

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, anhand verschiedener Antigenaufbereitungsmethoden zur Immunisierung von Mäusen speziesspezifische monoklonale Antikörper zum Tierartennachweis von Fleisch in erhitzten Lebensmitteln zu gewinnen. Die eigenen Untersuchungen wurden modellhaft an Extrakten von erhitzter Muskulatur der Tierarten Rind und Schwein durchgeführt.

Die gezielte Anreicherung und Reinigung eines Antigens zur Immunisierung war nicht möglich, da es bisher nur unzureichende Kenntnisse über speziesspezifische und hitzestabile Antigene in Extrakten aus erhitzter Muskulatur gibt. Die Ergebnisse anderer Untersucher deuten sowohl auf die Existenz von hitzestabilen spezifischen Antigenen, die bereits im Rohmaterial enthalten sind, als auch auf spezifische Antigene, die erst durch den Erhitzungsprozeß entstehen, hin.

Aus diesen Gründen wurden die folgenden Antigenaufbereitungsmethoden ausgewählt, die sich in der Stärke der thermischen Belastung des Muskelfleisches und der Extraktionsmethode unterscheiden:

1. Antigenaufbereitung 1 (Lyophilisat)

Zerkleinerte Muskulatur wurde für 15 Minuten auf 56 °C Kerntemperatur erhitzt, anschließend lyophilisiert und 500 mg Lyophilisat mit physiologischer Kochsalzlösung für 18 Stunden extrahiert. Die Immunisierungslösung enthielt 0,4 mg Protein je Dosis.

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

5 g zerkleinerte Muskulatur wurden in 10 ml PBS-Puffer für 5 Minuten im 100 °C Wasserbad erhitzt. Dabei wurden Kerntemperaturen von ca. 89 °C erreicht. Nach dem Erkalten wurde das Präparat zentrifugiert und filtriert. Auch hier enthielt die Immunisierungslösung 0,4 mg Protein je Dosis

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

50 g zerkleinerte Muskulatur wurden im Autoklaven für 15 Minuten auf 110 °C erhitzt und anschließend zu einem Aceton-Trocken-Pulver verarbeitet. Die Extraktion erfolgte mit einer Harnstoff-Mercaptoethanolösung für eine Stunde im 100 °C Wasserbad.

4. Antigenaufbereitung 4 (Ultrafiltration)

Die zerkleinerte Muskulatur wurde für 30 Minuten bei einer Kerntemperatur von ca. 98 °C erhitzt und anschließend mit Aqua dest. 24 Stunden bei 4 °C extrahiert. Nach der Zentrifugation und Filtration wurde der Extrakt nacheinander über Flachmembranfilter mit unterschiedlichen Molekulargewichts-Trennbereichen filtriert. Aufgrund eigener Voruntersuchungen und von Literaturhinweisen wurden die hochmolekularen Konzentrate (> 300 kDa und 100 – 300 kDa) zur Immunisierung der Mäuse eingesetzt.

Aus der Antigenaufbereitung 1 gingen zahlreiche spezifisch reagierende Antikörper verschiedener Hybridome hervor. Ein Klon konnte etabliert werden. Bei den weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass dieser monoklonale Antikörper nur mit dem Immunisierungsantigen spezifisch reagierte. Das Antigen war nicht hitzestabil. Eine Erhitzung auf 60 °C reichte bereits aus, das Antigen soweit zu denaturieren, dass es nicht mehr mit dem monoklonalen Antikörper reagierte.

Auch mit der Antigenaufbereitung 2 konnten einige mit dem homologen Antigen spezifisch reagierende Hybridomantikörper nachgewiesen werden. Diese zeigten jedoch keine spezifischen Reaktionen mit den stärker denaturierten Antigenen aus der Antigenaufbereitung 3. Ein Klon konnte nicht etabliert werden.

Aus der Antigenaufbereitung 3 gingen überraschenderweise keine spezifisch reagierenden Hybridomantikörper hervor. Andere Experimentatoren erzielten gerade mit der Harnstoffextraktion bei stark hitzedenaturierten Proben unter Einsatz polyklonaler Antiseren gute Ergebnisse.

Am erfolgreichsten stellte sich die Antigenaufbereitung 4 heraus. Obwohl das Antigenmaterial auch einer starken Hitzedenaturierung unterlag, wurden zahlreiche hochspezifische Antikörper verschiedener Hybridome nachgewiesen. Durch die Ultrafiltration konnten die hochmolekularen Proteine angereichert und von niedermolekularen Eiweißen getrennt werden. Diese scheinen vor allem für unspezifische Reaktionen auch in anderen Untersuchungssystemen verantwortlich zu sein. Bei den hochmolekularen spezifisch reagierenden Antigenen handelt es sich wahrscheinlich um Proteinaggregate, die erst durch den Erhitzungsprozeß entstehen, und nicht um hitzestabile Antigene, die bereits im Rohmaterial vorhanden sind. Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, dass für den kommerziellen ELISA die Anwendungsvorschrift für rohe oder gering erhitzte Proben eine Nacherhitzung für 15 Minuten im 100 °C Wasserbad vorschreibt.

