

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung des Sarcoptes-Milben-Antigens

3.1.1 Isolierung der Sarcoptes-Milben

Als Spendertiere dienten tote Rotfüchse (*Vulpes vulpes*), die eine natürlich erworbene, generalisierte Sarcoptes-Räude aufzeigten. Die Tiere wurden vom Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT, Berlin) zur Verfügung gestellt. Von diesen Füchsen wurden mit einem Skalpell Hautgeschabsel und dicke, dicht mit Milben besiedelte Borken entnommen und unter einem Stereomikroskop auf Lebensfähigkeit der Milben überprüft. Anschließend erfolgte die Gewinnung der Sarcoptes-Milben durch das Auswanderungsverfahren. Dafür wurde jeweils ein Filterpapier in der Größe von etwa 10x10 cm mit milbenkontaminiertem Hautmaterial beschichtet und in die Mitte einer großen Glaspetrischale (\varnothing 20 cm) gegeben. Um ein Auswandern der Milben über den Schalenrand zu verhindern, wurde dieser mit Paketband in der Art beklebt, dass es den inneren Schalenrand mit der Klebeseite nach unten überragte. Die nach dieser Methode beschickten Petrischalen wurden mit mehreren wassergefüllten Gefäßen über 24 h bei 37°C im Brutschrank stehen gelassen. Der Großteil der Milben unterschiedlichster Entwicklungsstadien war in diesem Zeitraum ausgewandert. Nach Entfernen des Filterpapiers mitsamt der Hautproben wurden die Milben mit Hilfe von Pinzette und Objektträger gesammelt, in Eppendorfgefäße gebracht und mit 0,05 M Carbonatpuffer (2,93 g NaHCO₃, 1,59 g Na₂CO₃, Aqua bidest. ad 1000 ml; pH 9,6,) 10 min in der Zentrifuge(Eppendorf Zentrifuge 5417 R) bei 1000 g unter dreimaligem Austausch des Puffers gewaschen. Anschließend erfolgte die Lagerung der gewaschenen Milben mit etwas Carbonatpuffer im Eppendorfgefäß bei – 80°C bis zur Weiterverarbeitung.

3.1.2 Herstellung des Milben-Ganzkörperextraktes

Zur Herstellung des Milbenextraktes wurde die tiefgefrorene Milbensuspension aufgetaut und nach Zugabe von Carbonatpuffer unter Verwendung eines Teflon-Homogenisators bei ständiger Kühlung im Eisbad zerkleinert. Um einer besonders im Milbenspeichel enthaltenen Proteasen-Freisetzung entgegenzuwirken, wurde ein Proteaseninhibitor-Cocktail zugegeben (Complete mini[®], Boehringer Mannheim). Der Zerkleinerungsgrad wurde regelmäßig durch Tüpfelpräparate unter dem Mikroskop untersucht. Die weitere Zerkleinerung fand mittels Ultraschall statt (Braunson Sonifier 250: 3 x 30 sec, „duty cycle“ 15%, „output control“ 1-2). Nach jedem Schritt wurde die Suspension bei 4.500g und 4°C 15 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5147 R) und anschließend der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das entstandene Pellet aus Milbenbestandteilen wurde mit Carbonatpuffer aufgeschwemmt und wieder mit dem Ultraschallgerät zerkleinert. Diese Vorgänge wurden solange wiederholt, bis eine weitere Zugabe von Carbonatpuffer nur noch zur Verdünnung des Antigen-Extraktes geführt hätte und nicht zu einer Erhöhung des Proteingehaltes.

Der gesammelte Überstand wurde in Eppendorfgefäße portioniert abgefüllt und bei – 80°C gelagert.

3.1.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt des Extraktes wurde mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad) nach der Methode von Lowry bestimmt.

Nach Überprüfung der Kompatibilität des Carbonatpuffers mit dem Protein Assay wurde vom Milbenextrakt mehrfach verdünnt. Vom Proteinstandard BSA wurden 5 Verdünnungen im Bereich von 0,2-1,5 mg/ml hergestellt. Der Proteingehalt wurde nach Zugabe der entsprechenden Reagentien im Photometer bei 750 nm gemessen.

