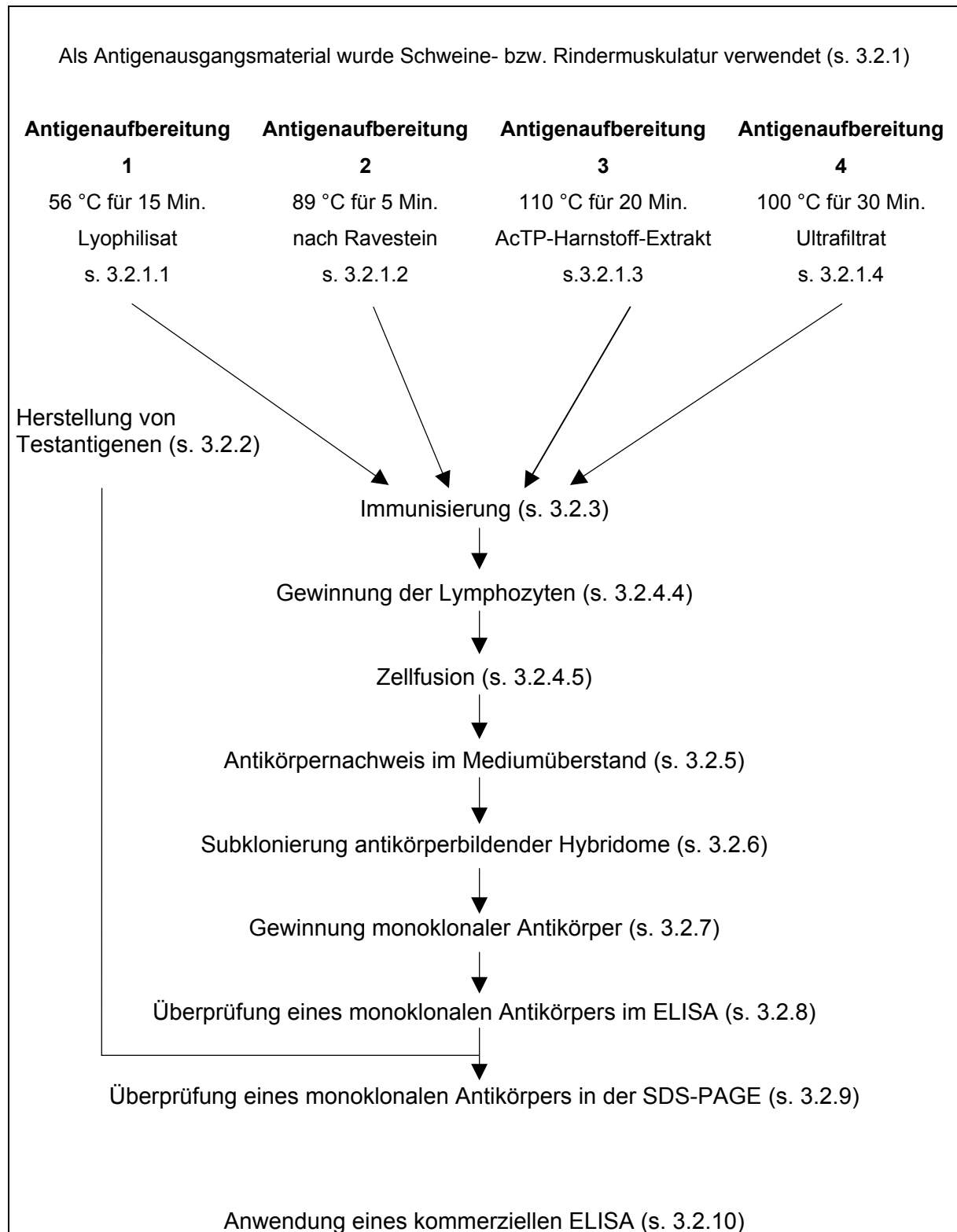


3 EIGENE UNTERSUCHUNGENÜbersicht über die durchgeführten Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Ausgangsmaterial zur Herstellung der Impfantigene

Für die Herstellung der Impfantigene wurde Skelettmuskulatur von Rind (Rouladenfleisch) und Schwein (Schnitzfleisch) verwendet. Die Muskulatur wurde vor ihrer weiteren Verarbeitung von anhaftendem Fett- und Bindegewebe weitgehend befreit und in einer Moulinette Typ 32002 zerkleinert.

3.1.2 Ausgangsmaterial zur Herstellung der Testantigene

Für die Überprüfung der Spezifität von monoklonalen Antikörpern wurden neben den homologen Antigenen wie unter 3.1.1 beschrieben auch Antigene aus der Muskulatur von Wildschwein (Keule), Schaf (Keule) und Pute (Brustfilet) hergestellt.

3.1.3 Kaninchen-Antiseren

Die ultrafiltrierten Proteinkonzentrate aus der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) wurden im ELISA auf ihre Eignung zur Immunisierung der Mäuse überprüft. Dazu wurden folgende aus früheren Versuchen bereits vorhandene institutseigene polyklonale Kaninchen-Antiseren eingesetzt. Diese Kaninchen-Antiseren waren unter Verwendung unterschiedlich erhitzter und extrahierter Immunisierungsantigene gewonnen worden.

Anti-Rind:

- 1) Anti-Rind 65 °C und 70 °C Muskulatur (Harnstoff-Extraktion) Pool 83X-1A + 83-11
- 2) Anti-Rind 100 °C Muskulatur (RAVESTEIN-Modus) 86-4
- 3) Anti-Rind 70 °C Muskulatur (Harnstoff-Extraktion) 6X-40
- 4) Anti-Rind 70 °C Muskulatur (Harnstoff-Extraktion) 7-32
- 5) Anti-Rind 70 °C Muskulatur (Harnstoff-Extraktion) 6X-23

Anti-Schwein:

- 1) Anti-Schwein 100 °C Muskulatur (RAVESTEIN-Modus) 86X-2
- 2) Anti-Schwein 55-70 °C Muskulatur 193
- 3) Anti-Schwein 70 °C Muskulatur (Harnstoff-Extraktion) Pool II 78-27 + 79-15
- 4) Anti-Schwein 100 °C Muskulatur (RAVESTEIN-Modus) 86X-3

3.1.4 Kommerzieller ELISA-Test

Zusätzlich kam ein kommerzieller Test zur Speziesidentifizierung der Fa. Transia GmbH, Art.Nr.: CO 65021 gegen Rind und CO 65022 gegen Schwein zur Anwendung. Es wurden sowohl die Spezifität des Testkits als auch die Spezifität der selbst hergestellten Impfantigene untersucht.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Impfantigene

In der Literatur sind zahlreiche mehr oder weniger erfolgversprechende Varianten zur Impfantigenherstellung beschrieben worden. Aufgrund der geringen Kenntnisse über speziesspezifische und hitzestabile Antigene in Extrakten aus erhitztem Fleisch wurden vier verschiedene Aufbereitungsarten zur Antigenherstellung verwendet und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt.