Bei den eigenen Untersuchungen stellte sich die Zellkultivierung und hier vor allem das Etablieren von stabilen, antikörperbildenden Klonen als besondere Schwierigkeit heraus, so konnten weitergehende Untersuchungen oft nicht mehr durchgeführt werden.

Mit der IEF, dem kommerziellen ELISA und der PCR bzw. DNA-Sonden-Technik stehen gute Instrumente für die Lebensmittelüberwachung zur Tierartbestimmung auch in erhitzten Lebensmitteln zur Verfügung. Bei differenzierteren Fragestellungen oder durch neue gesetzliche Bestimmungen kann es erforderlich sein, auch gewebe- und tierartspezifische Antikörper für entsprechende Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Die Gewinnung monoklonaler Antikörper unter Verwendung entsprechend gereinigter Antigene scheint dafür ein erfolgversprechender Weg zu sein.

6 SUMMARY

Study on the production of murine monoclonal antibodies for the detection of animal species identity in heat processed foods using various antigens for immunization

The present investigation had the aim to establish monoclonal antibodies for the detection of the animal species identity in heat processed meats. The experiments were carried out with extracts from heated meat samples of the bovine and porcine species.

The definite enrichment and purification of particular antigen for immunization was not possible because there exists no sufficient knowledge about species specific heatstable antigens in animal tissue, particularly in muscle. Results published by other investigators point to the existence of heat stable specific antigens already present in the raw material as well as others that do not develop before heating.

Extraction procedures had to be varied: The antigen-enrichment-methods chosen differed with regard to the intensity of the thermal effect on the muscle tissue and the method of extraction.

1. Antigen enrichment 1 (lyophilization)

Minced meat was heated for 15 minutes to a central temperature of 56 °C, then extracted with normal saline for 18 hours. The extract used for immunization contained 0.4 mg protein per dose.

2. Antigen enrichment 2 (according to RAVESTEIN and DRIEDONKS, 1986)

5 g of minced meat was heated for 5 minutes in a 100 °C waterbath. Central temperatures of about 89 °C were reached. After cooling the sample was centrifuged and filtered. The solution for immunization contained 0.4 mg protein per dose.

3. Antigen enrichment 3 (according to HITCHCOCK et al., 1981)

50 g of minced meat was heated in an autoclave for 15 minutes up to 110 °C and then prepared to aceton-dry-powder. The powder was extracted with urea-mercaptoethanol-solution in a 100 °C waterbath for one hour.

4. Antigen enrichment 4 (ultrafiltration)

The minced meat was heated for 30 minutes at a central temperature of about 98 °C and afterwards extracted with dist. aqua at 4 °C for 24 hours. After centrifugation and filtration the extract was filtered step by step with flat membrane filters separating by the order of molecular weight. According to preliminary studies and references from the literature, higher molecular weight fractions (> 300 kDa and 100 – 300 kDa) were used for immunization.

From the antigen enrichment 1 many specific antibodies of different hybridomas resulted. One single clone could be established. Further results revealed, that this monoclonal antibody reacted specifically only with the original antigen which was not heatstable. Heating up to 60 °C denatured the antigen to such an extent that it did not react anymore with the monoclonal antibody.

Also, with the antigen enrichment 2 some specifically reacting hybridoma antibodies were found. However, these did not react specifically with the more strongly denatured antigens from antigen enrichment 3. Not one clone could be established.

From antigen enrichment 3 no specifically reacting hybridoma antibodies were shown. Other authors proved definitely good results with urea extraction in heat denatured meats using polyclonal antisera.

Antigen enrichment 4 was the most successful one. Though the antigen material was undergoing strong denaturation, many antibodies of high specificity were detected. Ultrafiltration enriched the higher molecular weight proteins separating them from the lower molecular weight fraction. The latter seems to be a main cause for nonspecific reactions.

The specific reacting high molecular antigens are probably aggregates of proteins, which only develop during heating process, rather than heat stable antigens already present in the raw material. This supposition is supported by the fact, that commercial ELISA kits recommend a heat process for 15 minutes at 100 °C water temperature for raw or moderately heated samples.

During our own research the cultivation of cells, and especially the establishment of stable antibody producing clones proved to be a special difficulty.

IEF, commercial ELISA, PCR and DNA-probe technique are useful for determination of animal species also in heated meat. For more detailed investigations as well as for issues of new food regulations it might be useful to have available tissue and species specific antibodies. The production of monoclonal antibodies seems to be a successful way for those purposes.