3.2 Antikörper

Als Spendertier der *Sarcoptes*-Ak diente ein Kaninchen, das im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin mit *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* infiziert wurde. Dazu wurde frisches milbenhaltiges Hautmaterial vom Fuchs entnommen, in die Ohren des Kaninchens verbracht und diese mittels Leinenbeutel für 24 h verschlossen. Nach etwa zwei Monaten hatte das Kaninchen eine klinisch manifeste Räude entwickelt.

Die Negativ-Kontrollseren stammten von einem gesunden Kaninchen aus der Laborzucht des Institutes.

Die Peroxidase-gekoppelten, sekundären Ak (anti rabbit IgG), stammten von der Firma Sigma.

3.3 Proteinfractionen des *Sarcoptes*-Milben-Extraktes

3.3.1 Proteinfractionierung in der eindimensionalen SDS-PAGE und Färbung

Die SDS-PAGE dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Bestimmung des Molekulargewichtes (MG) unabhängig von der Eigenladung der Proteine, die durch das Natriumdodecylsulfat überdeckt wird. Es wurde die eindimensionale vertikale SDS-PAGE nach Laemmli (1970) unter Verwendung eines 8-16%igen Fertig-Gradientengels (Tris-Glycin-Gel, 1,0 mm; Novex) durchgeführt. Gradientengele geben einen breiteren Trennbereich und etwas schärfere Banden. Der Milbenextrakt wurde in verschiedenen Konzentrationen sowohl mit 5x reduzierendem Probrnpuffer (PP red: 60 mM Tris-HCl, 50 mM DTT, 0,003% Bromphenolblau, 10% Glycerol, 3% SDS; pH 6,8), als auch mit 5x nicht reduzierendem Probenpuffer (PP non red, wie PP red, jedoch ohne DTT) sowie TBS versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Für die Größenbestimmung der Proteine wurde ein Eichproteingemisch (ProSieve[®], FMC) mitgeführt.

Die Elektrophorese-Kammer X Cell II Mini-System (Novex) wurde mit dem Laufpuffer (30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS ad 1000 ml; vor Gebrauch 1:10 verdünnen) gefüllt und die Proben sowie der Marker (10 µl nach Verdünnung mit PP non red 1:20) aufgetragen.

Laufbedingungen (Power Pac 300, BioRad): 15 min bei 120 V, anschließend 200 V bis die Farbfront den unteren Rand erreicht hat (ca. 60 min).

Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Proteine in den Polyacrylamidgelen durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Voraussetzung ist deren Fixierung im Gel und das Auswaschen eventuell störender Substanzen. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte in Anlehnung an die Silberfärbung nach Blum et al. (siehe Tab.3). Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 5 ng Protein/Bande). Die Nachteile der Silberfärbung bestehen darin, dass sie umständlich, langwierig (1-2 h), schwierig genau reproduzierbar und nicht quantifizierbar ist, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben (Poehling und Neuhoff, 1981).

Die Gele wurden nach der Silberfärbung in einer Lösung mit 10% Ethanol + 2% Glycerol aufbewahrt oder nach Inkubation in dieser Lösung getrocknet.

Die Geltrocknung erfolgte entweder für 12-36 h zwischen zwei Blättern Zellophanpapier nach Einspannen in einen dafür vorgesehenen Rahmen (Novex) oder 2 h auf dem Maxidry-Geltrockner (Biometra, Göttingen).

Tab. 3: Silberfärbung (Blum et al., modifiziert):

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	40% Ethanol 10% Essigsäure 0,5 ml/l Formaldehyd (37%) 50% Aqua bidest.	>1 h
Waschen	50% Ethanol	3 x 10 min
Reduktion	0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 200mg/l Aqua bidest. ad 1000 ml	1 min
Waschen	Aqua bidest.	3 x 20 sec
Färbung	0,2% AgNO_3 0,02% Formaldehyd (37%) Aqua bidest. ad 1000 ml	10 – 15 min
Waschen	Aqua bidest.	3 x 20 sec
Entwicklung	5% Na_2CO_3 0,04% Formaldehyd (37%) 0,0005% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ Aqua bidest. ad 1000 ml	1 – 5 min
Waschen	Aqua bidest.	2 x 30 sec
Stopplösung	1% Glycin Aqua bidest. ad 1000 ml	10 min