Die ersten drei Antigenaufbereitungsarten, deren Gesamtextrakt zur Immunisierung verwendet wurde, lehnten sich an in der Literatur beschriebene Methoden an. Sie unterschieden sich in der Erhitzungsstärke und dem Extraktionsverfahren.

Die vierte Antigenaufbereitungsart wurde selbst entwickelt. Sie unterschied sich in der thermischen Belastung des Fleisches, dem Extraktionsverfahren und darüber hinaus durch die Ultrafiltration des Extraktes. So wurden Konzentrate mit Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte gewonnen.

3.2.1.1 Antigenaufbereitung 1, Lyophilisat

200 g zerkleinerter Muskulatur von Rind bzw. Schwein (s. 3.1.1) wurden in ein Becherglas überführt, gut angedrückt und mit Aluminiumfolie abgedeckt. In einem 57 °C heißen Wasserbad wurde die zerkleinerte Muskulatur auf eine Kerntemperatur von 56 °C für eine Dauer von 15 Minuten erhitzt. Der ausgetretene Fleischsaft wurde untergerührt. Anschließend wurde das erhitzte Material abgekühlt und lyophilisiert.

Der Antigenextrakt wurde wie folgt hergestellt: 500 mg Lyophilisat wurden in 5 ml steriler, physiologischer Natriumchlorid¹-Lösung aufgenommen, auf dem Whirlmix (Fa. Cenco) gut durchmischt und über Nacht (18 Stunden) bei 4 °C im Kühlschrank extrahiert. Es folgten eine 20minütige Zentrifugation bei ca. 12.000 g in der Kühlzentrifuge² bei 4 °C und Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 595 1/2).

¹ Merck, Art.-Nr. 6404

² Sorvall RC-58, Du Pont Instr.

Der Eiweißgehalt wurde mit der Biuret-Methode bestimmt (Amtliche Sammlung für Untersuchungsverfahren § 35 LMBG, L 06.00-23 1986).

3.2.1.2 Antigenaufbereitung 2, nach RAVESTEIN u. DRIEDONKS (1986)

Die Antigen 2-Gewinnung erfolgte in Anlehnung an die Methode nach RAVESTEIN u. DRIEDONKS (1986).

Als Extraktionsmittel wurde folgender PBS-Puffer pH 7,2 verwendet:

<u>- PBS-Puffer pH 7,2:</u>	NaCl	3,50650 g
	KH ₂ PO ₄ ¹	0,20413 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O ²	0,88995 g
	Na-Dodecylsulfat ³	3,75 g
	Aqua dest.	ad 500 ml

5 g zerkleinerte Muskulatur wurden in 10 ml PBS-Puffer in einem V4A-Stahl-Zentrifugenbecher suspendiert, auf dem Whirlmix gut durchmischt und anschließend für 5 Minuten im 100 °C Wasserbad erhitzt. Dabei wurde im Kern eine Temperatur von 89,2 °C erreicht. Nach 15minütigem Abkühlen im Wasserbad bei Raumtemperatur erfolgten eine 20minütige Zentrifugation bei ca. 12.000 g und Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 595 1/2). Der Eiweißgehalt wurde mit der Biuret-Methode (s. 3.2.1.1) bestimmt.

3.2.1.3 Antigenaufbereitung 3, nach HITCHCOCK et al. (1981)

Zur Herstellung dieser Antigene wurden 50 g zerkleinerter Muskulatur von Rind bzw. Schwein (s. 3.1.1) in einem Becherglas für 15 Minuten Haltezeit in einem Autoklaven auf 110 °C erhitzt.

Daraus erfolgte die Herstellung eines Aceton-Trocken-Pulvers wie folgt:

1. 10 g der erhitzten Muskulatur wurden in eine 250 ml Steilbrustflasche eingewogen, mit 100 ml eines Chloroform⁴/Methanol⁵-Gemisches (2:1 Volumenverhältnis) versetzt und für ca. 30 Sekunden gemischt. Anschließend erfolgte die Filtration über eine Nutsche mit Rundfilter (Schleicher & Schüll 1505 Ref.No. 301207) und Wasserstrahlpumpe.
2. Der Rückstand wurde vom Filter wieder in die Steilbrustflasche überführt und Schritt 1 zweimal wiederholt.

¹ Merck, Art.-Nr.: 4870

² Merck, Art.-Nr.: 6580

³ Merck, Art.-Nr.: 3976820

⁴ Merck, Art.-Nr.: 2445

⁵ Merck, Art.-Nr.: 6009

3. Der Rückstand wurde nun mit 100 ml HCl/Ethanol (500 ml 80 % Ethanol¹ mit einem Tropfen konz. HCl² versetzt) gemischt, wie oben beschrieben filtriert und dieser Schritt zweimal wiederholt.
4. Der Rückstand wurde dann mit 100 ml Aceton gemischt, filtriert und dieser Schritt zweimal wiederholt.
5. Nach der letzten Filtration wurde der Rückstand vom Filter in ein gewogenes Becherglas überführt, gewogen und die Ausbeute berechnet.

Anschließend erfolgte die Proteinextraktion des Aceton-Trocken-Pulvers mit Harnstoff analog der Sojaweißeextraktion nach HITCHCOCK et al. (1981). Dazu wurden folgende Substanzen nacheinander in ein graduiertes, mit Kunststoffstopfen versehenes 10 ml Reagenzglas gegeben:

- 150 mg Aceton-Trocken-Pulver von erhitzter Rinder- bzw. Schweinemuskulatur
 - 2 ml Tris/HCl-Puffer pH 8,6
 - 6,0 g Harnstoff³
 - 2 ml Aqua dest.
 - 200 µl Mercaptoethanol⁴
- mischen und mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen.

Danach wurde der Versuchsansatz für eine Stunde im 100 °C Wasserbad erhitzt und alle 15 Minuten gut durchmischt. Nach dem Erhitzen wurde der Extrakt mit Aqua dest. in einen 25 ml Meßkolben überführt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.1.4 Antigenaufbereitung 4, Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration

Antigenaufbereitung:

500 g zerkleinerte Schweine- bzw. Rindermuskulatur (s. 3.1.1) wurden in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Becherglas in einem 100 °C Wasserbad erhitzt. Nach 65 Minuten wurde eine Kerntemperatur von 97,8 °C erreicht und für 30 Minuten gehalten. Der ausgetretene Fleischsaft wurde untergerührt und nach Zusatz von 500 ml Aqua dest. bei 4 °C im Kühlschrank über 24 Stunden auf einem Magnetrührer extrahiert. Danach erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C in der Kühlzentrifuge sowie die

¹ Merck, Art.-Nr.: 983

² Merck, Art.-Nr.: 319

³ Merck, Art.-Nr.: 8487

⁴ Merck, Art.-Nr.: 15433

Filtration über ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 595 1/2). Zur Vorbereitung der Ultrafiltration wurden 200 ml des Antigenextraktes über ein Filter¹ sterilfiltriert.

