

I. FORTSCHRITTSBERICHT

FORTSCHRITTSBERICHT DER ERSTEN PHASE DES PROJEKTES 1244:

ABBAU VON TSE ERREGENDEN PRIONEN UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN - VALIDIERUNG DER PRIONENANALYTIK IN EINER UNBEKANNTEN FAULSCHLAMMMATRIX UND PRIONEN-ABBAUVERSUCHE UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN

NOVEMBER 2001

INHALT

1. Allgemeines.....	2
2. Zusammenfassung der Ergebnisse	3
2.1. Proteolytische Aktivität (IFA-Tulln).....	3
2.2. Detektionsversuche nach Proteinfällungsverfahren: Ultrazentrifugation Carrezfällung und Ethanol-fällung (BATS-B-Mödling).....	4
2.3. Nachweis von PrP ^{SC} (Maus-Scrapie) in Faulschlamm mittels Western-Plot (IAH- Edinburgh).....	4
2.3.1. Ethanol-fällung	5
2.3.2. Detergens- und Temperatureinfluss	5
2.3.3. Lauroylsarcosinkonzentration und Temperaturbehandlung.....	6
2.3.4. Ultrazentrifugation und erster Vergleich mit dem Prionics-Check®	6
2.3.5. Temperatureinfluss und erste Verdünnungsreihe.....	7
2.3.6. Detektion von PrP ^{SC} in Faulschlamm-matrix.....	7
3. Abkürzungsverzeichnis	10
4. Zusammenfassung.....	11

Anhang 1: Enzymaktivitätsbestimmungen

Anhang 2: Ultrazentrifugation

Anhang 3: Carrezfällung

Anhang 4: Ethanol-fällung (PrP^{SC})

Anhang 5: Protokoll Projektmeeting 17.08.01

Anhang 6: Protokoll IAH

Anhang 7: Erfahrungsaustausch

Die Anhänge 2-6 sind aufgrund der Relevanz für unseren Projektpartner in Schottland in englischer Sprache abgefasst.

1. ALLGEMEINES

Im Projektantrag wird das Institute for Animal Health in Edinburgh/UK als einziger Projektpartner genannt. Inzwischen hat sich dankenswerterweise auch die Bundesanstalt für vet. med. Untersuchungen in Mödling (BATSB) dazu bereit erklärt, das L-3 Labor in den Zeiten in denen es nicht für TSE-Routineuntersuchungen verwendet wird, für Versuche im Rahmen dieses Projektes zur Verfügung zu stellen.

Voruntersuchungen, ob das Protokoll und die Chemikalien des Prionics-Check[®] Testkits zum Nachweis von Prionprotein in Faulschlammatrix geeignet sind, sowie die ersten Aufreinigungsexperimente konnten daher bereits in Mödling durchgeführt werden.

Während der Arbeiten stellte sich jedoch heraus, dass die für Hirnmatrix optimierte und in den Prionics-Check[®] verpackte Prionproteinnachweismethode nur bedingt auf die unbekannte Faulschlammatrix übertragbar ist.

Am Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit in Edinburgh, UK (IAH-E) wurden basierend auf den Vorversuchen in Mödling Detektionsversuche des proteaseresistenten Prionproteins (PrP^{SC}) in Faulschlammatrix durchgeführt. Dieses Labor konnte jedoch erst vom 24. September bis 11. Oktober 2001 zur Verfügung gestellt werden.

Durch die am IAH in Edinburgh etablierte Nachweismethode konnte PrP^{SC} aus Scrapie-Maushirnhomogenat sehr gut in Faulschlammatrix nachgewiesen werden. Der Erfolg liegt einerseits im in Edinburgh verfügbaren Know-how und andererseits in der besseren Variabilität der einzelnen Parameter und in der Verwendung von Scrapie-Maushirn als Quelle für PrP^{SC} (da in diesem Mausmodell der Prionen-Titer sehr hoch ist) begründet.

In der Kürze der zur Verfügung stehenden Zeit konnten jedoch nicht alle Variablen zur Validierung der Prionenanalytik in unbekannter Faulschlammatrix abgeklärt, sowie auch keine Versuche mit „aktivem“ (=weder thermisch behandelt noch gammabestrahlt) Faulschlamm durchgeführt werden.

Die Abbauversuche von Prionenproteinen unter anaeroben Bedingungen (zweiter Teil des Projektes) können aufgrund der pathogenfreien Mausekultur im Gebäude des IAH-E nicht zur Durchführung in Edinburgh geplant werden. Die BATSB könnte die L3-Laboreinheit für diese Versuche zur Verfügung stellen. Folglich ist es notwendig, die am IAH-E erzielten Ergebnisse auf die Bedingungen des Labors in Mödling zu übertragen.

Am IAH-E wurde 22A/SV Maus-Scrapie PrP^{SC} wegen des hohen PrP^{SC}-Titers im Hirnhomogenat als Modellsubstanz verwendet. Das in Mödling als Referenzmaterial für die BSE-Routineanalytik verwendete natürliche Scrapie-Schafhirn ist nicht genau definiert, weiters ist auch der Titer von PrP^{SC} nicht bekannt. Dies würde eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen oder unmöglich machen.

Die Auswertung des Western-Plots unterscheidet sich auch erheblich in den einzelnen Labors. Am IAH in Edinburgh wurde die Horseradish-Peroxidase Supersignal Methode in Kombination mit einer Digitalkamera verwendet. In Mödling wird das System alkalische Phosphatase in Kombination mit einem Röntgenfilm angewandt.

Die Abklärung der noch offenen Variablen sowie die Validierung des gewählten Nachweisverfahrens von PrP^{SC} in Faulschlammatrix kann daher in Mödling erst nach Ausstellen einer (bereits beantragten) Importgenehmigung für Maus-Scrapie aus Edinburgh und dem Eintreffen der Materialien durchgeführt werden.

Vor der Finanzierungszusage des BMLFUW zu diesem Projekt wurde eine Reise von DI R. Kirchmayr zu einem Meeting der Arbeitsgruppe Downstreamproceasing in Cambridge getätigt (in dem die Weichen für eine Kooperation mit der BATSB Mödling gestellt wurden, sowie sehr wertvolle Daten und Informationen bezüglich der Nachweisbarkeit von Prionen gesammelt werden konnten). Weiters konnte eine Reise nach Edinburgh zur Sondierung der Möglichkeit Versuche im Rahmen dieses Projektes am IAH- Edinburgh durchzuführen (06.-08. April: Prof. Dr. R. Braun und DI R. Kirchmayr mit der Begleitung von Mag. H. Reichl, Hämosan, Wien) durchgeführt werden.

Am 17. August wurde eine Zwischenprojektbesprechung am IFA-Tulln abgehalten (siehe Anhang 5), in dem die Zwischenergebnisse diskutiert und die weitere Vorgangsweise vereinbart wurde.

Eine Diskussion der bis jetzt erzielten Ergebnisse sowie ein Erfahrungsaustausch zum Thema „Nachweis von TSE-Prionen in tierischen Geweben und anderen Substraten“ mit Experten aus Deutschland und Österreich in Kooperation mit der OÖ.TKV Ges.m.b.H. wurde für den 13. November in Wien organisiert (Teilnehmerliste siehe Anhang 3).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die bisher erzielten Ergebnisse ganz im Sinne des ersten Projektzieles der Nachweisbarkeit von Prionprotein in Faulschlammatrix verlaufen. Eine Zulassung zu Arbeiten im L3-Laborbereich der einzelnen Projektpartner stellte sich jedoch im Sinne der von beiden Seiten zu garantierenden Personal- und Laborsicherheit auch als sehr langwierig heraus. Weiters musste auch festgestellt werden, dass die Optimierung des Nachweises von PrP^{Sc} auf Hirnmatrix sich nicht gänzlich auf die unbekannt Matrix übertragen lässt. Die Abklärung der sich damit ergebenden Fragestellungen, die Validierung des auf diese Matrix optimierten Tests, sowie die Übertragung in verschiedene Labors und damit verbundenen verschiedenen Detektionsmöglichkeiten (Digitalkamera in Edinburgh resp. Röntgenfilm in Mödling) erfordert einen viel höheren Gesamtaufwand, als dies im Projektvorschlag vorgesehen wurde.

2. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

2.1. PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT (IFA-TULLN)

Die Deaktivierung des Prionproteins in der anaeroben Faulschlammatrix wird durch eine proteolytisch enzymatische Spaltung erfolgen.

Zur Abschätzung der enzymatisch proteolytischen Aktivität des Faulschlammes wurde die Spaltung der gefärbten Azogruppe von Azocasein als Indikator angewandt und fotometrisch ausgewertet (siehe Anhang 1).

Die Proteolytische Aktivität hängt von der Biomassekonzentration ab. Die Anwesenheit von Sauerstoff änderte die Aktivität nicht. Dies deutet darauf hin, dass Exoenzyme nicht wahllos in die Fermentationsbrühe ausgeschüttet werden. Die Inhibition der Proteolytischen Aktivität konnte durch kommerzielle Proteaseinhibitoren in der vorgeschlagenen Konzentration nicht erreicht werden. Eine Versuchsreihe mit bedeutend höheren Konzentrationen ist noch durchzuführen.

2.2. DETEKTIONSVERSUCHE NACH PROTEINFÄLLUNGSVERFAHREN: ULTRAZENTRIFUGATION CARREZFÄLLUNG UND ETHANOLFÄLLUNG (BATSB-MÖDLING)

Um eine Anreicherung von Prionprotein aus dem Faulschlamm zu erzielen wurde zuerst versucht das gesamte Protein der Lösung/Suspension in ein Pellet zu präzipitieren (siehe Anhang 2-5).

Ausgehend von der Hypothese, dass sich physiologisches (nicht infektiöses) Prionprotein (PrP^{C}) in Fällungsverfahren genauso verhalten wird wie PrP^{SC} , wurde für diese Versuche lediglich Homogenat von BSE-negativ befundenen Hirnproben verwendet.

Nach der Ultrazentrifugation (1 und 2 Stunden bei ca. 180 000 g) von mit Hirnhomogenat versetztem Faulschlamm konnte noch Protein im Überstand nachgewiesen werden. Im SDS-PAGE konnte dann nachgewiesen werden, dass der Überstand auch Proteine mit dem selben Molekulargewicht des Prionproteins enthält (siehe Anhang 2).

Eine Carrezfällung eines kurz anzentrifugierten Überstandes (um zuerst die Feststoffe aus der Lösung zu entfernen) führte weder im ersten Pellet, im „Carrez-Pellet“ (mit Kaliumhexacyanoferrat und Zinksulfat durch Mitfällung geklärt) noch im geklärten Überstand zu einem eindeutigen Ergebnis in welcher Stufe das PrP^{C} präzipitiert wurde (siehe Anhang 3).

Diese Versuche führen zu 2 Schlüssen: Erstens, dass sich physiologisches Prionprotein (PrP^{C}) in den Fällungsverfahren anders verhält als infektiöses Prionprotein (PrP^{SC}) oder zweitens, dass diese Verfahren nicht dazu geeignet sind, PrP^{C} und PrP^{SC} zu präzipitieren.

Wie von Mag. Reichl bestätigt wurde, verhält sich PrP^{C} anders als PrP^{SC} .

Um weiters einen unbekanntem Chemikalieneinfluss auszuschalten, wurde die in verschiedenen Labors erprobte Ethanol-fällung von PrP^{SC} durchgeführt.

Die meisten „BSE-Schnelltests“ beruhen auf einer Antikörperreaktion auf das Prionprotein. Die Unterscheidung von physiologischem und infektiösem Prionprotein erfolgt durch deren unterschiedliche Proteinase K (PK) Resistenz. Durch den Einsatz von Scrapie-pos. Hirnhomogenat in dieser Versuchsreihe konnte durch den PK-Verdauschritt auch das Hintergrundrauschen ausgeschaltet werden (siehe Anhang 4). Es konnte gezeigt werden, dass einerseits die Ethanol-fällung eine funktionierende Präzipitationsmöglichkeit darstellt, und andererseits PrP^{SC} aus der Faulschlamm-matrix nachgewiesen werden kann.

2.3. NACHWEIS VON PrP^{SC} (MAUS-SCRAPIE) IN FAULSCHLAMM MITTELS WESTERN-PLOT (IAH-EDINBURGH)

Für die folgenden Versuche (siehe Anhang 6) wurde wegen des hohen PrP^{SC} Titers Maus-Scrapie positives Hirnhomogenat (ME 7 und 22A/SV) als PrP^{SC} Quelle, sowie aufgrund der pathogenfreien Mausekultur im Gebäude des IAH lediglich gammabestrahelter Faulschlamm (25,6 kGray) eingesetzt.

Das angewandte Aufreinigungs- oder Anreicherungsprotokoll setzt sich aus folgenden prinzipiellen Schritten zusammen:

1. Zugabe von Hirnhomogenat (Scrapie pos.) zu Faulschlammatrix
2. Kurze Zentrifugation zur Entfernung der Feststoffe aus der Suspension (1-7 min.; 2000 g)
3. Ausfällung der Proteine aus dem Überstand durch Zugabe von Ethanol unter Kühlung (0°C)
4. Zentrifugation (10 min.; 2000 g), Entfernung des alkoholhaltigen Überstandes
5. Resuspension des Pellets in Verdaupuffer
6. Proteinase K Verdau (1 Stunde, 37°C) zur Entfernung von störenden Proteinen und physiologischem Prionprotein
7. Denaturierung
8. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Auftrennung
9. Western-Plot: 1. Antikörper: 6H4
2. Antikörper: Esel-Anti-Maus verknüpft mit Meerrettich-Peroxidase
10. Detektion mit Pierce-SuperSignal und Kodak Digitalkamera

2.3.1. Ethanolfällung

Um zu überprüfen ob eine selektive Anreicherung von PrP^{SC} aus dem ersten Überstand durch die Alkoholfällung möglich ist, wurde eine Präzipitationsreihe mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Wiederfindungsrate von PrP^{SC} der steigenden Ethanolkonzentration proportional ist. Daher wurde in den weiteren Versuchen ein 4-facher Überschuss an Ethanol zur Fällung des PrP^{SC} eingesetzt.

2.3.2. Detergens- und Temperatureinfluss

Die Mikroorganismen eines gammabestrahlten Faulschlammes sind nicht mehr funktionsfähig, die vorhandenen Enzyme werden dadurch jedoch nicht unbedingt beeinträchtigt und können in der Regel dann durch eine Dampfsterilisation deaktiviert werden. Um auszuschließen, dass eventuell vorhandene Enzyme PrP^{SC} in diesen Extraktionsschritten beeinträchtigen, wurde temperatur- und gammabehandelter und lediglich gammabehandelter Faulschlamm mit Hirnhomogenat versetzt. Weiters wurde zur besseren Extraktion ein mildes Detergens (Lauroylsarcosin) zugesetzt.

