

II. ARBEITSPROTOKOLLE OPTIMIERUNG 2 (L2-LABOR)

II.	Arbeitsprotokolle Optimierung 2 (L2-Labor)	1
II.1.	02 02 12	2
II.2.	02 02 14	6
II.3.	02 02 28	10
II.4.	02 03 04	14
II.5.	02 03 07	18
II.6.	02 03 11	22
II.7.	02 03 13	27
II.8.	02 03 18	32
II.9.	02 03 19	36
II.10.	02 03 21	40
II.11.	02 03 26	45
II.12.	02 03 27	49
II.13.	02 04 03	54
II.14.	02 04 06	58

Versuche:

- Übertragung der Ergebnisse von Edinburgh auf MD
- Verdünnungsreihe 0,5 - 0,2% HH in Faulschlamm
- Einfluss von SDS (0,1 - 0,4%)

Conclusio:

- längere Expositionsdauer von Lauroylsarcosin
- Längere Belichtung des Röntgenfilmes

HH SC –

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883
in 4 ml Wasser

HH SC+ /5,0

240 µl HH SC+ /1,0 + 240 µl Wasser

HH SC+ /3,0

165 µl HH SC+ /1,0 + 330 µl Wasser

HH SC+ /2,0

105 µl HH SC+ /1,0 + 420 µl Wasser

SDS 1%

100 µl SDS 10% (in Wasser)
+ 900 µl Wasser

SDS 2%

200 µl SDS 10% (in Wasser)
+ 800 µl Wasser

SDS 4%

400 µl SDS 10% (in Wasser)
+ 600 µl Wasser

PK

10 mg PK in Tris/HCl pH 7,4

PMSE

Gesättigte Lsg in i-Propanol

AD-M

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(21.01.2002)

Sterilisiert: 20 min 121°C

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics			
2 (-)	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC-	
3 (+)	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC+ /1,0	
4/5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC+ /1,0	
6/7	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC+ /0,5	
8/9	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC+ /0,3	
10/11	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	50µl HH SC+ /0,2
12/13	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	50µl HH SC+ /0,5
14/15	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	50µl HH SC+ /0,3
16/17	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	50µl HH SC+ /0,2

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics			
2 (-)	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC-	
3 (+)	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%	50µl HH SC+ /1,0	
24/25	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 2%	50µl HH SC+ /1,0
26/27	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 2%	50µl HH SC+ /0,5
28/29	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 2%	50µl HH SC+ /0,3
30/31	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 2%	50µl HH SC+ /0,2
32/33	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 4%	50µl HH SC+ /0,5
34/35	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 4%	50µl HH SC+ /0,3
36/37	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 4%	50µl HH SC+ /0,2

1,8 ml Eppendorf (Schraubverschluss)
AD-M
+ HH
+ L. Sarcosin
+ SDS

Schütteln, 5 - 10 min RT
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

300 µl Überstand in neues 1,8 ml Eppendorf
1200 µl Ethanol 98% -17°C
20 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert, Röhrchen überkopf im
Kühlakku auf Küchenrolle
Überstand in 75 µl Tris/HCl pH 7,4
resuspendiert und in Verdauplatte überführt
+ 5 µl PK 10 µl in 190 µl Tris/HCl
40 min 37°C
+ 10 µl PMSF
+ 25µl Sample Buffer 5x
15 min 97°C

10 µl in SDS-Gel
NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

45 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

1 min in Methanol
2 x 1 min in Wasser
30 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V in Miniprep., Transferpuffer,
Methanol erst nach 15 min zugegeben

Membran
30 sek. Methanol
2x 30 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 50 000
1 h RTemp. Slow shake
13 h 4°C
3x 3 min TBST fast shake
60 min AK II; 1:5000; RTemp. Slow shake

4x 3 min TBST, fast shake
10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix, 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

10 min. Expositur
5 min. Entwicklung
3 min. Fixierung

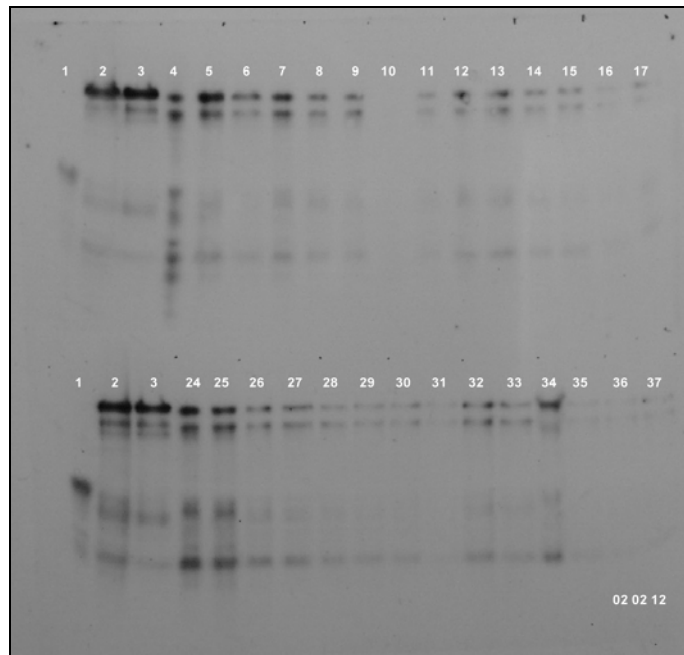


Abbildung 1: 020212:

- *Übertragung der Ergebnisse von Edinburgh auf MD*
- *Verdünnungsreihe 0,5 - 0,2% HH in Faulschlamm*
- *Einfluss von SDS (0,1 - 0,4%)*

Conclusio:

- *längere Expositionsdauer von Lauroylsarcosin*
- *Längere Belichtung des Röntgenfilmes*

Versuche:

Ablösen von PrP^{SC} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:

Verdünnungsreihe 0,5%, 0,3%, 0,2% Hirnhomogenat in Faulschlamm

- *Einfluss von SDS (0,1%)*
- *Einfluss von Guanidinthiocyanat (0,1%)*
- *Einfluss von GuSCN + SDS*

Conclusio:

- *Zu hohe Konzentration an PrP^{SC}. Fast alle Banden zeigen die selben Intensität. Unterschiedliche Einflüsse sind nicht erkennbar.*

HH SC – /10,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581 in 5 ml
Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883
in 4 ml Wasser

HH SC+ /5,0

270 µl HH SC+ /10,0 + 270 µl Wasser

HH SC+ /3,0

165 µl HH SC+ /10,0 + 330 µl Wasser

HH SC+ /2,0

110 µl HH SC+ /10,0 + 330 µl Wasser

AD-M

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

SDS 2%

200 µl SDS 10% (in Wasser)
+ 800 µl Wasser

GuSCN 2%

200 µl GuSCN 10% (in Wasser)
+ 800 µl Wasser

PK

10 mg PK in Tris/HCl pH 7,4; 0,1M

PMSE

Gesättigte Lsg in i-Propanol

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics				
2 (-)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%		
3 (+)	50µl HH SC-	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%		
4/5	50µl HH SC+ /1,0	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		
6/7	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	
8/9	50µl HH SC+ /0,3	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	
10/11	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	
12/13	50µl HH SC+ /1,0	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		
14/15	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		
16/17	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics				
2 (-)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%		
3 (+)	50µl HH SC-	500µl Wasser	30µl L.Sarcosin 10%		
24/25	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		
26/27	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		31µl GuSCN 2%
28/29	50µl HH SC+ /0,3	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		31µl GuSCN 2%
30/31	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%		31µl GuSCN 2%
32/33	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	31µl GuSCN 2%
34/35	50µl HH SC+ /0,3	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	31µl GuSCN 2%
36/37	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	30µl L.Sarcosin 10%	30 µl SDS 1%	31µl GuSCN 2%

1,8 ml Eppendorf (Schraubverschluss)

50 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M

5 min RT

Proben 4 - 5; 12 - 17; 24 - 25:

+ L. Sarcosin

Proben 6 - 11:

+ L. Sarcosin

+ SDS

Proben 26 - 31

+ L. Sarcosin

+ GuSCN

Proben 32 - 37

+ L. Sarcosin

+ SDS

+ GuSCN

Schütteln, 10 min RT

Zentrifugation: 2000 xg / 3 min

400 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf

1600 µl Ethanol 98% / -17°C

40 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (> 10 min)

Überstand in 75 µl Tris/HCl pH 7,4; 0,1M
resuspendiert und in Verdauplatte überführt

+ 5 µl PK (10 µl Stock (20mg/ml))

in 290 µl Tris/HCl

50 min 40°C

+ 10 µl PMSF

+ 25µl Sample Buffer 5x

20 min 95°C

10 µl in SDS-Gel

NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

45 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

1 min in Methanol

30 min in Transferpuffer (20% Methanol)

Blot:

60 min 30 V in Miniprep., Transferpuffer
(20% Methanol)

Membran

30 sek. Methanol

2x 30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 00

15h 4°C no shake

1x 1 min, 3x 3 min TBST fast shake

80 min AK II; 1:5000;

RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 3 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix, 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

35 min. Expositur

2 min. Entwicklung

3 min. Fixierung

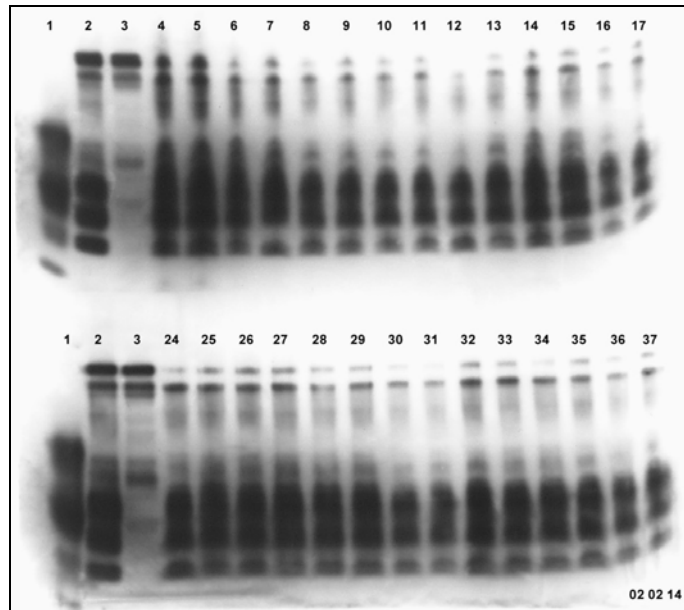


Abbildung 2: 020214

Versuche:

- Ablösen von PrP^{Sc} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:
Verdünnungsreihe 0,5%, 0,3% 0,2% Hirnhomogenat in Faulschlamm
- Einfluss von SDS (0,1%)
- Einfluss von Guanidinthiocyanat (0,1%)
- Einfluss von GuSCN + SDS

Conclusio:

Zu hohe Konzentration an PrP^{Sc}. Fast alle Banden zeigen die selben Intensität. Unterschiedliche Einflüsse sind nicht erkennbar.

Versuche:

Ablösen von PrP^{SC} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:

- *Einfluss von SDS (0,1%)*
- *Einfluss von Guanidinthiocyanat (0,1%)*
- *Einfluss von GuSCN + SDS*

Conclusio:

- *Weder SDS noch GuSCN bzw. die Kombination aus beiden verbesserte den Nachweis von PrP^{SC}. Die Banden nur mit L.Sarcosin erscheinen breiter und intensiver.*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

110 µl HH SC- /1,0 + 330 µl Wasser

HH SC+ /1,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883
in 4 ml Wasser

HH SC+ /0,25

110 µl HH SC+ /1,0 + 330 µl Wasser

HH SC+ /0,10

45 µl HH SC+ /1,0 + 405 µl Wasser

SDS 2%

200 µl SDS 10% (in Wasser)
+ 800 µl Wasser

GuSCN 2%

200 µl GuSCN 10% (in Wasser)
+ 800 µl Wasser

PK

Prionics-Kit

PK-Stopp

Prionics-Kit

AD-M

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

			Gesamtvol	ADM	HH	HH %	Sarco (10%)	Sarco %	SDS (2%)	SDS %	GuSCN (2%)	GuSCN %
1		Molekularmarker										
2		Kontrolle Prionics										
3		Positiv in Wasser										
4		Negativ in Wasser										
5	6	neg. 0,25 Sarco	579	500	50	0,864	29	0,501				
7	8	pos. 0,25 Sarco	579	500	50	0,864	29	0,501				
9	10	pos. 0,10 Sarco	579	500	50	0,864	29	0,501				
11	12	neg. 0,25 Sarco, SDS	612	500	50	0,817	31	0,507	31	0,101		
13	14	pos. 0,25 Sarco, SDS	612	500	50	0,817	31	0,507	31	0,101		
15	16	pos. 0,10 Sarco, SDS	612	500	50	0,817	31	0,507	31	0,101		
17												

			Gesamtvol	ADM	HH	HH %	Sarco	Sarco %	SDS	SDS %	GuSCN	GuSCN %
1		Molekularmarker										
2		Kontrolle Prionics										
3		Positiv in Wasser										
4		Negativ in Wasser										
25	26	neg. 0,25 Sarco, GuSCN	612	500	50	0,817	31	0,507			31	0,101
27	28	pos. 0,25 Sarco, GuSCN	612	500	50	0,817	31	0,507			31	0,101
29	30	pos. 0,10 Sarco, GuSCN	612	500	50	0,817	31	0,507			31	0,101
31	32	neg. 0,25 Sarco, GuSCN, SDS	646	500	50	0,774	32	0,495	32	0,099	32	0,099
33	34	pos. 0,25 Sarco, GuSCN, SDS	646	500	50	0,774	32	0,495	32	0,099	32	0,099
35	36	pos. 0,10 Sarco, GuSCN, SDS	646	500	50	0,774	32	0,495	32	0,099	32	0,099
37												

1,8 ml Eppendorf (Schraubverschluss)

50 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M

10 min RT

Proben 3 - 10:

+ L. Sarcosin

Proben 11 - 16

+ L. Sarcosin

+ SDS

Proben 25 - 30:

+ L. Sarcosin

+ GuSCN

Proben 31 - 36:

+ L. Sarcosin

+ SDS

+ GuSCN

Schütteln, 10 min RT

Zentrifugation: 2000 xg / 3 min

400 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf

1600 µl Ethanol 98% / -17°C

20 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (> 10 min)

Überstand in 75 µl Tris/HCl pH 7,4; 0,1M

resuspendiert und in Verdauplatte überführt

+ 5 µl PK (Prionics-Kit)

35 min 40°C

+ 10 µl PK-Stopp (Prionics-Kit)

+ 20 µl Sample Buffer 5x

20 min 95°C

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

10 µl Probe (Marker SeeBlue Plus2: 7 µl)

Elektrophorese

45 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

2x 30 sek. In Wasser

30 min in Transferpuffer (20% Methanol)

Blot:

60 min 30 V in Miniprep., Transferpuffer
(20% Methanol)

Membran

30 sek. Methanol

2x 30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000

16h, 4°C no shake

1x 1 min, 4x 10 min TBST fast shake

60 min AK II; 1:5000;

RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 10 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix, 100 µl ad 5 ml mit

Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

18 min. Expositur

1 min. Entwicklung

3 min. Fixierung

Filmbelichtung II

5 min. Expositur

2 min. Entwicklung

5 min. Fixierung

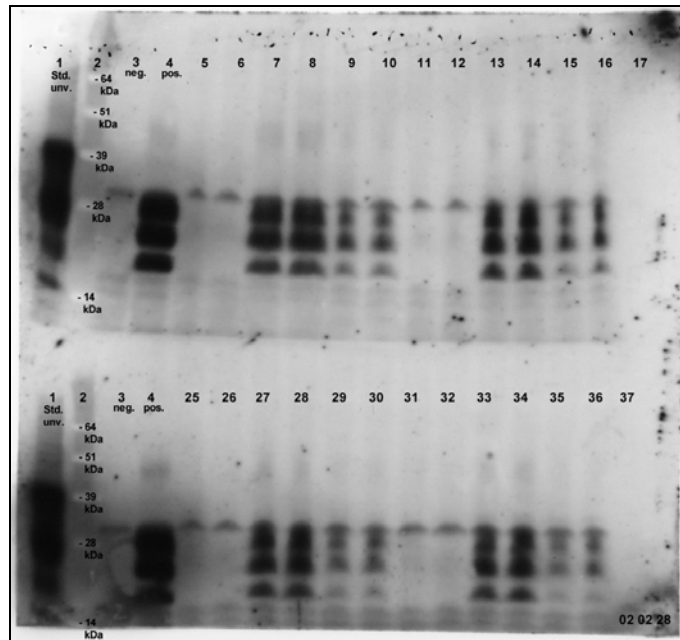


Abbildung 3: 020228

Versuche:

- Ablösen von PrP^{SC} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:
- Einfluss von SDS (0,1%)
- Einfluss von Guanidinthiocyanat (0,1%)
- Einfluss von GuSCN + SDS

Conclusio:

- Weder SDS noch GuSCN bzw. die Kombination aus beiden verbesserte den Nachweis von PrP^{SC}. Die Banden nur mit L.Sarcosin erscheinen breiter und intensiver.