3.3.2 Transfer der Proteinbanden auf Nitrocellulose und Färbung

Die durch die Elektrophorese erhaltenen Proteinbanden wurden durch einen Tankblotter (Hoefer Pharmacia) auf Nitrozellulose (Porendurchmesser 0,45 µm) übertragen. Nitrozellulose-Membranen binden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Sie besitzen hohe Proteinbindungskapazität und eignen sich für Protein- und Immunfärbungen. Selbst Peptide mit nur 20 AS haften noch auf Nitrozellulose. Proteine, die auf Nitrozellulose adsorbiert wurden, lassen sich reversibel anfärben, so dass der Gesamtproteingehalt vor der spezifischen Detektion geschätzt werden kann (Heukeshoven et al., 1988).

Das Gel, die Nitrozellulose, das Filterpapier und die Schwämme wurden für 10 min in Blotpuffer (25 mM Tris, 144 g Glycin, 10% Ethanol) äquilibriert. Anschließend wurden das Gel und die Blotmembran in Gitter zwischen Filterpapier und Schwammpads eingespannt und in den mit Puffer gefüllten Tank eingehängt. Der Transfer lief bei 100 mA (Power Pac 300, BioRad) über 1 h unter ständiger Kühlung, um eine Erwärmung des Blotsandwiches zu vermeiden.

Ponceau-Rotfärbung

Bei Blots mit geringen Proteinmengen ist die Ponceau-Rotfärbung die Methode der Wahl. Sie ermöglicht eine visuelle Kontrolle des Transfers der Proteinbanden vom Gel auf die Blotmembran. Die Nachweisgrenze liegt bei 250-500 ng/Bande. Die Ponceau-Färbung ist reversibel und verträgt sich mit der anschließenden Immunfärbung. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixiert gleichzeitig die Proteine auf dem Blot. Nach Verdünnung der Färbelösung (Ponceau-Konzentrat[®], Sigma, 20 ml, bestehend aus: Ponceau S 2% w/v, Trichloressigsäure 30% w/v, Sulfosalicylsäure 30% w/v) mit 180 ml Aqua bidest. wurde die Blotmembran darin 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 1%iger Essigsäure. Die Membran wurde bis zur vollständigen Entfärbung auf dem Schüttler in 1x TBS gewaschen.

3.3.3 Proteinbanden im Immunoblot

Der Westernblot dient der Identifizierung spezifischer Antigene. Auf der Membran sind die Proteine frei zugänglich für die anschließend hinzugebenden Antikörper. Die Detektion der so fixierten Protein-Antikörper-Komplexe erfolgt dann mit markierten sekundären Antikörpern.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Transferrmembran für 30 min in Blockreagenz (Roti[®]-Block, Roth; 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt) inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper, die von den mit *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* infizierten Kaninchen stammten, erfolgte ebenfalls mit dem Blockreagenz durch weiteres Verdünnen (1:10) mit TBS-T. Der Inkubation über Nacht mit den polyklonalen Antikörpern schloss sich nach 3 x 15 minütigem Waschen die einstündige Inkubation mit dem sekundären HRP-konjugierten Anti-Rabbit-Antikörper an. Als Kontrolle wurde das Serum eines gesunden Kaninchens mitgeführt. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die spezifische Detektion mit SuperSignal[®], West Pico (Pierce) nach Anleitung. Die Lichtsignale wurden mit der Intelligent Dark Box (Fujifilm) photographiert und direkt in den Computer übertragen.

3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2-D Gelelektrophorese ist eine effektive Methode zur Analyse von komplexen Proteingemischen. Das Proteingemisch wird nach zwei vollkommen unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Parametern aufgetrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen bzw. der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte durch isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE in vertikalen Plattengelen entsprechend ihrer molekularen Massen aufgetrennt. Um die 2-D Muster so weit wie möglich zu standardisieren und Einflüsse von dritter Seite so gering wie möglich zu halten, führt man die Trennungen in beiden Dimensionen unter denaturierenden Bedingungen durch.

