....	34
3.2.4.2	Ausrüstung, Puffer und Reagenzien.....	34
3.2.4.3	Gewinnung von Abdominalmakrophagen.....	36
3.2.4.4	Gewinnung der Milz-Lymphozyten.....	36
3.2.4.5	Durchführung der Zellfusion.....	36
3.2.5	ELISA zum Nachweis von Antikörpern im Mediumüberstand	37
3.2.5.1	Ausrüstung, Puffer und Reagenzien.....	37
3.2.5.2	Beschichtung der ELISA-Platten.....	37
3.2.5.3	Durchführung des ELISA.....	38
3.2.5.4	Auswertung.....	38
3.2.6	Subklonierung	39
3.2.7	Gewinnung monoklonaler Antikörper aus dem Medium durch Affinitätschromatographie.....	39
3.2.7.1	Prinzip.....	39
3.2.7.2	Ausrüstung, Puffer und Reagenzien.....	39
3.2.7.3	Durchführung.....	40
3.2.7.4	Überprüfung der Eluate auf monoklonale Antikörper im ELISA.....	41
3.2.7.5	Auswertung.....	41
3.2.8	Tests mit dem gereinigten monoklonalen Antikörper mit verschiedenen Antigenaufbereitungen im ELISA.....	41
3.2.9	Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting auf Nitrocellulosemembran	41
3.2.9.1	Prinzip.....	42

3.2.9.2	Ausrüstung, Puffer und Reagenzien.....	42
3.2.9.3	Durchführung.....	43
3.2.9.4	Indian Ink-Färbung	44
3.2.9.5	Immunfärbung	44
3.2.9.6	Auswertung.....	45
3.2.10	Kommerzieller ELISA-Test.....	46
3.2.10.1	Prinzip.....	46
3.2.10.2	Durchführung.....	46
3.2.10.3	Auswertung.....	46
3.3	Untersuchungsergebnisse.....	47
3.3.1.	Antikörnernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 1 (s. 3.2.1.1) stimulierten Lymphozyten.....	47
3.3.1.1	Antigen 1 vom Schwein	47
3.3.1.2	Antigen 1 vom Rind	50
3.3.2	Antikörnernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 2 (s.3.2.1.2) stimulierten Lymphozyten.....	51
3.3.2.1	Antigen 2 vom Schwein	51
3.3.2.2	Antigen 2 vom Rind	54
3.3.3	Antikörnernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 3 (s. 3.2.1.3) stimulierten Lymphozyten.....	56
3.3.3.1	Antigen 3 vom Schwein	56
3.3.4	Antikörnernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) stimulierten Lymphozyten.....	58
3.3.4.1	Untersuchung der Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration im ELISA mit gegen Rind und Schwein gerichteten Antiseren vom Kaninchen	58
3.3.4.2	Antigen 4 vom Schwein (MG 2. Proteinkonzentrat 100 - 300 kDa).....	62
3.3.4.3	Antigen 4 vom Rind (1. und 2. Proteinkonzentrat)	66
3.3.5	Untersuchungen mit einem gegen die Antigenaufbereitung 1 vom Schwein spezifisch reagierenden monoklonalen Antikörper	71
3.3.5.1	Ergebnisse der Eluatuntersuchung aus der Affinitätschromatographie.....	72
3.3.5.2	Ergebnisse der ELISA bei Beschichtung mit verschiedenen Antigenaufbereitungen.....	73
3.3.6	Ergebnisse der vertikalen SDS-PAGE	76
3.3.6.1	Bestimmung der Proteinbandenmuster der Antigenaufbereitung 1 von Rind bzw. Schwein und dieser Lyophilisatextrakte nach zusätzlicher Temperatur- einwirkung.....	76

3.3.6.2	Nachweis eines spezifischen Antigens und Bestimmung seines Molekulargewichts aus der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein	78
3.3.6.3	Überprüfung des Trennungsergebnisses nach Ultrafiltration der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4).....	80
3.3.7	Kommerzieller ELISA – Test zur Identifizierung von Rind und Schwein	81
3.3.7.1	Ergebnisse der Untersuchungen mit den Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration	82
3.3.7.2	Ergebnisse der Untersuchungen mit den Testantigenen von Rind, Schwein, Wildschwein, Schaf und Pute	83
4	<u>DISKUSSION</u>	86
4.1	Antigenaufbereitungen	86
4.1.1	Vergleich der vier Antigenaufbereitungen.....	87
4.1.2	Brauchbarkeit monoklonaler Antikörper im Vergleich zu konventionellen Antiseren	91
4.2	Kommerzieller ELISA	92
4.3	Weitere Untersuchungsverfahren zum Tierartennachweis in Lebensmitteln – Bedeutung und Ausblick	93
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	96
6	<u>SUMMARY</u>	98
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	100
8	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AcTP	Aceton-Trocken-Pulver
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Bic.-Extr.	Bicarbonat-Extrakt
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	Beziehungsweise
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EU	Europäische Union
Fc-Wert	Äquivalent der bei einer gegebenen Temperatur auf Sporen oder vegetative Zellen eines Referenzkeimes insgesamt letal einwirkenden Hitzeenergie in Minuten bezogen auf den geometrischen Mittelpunkt eines Lebensmittels
g	Gramm
g	Gravitas
h	Stunde
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
i.d.R.	In der Regel
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampère
mAk	Monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
N	Normal
nm	Nanometer
PAGIF	Polyacrylamidgel isoelektrische Fokussierung
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline mit Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH-Wert	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
ppm	Parts per million
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TMB	Tetramethylbenzidin
V	Volt
W	Watt
z. T.	Zum Teil

DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Sinell ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine Anregungen und seine jederzeit gewährte Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche und bei der Abfassung der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich den Mitarbeitern im Institut für Lebensmittelhygiene für ihre Anregungen und die erwiesene Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung meiner Arbeit danken.

Außerdem gilt mein großer Dank auch meiner Frau, ihrer ständigen Unterstützung und ihren Aufmunterungen, sowie meinen Kindern, für die ich beim Anfertigen dieser Arbeit oft nicht genügend Zeit hatte.

LEBENS LAUF

- 23.12.1961 geboren in Berlin-Tempelhof
Eltern: Georg Buchholz, Pfarrer, und Ingrid Buchholz,
geb. Gutsche, Religionslehrerin
- 1968 – 1974 Besuch der Grundschule in Berlin-Lichtenrade
- 1974 – 1980 Besuch des Eckener-Gymnasiums in Berlin-Mariendorf
- 1981 – 1987 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität
Berlin
- September 1987 Approbation als Tierarzt
- 1988 Freier Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelhygiene des
Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität
Berlin
- Seit Dezember 1988 Tierärztlicher Referent im Veterinär- und Lebensmittel-
aufsichtsamt im Bezirk Tempelhof-Schöneberg von Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 19. Dezember 2002

Matthias Buchholz