Versuche:

Ablösen von PrP^{SC} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:

- *Einfluß der Temperatur (0°C, 20°C(RT), 37°C)*
- *Einfluß der Expositionsdauer (7 min., 17 min., 37 min.)*

Conclusio:

- *Weder die Expositionsdauer noch die Temperatur bei der Exposition haben deutlichen Einfluß auf die Ergebnisse*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581 in 5 ml
Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /1,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883
in 4 ml Wasser

HH SC+ /0,25

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /0,10

100 µl HH SC+ /1,0 + 900 µl Wasser

AD-M

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen (gemischt
meso und thermophil 21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

PK

Prionics-Kit

PK-Stopp

Prionics-Kit

Gel 1: 7 min.

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics			
2	Molekularmarker SeeBlue Plus2 (7µl Probenvolumen)			
3 (+)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
4 (-)	50µl HH SC- /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
5/6	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 0°C
7/8	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 0°C
9/10	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 20°C
11/12	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 20°C
13/14	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 37°C
15/16	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	7 min. 37°C
17	50µl HH SC- /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	37 min. 0°C

Gel 2: 17 min.

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics			
2	Molekularmarker SeeBlue Plus2 (7µl Probenvolumen)			
3 (-)	50µl HH SC- /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
4 (+)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
25/26	50µl HH SC- /0,25	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	17 min. 0°C
27/28	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	17 min. 0°C
29/30	50µl HH SC+ /0,1	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	17 min. 20°C
31/32	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	17 min. 20°C
33/34	50µl HH SC+ /1,0	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	17 min. 37°C
35/36	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	17 min. 37°C
37	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	37 min. 20°C

Gel 3: 37 min.

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics			
2	Molekularmarker SeeBlue Plus2 (7µl Probenvolumen)			
3 (-)	50µl HH SC- /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
4 (+)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%	
45/46	50µl HH SC- /0,25	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	37 min. 0°C
47/48	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	37 min. 0°C
49/50	50µl HH SC+ /0,1	500µl AD-M	31µl L.Sarcosin 10%	37 min. 20°C
51/52	50µl HH SC+ /0,2	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	37 min. 20°C
53/54	50µl HH SC+ /1,0	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	37 min. 37°C
55/56	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	37 min. 37°C
57	50µl HH SC+ /0,5	500µl AD-M	32µl L.Sarcosin 10%	37 min. 37°C

1,8 ml Eppendorf (Schraubverschluss)

50 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M

10 min RT

+ L. Sarcosin
vortexen, 2 min RT

Proben 5 - 8:

7 min 0°C (Kühlakku)

Proben 9 - 12:

7 min 20°C (RT)

Proben 13 - 16:

7 min 37°C (Heizblock)

Proben 25 - 28:

17 min 0°C (Kühlakku)

Proben 29 - 32:

17 min 20°C (RT)

Proben 33 - 36:

17 min 37°C (Heizblock)

Proben 45 - 48; 17:

37 min 0°C (Kühlakku)

Proben 49 - 52; 37:

37 min 20°C (RT)

Proben 53 - 56; 57:

37 min 37°C (Heizblock)

Zentrifugation: 2000 xg / 2 min

400 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf

1600 µl Ethanol 98% / -17°C

80 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 15 min)

Überstand in 100 µl Tris/HCl pH 7,4; 0,1M
resuspendiert und in Verdauplatte überführt

Proben 25 - 37 (17 min, Gel 2):

35 µl wurden herausgenommen und in neue
Wells gefüllt (→ Proben 25' - 37')

25 - 37: + 3,5µl PK

25' - 37': + 3,5µl Digestion Buffer
+ 3,5µl PK

Die Proben 25'-37' wurden dann nach der
Denaturierung wegen zu geringen Volumens
und Auskristallisierung verworfen.

Proben 3 - 17 u. 45 - 57:

+ 5 µl PK (Prionics-Kit)

35 min 37°C

+ 5 µl PK-Stopp (Prionics-Kit)

+ 20 µl Sample Buffer 5x

20 min 95°C

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

10 µl Probe (Marker SeeBlue Plus2: 7 µl)

Elektrophorese

45 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

2x 30 sek. In Wasser

30 min in Transferpuffer

Blot:

65 min 140 V, Transferpuffer

Membran

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 12h, 4°C no shake

1x 1 min, 4x 10 min TBST fast shake

90 min AK II; 1:5000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 10 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix, 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

18 min. Expositur

1 min. Entwicklung

3 min. Fixierung

Filmbelichtung II

5 min. Expositur

2 min. Entwicklung

5 min. Fixierung

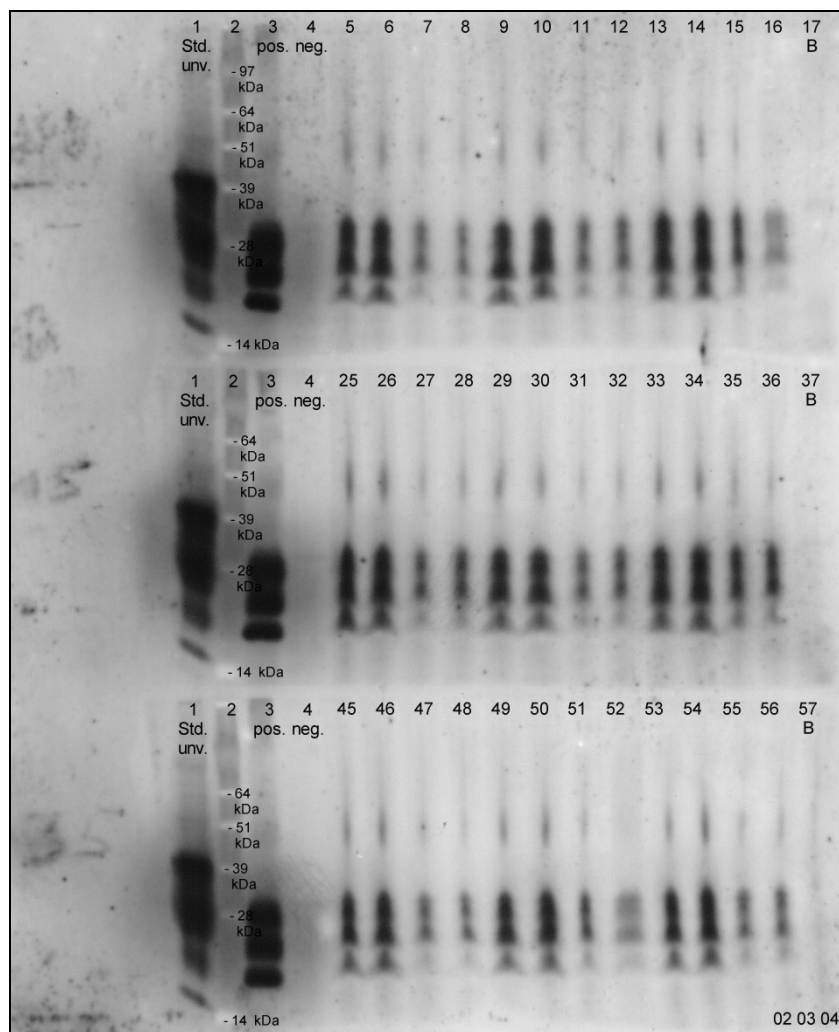


Abbildung 4: 020304

Gel 1:	7 min	Proben 5-8, 25-28, 45-48:	0°C
Gel 2:	17 min	Proben 9-12, 29-32, 49-52:	20°C
Gel 3:	37 min	Proben 13-16, 33-36, 53-56:	37°C

Versuche:

Ablösen von PrP^{Sc} mittels Lauroylsarcosinbehandlung:

- *Einfluß der Temperatur (0°C, 20°C(RT), 37°C)*
- *Einfluß der Expositionsdauer (7 min., 17 min., 37 min.)*

Conclusio:

Weder die Expositionsdauer noch die Temperatur bei der Exposition haben deutlichen Einfluß auf die Ergebnisse

Versuche:

- Zentrifugationsdauer nach der Lauroylsarcosinbehandlung (1 - 10 min)
- Vergleich Verdaupufferkombination Prionics-Check versus 0,1M Tris/HCl pH 7,4

Conclusio:

- 3 - 5 min. Zentrifugation führt zu den stärksten Signalen.
- Prionics Verdaupufferkombination (Homogenisierungspuffer, HB + Verdaupuffer, DB) führt zu breiteren Banden geringerer Intensität (die bei kürzerer Belichtung am Röntgenfilm fast verschwinden können) → der Einsatz von HB + DB führt daher nicht zu einer verbesserten Auflösung bzw. besseren Detektionsgrenze

HH SC – /10,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883
in 4 ml Wasser

HH SC+ /0,25

250 µl HH SC+ /1,0+ 750 µl Wasser

HH SC+ /0,10

100 µl HH SC+ /1,0 + 900 µl Wasser

Inhibitormix:

Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma)
Phiole in 1000µl Wasser gelöst

AD-M (steril)

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(gemischt meso und thermophil 21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

Tris/HCl (0,1M)

5 ml 1M Tris/HCl pH 7,4 (Fluka) ad 50ml

DB

Verdaupuffer (Prionics-Kit)

HB

Homogenisierungspuffer (Prionics-Kit)

PK

Prionics-Kit

PK-Stopp

Prionics-Kit

Gel 1: 1-3 min.

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics				
2	Molekularmarker SeeBlue Plus2 (7µl Probenvolumen)				
3 (+)	50µl HH SC+ /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%		
4 (-)	50µl HH SC- /1,0	500µl Wasser	29µl L.Sarcosin 10%		
5	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	1 min	Tris/HCl
6	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	1 min	HB+DB (Prionics)
7	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	1 min	Tris/HCl
8	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	1 min	HB+DB (Prionics)
9	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	2 min.	Tris/HCl
10	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	2 min.	HB+DB (Prionics)
11	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	2 min.	Tris/HCl
12	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	2 min.	HB+DB (Prionics)
13	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	3 min.	Tris/HCl
14	50µl HH SC+ /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	3 min.	HB+DB (Prionics)
15	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	3 min.	Tris/HCl
16	50µl HH SC+ /0,10	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	3 min.	HB+DB (Prionics)
17	50µl HH SC - /0,25	500µl AD-M	29µl L.Sarcosin 10%	2 min.	Tris/HCl

Gel 2: 5-10 min.

Probe Nr.

1	Kontrolle Prionics				
2	Molekularmarker SeeBlue Plus2 (7µl Probenvolumen)				
3 (-)	50 µl HH SC- /1,0	500 µl Wasser	29 µl L.Sarcosin 10%		
4 (+)	50 µl HH SC+ /1,0	500 µl Wasser	29 µl L.Sarcosin 10%		
25	50 µl HH SC- /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	5 min.	Tris/HCl
26	50 µl HH SC- /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	5 min.	HB+DB (Prionics)
27	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	5 min.	Tris/HCl
28	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	5 min.	HB+DB (Prionics)
29	50 µl HH SC+ /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	7 min.	Tris/HCl
30	50 µl HH SC+ /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	7 min.	HB+DB (Prionics)
31	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	7 min.	Tris/HCl
32	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	7 min.	HB+DB (Prionics)
33	50 µl HH SC+ /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	10 min.	Tris/HCl
34	50 µl HH SC+ /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	10 min.	HB+DB (Prionics)
35	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	10 min.	Tris/HCl
36	50 µl HH SC+ /0,10	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	10 min.	HB+DB (Prionics)
37	50 µl HH SC - /0,25	500 µl AD-M	29 µl L.Sarcosin 10%	2 min.	HB+DB (Prionics)

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
 50 µl Hirnhomogenat
 500 µl AD-M

10 min RT
 + L. Sarcosin

Schütteln, 10 min RT

Zentrifugation: 2000 xg:
 Proben 5 - 8: 1 min
 Proben 9 - 12; 17; 37: 2 min
 Proben 13 - 16: 3 min
 Proben 25 - 28: 5 min
 Proben 29 - 32: 7 min
 Proben 33 - 36: 10 min

450 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf
 1600 µl Ethanol 98% / -17°C

20 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,
 Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
 Küchenrolle (> 15 min)

Pellet resuspendiert und in Verdauplatte
 überführt:

Proben mit ungeraden Nummern:
 100 µl Tris/HCl pH 7,4; 0,1M

Proben mit geraden Nummern:
 100 µl Homogenisierungspuffer (Prionics),
 Zugabe von 10µl Digestion Buffer (Prionics)

+ 5 µl PK (Prionics-Kit)

45 min 40°C

+ 10 µl PK-Stopp (Prionics-Kit)

+ 20 µl Sample Buffer 5x

15 min 95°C

SDS-Gel (NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot)
 10 µl in (Marker SeeBlue Plus2: 7 µl)

Elektrophorese
 45 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:
 30 sek. in Methanol
 2x 30 sek. In Wasser
 20 min in Transferpuffer

Blot:
 70 min 30 V, Transferpuffer
 (+ 25 µl Antioxidant / 250ml Puffer)

Membran
 30 sek. Methanol
 30 sek. Wasser
 30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 12h, 4°C no shake
 1x 1 min, 4x 10 min TBST fast shake
 80 min AK II; 1:5000; RTemp. Slow shake
 1x 1 min, 3x 10 min TBST, fast shake
 10 min Lumineszenz Puffer, fast shake
 5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
 Lumineszenz Puffer

<u>Filmbelichtung I</u>	<u>Filmbelichtung II</u>
5 min. Expositur	40 min. Expositur
1,5 min. Entwicklung	10 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung	3 min. Fixierung

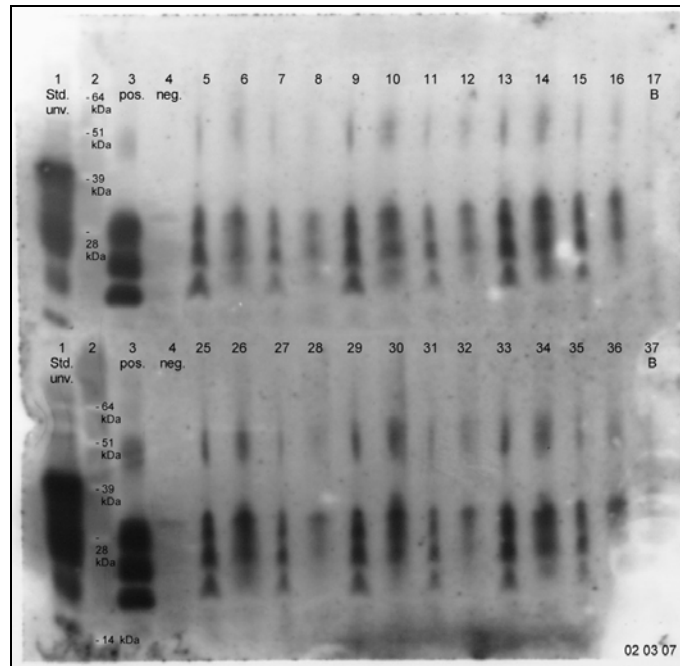


Abbildung 5: 020307

Proben 5-8:	1 min	ungerade Probennummern: Verdaupuffer Tris/HCl
Proben 9-12, 17, 37:	2 min	gerade Probennummern: Verdaupuffer Prionics
Proben 13-16:	3 min	
Proben 25-28:	5 min	
Proben 29-32:	7 min	
Proben 33-36:	10 min	

Versuche:

- Zentrifugationsdauer nach der Lauroylsarcosinbehandlung (1 - 10 min)
- Vergleich Verdaupufferkombination Prionics-Check versus 0,1M Tris/HCl pH 7,4

Conclusio:

- 3 - 5 min. Zentrifugation führt zu den stärksten Signalen.

