

3.3 Untersuchungsergebnisse

3.3.1 Antikörpernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 1 (s. 3.2.1.1) stimulierten Lymphozyten

3.3.1.1 Antigen 1 vom Schwein

Insgesamt wurden drei Zellfusionen mit Lymphozyten, die mit dem Antigen 1 vom Schwein stimuliert waren, durchgeführt (s. 3.2.4.5).

Nach der ersten Zellfusion waren auf den Zellkulturplatten ca. 120 Hybridome gewachsen, davon starben 80 bereits nach dem ersten Mediumwechsel. Die restlichen 40 Hybridome wurden auf neue entsprechend vorbereitete Zellkulturplatten umgesetzt. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte ein erster Test im ELISA zum Nachweis von spezifischen Antikörpern. In diesem ELISA wurden gleichzeitig mögliche Antikörperreaktionen gegen das homologe Impfantigen sowie die Antigenaufbereitung 1 vom Rind überprüft. Bei den angegebenen Extinktionswerten handelt es sich um den Mittelwert aus den Doppelbestimmungen des Screening-ELISA.

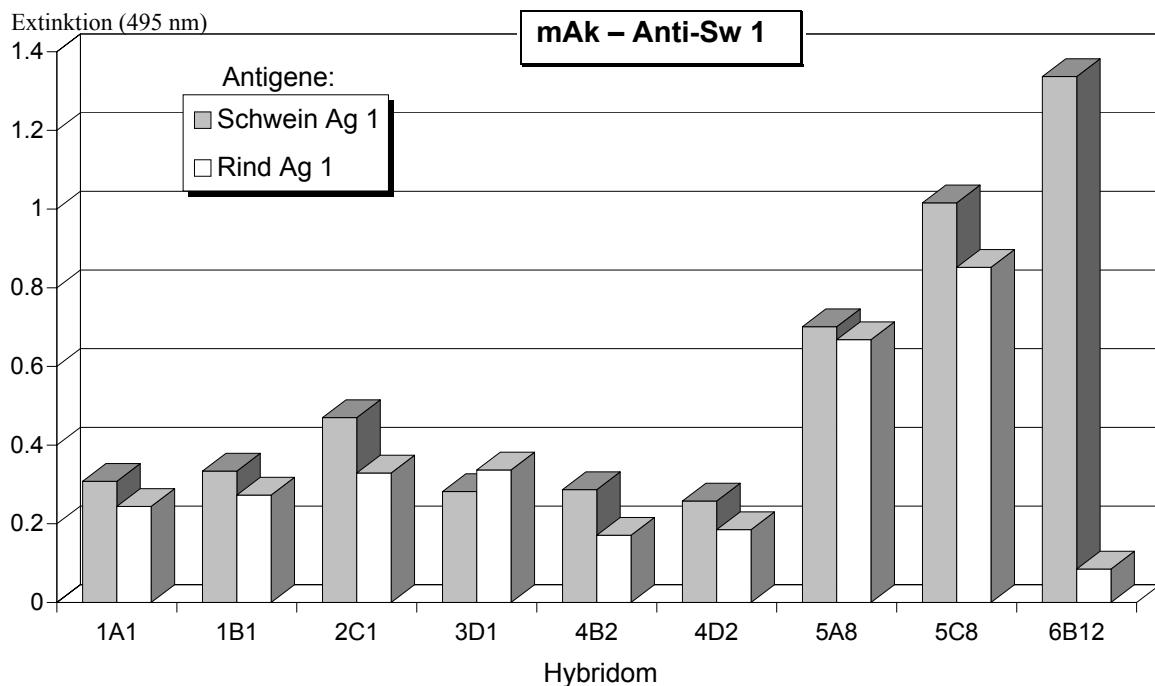


Abbildung 1: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der 1. Zellfusion, mit Antigen 1 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind

Die Bezeichnung der Hybridome erfolgte außer bei der ersten Zellfusion nach folgendem

Prinzip: Der erste Buchstabe steht für die Bezeichnung der Zellfusion.

Die erste Ziffer steht für die Nummer der Zellkulturplatten (i. d. R. 1–8).

Die Kombination des folgenden Buchstabens und der Ziffer beschreiben die Lokalisation der Kavität auf der Zellkulturplatte, in der das Hybridom wächst (i. d. R. 2–11 und B-G).

Nur bei neun Hybridomen konnte im ELISA gegenüber dem homologen Antigen eine Extinktion von $> 0,200$ gemessen werden. Von diesen neun Hybridomen zeigte in diesem ELISA nur das Hybridom 6B12 eine spezifische Reaktion (s. Abb. 1). Die Antikörper der anderen Hybridome reagierten dagegen auch stark mit dem Antigen vom Rind. Die Reaktion des Antikörpers vom Hybridom 3D1 war gegen das Antigen vom Rind sogar stärker als gegen das homologe Impfantigen.

Die dritte Zellfusion führte ebenfalls zu einem guten Fusionsergebnis. Zwei Wochen nach der Fusion zeigten sich 191 Hybridome in den 480 Kavitäten. Das Nährmedium wurde gewechselt und nach weiteren vier Tagen die erste Untersuchung auf Antikörper im ELISA durchgeführt.

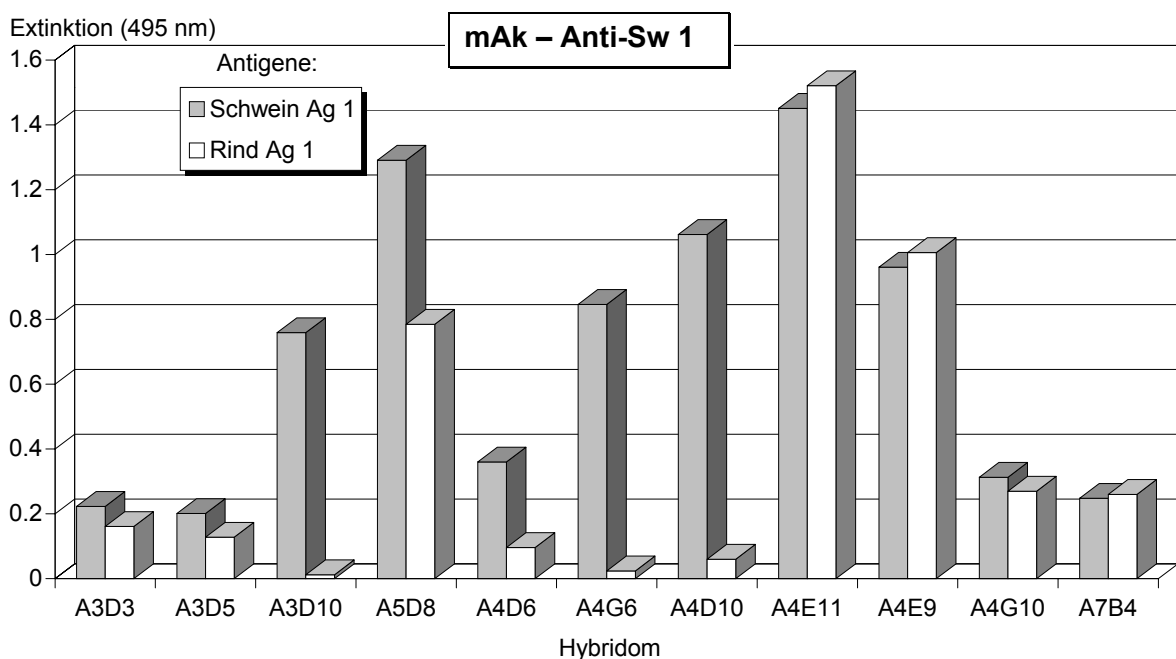


Abbildung 2: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der 3. Zellfusion, mit Antigen 1 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind

Auf einer Testplatte waren die Kavitäten abwechselnd mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. vom Rind beschichtet. Das Nährmedium von einem Teil der Hybridome wurde außerdem auch gegen die Antigenaufbereitung 2 von Schwein bzw. Rind im ELISA auf Antikörperreaktionen untersucht.

Aus dieser dritten Zellfusion gingen 11 antikörperbildende Hybridome hervor. Sie reagierten im ELISA mit dem homologen Antigen, und ihre Extinktion überstieg den Wert von 0,200 (s. Abb. 2). Die Antikörper der drei Hybridome A3D10, A4G6 und A4D10 zeigten dabei eine spezifische Reaktion gegen das homologe Impfantigen im Vergleich zur Reaktion mit der Antigenaufbereitung 1 vom Rind. Die Reaktion des Antikörpers des Hybridoms A4D6 war weniger stark spezifisch. Die Antikörper der anderen Hybridome reagierten in diesem ELISA unspezifisch. Die Extinktionswerte von drei Hybridom-Antikörpern waren gegen die Antigenaufbereitung 1 vom Rind sogar höher als gegen das homologe Impfantigen.

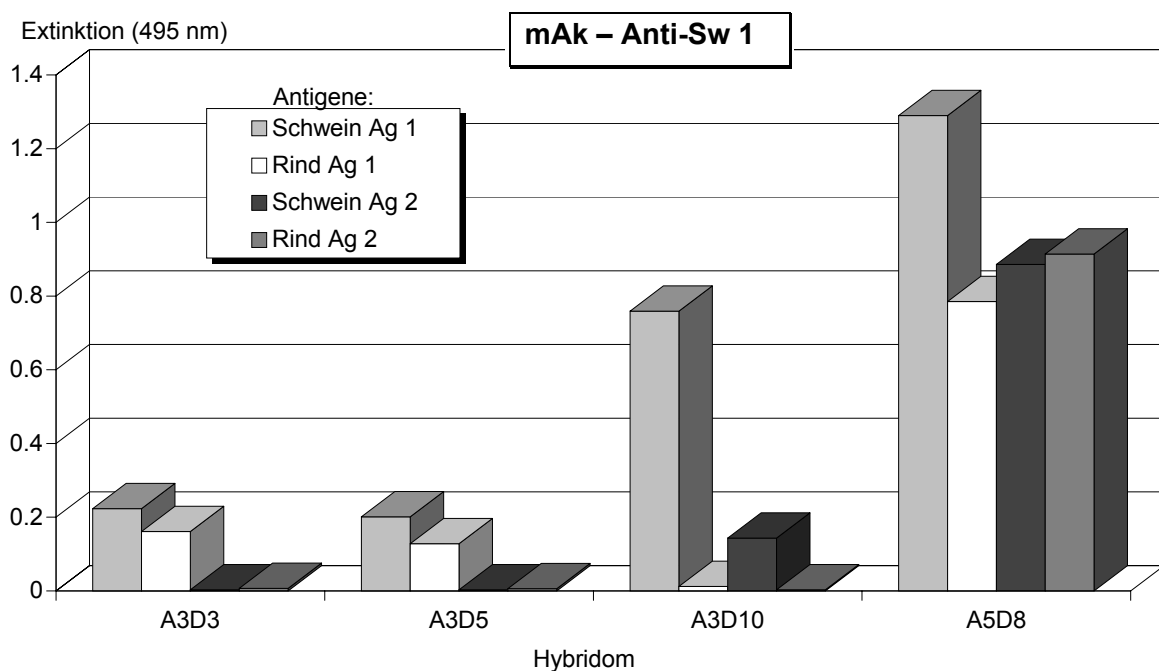


Abbildung 3: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der 3. Zellfusion, mit Antigen 1 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenaufbereitungen 1 und 2 vom Schwein bzw. Rind

Die Reaktion der Antikörper der vier Hybridome A3D3, A3D5, A3D10 und A5D8 wurden im ELISA zusätzlich gegen die Antigenaufbereitung 2 von Schwein bzw. Rind getestet (s. Abb. 3). Dabei zeigten sich drei unterschiedliche Muster:

1. Die Antikörper der beiden Hybridome A3D3 und A3D5 reagierten mit der homologen Antigenaufbereitung 1 unspezifisch, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind der Antigenaufbereitung 2 weder spezifisch noch unspezifisch.
2. Der Antikörper des Hybridoms A5D8 zeigte gegen die homologe Antigenaufbereitung nur eine geringe spezifische Reaktion. Dieser Antikörper reagierte auch mit den Antigenen der Antigenaufbereitung 2 von Schwein bzw. Rind. Hier jedoch deutlich unspezifisch.

3. Der Antikörper des Hybridoms A3D10 reagierte bei beiden Antigenaufbereitungen vom Schwein und Rind spezifisch. Die Reaktion unterschied sich nur in der Höhe der Extinktionswerte, die gegen die homologe Antigenaufbereitung vom Schwein deutlich größer waren.

3.3.1.2 Antigen 1 vom Rind

Mit der Antigenaufbereitung 1 vom Rind stimulierten Lymphozyten und den Myelomzellen wurden drei Zellfusionen durchgeführt, von denen nur eine untersucht werden konnte. Aus der ersten Zellfusion gingen aus unbekannter Ursache keine Hybridome hervor.

Die Zellen der dritten Zellfusion konnten wegen der asbestbedingten Schließung der Labore nicht weiter verfolgt werden.

Die zweite Zellfusion brachte kein gutes Fusionsergebnis. Es bildeten sich nur 41 Hybridome. Ursache hierfür war eine starke Verklumpung der Zellen nach dem Waschen und Zentrifugieren. Die Zellen konnten nicht vollständig resuspendiert werden. 13 Tage nach der Zellfusion erfolgte der erste ELISA zum Nachweis antikörperbildender Hybridome. Bei nur vier Hybridomen konnte eine Antikörperreaktion festgestellt werden, wobei nur einmal ein Extinktionswert von 0,200 überschritten wurden (s. Abb. 4).

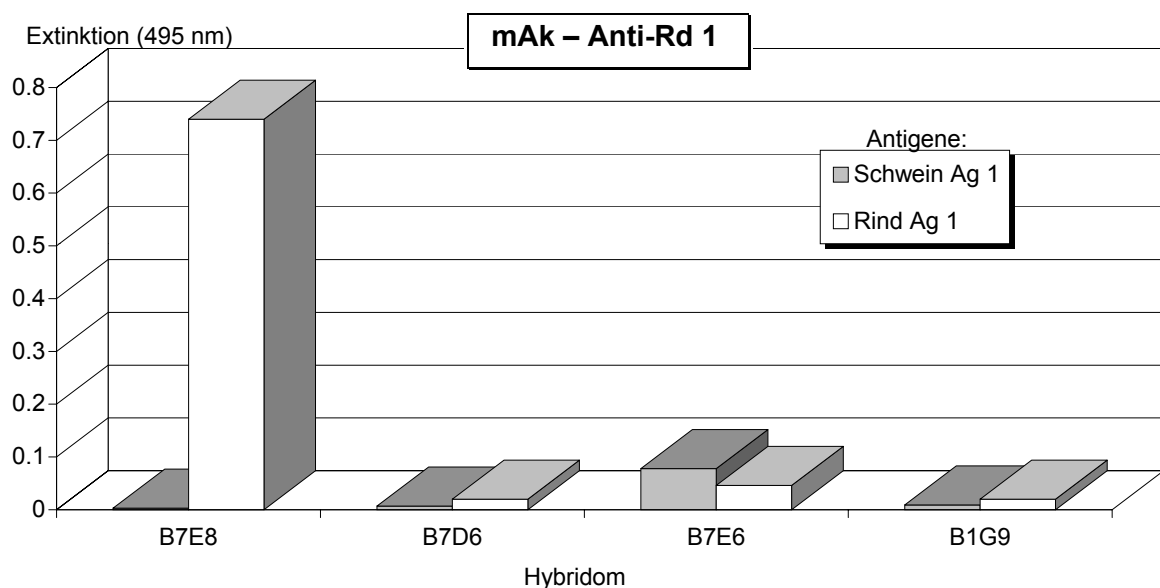


Abbildung 4: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der 2. Zellfusion, mit Antigen 1 vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind

Die Antikörper des Hybridoms B7E8 reagierten spezifisch gegen das homologe Impfantigen, während die Reaktionen der Hybridome B7D6 und B1G9 deutlich schwächer und unspezifisch waren. Die Antikörper des Hybridoms B7E6 reagierten sogar gegen das Antigen vom Schwein stärker als gegen das homologe Impfantigen.

3.3.2 Antikörpernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 2 (s. 3.2.1.2) stimulierten Lymphozyten

3.3.2.1 Antigen 2 vom Schwein

Es wurde eine Zellfusion mit den mit der Antigenaufbereitung 2 vom Schwein stimulierten Lymphozyten durchgeführt. Die Zellfusion zeigte ein gutes Ergebnis. In ca. 90 % der Kavitäten entwickelten sich Hybridome. Der erste Nährmediumwechsel erfolgte neun Tage nach der Zellfusion. Nach weiteren sechs Tagen wurde der ELISA zum Nachweis von antikörperbildenden Hybridomen durchgeführt.

Abweichend von dem sonst angewandten Verfahren wurde im ersten ELISA nicht das Impfantigen als Testantigen eingesetzt. Es sollte vielmehr untersucht werden, ob aus einer Immunisierung mit schwach hitzedenaturiertem Antigenmaterial Antikörper induziert werden können, die auch noch mit erheblich stärker hitzedenaturierten Antigenen spezifisch reagieren. Dies wäre ein Nachweis von Antigenstrukturen, die auch nach starker Hitzeeinwirkung stabil bleiben. Zu diesem Zweck erfolgte die Antigenextraktion aus dem Aceton-Trocken-Pulver (AcTP) nicht mit der Harnstofflösung wie bei der Antigenaufbereitung 3 (s. 3.2.1.3), sondern unter den gleichen Zeit- und Temperaturbedingungen mit dem Bicarbonat-Sensibilisierungspuffer (s. 3.2.5.2). Die Durchführung des ELISA erfolgte sonst wie unter 3.2.5.3 beschrieben.

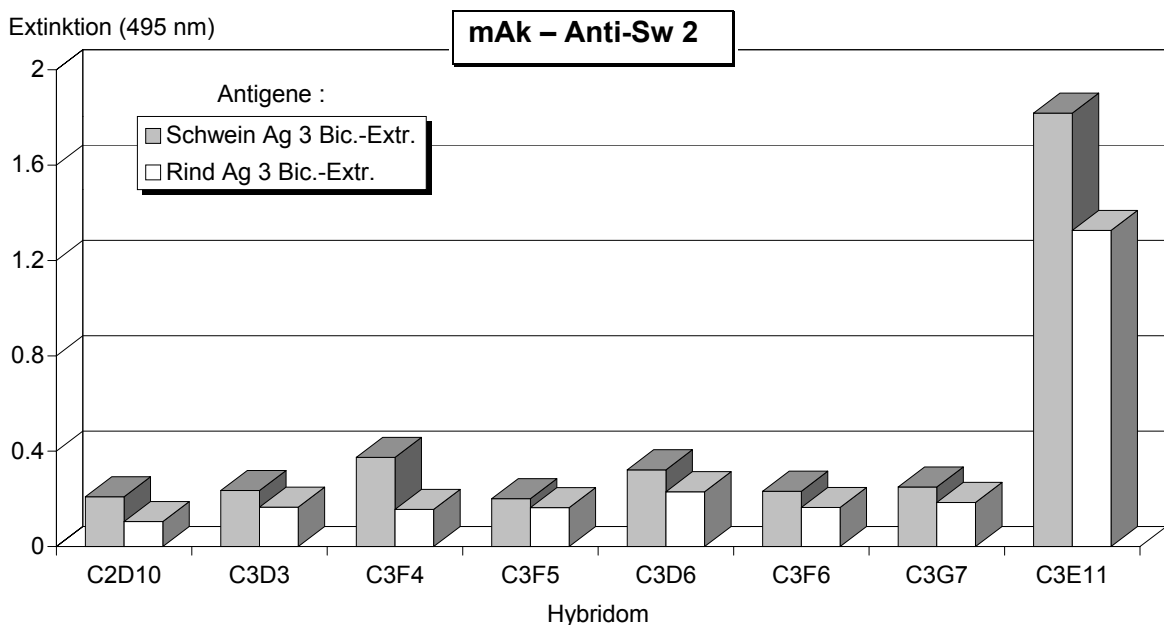


Abbildung 5: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 2 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 3-Bicarbonatextrakt vom Schwein bzw. Rind