Ohne Zugabe von Lauroylsarcosin konnte PrP^{SC} aus der vollen Faulschlammatrix nicht nachgewiesen werden. Eine Zugabe von Detergens zur Mischung aus Hirnhomogenat und Faulschlamm ist essentiell, um PrP^{SC} bei der ersten Zentrifugation im Überstand zu behalten und folglich detektieren zu können.

Weiters konnte festgestellt werden, dass die Wiederfindungsrate von PrP^{SC} bei den vorher dampfbehandelten Proben bedeutend besser war, als bei jenen ohne Dampfbehandlung.

Einerseits könnten tatsächlich Enzyme die Epitope geschädigt haben, die zur Erkennung durch den 6H4 Antikörper notwendig sind, andererseits könnte eine schwer charakterisierbare Änderung der Matrix zu einer schlechteren Adhäsion von PrP^{SC} führen.

2.3.3. Lauroylsarcosinkonzentration und Temperaturbehandlung

Eine Laurylsarcosinzugabe von 0,32% hat sich in Versuchen am IAH-E für reines Hirnhomogenat als optimale Konzentration herausgestellt. Bei höheren Konzentrationen ist mit einer Störung in der Gelelektrophorese zu rechnen.

Zur Optimierung der Detergentskonzentration wurde eine Versuchsreihe mit 0,32%; 0,50%; 0,75% und 1,00% Lauroylsarcosin in der Hirnhomogenat/Faulschlammatrixmischung durchgeführt.

Da PrP^{SC} des 22A/SV Stammes als Temperaturstabil (100°C) gilt, wurde obige Versuchsreihe nochmals durchgeführt, die Proben jedoch nach der Detergentszugabe 10 min. bei 100°C im Heizblock behandelt.

Überraschenderweise konnte PrP^{SC} bei den temperaturbehandelten Proben nicht detektiert werden. Eine Erhitzung von PrP^{SC} auf 100°C schädigt offensichtlich die Antikörpererkennungsepitope.

Bei den nicht temperaturbehandelten Proben konnte eine bessere Wiederfindung bei 0,50% Lauroylsarcosin beobachtet werden. Diese Konzentration wurde daher für die weiteren Experimente angewandt.

2.3.4. Ultrazentrifugation und erster Vergleich mit dem Prionics-Check[®]

Eine Verdünnungsreihe von 0,476% bis 0,015% Hirnhomogenat in Faulschlammatrix (jeweils mit und ohne Temperaturvorbehandlung; Verdünnungsschritte jeweils Reduktion um die Hälfte) wurde zur ersten Abschätzung des Detektionslimits von PrP^{SC} in Faulschlammatrix herangezogen.

Die Konzentrationsschritte 0,06% - 0,015% (die sonst unter dem erwarteten Detektionslimit von 0,1 mg Hirnmatrix am Gel liegen würden) wurden nach dem PK-Verdau einer einstündigen Ultrazentrifugation zum Zwecke der weiteren Anreicherung unterzogen. Rechnerisch würde dann eine Detektion möglich gewesen sein, tatsächlich konnte jedoch nicht die erwartete Anreicherung beobachtet werden. Wegen der Umständlichkeit dieses Schrittes wurde eine genauere Überprüfung nicht durchgeführt.

In einem ähnlichen Versuchsansatz (Verdünnungsreihe von Hirnhomogenat in gleichen Konzentrationsschritten, Faulschlamm mit und ohne Temperaturvorbehandlung, Ultrazentrifugationsschritt) wurden folgende Pufferlösungen aus dem Prionics-Check[®] in den Mengen und Konzentrationen gemäß dem Prionics-Check[®] Protokoll verwendet:

Resuspension des Alkohol-fällungspellets in Homogenisierungspuffer, Verdau-puffer, Proteinase K-Lösung, PK-Stopp, Sample-Puffer, Blockierungspuffer und 6H4 Antikörper.

Wie später bestätigt, konnte PrP^{SC} in den Proben ohne thermische Vorbehandlung des Schlammes bis zu einer Konzentration von 0,12% Hirn nachgewiesen werden, in jenen mit temperatursterilisiertem Faulschlamm sogar bis zu einer Konz. von 0,06% Hirn in Faulschlammatrix.

Im Parallelversuch mit den Lösungen aus dem Prionics-Check[®] konnte PrP^{SC} lediglich in der Positivkontrolle nachgewiesen werden.

Da die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Prionics-Check[®] nicht bekannt sind, ist eine systematische Überprüfung notwendig. Diese Versuche sollen wegen des schwer

abschätzbaren Zeithorizontes sowie dem standardisierten Versuchsaufbau in der BATS in Mödling durchgeführt werden.

2.3.5. Temperatureinfluss und erste Verdünnungsreihe

In den vorgehenden Versuchsreihen konnte ein PrP^{SC} Extraktions- und Detektionsverfahren in den wesentlichen Zügen erarbeitet und abgeklärt werden.

In dieser Versuchsreihe soll nochmals das Detektionslimit mittels einer Hirnhomogenatverdünnungsreihe von 0,0074% bis 0,238% Hirn in Faulschlamm eingegrenzt werden. Weiters soll abgeklärt werden ob ein negativer Befund nach der Erhitzung der Hirnhomogenats in der Faulschlammatrix (siehe Punkt 2.3.2) auf die Anwesenheit von Lauroylsarcosin zurückzuführen ist.

In diesem Procedere wurde die Mischung aus Hirnhomogenat und Faulschlamm vor der Zugabe des Detergens 10 min. auf 100°C erhitzt. Diese Serie wurde mit der Mischung aus Hirnhomogenat und temperaturbehandeltem Faulschlamm sowie Hirnhomogenat und Faulschlamm ohne Vorbehandlung verglichen.

Eine Erhitzung des angeblich temperaturstabilen PrP^{SC} aus dem 22A/SV Stamm in Faulschlammatrix in An- und Abwesenheit von Lauroylsarcosin führt zu keiner Detektion des PrP^{SC}. Weiters zeigen diese Versuche, dass die Nachweisgrenze tatsächlich in der Größenordnung von 0,1% von Scrapie infiziertem 22A/SV Maushirn in Faulschlamm liegt und dass der Nachweis in temperaturvorbehandeltem Schlamm empfindlicher ist als in nicht-temperaturbehandelter Matrix.

2.3.6. Detektion von PrP^{SC} in Faulschlammatrix

Wie in den vorgehenden Kapiteln beschrieben wurde konnte das untenstehende Aufreinigungs- und Detektionsprotokoll (siehe Tabelle 1) als eine Möglichkeit der Detektion von TSE-Prionen in Faulschlammatrix erarbeitet werden.

In dem in diesen Experimenten durchgeführten Detektionsvergleich einer Hirnhomogenatverdünnungsreihe von 0,91% bis 0,14% Hirn in temperatur- und nicht-temperaturvorbehandeltem Faulschlamm konnten die Ergebnisse aus den vorgehenden Experimenten bestätigt werden:

Eine Sterilisation oder Pasteurisation des Faulschlammes vor der Zugabe des Hirnhomogenates ermöglicht eine bessere Detektion von PrP^{SC} im Vergleich zu nicht temperaturbehandelter Faulschlammatrix.

Eine Konzentration von 0,114% Hirn in pasteurisierter (10 min 100°C) und γ -bestrahlter Faulschlammatrix kann zweifelsfrei nachgewiesen werden.

In γ -bestrahlter Faulschlammatrix kann eine Konzentration von 0,228% Hirn zweifelsfrei nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1).

Tabelle 1: Extraktions- und Nachweisprotokoll von PrP^{Sc} in Faulschlammatrix

Extraktion:

500 µl Faulschlammatrix in ein 2,0ml
Eppendorf Reaktionsgefäß
50 µl Hirnhomogenat
15 sec. Vortex
10 min Raumtemperatur (17°C)
29.0 µl Lauroylsarcosinlösung (10%)
15 sec. Vortex
10 min Raumtemperatur (17°C)
2 mal 15 sec. Vortex
Zentrifugation in der Tischzentrifuge 2000g;
2,0 min
350 µl Überstand in ein 2,0 ml Eppendorf
Reaktionsgefäß
1500 µl Ethanol zugeben
20 min 0°C (Eiswasser)
Zentrifugation in der Tischzentrifuge 2000 g,
10 min
Alkohohlältiger Überstand wird verworfen
Offene Eppendorfs: 5 min Raumtemp.;
Öffnung nach unten
Resuspension des Pellets in 50 µl
Verdaupuffer (Gesamtvol.: 60 µl)

Verdau:

5 µl Proteinase K Lösung
(10 µl 20mg/ml Stammlösung verdünnt in
300 µl Verdaupuffer... = 50 µg PK/ml)
Kurze Zentrifugation 10 sec.
Vortex
60 min 37°C im Heizblock
5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)
Kurze Zentrifugation 10 sec.
Vortex

Denaturierung:

12 µl 5x Sample Puffer zugeben
30 min 90°C Denaturierung
Vortex,
Kurze Zentrifugation 10 sec.
3 min 90°C offene Gefäße um noch
vorhandenen Alkohol zu entfernen

Polyacrylamidgelelektrophorese

12% SDS Gele
MES/200 V/35 min

Western Plot

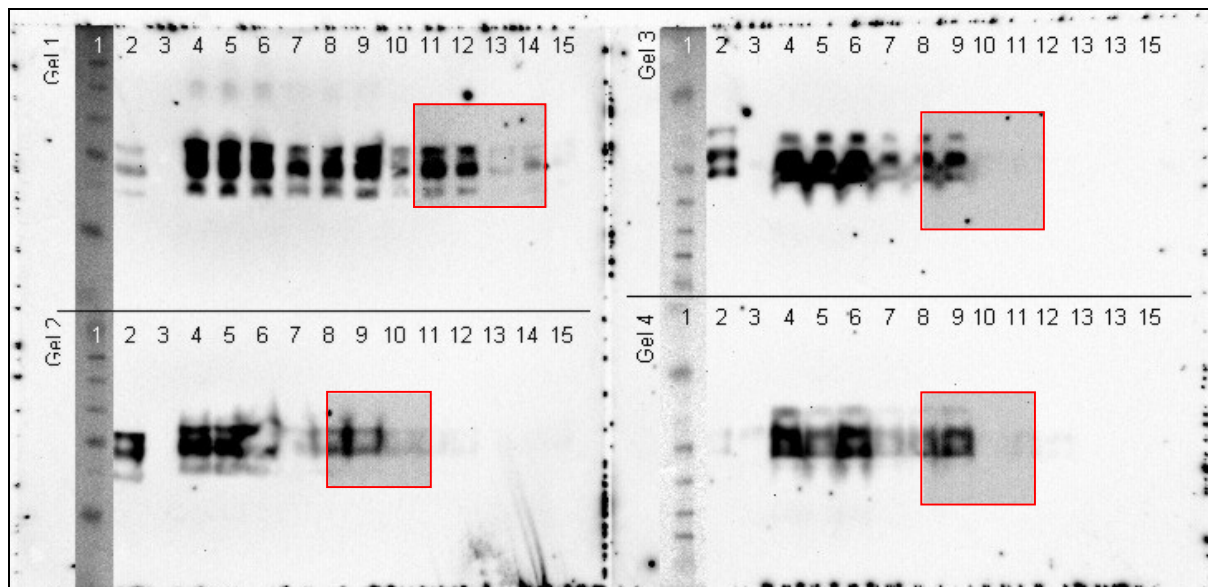
60 min./ 30V
6H4-Antikörper
Pierce-Supersignal/Kodak Digitalkamera

Gel 1, 3:

Nr.	Probe Nr.	Probenvol.	Faulschlamm (=ADM)	Hirnhomogat in ADM.	Hirn am Gel
1	60	7 μ l	Marker SeeBlue		
2	50 Pos.	10 μ l	500 μ l Wasser	0.227%	0.125 mg
3	40 Neg.	10 μ l	500 μ l ADM, pasteur.	0.909%	0.023 mg
4, 5, 6	1/ 2/ 3	10 μ l	500 μ l ADM, pasteur.	0.909%	0.500 mg
7, 8, 9	4/ 5/ 6	10 μ l	500 μ l ADM, pasteur.	0.455%	0.250 mg
10, 11, 12	7/ 8/ 9	10 μ l	500 μ l ADM, pasteur.	0.227%	0.125 mg
13, 14, 15	10/11/12	10 μ l	500 μ l ADM, pasteur.	0.114%	0.063 mg

Gel 2, 4:

Nr.	Probe Nr.	Probenvol.	Faulschlamm (=ADM)	Hirnhomogenat in ADM.	Hirn am Gel
1	60	7 μ l	Marker SeeBlue		
2	51 Pos.	10 μ l	500 μ l Wasser	0.227%	0.125 mg
3	41 Neg.	10 μ l	500 μ l ADM	0.909%	0.023 mg
4, 5, 6	13/14/15	10 μ l	500 μ l ADM	0.909%	0.500 mg
7, 8, 9	16/17/18	10 μ l	500 μ l ADM	0.455%	0.250 mg
10, 11, 12	19/20/21	10 μ l	500 μ l ADM	0.227%	0.125 mg
13, 14, 15	22/23/24	10 μ l	500 μ l ADM	0.114%	0.063 mg



Linie 1 (Marker): Durchlichtbild der Membran

Rot umrahmte Flächen: Bild bearbeitet - stärkerer Kontrast

Abbildung 1: Detektion von PrP^{SC} in Faulschlammatrix

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Microliter (1.10 ⁻⁶ Liter)
γ.....	Gamma
ADM	Anaerobic Digestion Matrix: Faulschlammatrix eines anaeroben Biogasreaktors
BATSB.....	Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling 2340 Mödling, R. Koch Gasse 17
BM	Biomasse (hier =ADM)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
g	Erdbeschleunigung 9,81 ms ⁻²
Hämosan	Hämosan Life Sciences Services Ges.mbH A- 8262 Ilz, Neudorf 41
IAH-E.....	Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit UK- Edinburgh EH9 3JF; West Mains Road
IFA-Tulln.....	Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie A- 3430 Tulln, K. Lorenzstr. 20
kGray.....	Kilogray (Einheit für Strahlungs-dosis bei der Gammabestrahlung)
Konz.	Konzentration
mg	Milligramm (1.10 ⁻³ Gramm)
min.	Minuten
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer (1.10 ⁻⁹ Meter)
OÖ.TKV Ges.mbH.....	Oberösterreichische Tierkörperverwertungsgesellschaft mbH A- 4844 Regau, 63
pasteur.	Pasteurisiert: Erhitzt auf mindestens 70°C über mindestens 10 Minuten
PK.....	Proteinase K
PrP ^C	physiologisches Prionprotein (in allen Vertebraten vorkommend)
PrP ^{SC}	proteaseresistentes Prionprotein (in pathologischen Hirnen von an TSE Vertebraten nachgewiesen)
Raumtemp..	Raumtemperatur (18-20°C)
rpm	Rounds per Minute: Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE .	Sodiumdodecylsulfat Polyamidgelelektrophorese
SN	Supernatant: Überstand einer Zentrifugierten ADM
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie

4. ZUSAMMENFASSUNG

Kommerziell erhältliche „BSE-Schnelltests“ sind auf den Nachweis von Prionenproteinen im Hirnhomogenat aus dem Obex des Rindes optimiert.