Durchführung der Ultrafiltration:

Die Ultrafiltration des Antigenextraktes erfolgte mit Hilfe einer Rührzelle² über Flachmembranfilter³. Der jeweilige Antigenextrakt der Rinder- bzw. Schweinemuskulatur wurde nacheinander über Flachmembranfilter mit den Molekulargewichts-Trenngrenzbereichen von 300, 100, 50, 30, 10, 3, 1 und 0,5 kDa filtriert. Bei einem Überstand von jeweils ca. 2-3 ml Volumen wurde die Ultrafiltration beendet. Mit 2 ml Aqua dest. wurde die Oberfläche des Flachmembranfilters gespült, um anhaftende Proteine zu lösen. Auf diese Weise wurden von jeder Ultrafiltration (je 8 von Rind bzw. Schwein) ca. 5 ml Proteinkonzentrat als Überstand gewonnen.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) abgewandelt durch PETERSON (1977) bestimmt, weil niedrigere Proteinkonzentrationen erwartet wurden. Der Trennungserfolg durch Ultrafiltration wurde in der SDS-PAGE und Säulengelfiltration überprüft.

3.2.1.5 Überprüfung der Proteinkonzentrate auf ihre Eignung zur Immunisierung

3.2.1.5.1 Prinzip

Die einzelnen Proteinkonzentrate sollten mit Hilfe bereits früher hergestellter, institutseigener Kaninchen-Antiseren auf eine eventuell vorhandene besondere Eignung zur Immunisierung der Mäuse (Ausbildung einer hohen Spezifität) in einem direkten ELISA untersucht werden. Dazu wurden die Proteine aus den Konzentraten (s. 3.2.1.4) als Antigene direkt an die ELISA-Platten gebunden und mit den Kaninchen-Antiseren (s. 3.1.3) überschichtet. Mit einem peroxidasekonjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper wurden gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe detektiert.

3.2.1.5.2 Ausrüstung, Puffer und Reagenzien

Bei der Durchführung des ELISA kamen folgende Puffer und Lösungen zum Einsatz:

<u>- Sensibilisierungspuffer</u>	pH 9,6	
Stammlösung: I) Na ₂ CO ₃ ⁴		1,06 g
Aqua dest.		ad 50 ml

¹ Satorius Minisart Nr.: 1613

² Amicon 8200 Art.-Nr.: 5123

³ Amicon Diaflo-Membran-Starter Kit Art.-Nr.: 1613

⁴ Merck, Art.-Nr.: 6392

Stammlösung: II)	NaHCO ₃ ¹	1,68 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Gebrauchspuffer: Stammlösung I		9 ml
	Stammlösung II	16 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml
<u>- Waschpuffer pH 7,2</u>	NaCl ²	8,500 g
	Na ₂ HPO ₄ ³	1,070 g
	NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O ⁴	0,390 g
	NaN ₃ ⁵	0,500 g
	Tween 20 ⁶	1,5 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<u>- Konjugatpuffer pH 7,6</u>		
Stammlösung: I)	Na ₂ HPO ₄	1,4196 g
	NaCl	14,6100 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Stammlösung: II)	NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	1,5601 g
	NaCl	14,6100 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Gebrauchspuffer:	ca. 4 ml Stammlösung II langsam zu 50 ml Stammlösung I geben, bis ein pH-Wert von 7,6 erreicht ist.	
<u>- Substratlösung:</u>	a) Acetat-Puffer pH 4,8	
Stammlösung: I)	NaOH ⁷	3,99 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Stammlösung: II)	CH ₃ COOH ⁸	6,00 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Acetat-Puffer :	Stammlösung I	6 ml
	Stammlösung II	10 ml
	Aqua dest.	ad 200 ml

¹ Merck, Art.-Nr.: 6329

² Merck, Art.-Nr.: 6404

³ Merck, Art.-Nr.: 6586

⁴ Merck, Art.-Nr.: 6345

⁵ Merck, Art.-Nr.: 6688

⁶ Merck, Art.-Nr.: 822184

⁷ Merck, Art.-Nr.: 6498

⁸ Merck, Art.-Nr.: 63

b) H ₂ O ₂ -Lösung:	
H ₂ O ₂ 35 % ¹	4,860 ml
Aqua dest.	ad 100 ml
c) TMB-Lösung:	
TMB ²	0,020 g
DMSO ³	ad 1 ml

- Gebrauchssubstratlösung:

a) Acetatpuffer	99,0 ml
b) H ₂ O ₂ -Lösung	0,32 ml
c) TMB-Lösung	0,50 ml

- Stopp-Lösung:

H ₂ SO ₄ ⁴	19,61 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Darüber hinaus wurden folgende Ausrüstungsgegenstände benötigt: ELISA-Platten, ELISA-Reader, ELISA-Washer, Maßkolben, Vollpipetten, Magnetrührer, Kolbenhubpipetten (Fa. Eppendorf), Spatel und Fließpapier.

3.2.1.5.3 Durchführung

Der ELISA wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt:

- Sensibilisierung: Die Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration wurden mit dem Sensibilisierungspuffer auf einen Proteingehalt von 10 µg/ml eingestellt, jede Kavität der ELISA-Platten mit 0,1 ml dieser Sensibilisierungslösungen beschickt und abgedeckt für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank belassen.
- Waschen: 5maliges Waschen auf dem DynaWasher II mit dem Waschpuffer.
- Antiserum: Die unter 3.1.3 benannten Kaninchen-Antiseren wurden mit dem PBS-Puffer (Waschpuffer ohne Tween 20) 1:500 verdünnt, jede Kavität mit 100 µl befüllt und 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Waschen: 5mal, wie oben beschrieben.
- Konjugat: Das Konjugat⁵ wurde mit Konjugatpuffer 1:2.000 verdünnt, jede Kavität mit 100 µl befüllt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Waschen: 5mal, wie oben beschrieben.
- Substrat: Jede Kavität wurde mit 100 µl Substratlösung befüllt und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert.

¹ Merck, Art.-Nr.: 8600

² Merck, Art.-Nr.: 35926

³ Merck, Art.-Nr.: 2951

⁴ Merck, Art.-Nr.: 731

⁵ Dianova, Art.-Nr.: 111-035-008 Peroxidase konjugierte Ziegen Anti-Kaninchen IgG

- Stopp: Zugabe von 100 µl Stopplösung je Kavität.
- Messung: Die Messung erfolgte bei 495 nm mit dem ELISA-Reader¹.

3.2.1.5.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte auf der Basis der gemessenen Extinktionen. Die Proteinkonzentrate, die in den Meßwerten zwischen den verwendeten homologen und heterologen Antiseren stark differierten, wurden als zur Immunisierung besonders geeignet angesehen.