Prionics Verdaupufferkombination (Homogenisierungspuffer, HB + Verdaupuffer, DB) führt zu breiteren Banden geringerer Intensität (die bei kürzerer Belichtung am Röntgenfilm fast verschwinden können) → der Einsatz von HB + DB führt daher nicht zu einer verbesserten Auflösung bzw. besseren Detektionsgrenze

Versuche:

- Verdünnungsreihe 300 - 2500 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich temperaturbehandelter und „nativer“ Faulschlamm
- Vergleich Aufkonzentrierung von PrP^{SC} durch Ethanolfällung und direkter Nachweis aus Faulschlamm bzw. Wasser.
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail während der Laurylsarcosinexposition.

Conclusio:

- Im Bereich von 300 - 2500 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$ kann PrP^{SC} aus Wasser bzw. Faulschlamm nur nach der Aufkonzentrierung mittels Ethanolfällung nachgewiesen werden (Proben 5 - 28 und 45 - 52)
- In Wasser kann PrP^{SC} ab 1250 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$; in sterilem Faulschlamm ab 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$; in „nativem“ Faulschlamm ab 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$ (ohne Inhibitor) nachgewiesen werden.
- Zugabe von Proteaseinhibitor-Cocktail führt zu keinem Nachweis von PrP^{SC} .

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883 in 4 ml
Wasser

HH SC+ /0,32

32 μl HH SC+ /1,0 + 968 μl Wasser

HH SC+ /0,63

63 μl HH SC+ /1,0 + 937 μl Wasser

HH SC+ /1,25

125 μl HH SC+ /1,0 + 875 μl Wasser

HH SC+ /2,50

250 μl HH SC+ /1,0 + 750 μl Wasser

Inhibitormix:

Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma)
Phiole in 1000 μl Wasser gelöst

AD-M (steril)

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrrchen
(gemischt meso und thermophil 21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

AD-M nat (nicht temperaturbehandelt)

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrrchen
(thermophil 21.01.2002)

PK

Prionics-Kit

PK-Stopp

Prionics-Kit

			HH	HH conc [%]	% HH in Ges.	Inhibitormi x	µl L.Sarco 10%	
Gel 1	1	Std Prionics						
	2	Molekularmarker						
	3	SC +	500 µl Wasser	56			30	
	4	SC -	500 µl Wasser	56			30	
	5 / 6	VWE	500 µl Wasser	56	0,32	0,0322	30	
	7 / 8	VWE	500 µl Wasser	56	0,63	0,0635	30	
	9 / 10	VWE	500 µl Wasser	56	1,25	0,1259	30	
	11 / 12	VWE	500 µl Wasser	56	2,50	0,2518	30	
	13 / 14	VW Z	150 µl Wasser	17	0,32	0,0326	9	
	15 / 16	VW Z	150 µl Wasser	17	0,63	0,0641	9	
	17	VWE neg.	500 µl Wasser	56	2,50	0,2518	30	
	Gel 2	25 / 26	VW Z	150 µl Wasser	17	1,25	0,1272	9
		27 / 28	VW Z	150 µl Wasser	17	2,50	0,2545	9
		29 / 30	VBE	500 µl ADMs	56	0,32	0,0322	30
		31 / 32	VBE	500 µl ADMs	56	0,63	0,0635	30
		33 / 34	VBE	500 µl ADMs	56	1,25	0,1259	30
		35 / 36	VBE	500 µl ADMs	56	2,50	0,2518	30
37		VBE neg.	500 µl ADMs	56	2,50	0,2518	30	
Gel 3		45 / 46	VBZ	150 µl ADMs	17	0,32	0,0326	9
	47 / 48	VBZ	150 µl ADMs	17	0,63	0,0641	9	
	49 / 50	VBZ	150 µl ADMs	17	1,25	0,1272	9	
	51 / 52	VBZ	150 µl ADMs	17	2,50	0,2545	9	
	53 / 54	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	0,32	0,0322	30	
	55 / 56	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	0,63	0,0635	30	
	57	VBZ neg.	150 µl ADMnat	17	2,50	0,2545		
	Gel 4	65 / 66	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	1,25	0,1259	30
67 / 68		VBE nat.	500 µl ADMnat	56	2,50	0,2518	30	
69 / 70		VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	0,32	0,0317	10 30	
71 / 72		VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	0,63	0,0623	10 30	
73 / 74		VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	1,25	0,1237	10 30	
75 / 76		VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	2,50	0,2473	10 30	
77		VBE nat neg	501 µl ADMnat	56	2,50	0,2469	10 30	

VWE..... Verd. Reihe in Wasser mit Ethanolprecipitation

VWZ..... Verd. Reihe in Wasser, Zentrifugation nach der Denaturierung

VBE..... Verd. Reihe in sterilem Faulschlamm mit Ethanolprecipitation

VBZ..... Verd. Reihe in sterilem Faulschlamm, Zentrifugation nach der Denaturierung

VBE nat..... Verd. Reihe in unsterilisiertem Faulschlamm mit Ethanolprecipitation

VBE nat Inh. Verd. Reihe in unsterilisiertem Faulschlamm (+ Proteaseinhibitoren) mit Ethanolprecipitation

Verdünnungsreihen mit Ethanolprecipitation:
(Proben 5 - 12; 29 -37; 53 - 77)

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
Proben 3 - 12: 500 µl Wasser
Proben 29 - 37: 500 µl Faulschlamm steril
Proben 53 - 68: 500 µl Faulschlamm nativ
Proben 69 - 77:
500 µl Faulschlamm nativ
10 µl Inhibitormix

10 min RT
+ L. Sarcosin
vortexen, 10 min RT
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
450 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf
1600 µl Ethanol 98% / -17°C
35 min in Kühlakku 0°C
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 15 min)
Pellet in 0,1M Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert
und in Verdauplatte überführt:
+ PK (Prionics-Kit)
35 min / 40°C
+ PK-Stopp (Prionics-Kit)
+ 20 µl Sample Buffer 5x
10 min 95°C

Verdünnungsreihen mit Zentrifugation nach der
Denaturierung (Proben 13 - 28 u. 45 - 52)

Verdauplatte (250 µl / Well)
17 µl Hirnhomogenat
Proben 13 - 28: 150 µl Wasser
Proben 45 - 52: 150 µl Faulschlamm steril

10 min RT
+ 9 µl L. Sarcosin
Mischen mit der Pipette
10 min RT
+ 10 µl PK (Prionics-Kit)
35 min / 40°C
+ 20 µl PK-Stopp (Prionics-Kit)
+ 30 µl Sample Buffer 5x
10 min / 95°C
160 µl in 1,8 ml Eppendorf überführen
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

SDS-Gel (NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot)
10 µl Probe (Marker SeeBluePlus2: 7 µl)

Elektrophorese

40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

65 min 140 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 50 000 16h, 4°C no shake

1x 1 min, 4x 10 min TBST fast shake

80 min AK II; 1: 25000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 10 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

10 min. Expositur

4 min. Entwicklung

3 min. Fixierung

Filmbelichtung II

60 min. Expositur

10 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

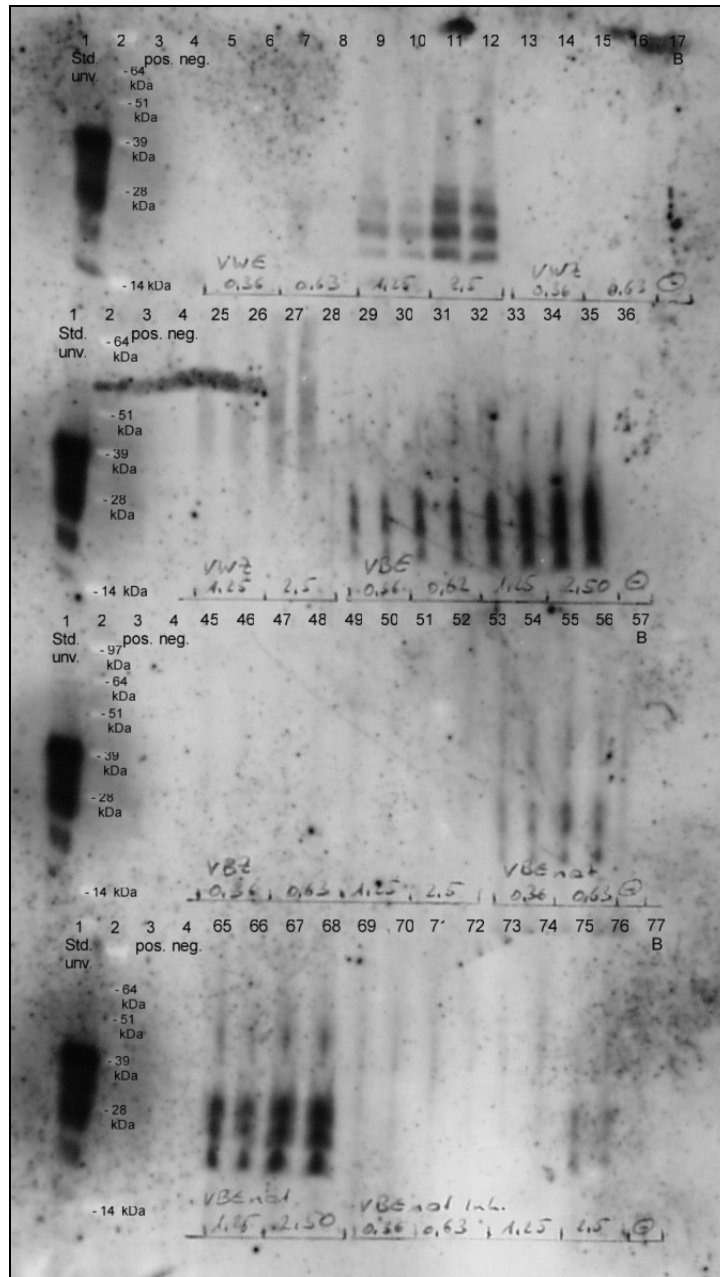


Abbildung 6: 02 03 11

Versuche:

- Verdünnungsreihe 300 - 2500 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich temperaturbehandelter und „nativer“ Faulschlamm
- Vergleich Aufkonzentrierung von PrP^{SC} durch Ethanol fällung und direkter Nachweis aus Faulschlamm bzw. Wasser.
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail während der Laurylsarcosinexposition.

Conclusio:

- Im Bereich von 300 - 2500 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$ kann PrP^{SC} aus Wasser bzw. Faulschlamm nur nach der Aufkonzentrierung mittels Ethanol fällung nachgewiesen werden (Proben 5 - 28 und 45 - 52)
 - In Wasser kann PrP^{SC} ab 1250 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$; in sterilem Faulschlamm ab 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$; in „nativem“ Faulschlamm ab 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}$ (ohne Inhibitor) nachgewiesen werden.
- Zugabe von Proteaseinhibitor-Cocktail führt zu keinem Nachweis von PrP^{SC} .

Versuche:

- Verdünnungsreihe 150 - 1270 ng_{HH}/ml_{FS}
- Vergleich temperaturbehandelter und „nativer“ Faulschlamm
- Einfluß der Zentrifugation nach der Denaturierung
- Vergleich Aufkonzentrierung von PrP^{SC} durch Ethanolfällung und direkter Nachweis aus Faulschlamm bzw. Wasser.
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail während der Laurylsarcosinexposition.

Conclusio:

- Im Bereich von 150 - 1270 ng_{HH}/ml kann PrP^{SC} aus Wasser bzw. Faulschlamm nur nach der Aufkonzentrierung mittels Ethanolfällung nachgewiesen werden (Proben 5 - 28 und 45 - 52)
- In Wasser kann PrP^{SC} ab 600 ng_{HH}/ml; in sterilem Faulschlamm ab 150 ng_{HH}/ml; in „nativem“ Faulschlamm ab 600 ng_{HH}/ml (mit und ohne Inhibitor) nachgewiesen werden.
- Proteaseinhibitor-Cocktail führt zu breiteren und besser aufgetrennten Banden.
- Eine Zentrifugation nach der Denaturierung führt zu keiner besseren Auftrennung im Gel.