Durch diese Technik erhält man Protein-Spots in nahezu absoluter biochemischer Reinheit. Nachfolgende Analysen, wie in diesem Fall die Sequenzierung, werden dadurch vereinfacht. Außerdem können auch geringfügige Veränderung der Struktur

und Ladung einzelner Proteine (Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung, Aminosäureaustausch etc.) durch Verschiebung der Position im 2-D Muster erkannt werden.

3.4.1 Probenvorbereitung

PD-10 Säule

Aufgrund der Inkompatibilität der Salze des Carbonat-Puffers im Milbenextrakt mit der 2-D Elektrophorese und der Sequenzierung wurde die Milbensuspension mit Hilfe der PD-10 Säule (Amersham) umgepuffert und gleichzeitig aufkonzentriert. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml 1/10 TBS gespült. Die Probe wurde anschließend bis zu einem Volumen von 2,5 ml aufgetragen und nach dem Einziehen mit 3 ml 1/10 TBS aus der Säule gespült und aufgefangen.

Das Konzentrieren der Probe wurde in einem Zentrifugenfilter (Ultrafree[®], Millipore) vorgenommen, der zunächst in der Ultrazentrifuge (Hermle ZK 380, BHG) mit sterilem Wasser gereinigt wurde. Nach Abschütten des Wassers wurde die Probe eingefüllt und zentrifugiert (10 min bei 4°C und 1200 g). Anschließend wurde eine erneute Proteinbestimmung nach Bradford (Protein Assay, BioRad) durchgeführt. Durch diese Methode lassen sich Proteingehalte von 12,5–100 µg/ml bestimmen. Demnach musste die Probe zuvor gemäß des erwarteten Proteingehaltes verdünnt werden. Zur Erstellung eines Standards wurde eine BSA-Verdünnungsreihe nach Anleitung angefertigt. Die Proben wurden ebenfalls in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

In eine Mikrotiterplatte wurden je 20 µl des Proteinstandards bzw. der Probe pro Kavität pipettiert und je 200 µl Reagenz (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, vor Gebrauch 1:5 verdünnt) hinzugegeben. Die Messung erfolgte im Photometer bei $\lambda = 595 \text{ nm}$.

3.4.2 Isoelektrische Fokussierung der IPG Streifen, 1. Dimension

Werden die zu sequenzierenden Proteine durch IEF aufgetrennt, so sind immobilisierte pH-Gradienten (IPG) zu verwenden, da Carrier-Ampholyte mit dem Sequenzsignalen interferieren (Kennedy et al., 1988).

Der Probenauftrag erfolgte während der Rehydratation der IPG-Streifen (Pharmacia) durch Mischen mit dem Rehydratationspuffer. Im Gegensatz zum direkten Probenauftrag können so größere Mengen an Protein geladen und Präzipitationen am Applikationsort vermieden werden.

Um Verdünnungseffekte bei der Mischung mit den Proben auszugleichen, wurde der Rehydratationspuffer 1,2fach konzentriert angesetzt (2,4 M Thioharnstoff: 0,913 g, 8,4 M Harnstoff: 2,522 g, 4,8% Chaps: 0,24 g, 2,4% Immobiline-Puffer: 120 µl, 0,36% DTT: 0,018 g. Mit 1 ml Aqua bidest. bei 3°C rühren, dann Aqua bidest. ad 5 ml). Anschließend wurden das Gemisch 1 h bei 24°C geschüttelt (Belly Dancer, Stovall) und in die Immobiline DryStrip Reswelling-Kammer (Amersham) gemäß der Länge der Streifen pipettiert. Die Streifen wurden mit der Gelseite auf die Probe gelegt und mit je 2 ml Silikonöl überschichtet. Nach der Rehydratation über Nacht wurden die IPG-Streifen entnommen, auf nasses Filterpapier gelegt und das überschüssige Silikonöl entfernt. Anschließend wurden sie in die Fokussierkammer (Multiphor II Elektrophoresis System, Pharmacia) verbracht. Die Elektrodenstreifen wurden auf die passende Größe zugeschnitten, mit einem definierten Volumen Aqua bidest., das sich nach der Länge der Streifen richtet, angefeuchtet und das Programm gestartet (Elektrophoresis Power Supply EPS 3500XL, Pharmacia).