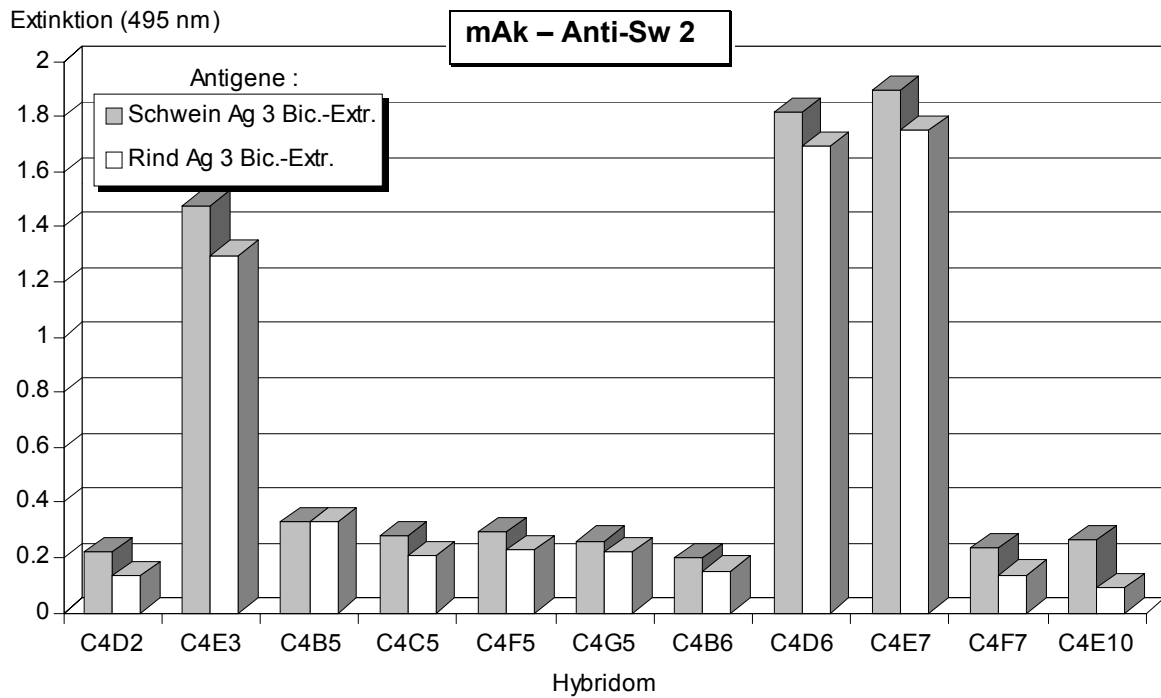


Abbildung 5a: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 2 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 3-Bicarbonatextrakt vom Schwein bzw. Rind

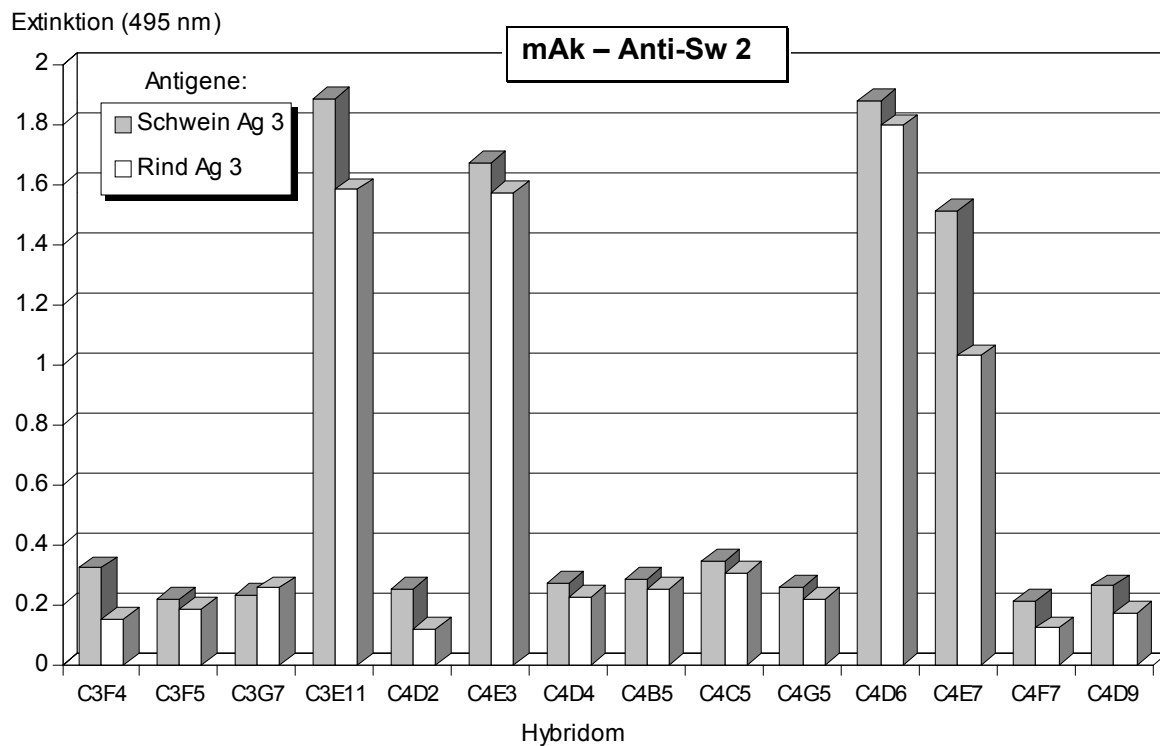


Abbildung 6: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 2 vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 3 vom Schwein bzw. Rind

Nach dem ersten ELISA zeigten nur 19 Hybridome Antikörperreaktionen mit Extinktionen $> 0,200$ gegen die Antigenaufbereitung 3-Bicarbonatextrakt vom Schwein (s. Abb. 5 u. 5a). Alle Antigen-Antikörper-Reaktionen im Vergleich Antigen vom Schwein zu Antigen vom Rind waren wenig spezifisch bzw. unspezifisch.

Zusätzlich wurden die Reaktionen der Hybridomantikörper im ELISA mit den Antigenen der Antigenaufbereitung 3 (Harnstoffextrakt des AcTP) vom Schwein bzw. Rind getestet (s. Abb. 6). Es zeigte sich, dass die Antikörper aus dieser Zellfusion sowohl mit den homologen Antigenen (s. Abb. 5 und 5a) als auch mit den heterologen Antigenen von Rind bzw. Schwein aus der Antigenaufbereitung 3 (s. Abb. 6) unspezifisch reagierten.

Nach weiterer Zellkultivierung und einem erneuten ELISA zeigte sich, dass viele Hybridome keine Antikörper mehr produzierten. Einige Hybridome bildeten dagegen erst jetzt eine ausreichende Antikörpermenge, die im ELISA zu Extinktionen $> 0,200$ führte (s. Abb. 7). Die in der Abbildung 7 dargestellten Hybridome wurden subkloniert und die Klone dann erneut im ELISA auf ihre Antikörperbildung überprüft. Von diesen Klonen produzierte nur noch der Klon des Hybridoms C4D10 Antikörper.

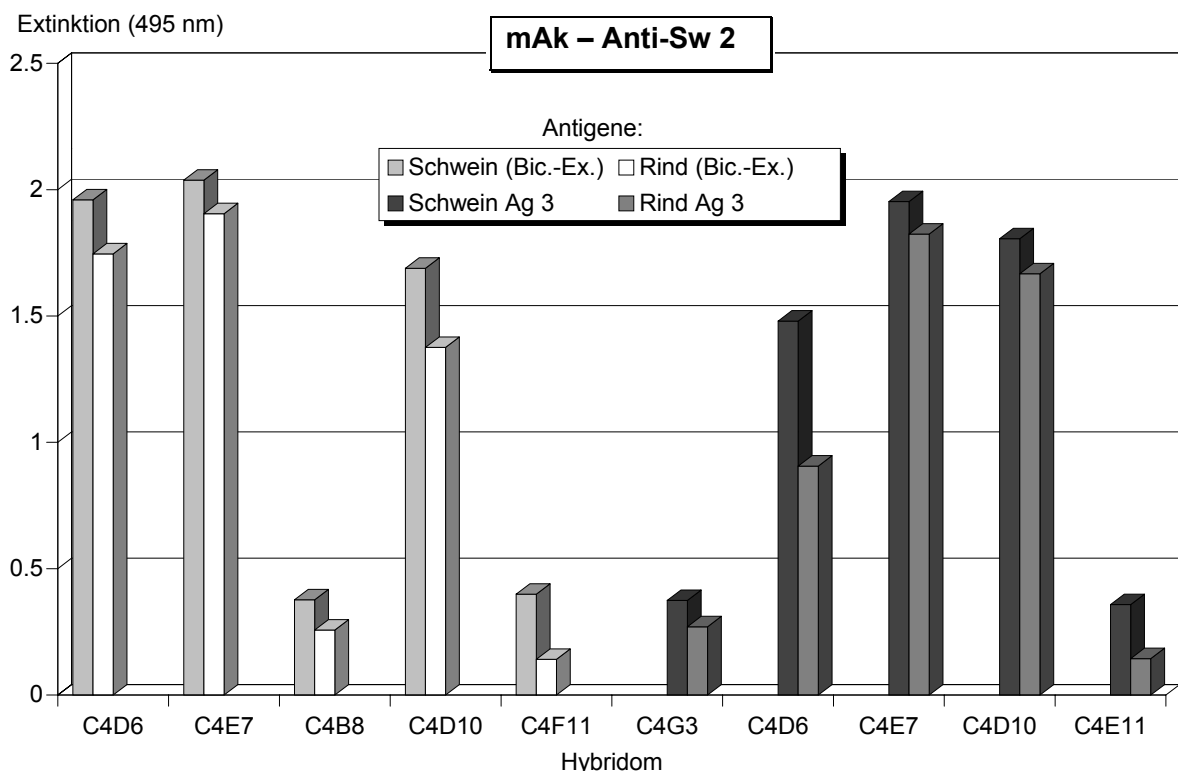


Abbildung 7: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Hybridomantikörper (Anti-Schwein Ag 2) nach weiterer Zellkultivierung mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind aus der Antigenaufbereitung 3 und dem AcTP-Bicarbonatextrakt

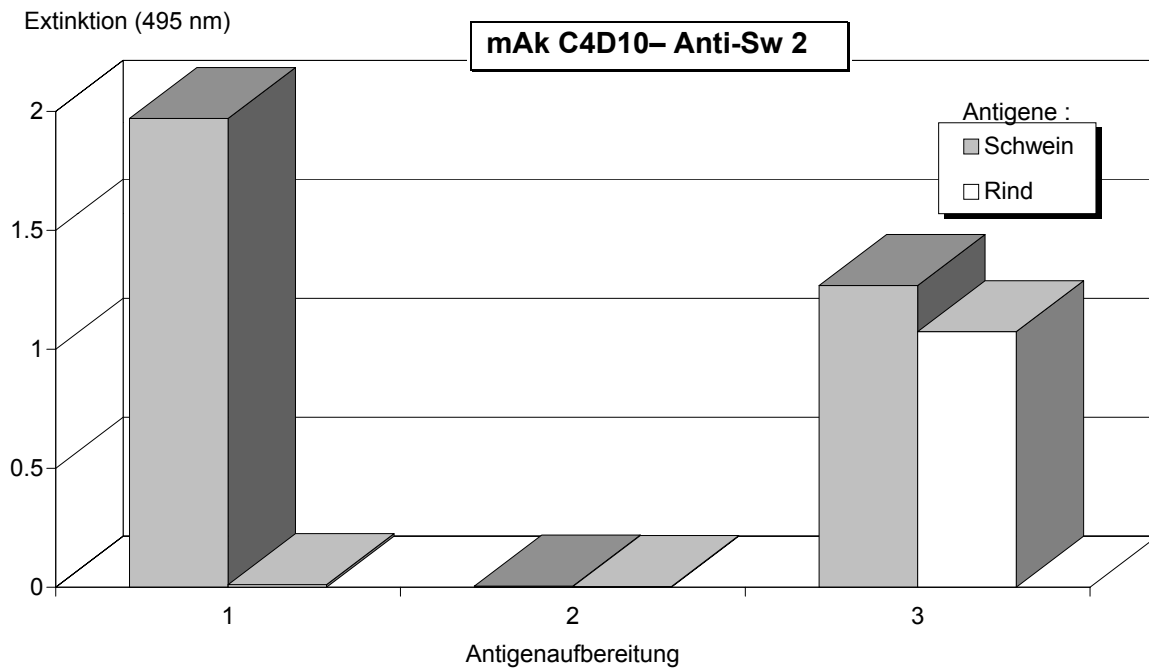


Abbildung 8: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Antikörper des Subklons C4D10 aus der Zellfusion mit Antigen 2 vom Schwein stimulierten Lymphozyten mit den Antigenaufbereitungen 1, 2 und 3 vom Schwein bzw. Rind

Diese wurden im ELISA auf ihre Reaktionen gegen die Antigene der Antigenaufbereitungen 1, 2 und 3 von Schwein bzw. Rind untersucht (s. Abb. 8). Das Ergebnis war insofern überraschend, als dass die Antikörper gegen die Antigene der Antigenaufbereitung 2 (Impfantigene) nicht reagierten, dagegen in ihrer Reaktion gegen die Antigene der Antigenaufbereitung 1 hochspezifisch waren. Die Reaktionen gegen die Antigene der Antigenaufbereitung 3 waren wie erwartet unspezifisch.

Weitere Untersuchungen blieben ohne Ergebnis, da die Klonzellen zwar weiter wuchsen, aber keine Antikörper mehr bildeten.

3.3.2.2 Antigen 2 vom Rind

Zwei Zellfusionen wurde mit Lymphozyten, die mit der Antigenaufbereitung 2 vom Rind stimuliert waren, durchgeführt. Die erste Zellfusion führte nicht zur Entwicklung von Hybridomen. Bei der zweiten Zellfusion entwickelten sich zahlreiche Hybridome, die 12 Tage nach der Fusion auf die Bildung von Antikörpern im ELISA untersucht wurden. Im Nährmedium fast aller Kavitäten konnten Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch war in nur 29 Kavitäten auch das Wachstum von Hybridomen bei mikroskopischer Überprüfung feststellbar. Die Reaktionen der Antikörper dieser Hybridome wurden im ELISA sowohl gegen die Antigenaufbereitung 2 als auch die Antigenaufbereitung 3 vom Rind bzw. Schwein untersucht. In den Abbildungen 9 und 10 wurden die Ergebnisse im einzelnen dargestellt.

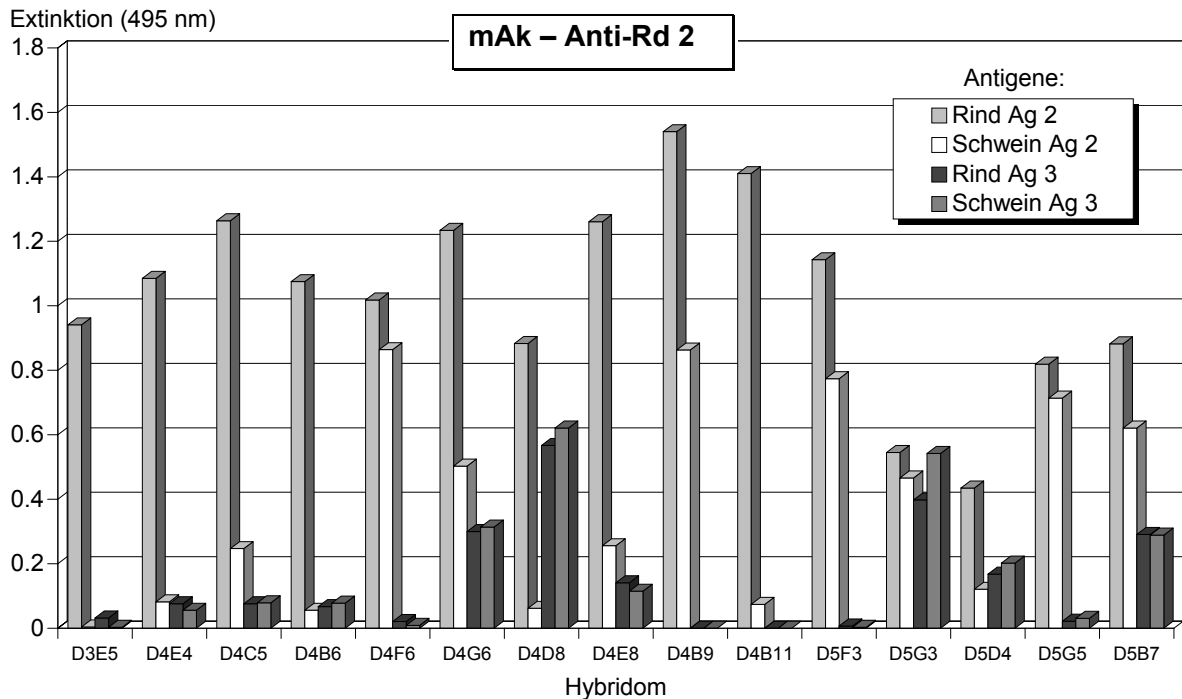


Abbildung 9: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 2 vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenaufbereitungen 2 und 3 vom Schwein bzw. Rind

Insgesamt war festzustellen, dass die Extinktionswerte gegenüber dem homologen Impfantigen überwiegend $> 1,000$ waren. Außerdem zeigten die Antikörper von acht Hybridomen mit Extinktionswerten von $< 0,020$ gegenüber dem Antigen 2 vom Schwein sehr spezifische Reaktionen. Daneben waren auch Extinktionswerte zu messen, die einen schrittweisen Übergang zu unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen darstellten. Es wurden aber in keinem Fall gleiche oder höhere Extinktionswerte gegen das heterologe Antigen (Antigenaufbereitung 2 vom Schwein) erreicht.

In einer weiteren Testreihe erfolgte die Überprüfung der Antikörperreaktionen gegen die Antigene aus der Antigenaufbereitung 3 von Rind und Schwein. Drei Hybridome konnten nicht mehr überprüft werden, da sie ihr Wachstum bereits eingestellt hatten. Insgesamt zeigten sich hier deutlich schwächere Reaktionen gegen das Antigen vom Rind als gegen das homologe Impfantigen. Gleichzeitig überwogen die unspezifischen Reaktionen, wobei gegen das Antigen vom Schwein oft gleiche oder sogar höhere Extinktionswerte erreicht wurden. Die Antikörper von nur vier Hybridomen (D1B2, D3C4, D3F4 und D4F6) zeigten auch hier spezifische Reaktionen. Die Spezifität eines Antikörpers in der Reaktion mit den Antigenen der beiden Antigenaufbereitungsarten verlief nicht immer gleichförmig und konnte sich unterscheiden wie bei dem Hybridom D3C4.

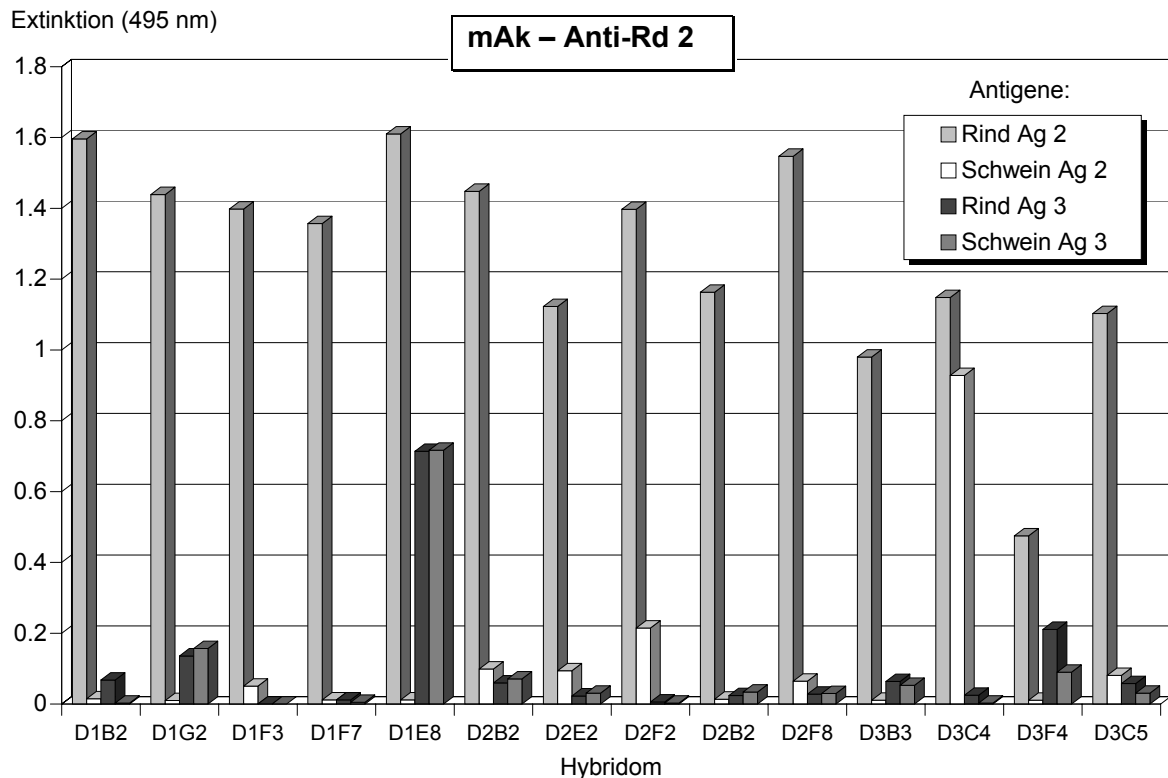


Abbildung 10: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA

Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 2 vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenaufbereitungen 2 und 3 vom Schwein bzw. Rind

3.3.3 Antikörpernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 3 (s. 3.2.1.3) stimulierten Lymphozyten

3.3.3.1 Antigen 3 vom Schwein

Mit der Antigenaufbereitung 3 vom Schwein stimulierten Lymphozyten wurde eine Zellfusion durchgeführt. Aus dieser Fusion gingen zahlreiche, sich gut entwickelnde Hybridome hervor, so dass nach sechs Tagen der erste Nährmediumwechsel erfolgte. Nach weiteren sechs Tagen wurde der erste ELISA zum Nachweis von antikörperbildenden Hybridomen durchgeführt. Dazu wurden als Antigene die Antigenaufbereitung 3 vom Schwein (Impfantigen) bzw. Rind verwendet.