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 400 mg Nr. 5883 in 4 ml
Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,32

32 µl HH SC+ /1,0 + 968 µl Wasser

HH SC+ /0,63

63 µl HH SC+ /1,0 + 937 µl Wasser

HH SC+ /1,25

125 µl HH SC+ /1,0 + 875 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

Inhibitormix:

Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma)
Phiole in 1000µl Wasser gelöst

AD-M (steril)

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrrchen
(gemischt meso und thermophil 21.01.2002)
Sterilisiert: 20 min 121°C

AD-M nat (nicht temperaturbehandelt)

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrrchen
(thermophil 21.01.2002)

PK

Prionics-Kit

PK-Stopp

Prionics-Kit

				HH [µl]	HH conc. [%]	% HH in Ges.	Inhibitor- mix [µl]	10% Sarc. [µl]	Vol b. Ver-dau [µl]	PK [µl]	PK verd.	% PK	PK Stopp [µl]	Zentrifug. v. d. Gel
	1	Std Prionics												
	2	Molekularmarker												
	3	SC +	500 µl Wasser	56				30	100	5	4	0,013	5	
	4	SC -	500 µl Wasser	56				30	100	5	4	0,013	5	
1	5 / 6	VWE	500 µl Wasser	56	0,15	0,0151		30	100	5	4	0,013	5	
	7 / 8	VWE	500 µl Wasser	56	0,32	0,0322		30	100	5	4	0,013	5	
	9 / 10	VWE	500 µl Wasser	56	0,62	0,0624		30	100	5	4	0,013	5	
	11 / 12	VWE	500 µl Wasser	56	1,25	0,1259		30	100	5	4	0,013	5	
	13 / 14	VW Z	150 µl Tris/HCl 7,4	17	0,15	0,0153		9	186	10	4	0,013	10	
	15 / 16	VW Z	150 µl Tris/HCl 7,4	17	0,32	0,0326		9	186	10	4	0,013	10	
	17	VWE neg.	500 µl Wasser	56	2,50	0,2518		30	186	10	4	0,013	5	
2	25 / 26	VW Z	150 µl Tris/HCl 7,4	17	0,62	0,0631		9	186	10	4	0,013	10	
	27 / 28	VW Z	150 µl Tris/HCl 7,4	17	1,25	0,1272		9	186	10	4	0,013	10	
	29 / 30	VBE	500 µl ADMs	56	0,15	0,0151		30	100	5	1	0,050	5	
	31 / 32	VBE	500 µl ADMs	56	0,32	0,0322		30	100	5	1	0,050	5	32
	33 / 34	VBE	500 µl ADMs	56	0,62	0,0624		30	100	5	1	0,050	5	34
	35 / 36	VBE	500 µl ADMs	56	1,25	0,1259		30	100	5	1	0,050	5	36
	37	VBE neg.	500 µl ADMs	56	2,50	0,2518		30	100	5	1	0,050	5	

VWE..... Verd. Reihe in Wasser mit Ethanolprecipitation

VWZ..... Verd. Reihe in Wasser, Zentrifugation nach der Denaturierung

VBE..... Verd. Reihe in sterilem Faulschlamm mit Ethanolprecipitation

				HH [µl]	HH conc. [%]	% HH in Ges.	Inhibitor- mix [µl]	10% Sarc. [µl]	Vol b. Ver-dau [µl]	PK [µl]	PK verd.	% PK	PK Stopp [µl]	Zentrifug. v. d. Gel
3	45 / 46	VBZ	150 µl ADMs	17	0,15	0,0153		9	186	10	1	0,054	10	
	47 / 48	VBZ	150 µl ADMs	17	0,32	0,0326		9	186	10	1	0,054	10	
	49 / 50	VBZ	150 µl ADMs	17	0,62	0,0631		9	186	10	1	0,054	10	
	51 / 52	VBZ	150 µl ADMs	17	1,25	0,1272		9	186	10	1	0,054	10	
	53 / 54	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	0,15	0,0151		30	100	5	1	0,050	5	54
	55 / 56	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	0,32	0,0322		30	100	5	1	0,050	5	56
	57	<i>VBZ neg.</i>	<i>150 µl ADMnat</i>	17	2,50	0,2545			186	5	1	0,027	5	
4	65 / 66	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	0,62	0,0624		30	100	5	1	0,050	5	66
	67 / 68	VBE nat.	500 µl ADMnat	56	1,25	0,1259		30	100	5	1	0,050	5	68
	69 / 70	VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	1,25	0,1215	20	30	100	5	1	0,050	5	70
	71 / 72	VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	0,62	0,0603	20	30	100	5	1	0,050	5	72
	73 / 74	VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	0,32	0,0311	20	30	100	5	1	0,050	5	74
	75 / 76	VBE nat. Inh.	500 µl ADMnat	56	0,15	0,0146	20	30	100	5	1	0,050	5	76
	77	<i>VBE nat neg</i>	<i>501 µl ADMnat</i>	56	2,50	0,2426	20	30	100	5	1	0,050	5	

VBZ.....Verd. Reihe in sterilem Faulschlamm, Zentrifugation nach der Denaturierung

VBE nat.....Verd. Reihe in unsterilisiertem Faulschlamm mit Ethanolprecipitation

VBE nat Inh.....Verd. Reihe in unsterilisiertem Faulschlamm (+ Proteaseinhibitoren) mit
Ethanolprecipitation

Verdünnungsreihen mit Ethanolprecipitation:

(Proben 5 - 12; 29 -37; 53 - 77)

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

56 µl Hirnhomogenat

Proben 5 - 12: 500 µl Wasser

Proben 29 - 37: 500 µl Faulschlamm steril

Proben 53 - 68: 500 µl Faulschlamm nativ

Proben 69 - 77:

500 µl Faulschlamm nativ

20 µl Inhibitormix

10 min RT

+ L. Sarcosin

Schütteln, 10 min RT

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

450 µl Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf

1600 µl Ethanol 98% / -17°C

20 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (> 15 min)

Pellet in 0,1M Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert

und in Verdauplatte überführt:

+ PK (Prionics-Kit)

35 min / 40°C

PK-Stopp (Prionics-Kit)

+ 20 µl Sample Buffer 5x

10 min 95°C

Proben 32, 34, 36, 54, 56,

66, 68, 70, 72, 74 u. 76:

Überführung in 1,8 ml Eppendorf

Zentrifugation 4 min / 2000 x g

Verdünnungsreihen mit Zentrifugation nach der Denaturierung (Proben 13 - 28 u. 45 - 52)

Verdauplatte (250 µl / Well)

17 µl Hirnhomogenat

Proben 13 - 28: 150 µl Tris/HCl pH 7,4

Proben 45 - 52: 150 µl Faulschlamm steril

10 min RT

+ 9 µl L. Sarcosin

Mischen mit der Pipette

10 min RT

+ PK (Prionics-Kit)

35 min / 40°C

+ PK-Stopp (Prionics-Kit)

+ 30 µl Sample Buffer 5x

10 min / 95°C

160 µl in 1,8 ml Eppendorf überführen

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

SDS-Gel (NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot)

10 µl Probe (Marker SeeBluePlus2: 7 µl)

Elektrophorese

40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

65 min 140 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 50 000 16h, 4°C no shake

1x 1 min, 4x 10 min TBST fast shake

80 min AK II; 1: 25000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 10 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit

Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

10 min. Expositur

4 min. Entwicklung

3 min. Fixierung

Filmbelichtung II

60 min. Expositur

10 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

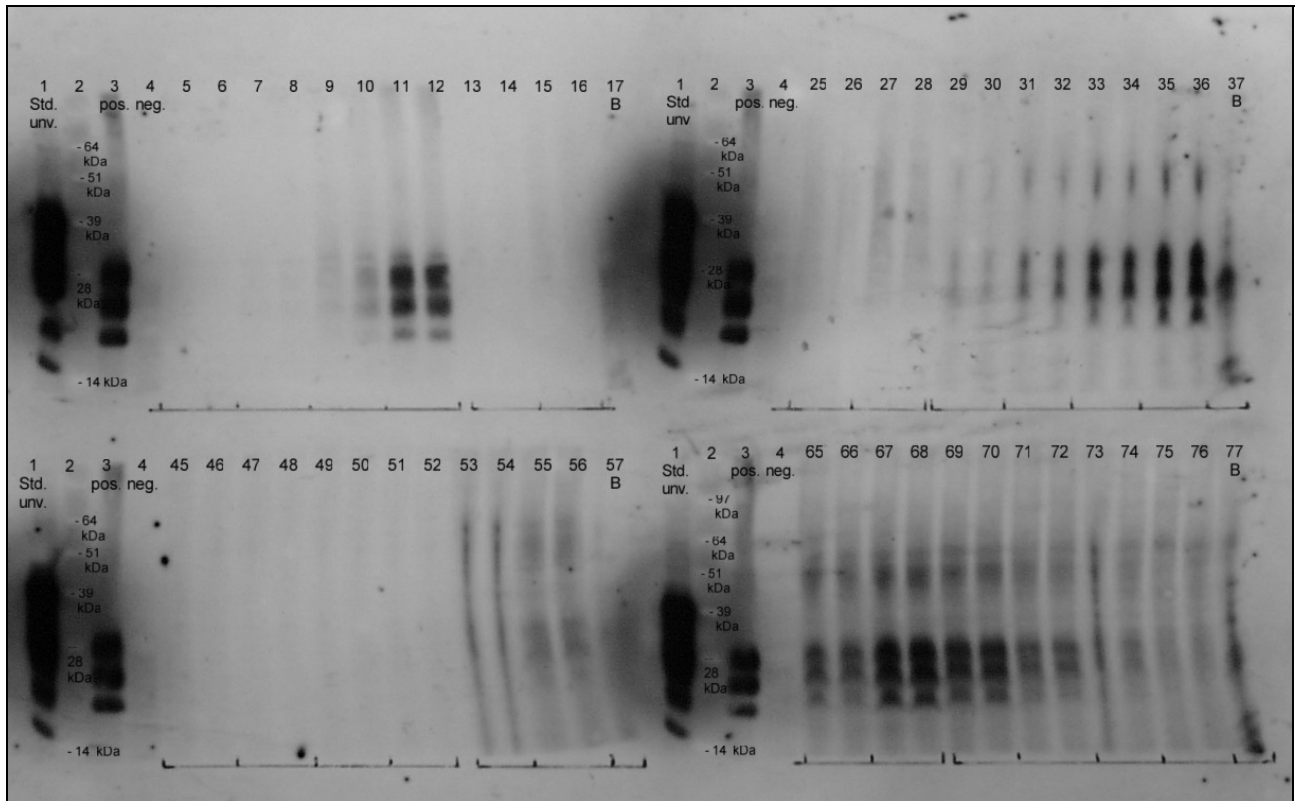


Abbildung 7: 02 03 13

Versuche:

- Verdünnungsreihe 150 - 1270 ng_{HH}/ml_{FS}
- Vergleich temperaturbehandelter und „nativer“ Faulschlamm
- Einfluß der Zentrifugation nach der Denaturierung
- Vergleich Aufkonzentrierung von PrP^{SC} durch Ethanol-fällung und direkter Nachweis aus Faulschlamm bzw. Wasser.
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail während der Laurylsarcosinexposition.

Conclusio:

- Im Bereich von 150 - 1270 ng_{HH}/ml kann PrP^{SC} aus Wasser bzw. Faulschlamm nur nach der Aufkonzentrierung mittels Ethanol-fällung nachgewiesen werden (Proben 5 - 28 und 45 - 52)
- In Wasser kann PrP^{SC} ab 600 ng_{HH}/ml; in sterilem Faulschlamm ab 150 ng_{HH}/ml; in „nativem“ Faulschlamm ab 600 ng_{HH}/ml (mit und ohne Inhibitor) nachgewiesen werden.
- Proteaseinhibitor-Cocktail führt zu breiteren und besser aufgetrennten Banden.
- Eine Zentrifugation nach der Denaturierung führt zu keiner besseren Auftrennung im Gel.

Versuche:

- *Einfluß von BSA zur besseren Präcipitation*
- *Vergleich mesophiler und thermophiler Schlamm bzw. Wasser*

Conclusio:

- *schlecht verdautes BSA führt zu starken Schmierbanden und schlechterer Detektion von PrP^{SC}*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535 in 4400 µl
Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /1,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

nicht temperaturbehandelt
mesophil , thermophil 21.01.2002

L.Sarco (10%)

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

BSA (10%)

100 mg BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1000 µl Wasser

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl
in 0,1 M Tris/HCl mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

20 µl PK-Stock ad 690 µl;
(Endconc. in Probe: 50µgPK/ml)

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4
+ 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl L.Sarco auf 10 ml Tris/HCl)

				HH	HH conc. [%]	% HH in Ges.	% BSA ges.	µl 5% BSA	µl L.Sarco 10%	conc Sarco
1	Std Prionics							917,442		
2	Molekularmarker									
3	SC +	500	µl Wasser	56					30	
4	SC -	500	µl Wasser	56					30	
5 / 6	VDm-BSA 01	500	µl AD-M meso	56	0,15	0,0151	0,10	11,72	30	0,50
7 / 8	VDm-BSA 01	500	µl AD-M meso	56	0,32	0,0322	0,10	11,72	30	0,50
9 / 10	VDm-BSA 01	500	µl AD-M meso	56	0,62	0,0624	0,10	11,72	30	0,50
11 / 12	VDm-BSA 1	500	µl AD-M meso	56	0,15	0,0151	1,00	118,20	35	0,49
13 / 14	VDm-BSA 1	500	µl AD-M meso	56	0,32	0,0322	1,00	118,20	35	0,49
15 / 16	VDm-BSA 1	500	µl AD-M meso	56	0,62	0,0624	1,00	118,20	35	0,49
17	neg	500	µl AD-M meso	56	2,50	0,2518	0,01	1,17	30	0,51
								0,00		
25 / 26	VDt-BSA 01	500	µl AD-M thermo	56	0,15	0,0151	0,10	11,72	30	0,50
27 / 28	VDt-BSA 01	500	µl AD-M thermo	56	0,32	0,0322	0,10	11,72	30	0,50
29 / 30	VDt-BSA 01	500	µl AD-M thermo	56	0,62	0,0624	0,10	11,72	30	0,50
31 / 32	VDt-BSA 1	500	µl AD-M thermo	56	0,15	0,0151	1,00	118,20	35	0,49
33 / 34	VDt-BSA 1	500	µl AD-M thermo	56	0,32	0,0322	1,00	118,20	35	0,49
35 / 36	VDt-BSA 1	500	µl AD-M thermo	56	0,62	0,0624	1,00	118,20	35	0,49
37	neg	500	µl AD-M thermo	56	2,50	0,2518	0,10	11,72	30	0,50
45 / 46	W-BSA 01	500	Wasser	56	0,15	0,0151	0,10	11,72	30	0,50
47 / 48	W-BSA 01	500	Wasser	56	0,32	0,0322	0,10	11,72	30	0,50
49 / 50	W-BSA 01	500	Wasser	56	0,62	0,0624	0,10	11,72	30	0,50
51 / 52	W-BSA 1	500	Wasser	56	0,15	0,0151	1,00	118,20	35	0,49
53 / 54	W-BSA 1	500	Wasser	56	0,32	0,0322	1,00	118,20	35	0,49
55 / 56	W-BSA 1	500	Wasser	56	0,62	0,0624	1,00	118,20	35	0,49
57	neg	500	Wasser	56	2,50	0,2518	1,00	118,00	35	0,49

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
 56 µl Hirnhomogenat
 500 µl AD-M oder Wasser
 15 min RT
 + L. Sarcosin (10%)
 +BSA (10%)
 15 min / RT

 Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
 neues 2,0 ml Eppendorf
 gesamter Überstand mit Pipette überführt
 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
 40 min in Kühlakku 0°C
 Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
 Überstand weggeleert,
 Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
 Küchenrolle (> 15 min)
 Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert
 und in Verdauplatte überführt
 + 10 µl PK (Stepper)

 40 min 40°C
 + PMSF
 + 20 µl Sample Buffer 5x
 10 min 95°C
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
 10 µl Probe

Elektrophorese

40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

30 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 14h, 4°C no shake

1x 1 min, 3x 5 min TBST fast shake

60 min AK II; 1: 5000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 5 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