3.2.2 Antigenherstellung zur Spezifitätsüberprüfung gewonnener Antikörper

Zusätzlich zu den oben beschriebenen vier Verfahren zur Herstellung von Impfantigenen wurden folgende Antigene hergestellt:

Je 30 g in der Moulinette zerkleinerte Muskulatur von Rind, Schwein (s. 3.1.1), Wildschwein, Schaf bzw. Pute (s. 3.1.2) wurden in einem V4A-Stahl-Zentrifugenbecher auf 60, 70, 80, 90 und 100 °C für 30 Minuten im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Fleischsaft untergerührt und je 5 g mit 10 ml PBS-Puffer (s. 3.2.1.2) angesetzt, auf dem Whirlmix gut gemischt und über Nacht (18 Stunden) bei 4 °C im Kühlschrank extrahiert. Es folgten eine 20minütige Zentrifugation bei ca. 12.000 g und 4 °C in der Kühlzentrifuge und Filtration über ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 595 1/2). Die Proteinkonzentration wurde mit der Biuret-Methode (s. 3.2.1.1) bestimmt.

3.2.3 Immunisierung

3.2.3.1 Immunisierung mit den Antigenen 1 bis 3

Zur Gewinnung von antigenstimulierten Lymphozyten bzw. Lymphoblasten wurden weibliche Balb/c Mäuse im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Die Immunisierungen mit den Antigenen 1 bis 3 von Rind bzw. Schwein erfolgte nach folgendem Schema:

Am ersten Tag erhielten 4 Mäuse je Antigenaufbereitung eine intraperitoneale Injektion mit 0,2 ml einer Emulsion (= 0,4 mg Protein), hergestellt aus 1 ml Antigenextrakt (= 4 mg Protein) und 1 ml inkomplettem Freund's Adjuvans (Fa. Difco). Im Abstand von jeweils 14 Tagen wurden weitere drei Immunisierungen intraperitoneal durchgeführt.

Nach einer Wartezeit von 1-3 Monaten wurden die Mäuse erneut intraperitoneal immunisiert. Diese Immunisierung wurde mit 0,1 ml Antigenextrakt (= 0,4 mg Protein) ohne Freund's Adjuvans durchgeführt und erfolgte drei Tage vor der Zellfusion.

¹ Dynatech MR 700 Microplate Reader

3.2.3.2 Immunisierung mit Antigen 4

Aufgrund der Voruntersuchungsergebnisse (s. 3.2.1.5) und von Literaturhinweisen wurden zur Immunisierung das 1. (>300 kDa) und 2. (100-300 kDa) Proteinkonzentrat vom Rinder-muskelextrakt sowie das 2. Proteinkonzentrat vom Schweinemuskelextrakt (s. 3.2.1.4) verwendet. Im Abstand von 14 Tagen erfolgten zwei intraperitoneale Injektionen mit 0,2 ml einer Emulsion, bestehend aus Proteinkonzentrat und inkomplettem Freund's Adjuvans im Verhältnis 1:1. Die Proteinmenge je Injektion betrug bei den Proteinkonzentraten der Rinderextrakte jeweils 0,1 mg und vom Schweineextrakt 0,02 mg. Die dritte Immunisierung - wiederum drei Tage vor der Zellfusion - erfolgte nach mindestens weiteren 14 Tagen mit der jeweils doppelten Proteinmenge, jedoch ohne Zusatz von Freund's Adjuvans.

3.2.4 Zellkultivierung und Zellfusion

3.2.4.1 Prinzip

Aus der Maus stammende antikörperbildende Lymphozyten lassen sich in der Zellkultur nur für wenige Wochen kultivieren und sind so nicht für die Gewinnung einer ausreichenden Menge monospezifischer Antikörper geeignet. Seit der Entwicklung der Hybridomtechnik durch KÖHLER und MILSTEIN (1975) ist es möglich, eine genügend große Menge monoklonaler und monospezifischer Antikörper herzustellen. Hierzu werden murine Myelomazellen, die in der Zellkultur praktisch unbegrenzt vermehrbar sind, mit Lymphozyten der Maus im PEG-Medium fusioniert. Die PEG-vermittelte Zellfusion wurde an Säugerzellen zum erstenmal von PONTECORVO (1975) eingesetzt. Polyethylenglykol besitzt ein hohes Dipolmoment. Diese Eigenschaft führt dazu, dass um PEG-Moleküle eine große Hydrationshülle gebildet wird. So bewirkt der Einsatz von 50 - 60 % - igem PEG, dass das gesamte Wasser einer Lösung mit PEG assoziiert wird. Dadurch kommt es zur Entfernung der Hydrationshülle von der Oberfläche der zu fusionierenden Zellen und zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Membranlipiden (KLEBE u. BENTLEY, 1987). Die Verdünnung des PEG mit Medium führt dann zur eigentlichen Fusion (HUANG et al., 1990). Die Anzahl von Myelom-Hybridzellen konnte mit PEG statt Sendai Viren als Fusogen gesteigert werden (GEFTER et al., 1977). Die dadurch entstehenden Hybridzellen besitzen beide Eigenschaften (Antikörperbildung und unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit) in der Zellkultur. Durch Subklonierung und anschließende Vermehrung der Hybridzellen lassen sich monoklonale Antikörper in ausreichender Menge herstellen.

3.2.4.2 Ausrüstung, Puffer und Reagenzien

Für die Zellkultivierung und die Zellfusionen wurden folgende Medien verwendet:

<u>- DMEM-Medium:</u>	DMEM powder medium ¹	13,53 g
	NaHCO ₃	3,7 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
<u>- Myeloma-Medium:</u>	DMEM-Medium	900 ml
	Foetales Kälberserum ²	100 ml
	Penicillin/Streptomycin-Lsg. ³	10 ml
	Natriumpyruvat-Lsg. ⁴	10 ml
<u>- Selektions-Medien:</u>	a) HAT-Lösung ⁵	20 ml
	Myeloma-Medium	ad 1000 ml
	b) HT-Lösung ⁶	20 ml
	Myeloma-Medium	ad 1000 ml
<u>- Fusions-Medium:</u>	PEG 4000	9 g
	auf ca. 70 °C erwärmt, dann Zugabe von:	
	DMEM-Medium	10 ml
	DMSO	1 ml
	Foetales Kälberserum	1 ml

Alle Lösungen und Medien wurden sterilfiltriert. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % Volumen und bei ca. 95 % Luftfeuchte.

Die verwendeten Myelomzellen stammten von der AgX 63-Zelllinie, die freundlicherweise vom Institut für Tierhygiene der Universität Stuttgart/Hohenheim für die Zellkultivierung überlassen wurden.

Als weitere Ausrüstungsgegenstände wurden benötigt: Laminar Flow, CO₂-Inkubator, steriles Einwegmaterial für die Zellkultivierung (Kulturplatten, Kulturflaschen, Pipetten, Zentrifugenröhrchen, Pasteurpipetten), Wasserstrahlpumpe, Inversmikroskop, Bunsenbrenner, Maßkolben, Mediumflaschen, Präparierbesteck und CO₂-Versorgung.