Diese Matrix unterscheidet sich jedoch ganz essentiell von der Faulschlammatrix, aus der in diesem Projektteil Prionprotein nachgewiesen werden soll. In den bis jetzt durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Prionprotein in dieser Faulschlammatrix tatsächlich nachgewiesen werden kann. Die Übertragbarkeit der auf einem Western-Plot beruhenden Schnelltestmethode Prionics-Check® auf diese neue Matrix ist jedoch nur bedingt gegeben. In den diesen Experimenten konnte Scrapie infiziertes Maushirn 22A/SV in Faulschlammatrix bis zu einem Detektionslimit von 0,114% eindeutig bestimmt werden.

Die Validierung und statistische Absicherung der Ergebnisse mit in Österreich zur Verfügung stehenden Detektions- und Labormöglichkeiten muss noch durchgeführt werden, der Zeitrahmen ist jedoch im Wesentlichen durch die Ausstellung einer Importgenehmigung für Scrapie-Referenzmaterial aus Schottland determiniert.

Eine Fortsetzung und Weiterfinanzierung des Projektes ist daher wünschenswert und sinnvoll.

ao.Univ.Prof. DI Dr. Rudolf Braun
21. November 2002

DI Roland Kirchmayr
21. November 2002

ANHANG 1**BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT IM VERGLEICH ZU PROTEINASE K**

Prionproteine sollen anaerob durch Proteinasen zerstört werden. Als Indikator für diese Aktivität soll die Spaltung von Azocasein im Vergleich zu Proteinase K dienen.

Eine Proteaseinhibition durch einen wasserlöslichen kommerziell erhältlichen Inhibitor (AEBSF, Sigma) und ein Inhibitor-Gemisch (Proteaseinhibitor-Mix, Sigma) in der vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentration wurde versucht.

Im Vergleich zu Proteinase K konnte die Aktivität mit $1,0 \cdot 10^{-3}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml PK determiniert werden. Mit den Proteaseinhibitoren konnte auch bei 60 fachem Überschuß keine Reduktion der Aktivität festgestellt werden. Wie erwartet hatte die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff auf die Bestimmung keinen Einfluß da die Mikroorganismen, die die hydrolytische Stufe durchführen, in der Regel fakultativ anaerob sind.

DURCHFÜHRUNG:

300 µl Probe in 1,5 ml Eppendorf - Gefäße

300 µl Azocaseinlösung 2% w/v

Inkubation 40 min/35°C

300 µl Trichloressigsäure 8% Reaktionsstopp

Zentrifugation 15 min/12500rpm

500µl Probe

500 µl NaOH 5M

Zentrifugation 15 min/12500rpm

Photometrische Absorptionsmessung bei 440nm

KALIBRATIONSKURVE:

Tabelle 2: Kalibration, Absorption bei 440 nm

µl	mg PK	Standardreihe 1:5		Standardreihe 1:1		MW	korr
		1	1 korr	2	2 korr		
0	0	0,108		0,103		0,106	
50	0,000132	0,126		0,136		0,131	
150	0,000396	0,196	0,091	0,191	0,086	0,194	0,088
300	0,000792	0,347	0,242	0,341	0,236	0,344	0,239
500	0,00132	0,580	0,475	0,583	0,478	0,582	0,476

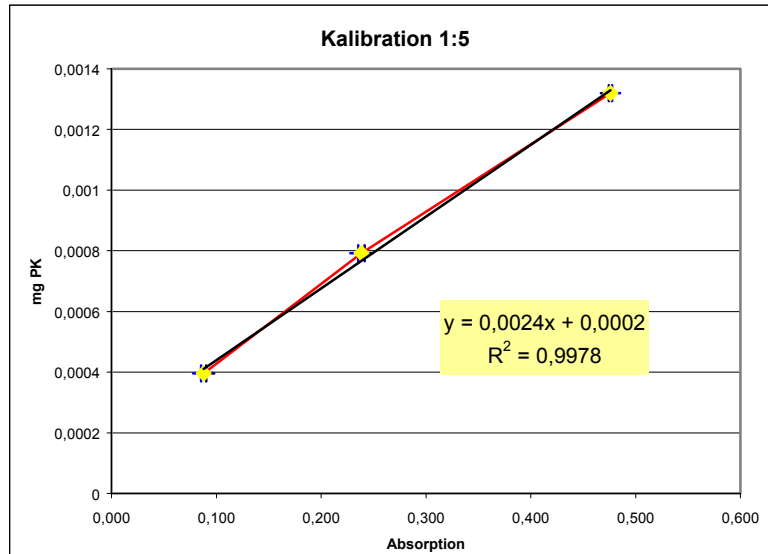


Abbildung 2: Kalibrationsgerade

ERGEBNISSE

Tabelle 3: Werte: Proteolytische Aktivität (Bezogen auf Proteinase K) von kolloidalem Überstand und Vollprobe eines anaeroben Faulschlammes. In An- und Abwesenheit von Sauerstoff sowie dem Einfluß von Proteaseinhibitoren.

Anaerober Faulschlamm		mgPK/ml
kolloidaler Überstand 1	1 SN	1,228E-03
kolloidaler Überstand 1 unter Sauerstoffausschluß	1 SN (-O ₂)	1,146E-03
kolloidaler Überstand 2	2 SN	1,124E-03
1 SN + Inhibitor Mix	1 SN Mix 16,5µl	1,190E-03
1 SN + Inhibitor Mix 20 Facher Überschuß	1 SN Mix 165µl	1,193E-03
1 SN + Inhibitor Mix 60 Facher Überschuß	1SN 1000µl	1,606E-03
1 SN + Inhibitor AEBSF	1 SN AEBSF 0,03mg/ml	1,276E-03
1 SN + Inhibitor AEBSF 20 Facher Überschuß	1SN AEBSF 0,33mg/ml	1,315E-03
1 SN + Inhibitor AEBSF 60 Facher Überschuß	1 SN AEBSF 2mg/ml	1,782E-03
Anaerober Faulschlamm Vollprobe 1	1 BM	3,199E-03
Anaerober Faulschlamm 1 unter Sauerstoffausschluß	1 BM (-O ₂)	2,422E-03
Anaerober Faulschlamm Vollprobe 2	2 BM	2,009E-03
1 BM + Inhibitor Mix	1 BM Mix 16,5µl	3,526E-03
1 BM + Inhibitor Mix 20 Facher Überschuß	1 BM Mix 165µl	3,040E-03
1 BM + Inhibitor Mix 60 Facher Überschuß	1BM 1000µl	3,636E-03
1 BM + Inhibitor AEBSF	1 BM AEBSF 0,03mg	3,107E-03
1 BM + Inhibitor AEBSF 20 Facher Überschuß	1 BM AEBSF 0,3mg	3,192E-03
1 BM + Inhibitor AEBSF 60 Facher Überschuß	1 BM AEBSF 2mg	3,674E-03

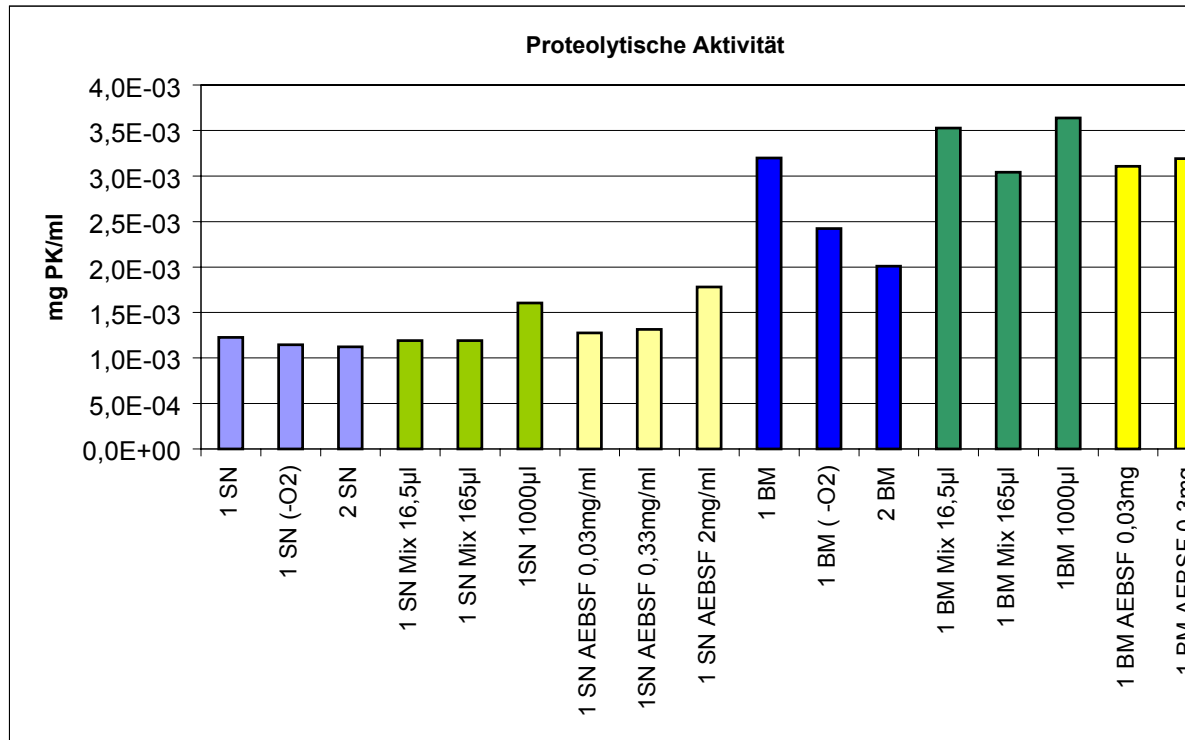


Abbildung 3: Proteolytische Aktivität (Bezogen auf Proteinase K) von kolloidalem Überstand und Vollprobe eines anaeroben Faulschlammes. In An- und Abwesenheit von Sauerstoff sowie dem Einfluß von Proteaseinhibitoren.

ANHANG 2**CENTRIFUGATION TESTS:**

Some people believe that PrP^{SC} and PrP^C cannot be completely precipitated with an Ultra-centrifugation due to the formation of a density gradient. To find out if this gradient is also formed in our case the following experiments were carried out.

The results show clearly that all proteins are not completely precipitable with a centrifugation of 1 hour with 120 000 g. There is also a band with the molecular weight of PrP^C. This does not mean that PrP^{SC} would remain in the supernatant, but is a link to try other precipitation possibilities.

Experimental design:

- 0.1 ml of Brain-homogenate (0.5 g in 6 ml of Homogenisation-Buffer)
- mixed with 10 ml of AD-Matrix
- Centrifugation 60 minutes and 120 minutes at 45 000 rpm (120 000 xg)
- The Protein content of the Supernatant was measured with a Lowry-Protein-Test

Tab. 1: Protein Content of Ultracentrifuged anaerobic Sludge spiked with Brainhomogenate (BSE neg.); see also Fig. 1

Sample Nr.	UZ 60 min				UZ 120 min			
	[Abs.]	Mean [Abs.]	Prot [mg/ml]	Prot [mg/ml]	Mean [Abs.]	Prot [mg/ml]	Prot [mg/ml]	Prot [mg/ml]
1	0,393		1,366		0,231		0,566	
1	0,416	0,405	1,480	1,423	0,255	0,243	0,685	0,625
2	0,433		1,563		0,279		0,803	
2	0,438	0,436	1,588	1,576	0,27	0,275	0,759	0,781
3	0,354		1,173		0,214		0,482	
3	0,359	0,357	1,198	1,186	0,208	0,211	0,453	0,468
4	0,382		1,312		0,211		0,468	
4	0,386	0,384	1,331	1,322	0,244	0,228	0,630	0,549
5	0,353		1,169		0,219		0,507	
5	0,368	0,361	1,243	1,206	0,233	0,226	0,576	0,542
Mean			1,342				0,593	
Maximum	0,438	0,436	1,588	1,576	0,279	0,275	0,803	0,781

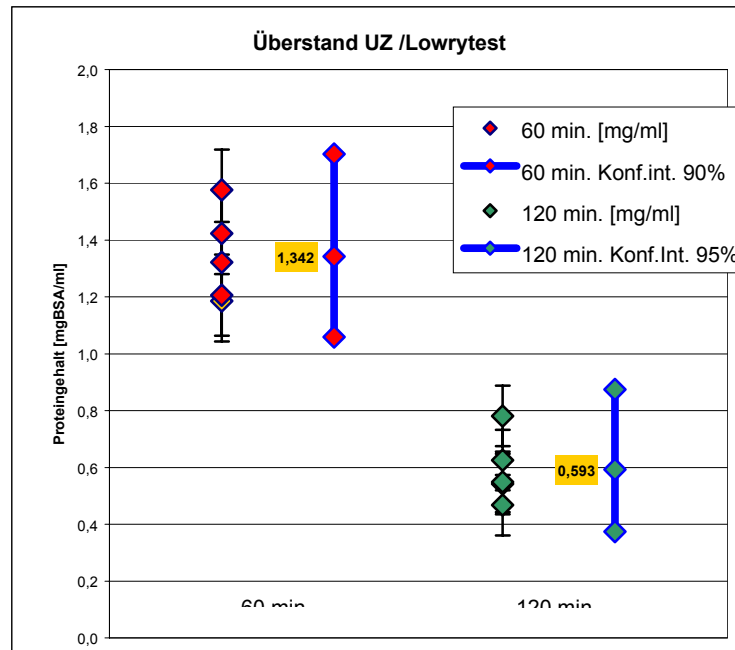


Fig. 1: Protein Content of Ultracentrifuged anaerobic Sludge spiked with Brainhomogenate (BSE neg.) see also Tab. 1

To check if the measured Protein in the Supernatant could be PrP^C, the Supernatant was concentrated in the Vortexvacuumconcentrator and analyzed with a Polyacrylamidgel-electrophorese (Coomassie blue staining) and a Western Blot (Prionics-Check Protocol). See Fig 2-4.