36 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

2 min. Fixierung

Filmbelichtung II

20 min. Expositur

120 sek. Entwicklung

2 min. Fixierung

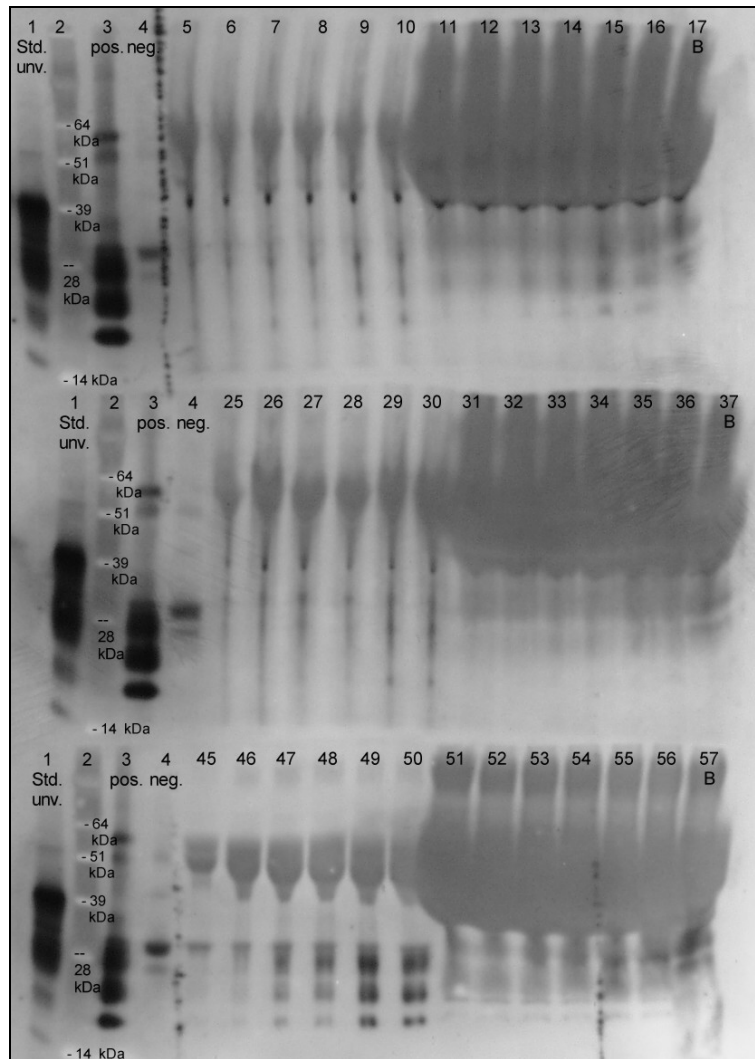


Abbildung 8: 02 03 18

Versuche:

- *Einfluß von BSA zur besseren Präcipitation*
- *Vergleich mesophiler und thermophiler Schlamm bzw. Wasser*

Conclusio:

- *schlecht verdautes BSA führt zu starken Schmierbanden und schlechterer Detektion von PrP^{SC}*

Versuche:

- *Einfluß von BSA zur besseren Präzipitation*
- *Vergleich mesophiler und thermophiler Schlamm bzw. Wasser*

Conclusio:

- *1% BSA verbessert die Detektion von PrP^{SC} ganz beträchtlich*
- *in thermophilem Schlamm ist PrP^{SC} nicht nachweisbar*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535 in 4400 µl
Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /1,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

nicht temperaturbehandelt
mesophil , thermophil 21.01.2002

L.Sarco (10%)

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

BSA (10%)

100 mg BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1000 µl Wasser

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl
in 0,1 M Tris/HCl mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

20 µl PK-Stock ad 690 µl;
(Endconc. in Probe: 50µgPK/ml)

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4
+ 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl L.Sarco auf 10 ml Tris/HCl)

	AD-M			Hirnhomogenat			BSA (10 %)				Sarcosin 10%	
		[µl]			[%]	in Probe [%]	soll [%]	soll [µl]	ist [µl]	[%]	[µl]	[%]
1	Std Prionics											
2	Molekularmarker											
3	SC +	500	µl Wasser	56	2,50	0,2518	-				30	0,51
4	SC -	500	µl Wasser	56	2,50	0,2518	-				30	0,51
5 / 6	VBm-BSA 0,1	500	µl AD-M meso	56	0,15	0,0151	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
7 / 8	VBm-BSA 0,1	500	µl AD-M meso	56	0,30	0,0302	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
9 / 10	VBm-BSA 0,1	500	µl AD-M meso	56	0,60	0,0604	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
11 / 12	VBm-BSA 1,0	500	µl AD-M meso	56	0,15	0,0151	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
13 / 14	VBm-BSA 1,0	500	µl AD-M meso	56	0,30	0,0302	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
15 / 16	VBm-BSA 1,0	500	µl AD-M meso	56	0,60	0,0604	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
17	neg Bm BSA 1,0	500	µl AD-M meso	56	2,50	0,2518	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
25 / 26	VBt-BSA 0,1	500	µl AD-M thermo	56	0,15	0,0151	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
27 / 28	VBt-BSA 0,1	500	µl AD-M thermo	56	0,30	0,0302	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
29 / 30	VBt-BSA 0,1	500	µl AD-M thermo	56	0,60	0,0604	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
31 / 32	VBt-BSA 1,0	500	µl AD-M thermo	56	0,15	0,0151	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
33 / 34	VBt-BSA 1,0	500	µl AD-M thermo	56	0,30	0,0302	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
35 / 36	VBt-BSA 1,0	500	µl AD-M thermo	56	0,60	0,0604	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
37	neg Bt BSA 1,0	500	µl AD-M thermo	56	2,50	0,2518	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
45 / 46	VW-BSA 0,1	500	µl Wasser	56	0,15	0,0151	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
47 / 48	VW-BSA 0,1	500	µl Wasser	56	0,30	0,0302	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
49 / 50	VW-BSA 0,1	500	µl Wasser	56	0,60	0,0604	0,10	5,86	6,00	0,10	30	0,50
51 / 52	VW-BSA 1,0	500	µl Wasser	56	0,15	0,0151	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
53 / 54	VW-BSA 1,0	500	µl Wasser	56	0,30	0,0302	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
55 / 56	VW-BSA 1,0	500	µl Wasser	56	0,60	0,0604	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43
57	neg W BSA 1,0	500	µl Wasser	56	2,50	0,2518	1,00	58,60	60,00	0,93	30	0,43

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
 56 µl Hirnhomogenat
 500 µl AD-M oder Wasser
 15 min RT
 + L. Sarcosin (10%)
 +BSA (10%)
 15 min / RT

 Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
 neues 2,0 ml Eppendorf
 gesamter Überstand mit Pipette überführt
 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
 40 min in Kühlakku 0°C
 Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
 Überstand weggeleert,
 Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
 Küchenrolle (> 15 min)
 Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert
 und in Verdauplatte überführt
 + 10 µl PK (Stepper)

 40 min 40°C
 + PMSF
 + 20 µl Sample Buffer 5x
 10 min 95°C
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
 10 µl Probe

Elektrophorese

40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

30 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 14h, 4°C no shake

1x 1 min, 3x 5 min TBST fast shake

60 min AK II; 1: 5000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 3x 5 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

Filmbelichtung II

22 min. Expositur

40 min. Expositur

120 sek. Entwicklung

20 sek. Entwicklung

2 min. Fixierung

2 min. Fixierung

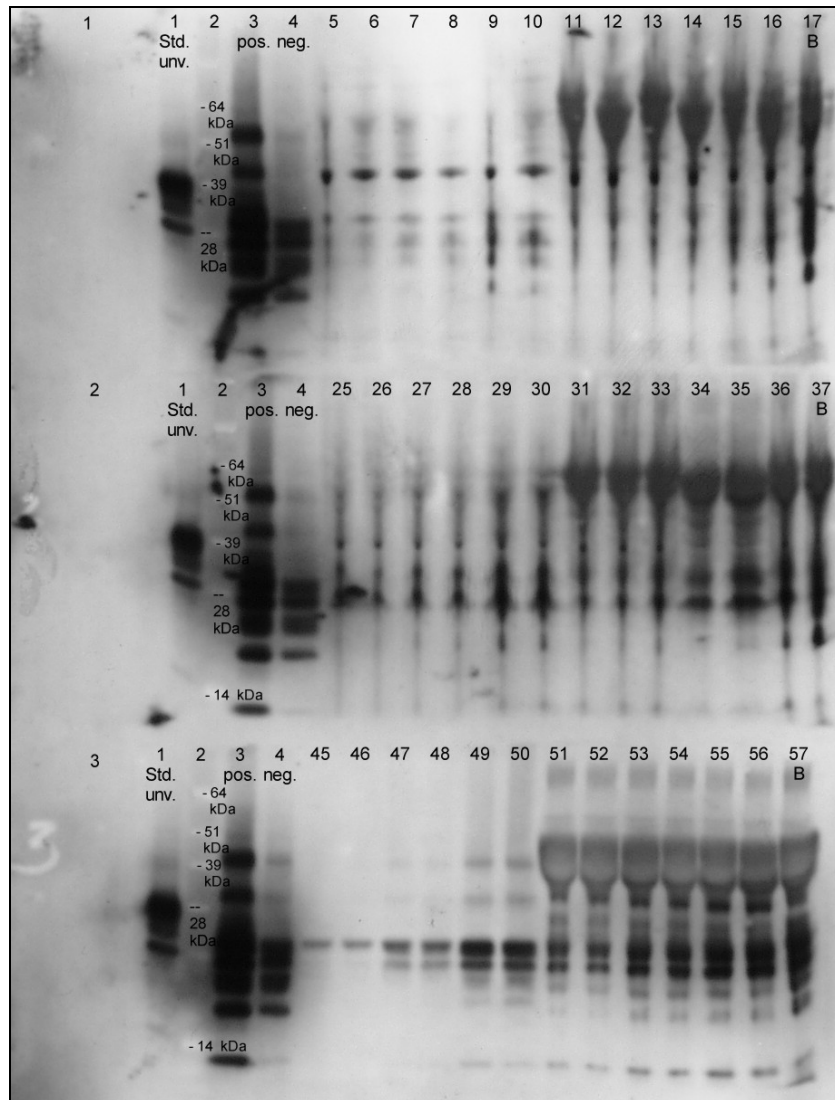


Abbildung 9:

Versuche:

- *Einfluß von BSA zur besseren Präzipitation*
- *Vergleich mesophiler (Gel 1) und thermophiler Schlamm (Gel 2) bzw. Wasser (Gel 3)*

Conclusio:

- *1% BSA verbessert die Detektion von PrP^{Sc} ganz beträchtlich*
- *in thermophilem Schlamm ist PrP^{Sc} nicht nachweisbar*

Versuche:

- *Einfluß von höherer Lauroylsarcosinkonz. (0,5%, 1,0% und 2,0%)*
- *Einfluß von SDS (0,1% und 0,2%)*
- *Einfluß von Guanidiniumthiocyanat (0,1% und 0,2%)*
- *Einfluß der Temperatur bei der Lauroylsarcosinbehandlung (23°C [RT] und 37°C)*
- *30 min. L.Sarcosin; 4x Vortexen*
- *Nachweis von PrP^{SC} in den Schlamp pellets*
- *Verdünnungsreihe 150 - 600 µg_{HH}/ml_{FS}*

Conclusio:

- *in den Schlamp pellets kann noch PrP^{SC} nachgewiesen werden (Proben 85 - 92, 105 - 112)*
- *Schlamp pellets mit Negativhirnmaterial konnten als negativ identifiziert werden (Proben 94 - 97)*
- *höhere L.Sarcosinkonz. bzw. erhöhte Temperatur führt zu keinen Unterschieden in der Detektion von PrP^{SC} (Proben 5 - 17, 65 - 77)*
- *SDS-Zugabe verbessert den Nachweis nicht (Proben 25 - 37)*
- *0,2% GuSCN führt zu breiten und besser aufgetrennten Banden (Proben 51 - 56)*

HH SC - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535 in 4400 µl
Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /1,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

nicht temperaturbehandelt
mesophil 21.01.2002

L.Sarco (10%)

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

SDS (10%)

1,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat; Sigma)
in 10 ml Wasser

GuSCN (10%)

1,0 g Guanidiniumthiocyanat (Sigma)
in 10 ml Wasser

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl
in 0,1 M Tris/HCl mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

20 µl PK-Stock ad 690 µl;
(Endconc. in Probe: 50µgPK/ml)

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4
+ 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl L..Sarco auf 10 ml Tris/HCl)

			Ges.Vol	AD-M	Hirnhomogenat			LS soll	LS 10%	LS ist	SDS soll	SDS 1%	SDS ist	GuSCN soll	GuSCN 1%	GuSCN ist
			[µl]	[µl]	[µl]	[%]	ng/ml	[%]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[%]
	1	Std Prionics														
	2	Mokekularmarker														
	3	SC +														
	4	SC -														
1	5 / 6	LS 1,00%	618	500	56	0,15	151,1	1,00	62	1,00	3					
	7 / 8	LS 1,00%	618	500	56	0,30	302,2	1,00	62	1,00	3					
	9 / 10	LS 1,00%	618	500	56	0,60	604,3	1,00	62	1,00	3					
	11 / 12	LS 2,00%	695	500	56	0,15	151,1	2,00	139	2,00						
	13 / 14	LS 2,00%	695	500	56	0,30	302,2	2,00	139	2,00						
	15 / 16	LS 2,00%	695	500	56	0,60	604,3	2,00	139	2,00						
	17	neg. LS 2,0%	695	500	56	2,50	2518,0	2,00	139	2,00						
2	25 / 26	LS 0,50% SDS 0,10%	655	500	56	0,15	151,1	0,50	33	0,50	4	0,10	66	0,10	66	0,10
	27 / 28	LS 0,50% SDS 0,10%	655	500	56	0,30	302,2	0,50	33	0,50	4	0,10	66	0,10	66	0,10
	29 / 30	LS 0,50% SDS 0,10%	655	500	56	0,60	604,3	0,50	33	0,50	4	0,10	66	0,10	66	0,10
	31 / 32	LS 0,50% SDS 0,20%	744	500	56	0,15	151,1	0,50	38	0,50	4	0,20	150	0,20	150	0,20
	33 / 34	LS 0,50% SDS 0,20%	744	500	56	0,30	302,2	0,50	38	0,50	4	0,20	150	0,20	150	0,20
	35 / 36	LS 0,50% SDS 0,20%	744	500	56	0,60	604,3	0,50	38	0,50	4	0,20	150	0,20	150	0,20
	37	neg. LS 0,50% SDS 0,20%	744	500	56	2,50	2518,0	0,50	38	0,50	4	0,20	150	0,20	150	0,20
3	45 / 46	LS 0,50% GuSCN 0,10%	655	500	56	0,15	151,1	0,50	33	0,50	4		0,10	66	0,10	66
	47 / 48	LS 0,50% GuSCN 0,10%	655	500	56	0,30	302,2	0,50	33	0,50	4		0,10	66	0,10	66
	49 / 50	LS 0,50% GuSCN 0,10%	655	500	56	0,60	604,3	0,50	33	0,50	4		0,10	66	0,10	66
	51 / 52	LS 0,50% GuSCN 0,20%	744	500	56	0,15	151,1	0,50	38	0,50	4		0,20	150	0,20	150
	53 / 54	LS 0,50% GuSCN 0,20%	744	500	56	0,30	302,2	0,50	38	0,50	4		0,20	150	0,20	150
	55 / 56	LS 0,50% GuSCN 0,20%	744	500	56	0,60	604,3	0,50	38	0,50	4		0,20	150	0,20	150
	57	neg. LS 0,50% GuSCN 0,20%	744	500	56	2,50	2518,0	0,50	38	0,50	4		0,20	150	0,20	150