Die Fokussierung lief zeitlich in Abhängigkeit von der Länge der Streifen und dem gewählten pH-Bereich bei 20°C:

2-D Minigele, 7cm

	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit	Vh
<i>pH 4-7</i>	200V	2mA	5W	0:01 h	
	3500V	2mA	5W	1:30 h	
	3500V	2mA	5W	<u>1:30 h</u>	5250
				3:01 h	
<i>pH 3-10</i>	200V	2mA	5W	0:01 h	
	3500V	2mA	5W	1:30 h	
	3500V	2mA	5W	<u>1:00 h</u>	3500
				2:31 h	

2-D Maxigele, 18cm

	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit	Vh
<i>pH 4-7, pH 3-10</i>	150V	2mA	5W	0:01 h	
	150V	2mA	5W	3:00 h	
	500V	2mA	5W	0:01 h	
	500V	2mA	5W	1:00 h	
	3500V	2mA	5W	1:30 h	
	3500V	2mA	5W	<u>11:00 h</u>	38500
				16:32 h	

3.4.3 SDS-PAGE, 2. Dimension

Die SDS-PAGE der zweidimensionalen Gelelektrophorese besteht aus vier Schritten: 1) Herstellen der Gele, 2) Equilibrierung der IPG-Streifen in SDS-Puffer, 3) Laden der equilibrierten IPG-Streifen auf das SDS-Gel, 4) Elektrophorese.

3.4.3.1 Herstellung der SDS-Gele

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Gele für die zweite Dimension verwendet. Es handelte sich dabei um 2-D Mini-Gradientengele, große Gradientengele (10-20%) und um große kontinuierliche Gele (10%).

A: 2-D Mini-Gradientengele, 8-16% (Novex)

(für 7cm lange IPG-Streifen)

B: 2-D Maxi-Gradientengele, 10-20%

(für 18 cm lange IPG-Streifen)

	leichte Lösung	schwere Lösung
	600 ml	550 ml
Acrylamid	150 ml	275 ml
1M Tris-HCl (pH 8,8)	225 ml	206 ml
1M Thiosulfat	3 ml	2,75 ml
Glycerol	/	37 ml
Aqua bidest.	215 ml	23 ml

5 min entlüften

10% APS	6 ml	5,5 ml
10% TEMED	1,1 ml	1 ml

Acrylamid 40% 300 ml

Acrylamid 117 g

Piperazin Diacrylamid (PDA) 3 g

Behandlung mit Ionenaustauscher 1 g

10 min bei RT rühren, anschließend über Whatman N° 1 Filter filtrieren.

<u>1M Tris-HCl</u>	<u>1000 ml</u>
--------------------	----------------

Tris M 121,14	121,14 g
---------------	----------

Mit HCl auf pH 8,8 bringen.

<u>1M Thiosulfat</u>	<u>100 ml</u>
----------------------	---------------

Na-Thiosulfat Pentahydrat, M 248,18	24,818 g
-------------------------------------	----------

APS

10% Ammoniumperoxidsulfat	2 g
---------------------------	-----

Aqua bidest.	ad 20 ml
--------------	----------

TEMED

10% in 0,5ml Aqua bidest.

Aqua bidest.	ad 5 ml
--------------	---------

Das Gießen der Gradientgele wurde im Gradient Maker (Hoefer DALT, Amersham) vorgenommen.

C: 2-D Maxigele, 10%

(für 18 cm IPG-Streifen)

Zunächst wurde ein 15%iges Fußgel (2,5 ml Acrylamid, 1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 8,8), 1,25 ml Aqua bidest., 25 µl APS, 2,5 µl Temed) als Auslaufschutz gegossen. Nach der Polymerisation des Fußgels erfolgte die Herstellung der 1,5 mm dicken SDS-Gele: 32 ml ProSieve[®] 50 gel solution (FMC), 40 ml Tris-HCl (1M, pH 8,8), 88 ml Aqua bidest. filtriert, 800 µl APS (10%), 80 µl TEMED.