Die Myelomzellen wurden in großen Kulturflaschen vermehrt. Vor einer Zellfusion wurde darauf geachtet, dass genügend Myelomzellen (ca. 10⁸) in logarithmischer Wachstumsphase zur Verfügung standen. Sie wurden dann vorsichtig vom Flaschengrund abgeschüttelt, im Medium suspendiert und die Zellzahl bestimmt.

¹ Serva, Art.-Nr.: 47303

² Serva, Art.-Nr.: 47900

³ Serva, Art.-Nr.: 47970

⁴ Serva, Art.-Nr.: 47270

⁵ Serva, Art.-Nr.: 47241

⁶ Serva, Art.-Nr.: 47248

3.2.4.3 Gewinnung von Abdominalmakrophagen

Vor der Zellfusion sollten Abdominalmakrophagen auf den Zellkulturplatten ausgesät werden. Diese bilden für das Wachstum der Fusionsprodukte notwendige Zytokine und „reinigen“ die Zellkultur von im HAT-Medium abgestorbenen Zellen (CAMPBELL, 1984; SUGASAWARA et al., 1985).

Einen Tag vor der Zellfusion wurden von 3 Balb/c-Mäusen die Abdominalmakrophagen gewonnen, indem nach Chloroformnarkose und Tötung durch cervicale Dislokation unter sterilen Bedingungen die Bauchdecke freipräpariert wurde. Nach Desinfektion der Bauchdecke mit 80 %igem Ethanol wurden ca. 4-6 ml einer 0 °C temperierten 0,34 M Saccharoselösung¹ mit Hilfe einer Braunüle² in die Bauchhöhle injiziert. Diese wurde 2-3 Minuten massiert und die dann makrophagenhaltige Saccharoselösung möglichst vollständig zurückgewonnen, in 20 ml kaltes DMEM-Medium gegeben und bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Makrophagen in 50 ml HAT-Medium suspendiert und auf acht Zellkulturplatten (Nunclon Delta Nr.: 090872) so ausgesät, dass die 60 inneren Kavitäten der Zellkulturplatte (96 Kavitäten) mit je 100 µl beschickt wurden. Die randständigen Kavitäten wurden mit sterilem Aqua dest. befüllt.

3.2.4.4 Gewinnung der Milz-Lymphozyten

Nach Chloroformnarkose und Tötung der immunisierten Balb/c Mäuse durch cervicale Dislokation wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen und anschließend im Homogenisator³ zerkleinert. Die so gewonnenen Milzzellen wurden dreimal mit DMEM-Medium gewaschen, in 30 ml Medium suspendiert und mit einer Thoma-Zählkammer die Lymphozyten-Zellzahl bestimmt.

3.2.4.5 Durchführung der Zellfusion

Aus der unten stehenden Übersicht können die Anzahl der Zellfusionen zu den einzelnen Immunisierungen mit den verschiedenen Antigenaufbereitungen entnommen werden.

Immunisierungsantigen	Anzahl Fusionen		Immunisierungsantigen	Anzahl Fusionen
Ag 1 Schwein	3		Ag 3 Schwein	1
Ag 1 Rind	3		Ag 4, 2.Konz. Schwein	2
Ag 2 Schwein	1		Ag 4, 1. Konz. Rind	1
Ag 2 Rind	2		Ag 4, 2. Konz. Rind	1

¹ Merck, Art.-Nr.: 7687

² Braunüle Luer Lock 0,5 × 18G Art.-Nr.: 420753/0

³ Kantes Scientific Glassware: Tissue Grind Pestle S7 23 Art.-Nr.: 885501-0023

Für die Zellfusion wurden die Lymphozyten mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 vermischt.

Nach 5minütiger Zentrifugation bei 500 g wurde der Mediumüberstand abgesaugt und die Fusion in Anlehnung an CAMPBELL (1984) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2 ml Fusionsmedium wurden über 30 Sekunden tropfenweise dem Zellpellet zugegeben, das Zentrifugenröhrchen dabei leicht geschüttelt, weitere 30 Sekunden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette suspendiert und dann nochmals 30 Sekunden ruhen gelassen. Anschließend wurden unter ständigem Schütteln 5 ml DMEM-Medium über zwei Minuten tropfenweise zugegeben, um die Zellfusion zu beenden. Nach der Zugabe von weiteren 5 ml DMEM-Medium wurden die Zellen zentrifugiert (s. o.), der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit 25 ml DMEM-Medium gewaschen. Schließlich wurden sie in 50 ml HAT-Selektionsmedium suspendiert und auf acht Zellkulturplatten ausgesät, die mit Makrophagen entsprechend 3.2.4.3 vorbereitet waren. Das Wachstum von Hybridomen wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops (Olympus CK 2) kontrolliert. Nach zwei bis drei Wochen wurde der Mediumüberstand auf spezifische Antikörper im ELISA untersucht.

3.2.5 ELISA zum Nachweis von Antikörpern im Mediumüberstand

In Vorversuchen wurde ein ELISA entwickelt, der eine ausreichende Empfindlichkeit zum Nachweis von geringen Mengen Antikörpern in 50 µl Mediumüberstand besaß und relativ schnell durchgeführt werden konnte.

3.2.5.1 Ausrüstung, Puffer und Reagenzien

Es wurden die gleiche Ausrüstung, Puffer und Reagenzien wie unter 3.2.1.5 beschrieben verwendet. Für die Untersuchung des Mediumüberstandes auf Antikörper war eine große Zahl von ELISA-Platten¹ erforderlich. Eine Bevorratung der zur Sensibilisierung vorbereiteten Platten bei - 18 °C war problemlos möglich

3.2.5.2 Beschichtung der ELISA-Platten

Die Sensibilisierung der ELISA-Platten erfolgte mit 100 µl Antigenlösung je Kavität. Die Antigenextrakte (s. u.) wurden mit dem Beschichtungspuffer auf einen Proteingehalt von 0,01 mg/ml eingestellt, so dass jede Kavität mit 1 µg Antigenprotein beschickt wurde. Anschließend wurden die Testplatten abgedeckt und bei -18 °C tiefgefroren.