- 0.1g Brainhomogenate (10%, BSE neg.)
- 10 ml of AD-Matrix
- Ultracentrifugation 45 000 rpm (
- Supernatant concentrated in the Vortexvacuumconcentrator (40°C; 2 ml to 0.5 ml)
- SDS-PAGE
- Western-Blot (Prionics-Check)

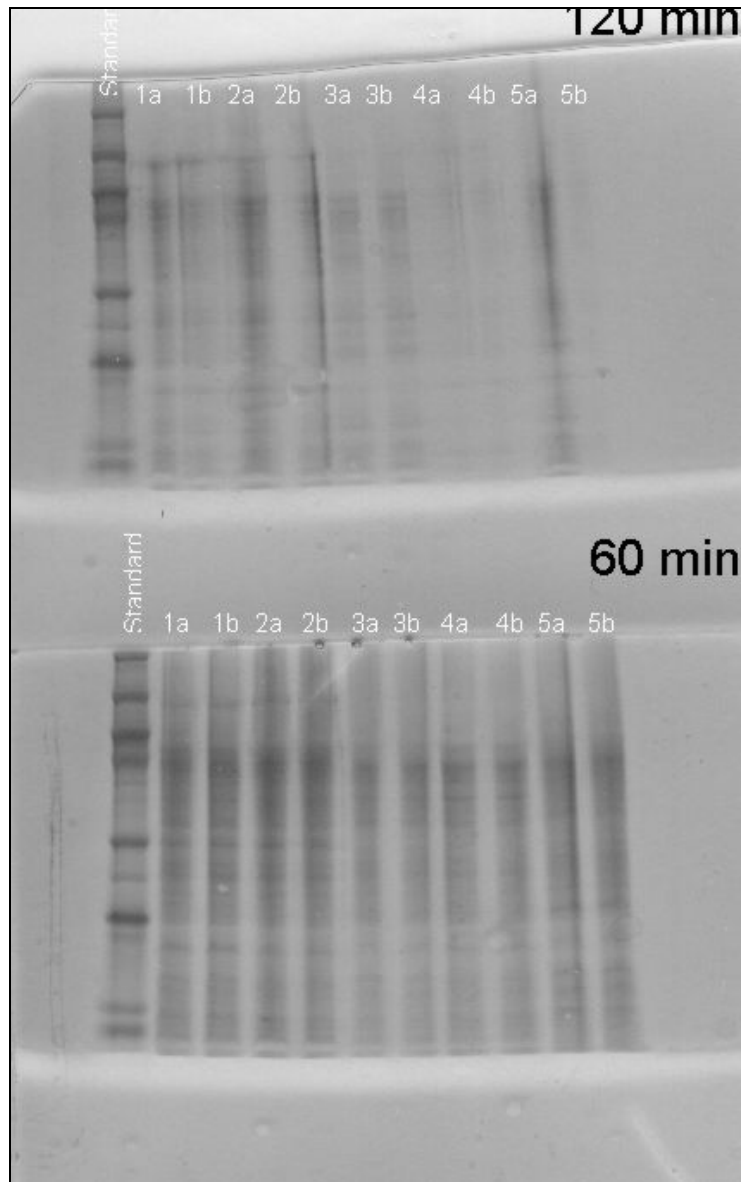


Fig. 2: SDS-PAGE, Coomassie-blue staining of the concentrated Supernatant after the Ultracentrifugation of spiked anaerobic Sludge



Fig. 3: Western Blot (Prionics Check)

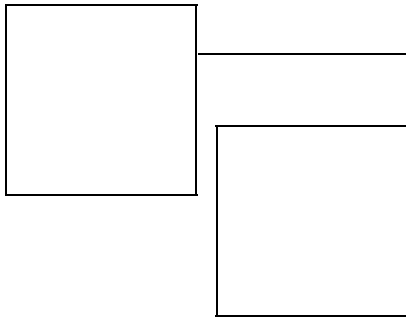


Fig. 4: Coloured Membrane with BCIP/NBT Blue Liquid (Substrate-System for Membranes)

ANHANG 3**CARREZ PRECIPITATION**

In the HPLC Analysis the clearance of the samples from proteins and fats is often carried out with the Carrez-Precipitation (coprecipitation with zink hexacyanoferat).

This experiment was carried out to see if the proteins still remaining in the supernatant after an ultracentrifugation (see "Centrifugation Tests", previous Attachment) could be precipitated with this method. All Pellets and concentrated (Vortexvacuumconcentrator) supernatants were checked for PrP^C with the Prionics-Check.

The results (see Fig. 5) show not a clear result, if PrP^C is completely precipitated. There seem to be too much interferences with the chemicals still present.

8ml AD-Matrix were mixed with:

2 ml	Brain Homogenate (0,5g Brain + 6 ml Homogenisation Buffer)
1 ml	--"--
0,5 ml	--"--
0,1 ml	--"--

Centrifugation 120 min 46 000 rpm Ti 70 (aprox 120 000 g)

Pellet (aprox. 1 g):

Homogenized in Homogenization Buffer (total: 5 g)

Western Blot (1:1 with Sample-Buffer, 5 min 95°C; ...)

Supernatant:

Carrez-Prezipitation:

4 ml Supernatant + 400µl 0,05M H₂SO₄

40 µl C1 (K₄[Fe(CN)₆])

40 µl C2 (ZnSO₄)

→Centrifugation 30 min 4000rpm

Pellet 2:

Homogenized in Homogenization Buffer (total: 3 g)

Western Blot(1:1 with Sample-Buffer, 5 min 95°C; ...Prionics-Check)

Supernatant 2:

Concentrated at the Vortex-Vapor: 4 ml to 1,3 ml

Western Blot (1:1 with Sample-Buffer, 5 min 95°C; ...Prionics-Check)

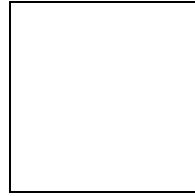
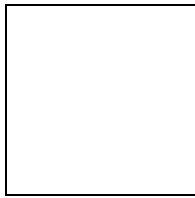


Fig. 5: Stained membrane from the Western-Blot of:

1. Brainhomogenate dilution serie
2. Ultracentrifugation-Pellet of spiked (brain homogenate, BSE neg.) anaerobic sludge
3. Carrez-Pellet of the precipitated supernatant
4. Concentrated supernatant of the Carrez-precipitation

ANHANG 4**ETHANOLPRECIPITATION OF SCRAPIE-POS. BRAINHOMOGENATE IN BIOGASMATRIX**

carried out: Mödling, 23.08.01

The Ultracentrifugation of anaerobic sludge spiked with brain homogenate gives a huge pellet and so this does not result in a concentration. As anaerobic sludge is not a homogenous solution there are a lot of interferences with the SDS-PAGE or the Western-Blot possible.

In this Experiments all the rubbish was removed with a short centrifugation and the proteins in the supernatant were precipitated on adding cold ethanol. The pellet was resuspended and analyzed with the Prionics-Check protocol.

The Western Blot shows clearly a signal of PrP^{SC} in the precipitated Pellet (see Fig. 6).

BSE negative Brain Homogenate: BH (BSE -):

0.5 g of bovine brain (BSE neg.) were homogenated in a potter with 5 ml of BLB

Scrapie positive Brain Homogenate: BH (Scrapie +)

0.5 g of bovine brain (Scrapie pos.) were homogenated in a potter with 5 ml of BLB

pasteurized Biogas Matrix: AD-M-b

25 ml samples of a biogas-reactor (adapted to slaughterhouse waste) in a 50 ml centrifuge tube were pasteurized 20 minutes at 100°C (flowing steam).

Biogas Matrix: AD-M

Reactor Content of a Biogas-Reactor (adapted to slaughterhouse waste)

BLB: 100 ml Na-Phosphate Buffer pH 7.4

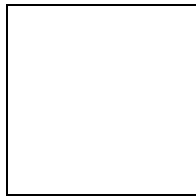
1 g N-Lauroylsarcosine

200 µl NEM

200 µl PMSF

Sample Nr.:

1	2	5 ml AD-M-b +0.5 ml BH (BSE -)
3	4	5 ml AD-M-b +0.1 ml BH (BSE -)
5	6	5 ml AD-M-b +0.1 ml BH (Scrapie +)
7	8	5 ml AD-M-b
9	10	5 ml AD-M



- AD-M and BH were mixed in a 13 ml Beckman Quick-Seal centrifuge tube (Vortex).
- Centrifugation: 30 min/16 000 rpm (aprox 22 000xg)/4°C/Ti70.1
- Supernatant was transferred with a Syringe into 8 ml Ethanol (-10°C) in a 13 ml Quick seal
- 25 min cooling down to -16°C
- Centrifugation 30 min/16 000 rpm/4°C/Ti70.1
- The Pellet was resuspended in 500µl of 0.015m Tris/HCl pH 7.4 (Samples 1, 2 and 4 in 1000µl)
- PK-digestion (Digestion Plate):
 - 100µl sample (resuspended Pellet)
 - 10µl Digestion Buffer (Prionics)
 - 10µl PK Solution (Prionics)
 - 40 min/50°C
 - 10 µl of PK-Stop (Prionics)
- not PK-digested samples:
 - 100 µl sample (resuspended Pellet)
 - 10 µl PK-Stop (Prionics)
- 100 µl sample were mixed with 100 µl of Sample Buffer
- 5 min 95°C

SDS-PAGE and Western Blot according to Prionics Protocol.

Unfortunately the Foto gave worse results than the colored membrane.

The picture shows the results of the colored membrane (see Fig. 6).

The variation of above protocol with the following changes gave no results (due to whatever).

- *Biogas-Matrix was not pasteurized*
- *The Ethanol was not precooled.*
- *Second centrifugation 30 min/32 000 rpm (aprox 100 000xg)/4°C/Ti70.1*
- *Resuspension of the pellet in Homogenisation Buffer (Prionics).*

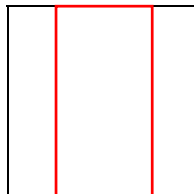


Fig. 6: Stained Membrane from the Prionics-Check of anaerobic sludge spiked with scrapie-pos. brain homogenate.

Red marked Frame: Scrapie-positive Samples

ANHANG 5

PROTOCOL: Projectmeeting in Tulln, 17.08.2001

DEGRADATION OF TSE-PRIONS UNDER ANAEROBIC CONDITIONS

Prof. Dr. R. Braun (RB; IFA-Tulln)	braun@ifa-tulln.ac.at
Dr. J. Rodger (JR; IAH-Edinburgh)	joanne.rodger@bbsrc.ac.uk
Mag. H. Reichl (HR; Hämosan)	herwig.reichl@haemosan.com
Mag. W. Frötscher (WF; BATSB Mödling)	froetscher@batsb.at
DI R. Kirchmayr (RK; IFA-Tulln)	kirchmayr@ifa-tulln.ac.at

Firstly I would like to thank all participants that you found time to join us and for the fruitful discussions.

- Presentation of the Results
- Diskussion of Strategies and Experiments
- Time-schedule for the new Experiments

The results obtained by WF and RK showed that the PrP^C (physiological Prion-Protein) behaves in the System of AD-Matrix and Brain Homogenate as it should: the PrP^C is found in the Supernatant (See first Centrifugation-Experiments and first Detection Experiments).

This points out that there we do not have to expect too much interference of the AD-matrix with the prionics-check.

The proteolytic activity seems to be quite low, but the assay has to be redesigned (precipitation after the elevation of pH).

Time schedule for the next experiments:

4th week of August 2001:

determine if PrP^{SC} (Scrapie-Prion Protein) can be identified in presence of AD-Matrix (without any concentration experiments)

3rd Week of September:

Preliminary experiments for the concentration steps (Ultracentrifugation steps, Precipitation, Proteolytic activity)

Detection limit of PrP^{SC} with concentration steps (Ultracentrifugation, Precipitation)

End of September - mid of October:

Experiments for detection-limits of PrP^{SC} in the AD-Matrix in IAH-E

IAH-E (JR) until End of August:

Western Blot according to Standard procedure and:

Western Blot skipping the PK-digestion:

AD-Matrix (γ -irradiated) mixed with 263K Hamster Brain Homogenate (HB; 10%)

AD-Matrix (γ -irradiated) mixed with 263K HB (10%) and heated up 10 minutes 75°C

Transmit to IFA:

Watch-List of Pathogens which should not come near the IAH-E Building

complete PrP^{SC}-Western-Blot Standard-Protocol

Prescription of the Homogenisation Buffer

Open Questions:

What is the minimum Speed to precipitate PrP^{SC}?

Costs for the preliminary experiments

Cost estimation for the detection limit experiments (3 weeks in the lab in IAH-E)

BATSB (WF, RK) until End of August:

Western Blot according to Prionics-Check protocol:

With and without PK-digestion:

AD-Matrix mixed with Scrapie Sheep Brain Homogenate (10%) in homogenisation buffer (Prionics)

AD-Matrix mixed with Scrapie Sheep BH (10%) in HB (Prionics) pasteurized (75°C/10min)

Centrifugation of AD-Matrix and Brain Homogenate

Open Questions:

What has to be done before the first experiments with PrP^{SC} (Scrapie)

Is there an import licence necessary for 263K Hamsterbrain?

Will there be a possibility to do the degradation experiments with PrP^{SC}(BSE), PrP^{SC}(263K Hamster), and/or PrP^{SC}(301V recombinant Mouse) in the L3 Lab in the BATSB Mödling

Costs for the preliminary experiments

Cost estimation for the degradation experiments

Hämosan Life Science GmbH (HR)

Hämosan-PrP^{SC} Assay of AD-Matrix (crude) and non infectious Brain-Homogenate

Precipitation Protocol for Proteins: 1:1 with Ethanol; -20°C

IFA-Tulln (RK)

Pathogen-characterisation of Pathogens to be able to enter crude AD-Matrix into the IAH-E Building (End of September).

Fractionized Centrifugation of the AD-Matrix:

Which is the min. and max. centrifugation speed to precipitate the AD-Matrix (suspended solids): control via Protein concentration?

Centrifugation behavior of heated and not pasteurized AD-Matrix

ANHANG 6**RECOVERY OF PrP^{SC} OUT OF THE SPIKED SLUDGE OF AN ANAEROBIC REACTOR**

Roland Kirchmayr; 24.09.-11.10.2001; IAH-E

5. INTRODUCTION

The anaerobic degradation of sterilized slaughterhouse waste (macerated animal carcasses) could be a possible disposal alternative. To implement the biogas-technology into the rendering industry also the question of the destiny of PrP^{SC} (as a possible indicator for TSE infectivity) has to be investigated.

In order to find out whether there is a degradation of PrP^{SC} in an anaerobic reactor or not, the detectability has to be determined. Thus, the in the following described experiments were done to determine if the detection of PrP^{SC} in anaerobic sludge is possible and subsequently to determine a possible detection limit (in dependence of the used spike-material).