Die ProSieve[®] Acrylamidlösung wurde der Verwendung herkömmlicher Acrylamid/Bisacrylamid-Mischungen vorgezogen, da sie die Effizienz einer Gradientengel-Separation erreicht. Hinzu kommen Vorteile wie Resolution großer Proteine, größere Proteinmobilität, kürzere Färbungs- und Entfärbungszeiten, robustere Matrix, geringerer Hintergrund bei Silberfärbungen und somit größere Sensitivität.

Die Gele wurden in die dafür vorgesehene Vorrichtung gegossen. Während ihrer Polymerisation (mindestens 2 h) erfolgte die Equilibrierung der IPG-Streifen.

3.4.3.2 Equilibrierung der IPG-Streifen

Die Elektrodenstreifen wurden in Tubes (7 cm Streifen) oder Petrischalen (18 cm Streifen) mit Equilibrierungspuffer (72 g Harnstoff, 6 M; 60 g Glycerin, 30% w/v; 8 g SDS, 4% w/v; 6,68 ml Tris-HCl, 50 mM, pH 8,8; Aqua bidest. ad 200 ml) gelegt.

1. Equilibrierungspuffer + 100 mg DTT/10 ml, 15 min
Für 18 cm Streifen + 150 mg DTT/10 ml, 15 min
2. Equilibrierungspuffer + 240 mg Iodacetamid/10 ml, 15 min
2 x mit Laufpuffer (vor Zusatz von SDS filtrieren) spülen.

3.4.3.3 Auftrag der IPG-Streifen

Nach der Polymerisation der Gele und der Equilibrierung der IPG-Streifen wurden diese unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig auf die Gele gelegt. Der Proteinmarker (ProSieve[®], FMC) wurde unverdünnt auf Filterpapierstücke pipettiert (3 µl bei Silberfärbungen, 20 µl bei Blots) und neben die Enden der IPG-Streifen auf die Gele verbracht.

Nach Herstellung einer Agaroselösung (100 ml SDS Elektrophorese-Puffer, 0,5 g Agarose, einige Körner Bromphenolblau) wurde diese erhitzt bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf etwa 75°C wurde diese über Streifen und Marker mittels Pipette blasenfrei aufgetragen.

3.4.3.4 Elektrophorese der zweiten Dimension

A: 2-D Mini-Gradientengele, 8-16%

- Elektrophorese-Kammer: X Cell II Mini, Novex.
- Laufpuffer (pH 8,8): 30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, Aqua bidest. ad 1000ml; vor Gebrauch 1:10 verdünnen.
- Laufbedingungen: 120 V, 10 min, dann bei 200 V ca. 60 min.

B: 2-D Maxi-Gradientengele, 10-20%

- Elektrophorese-Kammer: Hoefer-Dalt, Amersham.
- Laufpuffer (pH 8,3): 60,5 g Tris (25 mM), 288 g Glycin (192 mM), 20 g SDS (0,1% w/v), Aqua bidest. ad 20 l.
- Laufbedingungen: 10°C, 100 V, 400 mA und 300 W über Nacht.

C: 2-D Maxigel, 10%

- Elektrophorese-Kammer: Mini Protean II 2D Zelle, BioRad
- Laufpuffer (pH 8,8): 30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, Aqua bidest. ad 1000ml; vor Gebrauch 1:10 verdünnen.
- Laufbedingungen: 10°C, 100 V ca. 1 h , 300 V ca. 3 h

3.4.4 Transfer der Proteinspots auf Nitrocellulose

Der Transfer der Proteinspots auf Nitrocellulose erfolgte bei den 2-D Gelen gemäß der auf S. 5 beschriebenen Methodik.