Die ELISA-Platten wurden im einzelnen mit folgenden Antigenen beschichtet:

¹ Nunc Immunoplate Maxi Sorb F 96

1. Antigen 1: Rind- bzw. Schwein-Lyophilisat (s. 3.2.1.1)
2. Antigen 2: Rind- bzw. Schwein-Antigenaufbereitung nach RAVESTEIN u. DRIEDONKS (s. 3.2.1.2)
3. Antigen 3: Rind- bzw. Schwein- Antigenaufbereitung nach HITCHCOCK et al. (s. 3.2.1.3)
4. Antigen 4: Rind- bzw. Schwein-100 °C Gesamtextrakt vor Ultrafiltration (s. 3.2.1.4)
5. Antigene: Rind, Schwein, Wildschwein, Schaf und Pute jeweils 60-100 °C (s. 3.2.2)

3.2.5.3 Durchführung des ELISA

Die Durchführung erfolgte nach folgendem Schema:

- Sensibilisierung: Die vorbereiteten ELISA-Platten wurden dem Tiefkühlschrank entnommen und nach Entfernen der Folie für 1 Stunde bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte aufgetaut und dadurch sensibilisiert.
- Waschen: Fünfmaliges Waschen auf dem DynaWasher II mit dem Waschpuffer. Nach jedem Waschschritt wurde die Platte auf einem saugfähigen Tuch ausgeklopft.
- Mediumüberstand: Aus jeder Kavität der Zellkulturplatten wurden 200 µl Mediumüberstand entnommen und 50 µl davon auf je eine Kavität der ELISA-Platte mit den homologen Impfantigenaufbereitungen von Rind bzw. Schwein übertragen und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die übrigen 100 µl Mediumüberstand wurden teilweise zu Tests gegen andere Antigenaufbereitungen von Rind bzw. Schwein verwendet.
- Waschen: Fünfmal, wie oben beschrieben.
- Konjugat: Das Konjugat¹ wurde mit Konjugatpuffer 1:2.000 verdünnt, jede Kavität mit 100 µl befüllt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Waschen: Fünfmal, wie oben beschrieben.
- Substrat: Jede Kavität wurde mit 100 µl Substratlösung befüllt und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert.
- Stopp: Zugabe von 100 µl Stopplösung je Kavität.
- Messung: Die Messung erfolgte bei 495 nm mit dem ELISA-Reader.

3.2.5.4 Auswertung

Der Mediumüberstand eines Hybridoms wurde gleichzeitig gegen die homologe Antigenaufbereitung von Rind und Schwein und z. T. auch gegen andere Antigenaufbereitungen getestet. Kavitäten mit Hybridomen, die spezifisch im ELISA reagierten, wurden weiter kultiviert, im ELISA überprüft und dann subkloniert.

¹ Dianova, Art.-Nr.: 115-035-008 Peroxidase konjugierte Ziegen Anti-Maus IgG

3.2.6 Subklonierung

Konnte im Nährmedium eines Hybridoms ein spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, wurde dieses Hybridom zweimal subkloniert. Dazu wurden die Hybridzellen vorsichtig von den Kulturplatten abgespült und die Zelldichte im Medium bestimmt. Die Verdünnung der Zellsuspension erfolgte so, dass beim Ausbringen in 120 Kavitäten (= 12 ml) rechnerisch nur 80 Zellen in dem dafür benötigten Mediumvolumen vorhanden waren (begrenzende Verdünnung). So konnten Hybridzellen vereinzelt und zu neuen Klonen herangezüchtet werden. Diese wurden im ELISA mehrfach auf ihre Antikörperbildung überprüft.

3.2.7 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus dem Medium durch Affinitätschromatographie

Nach der Subklonierung wurden die Zellen in größeren Kulturflaschen¹ vermehrt, der Überstand gesammelt und eingefroren. Die Gewinnung der monoklonalen Antikörper daraus erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine Protein-A-Sepharose-Säule².

3.2.7.1 Prinzip

Die Affinitätschromatographie ist eine Methode, mit der in nur einem Arbeitsgang spezifische Substanzen aus einer komplex zusammengesetzten Lösung in hohem Reinheitsgrad gewonnen werden können. Die zu reinigenden Moleküle (hier murine Immunglobuline) werden spezifisch und reversibel an eine komplementäre Substanz, den Liganden (hier Protein A), gebunden. Der Ligand ist kovalent an eine unlösliche Matrix (Sepharose) gebunden. Die Probe wird unter besonderen Bindungsbedingungen (z.B. pH-Wert) über den an der Matrix fixierten Liganden gegeben. Spezifische Moleküle werden gebunden, alle anderen Substanzen ausgewaschen. Durch Veränderung des Puffermilieus (pH-Werte 8, 5, 4 und 3) können die spezifisch gebundenen Substanzen von dem Liganden gelöst und in konzentrierter und reiner Form gewonnen werden.

3.2.7.2 Ausrüstung, Puffer und Reagenzien

Folgende Ausrüstungsgegenstände wurden für die Durchführung der Affinitätschromatographie verwendet: Glassäule (30 cm lang, Ø 1 cm) mit Diaphragma, Schlauchpumpe, UV-Spektralphotometer, Verstärker, Flachsreiber, Schläuche und Bechergläser.

Darüber hinaus wurden folgende Puffer benötigt:

¹ Costar 3150 Tissue Culture Flask 150 cm²

² Pharmacia LKB Art.-Nr.: 17-0974-01 Protein A-Sepharose 4 fast flow

<u>- Bindungspuffer:</u>	Glycin ¹	112,57 g
	NaCl	175,20 g
	NaN ₃	0,50 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<u>- Eluationspuffer:</u>	Citronensäure ²	21,014 g
	NaN ₃	0,050 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
	Die benötigten pH-Werte (pH 8, 5, 4 u. 3) der Eluationspuffer wurden mit 10 N NaOH eingestellt.	

Alle Puffer wurden vor ihrer Verwendung auf dem Magnetrührer mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Das antikörperhaltige Medium wurde vor der Affinitätschromatographie sterilfiltriert, mit 112,57 g Glycin und 175,20 g NaCl pro Liter Medium versetzt und anschließend entgast.

3.2.7.3 Durchführung

1. Die Protein A-Sepharose wurde dreimal mit Aqua dest. gewaschen, im Bindungspuffer suspendiert und in die Glassäule mit Diaphragma überführt. Nach dem Sedimentieren wurde diese noch einmal mit 200 ml Bindungspuffer gewaschen und gleichzeitig die Durchflußrate mit der Schlauchpumpe (Ismatec Reglo 1/8 ISM 126) auf 30 ml/h eingestellt.
2. 700 ml vorbereitetes Medium wurden bei der gleichen Durchflußrate über die Protein A-Sepharose gegeben und anschließend aufgefangen, um im ELISA zu überprüfen, ob noch Antikörper im Medium vorhanden sind.
3. Danach wurde solange Bindungspuffer über die Säule gegeben, bis der Meßwert des UV-Meters (395 nm)³ auf einen konstanten Wert abgesunken war. Die Meßwerte wurden mit einem Flachsreiber⁴ registriert.
4. Nacheinander erfolgte nun der Einsatz der Eluationspuffer mit den pH-Werten 8, 5, 4 und 3, bis jeweils ein konstanter Meßwert (Absinken auf das jeweilige Nullniveau) erreicht wurde.

Die Eluate wurden separat aufgefangen und später im ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern getestet.