The experiments were carried out in the Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit in Edinburgh (UK) under the supervision of Dr. Robert Somerville.

Special thanks to Fiona MacDonald, Phil Steele and Scott Hamilton for their patience, their contribution in the laboratory and the fruitful discussions (not only in the lab).

5.1. GENERAL EXPERIMENTAL SETUP

In the following experiments γ -irradiated Anaerobic Sludge (25.6 kGray) was used.

The ultracentrifugation of anaerobic sludge (AD-M) leads to a huge pellet. Therefore this is not an appropriate system for an enrichment of PrP^{SC}.

To spike the anaerobic sludge a brain homogenate from 22A/SV mouse-scrapie in water was used.

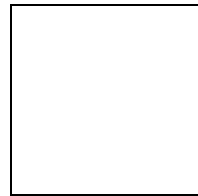
To separate PrP^{SC} from the sludge the following procedure was tested:

- Slow spin of PrP^{SC} enriched AD-M: 2-7 minutes 2000 g.
- Ethanolprecipitation of the Supernatant (ADM-SN)
- PK-Digestion of the resuspended pellet
- SDS-PAGE
- Western blot: PVDF-Membrane, 6H4 Anti-PrP^{SC} antibody (Mouse), Donkey Anti-Mouse antibody, Pierce Supersignal

5.2. RESULTS AND DISCUSSION

This experiments show clearly that PrP^{SC} can be detected in the spiked sludge of an anaerobic reactor (AD-M; Anaerobic Digestion Matrix).

The addition of Lauroylsarcosine to the mixture of brain homogenate and sludge is essential for the recovery. The best results were obtained with a concentration of 0.5 % Lauroyl-sarcosine.



The precipitation of PrP^{SC} can be achieved with Ethanol at low temperatures (0°C). Higher concentrations of Ethanol gave better results. Thus, an excess of Ethanol (four times the original volume) was applied.

A temperature pretreatment of the AD-M (15 min/121°C, or 10 min/100°C; before spiking) enhanced the recovery of PrP^{SC}. Boiling the spiked AD-M (100°C/10 min) at the presence of Lauroylsarcosine or boiling before the addition of L.sarcosine gave no signal in the Western-blot.

There are several reasons possible for the effect of the temperature pretreatment:

Inactivation of all enzymes still present, precipitation of proteins which cause bad resolution on the SDS-PAGE or Western Blot, or the damage of cell walls from the biomass, so that PrP^{SC} could not attach any more. As there are no clear data of the isoelectric point of PrP^{SC} available (literature values range from acid to alcalic pH-values) also an electrostatic attachment to the negatively charged biomass could be possible.

Further experiments have to be carried out to investigate this effect.

Finally, a detection of PrP^{SC} in preboiled γ -irradiated AD-M above a concentration of 0.114 % 22A/SV mouse brain is possible. For the not temperature treated γ -irradiated anaerobic sludge the value of the lowest detected concentration is 0.227% 22A/SV mouse brain.

6. EXPERIMENTS

6.1. ETHANOLPRECIPITATION

In order to find out if with an Ethanol-precipitation a selective enrichment of PrP^{SC} can be achieved a serie of spiked ADM-SN (AD-M centrifuged 7 min with 2000 g, Supernatant was used) was precipitated with 20, 30 and 50% final concentration of Ethanol.

To find out if the amount of Proteins present has an influence, the same experiment was carried out with spiked Bloodplasma.

Although the applied PK concentration was too high (20 fold), the results show that the recovery was better with higher concentrations of Ethanol (see Figure 1 and Attachment 1).

Consequently the following experiments were carried out with an excess of Ethanol (4 times).

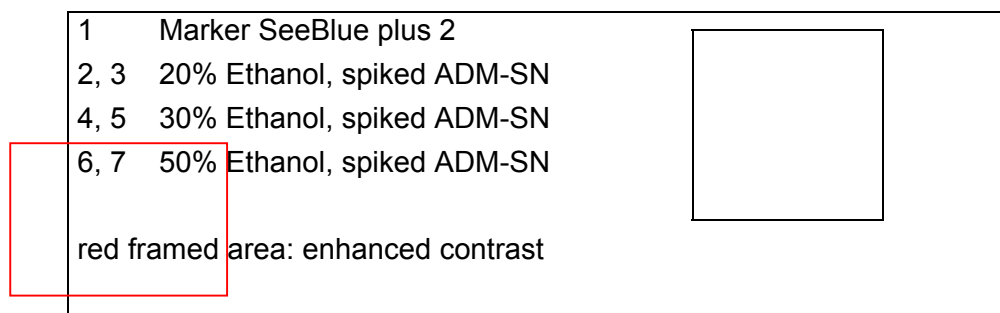


Figure 1: Detail of the Western Blot of PrP^{SC} precipitated with different concentrations of Ethanol

6.2. INFLUENCE OF LAUROYLSARCOSINE AND TEMPERATURE-PRETREATMENT OF THE SLUDGE

To avoid a possible influence of present proteolytic enzymes, AD-M and ADM-SN was previously additional sterilized (15 min, 121°C).

Sterilized and non-sterilized AD-M and ADM-SN was spiked with scrapie-pos. brain homogenate. To one part of the samples additionally 0.5% (final conc.) of Lauroylsarcosine was added before the first centrifugation.

The Western Blot shows clearly that the sterilized samples and the samples with Lauroylsarcosine show a better recovery of PrP^{SC}. Especially the non-temperature treated AD-M samples show only a PrP^{SC}-signal when Lauroylsarcosine was present.

See Figure 2 and Attachment 2.

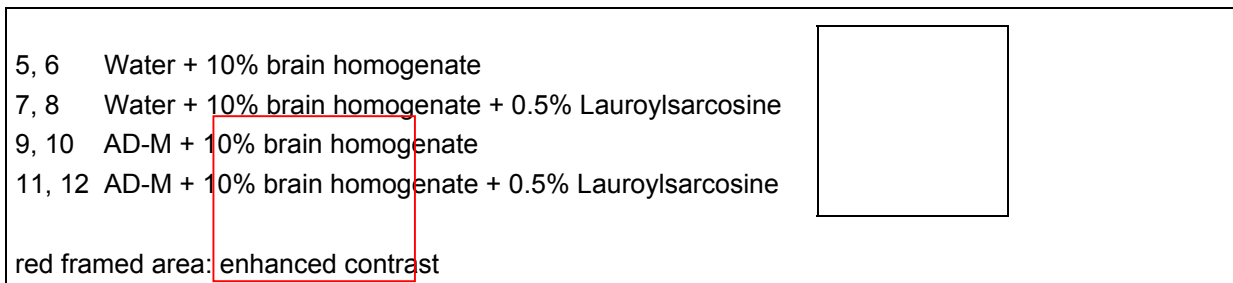


Figure 2: Detail of the Western blot of PrP^{SC} spiked Water and AD-M with and without addition of Lauroylsarcosine.

6.3. INFLUENCE OF LAUROYLSARCOSINECONCENTRATION AND TEMPERATURETREATMENT

Above described experiments show that the temperature treatment of the sludge leads towards a better recovery of PrP^{SC}. In order to optimize the concentration of the Lauroylsarcosine a serie of 0.0 - 1.0% (final conc.) Lauroylsarcosine was added to spiked AD-M samples before the first centrifugation. The same experimental serie was carried out a second time but was boiled 10 min at 100°C after the addition of the detergent.

The results show that a boilage of PrP^{SC} in AD-M in presence of Lauroylsarcosine avoids a signal of PrP^{SC} in the Western blot.

The serie which was not boiled shows a better recovery of PrP^{SC} at a concentration of 0.5% final concentration of Lauroylsarcosine in comparison with 0.32%. Higher concentrations of Lauroylsarcosine (0.75% and 1%) also decreased the intensity of the signal.

See Figure 3 and Attachment 3.

Gel 1	Gel 2
1 Marker SeeBlue plus 2	1 Marker SeeBlue plus 2
2 Brain homogenate not boiled	2 Brain homogenate not boiled
3 Brain homogenate boiled	3 Brain homogenate boiled
4 ADM + 0.50% L.Sarcosine	4 ADM + 0.50% L.Sarcosine
5, 6 ADM + 0.32% L.Sarcosine	5, 6 ADM + 0.32% L.Sarcosine
7, 8 ADM + 0.50% L.Sarcosine	7, 8 ADM + 0.50% L.Sarcosine
9, 10 ADM + 0.75% L.Sarcosine	9, 10 ADM + 0.75% L.Sarcosine
Samples 4 - 10: boiled before centrifugation	Samples 4 - 10 not boiled before centrifugation

Figure 3: Influence of temperature treatment and Lauroylsarcosine concentration on the recovery of PrP^{Sc}.

6.4. ULTRACENTRIFUGATION AND COMPARISON WITH THE PRIONICS-CHECK[®]

To determine the detection-limit of PrP^{Sc} (22A/SV Mouse scrapie) in anaerobic sludge a dilution serie of the brain homogenate (10%; 5%; 2.50%, 1.25%; 0.625%, 0.313%; 0.156% and 0.078%) was carried out. AD-M and previously sterilized AD-M was spiked (5%) with the dilution serie of brain homogenate. The samples spiked with the 0.313%; 0.156% and 0.078% step were centrifuged (1 hour, 78 000 rpm, Ti 100.3) after the PK- digestion step in order to concentrate the not digested PrP^{Sc}. As the volume after the digestion is 100 µl a centrifugation step does not give a better signal on the Western blot. The resuspension will also give 15-50 µl and this small volume will cause problems on the denaturation step (complete evaporation...).

In order to compare the "home made Western blot" and the Prionics-Check[®] the same experiment as above described was carried out but the pellet after the ethanol precipitation was resuspended with the homogenisation buffer. Also the sample buffer, the 6H4 antibody and the blocking buffer was used from the Prionics-Check[®] Kit.

As there was no signal on the blot the usage of the solutions from the Prionics[®]-Kit has to be adjusted.

See Attachment 4.

6.5. DILUTION SERIE 1, TEMPERATURE PRETREATMENT

For spiking the AD-M a brain homogenate dilution serie was performed (see Table 1). Then preboiled AD-M (500µl; 10 min, 100°C) and two series of AD-M (500µl) were spiked with 25 µl of brain homogenate dilution. One serie of spiked AD-M was boiled (10 min, 100°C). Then Lauroylsarcosine (0.5%) was added to all samples.

This dilution serie seems to be below the detection limit. Just the 0.238% concentration step gave signal with the preboiled AD-M and the untreated sludge, a signal was also found in the 0.119% step with the untreated AD-M. The boilage of AD-M with brain homogenate at the

presence of Lauroylsarcosine (see chapter 6.3) gave the same result than the addition of L.sarcosine after boiling AD-M and brain homogenate: no signal in the Western blotting.

See Figure 4 and Attachment 5.

brain homogenate: conc. brain in water	final conc. brain in AD-M
5.000 %	0.238 %
2.500 %	0.119 %
1.250 %	0.059 %
0.625 %	0.030 %
0.031 %	0.015 %

Table 1: concentration-steps of the brain homogenate dilution serie 1.

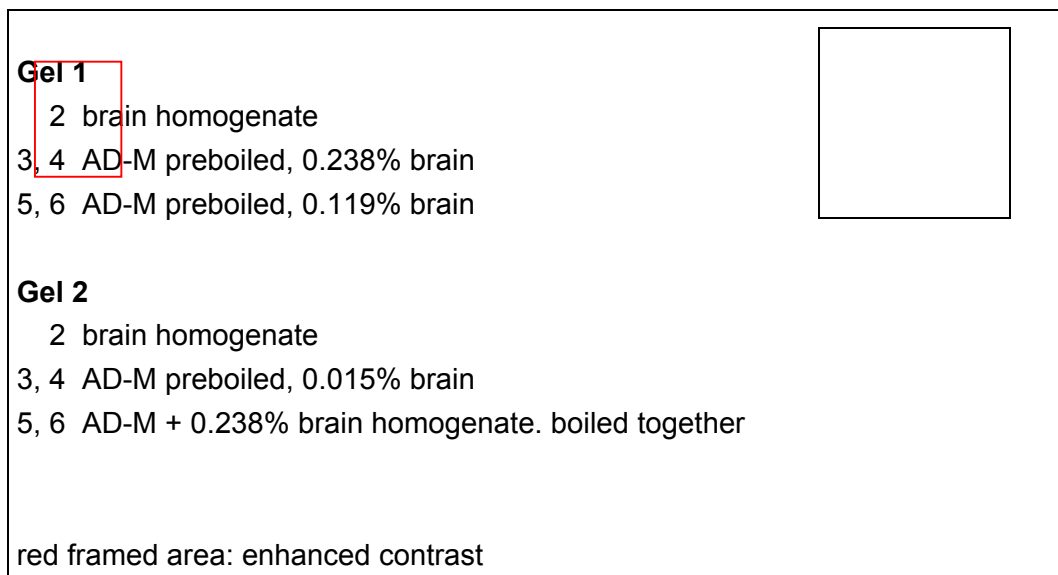


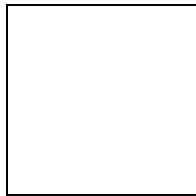
Figure 4: Sludge spiked with a dilution serie of brain homogenate; Effect of boiling.

6.6. DILUTION SERIE 2

The previous experiments showed that the detection limit of PrP^{SC} in anaerobic sludge (AD-M) is above 0.059% brain in AD-M.

There is also the suspicion that the recovery could be affected by a 37°C step between the addition of L.sarcosine and the centrifugation. This step was carried out to give a better performance of the L.sarcosine. There is a worse recovery of PrP^{SC} from not temperature pretreated AD-M in comparison to spiked preboiled AD-M (see chapter 6.3, 6.4 and 6.5).

The reasons could be the enzymatic degradation, a higher protein background on the gel and an attachment to the biomass and loss in the first centrifugation step.



In this experimental setup (see Attachment 6) higher brain concentrations (in comparison to chapter 6.5; see Table 2) were used and the L.sarcosine was applied at room temperatures (see Attachment 6).

The results (see Figure 5 and Attachment 6) show a detection limit of PrP^{SC} in AD-M of about 0.114% brain in preboiled AD-M and about 0.227% brain in gamma irradiated AD-M.

added brain homogenate (% brain in water)	final conc. brain in AD-M (% brain)
10.00 %	0.909 %
5.00 %	0.455 %
2.50 %	0.227 %
1.25 %	0.114 %

Table 2: concentration-steps of the brain homogenate dilution serie 2.