			Ges.Vol	AD-M	Hirnhomogenat			LS soll	LS 10%	LS ist	SDS soll	SDS 1%	SDS ist	GuSCN	GuSCN	GuSCN ist
			[μ l]	[μ l]	[μ l]	[%]	ng/ml	[%]	[μ l]	[%]	[μ l]	[%]	[%]	[μ l]	[%]	[%]
4	65 / 66	LS 0,50% 37°C	586	500	56	0,15	151,1	0,50	30	0,512						
	67 / 68	LS 0,50% 37°C	586	500	56	0,30	302,2	0,50	30	0,512						
	69 / 70	LS 0,50% 37°C	586	500	56	0,60	604,3	0,50	30	0,512						
	71 / 72	LS 1,00% 37°C	622	500	56	0,15	151,1	1,00	66	1,061						
	73 / 74	LS 1,00% 37°C	622	500	56	0,30	302,2	1,00	66	1,061						
	75 / 76	LS 1,00% 37°C	622	500	56	0,60	604,3	1,00	66	1,061						
	77	neg. LS 1,00% 37°C	622	500	56	2,50	2518,0	1,00	66	1,061						
5	85 / 86	Schlamm 9/10														
	87 / 88	Schlamm 15/16														
	89 / 90	Schlamm 29/30														
	91 / 92	Schlamm35/36														
	93															
	94	Schlamm 17 (neg)														
	95	Schlamm 37 (neg)														
96	Schlamm 57 (neg)															
97	Schlamm 77 (neg)															
6	105 / 106	Schlamm 49 / 50														
	107 / 108	Schlamm 55 / 56														
	109 / 110	Schlamm 69 / 70														
	111 / 112	Schlamm 75 / 76														
	3	Sc+														
4	SC -															

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser (Proben 3 u.4)
15 min RT
Proben 5 - 17 u 65 - 77:
+ L. Sarcosin (10%)
Proben 25 - 37:
+ L. Sarcosin (10%)
+ SDS (10%)
Proben 45 - 57:
+ L. Sarcosin (10%)
+ GuSCN
Proben 3 - 57:
30 min / RT
4 mal vortexen
Proben 65 - 77:
30 min / 37°C
2 mal vortexen
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
Proben:3 - 77
neues 2,0 ml Eppendorf
gesammter Überstand mit Pipette überführt
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
40 min in Kühlakku 0°C
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 15 min)
Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert
und in Verdauplatte überführt
+ 10 µl PK (Stepper)
Proben: 85 - 112:
Schlamm-Pellets in 200 µl Verdaupuffer
resuspendiert, und 200µl in Verdauplatte
überführt.
+ 20 µl PK (Stepper)

40 min 40°C
+ PMSF:
10 µl Proben 3 - 77
20 µl Proben 85 - 112
+ Sample Buffer 5x
20 µl Proben 3 - 77
50 µl Proben 85 - 112
10 min 95°C
Proben85 - 112
Überführung in ein 1,8 ml Eppendorf
Zentrifugation 10 min 2000 x g
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
Elektrophorese
40 min 200V const, MOPS
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
30 min in Transferpuffer
Blot:
60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“
Membran:
30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer
AK I (6H4) 1: 5 000 10h, 4°C no shake
1x 1 min, 3x 5 min TBST fast shake
60 min AK II; 1: 5000; RTemp. Slow shake
1x 1 min, 3x 5 min TBST, fast shake
10 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer
Filmbelichtung
35 min. Expositur / 20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

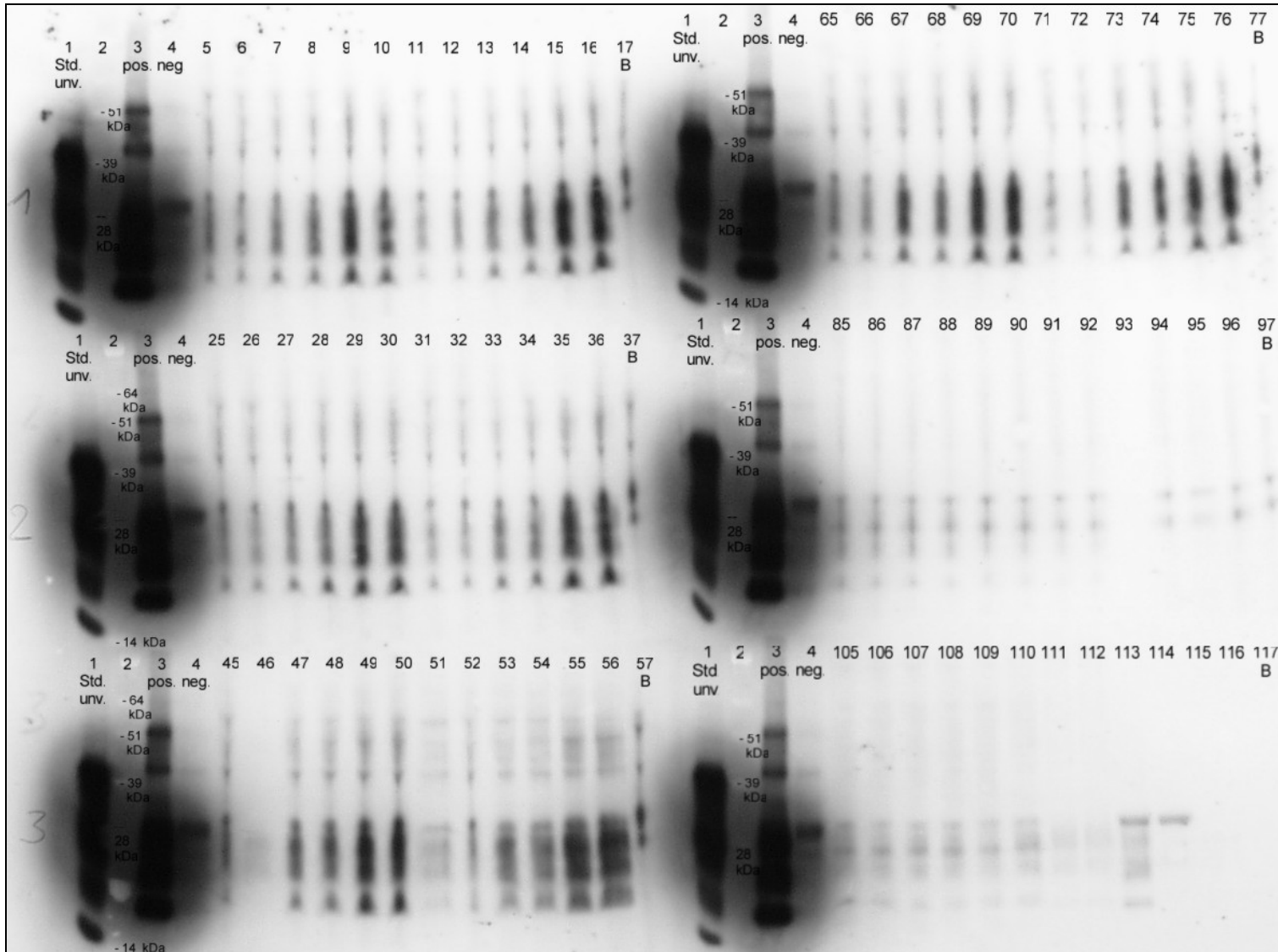


Abbildung 10:

Versuche:

- *Einfluß von höherer Lauroylsarcosinkonz. (0,5%, 1,0% u. 2,0%)*
- *Einfluß von SDS (0,1% und 0,2%)*
- *Einfluß von Guanidiniumthiocyanat (0,1% und 0,2%)*
- *Einfluß der Temperatur bei der Lauroylsarcosinbehandlung (23°C [RT] und 37°C)*
- *30 min. L.Sarcosin; 4x Vortexen*
- *Nachweis von PrP^{Sc} in den Schlamm pellets*
- *Verdünnungsreihe 150 - 600 µg_{HH}/ml_{FS}*

Conclusio:

- *in den Schlamm pellets kann noch PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Proben 85 - 92, 105 - 112)*
- *Schlamm pellets mit Negativhirnmaterial konnten als negativ identifiziert werden (Pr.n 94 - 97)*
- *höhere L.Sarcosinkonz. bzw. erhöhte Temperatur führt zu keinen Unterschieden in der Detektion von PrP^{Sc} (Proben 5 - 17, 65 - 77)*
- *SDS-Zugabe verbessert den Nachweis nicht (Proben 25 - 37)*
- *0,2% GuSCN führt zu breiten und besser aufgetrennten Banden (Proben 51 - 56)*

Versuche:

- *Einfluß von Guanidiniumthiocyanat*
- *Verdünnungsreihe 70 - 300 ng_{HH}/ml_{FS}*

Conclusio:

- *keine Detektion von PrP^{SC}.*
- *PrP^{SC} könnte zu stark an die Biomasse gebunden sein (obwohl auc im Schlammpellet [Proben 31 - 37] kein PrP^{SC} nachgewiesen werden konnte)*
→ *stärkerer mechanischer Einfluß während der Lauroylsarcosinbehandlung könnte nötig sein (vortexen, schütteln)*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535 in 4400 µl
Wasser

HH SC+ /0,75

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 993 µl Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

nicht temperaturbehandelt
mesophil 21.01.2002

L.Sarco

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl
in 0,1 M Tris/HCl mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

20 µl PK-Stock ad 690 µl;
(Endconc. in Probe: 50µgPK/ml)

GuSCN

1,0 g Guanidiniumthiocyanat (Sigma)
in 10 ml Wasser

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4
+ 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl L..Sarco auf 10 ml Tris/HCl)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]		Hirnhomogenat			Sarco 10 % in Lsg		GuSCN 10%		Resusp Verdaup. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]
					[µl]	conc [%]	in AD-M [%]	in AD-M [ng/ml]	[µl]	[%]	[µl]			
	1 Std Prionics 1 µl													
	2 Molekularmarker 5 µl													
	3 SC + 2,5%	585	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2518	29	0,496			100	10	30
	4 SC - 2,5%	585	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2518	29	0,496			100	10	30
1	5 / 6 GuSCN 0,20%	597	500	56	0,075	0,0755	76	29	0,486	12	0,201	100	10	30
	7 / 8 GuSCN 0,20%	597	500	56	0,150	0,1511	151	29	0,486	12	0,201	100	10	30
	9 / 10 GuSCN 0,20%	597	500	56	0,300	0,3022	302	29	0,486	12	0,201	100	10	30
	11 / 12 GuSCN 0,50%	618	500	56	0,075	0,0755	76	31	0,502	31	0,502	100	10	30
	13 / 14 GuSCN 0,50%	618	500	56	0,150	0,1511	151	31	0,502	31	0,502	100	10	30
	15 / 16 GuSCN 0,50%	618	500	56	0,300	0,3022	302	31	0,502	31	0,502	100	10	30
	17 neg GuSCN 0,20%	597	500	56	2,500	2,5180	2518	29	0,486	12	0,201	100	10	30
2	25 / 26 GuSCN 1,00%	655	500	56	0,075	0,0755	76	33	0,504	66	1,008	100	10	30
	27 / 28 GuSCN 1,00%	655	500	56	0,150	0,1511	151	33	0,504	66	1,008	100	10	30
	29 / 30 GuSCN 1,00%	655	500	56	0,300	0,3022	302	33	0,504	66	1,008	100	10	30
	31 / 32 Pellet Proben 9/10				0,300							200	20	50
	33 / 34 Pellet Proben 15/16				0,300							200	20	50
	35 / 36 Pellet Proben 29/30				0,300							200	20	50
	37 Pellet neg GuSCN 0,20%				2,500							200	20	50

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
15 min RT
+ L. Sarcosin (10%)
+ GuSCN
30 min / RT
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
Proben:3 - 30
neues 2,0 ml Eppendorf
gesammter Überstand mit Pipette überführt
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
40 min in Kühlakku 0°C
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 15 min)
Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert
und in Verdauplatte überführt:
Proben:31 - 37:
Schlamm-Pellets von Proben 9/10, 15/16 u.
29/30 in Verdaupuffer resuspendiert, und
200µl in Verdauplatte überführt.

+ PK (Stepper)
40 min 40°C
+ 10 µl PMSF
+ Sample Buffer 5x
10 min 95°C

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std., SC+: 5 µl)

Elektrophorese

40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

30 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 10h, 4°C no shake

1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake

60 min AK II; 1: 5000; RTemp. Slow shake

1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

35 min. Expositur / 20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

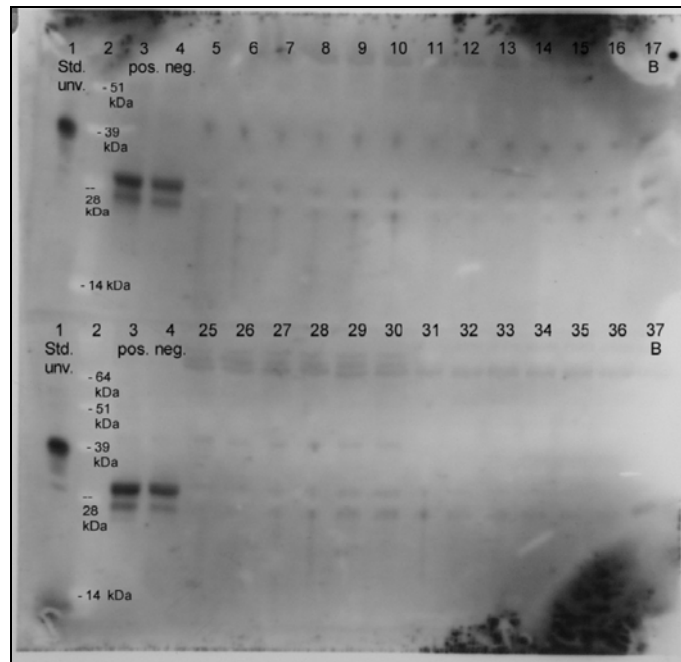


Abbildung 11: 02 03 26

Versuche:

- *Einfluß von Guanidiniumthiocyanat*
- *Verdünnungsreihe 70 - 300 ng_{HH}/ml_{FS}*

Conclusio:

- *keine Detektion von PrP^{SC}.*
- *PrP^{SC} könnte zu stark an die Biomasse gebunden sein (obwohl auch im Schlamm pellet [Proben 31 - 37] kein PrP^{SC} nachgewiesen werden konnte)*
→ stärkerer mechanischer Einfluß während der Lauroylsarcosinbehandlung könnte nötig sein (vortexen, schütteln)

Versuche:

- *Vergleich sequentielles Vortexen und kontinuierliches Vortexen bei der Lauroylsarcosinbehandlung.*
- *Einfluß von Guanidiniumthiocyanat*
- *Vergleich des Einflusses von Proteaseinhibitoren bei der Lauroylsarcosinbehandlung:*
AEBSF: Serinproteasehemmer, Wasserlöslich, teuer
PMSF: billig, PK-Stopp
Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma): Universelle Proteasehemmung

Conclusio:

- *Guanidiniumthiocyanat verbessert die Auflösung nicht. Die Banden verschmieren (Proben 45 - 77)*
- *Sequentielles Vortexen (7 mal) führt zum selben Ergebnis wie stängiges Schütteln bei 1000 rpm bedeutet jedoch höheren Arbeitsaufwand)*
- *Alle 3 Proteaseinhibitoren führen nicht deutlich zu einer besseren Detektion von PrP^{Sc}*
Proteaseinhibitormix führt zu sauberer aufgetrennten Banden (Proben 65 -77)

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535 in 4400 µl
Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /1,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

mesophil 21.01.2002

L.Sarco

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl
in 0,1 M Tris/HCl mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

20 µl PK-Stock ad 690 µl;
(Endconc. in Probe: 50µgPK/ml)

PMSF

PMSF, 100mMol/l in iso-Propanol
(17,4 mg/ml)

AEBSF

AEBSF (Sigma): 100mMol/l in Wasser

Mix

Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma)
Phiole in 2000 µl Wasser