¹ Merck, Art.-Nr.: 4201

² Merck, Art.-Nr.: 244

³ LKB - Uvicord Control Unit Type 8301 A u. Detector Unit Type 8303 A

⁴ Watanabe Instruments Corp.: Servocorder SR 6255

3.2.7.4 Überprüfung der Eluate auf monoklonale Antikörper im ELISA

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben. Die ELISA-Platten wurden mit 1 µg der Antigenaufbereitung 1 von Rind bzw. Schwein sensibilisiert. Die Eluate mit pH 8, pH 4 und pH 3 wurden mit PBS 1:10² im ELISA eingesetzt, das Eluat mit pH 5 in dezimalen Verdünnungsstufen von 1:10² bis 1:10⁵, da hier die monoklonalen Antikörper in einer größeren Konzentration erwartet wurden. Darüber hinaus wurde die Antikörperaktivität des Nährmediums vor und nach Durchführung der Affinitätschromatographie untersucht. Als Probe wurden 100 µl der Eluatverdünnungen bzw. des Nährmediums je Kavität auf die ELISA-Platten aufgebracht. Die Messungen erfolgten im ELISA-Reader bei 495 nm.

3.2.7.5 Auswertung

Die Höhe der Extinktion des Eluates und Mediums steht in direktem Bezug zur Antikörperkonzentration. Anhand der Meßwerte konnte der korrekte Ablauf der Affinitätschromatographie sowie das Medium auf einen Antikörperrestgehalt überprüft werden. Gleichzeitig wurde die Verdünnungsstufe einer antikörperhaltigen Gebrauchslösung für den Einsatz im ELISA ermittelt.

3.2.8 Tests mit dem gereinigten monoklonalen Antikörper mit verschiedenen Antigenaufbereitungen im ELISA

In weiteren Versuchen sollte die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers überprüft werden. Dazu wurden ELISA-Platten mit den Antigenaufbereitungen 1 bis 3 (s. 3.2.1.1 - 3.2.1.3) und den Testantigenen (s. 3.2.2) beschichtet. Es wurden die gleiche Ausrüstung, Puffer und Reagenzien wie unter 3.2.5.1 verwendet. Die Sensibilisierung der Platten und Durchführung des ELISA erfolgten wie unter 3.2.5.2 bzw. 3.2.5.3. Statt des Mediumüberstandes wurde hier jedoch eine Verdünnung des gereinigten monoklonalen Antikörpers von 1:1000 mit PBS verwendet.

Darüber hinaus wurden als weitere Antigene die Extrakte von Antigen 1 (Rind bzw. Schwein) nachträglich für jeweils 5 Minuten auf 60, 80 und 100 °C erhitzt und für diesen ELISA verwendet, um zu überprüfen, ob das spezifische Antigen 1 auch bei stärkerer thermischer Belastung seine spezifischen Eigenschaften behält.

Zur Auswertung der Tests wurden die Meßwerte verglichen und graphisch dargestellt.

3.2.9 Vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting auf Nitrocellulosemembran

Die SDS-PAGE kam für folgende Untersuchungen zum Einsatz:

- a) Bestimmung der Proteinbandenmuster der Antigenaufbereitung 1 von Rind bzw. Schwein auch nach zusätzlicher thermischer Belastung.
- b) Bestimmung des Molekulargewichts des spezifischen Antigens aus der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein.
- c) Überprüfung des Trennungsergebnisses der Proteinkonzentrate nach Ultrafiltration aus der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4).

3.2.9.1 Prinzip

Für die SDS-Elektrophorese ist die Arbeitsvorschrift von LÄMMLI (1970) ein Standard geworden und wird in den meisten Fällen unverändert angewandt. Durch die SDS-Behandlung von Proteinen werden individuelle Ladungsunterschiede überdeckt, Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben, die Aggregatbildung von Proteinen verhindert sowie die Polypeptidfäden gestreckt und zu Mizellen geformt. Alle Mizellen erhalten eine negative Ladung, die proportional zur Masse ist. Da die Radien dieser Mizellen auch proportional zum Molekulargewicht sind, erhält man bei der Elektrophorese eine Auftrennung entsprechend den Molekulargewichten.

Im Sammelgel ist die Mobilität der Proteine ausschließlich durch die Ladung bestimmt. So werden die Proteine in Zonen gleicher Ladung gewissermaßen vorsortiert. Beim Auftreffen auf das engporige Trenngel werden die Proteine retardiert, und es bildet sich ein Proteinstau. Die Mobilität ist jetzt von der Ladung und der Molekülgröße abhängig. Es erfolgt nun die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße.

Beim anschließenden Western blot werden durch eine weitere Elektrophorese die Proteine aus dem Gel auf die Oberfläche einer Blotfolie transferiert und so für größere Liganden wie z.B. Immunglobuline zugänglich (BURNETTE, 1981; GERSHONI u. PALADE, 1990).

3.2.9.2 Ausrüstung, Puffer und Reagenzien

Die SDS-PAGE wurde im Vertikalelektrophoresesystem 2001 von Pharmacia LKB¹ nach den Vorschriften der Pharmacia LKB-Schrift SD 008/89 durchgeführt. Nach dieser Anleitung wurde ein Stufengel von 1,5 mm Schichtdicke gegossen, wobei das Trenngel 12,5 % T (Totalacrylamid) und das Sammelgel 5 % T enthielt. Hierzu wurde das Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiggemisch von Pharmacia LKB² verwendet.

Im Anschluß an die Gelelektrophorese erfolgte ein Semidry-Blotting der Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulosemembran (Pharmacia LKB Nr.: 2005-107) in der Multiphor II

¹ Pharmacia LKB Art.-Nr.: 2001-001

² Pharmacia LKB Art.-Nr.: 1820-202

Elektrophoresekammer¹ von Pharmacia LKB mit Hilfe des Novablot Kits² im diskontinuierlichen Puffersystem nach den Anleitungen der Pharmacia LKB-Schrift SD RE-072.

3.2.9.3 Durchführung

- zu a) Molekulargewichtsbestimmung eines Antigens aus der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein (s. 3.2.1.1)
- zu b) Überprüfung der Antigen-Antikörper-Reaktion der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind und von deren zusätzlich erhitzten Lyophilisatextrakten im Immunblot.

Beschreibung der Durchführung zu a) und b):

Je 2 ml des Lyophilisatextraktes (s. 3.2.1.1) von Schwein bzw. Rind wurden im Wasserbad bei 60 °C für jeweils 5, 10, 15 und 30 Minuten sowie bei 80 und 100 °C für ebenfalls 30 Minuten erhitzt. Danach wurden sie im Wasserbad mit 20 °C abgekühlt. Der Lyophilisatextrakt (s. a)) und die zusätzlich erhitzten Proben (s. b)) wurden mit 2 ml nicht reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 30 µl der Proben und 50 µl eines Proteinmarkergemisches³ auf die Startzone der beiden Gele gegeben. Die Trennung erfolgte zunächst bei 150 V für 5,5 Stunden und dann bei 300 V für weitere 45 Minuten. Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine im Semidry-Blotting Verfahren auf je eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Blotting erfolgte im diskontinuierlichen Puffersystem bei 15 V und 200 mA über 1 Stunde. Danach wurden die Nitrocellulosemembranen einer Indian Ink- bzw. einer Immunfärbung unterzogen.