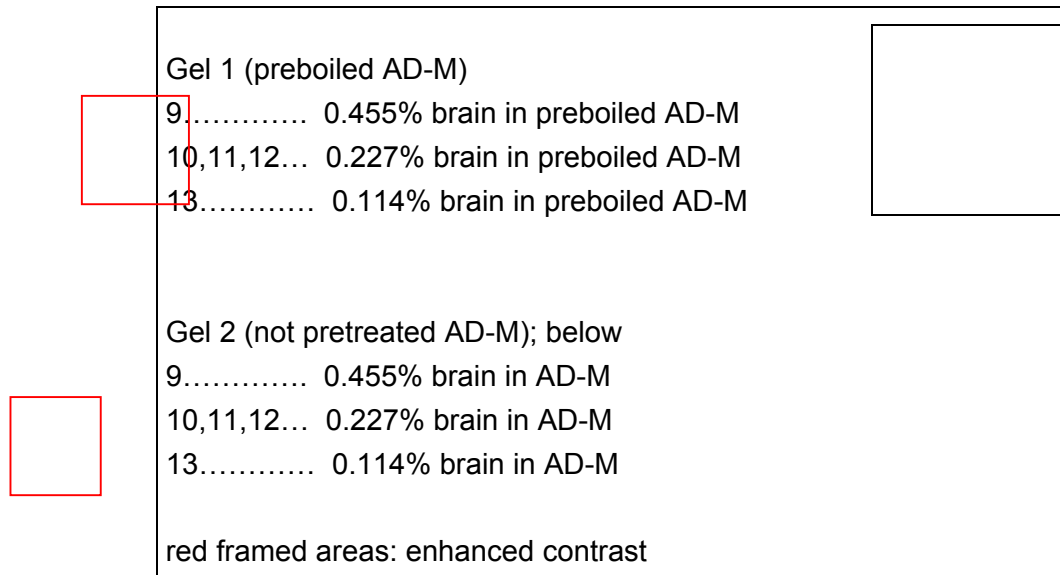


Figure 5: dilution serie of brain homogenate (detail) in preboiled and not pretreated AD-M.

ATTACHMENT 1

RK, 25.09.01

ETHANOL PRECIPITATION OF PRPSC OUT OF SLUDGE SUPERNATANTBrain Homogenate BH:

0.4 g 263K Hamster Brain

4.0 ml Water ... homogenisation

Sludge Matrix Supernatant ADM-SN

7 ml of gamma-irradiated AD-Sludge were centrifuged 7 min at 2000 g

Supernatant was used

Plasma:

Freeze-dried Plasma was rehydrated with 1.0 ml of Water

Sample

1/2	500 µl ADM-SN	50 µl BH	138 µl Etanol (=20%)
3/4	500 µl ADM-SN	50 µl BH	235 µl Etanol (=30%)
5/6	500 µl ADM-SN	50 µl BH	550 µl Etanol (=50%)
7/8	400 µl Plasma	50 µl BH	110 µl Etanol (=20%)
9/10	400 µl Plasma	50 µl BH	188 µl Etanol (=30%)
11/12	400 µl Plasma	50 µl BH	450 µl Etanol (=50%)

ADM-SN or Plasma Samples were mixed with BH.

Vortexed

Corresponding Amount of Ethanol was added

Vortexed

20 min -20°C

Centrifuged: 10 min 2000 g

Pellet 30 min Speedvac (low drying rate)

80 µl of Digestion Buffer (final Volume approx 100 µl)

except Samples 11/12: 100 µl DB and final volume 200 µl

Supernatant was transferred to an other Eppendorf (Sample 1: Supernatant=1SN)

1 h Speedvac (high drying rate) resulting volume: approx. 50 µl

50 µl Digestion Buffer (except Samples 9SN – 12SN: 100µl of DB and final volume 150 µl)

Sample

13	50 µl BH + 50 µl DB
14	50 µl Plasma + 50 µl DB
15	50 µl ADM-SN + 50 µl DB

6 µl of PK Solution (50µg/ml; 20mg/ml) except 11/12: 12 µl; 9SN – 12SN: 9 µl
60 min 37°C

5 µl PMSF
shortspin
21.6 µl of 5x Samplebuffer (total Volume x 0.2)
Denaturation 30 min 95°C
Freezing over night

26 09 01

5 min 37°C

NuPage 12% BT 1.0 (15 Slot)
Marker: 7 µl
Samples: 10 µl (0.5mg Protein per Slot)
200 V constant

Blotting

PVDF Membrane
30 seconds Methanol
2x 30 sec. Water
5 min Blotting Buffer
60 min 30 V constant

Membrane

30 sec. Methanol
2x 30 sec. Water
30 min Blocking Solution
6H4 Antibody (1:50000; 1µl of 2 mg/ml in 50ml Blocking Solution) over night (19 hours)

27 09 01

TBST washing: 1 min; 10 min; 10 min: fast shake
AB 6H4: 10 min; 10 min: slow shake
TBST washing: 1 min; 5 min; 5 min: fast shake
25 ml Blocking Buffer: 10 min; 10 min: slow shake

Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 95 min slow shake
1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)
TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake
Water washing: 1 min

1 ml Pierce Super Signal Substrate; Expositure time: 45 min

Gel 1**Gel 2**

Nr.		Sample	Nr.		Sample
1		Marker SeeBlue Plus 2	1		Marker SeeBlue Plus 2
2	1	Pellet 20% Ethanol Precipit. ADM-SN	2	1SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. ADM-SN
3	2	Pellet 20% Ethanol Precipit. ADM-SN	3	2 SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. ADM-SN
4	3	Pellet 30% Ethanol Precipit. ADM-SN	4	3 SN	Supernat. 30% Ethanol Precipit. ADM-SN
5	4	Pellet 30% Ethanol Precipit. ADM-SN	5	4 SN	Supernat. 30% Ethanol Precipit. ADM-SN
6	5	Pellet 50% Ethanol Precipit. ADM-SN	6	5 SN	Supernat. 50% Ethanol Precipit. ADM-SN
7	6	Pellet 50% Ethanol Precipit. ADM-SN	7	6 SN	Supernat. 50% Ethanol Precipit. ADM-SN
8	7	Pellet 20% Ethanol Precipit. Plasma	8		(too much Protein, Coagulation of the Sample)
9	8	Pellet 20% Ethanol Precipit. Plasma	9		(too much Protein, Coagulation of the Sample)
10	9	Pellet 30% Ethanol Precipit. Plasma	10	9 SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. Plasma
11	10	Pellet 30% Ethanol Precipit. Plasma	11	10 SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. Plasma
12	11	Pellet 50% Ethanol Precipit. Plasma	12	11 SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. Plasma
13	12	Pellet 50% Ethanol Precipit. Plasma	13	12 SN	Supernat. 20% Ethanol Precipit. Plasma
14	13	Brain homogenate	14	13	Brain homogenate
15	15	ADM-SN + Brain homogenate	15	14	Plasma + Brain homogenate

red framed areas: enhanced contrast

line 1 (marker): through-light picture of the membrane

Composition of the Solutions: see Attachment 7

ATTACHMENT 2

RK, 29.09.2001

**LAUROYLSARCOSINEINFLUENCE
PREVIOUS STERILIZED SLUDGE / NON STERILIZED SLUDGE**Brain homogenate 10% in Water

Mouse Scrapie ME7/SV

ADM_s ADM: 121°C / 15 minADM-SN_s ADM 5 min/2000 g: Supernatant 121°C / 15 min

ADM Biogasmatrix (gamma irradiated)

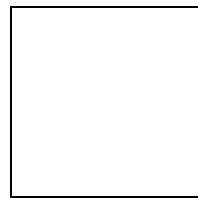
ADM-SN Supernatant (ADM 5 min/2000 g)

Sarcosyl:

10% Stock solution Lauroylsarcosine; final conc. 0.5%

Sample

1/2	1000 µl ADM _s	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
3/4	1000 µl ADM _s	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	58 µl Sarcosyl
5/6	500 µl ADM-SN _s	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
7/8	500 µl ADM-SN _s	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
9/10	1000 µl ADM _s		2500 µl Ethanol	
11/12	1000 µl ADM _s		2500 µl Ethanol	52.5 µl Sarcosyl
13/14	500 µl Water	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
15/16	500 µl Water	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
17/18	1000 µl ADM	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
19/20	1000 µl ADM	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	58 µl Sarcosyl
21/22	500 µl ADM-SN	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
23/24	500 µl ADM-SN	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
25/26	1000 µl ADM		2500 µl Ethanol	
27/28	1000 µl ADM		2500 µl Ethanol	52.5 µl Sarcosyl
29	Digested Brain homogenate			
30	Not digested Brain homogenate			



Brain homogenate
digested

50 µl Brain homogenate

50 µl Digestionbuffer

... continuation with Digestion

ADM and ADM_S

1000 µl Biogas Matrix Eppendorf

100 µl Brain homogenate
(Lauroylsarcosine)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 5 min

550 µl Supernatant into 15 ml Orange Cap

2500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min / 0°C

Brain homogenate not digested

50 µl Brain homogenate

50 µl Digestionbuffer

5 µl PMSF

... continuation with Denaturation

ADM-SN and ADM-SN_S

550 µl Biogas Matrix Supernatant in
Orangecap

50 µl Brain homogenate
(Lauroylsarcosine)

Vortex

15 min 37°C

2500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min / 0°C

Poor Supernatant of

Open Orangecaps 15 min upside down

10 min 37°C (open, to evaporate the Ethanol)

Resuspension of the Pellet in 75 µl of Digestion buffer (final volume 100 µl)

Digestion:

5 µl PK (10 µl 20mg/ml diluted in 200 µl Digestionbuffer1) ... = 50 µg PK/ml

Shortspin 10 sec.; Vortex

40 min 37°C

5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)

Shortspin 10 sec.; Vortex

Denaturation

22 µl 5x Sample Buffer

30 min 95°C denaturation

SDS-PAGE

20 µl Sample on the Gel (NuPage 12%, 12 Slot)

MES – SDS Running Buffer

40 min

200 V

Blotting

PVDF Membrane

30 seconds Methanol

2x 30 sec. Water

5 min Blotting Buffer

60 min 30 V constant

30 sec. Methanol

2x 30 sec. Water

30 min Blocking Solution

6H4 Antibody (1:50000; 1µl of 2 mg/ml in 50ml Blocking Solution) over night (19 hours)

30.09.2001

TBST washing: 1 min; 2x 10 min: fast shake

25 ml Blocking Buffer: 2x 10 min: slow shake

Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 95 min slow shake

1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)

TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake

Water washing: 1 min

0.75 ml Pierce Super Signal Substrate

Exposure time: 16 min

Gel 1:

Line	Sample				
1	31	Marker	SeeBlue		
2	28	Digested Brain homogenate			
3, 4	1/2	1000 µl ADM _s	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
5, 6	3/4	1000 µl ADM _s	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	58 µl Sarcosyl
7, 8	5/6	500 µl ADM-SN _s	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
9, 10	7/8	500 µl ADM-SN _s	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
11, 12	9/10	1000 µl ADM _s		2500 µl Ethanol	

Gel 2:

Line	Sample				
1	31	Marker	SeeBlue		
2	29	Digested Brain homogenate			
3, 4	11/12	1000 µl ADM _s		2500 µl Ethanol	52.5 µl Sarcosyl
5, 6	13/14	500 µl Water	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
7, 8	15/16	500 µl Water	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
9, 10	17/18	1000 µl ADM	100 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	

11, 12 19/20 1000 µl ADM 100 µl BH 10⁻¹ 2500 µl Ethanol 58 µl Sarcosyl

Gel 3:

Line	Sample				
1	31	Marker	SeeBlue		
2	29	Digested Brain homogenate			
3, 4	21/22	500 µl ADM-SN	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	
5, 6	23/24	500 µl ADM-SN	50 µl BH 10 ⁻¹	2500 µl Ethanol	29 µl Sarcosyl
7, 8	25/26	1000 µl ADM		2500 µl Ethanol	
9, 10	27/28	1000 µl ADM		2500 µl Ethanol	52.5 µl Sarcosyl
11		free			
12	30	Not digested Brain homogenate			

red framed areas: enhanced contrast

line 1 (marker): through-light picture of the membrane

Composition of the Solutions: see Attachment 7

ATTACHMENT 3

RK, 01 10 01

**TEMPERATURE INFLUENCE
LAUROYLSARCOSINE INFLUENCE**Brain homogenate 10% in Water

Mouse Scrapie 22a/SV

ADM Non Sterilized Biogasmatrix (gamma irradiated)Sarcosyl:

10% Stock solution Lauroylsarcosine

boiled before centrifugation

Sample				Lauroylsarcosine
	10µl	500 µl ADM		0.50% 29.0 µl Sarcosine
1/2	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
3/4	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
5/6	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
7/8	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine

not boiled

9/10	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
11/12	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
13/14	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
15/16	20µl	330 µl ADM	33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine

Brain homogenate digested

50 µl Brain homogenate

50 µl Digestionbuffer

... continuation with Digestion

Brain homogenate boiled,
Ethanolprecipitation

330 µl Water

33 µl Brain homogenate

18.2 µl Sarcosine

10 min 100°C

1500 µl Ethanol

20 min 0°C Icewater

Resuspension in 75µl Digestionbuffer

... continuation with Digestion

Gel 1: boiled (samples 1 - 8)

330 µl ADM in 2.0ml

Eppendorf

33 µl Brain homogenate

Lauroylsarcosine

Vortex

15 min 37°C

10 min 100°C

Spin 2000g; 5 min

300 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1200 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Gel 2: not boiled (samples 9 - 16)

330 µl ADM in 2.0ml Eppendorf

33 µl Brain homogenate

Lauroylsarcosine

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 5 min

300 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1200 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Poor Supernatant of

Open Eppendorfs 15 min upside down

10 min 37°C (open, to evaporate the Ethanol)

Resuspension of the Pellet in 75 µl of Digestion buffer (final volume 100 µl)

Digestion:

5 µl PK (10 µl 20mg/ml diluted in 200 µl Digestionbuffer1) ... = 50 µg PK/ml

Shortspin 10 sec.; Vortex

40 min 37°C

5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)

Shortspin 10 sec.; Vortex

Denaturation

22 µl 5x Sample Buffer

30 min 100°C denaturation

Gel 3 and 4

Eppendorfs from Samples Gel1

5 min upside down to poor off Supernatant

Resuspension in 300 µl Digestionbuffer final Volume 600 µl

1.7 µl PK Stock (20 mg/ml; 50 µg/ml final conc.)

1 hour 37°C

30 µl PMSF

136 µl Sample Buffer

Shortspin/Vortex

30 min 100°C denaturation
Spin 3000 g 10 min – Supernatant to Gel

02.10.2001

SDS-PAGE

Samples stored over night 4°C

Samples on the Gel (NuPage 12%, 12 Slot)

MES – SDS Running Buffer

33 min

200 V

Blotting

PVDF Membrane 8.0 x 8.5 cm

Hydrate Membrane with Methanol 30 sec.