Bei der ersten Untersuchung konnten insgesamt 45 antikörperbildende Hybridome mit Extinktionen > 0,200 gegen das homologe Antigen nachgewiesen werden. Die meisten Antigen-Antikörper-Reaktionen waren unspezifisch und führten zu fast gleichen Extinktionen gegen die Antigene vom Schwein bzw. Rind. Die zehn Antigen-Antikörper-Reaktionen, die die größten Differenzen bei den Extinktionswerten zeigten, sind in Abbildung 11 dargestellt. Hier reagierten nur die Antikörper des Hybridoms E3D5 spezifisch.

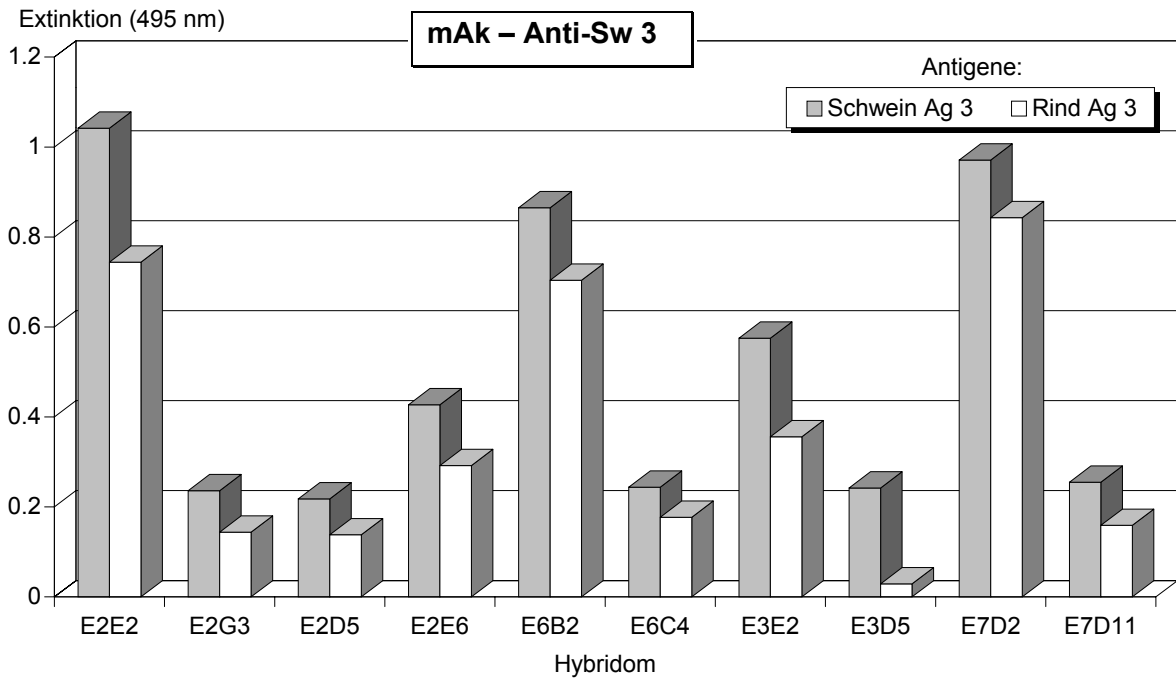


Abbildung 11: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 3 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, mit der Antigenaufbereitung 3 vom Schwein bzw. Rind

In weiteren Untersuchungen wurden die Reaktionen der Hybridomantikörper gegen die Antigenaufbereitungen 1 vom Schwein bzw. Rind überprüft. Dabei reagierten Antikörper von nur vier Hybridomen mit diesen Antigenen mit Extinktionswerten > 0,200 (s. Abb. 12).

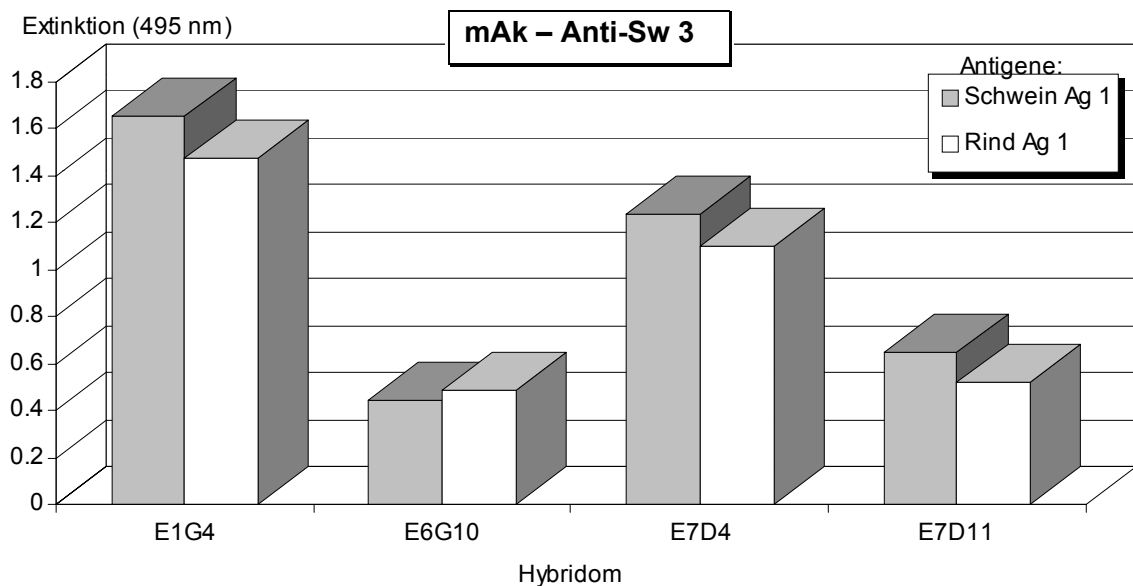


Abbildung 12: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Darstellung der 4 Hybridomantikörper aus der Zellfusion, mit der Antigenaufbereitung 3 vom Schwein stimulierten Lymphozyten, die mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind reagierten

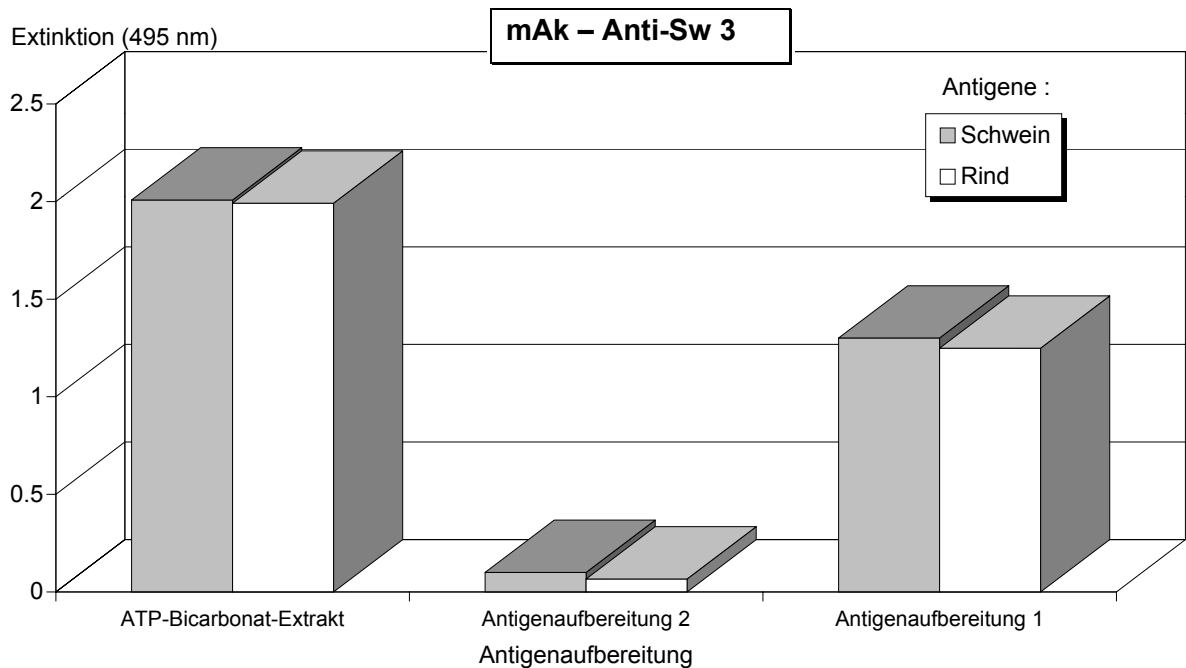


Abbildung 13: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Antikörper des Hybridoms E7D11 mit den Antigenaufbereitungen 1, 2 und 3
 (AcTP-Bicarbonat-Extrakt) vom Schwein bzw. Rind

Die Reaktionen der Antikörper aller vier Hybridome gegen diese Antigene waren unspezifisch. Allein der Antikörper des Hybridoms E7D11 (s. Abb. 13) reagierte mit den Antigenaufbereitungen 1, 2 und 3 (AcTP-Bicarbonat-Extrakt) vom Schwein bzw. Rind. Auch diese Reaktionen waren unspezifisch.

Weitere Untersuchungen wurden nicht durchgeführt, da das den einzig spezifisch reagierenden Antikörper dieser Versuchsreihe bildende Hybridom E3D5 diesen nicht mehr produzierte.

3.3.4 Antikörpernachweis nach Zellfusion mit Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) stimulierten Lymphozyten

3.3.4.1 Untersuchung der Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration im ELISA mit gegen Rind und Schwein gerichteten Antiseren vom Kaninchen

Zur Ermittlung für die Immunisierung besonders geeigneter Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration des Rinder- bzw. Schweinemuskelextraktes wurden diese im ELISA mit verschiedenen aus früheren Versuchen zur Speziesidentifizierung stammenden institutseigenen Kaninchen-Anti-Rind- bzw. -Anti-Schwein-Sera untersucht. Diese stammten aus Immunisierungen mit unterschiedlich erhitzten (70 – 100 °C) und extrahierten

(RAVESTEIN-Modus und Harnstoffextrakt) Antigenen (s. 3.1.3). Ziel der Untersuchung war zu ermitteln, ob bestimmte Proteinkonzentrate Antigene enthielten, die im ELISA für besonders tierartsspezifische Reaktionen verantwortlich waren. Damit sollte eine Eingrenzung auf solche Proteinkonzentrate (Antigene) für die Immunisierung erfolgen, gegen die die Bildung hochspezifischer Antikörper eher erwartet werden konnte. Proteinkonzentrate, die solche Antigene enthielten, sollten dann für die Immunisierung der Mäuse eingesetzt werden.

In den Abbildungen 14 und 15 sind die Extinktionen der ELISA der Anti-Schwein-Sera mit den Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration des Rinder- bzw. Schweinemuskelextraktes dargestellt. Die Reaktionen der vier verschiedenen Anti-Schwein-Sera gegen die einzelnen Proteinkonzentrate vom Schweinemuskelextrakt unterschieden sich außer in der Höhe der Extinktionen nicht von einander. Während die Reaktionen aller Anti-Schwein-Sera gegen das 1. Proteinkonzentrat (MG > 300 kDa) am schwächsten war, stiegen die Extinktionen bereits beim 2. Proteinkonzentrat (MG 100 - 300 kDa) auf deutlich höhere Werte an, die auch bei den anderen Proteinkonzentraten erreicht wurden. Nur gegen das 5. Proteinkonzentrat (MG 10 - 30 kDa) reagierten alle vier Anti-Schwein-Sera etwas schwächer.

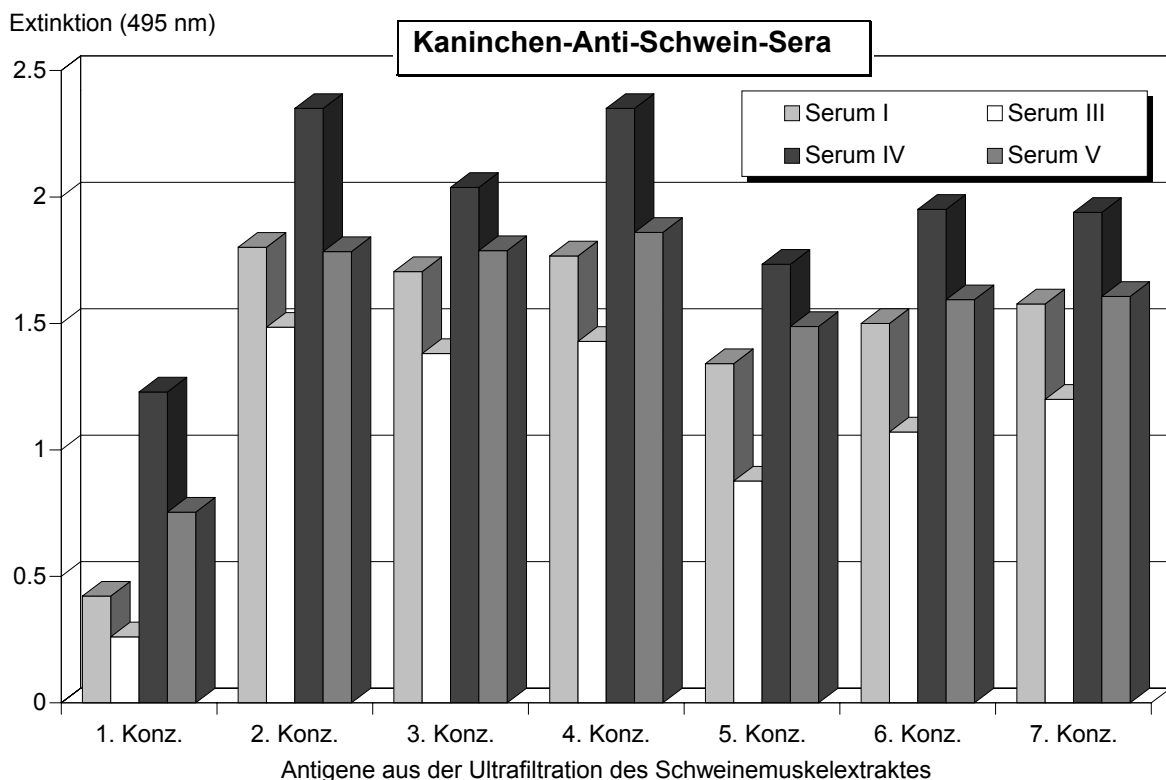


Abbildung 14: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Kaninchen-Sera-Antikörper (Anti-Schwein) mit den sieben Proteinkonzentraten aus der Antigenaufbereitung 4 vom Schwein

Auch bei dem ELISA mit den Proteinkonzentraten vom Rindermuskelextrakt zeigten die vier Anti-Schwein-Sera ein überwiegend gleiches Reaktionsmuster. So waren die Reaktionen gegen das 1. Proteinkonzentrat vom Rindermuskelextrakt am schwächsten. Die Extinktionen stiegen dann beim 2. und 3. Proteinkonzentrat weiter an, um beim 4. Proteinkonzentrat (MG 30 - 50 kDa) ein Maximum zu erreichen. Dabei wurden Extinktionswerte gemessen, die denen der Reaktionen gegen die Proteinkonzentrate vom Schweinmuskelextrakt entsprachen bzw. sie übertrafen.

Daraus war ersichtlich, dass die unspezifischen Reaktionen der Anti-Schwein-Sera mit den Rindermuskelantigenen mit abnehmenden Molekulargewichten der Antigene zunahm. Die Antikörper der Anti-Schwein-Sera zeigten bei der Reaktion gegen die Antigene des 2. Proteinkonzentrates (MG 100 - 300 kDa) von Rind bzw. Schwein die größte Differenz der Extinktionswerte. Die Schweinmuskelantigene aus diesem Molekulargewichtsbereich verursachten die geringsten unspezifischen Reaktionen.

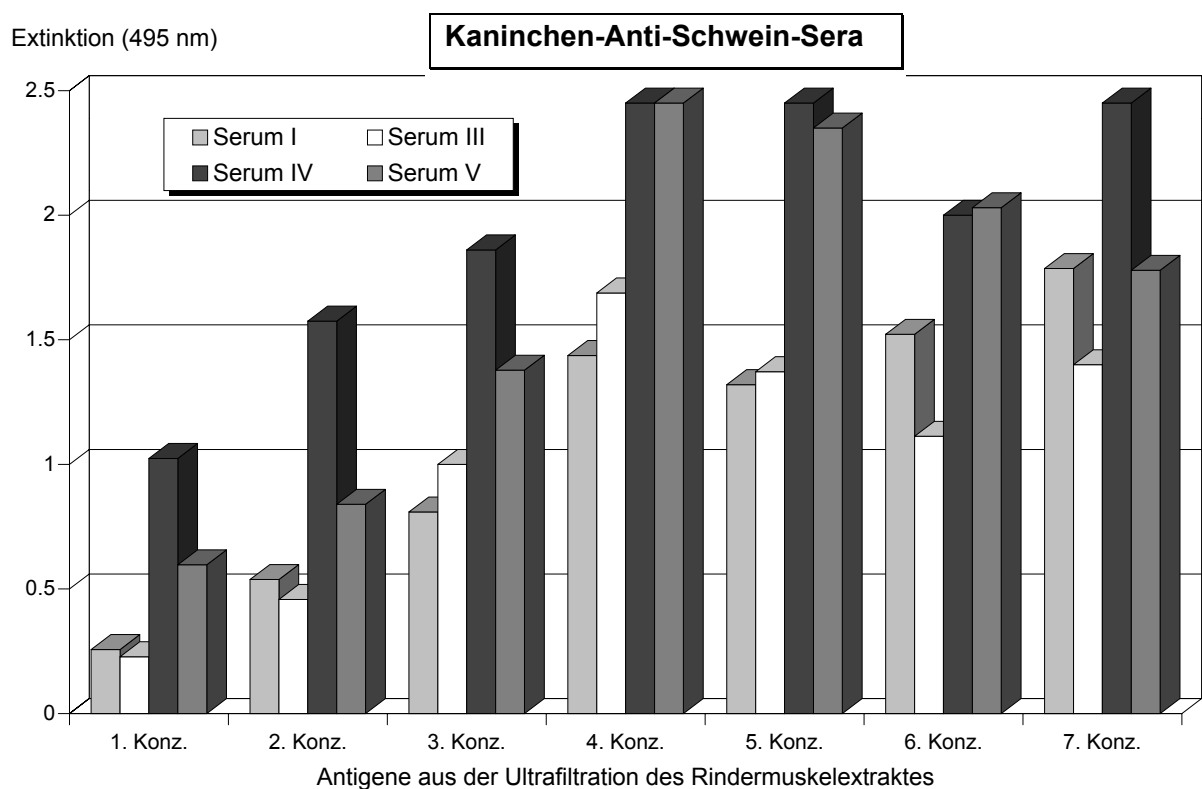


Abbildung 15: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Kaninchen-Sera-Antikörper (Anti-Schwein) mit den sieben Proteinkonzentraten aus der Antigenaufbereitung 4 vom Rind

In den Abbildungen 16 und 17 sind die Reaktionen der Anti-Rind-Sera mit den einzelnen Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration des Rinder- bzw. Schweinmuskelextraktes dargestellt. Die Reaktionen der fünf verschiedenen Anti-Rind-Sera gegen die Protein-

konzentrate des Rindermuskelextraktes verliefen überwiegend nach gleichem Muster, wie aus Abbildung 16 zu ersehen ist. Bei dem 1. Proteinkonzentrat wurden die niedrigsten Extinktionswerte gemessen. Die Extinktionen stiegen beim 2. und 3. Proteinkonzentrat an, um beim 4. Proteinkonzentrat ein Maximum zu erreichen. Auf diesem Niveau lagen auch die Extinktionen der Reaktionen gegen das 5. bis 7. Proteinkonzentrat vom Rindermuskelextrakt. Nur die Extinktionswerte des 2. Kaninchen-Anti-Rind-Serums lagen etwas niedriger. Die Reaktionen der Anti-Rind-Sera mit den Proteinkonzentraten aus dem Schweinemuskel-extrakt waren im hohen Maße unspezifisch und erreichten Extinktionen wie bei den Protein-konzentraten aus der Rindermuskulatur (s. Abb. 17). Nur das 1. Kaninchen-Anti-Rind-Serum reagierte gegen die Schweinemuskelantigene nicht so unspezifisch und wies gegen das erste Proteinkonzentrat vom Rindmuskelextrakt eine dreimal höhere Extinktion als gegen das erste Proteinkonzentrat vom Schweinemuskelextrakt auf.