GuSCN

1,0 g Guanidiniumthiocyanat (Sigma)
in 10 ml Wasser

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4
+ 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl L..Sarco auf 10 ml Tris/HCl)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				Sarco		GuSCN 10%		Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	Prot. Inhibitor conc	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [ng/ml]	10 % [µl]	in Lsg [%]	[µl]	[%]				[µl]	[nMol/ml]
	1 Std Prionics 1 µl															
	2 Molekularmarker 5 µl															
	3 SC + 2,5%	585	500 H ₂ O	56	2,500	2,5180	2518	29	0,496			100	10	30		
	4 SC - 2,5%	585	500 H ₂ O	56	2,500	2,5180	2518	29	0,496			100	10	30		
1	5 / 6 part	586	500	56	0,150	0,1511	1518	30	0,512			100	10	30		
	7 / 8 part	586	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,512			100	10	30		
	9 / 10 part	586	500	56	0,600	0,6043	604	30	0,512			100	10	30		
	11 / 12 part. GuSCN 0,20%	598	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	13 / 14 part. GuSCN 0,20%	598	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	15 / 16 part. GuSCN 0,20%	598	500	56	0,600	0,6043	604	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	17 part. neg GuSCN 0,2%	598	500	56	2,500	2,5180	2518	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
2	25 / 26 fulltime	586	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,512			100	10	30		
	27 / 28 fulltime	586	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,512			100	10	30		
	29 / 30 fulltime	586	500	56	0,600	0,6043	604	30	0,512			100	10	30		
	31 / 32 fulltime GuSCN 0,20%	598	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	33 / 34 fulltime GuSCN 0,20%	598	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	35 / 36 fulltime GuSCN 0,20%	598	500	56	0,600	0,6043	604	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
	37 Fullt. neg GuSCN 0,2%	598	500	56	2,500	2,5180	2518	30	0,502	12	0,201	100	10	30		

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				Sarco		GuSCN 10%		Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	Prot. Inhibitor conc		
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [ng/ml]	10 % [µl]	in Lsg [%]	[µl]	[%]				[µl]	[nMol/ml]	
3	45 / 46	PMSF part. GuSCN 0,20%	618	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	3236,2
	47 / 48		618	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	3236,2
	49 / 50	AEBSF part. GuSCN 0,20%	618	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	3236,2
	51 / 52		618	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	3236,2
	53 / 54	Mix part. GuSCN 0,20%	618	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	5080,9
	55 / 56		618	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,485	12	0,194	100	10	30	20	5080,9
	57	neg.	598	500	56	2,500	2,5180	2518	30	0,502	12	0,201	100	10	30		
4	65 / 66	PMSF part.	606	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,495			100	10	30	20	3300,3
	67 / 68		606	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,495			100	10	30	20	3300,3
	69 / 70	AEBSF part.	606	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,495			100	10	30	20	3300,3
	71 / 72		606	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,495			100	10	30	20	3300,3
	73 / 74	Mix part.	606	500	56	0,150	0,1511	151	30	0,495			100	10	30	20	5181,5
	75 / 76		606	500	56	0,300	0,3022	302	30	0,495			100	10	30	20	5181,5
	77	neg.	586	500	56	2,500	2,5180	2518	30	0,512			100	10	30		

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
30 min RT

Proben 3 - 10; 25 - 30
+ L. Sarcosin (10%)

Proben 11 - 17; 31 - 37
+ L. Sarcosin (10%)
+ GuSCN

Proben 45 - 48:
+ L. Sarcosin (10%)
+ PMSF
+ GuSCN

Proben 49 - 52:
+ L. Sarcosin (10%)
+ AEBSF
+ GuSCN

Proben 53 - 57:
+ L. Sarcosin (10%)
+ Mix
+ GuSCN

Proben 65 - 68:
+ L. Sarcosin (10%)
+ PMSF

Proben 69 - 72:
+ L. Sarcosin (10%)
+ AEBSF

Proben 73 - 77:
+ L. Sarcosin (10%)
+ Mix

Proben 25-37:
30 min Vortexschüttler: 1000 rpm / RT

Ale anderen Proben:
30 min; alle 5 min vortexen (7x) / RT

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf
gesammter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
40 min in Kühlakku 0°C

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 15 min)

Pellet in 100µl Verdauopuffer resuspendiert und
in Verdauplatte überführt:

+ 10 µl PK (Stepper)
40 min 40°C
+ 10 µl PMSF
+ 20 µl Sample Buffer 5x
10 min 95°C

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std., SC+: 5 µl)

Elektrophorese
40 min 200V const, MOPS

Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
30 min in Transferpuffer

Blot:
60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:
30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 10h, 4°C no shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake
60 min AK II; 1: 5000; RTemp. Slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
10 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung
35 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

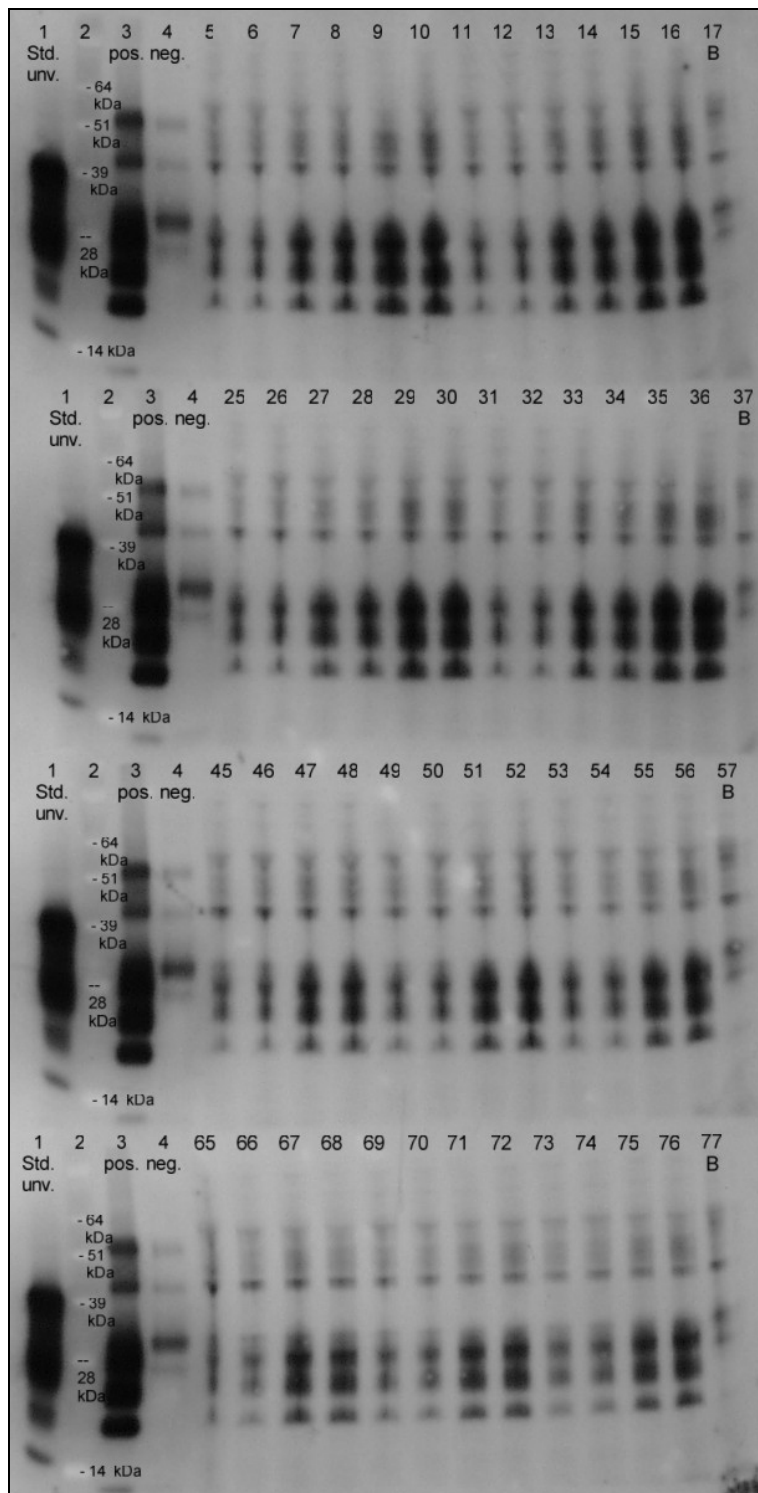


Abbildung 12: 02 03 27

Versuche:

- Vergleich sequentielles Vortexen und kontinuierl. Vortexen bei der Lauroylsarcosinbehandlung.
- Einfluß von Guanidin-thiocyanat
- Vergleich des Einflusses von Proteaseinhibitoren bei der Lauroylsarcosinbehandlung:
AEBSF: Serinproteasehemmer, Wasserlöslich, teuer
PMSF: billig, PK-Stopp
Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma): Universelle Proteasehemmung

Conclusio:

- Guanidiniumthiocyanat verbessert die Auflösung nicht. Die Banden verschmieren (Proben 45 - 77)
- Sequentielles Vortexen (7 mal) führt zum selben Ergebnis wie stängiges Schütteln bei 1000 rpm bedeutet jedoch höheren Arbeitsaufwand)
- Alle 3 Proteaseinhibitoren führen nicht deutlich zu einer besseren Detektion von PrPSC
 Proteaseinhibitormix führt zu sauberer aufgetrennten Banden (Proben 65 -77)

Versuche:

- Nachweis von PrP^{SC} in wässriger Verdünnung (Ethanol-fällung mit BSA-Zugabe)
- Vergl. Einfluß von Proteaseinhibitormix, PMSF und Guanidiniumthiocyanat

Conclusio:

- Zugabe von PMSF (Proben 5 - 10) und Proteaseinhibitormix (Proben 11 - 16) führt zu sehr ähnlichen Resultaten (deutlicher getrennte Banden bei Proben 11 - 16 - Mix)
- Die Zugabe von GuSCN führt (bei gleicher Detektionsgrenze) zu verengten und verschmierten Banden (Proben 25 - 36)
- 37 µg_{HH}/ml_{H₂O} in Wasser (+Inhibitormix) kann mittels Ethanol-fällung (+BSA) nachgewiesen werden

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535
in 4400 µl Wasser

HH SC+ /0,07

7 µl HH SC+ /1,0 + 993 µl Wasser

HH SC+ /0,15

15 µl HH SC+ /1,0 + 985 µl Wasser

HH SC+ /0,30

30 µl HH SC+ /1,0 + 970 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

Schlamm mesophil 25.03.2002

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000µl in 0,1 M Tris/HCl
mit 2,5 mM CaCl₂·2H₂O

PK

14 µl PK-Stock ad 509 µl (Endconc. in Probe:
50 µg PK/ml)

PMSF

PMSF, 100mMol/l in iso-Propanol (17,4 mg/ml)

Mix (Inhibitor)

Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma)
Phiole in 2000 µl Wasser gelöst
(bei 4°C gelagert)

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1,5 ml Wasser

GuSCN

0,1 g Guanidiniumthiocyanat (Sigma)
in 1,0 ml Wasser

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4 + 0,05% Lauroylsarcosin
(50 µl 10% Lauroylsarcosin-Stock auf 10 ml
Tris/HCl)

			Ges.	AD-M	HH			L. Sarcosin		GuSCN		PMSF		Inhibitormix		BSA		Vol. n.	PK	SDB	
			Vol.			conc	in AD-M	in AD-M	10 %	in Lsg	10%		100 mM	conc		conc	10%	conc	Resusp.		
			[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[µl]	nMol/ml	[µl]	nMol/ml	[µl]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]
	1	Std Prionics																			
	2	Molekularmarker																			
	3	SC + 2,5%	606	500 W	56	2,500	2,5180	2517,9	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
	4	SC - 2,5%	606	500 W	56	2,500	2,5180	2517,9	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
1	5 / 6	PMSF	606	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495			20	3300,3					100	10	30
	7 / 8	PMSF	606	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495			20	3300,3					100	10	30
	9 / 10	PMSF	606	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495			20	3300,3					100	10	30
	11 / 12	Mix	606	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
	13 / 14	Mix	606	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
	15 / 16	Mix	606	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
	17	neg Mix	606	500	56	2,500	2,5180	2517,9	30	0,495					20	5181,5			100	10	30
2	25 / 26	GuSCN, PMSF	619	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,485	13	0,210	20	3231,0					100	10	30
	27 / 28	GuSCN, PMSF	619	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,485	13	0,210	20	3231,0					100	10	30
	29 / 30	GuSCN, PMSF	619	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,485	13	0,210	20	3231,0					100	10	30
	31 / 32	GuSCN, mix	619	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,485	13	0,210			20	5072,7			100	10	30
	33 / 34	GuSCN, mix	619	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,485	13	0,210			20	5072,7			100	10	30
	35 / 36	GuSCN, mix	619	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,485	13	0,210			20	5072,7			100	10	30
	37	neg. GuSCN, PMSF	619	500	56	2,500	2,5180	2517,9	30	0,485	13	0,210			20	5072,7			100	10	30
3	45 / 46	Wasser, BSA, mix	590	500 W	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,508					20	5322,0	12	0,203	100	10	30
	47 / 48	Wasser, BSA, mix	618	500 W	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,485					20	5080,9	12	0,194	100	10	30
	49 / 50	Wasser, BSA, mix	618	500 W	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,485					20	5080,9	12	0,194	100	10	30
	51 / 52	Wasser, BSA, mix	618	500 W	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,485					20	5080,9	12	0,194	100	10	30

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

56 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M oder Wasser (45 - 52)

10 min RT

Proben 5 - 10, 17:

+ L. Sarcosin (10 %)

+ PMSF

Proben 3, 4, 11 - 16

+ L. Sarcosin (10 %)

+ Inhibitormix

Proben 25 - 30, 37:

+ L. Sarcosin (10 %)

+ PMSF

+ GuSCN

Proben 31 - 36

+ L. Sarcosin (10 %)

+ Inhibitormix

+ GuSCN

Proben 45 - 52

+ L. Sarcosin (10 %)

+ Inhibitormix

+ BSA

Schütteln RT: 25 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku

1500 µl Ethanol 98% / -17°C vorgelegt

gesamter Überstand in Ethanol geschüttet

40 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (> 10 min)

Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert:

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze re-suspendiert und dann Vortexen mit Pipettenspitze) und in Verdauplatte überführt:

+ 10 µl PK (Stepper)

Mischen mit 8-Kanalpipette

45 min 40°C

+ 10 µl PMSF (Stepper)

Mischen mit 8-Kanalpipette

+ 30 µl Sample Buffer 5x

Mischen mit 8-Kanalpipette

10 min 95°C

Überführung in 1,8ml Eppendorf

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

10 µl Probe (Marker, Std., SC+ je 5 µl)