Wash Membrane with water 2x 30 sec.

Soak Membrane in blotting buffer: 10 min

Assemble Sandwich

Blot 1 hour 30 V const.

Primary Antibody (6H4)

Rehydrate Membrane with Methanol: 10-30s

Wash with water 2x 30 sec.

Block the blot with blocking solution 30 min.

Incubate over night with primary antibody (1:50000; 1µl in 50 ml 2mg/ml)

03.10.2001

TBST washing: 1 min; 2x 10 min: fast shake

25 ml Blocking Buffer: 2x 10 min: slow shake

Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 95 min slow shake

1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)

TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake

Water washing: 1 min

0.75 ml Pierce Super Signal Substrate

Exposure time: 5-16 min

Gel 1: boiled

Nr.	Sample	on Gel	Lauroylsarcosine
1	7 µl	Marker SeeBlue	
2	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ not boiled	
3	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ boiled	
4	10µl	500 µl ADM	0.50% 29.0 µl Sarcosine
5, 6	1/2 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
7, 8	3/4 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
9, 10	5/6 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
11, 12	7/8 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine

Gel 2: not boiled

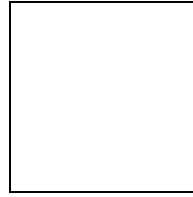
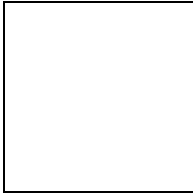
Nr.	Sample	on Gel	Lauroylsarcosine
1	7 µl	Marker SeeBlue	
2	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ not boiled	
3	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ boiled	
4	10µl	500 µl ADM	0.50% 29.0 µl Sarcosine
5, 6	9/10 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
7, 8	11/12 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
9, 10	13/14 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
11, 12	15/16 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine

Gel 3: Pellet 1 not boiled

Nr.	Sample	on Gel	Lauroylsarcosine
1	7 µl	Marker SeeBlue	
2	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ not boiled	
3	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ boiled	
4	10µl	500 µl ADM	0.50% 29.0 µl Sarcosine
5, 6	1/2 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
7, 8	3/4 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
9, 10	5/6 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
11, 12	7/8 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine

Gel 4: Pellet not boiled

Nr.	Sample	on Gel	Lauroylsarcosine
1	7 µl	Marker SeeBlue	
2	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ not boiled	
3	10µl	Digested BH 10 ⁻¹ boiled	
4	10µl	500 µl ADM	0.50% 29.0 µl Sarcosine
5, 6	9/10 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.32% 11.6 µl Sarcosine
7, 8	11/12 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.50% 18.2 µl Sarcosine
9, 10	13/14 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	0.75% 27.2 µl Sarcosine
11, 12	15/16 20µl	330 µl ADM 33 µl BH 10 ⁻¹	1.00% 36.3 µl Sarcosine



line 1 (marker): through-light picture of the membrane

Composition of the Solutions: see Attachment 7

ATTACHMENT 4

RK, 05 10 08

**DILUTION SERIE OF BRAIN HOMOGENATE
COMPARISON WITH PRIONICS-CHECK®**Brain homogenate 10% in Water

Mouse Scrapie 22a/SV

ADM: Biogasmatrix (gamma irradiated)

From the described Samples 1- 18 a second serie was performed (Samples 1a-18a) and the homogenisation digestion-buffer, PK-solution, 6H4-Antibody and the blocking solution were used from the Prionics-Kit.

Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Brain in AD-M
1/2	500 µl ADM	25.00 µl	75 µl	0.476 %
3/4	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl	0.238 %
5/6	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl	0.119 %
7/8	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	0.060 %

Ultracentrifugation

Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Resusp. after Centrifug	Brain in AD-M
9/10	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl		0.238 %
11/12	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl		0.119 %
13/14	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	15 µl	0.060 %
15/16	500 µl ADM	1.56 µl	75 µl	15 µl	0.030 %
17/18	500 µl ADM	0.78 µl	75 µl	15 µl	0.015 %

Boiled AD-M

Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Brain in AD-M
19/20	500 µl ADM boiled	12.50 µl	75 µl	0.238 %
21/22	500 µl ADM boiled	6.25 µl	75 µl	0.119 %
23/24	500 µl ADM boiled	3.13 µl	75 µl	0.060 %
25/26	500 µl ADM boiled	1.56 µl	75 µl	0.030 %

Samples 1-18
Sludge

500 µl ADM in 2.0ml

Eppendorf

25 µl Brain homogenate

Vortex

15 min room temperature

44,2 µl Lauroylsarcosine (10%)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 1.5 min

330 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Samples 19-26
Sludge boiled

500 µl ADM in 2.0ml Eppendorf

15 min 100°C

25 µl Brain homogenate

Vortex

15 min room temperature

27.6 µl Lauroylsarcosine (10%)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 1.5 min

350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Samples 1-18:

Poor Supernatant of

Open Eppendorfs 15 min upside down

Resuspension of the Pellet in 75 µl of
digestion buffer (final volume 100 µl)

Digestion:

5 µl PK (10 µl 20mg/ml diluted in 300 µl
digestion buffer) ...= 50 µg PK/ml

Shortspin 10 sec.; Vortex

60 min 37°C

5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)

Shortspin 10 sec.; Vortex

Samples 1a-18a: (Prionics-Kit)

Poor Supernatant of

Open Eppendorfs 15 min upside down

Resuspension of the Pellet in 75 µl of
homogenisation buffer (final vol. 100 µl)

Digestion:

10 µl Digestion buffer

10 µl µl Proteinase K Solution

Shortspin 10 sec.; Vortex

60 min 48°C

10 µl Stop Solution

Shortspin 10 sec.; Vortex

Samples 13-18 and 13a-18a

100 µl Sample into Polyallomereppendorf

Ultracentrifugation: 60 min 78 000 rpm, Ti 100.3

Resuspension of the pellet in 10 µl water (final conc.: 15µl)

Denaturation (samples1-26)

20 µl 5x Sample Buffer

Samples 13-18: 3 µl 5x Sample Buffer

30 min 90°C denaturation

Vortex, Shortspin 10 sec.

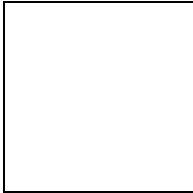
Denaturation (**samples
1a-26a**)

100 µl Sample Buffer

Samples 13a-18a 15 µl Sample Buffer

30 min 90°C denaturation

Vortex, Shortspin 10 sec.


SDS-PAGE

Samples stored over night 4°C

Samples on the Gel (NuPage 12%, 15 Slot)

15 µl Sample per slot

MES – SDS Running Buffer

33 min

200 V

Blotting

PVDF Membrane 8.0 x 8.5 cm

Hydrate Membrane with Methanol 30 sec.

Wash Membrane with water 2x 30 sec.

Soak Membrane in blotting buffer: 10 min

Assemble Sandwich

Blot 1 hour 30 V const.

Primary Antibody (6H4)

Rehydrate Membrane with Methanol: 10-30s

Wash with water 2x 30 sec.

Block the blot with blocking solution 30 min.

Incubate over night (15 hours) with primary antibody (1:50000; 1µl in 50 ml 2mg/ml)

TBST washing: 1 min; 2x 10 min: fast shake

25 ml Blocking Buffer: 2x 10 min: slow shake

Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 90 min slow shake

1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)

TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake

Water washing: 1 min

0.75 ml Pierce Super Signal Substrate per Membrane

Exposure time: 48 min

Gel 1

Nr.	Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Resusp. after Spin	Brain on Blot
1	Marker SeeBlue Plus2					
2	1	500 µl ADM	25.00 µl	75 µl		0.181 mg
3	Pos. digested Brain homogenate (0.47% in Water)					
4	2	500 µl ADM	25.00 µl	75 µl		0.181 mg
5, 6	3/4	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl		0.091 mg
7, 8	5/6	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl		0.045 mg
9, 10	7/8	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl		0.023 mg
11, 12	9/10	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl		0.091 mg
13, 14	11/12	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl		0.045 mg
15	13	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	15 µl	0.181 mg

Gel 2

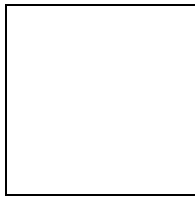
Nr.	Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Resusp. after Spin	Brain on Blot
1	Marker SeeBlue Plus2					
2	Pos. digested Brain homogenate (0.47% in Water)					
3	14	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	15 µl	0.181 mg
4, 5	15/16	500 µl ADM	1.56 µl	75 µl	15 µl	0.091 mg
6, 7	17/18	500 µl ADM	0.78 µl	75 µl	15 µl	0.049 mg
8, 9	19/20	500 µl ADM boiled	12.50 µl	75 µl		0.091 mg
10, 11	21/22	500 µl ADM boiled	6.25 µl	75 µl		0.045 mg
12, 13	23/24	500 µl ADM boiled	3.13 µl	75 µl		0.023 mg
14, 15	25/26	500 µl ADM boiled	1.56 µl	75 µl		0.023 mg

Gel 3 (Prionics)

Nr.	Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Resusp. after Spin	Brain on Blot
1	Marker SeeBlue Plus2					
2	Pos. digested Brain homogenate (0.47% in Water)					
3, 4	1a/2a	500 µl ADM	25.00 µl	75 µl		0.104 mg
5, 6	3a/4a	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl		0.052 mg
7, 8	5a/6a	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl		0.026 mg
9, 10	7a/8a	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl		0.013 mg
11, 12	9a/10a	500 µl ADM	12.50 µl	75 µl		0.052 mg
13, 14	11a/12a	500 µl ADM	6.25 µl	75 µl		0.026 mg
15	13a	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	15 µl	0.136 mg

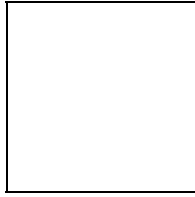
Gel 2 (Prionics)

Nr.	Sample	Sludge	Brain hom. 10% ad 25 µl	Resusp. after Ethanol	Resusp. after Spin	Brain on Blot
1	Marker SeeBlue Plus2					
2	Pos. digested Brain homogenate (0.47% in Water)					
3	14a	500 µl ADM	3.13 µl	75 µl	15 µl	0.136 mg
4, 5	15a/16a	500 µl ADM	1.56 µl	75 µl	15 µl	0.074 mg
6, 7	17a/18a	500 µl ADM	0.78 µl	75 µl	15 µl	0.037 mg
8, 9	19a/20a	500 µl ADM boiled	12.50 µl	75 µl		0.056 mg
10, 11	21a/22a	500 µl ADM boiled	6.25 µl	75 µl		0.028 mg
12, 13	23a/24a	500 µl ADM boiled	3.13 µl	75 µl		0.014 mg
14, 15	25a/26a	500 µl ADM boiled	1.56 µl	75 µl		0.007 mg



RK

AD-TSE Fortschrittsbericht, Anhang 6



line 1 (marker): through-light picture of the membrane
red framed areas: enhanced contrast

Composition of the Solutions: see Attachment 7

ATTACHMENT 5

RK, 08 10 08

**Temperature influence
Dilution serie of Brain homogenate 1**

Brain homogenate 10% in Water

Mouse Scrapie 22a/SV

ADM: Biogasmatrix (gamma irradiated)

Nr.	on Gel	Sludge		Brain hom.	Lauroylsarcosine	Resusp.	Brain on Blot
1/2	15µl	500 µl ADM	boiled	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg
3/4	15µl	500 µl ADM	boiled	6.25 mg	0.5%	50 µl	0.099 mg
5/6	15µl	500 µl ADM	boiled	3.13 mg	0.5%	50 µl	0.050 mg
7/8	15µl	500 µl ADM	boiled	1.56 mg	0.5%	50 µl	0.025 mg
9/10	15µl	500 µl ADM	boiled	0.78 mg	0.5%	50 µl	0.012 mg
11/12	15µl	500 µl ADM	boiled	0.39 mg	0.5%	50 µl	0.006 mg
13/14	15µl	500 µl ADM	12.50 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.198 mg
15/16	15µl	500 µl ADM	6.25 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.099 mg
17/18	15µl	500 µl ADM	3.13 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.050 mg
19/20	15µl	500 µl ADM	1.56 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.025 mg
21/22	15µl	500 µl ADM	0.78 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.006 mg
23/24	15µl	500 µl ADM	0.39 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.003 mg
25/26	15µl	500 µl ADM		12.50 mg	0.5%	50 µl	0.199 mg
27/28	15µl	500 µl ADM		6.25 mg	0.5%	50 µl	0.099 mg
29/30	15µl	500 µl ADM		3.13 mg	0.5%	50 µl	0.050 mg
31/32	15µl	500 µl ADM		1.56 mg	0.5%	50 µl	0.025 mg
33/34	15µl	500 µl ADM		0.78 mg	0.5%	50 µl	0.013 mg
35/36	15µl	500 µl ADM		0.39 mg	0.5%	50 µl	0.006 mg
40	15 µl	500 µl Water		12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg
42	15 µl	500 µl Water		12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg
41	15 µl	500 µl Water	12.50 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.198 mg

Samples 1-12
Sludge preboiled

500 µl ADM in 2.0ml

Eppendorf

15 min 100°C

25 µl Brain homogenate

Vortex

15 min room temperature

27.6 µl Lauroylsarcosine (10%)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 1.5 min

350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Samples 13-24
Sludge + Brain boiled

500 µl ADM in 2.0ml Eppendorf

25 µl Brain homogenate

Vortex

15 min room temperature

15 min 100°C

27.6 µl Lauroylsarcosine (10%)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 1.5 min

350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Samples 25-36

Sludge

500 µl ADM in 2.0ml Eppendorf

25 µl Brain homogenate

Vortex

15 min room temperature

27.6 µl Lauroylsarcosine (10%)

Vortex

15 min 37°C

Spin 2000g; 1.5 min

350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf

1500 µl Ethanol

20 min 0°C (Icewater)

Spin 2000 g 10 min

Poor Supernatant of

Open Eppendorfs 15 min upside down

Resuspension of the Pellet in **50 µl of digestion buffer (final volume 60 µl)**

Digestion:

5 µl PK (10 µl 20mg/ml diluted in 300 µl digestion buffer) ...= 50 µg PK/ml

Shortspin 10 sec.; Vortex

60 min 37°C

5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)

Shortspin 10 sec.; Vortex

Denaturation

12 µl 5x Sample Buffer

30 min 90°C denaturation

Vortex, Shortspin 10 sec., 5 min 90°C open tubes (to evaporate the alcohol)

SDS-PAGE

Samples stored over night 4°C

Samples on the Gel (NuPage 12%, 12 Slot)

MES – SDS Running Buffer

33 min

200 V

Blotting

PVDF Membrane 8.0 x 8.5 cm

Hydrate Membrane with Methanol 30 sec.