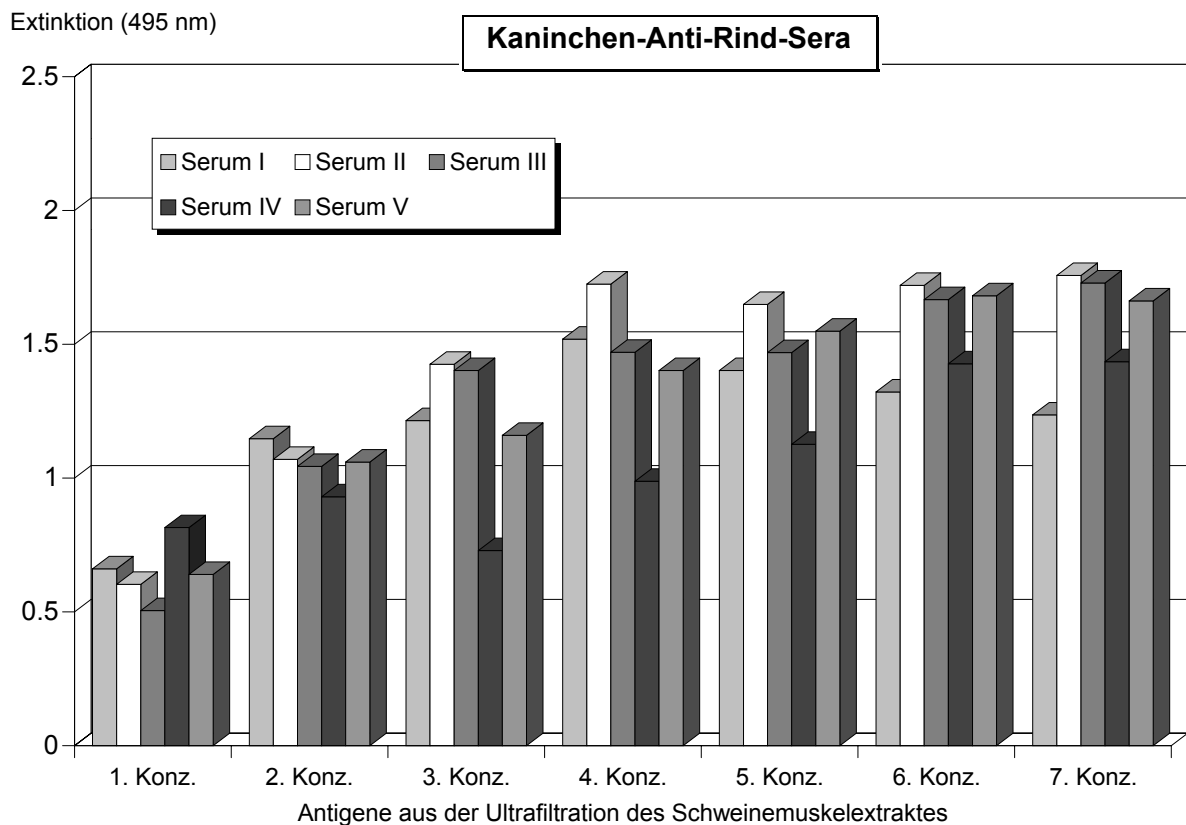


Abbildung 16: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Kaninchen-Sera-Antikörper (Anti-Rind) mit den sieben Proteinkonzentraten aus der Antigenaufbereitung 4 vom Schwein

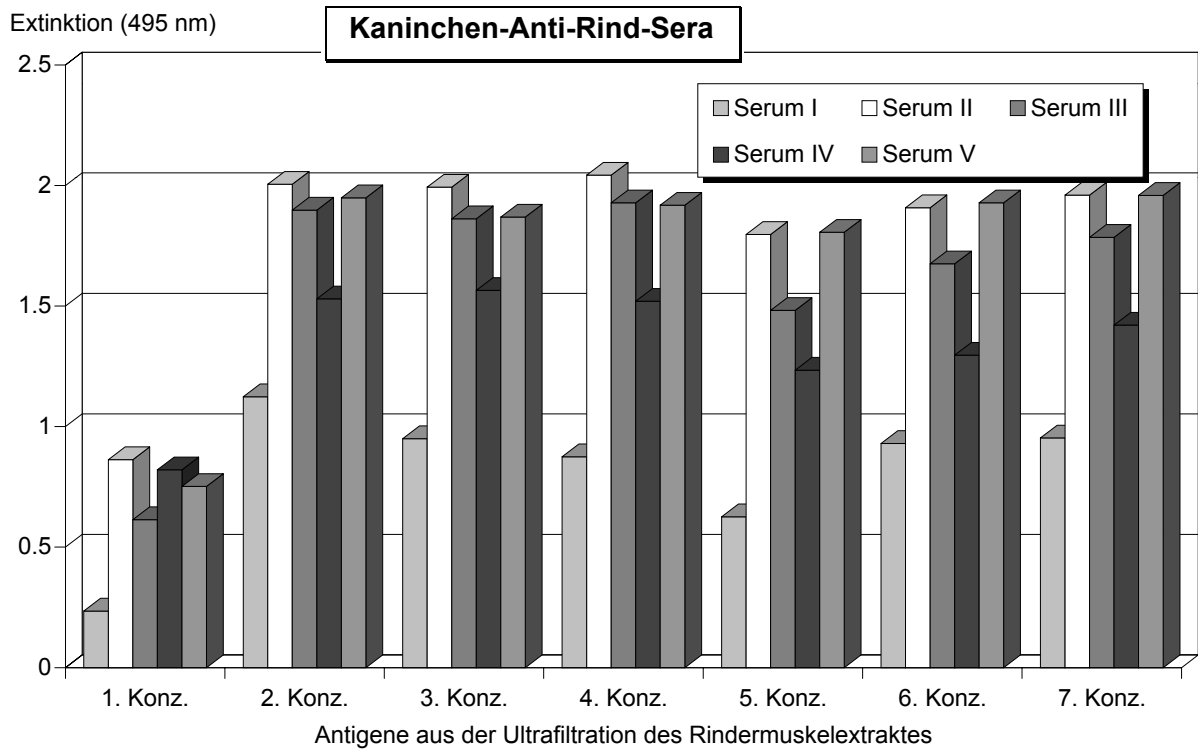


Abbildung 17: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Kaninchen-Sera-Antikörper (Anti-Rind) mit den sieben Proteinkonzentraten aus der Antigenaufbereitung 4 vom Rind

Insgesamt gab es keine Proteinkonzentrate, die sich durch besonders spezifische Reaktionen auszeichnen konnten. Vielmehr schien es Schweinemuskelantigene zu geben, die im Gegensatz zu den Rindermuskelantigenen unabhängig vom Molekulargewicht für die unspezifischen Reaktionen verantwortlich waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse erschienen die hochmolekularen Proteinkonzentrate am ehesten für die Immunisierung geeignet.

3.3.4.2 Antigen 4 vom Schwein (MG 2. Proteinkonzentrat 100 - 300 kDa)

Mit dem 2. Proteinkonzentrat (MG 100 - 300 kDa) aus dem Schweinemuskelextrakt der Antigenaufbereitung 4 wurden zwei Mäuse immunisiert und später zwei Zellfusionen durchgeführt. Vierzehn Tage nach der Fusion hatten sich in mehr als 50% der Kavitäten der Zellkulturplatten Hybridome entwickelt.

Der erste ELISA (s. 3.2.5) zum Nachweis von Antikörpern erfolgte 16 Tage nach der Zellfusion. Als Testantigene wurden die Proteine aus dem Rinder- bzw. Schweinemuskelextrakt der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) verwendet. Die Antikörperreaktionen waren überwiegend unspezifisch. 30 Hybridome (s. Abb. 18 u. 18a) zeigten Reaktionen im ELISA, die zu Extinktionswerten mit dem Antigen vom Schwein $> 0,200$ und mit dem Antigen vom Rind $< 0,200$ führten.

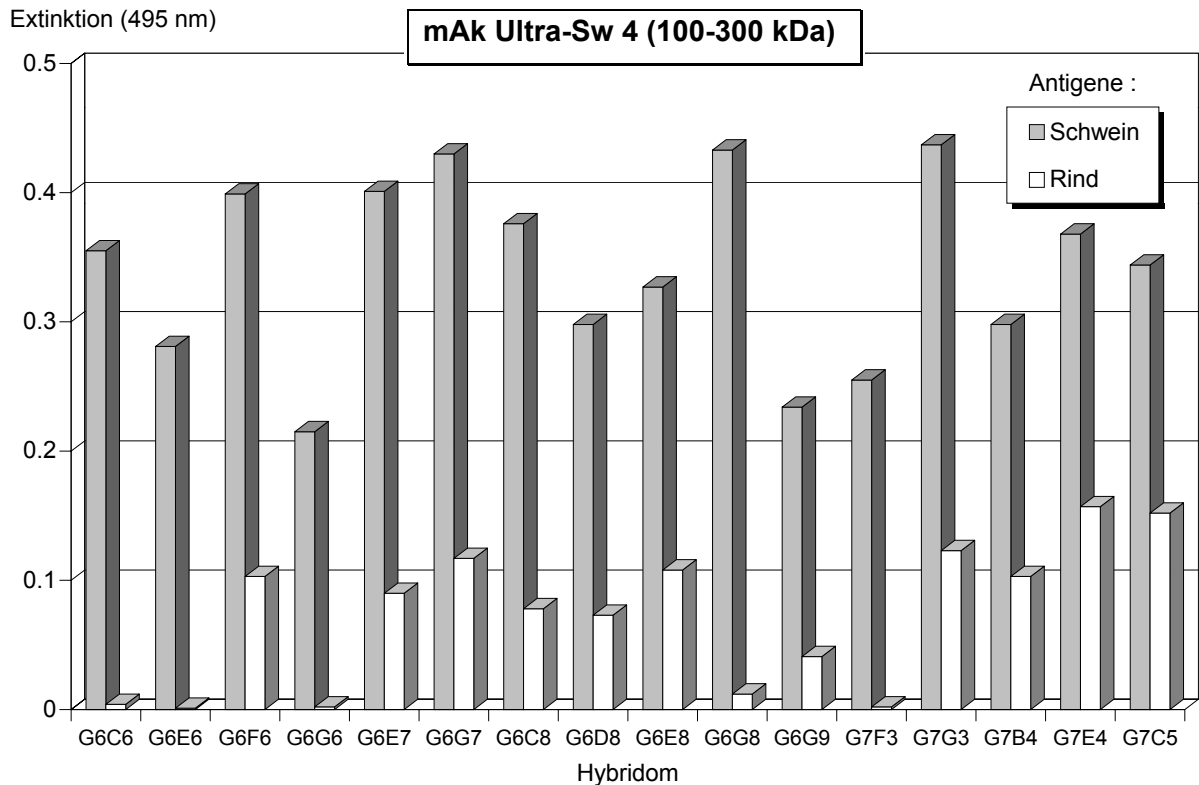


Abbildung 18: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA

Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 vom Schwein 2. Proteinkonzentrat stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

Bei der Kultivierung der Hybridome und Überprüfung derer Antikörperbildung im ELISA zeigten nach weiteren 14 Tagen nur noch drei Hybridome eine ausreichend spezifische Antikörperreaktion (s. Abb. 19). Anschließend wurden die Hybridome G6G9 und G7B4 subkloniert, da die Möglichkeit zur Etablierung eines stabilen Klons mit Bildung spezifischer Antikörper aus einem dieser Hybridome am größten erschien. Die Zellen in G6G8 waren zugrunde gegangen und standen daher einer Subklonierung nicht mehr zur Verfügung.

Nach der Subklonierung wurden die fünf Subklone vom Hybridom G7B4 und die 4 Subklone vom Hybridom G6G9 in weiteren ELISA auf ihre Antikörperbildung bzw. Antikörperreaktionen untersucht. Zu diesem Zweck waren die ELISA-Platten mit den Antigenen der einzelnen Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4) sensibilisiert worden. Es zeigte sich, dass die Subklone des Hybridoms G6G9 die Fähigkeit zur Antikörperbildung völlig verloren hatten. Die Reaktionen der Antikörper der fünf Subklone des Hybridoms G7B4 mit den einzelnen Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration des Schweine- bzw. Rindermuskelextraktes sind in Abbildung 20 dargestellt.

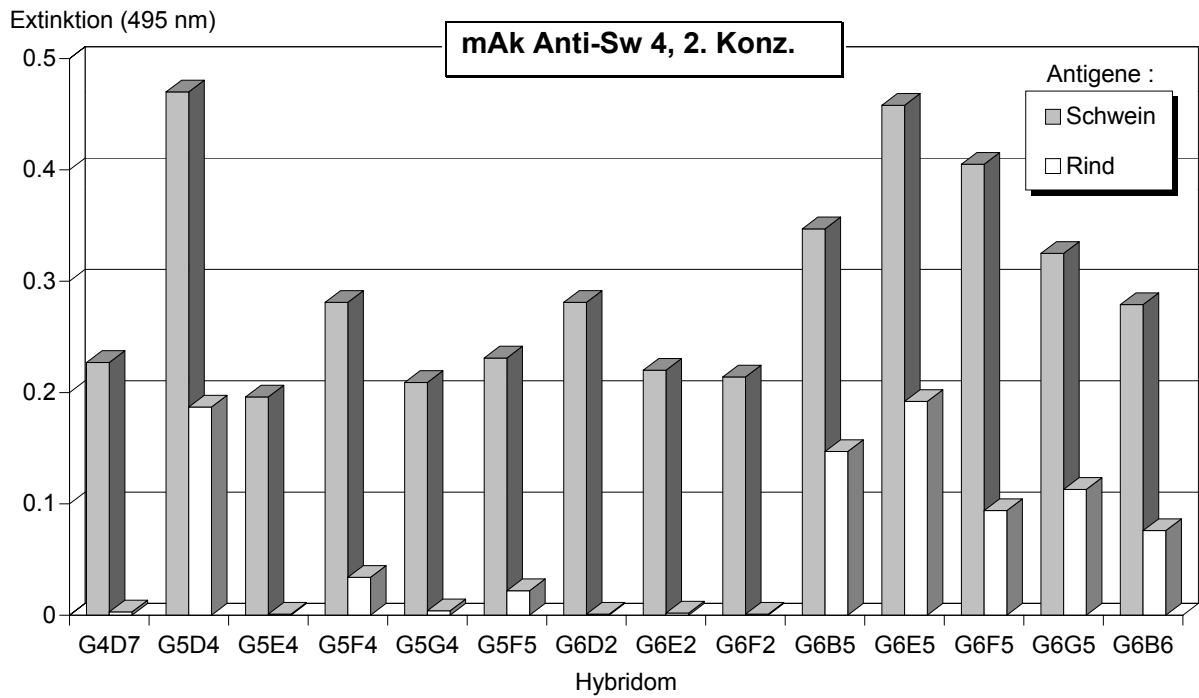


Abbildung 18a: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Schwein) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 vom Schwein 2. Proteinkonzentrat stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

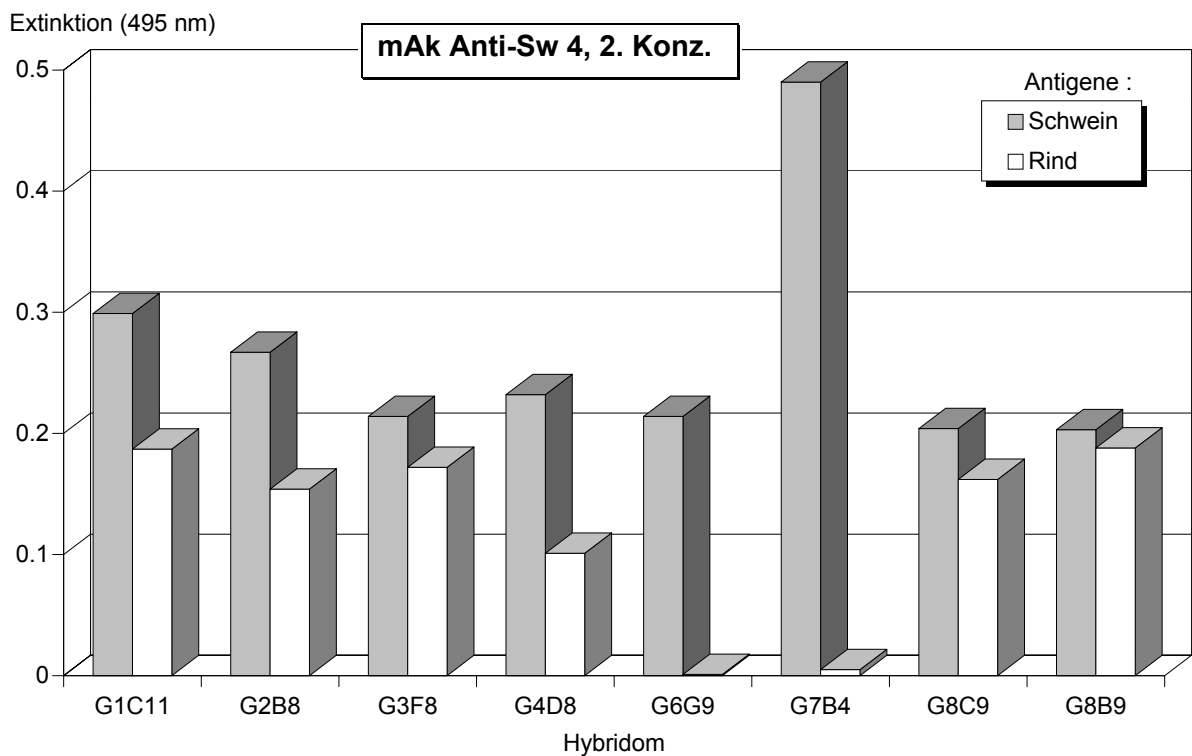


Abbildung 19: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktionen der Antikörper der Subklone von Hybridom G6G9 und G7B4 mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

Die Subklone 2, 4 und 5 produzierten nach wie vor Antikörper, während die Antikörperreaktionen der Subklone 1 und 3 stark nachgelassen hatten bzw. kaum noch vorhanden waren. Die Reaktionen der Antikörper der Subklone 2, 4 und 5 waren gegen die verschiedenen Proteinkonzentrate aus dem Schweinemuskelextrakt und dem Rindermuskelextrakt sehr unterschiedlich.

Die Antikörper reagierten besonders stark mit den Proteinkonzentraten MG 100 - 300 und 50 - 100 kDa vom Schwein. Die Reaktion mit dem Proteinkonzentrat MG 30 - 50 kDa war deutlich schwächer und gegen die anderen Proteinkonzentrate lag sie unter dem Extinktionswert von 0,200. Die gegen die Schweinemuskulatur gerichteten Antikörper reagierten damit vor allem mit Antigenen, die aus dem gleichen Molekulargewichtsbereich stammten wie die Impfantigenaufbereitung zur Immunisierung der Mäuse.

Die Reaktionen der Antikörper von den Subklonen 1 bis 5 mit den Proteinkonzentraten aus dem Rindermuskelextrakt stellten sich dagegen ganz anders dar. Wie erwartet waren die Reaktionen der gegen den Schweinemuskelextrakt gerichteten Antikörper mit den Proteinkonzentraten aus dem Rindermuskelextrakt sehr gering.

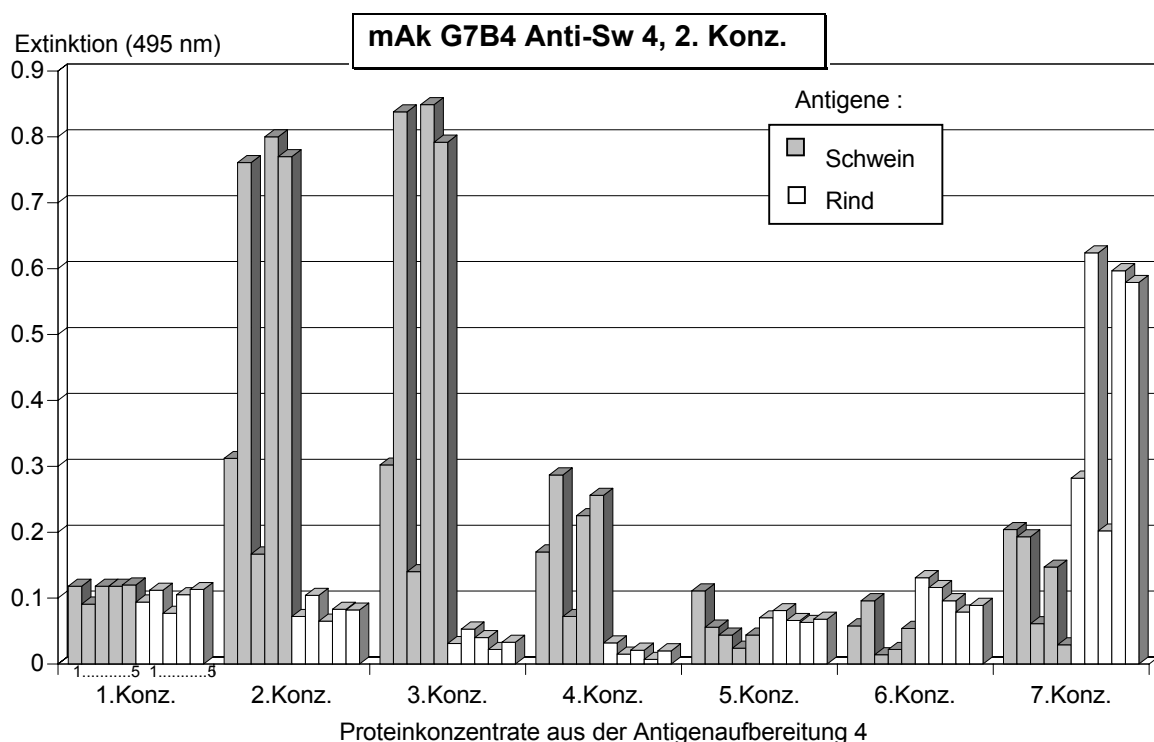


Abbildung 20: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Antikörper der fünf Subklone des Hybridoms G7B4 mit den sieben Proteinkonzentraten aus den Antigenaufbereitungen 4 vom Schwein bzw. Rind

Die Extinktionswerte lagen deutlich unter 0,200. Überraschend war die starke Reaktion dieser Antikörper mit den Rinderantigenen aus dem Molekulargewichtsbereich 1 - 3 kDa. Sie

war in diesem Bereich um ein Vielfaches stärker als gegen die Schweineantigene und erreichte Extinktionswerte bis 0,624.