Elektrophorese

45 min 200 V const., MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

40 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000 14 h, 4°C no shake

1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake

60 min AK II; 1: 5000; RTemp. slow shake

1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

35 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

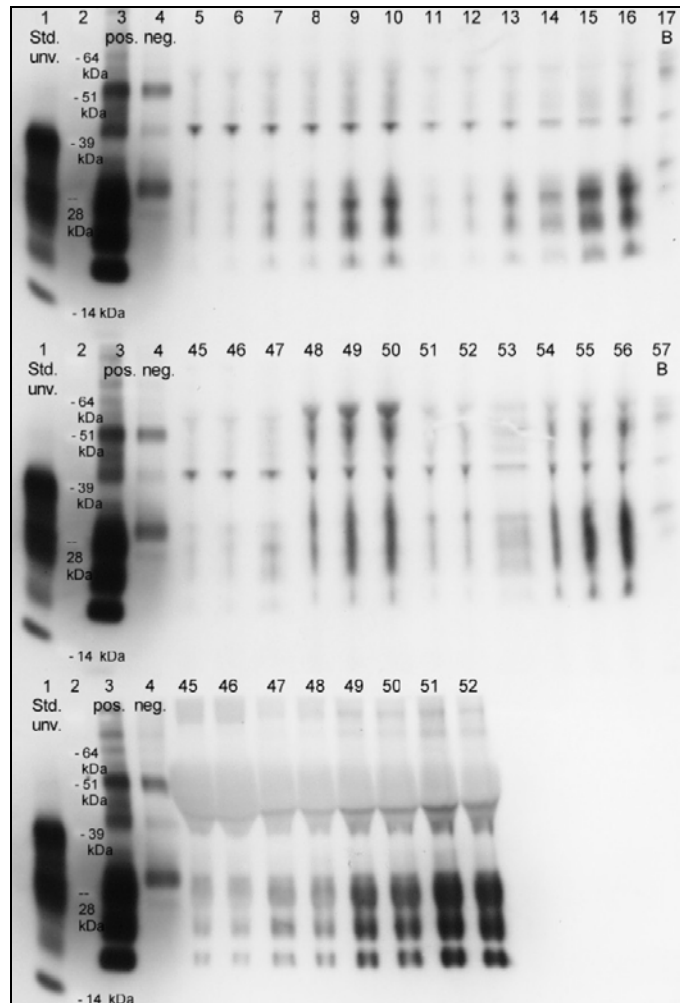


Abbildung 13: 02 04 03

Versuche:

- Nachweis von PrP^{SC} in wässriger Verdünnung (Ethanol-fällung mit BSA-Zugabe)
- Vergl. Einfluß von Proteaseinhibitormix, PMSF und Guanidiniumthiocyanat

Conclusio:

- Zugabe von PMSF (Proben 5 - 10) und Proteaseinhibitormix (Proben 11 - 16) führt zu sehr ähnlichen Resultaten (deutlicher getrennte Banden bei Proben 11 - 16 - Mix)
- Die Zugabe von GuSCN führt (bei gleicher Detektionsgrenze) zu verengten und verschmierten Banden (Proben 25 - 36)
- 37µg_{HH}/ml_{H₂O} in Wasser (+Inhibitormix) kann mittels Ethanol-fällung (+BSA) nachgewiesen werden

Versuche:

- Verdünnungsreihe 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Einfluß von PMSF (um Abbau von PrP^{SC} bei der L.Sarcosinbehandlung zu verhindern)
- Einfluß von BSA auf die Fällung von PrP^{SC}
- Vergleich der Nachweisbarkeit von PrP^{SC} in Wasser
Einfluß der Ethanol-fällung - mit und ohne BSA-Zugabe

Conclusio:

- Die Zugabe BSA(45-56), PMSF(25-36) bzw. BSA+PMSF (5-16) verbessern die Nachweisbarkeit von PrP^{SC} in Faulschlamm nicht. Die Linien wirken zusammengezogen, sodaß die einzelnen Banden nicht mehr zu erkennen sind.
- 70 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$ sind im Faulschlamm nachweisbar; geringere Konzentrationen geben nur einen leichten Schatten.
- Durch Ethanol-fällung und BSA-Zugabe lassen sich 37 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ in Wasser nachweisen
- Ohne BSA lassen sich mit der Ethanol-fällung 150 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ nachweisen
- Ohne aufkonzentrierende Ethanol-fällung lassen sich auch 150 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ nachweisen

HH SC - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6581
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 375 mg Nr. 5535
in 4400 μl Wasser

HH SC+ /0,07

10,5 μl HH SC+ /1,0 + 1490 μl Wasser

HH SC+ /0,15

13,5 μl HH SC+ /1,0 + 985 μl Wasser

HH SC+ /0,30

27 μl HH SC+ /1,0 + 873 μl Wasser

HH SC+ /2,50

250 μl HH SC+ /1,0 + 750 μl Wasser

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

L.Sarco

1,0 g Lauroylsarcosin (Sigma)
in 10 ml Wasser

BSA (10%)

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)

ADM

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(mesophil 25.03.2002)

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000 μl in 0,1 M Tris/HCl
mit 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

PK

28 μl PK-Stock ad 1018 μl
(Endconc. in Probe: 50 μg PK/ml)

Verdaupuffer

0,1M Tris/HCl pH 7,4 + 0,05%
Lauroylsarcosin
(50 μl 10% Laurylsarcosin-Stock
auf 10 ml Tris/HCl)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH [µl]	conc [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	Sarco 10 % [µl]	in Lsg [%]	PMSF [µl]	conc [nMol/ml]	BSA 10% [µl]	conc [%]	Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]
	1 Std Prionics															
	2 Molek.Marker															
	3 SC + 2,5%	626	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
	4 SC - 2,5%	626	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
1	5 / 6 PMSF, BSA	594	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,505	40	6734,0	10	0,168	100	10	30
	7 / 8 PMSF, BSA	608	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,493	40	6578,9	10	0,164	100	10	30
	9 / 10 PMSF, BSA	636	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,472	40	6289,3	10	0,157	100	10	30
	11 / 12 PMSF, BSA	636	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,472	40	6289,3	10	0,157	100	10	30
	13 / 14 PMSF, BSA	636	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,472	40	6289,3	10	0,157	100	10	30
	15 / 16 neg, PMSF, BSA	636	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,472	40	6289,3	10	0,157	100	10	30
2	25 / 26 PMSF	584	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,514	40	6849,3			100	10	30
	27 / 28 PMSF	598	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,502	40	6689,0			100	10	30
	29 / 30 PMSF	626	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
	31 / 32 PMSF	626	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
	33 / 34 PMSF	626	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
	35 / 36 neg. PMSF	626	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,479	40	6389,8			100	10	30
3	45 / 46 BSA	554	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,542			10	0,181	100	10	30
	47 / 48 BSA	568	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,528			10	0,176	100	10	30
	49 / 50 BSA	596	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,503			10	0,168	100	10	30
	51 / 52 BSA	596	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,503			10	0,168	100	10	30
	53 / 54 BSA	596	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,503			10	0,168	100	10	30
	55 / 56 neg. BSA	596	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,503			10	0,168	100	10	30

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH			Sarco		PMSF		BSA		Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10 % [µl]	in Lsg [%]	conc [µl]	[nMol/ml]	10% [µl]	conc [%]			
4	65 / 66	544	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,551				100	10	30
	67 / 68	558	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,538				100	10	30
	69 / 70	586	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,512				100	10	30
	71 / 72	586	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,512				100	10	30
	73 / 74	586	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,512				100	10	30
	75 / 76	neg.	586	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				100	10
5	85 / 86	Wasser, BSA	594	500 W	14	0,070	0,0191	19,07			10	0,168	100	10	30
	87 / 88	Wasser, BSA	608	500 W	28	0,070	0,0371	37,12			10	0,164	100	10	30
	89 / 90	Wasser, BSA	636	500 W	56	0,070	0,0705	70,50			10	0,157	100	10	30
	91 / 92	Wasser, BSA	636	500 W	56	0,150	0,1511	151,08			10	0,157	100	10	30
	93 / 94	Wasser, BSA	636	500 W	56	0,300	0,3022	302,16			10	0,157	100	10	30
	95 / 96	neg.Wasser, BSA	636	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99			10	0,157	100	10	30
6	105/106	Wasser	584	500 W	14	0,070	0,0191	19,07					100	10	30
	107/108	Wasser	598	500 W	28	0,070	0,0371	37,12					100	10	30
	109/110	Wasser	626	500 W	56	0,070	0,0705	70,50					100	10	30
	111/112	Wasser	626	500 W	56	0,150	0,1511	151,08					100	10	30
	113/114	Wasser	626	500 W	56	0,300	0,3022	302,16					100	10	30
	115/116	neg.Wasser	626	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99					100	10	30

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				Sarco		PMSF		BSA		Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10 % [µl]	in Lsg [%]	conc [µl]	[nMol/ml]	10% [µl]	conc [%]				
7	125/126	W., keine Precipitation	287	250 Wasser	7	0,070	0,0191	19,07					100	10	30	
	127/128	W., keine Precipitation	294	250 Wasser	14	0,070	0,0371	37,12					100	10	30	
	129/130	W., keine Precipitation	308	250 Wasser	28	0,070	0,0705	70,50					100	10	30	
	131/132	W., keine Precipitation	308	250 Wasser	28	0,150	0,1511	151,08					100	10	30	
	133/134	W., keine Precipitation	308	250 Wasser	28	0,300	0,3022	302,16					100	10	30	
	135/136	neg. W., keine Precipit.	308	250 Wasser	28	2,500	2,5180	2517,99					100	10	30	

Proben 3 – 116:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat

Proben 5 - 76

500 µl AD-M

Proben 3, 4, 85 - 116

500 µl Wasser

Schütteln: 10 min RT

(Vortexschüttler 1000 rpm)

Proben 5 - 36:

+ L. Sarcosin (10 %)

+ PMSF

Proben 3, 4, 45 - 116:

+ L. Sarcosin (10 %)

Schütteln RT: 25 min Vortexschüttler 1000rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
gesamter Überstand hinübergeleert

Proben 5 - 16, 45 - 56, 85 - 98

+ BSA

vortexen

1500 µl Ethanol 98% / -17°C

60 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)

Pellet in 100 µl Verdaupuffer resuspendiert:

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze re-
suspendiert und dann Vortexen mit Pipetten-
spitze) und in Verdauplatte überführt:

Proben 125-236:

HH

+Wasser

Vortexen

100 µl in Verdauplatte überführt

alle Proben:

+ 10 µl PK (Stepper)

Mischen mit 8-Kanalpipette

45 min 40°C

+ 10 µl PMSF (Stepper)

Mischen mit 8-Kanalpipette

+ 30 µl Sample Buffer 5x

Mischen mit 8-Kanalpipette

7 min 95°C

Proben 5 - 76:

Überführung in 1,8ml Eppendorf

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

SDS-Gel NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

10 µl Probe

(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+ je 3,5 µl)

Elektrophorese

45 min 200 V const., MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

40 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 130 V, Transferpuffer „Großblot“

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1: 5 000

13 h, 4°C no shake

1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake

60 min AK II; 1: 5000; RTemp. slow shake

1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

35 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

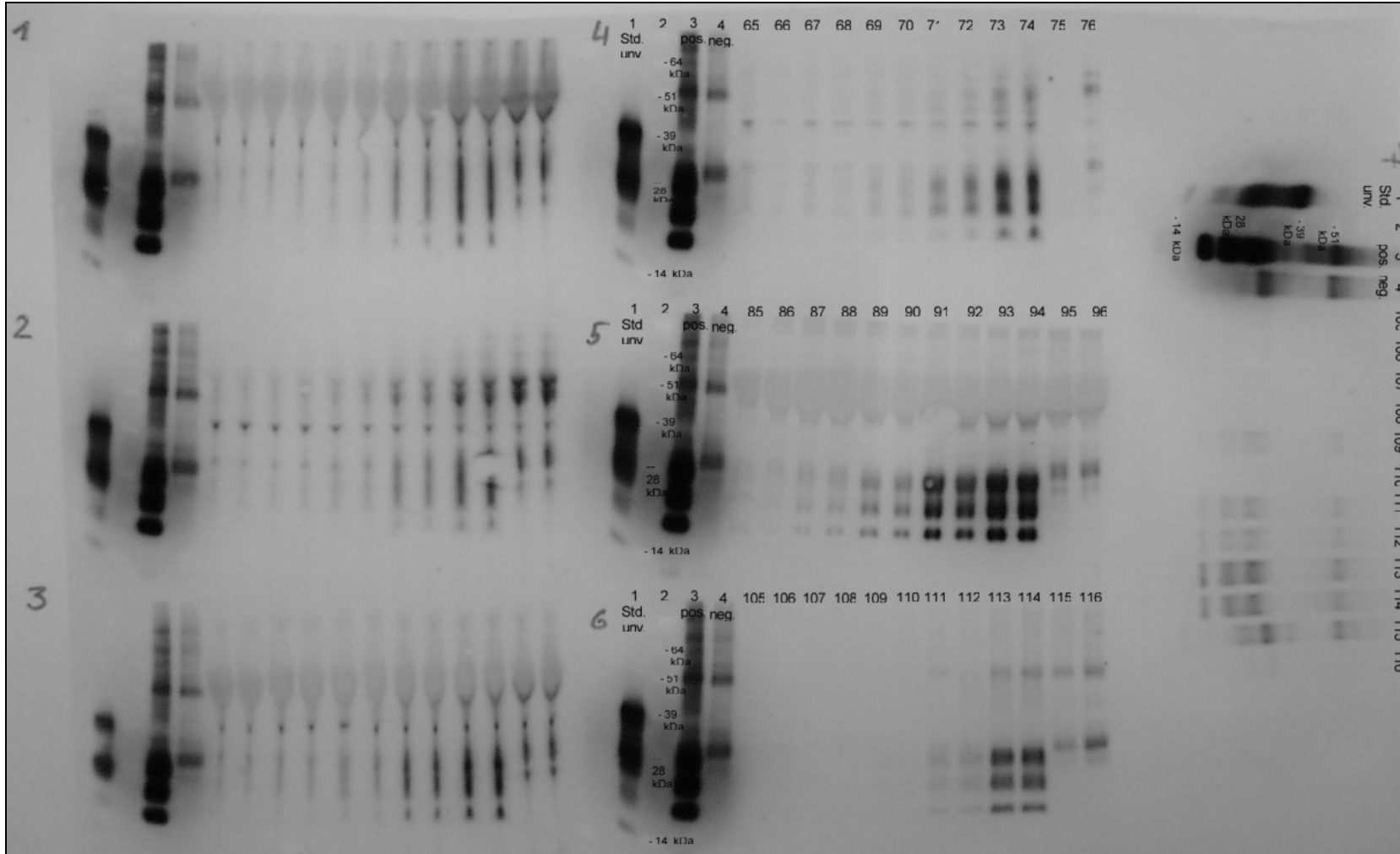


Abbildung 14: 02 04 06 (siehe nächste Seite)

Abbildung 14:

Versuche:

- Verdünnungsreihe 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Einfluß von PMSF (um Abbau von PrP^{SC} bei der L.Sarcosinbehandlung zu verhindern)
- Einfluß von BSA auf die Fällung von PrP^{SC}
- Vergleich der Nachweisbarkeit von PrP^{SC} in Wasser
Einfluß der Ethanol-fällung - mit und ohne BSA-Zugabe

Conclusio:

- Die Zugabe BSA(45-56), PMSF(25-36) bzw. BSA+PMSF (5-16) verbessern die Nachweisbarkeit von PrP^{SC} in Faulschlamm nicht. Die Linien wirken zusammengezogen, sodaß die einzelnen Banden nicht mehr zu erkennen sind.
- 70 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$ sind im Faulschlamm nachweisbar; geringere Konzentrationen geben nur einen leichten Schatten.
- Durch Ethanol-fällung und BSA-Zugabe lassen sich 37 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ in Wasser nachweisen
- Ohne BSA lassen sich mit der Ethanol-fällung 150 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ nachweisen
- Ohne aufkonzentrierende Ethanol-fällung lassen sich auch 150 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}$ nachweisen