Wash Membrane with water 2x 30 sec.

Soak Membrane in blotting buffer: 10 min

Assemble Sandwich

Blot 1 hour 30 V const.

Primary Antibody (6H4)

Rehydrate Membrane with Methanol: 10-30s

Wash with water 2x 30 sec.

Block the blot with blocking solution 30 min.

Incubate over night (15 hours) with primary antibody (1:50000; 1µl in 50 ml 2mg/ml)

09.10.01

TBST washing: 1 min; 2x 10 min: fast shake

25 ml Blocking Buffer: 2x 10 min: slow shake

Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 90 min slow shake

1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)

TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake

Water washing: 1 min

0.75 ml Pierce Super Signal Substrate per Membrane

Exposure time: 48 min

Gel 1:

Nr.	on Gel	Sludge	Brain hom.	L.Sarcosine	Resusp.vol.	Brain on Blot			
1	50	7 µl	Marker SeeBlue						
2	40	15 µl	500 µl	Water	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg	
3, 4	1/2	15µl	500 µl	ADM	boiled	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg
5, 6	3/4	15µl	500 µl	ADM	boiled	6.25 mg	0.5%	50 µl	0.099 mg
7, 8	5/6	15µl	500 µl	ADM	boiled	3.13 mg	0.5%	50 µl	0.050 mg
9, 10	7/8	15µl	500 µl	ADM	boiled	1.56 mg	0.5%	50 µl	0.025 mg
11, 12	9/10	15µl	500 µl	ADM	boiled	0.78 mg	0.5%	50 µl	0.012 mg

Gel 2:

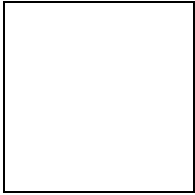
Nr.	Sample	on Gel	Sludge	Brain homogenate	Sarcosine	Resusp.	Brain on Blot		
1	50	7 µl	Marker SeeBlue						
2	41	15 µl	500 µl	Water	12.50 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.198 mg
3, 4	11/12	15µl	500 µl	ADM	boiled	0.39 mg	0.5%	50 µl	0.006 mg
5, 6	13/14	15µl	500 µl	ADM	12.50 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.198 mg
7, 8	15/16	15µl	500 µl	ADM	6.25 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.099 mg
9, 10	17/18	15µl	500 µl	ADM	3.13 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.050 mg
11, 12	19/20	15µl	500 µl	ADM	1.56 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.025 mg

Gel 3:

Nr.	Sample	on Gel	Sludge	Brain hom.	L.Sarcosine	Resusp.	Brain on Blot		
1	50	7 µl	Marker SeeBlue						
2	42	15 µl	500 µl	Water	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg	
3, 4	21/22	15µl	500 µl	ADM	0.78 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.006 mg
5, 6	23/24	15µl	500 µl	ADM	0.39 mg	boiled	0.5%	50 µl	0.003 mg
7, 8	25/26	15µl	500 µl	ADM	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.199 mg	
9, 10	27/28	15µl	500 µl	ADM	6.25 mg	0.5%	50 µl	0.099 mg	
11, 12	29/30	15µl	500 µl	ADM	3.13 mg	0.5%	50 µl	0.050 mg	

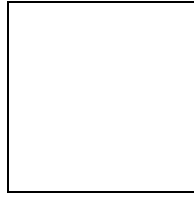
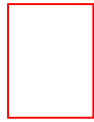
Gel 4:

Nr.	Sample	on Gel	Sludge	Brain hom.	L.Sarcosine	Resusp.	Brain on Blot	
1	50	7 µl	Marker SeeBlue					
2	42	15 µl	500 µl	Water	12.50 mg	0.5%	50 µl	0.198 mg
3, 4	31/32	15µl	500 µl	ADM	1.56 mg	0.5%	50 µl	0.025 mg
5, 6	33/34	15µl	500 µl	ADM	0.78 mg	0.5%	50 µl	0.013 mg
7, 8	35/36	15µl	500 µl	ADM	0.39 mg	0.5%	50 µl	0.006 mg



RK

AD-TSE Fortschrittsbericht, Anhang 6



line 1 (marker): through-light picture of the membrane
red framed area: enhanced contrast

Composition of the Solutions: see Attachment 7

ATTACHMENT 6

RK, 09 10 08

Temperature influence
Dilution serie of Brain homogenate

Brain homogenate Mouse Scrapie 22a/SV (7175)

10% in Water

Neg. Brain 79A/VM, 7160

0.45 g in 4 ml Water

ADM: Non Sterilized Biogasmatrix (gamma irradiated)

Nr.	Sample	Sludge	Brain homogenate final conc.	Resusp.	Exp. Brain on Blot
1/ 2/ 3	10µl	500 µl ADM, boiled	9.091 mg/ml	50 µl	0.500 mg
4/ 5/ 6	10µl	500 µl ADM, boiled	4.545 mg/ml	50 µl	0.250 mg
7/ 8/ 9	10µl	500 µl ADM, boiled	2.273 mg/ml	50 µl	0.125 mg
10/11/12	10µl	500 µl ADM, boiled	1.136 mg/ml	50 µl	0.063 mg
13/14/15	10µl	500 µl ADM	9.091 mg/ml	50 µl	0.500 mg
16/17/18	10µl	500 µl ADM	4.545 mg/ml	50 µl	0.250 mg
19/20/21	10µl	500 µl ADM	2.273 mg/ml	50 µl	0.125 mg
22/23/24	10µl	500 µl ADM	1.136 mg/ml	50 µl	0.063 mg
40 Neg.	10µl	500 µl ADM, boiled	9.091 mg/ml	50 µl	0.023 mg
41 Neg.	10µl	500 µl ADM	9.091 mg/ml	50 µl	0.023 mg
50, 51 Pos.	10 µl	500 µl Water	2.273 mg/ml	50 µl	0.125 mg

Samples 1-12**Sludge preboiled**

500 µl ADM in 2.0ml Eppendorf
15 min 100°C
50 µl Brain homogenate
Vortex
10 min room temperature
29.0 µl Lauroylsarcosine (10%)
Vortex
10 min room temperature
Vortex two times
Spin 2000g; 2.0 min
350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf
1500 µl Ethanol; 20 min 0°C (Icewater)
Spin 2000 g 10 min

Samples 13-24**Sludge**

500 µl ADM in 2.0ml Eppendorf
50 µl Brain homogenate
Vortex
10 min room temperature
29.0 µl Lauroylsarcosine (10%)
Vortex
10 min room temperature
Vortex two times
Spin 2000g; 2.0 min
350 µl Supernatant into 2 ml Eppendorf
1500 µl Ethanol; 20 min 0°C (Icewater)
Spin 2000 g 10 min

Poor Supernatant of
Open Eppendorfs 5 min upside down
Resuspension of the Pellet in **50 µl of digestion buffer (final volume 60 µl)**

Digestion:

5 µl PK (10 µl 20mg/ml diluted in 300 µl digestion buffer) ... = 50 µg PK/ml
Shortspin 10 sec.; Vortex
60 min 37°C
5 µl PMSF (100 mM in N-Propanol)
Shortspin 10 sec.; Vortex

Denaturation

12 µl 5x Sample Buffer
30 min 90°C denaturation (cool down over night)
Vortex, Shortspin 10 sec., 5 min 90°C open tubes (to evaporate the alcohol)

10.10.2001

SDS-PAGE

Samples on the Gel (NuPage 12%, 15 Slot)
MES – SDS Running Buffer
35 min/200 V

Blotting

PVDF Membrane 8.0 x 8.5 cm
Hydrate Membrane with Methanol 30 sec.
Wash Membrane with water 2x 30 sec.
Soak Membrane in blotting buffer: 10 min
Assemble Sandwich
Blot 1 hour 30 V const.

Primary Antibody (6H4)

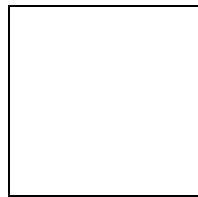
Rehydrate Membrane with Methanol: 10-30s
Wash with water 2x 30 sec.
Block the blot with blocking solution 30 min.
Incubate 1 hour with primary antibody (1:10000; 2.5µl in 25 ml)
TBST washing: 1 min; 2x 10 min: fast shake
25 ml Blocking Buffer: 2x 10 min: slow shake
Secondary Antibody: Donkey Anti Mouse 17/01/00: 85 min slow shake
1µl in 25 ml Blocking Buffer (1:25000)
TBST washing: 1 min; 4x 10 min: fast shake
Water washing: 1 min
0.75 ml Pierce Super Signal Substrate per Membrane
Exposure time: 16 min

Gel 1, 3:

Nr.	Sample Nr.	Samplevol.	Sludge	Brainhom. final conc.	Resusp.	Exp. Brain on Blot
1	60	7 µl	Marker SeeBlue			
2	50 Pos.	10 µl	500 µl Water	0.227%	50 µl	0.125 mg
3	40 Neg.	10µl	500 µl ADM, boiled	0.909%	50 µl	0.023 mg
4, 5, 6	1/ 2/ 3	10µl	500 µl ADM, boiled	0.909%	50 µl	0.500 mg
7, 8, 9	4/ 5/ 6	10µl	500 µl ADM, boiled	0.455%	50 µl	0.250 mg
10, 11, 12	7/ 8/ 9	10µl	500 µl ADM, boiled	0.227%	50 µl	0.125 mg
13, 14, 15	10/11/12	10µl	500 µl ADM, boiled	0.114%	50 µl	0.063 mg

Gel 2, 4:

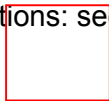
Nr.	SampleNr.	Samplevol.	Sludge	Brainhom. final conc.	Resusp.	Exp. Brain on Blot
1	60	7 µl	Marker SeeBlue			
2	51 Pos.	10 µl	500 µl Water	0.227%	50 µl	0.125 mg
3	41 Neg.	10µl	500 µl ADM	0.909%	50 µl	0.023 mg
4, 5, 6	13/14/15	10µl	500 µl ADM	0.909%	50 µl	0.500 mg
7, 8, 9	16/17/18	10µl	500 µl ADM	0.455%	50 µl	0.250 mg
10, 11, 12	19/20/21	10µl	500 µl ADM	0.227%	50 µl	0.125 mg
13, 14, 15	22/23/24	10µl	500 µl ADM	0.114%	50 µl	0.063 mg



line 1 (marker): through-light picture of the membrane

red framed area: enhanced contrast

Composition of the Solutions: see Attachment 7



ATTACHMENT 7**COMPOSITION OF THE SOLUTIONS****Digestion Buffer:**

100 mM Tris/HCl pH 7.6
0.05 g Lauroylsarcosine
ad 100 ml with Water

Running Buffer

50 ml MES SDS Running Buffer
20x (Invitrogen 46 50 36)
ad 1000 ml Water
inner Chamber: 200 ml Running Buffer +
500 µl Antioxidant (Invitrogen 46-5028)

Transfer Buffer

50 ml Invitrogen Transfer Buffer 20x
200 ml Methanol
500 µl Antioxidant Invitrogen
ad 1000 ml Water

Blocking Buffer

1.25 ml Western Blocking Reagent
(Boehringer 19210681)
ad 25 ml TBS

Antibody I: 6H4 1:50000

1µl in 50 ml of Blocking Buffer

Antibody II: Donkey Anti Mouse 1:25000

1µl in 25 ml of Blocking Buffer

SuperSignal West Dura Extended

(Pierce 34075)

Duration Substrate (for Horseradish
Peroxidase labels)
0.5 ml SuperSignal West Dura Stable
Peroxidase Buffer (Pierce 1856146)
0.5 ml SuperSignal West Dura Luminol
Enhancer Solution (Pierce 1856145)

TBS

	10mM Tris	1.21 g
NaCl	8.77 g	
HCl (1M)	2 ml	
Water	ad 1000 ml	

TBST

10 mM Tris	1.21 g
NaCl	8.77 g
HCl (1M)	2 ml
Tween 20	
Water	ad 1000 ml

PERSÖNLICHE
UNG ZUM GEDANKEN- UND ERFAHRUNSAUSTAUSCH

ND DEAKTIVIERUNG VON "TSE-PRIONEN"
N GEWEBEN UND ANDEREN SUBSTRATEN
MÖGLICHKEITEN, ERFAHRUNGEN, SCHWIERIGKEITEN

Oberösterreichische
Tierkörperverwertungs-
Gesellschaft.m.b.H.
Regau

Interuniversitäres
Forschungsinstitut für
Agrarbiotechnologie
Tulln

Hotel Parkvilla
Hasenauerstr. 12, Wien XIX
13. November 2001, 9.00 - 16.00 Uhr

VORSTELLUNG DER TEILNEHMER:

Dr. Radulf OBERTHÜR, SNP R&D (Bawinkel, D)
Dr. Rainer SÖLLER, Artus Ges. f. molekulare Forschung und Entwicklung mbH (Hamburg, D)
Mag. Herwig REICHL, Hämosan Life Sciences Ges.m.b.H. (Wien, A)
DI Roland KIRCHMAYR, IFA-Tulln (Tulln, A)
Dr. Franz BAUMANN, OÖ.TKV Ges.m.b.H (Regau, A)
Prof. Dr. Rudolf BRAUN, Univ. f. Bodenkultur, IFA-Tulln (Wien, A)
Dr. Hermann SCHILDORFER, Bundesveterinärbehörde, BMSG (Wien, A)
Marlies NEMETH, Bundesanstalt für vet. med. Untersuchungen (Mödling, A)
Prof. Dr. Matthias MÜLLER, Univ. f. vet. med., IFA-Tulln (Wien, A)
HR Dr. Karl WAMPL, Landesvet. Dienst OÖ (Linz, A)
Dir. Manfred KAINER, Steir. TKV Ges.m.b.H (Landscha, A)
Ing. Richard LACHUT, Saria Bio-Industries (Tulln, A)

ERFAHRUNGSBERICHTE AUS DEN EINZELNEN GEBIETEN:

Dr. Radulf Oberthür:

Detektion und Deaktivierung von PrP^{SC} in Schlachtabfällen/Tiermehl

Dr. Rainer Söller:

Erfahrungen und Schwierigkeiten beim Anwenden von „Schnelltestmethoden“

Mag. Herwig Reichl

Erfahrungen beim Entwickeln von „Schnelltestmethoden“

DI Roland Kirchmayr

Detektion von PrP^{SC} in Anaerobem Faulschlamm

DISKUSSION:

Input- und Post-Treatment Kontrolle der anaeroben Verwertung von SRM?