Die Antikörper der Subklone 2, 4 und 5 des Hybridoms G7B4 zeigten mit den Antigenen im Molekulargewichtsbereich 50 - 100 kDa eine spezifische Reaktion gegen das homologe Antigen. Die Rinderantigene aus dem Molekulargewichtsbereich 1 - 3 kDa führten zu unspezifischen Reaktionen, die sich bei der Verwendung des gesamten Rindermuskel-extraktes als Antigen im ELISA nicht so stark ausprägten wie bei dem 7. Proteinkonzentrat aus der Ultrafiltration des Rindermuskelextraktes.

3.3.4.3 Antigen 4 vom Rind (1. und 2. Proteinkonzentrat)

Aus der Antigenaufbereitung 4 des Rindermuskelextraktes wurden sowohl das 1. Proteinkonzentrat (>300 kDa) als auch das 2. Proteinkonzentrat (100 - 300 kDa) zur Immunisierung jeweils einer Maus verwendet (s. 3.2.3.2). Drei Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die Zellfusion wie unter 3.2.4.5 beschrieben.

Bei beiden Zellfusionen erfolgte ein kompletter Nährmediumwechsel 9 Tage nach der Fusion. Auch hier zeigte sich bei ca. 50 % der Kavitäten ein Hybridomwachstum.

Ergebnisse aus der Zellfusion mit Antigen 4 vom Rind, 1. Proteinkonzentrat stimulierten Lymphozyten.

Der erste ELISA (s. 3.2.5) zum Nachweis von Antikörpern im Nährmedium aus den 480 Kavitäten der Zellkulturplatten (60 je Kulturplatte) wurde 16 Tage nach der Zellfusion durchgeführt. Dabei wurden die mit den Antigenen Rind bzw. Schwein aus der Antigenaufbereitung 4 sensibilisierten Testplatten (s. 3.2.5.2) verwendet.

Die Reaktionen gegen das Antigen 4 vom Rind waren unspezifisch bis hochspezifisch. In einzelnen Fällen zeigten sich sogar stärkere Extinktionen gegen das Antigen Schwein als gegen das Antigen Rind.

Insgesamt wurden in 37 Kavitäten Antikörper nachgewiesen, deren Extinktionen im ELISA gegen das Antigen Rind > 0,200 und gegen das Antigen Schwein < 0,020 betrugen (s. Abb. 21 u. 22).

Die Zellen von Hybridomen aus diesen Kavitäten wurden nach vorsichtigem Suspendieren auf andere mit Makrophagen vorbereitete Zellkulturplatten umgesetzt und nach 11 Tagen erneut im ELISA auf ihre Antikörperbildung untersucht.

Bei nur noch fünf von sieben Hybridomen konnten Antikörper im Nährmedium nachgewiesen werden, die im ELISA zu Extinktionen gegen das Antigen Rind von > 0,200 führten (s. Abb. 23).

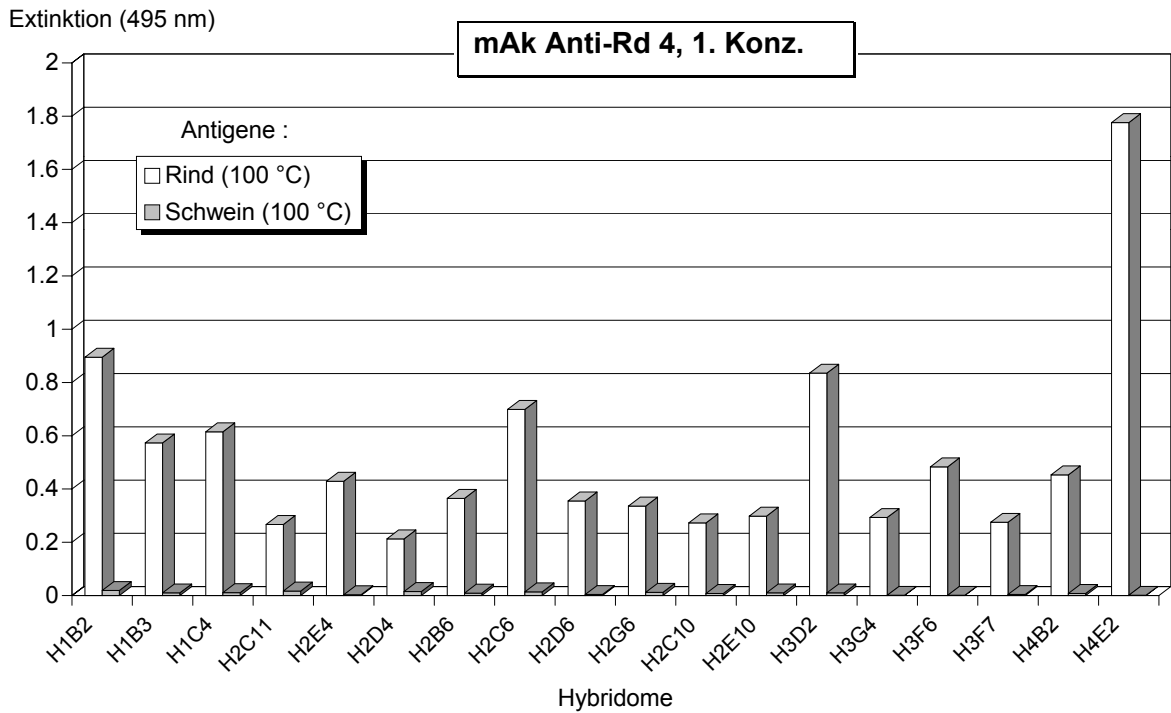


Abbildung 21: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 1. Proteinkonzentrat vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

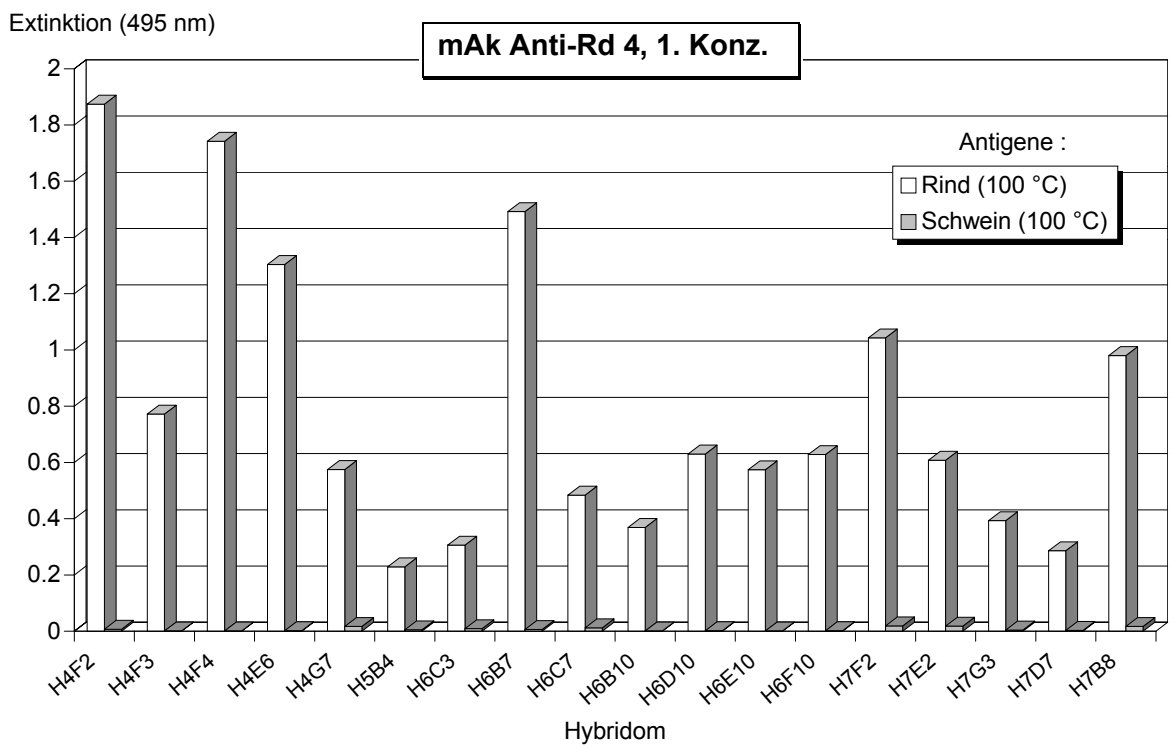


Abbildung 22: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 1. Proteinkonzentrat vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

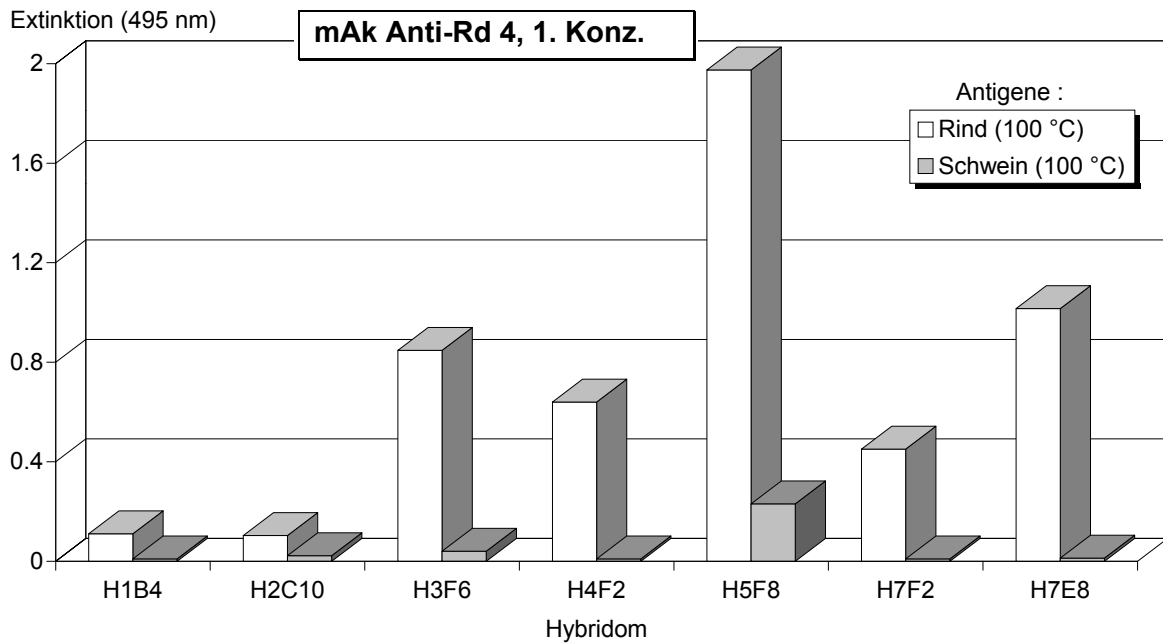


Abbildung 23: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktionen von fünf Hybridomantikörpern (Anti-Rind) nach dem Umsetzen der Hybridome auf neue Zellkulturplatten mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

Diese fünf Hybridome wurden subkloniert (s. 3.2.6) und die einzelnen Subklone 16 Tage später erneut auf ihre Antikörperbildung überprüft. Dabei zeigte sich, dass nur noch vier Subklone des Hybridoms H5F8 Antikörper bildeten (s. Abb. 24). Im ELISA konnten zwar auch Antikörper bei vier Subklonen des Hybridoms H7E8 festgestellt werden, die Klonzellen waren jedoch abgestorben.

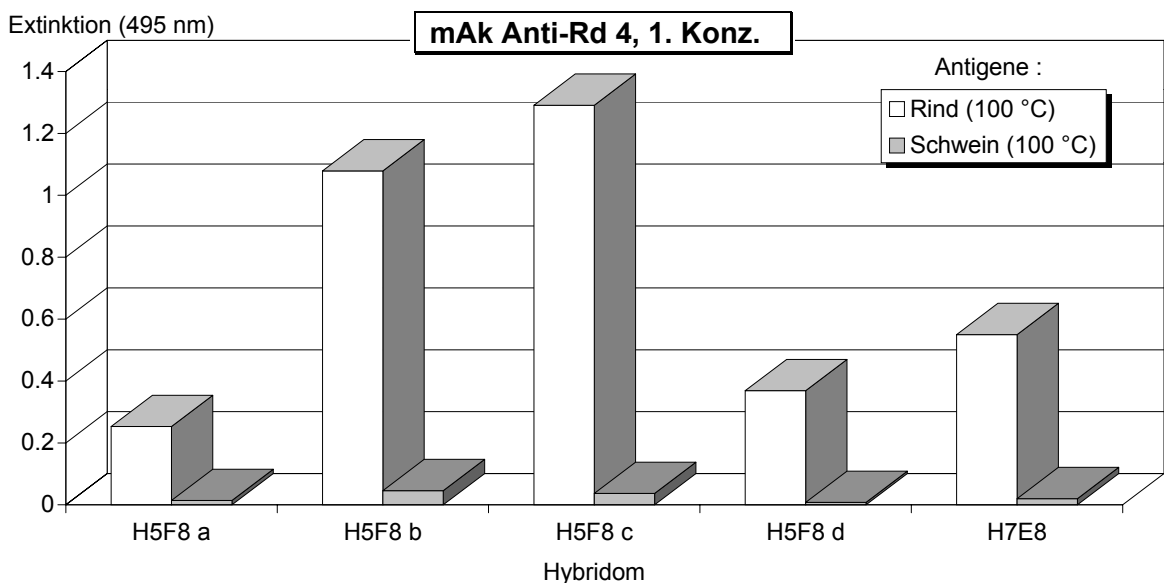


Abbildung 24: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion der Antikörper der Subklone a - d des Hybridoms H5F8 und des Hybridoms H7E8 mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

Ergebnisse aus der Zellfusion mit Antigen 4 vom Rind, 2. Proteinkonzentrat stimulierten Lymphozyten.

Der erste ELISA zum Nachweis von Antikörpern im Nährmedium aus den einzelnen Kavitäten der Zellkulturplatten wurde 17 Tage nach der Zellfusion durchgeführt. Bereits neun Tage nach der Fusion erfolgte der erste Nährmediumwechsel in den Kavitäten. Anschließend waren viele Hybridome nicht mehr gewachsen bzw. abgestorben. Wie aus Abbildung 25 und 25a zu ersehen ist, wurden deshalb nur noch 29 antikörperbildende Hybridome mit Extinktionswerten $> 0,200$ gegen das Antigen Rind nachgewiesen, wobei die meisten davon unspezifisch reagierten.

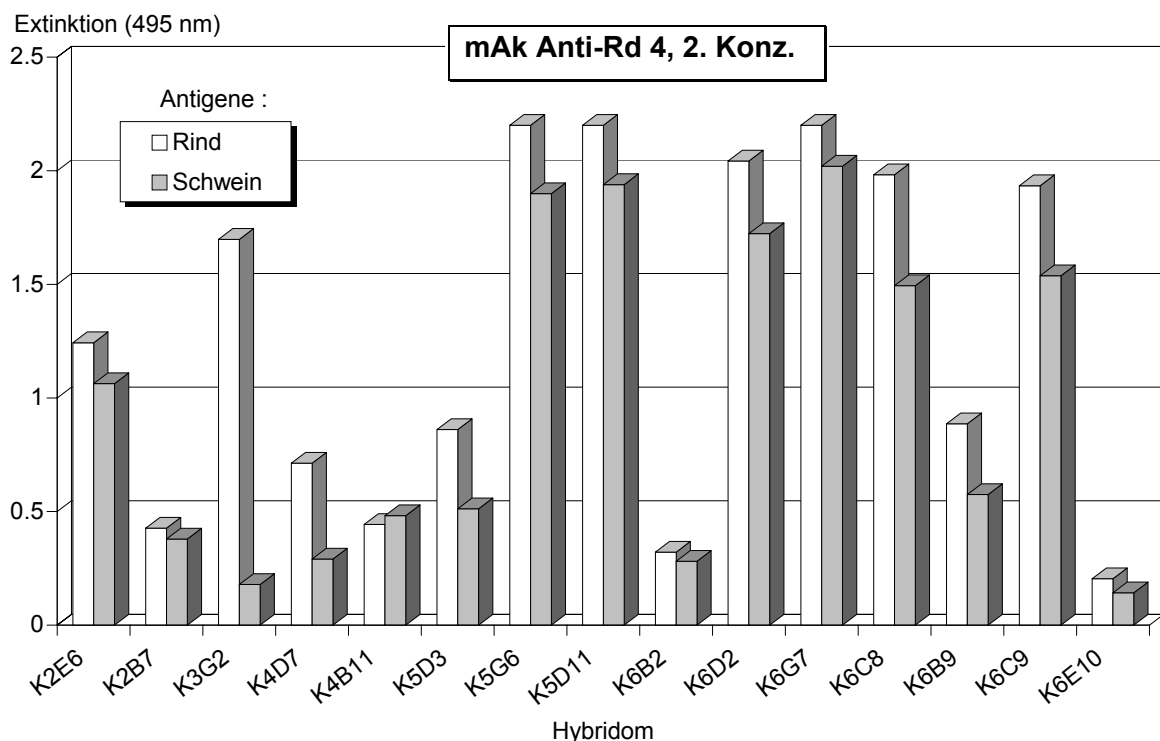


Abbildung 25: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA

Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 2. Proteinkonzentrat vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind (100 °C)

In einem zweiten ELISA elf Tage später wurde die Antikörperbildung dieser Hybridome überprüft (s. Abb. 26). Im Nährmedium von 12 Hybridomen konnten keine Antikörper gegen das Antigen Rind mehr festgestellt werden bzw. lagen die Extinktionswerte unter 0,200. Nur zwei der restlichen 17 Hybridome reagierten spezifisch (K3G2, K7B4). Deren Extinktionswerte lagen im ELISA mit dem Antigen Rind über 0,200 und mit dem Antigen Schwein unter 0,020.