A: 2-D Mini-Gradientengele, 8-16%

- Tankblotter: Hoefer Pharmacia
- Blotpuffer: 25 mM Tris, 144 g Glycin, 10% Ethanol
- Transferparameter: 100 mA, 1 h, unter Kühlung

B: 2-D Maxi-Gradientengele, 10-20%

- Tankblotter: Hoefer Pharmacia
- Blotpuffer (Towbin-Puffer, Pharmacia): 60,56 g Tris (25 mM), 288,27 g Glycin (192 mM), 1 g SDS (0,005%), Aqua bidest. ad 2000 ml
- Transferparameter: 330 mA, ca. 41 V, 22 h bei 10°C

C: 2-D Maxigel, 10%

- Tankblotter: Hoefer Pharmacia
- Blotpuffer (Towbin-Puffer, Pharmacia): 60,56 g Tris (25 mM), 288,27 g Glycin (192 mM), 1 g SDS (0,005%), Aqua bidest. ad 2000 ml.
- Transferparameter: 330 mA, ca. 41 V, 22 h bei 10°C

3.4.5 Transfer der Proteinspots auf eine PVDF-Membran

Die hydrophoben PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid, Porengröße: 0,22 µm), haben eine ähnliche Bindungskapazität für Proteine wie Nitrozellulose-Membranen (170-200 µg/cm²), sind aber mechanisch und chemisch wesentlich stabiler, weswegen sie besonders bei der Sequenzierung eingesetzt werden. Für Blot und Entwicklung gelten ähnliche Bedingungen wie bei Nitrozellulose, doch bindet die PVDF-Membran im Gegensatz zu Nitrozellulose auch kleine Mengen Protein nicht vollständig. Je nach Protein passieren 10-50% die Membran ungebunden. Das gesuchte Protein kann bei der PVDF-Membran durch Commassiefärbung identifiziert werden, ohne dass die anschließende Mikrosequenzierung beeinflusst wird (Xu & Shively 1988).

Zunächst wird eine CAPS-Puffer-Stammlösung hergestellt (3-Cyclohexamino-propan Sulfonsäure: 22,13 g, in 990 ml Aqua bidest. lösen; mit 2 M NaOH auf pH 11 titrieren, dann Aqua bidest. ad 1 l). Nach dem Zuschneiden zweier PVDF-Membranen wurden diese für 15 sec in Methanol gelegt, gründlich mit Aqua bidest. gespült und anschließend 15 min in Blotpuffer (100 ml der CAPS-Stammlösung, 100 ml Methanol und 800 ml Aqua bidest.) äquiliert.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese ebenfalls 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Nach dem Zusammensetzen des Blotsandwichs und dem Einhängen in den Tank lief der Blot ca. 20 min bei 90 V und 300 mA.

3.4.6 Coomassiefärbung (R-250) der PVDF-Membran

Die Textilfarbe Coomassie Brilliantblau R-250 gehört zu den am häufigsten benutzten und empfindlichsten organischen Farbstoffen. Die Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen Färbemethoden ist jedoch mäßig, die Nachweisgrenze liegt bei 0,2-1 µg pro Proteinbande. Der Farbstoff bindet in saurem Medium an frei geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Dadurch ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen der Farbintensität und dem Anteil des jeweiligen Proteins an Lysin, Arginin und Histidinresten.

Nachdem die Proteinspots vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen waren, erfolgte die Coomassiefärbung für 1-5 min in einem Schritt direkt in der Fixierlösung (227 ml Methanol, 46 ml Eisessig, 1,25 g Coomassie Blue R250 ad 500 ml Aqua bidest.). Die Entfärbung der Membran erfolgte durch eine Mischung von Methanol/ Essigsäure/ Aqua bidest. im Verhältnis 5:10:40.

3.5 Sequenzierung

Die Proteinsequenz der elektrophoretisch aufgetrennten Spots wurde anhand des Edman-Abbaus bestimmt. Es handelt sich dabei um einen zyklischen Prozess, bei dem in jedem Reaktionszyklus von einem Ende der Peptidkette die endständige (N-terminale) AS abgespalten und identifiziert wird.

Die Mikrosequenzierung nach Edman liefert mit 1-10 µg Protein Sequenzen von 20-30 Aminosäurenlängen (Rehm, 1996). Die maximale Ausbeute bei der Sequenzierung bezüglich des Proteingehaltes liegt jedoch lediglich bei 50%.

Sie wurde von der Aventis Pharma (ehemals Hoechst) mit einem Procise ABI 494 cLC durchgeführt.