- zu c) Zur Überprüfung des Trennergebnisses der Proteinkonzentrate nach Ultrafiltration aus der Antigenaufbereitung 4.

Beschreibung der Durchführung zu c):

Von den einzelnen Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration wurde jeweils ein Probenvolumen entnommen, das 0,1 mg Protein enthielt, und in Probenröhrchen überführt. Die Proben wurden im Vakuum getrocknet, dann mit 0,1 ml reduzierendem Probenpuffer aufgefüllt und für drei Minuten im 100 °C Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden 30 µl jeder Probe auf die Startzone des SDS-Gels gegeben und bei 600 V mit max. 15 mA sowie max. 10 W getrennt, bis die Trennfront ca. 1 cm vor Gelende lag. Im Anschluß daran erfolgte das Blotting auf Nitrocellulosemembran

¹ Pharmacia LKB Art.-Nr.: 2117-001

² Pharmacia LKB Art.-Nr.: 2117-250

³ HMW u. LMW Calibration Kit for Electrophoresis Pharmacia LKB

im diskontinuierlichen Puffersystem bei 10 V, max. 150 mA sowie max. 10 W über eine Stunde. Die Proteinfärbung erfolgte nach der Indian Ink-Methode.

3.2.9.4 Indian Ink-Färbung

Die Indian Ink-Technik (HANCOCK u. TSANG, 1983) wurde modifiziert eingesetzt. Folgende Lösungen zur Durchführung der Färbung wurden benötigt:

<u>- Fixierlösung:</u>	0,2 M NaOH	
<u>- Waschlösung (PBS-T):</u>	NaCl	48,80 g
	Na ₂ HPO ₄ ¹	14,50 g
	NaH ₂ PO ₄ ²	1,17 g
	Tween 20	2,5 ml
	Aqua dest.	ad 5000 ml
<u>- Färbelösung:</u>	Pelikan-Füllertinte	250 µl
	Essigsäure ³	2,5 ml
	PBS-T	ad 250 ml

Durchführung der Färbung:

1. Die Nitrocellulosemembran wurde direkt nach dem Blotten für fünf Minuten in der Fixierlösung gebadet.
2. Viermal mit PBS-T für je ca. acht Minuten waschen.
3. Ca. zwei bis drei Stunden in der Färbelösung anfärben.
4. Entfernen des überschüssigen Farbstoffes durch 2maliges Waschen in Aqua dest. für ca. fünf Minuten.
5. Nitrocellulosemembran an der Luft trocknen.

3.2.9.5 Immunfärbung

Die Immunfärbung erfolgt im Prinzip wie in einem direkten ELISA, nur dass es nicht zur Bildung eines löslichen Farbstoffes, sondern zu einem Farbniederschlag an der Stelle der Antigen-Antikörperreaktion auf der Blotfolie kommt.

Zur Durchführung der Immunfärbung der Nitrocellulosemembran wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

¹ Merck, Art.-Nr.: 6586

² Merck, Art.-Nr.: 6370

³ Merck, Art.-Nr.: 63

<u>- TRIS-Puffer-Konz. (5×):</u>	TRIS ¹	12,10 g
	NaCl	145,00 g
	mit HCl 32 % auf pH 7,5 einstellen	
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<u>- Waschlösung (TBS-T):</u>	TRIS (5×)	200 ml
	Tween 20	0,5 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<u>- Substratlösung:</u>	4-Chloro 1-Naphthol ²	60 mg
	Methanol ³	20 ml
	TBS ohne Tween	80 ml
	H ₂ O ₂ 35%	52 µl

Färbeprotokoll:

- Waschen: Direkt nach dem Blotten wird die Nitrocellulosemembran für zehn Minuten in TBS-T gewaschen.
- Antikörperlösung: Die Lösung eines eigenen monoklonalen Antikörpers wird mit TBS-T 1:250 verdünnt und die Nitrocellulosemembran mit dieser Antikörperlösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.
- Waschen: Viermaliges Waschen mit TBS-T.
- Konjugatlösung: Das Konjugat⁴ wird mit TBS-T 1:500 verdünnt und die Nitrocellulosemembran mit dieser Konjugatlösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.
- Waschen: Viermaliges Waschen mit TBS-T.
- Substrat: Das H₂O₂ wird erst kurz vor dem Gebrauch des Substrates zugegeben. Mit dem Substrat wird die Nitrocellulosemembran für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Stopp: Durch Waschen der Nitrocellulosemembran mit Aqua dest. wird die Reaktion beendet, und sie kann an der Luft getrocknet werden.

3.2.9.6 Auswertung

Die immungefärbten Banden wurden mit den Indian Ink-gefärbten Proteinbanden verglichen und mit Hilfe von Molekulargewichtsstandards (HMW und LMW Calibration Kit Proteins for Electrophoresis der Fa. Pharmacia LKB) die Molekulargewichte berechnet.

¹ Merck, Art.-Nr.: 8382

² Merck, Art.-Nr.: 11952

³ Merck, Art.-Nr.: 6009

⁴ Dianova, Art.-Nr.: 115-035-008 Peroxidase konjugierte Ziegen Anti-Maus IgG

3.2.10 Kommerzieller ELISA-Test

3.2.10.1 Prinzip

Bei diesem Test der Firma Transia GmbH handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Er wird in mit spezifischen Antikörpern beschichteten Kavitäten durchgeführt. Die Menge gebundener Proteine wird durch einen biotinylierten Antikörper und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bestimmt. Nach der Substratzugabe entsteht ein grüner Farbstoff. Durch visuelle oder photometrische Auswertung ist eine qualitative Aussage möglich.

Verwendet wurden die Tests gegen Rind (Art.-Nr.: CO 65021) und gegen Schwein (Art.-Nr.: CO 65022).

3.2.10.2 Durchführung

Die Testdurchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Als Proben wurden folgende Antigenaufbereitungen verwendet:

- Die Proteinkonzentrate 1 bis 8 aus der Ultrafiltration sowie der Gesamtextrakt von Rind und Schwein aus dieser Antigenaufbereitung (s. 3.2.1.4).
- Die Proteinkonzentrate 1 bis 8 aus der Ultrafiltration sowie der Gesamtextrakt von Rind und Schwein aus dieser Antigenaufbereitung (s. 3.2.1.4), jedoch 1:1000 verdünnt.
- Die Antigenextrakte von Rind, Schaf, Wildschwein, Schwein und Pute, die jeweils auf 60, 70, 80, 90 und 100 °C erhitzt worden waren (s. 3.2.2).
- Ein Extrakt aus roher Rindermuskulatur.

3.2.10.3 Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem Mikroplatten-Reader¹ bei 405 nm. Als positiv galt eine Probe, wenn die Absorption über einem errechneten Cut-off-Wert lag. Um diesen zu ermitteln, wurde die mittlere Absorption der beiden negativen Kontrollen mit dem Faktor 2,5 multipliziert.

¹ Dynatech MR 700 Microplate Reader