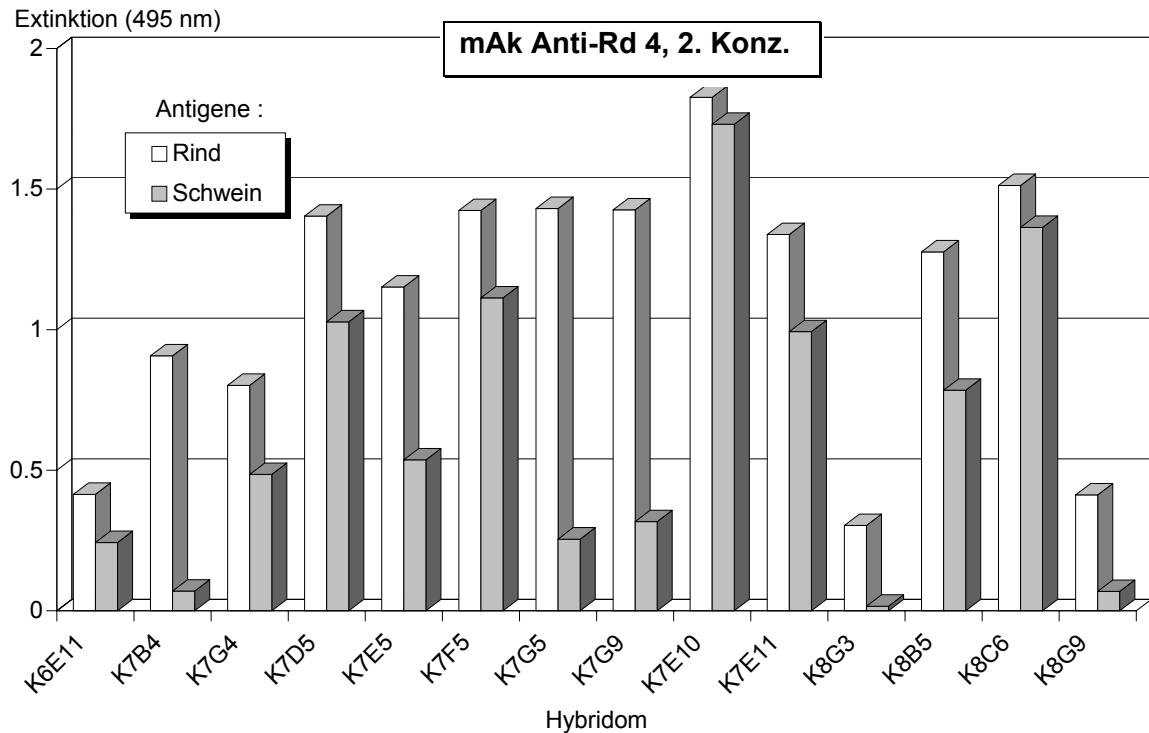


Abbildung 25a: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 2. Protein-
 konzentrat vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw.
 Rind (100 °C)

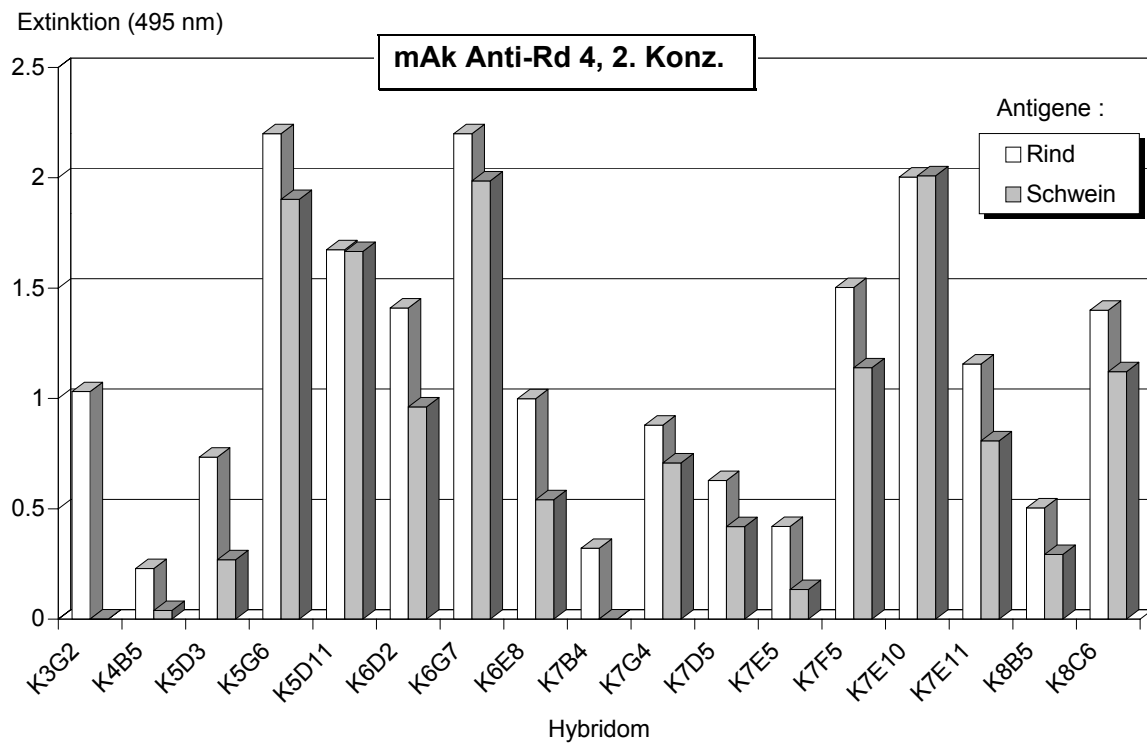


Abbildung 26: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Hybridom-Antikörper (Anti-Rind) nach der Zellfusion, mit Antigen 4 2. Protein-
 konzentrat vom Rind stimulierten Lymphozyten, mit den Antigenen vom Schwein bzw. Rind
 (100 °C) nach weiterer Zellkultivierung im 2. ELISA

Nur die beiden Hybridome K3G2 und K7B4 wurden weiter kultiviert. Im ELISA erfolgte die Überprüfung der Antikörperreaktionen mit den Antigenaufbereitungen 1 und 4 vom Rind bzw. Schwein sowie mit den Testantigenen verschiedener Tierarten (s. 3.2.2) in der Erhitzungsstufe 70 °C (s. Abb. 27). Der Antikörper des Hybridoms K3G2 zeigte eine deutlich positive Reaktion sowohl mit dem Antigen Rind in den Antigenaufbereitungen 1 und 4 als auch mit dem Testantigen Rind 70 °C. Daneben zeigten sich aber auch starke Reaktionen mit dem Testantigen Schaf 70 °C und der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein.

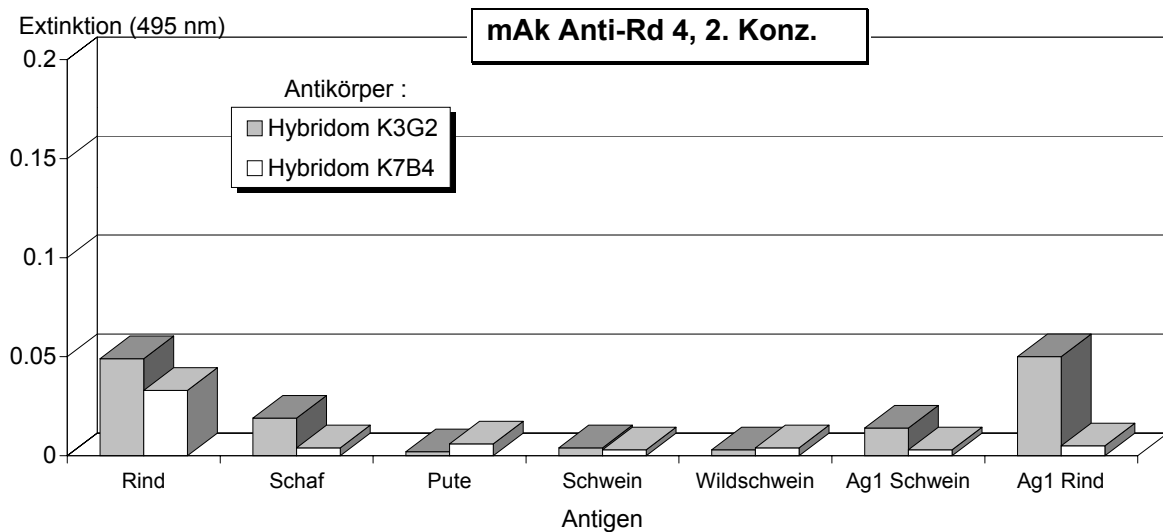


Abbildung 27: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion der Antikörper von Hybridom K3G2 und K7B4 mit den Testantigenen 70 °C und der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind

Der Antikörper des Hybridoms K7B4 war dagegen in seinen Reaktionen mit den verschiedenen Antigenen deutlich spezifischer. So reagierte dieser Antikörper nur mit dem Antigen 4 vom Rind und dem Testantigen Rind 70 °C. Die Extinktionswerte bei den anderen Antigenen lagen alle unter 0,020. Auch nach der Subklonierung zeigte der Antikörper des Klons K7B4 in einem weiteren ELISA seine hochspezifische Reaktion mit der Antigenaufbereitung 4 mit Extinktionswerten von 0,568 gegen Rind und 0,024 gegen Schwein.

3.3.5 Untersuchungen mit einem gegen die Antigenaufbereitung 1 vom Schwein spezifisch reagierenden monoklonalen Antikörper

Aus der Zellfusion der mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein stimulierten Lymphozyten und den Myelomzellen konnte ein antikörperbildender Klon etabliert werden. Dieser Antikörper war gegen ein Antigen aus dem Extrakt der auf 56 °C erhitzten und anschließend lyophilisierten Schweinemuskulatur gerichtet. Die Reaktionen dieses monoklonalen

Antikörpers in den Eluaten aus der Affinitätschromatographie und gegen verschiedene Antigenaufbereitungen im ELISA sowie in der SDS-PAGE wurden untersucht.

3.3.5.1 Ergebnisse der Eluatuntersuchung aus der Affinitätschromatographie

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.2.7.4 beschrieben. Zur Untersuchung gelangte das Nährmedium vor und nach der Affinitätschromatographie, die Eluate pH 3, pH 4 und pH 8 1:10² verdünnt sowie das Eluat pH 5 in dezimalen Verdünnungsstufen 1:10² bis 1:10⁵.

Die Antikörperaktivität im Nährmedium war nach der Durchführung der Affinitätschromatographie nur halbiert (s. Abb. 28).

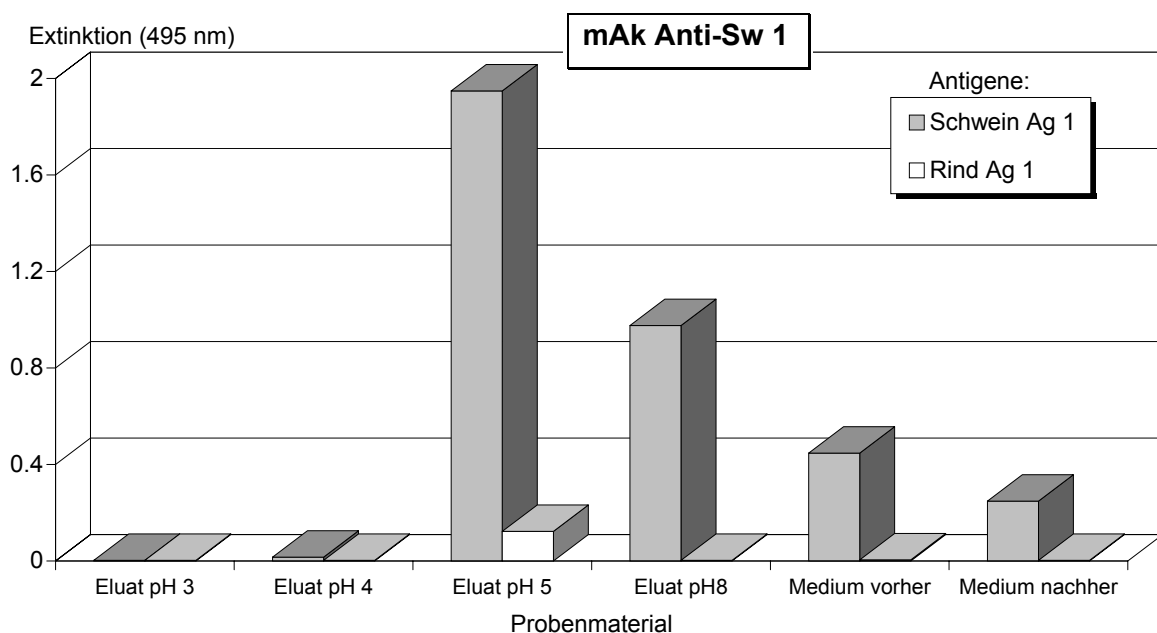


Abbildung 28: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Darstellung der Reaktion des monoklonalen Antikörpers im Nährmedium vor und nach der Affinitätschromatographie sowie in den einzelnen Eluaten

Die Kapazität des Chromatographiegels reichte offenbar nicht aus, um alle Antikörper aus dem Nährmedium zu binden. Während sich im Eluat pH 3 keine Antikörper nachweisen ließen, zeigte sich im Eluat pH 4 eine schwache Reaktion gegen das homologe Antigen. Wie erwartet zeigte sich im Eluat pH 5 die stärkste Antikörperaktivität. Aufgrund des hohen Antikörpergehaltes dieses Eluats war auch eine starke unspezifische Reaktion gegen das Antigen vom Rind festzustellen. Das Eluat pH 8, zum Reinigen der Liganden eingesetzt, wies noch eine erhebliche Antikörperaktivität auf.

Zur Ermittlung einer gebrauchsfertigen Verdünnung für weitere Untersuchungen mit diesem Antikörper wurden die o.g. dezimalen Verdünnungsstufen auf ihre Antikörperaktivität geprüft. Dabei war die Verdünnungsstufe 1:10³ am besten für weitere Untersuchungen geeignet, da

bei einem maximalen Extinktionswert von 1,480 gegen das homologe Antigen der minimale Wert gegen das Antigen vom Rind bei 0,000 lag (s. Abb. 29). Bei dieser Verdünnung wurde bei maximal spezifischer Reaktion eine hohe Sensibilität erreicht.

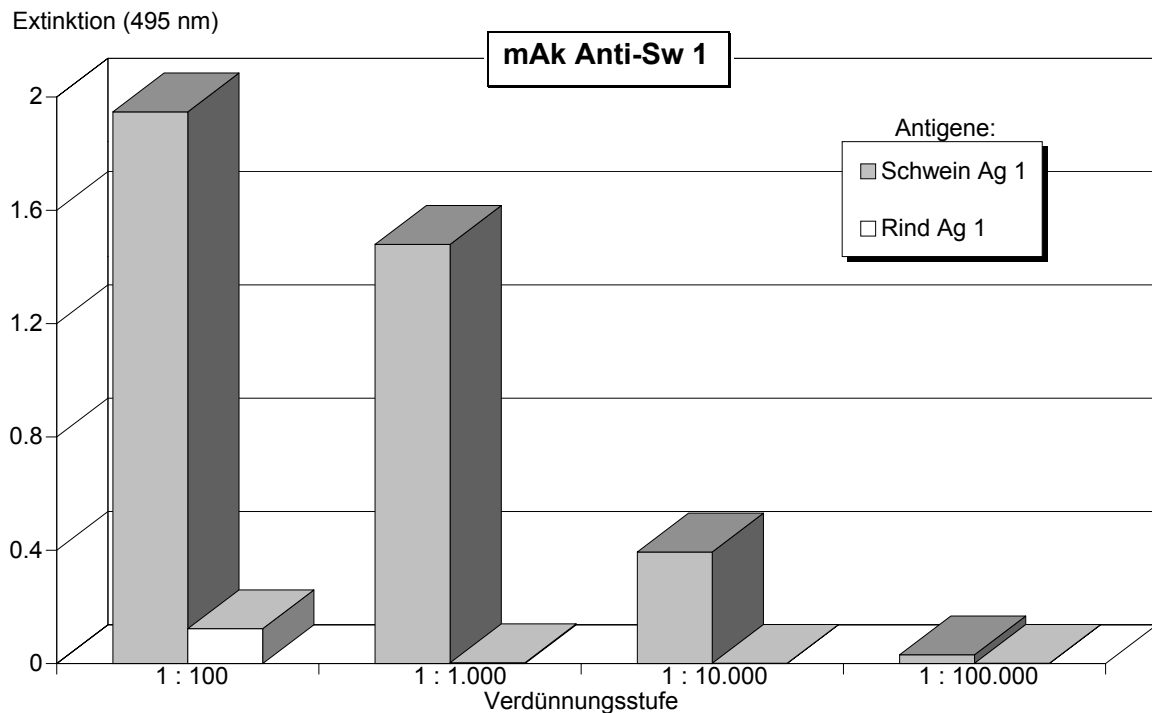


Abbildung 29: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion des monoklonalen Antikörpers in den dezimalen Verdünnungsstufen des Eluats pH 5 mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind

3.3.5.2 Ergebnisse der ELISA bei Beschichtung mit verschiedenen Antigenaufbereitungen

Zunächst wurden die Reaktionen des monoklonalen Antikörpers gegen die Antigenaufbereitung 1 von Schwein bzw. Rind untersucht. Die Extrakte dieser Antigenaufbereitungen wurden nachträglich auf 60, 80 und 100 °C erhitzt, um so das Reaktionsverhalten bei zusätzlicher thermischer Belastung der Antigene zu prüfen. Die Ergebnisse der ELISA mit diesen Antigenen sind in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass der monoklonale Antikörper hochspezifisch gegen die Antigenaufbereitung 1 vom Schwein reagierte. Doch schon bei einer nachträglichen Erhitzung des Antigens auf 60 °C ging die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion erheblich zurück. Bei den auf 80 und 100 °C nachträglich erhitzten Extrakten zeigten sich keine Reaktionsunterschiede mehr zwischen den Antigenen vom Schwein bzw. Rind mit diesem monoklonalen Antikörper. Das für die spezifische Reaktion gegen die Antigenaufbereitung 1 vom Schwein verantwortliche Antigen besaß offenbar keine ausreichende Hitzestabilität.

Dieser Antikörper war daher für einen Nachweis der Speziesidentität thermisch belasteter Muskulatur vom Schwein nicht geeignet.

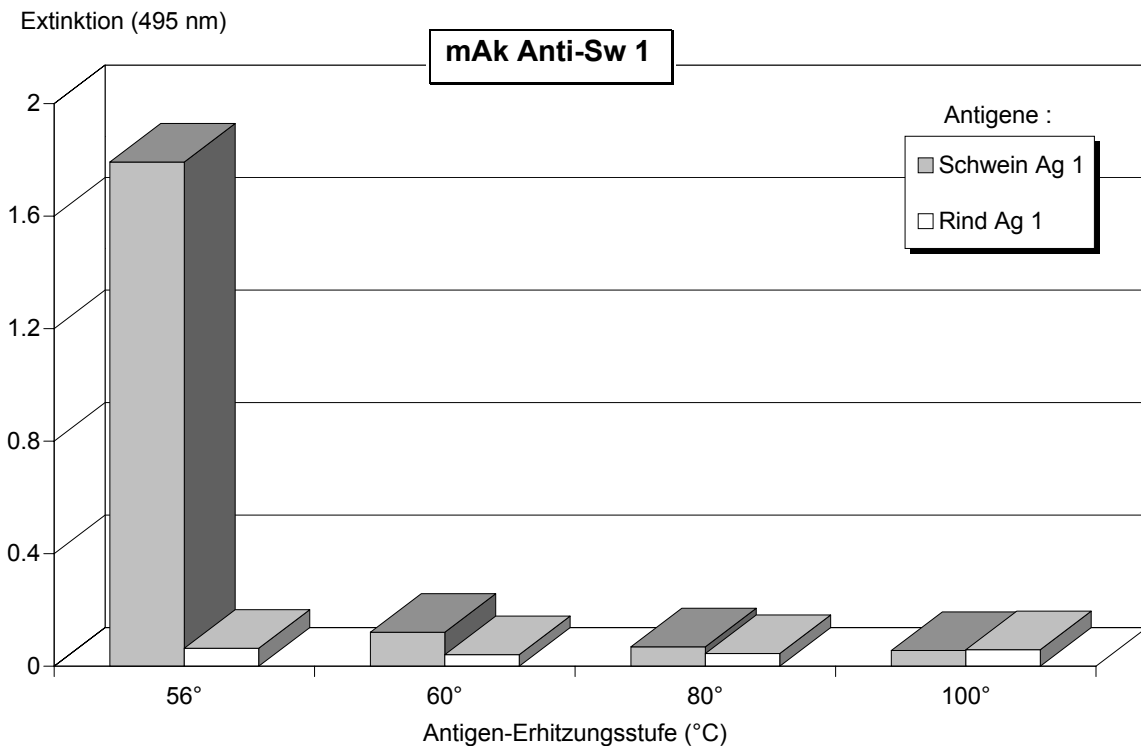


Abbildung 30: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind und mit dieser Antigenaufbereitung nach zusätzlicher thermischer Belastung

In einer weiteren Untersuchung wurden die Reaktionen des monoklonalen Antikörpers auch gegenüber den Antigenaufbereitungen 2 und 3 von Schwein bzw. Rind überprüft. Wie in Abbildung 31 dargestellt, zeigte sich mit der homologen Antigenaufbereitung wieder eine hochspezifische Reaktion.

Mit den beiden anderen Antigenaufbereitungen wurden jedoch ganz unterschiedliche Reaktionen festgestellt. Die Extinktionswerte der Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit der Antigenaufbereitung 2 lagen sowohl mit dem Antigen vom Schwein als auch vom Rind sehr niedrig, wobei sich die Reaktion gegen Schwein etwas stärker, aber nicht als spezifisch darstellte.

Der monoklonale Antikörper reagierte mit der Antigenaufbereitung 3 vom Schwein bzw. Rind mit Extinktionswerten von 0,97 bzw. 0,772 deutlich stärker als mit der Antigenaufbereitung 2. Auch hier zeigte sich eine etwas stärkere, aber unspezifische Reaktion mit dem Antigen vom Schwein als mit dem vom Rind.

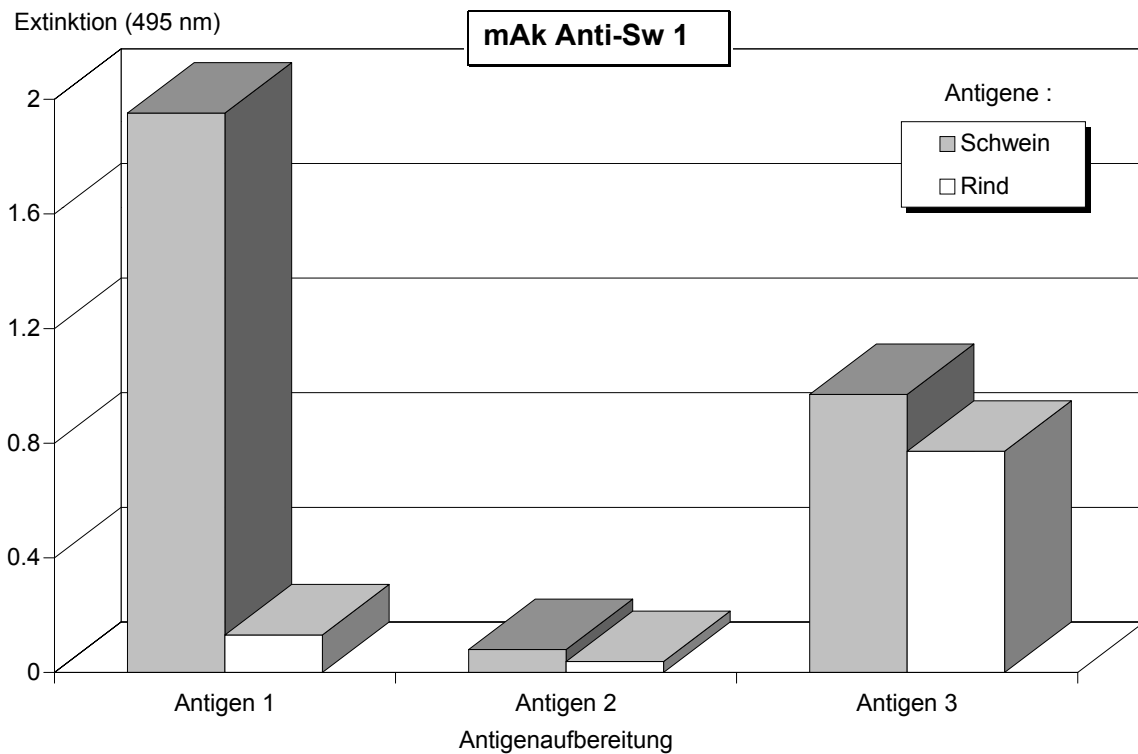


Abbildung 31: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit den Antigenaufbereitungen 1, 2 und 3 vom Schwein bzw. Rind

In der Abbildung 32 wurden die Reaktionen des monoklonalen Antikörpers mit den Testantigenen (s. 3.2.2) der Erhitzungsstufe 60 °C und mit der homologen Antigenaufbereitung 1 vom Schwein bzw. Rind im ELISA dargestellt.

Wie aus den Abbildungen 30 und 31 bereits zu entnehmen ist, zeigte sich auch hier wieder eine hochspezifische Reaktion mit dem homologen Antigen. Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde dieser monoklonale Antikörper nur gegen die Erhitzungsstufe 60 °C der Testantigene im ELISA untersucht. Auch hier zeigte sich mit Extinktionswerten von 0,054 beim Schwein und 0,043 beim Wildschwein eine schwache Reaktion, die zudem nur geringfügig stärker als gegen Rind, Schaf und Pute war.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass dieser monoklonale Antikörper nur mit der homologen Antigenaufbereitung spezifisch reagierte und das Antigen nicht hitzestabil war. Andere Antigenaufbereitungsarten mit stärkerer Hitzedenaturierung oder anderen Extraktionsverfahren führten offenbar zu einem Spezifitätsverlust.

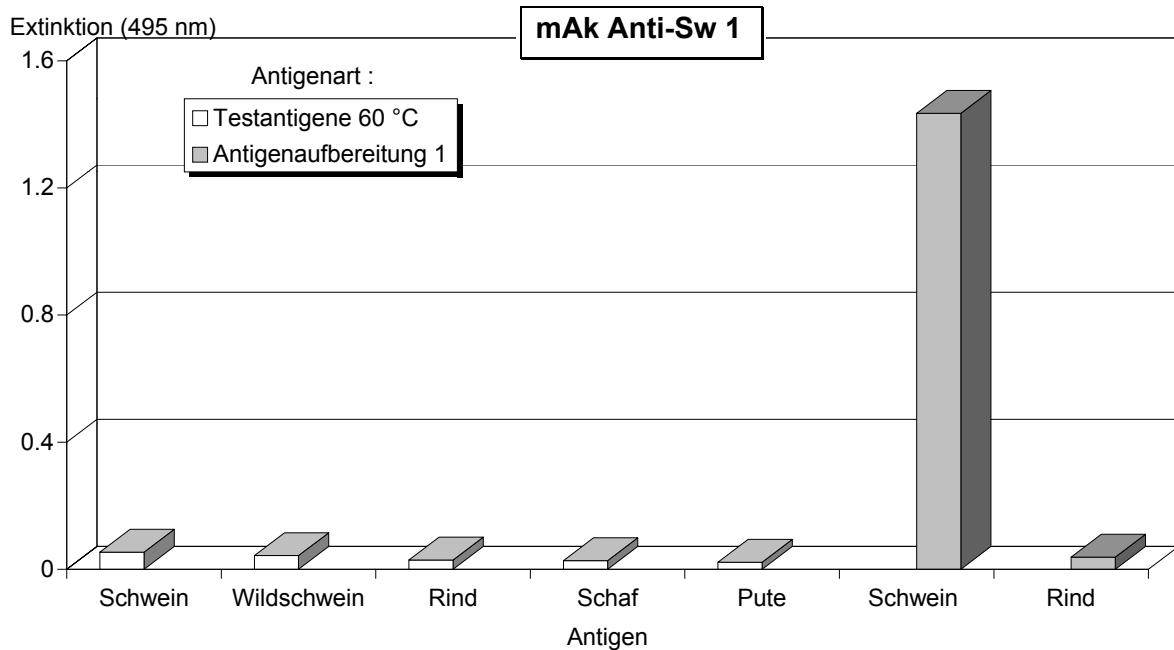


Abbildung 32: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
 Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit den Testantigenen 60 °C und der Antigenaufbereitungen 1 vom Schwein bzw. Rind

3.3.6 Ergebnisse der vertikalen SDS-PAGE

3.3.6.1 Bestimmung der Proteinbandenmuster der Antigenaufbereitung 1 von Rind bzw. Schwein und dieser Lyophilisatextrakte nach zusätzlicher Temperatureinwirkung.

Die Antigenaufbereitungen 1 vom Rind bzw. Schwein wurden in der vertikalen SDS-PAGE mit anschließendem Blot auf Nitrocellulosemembran und Indian Ink-Färbung untersucht. Daneben wurden die nachträglich für 30 Minuten auf 60, 80 bzw. 100 °C erhitzten Lyophilisatextrakte von Rind bzw. Schwein einer Proteinauftrennung in der SDS-PAGE unterzogen.

Lyophilisatextrakt vom Schwein (s. Abb. 33):

Die Antigenaufbereitung 1 vom Schwein wurde in sechs intensiv gefärbte Banden aufgetrennt. Dabei gingen drei Banden im mittleren Trennbereich ineinander über. Eine Bande zeigte sich am Ende der Lauffront (niedermolekularer Bereich). Bereits bei der ersten Nacherhitzungsstufe (60 °C) des Lyophilisatextraktes zeigte sich eine deutliche Veränderung des Bandenmusters. Drei Banden im mittleren Molekulargewichtsbereich waren nicht mehr nachzuweisen.

Die drei verbliebenen Banden zeigten sich in den Molekulargewichtsbereichen von ca. 47 bis 20 kDa. Die anderen Zonen im Trennbereich färbten sich kaum noch an, weil die Erhitzung des Lyophilisatextraktes auf 60 °C Proteine ausgefällt hatte.

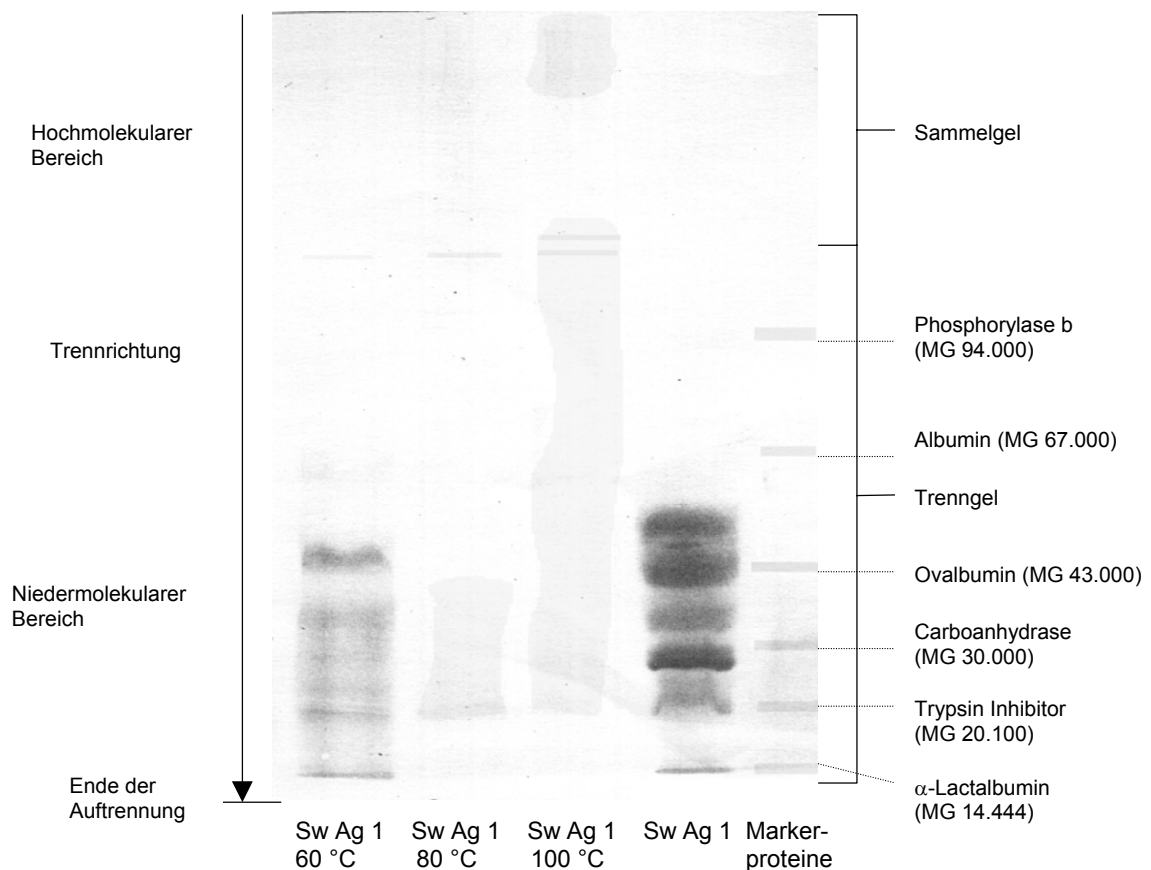


Abbildung 33: Blot auf NC-Membran nach SDS-PAGE
 Proteinauftrennung der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein und der gleichen Antigenaufbereitung nach zusätzlicher Erhitzung auf 60, 80 und 100 °C für 30 Minuten sowie eines Proteinmarkerpräparats

Noch stärker war das Trennergebnis bei den Erhitzungsstufen 80 °C und 100 °C verändert. Jede Bandenstruktur war verloren gegangen, Trenngel und Sammelgel (hochmolekularer Bereich) waren nahezu gleichmäßig angefärbt.

Lyophilisatextrakt vom Rind (s. Abb. 34):

Ein fast identisches Bandenmuster und Anfärbeverhalten zeigte sich bei der SDS-PAGE der Antigenaufbereitung 1 vom Rind. Nur im mittleren Trennbereich ließen sich die Proteinbanden weniger stark anfärben. Der für 30 Minuten auf 60 °C erhitzte Lyophilisatextrakt wies außerdem am Anfang des Trenngels eine deutlich angefärbte Proteinbande auf. Ebenso wie der auf 80 °C bzw. 100 °C erhitzte Lyophilisatextrakt vom Schwein bestand auch beim Rind nur noch ein schwach anfärbbarer Proteinschleier über den gesamten Trennbereich.

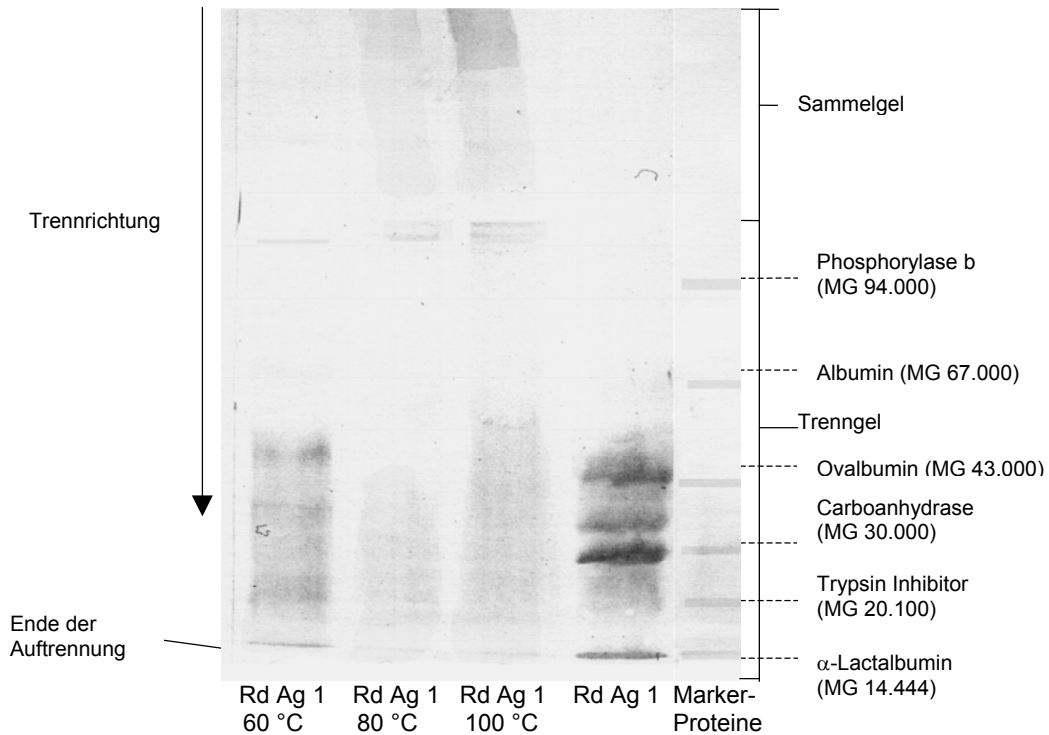


Abbildung 34: Blot auf NC-Membran nach SDS-PAGE
 Proteinauftrennung der Antigenaufbereitung 1 vom Rind sowie der gleichen Antigenaufbereitung nach zusätzlicher Erhitzung auf 60, 80 und 100 °C für 30 Minuten sowie eines Proteinmarkerpräparats

3.3.6.2 Nachweis eines spezifischen Antigens und Bestimmung seines Molekulargewichts aus der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein

Zur Überprüfung der Antigen-Antikörper-Reaktion eines monoklonalen Antikörpers mit einem Antigen aus der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein (s. 3.2.1.1) wurden die Lyophilisat-extrakte vom Schwein bzw. Rind sowie deren zusätzlich thermisch belastete Proben (s. 3.2.9.3) jeweils in zwei Trenngelen gleichzeitig unter identischen Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine aus den Gelen unter gleichen Bedingungen im Semidry-Blotting-Verfahren auf zwei Nitrocellulosemembranen übertragen. Eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) wurde der Indian Ink-Färbung (s. 3.2.9.4), die andere NC-Membran einer Immunfärbung (s. 3.2.9.5) unterzogen (s. Abb. 35 u. 36). Beim Vergleich der beiden NC-Membranen war folgendes festzustellen.

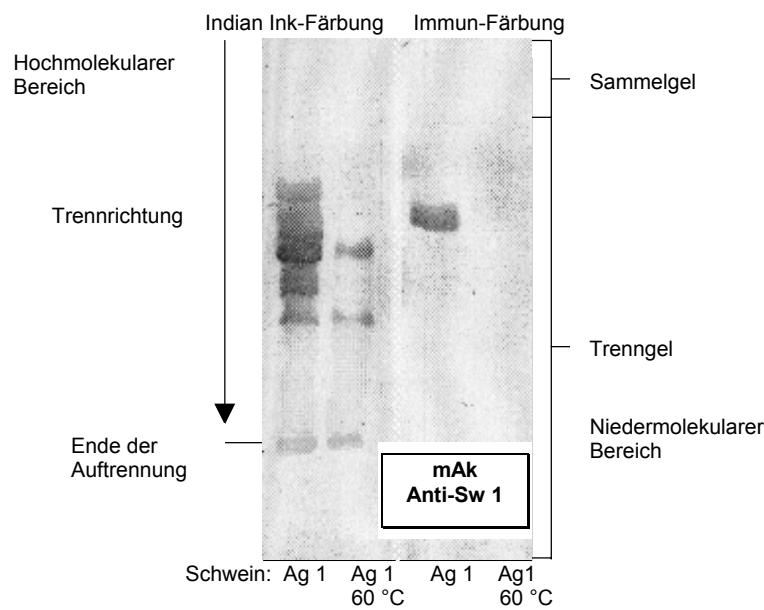


Abbildung 35: Blot auf NC-Membran nach SDS-PAGE
 Auftrennung der Antigenaufbereitung 1 vom Schwein sowie der gleichen Antigenaufbereitung nach zusätzlicher Erhitzung auf 60 °C für 30 Minuten nach Indian Ink- und Immun-Färbung

Die NC-Membranen vom Schwein bzw. Rind zeigten das oben beschriebene Bandenmuster bzw. Anfärbeverhalten (s. 3.3.6.1).

Die mit dem monoklonalen Antikörper erfolgte Immunfärbung der NC-Membran von der Schweine- bzw. Rinderantigentrennung ließ nur eine Proteinbande der Lyophilisat-auftrennung vom Schwein erkennen. Es kam weder bei den nachträglich erhitzten Lyophilisatextraktproben vom Schwein noch bei den Antigenproben des Rinderlyophilisates zu einer sichtbaren Anfärbung. Dieser monoklonale Antikörper reagierte mit einem spezifischen Antigen aus dem Lyophilisatextrakt vom Schwein. Dieses Antigen war jedoch nicht hitzestabil, da bereits eine nachträgliche thermische Belastung von 30 Minuten auf 60 °C die spezifischen Eigenschaften des Antigens zerstörte, so dass eine spezifische Reaktion im Immunblot nicht mehr zustande kam. Für dieses Antigen konnte aufgrund der gleichzeitig mit aufgetrennten Markerproteine ein Molekulargewicht von ca. 51 kDa ermittelt werden.

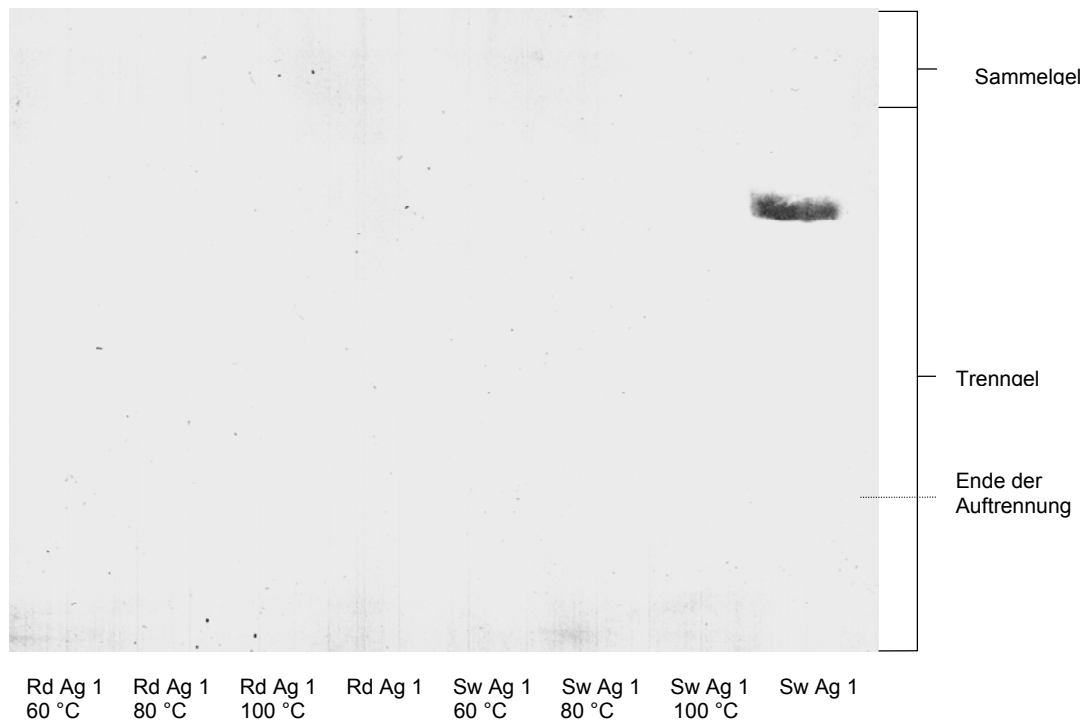


Abbildung 36: Blot auf NC-Membran nach SDS-PAGE
 Auftrennung der Antigenaufbereitung 1 von Rind und Schwein sowie die gleichen zusätzlich auf 60, 80 und 100 °C für 30 Minuten erhitzten Antigenaufbereitungen mit einem monoklonalen Antikörper einer Immunfärbung unterzogen

3.3.6.3 Überprüfung des Trennungsergebnisses nach Ultrafiltration der Antigenaufbereitung 4 (s. 3.2.1.4)

Die Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration von Extrakten thermisch behandelte Rinder- bzw. Schweinemuskulatur (Antigenaufbereitung 4) wurden in der vertikalen SDS-PAGE mit anschließendem Blott und Indian Ink-Färbung auf eine erfolgreiche Molekulargewichtstrennung durch Ultrafiltration untersucht.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte wie unter 3.2.9.3 beschrieben. Die Indian Ink-Färbung der Proteine führte weder beim Gesamtextrakt noch bei den einzelnen Proteinkonzentraten zu einer sichtbaren Bandenbildung auf der Nitrocellulosemembran (s. Abb. 37). Die Anfärbung der Proteine war so schwach, dass auch hier diese Bereiche zur besseren Darstellung künstlich verstärkt wurden.

Beim Gesamtextrakt zeigte sich eine Färbung unterschiedlicher Intensität über den gesamten Trennbereich des Gels und des Sammelgels. Zonen intensiver Färbung ließen sich jeweils am Anfang des Sammel- und des Trenngels nachweisen. Von dort nahm die Intensität der Färbung in Trennrichtung der SDS-PAGE (vom hochmolekularen zum niedermolekularen Bereich) kontinuierlich ab.

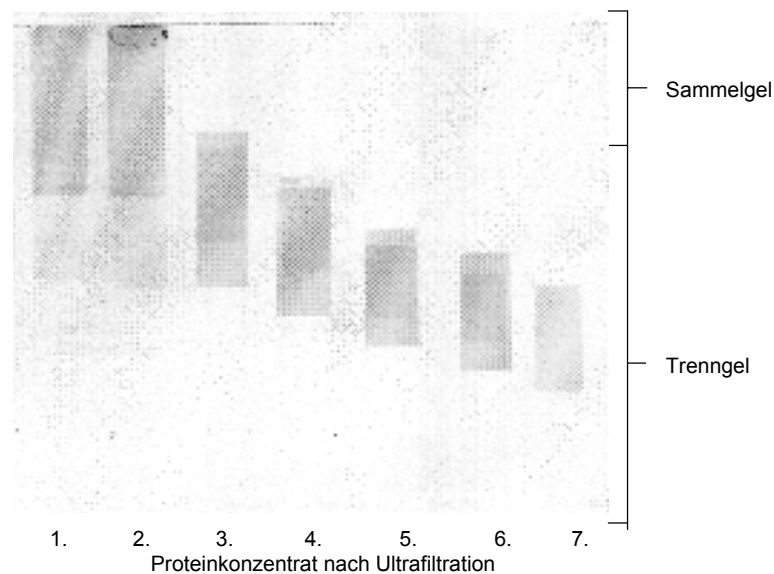


Abbildung 37: Blot auf NC-Membran nach SDS-PAGE
Schematische Darstellung der Anfärbereiche (Indian Ink-Färbung) nach Auftrennung der Antigenaufbereitung 4 vom Rind

Die aus der Trennung des Gesamtextraktes durch Ultrafiltration gewonnenen Proteinkonzentrate zeigten in der SDS-PAGE wie der Gesamtextrakt keine Bandenbildung. Gegenüber dem Gesamtextrakt entstanden jedoch intensiv gefärbte Zonen, die nur über einen Teil des Trennbereichs des Gels reichten. So kam es bei der Trennung des 1. Proteinkonzentrates (MG > 300 kDa) zur Bildung einer intensiv gefärbten Zone bereits im Sammelgel und beim 2. Proteinkonzentrat (MG 100 - 300 kDa) am Anfang des Trenngels. Die intensiver gefärbten Zonen der anderen Proteinkonzentrate fanden sich entsprechend der Ultrafiltrationsstufe zunehmend im niedermolekularen Bereich des Trenngels. Die angefärbten Zonen der einzelnen Proteinkonzentrate waren nicht den Molekulargewichtstrenngrenzen der Ultrafilter entsprechend scharf abgegrenzt, vielmehr überschritten sie sich in den verschiedenen Molekulargewichtstrennbereichen des Gels.

3.3.7 Kommerzieller ELISA – Test zur Identifizierung von Rind und Schwein

Bei dieser Untersuchung wurden die ELISA-Testplatten der Fa. Transia zur Identifizierung von Rinder- bzw. Schweinemuskelantigenen eingesetzt.

Zur Untersuchung gelangten dabei die Antigenextrakte aus der auf 60, 70, 80, 90 und 100 °C für 30 Minuten erhitzten Muskulatur von Rind, Schwein, Wildschwein, Schaf und Pute (s. 3.2.2). Darüber hinaus wurden die Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration von auf 100 °C erhitzter Schweine- und Rindermuskulatur in diesem ELISA auf ihre Reaktionen untersucht (s. 3.2.1.4).

3.3.7.1 Ergebnisse der Untersuchungen mit den Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration

Die Reaktionen der Proteinkonzentrate aus der Ultrafiltration des Schweinemuskelextraktes fielen im Transia-Test zur Identifizierung von Schweinemuskelantigenen sehr unterschiedlich aus (s. Abb. 38). Der Gesamtextrakt der auf ca. 100 °C erhitzten Schweinemuskulatur reagierte im Test mit einer Extinktion von 0,849 bei einem Cut off-Wert von 0,370 positiv.

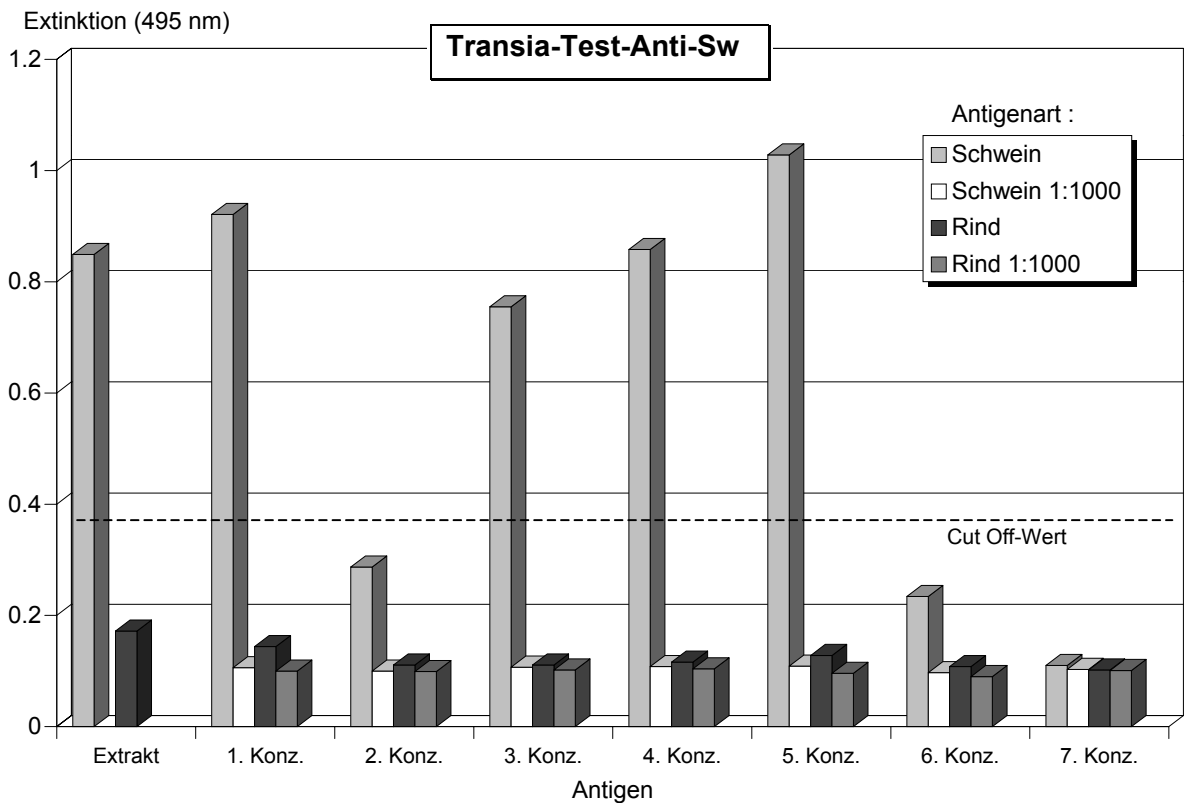


Abbildung 38: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktionen des Transia-Tests Anti-Schwein mit den Antigenen der Antigenaufbereitung 4 vom Schwein bzw. Rind

Die aus dem Gesamtextrakt der erhitzten Schweinemuskulatur hergestellten Proteinkonzentrate mit einem Molekulargewicht > 10 kDa reagierten bis auf das 2. Proteinkonzentrat (100 - 300 kDa) im Test ebenfalls positiv. Antigene mit Molekulargewichten unter 10 kDa wurden in diesem Test jedoch nicht mehr als Schweinemuskelantigene erkannt. Deren Extinktionswerte lagen alle unter dem Cut off-Wert.

Auch die 1:1000 Verdünnungen der einzelnen Proteinkonzentrate führten zu Extinktionswerten unterhalb des Cut off-Wertes.

Im Anti-Rind-Testkit zeigte sich gegenüber den einzelnen Proteinkonzentraten aus der Ultrafiltration des Rindermuskelextraktes ein etwas anderes Bild (s. Abb. 39).

Bei einem Cut off-Wert von 0,320 reagierten alle Proteinkonzentrate mit einem Molekulargewicht > 1 kDa deutlich positiv. Erst Rinderantigene mit einem geringeren Molekulargewicht wurden von diesem Test nicht mehr erkannt. Selbst auf die 1:1000 Verdünnung der Proteinkonzentrate mit den Molekulargewichtsbereichen 3 - 10 kDa und 10 - 30 kDa gab es noch positive Reaktionen.

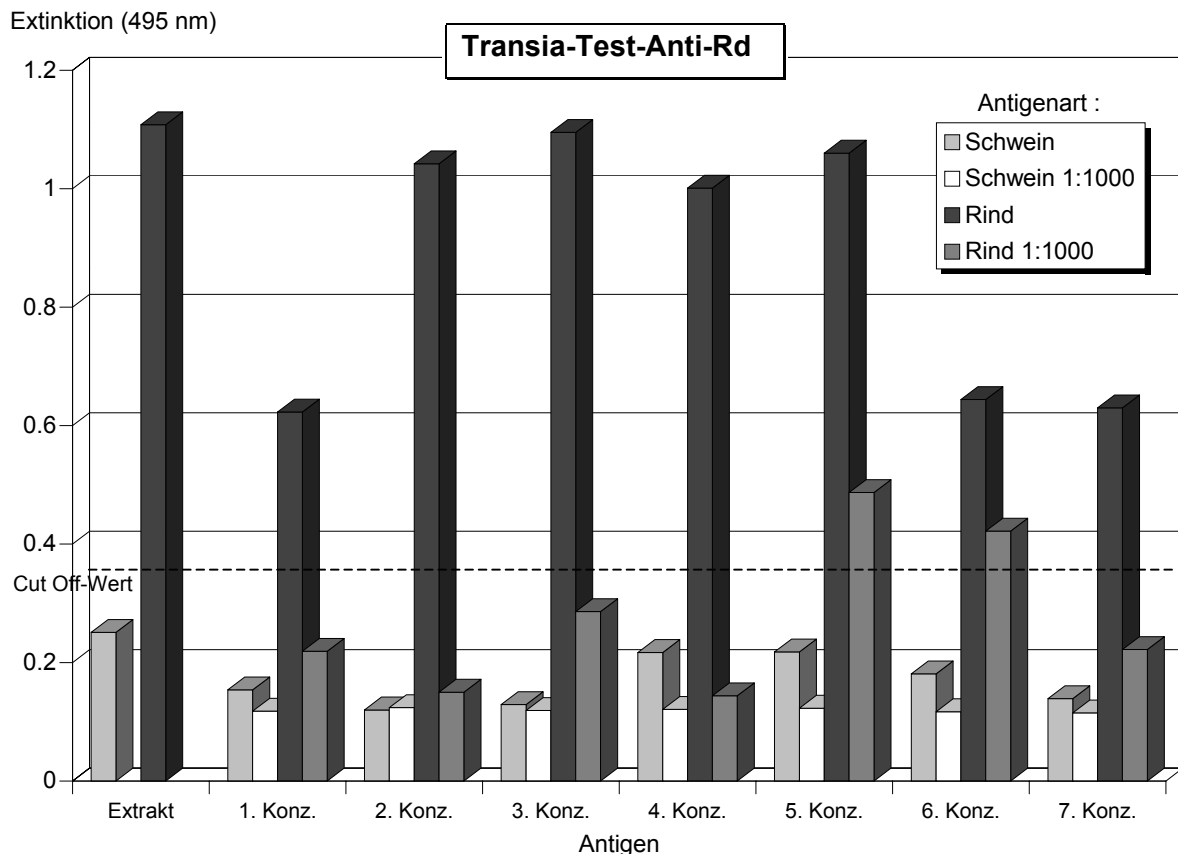


Abbildung 39: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktionen des Transia-Tests Anti-Rind mit den Antigenen aus der Antigenaufbereitung 4 vom Schwein bzw. Rind

3.3.7.2 Ergebnisse der Untersuchungen mit den Testantigenen von Rind, Schwein, Wildschwein, Schaf und Pute

Die Reaktionen der Testantigene im ELISA zur Identifizierung von Schweinmuskelantigenen sind in Abbildung 40 dargestellt.

Zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Reaktionen wurde zunächst der Cut off-Wert ermittelt. Dieser ergab sich aus dem Produkt des 2,5 fachen des Mittelwertes der Extinktionen der Negativkontrollen und lag bei 0,370.

Die Extinktionen der Antigene von Rind, Schaf und Pute lagen bei allen Erhitzungsstufen deutlich unter dem Cut off-Wert und waren somit eindeutig als negativ zu beurteilen. Gegen-

über diesen Antigenen zeigte sich der Test als hochspezifisch, da die Extinktionen der Schweinemuskelantigene aller Erhitzungsstufen mit Werten von 0,780 bis 0,880 deutlich über dem Cut off-Wert lagen.

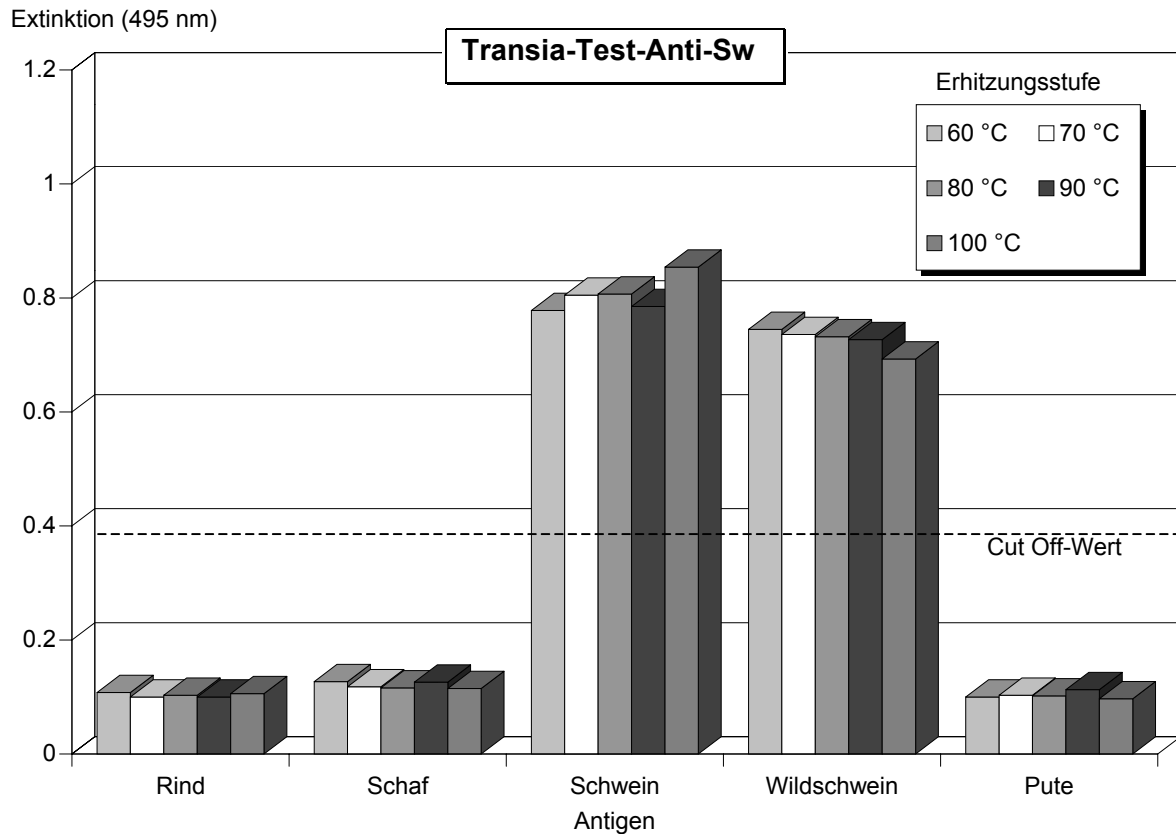


Abbildung 40: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktionen des Transia-Tests Anti-Schwein mit den Testantigenen (s. 3.2.2)

Die Extinktionen der Wildschweinemuskelantigene ergaben Werte, die nur geringfügig unter denen der Schweinemuskelantigene lagen und als positiver Nachweis von Schweinemuskelantigenen zu beurteilen sind. Insoweit war dieser kommerzielle ELISA Test nicht in der Lage, zwischen Schweinemuskel- und Wildschweinemuskelantigenen zu unterscheiden.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse des Anti-Rind-Testkits unter Verwendung der Testantigene dargestellt.

Als Cut off-Wert dieses Anti-Rind-Testkits wurde ein Extinktionswert von 0,320 ermittelt.

Die Extinktionswerte der Testantigene von Schaf, Schwein, Wildschwein und Pute lagen bei allen Erhitzungsstufen zwischen 0,1 und 0,2 und somit deutlich unter dem Cut off-Wert. Die Reaktionen gegen diese Antigene waren somit eindeutig negativ. Die Rindermuskelantigene der verschiedenen Erhitzungsstufen wurden mit Extinktionswerten von über 0,948 als eindeutig positiv erkannt.

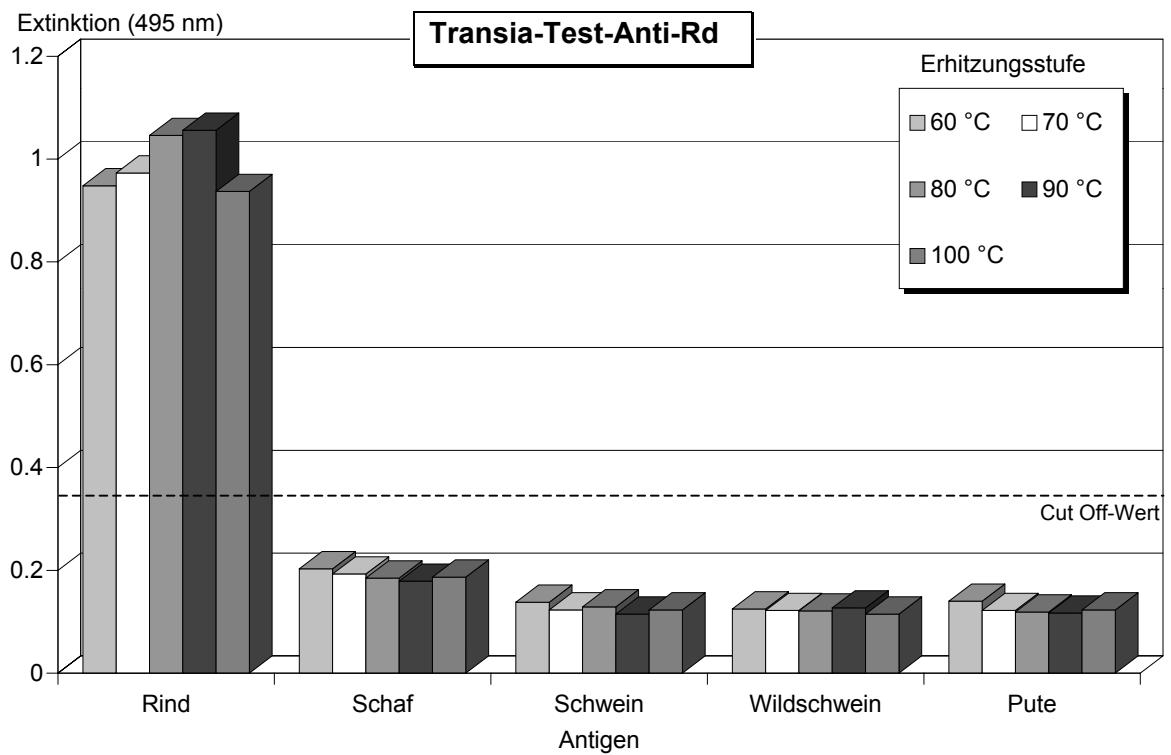


Abbildung 41: Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA
Reaktionen des Transia-Tests Anti-Rind mit den Testantigenen (s. 3.2.2)