

III. ARBEITSPROTOKOLLE OPTIMIERUNG 3 (L3-LABOR)

INHALT

III.	Arbeitsprotokolle Optimierung 3 (L3-Labor)	1
III.1.	02 04 10.....	2
III.2.	02 04 15.....	6
III.3.	02 04 18.....	10
III.4.	02 04 23.....	14
III.5.	02 04 25.....	19
III.6.	02 04 29.....	25
III.7.	02 05 02.....	30
III.8.	02 05 07.....	34
III.9.	02 05 10.....	39
III.10.	02 05 15.....	43
III.11.	02 05 23.....	47
III.12.	02 05 27.....	51
III.13.	02 05 31.....	56
III.14.	02 06 10.....	60
III.15.	02 06 17.....	64
III.16.	02 06 19.....	68
III.17.	02 06 25.....	72
III.18.	02 07 01.....	76
III.19.	02 07 02.....	80
III.20.	02 07 03.....	85
III.21.	02 07 04.....	91
III.22.	02 07 05.....	95
III.23.	02 07 08.....	99
III.24.	02 07 09.....	103
III.25.	02 07 10.....	107
III.26.	02 07 12.....	111
III.27.	02 07 16.....	115
III.28.	02 07 17.....	119

Versuche:

- Verdünnungsreihe HH: 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{AD-M}}$
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma)
- Einfluß der Schlammqualität (mesophiler bzw. thermophiler Schlamm)

Conclusio:

- schlechte Detektion von PrP^{SC}
- schlechte Befüllbarkeit des Geles: Offene Röhrchen beim Denaturieren, mehr Samplepuffer

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

7,5 μl HH SC+ /1,0 + 492,5 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /1,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /2,50

250 μl HH SC+ /1,0 + 750 μl Wasser

AD-M

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

L.Sarco

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

PK-Stock

20mg PK (32 U) in 1000 μl
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)

Inhibitor Mix (Sigma)

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

Verdaupuffer

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

PMSE

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				L. Sarcosin		Inhibitormix		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]				
	1 Std Prionics													
	2 Molekularmarker													
	3 SC + 2,5%	586	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			100	10	30
	4 SC - 2,5%	586	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			100	10	30
1	5 / 6 mesophil	564	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,532	20	5567,4	100	10	30
	7 / 8 mesophil	578	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,519	20	5432,5	100	10	30
	9 / 10 mesophil	606	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	11 / 12 mesophil	606	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	13 / 14 mesophil	606	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	15 / 16 neg, mesophil	606	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
2	25 / 26 thermophil	564	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,532	20	5567,4	100	10	30
	27 / 28 thermophil	578	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,519	20	5432,5	100	10	30
	29 / 30 thermophil	606	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	31 / 32 thermophil	606	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	33 / 34 thermophil	606	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	35 / 36 neg. thermo.	606	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,495	20	5181,5	100	10	30

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 1000 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %)
+ Inhibitormix
Schütteln RT: 25 min Vortexschüttler
1000rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesamter Überstand hinübergeleert
45 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
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
vortexen
45 min 40°C

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 30 µl Sample Buffer 5x
vortexen

7 min / 95°C (geschlossene Röhrchen)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

Gel konnte nicht geladen werden: nochmals
4 min auf 95°C und dann in der Laminair
offen stehen lassen und weitere 10 µl
Samplebuffer zugeben

10 µl in SDS-Gel

(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+ je 5 µl)
NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

45 min 200 V const., MOPS

Membranvorbereitung:

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

Blot:

60 min 30 V, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol
30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:25000
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 I

45 min. Expositur
60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

--- <<°~°>> ---

Conclusio:

Denaturieren, 10 min bei offenen Röhrchen in
Laminair, oder höherer Glyceringehalt im
Samplebuffer

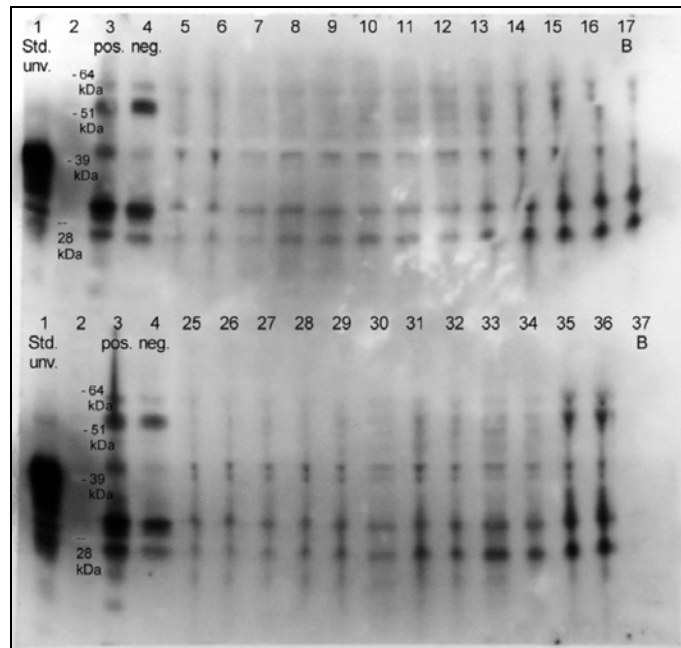


Abbildung 1: 020410

Proben 5 - 17: mesophiler Schlamm

Proben 25 - 27: thermophiler Schlamm

- Verdünnungsreihe HH: 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{AD-M}}$
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma)
- Einfluß der Schlammqualität (mesophiler bzw. thermophiler Schlamm)

Conclusio:

- schlechte Detektion von PrP^{SC}
- schlechte Befüllbarkeit des Geles: Offene Röhrchen beim Denaturieren, mehr Samplepuffer

Versuche:

- Verdünnungsreihe HH: 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{AD-M}}$
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma)
- Detektionsgrenzenvergleich zur Hirnhomogenatverdünnung in Wasser (Ethanolpräzipitation mit BSA-Zusatz)

Conclusio:

- BSA-Zusatz ergibt bessere PrP^{SC} Detektion schlechter Verdau (Negativproben ergeben falschpositives Signal)
- Proteaseinhibitor-Cocktail zusatz ergibt eine bessere Detektion von PrP^{SC} Negativproben sind eindeutig neg., haben aber eine Bande im oberen PrP^{SC} -Bereich
- Schlechte Befüllbarkeit der Gele: längere Denaturierung bei offenen Röhrchen (oder mehr Samplepuffer)

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 + 995 μl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 μl HH SC+ /1,0 + 493 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /1,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /2,50

250 μl HH SC+ /1,0 + 750 μl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

Inibitormix

(Proteaseinhibitor Cocktail Sigma P2714)
Phiole in 2000 μl Wasser aufgelöst

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 μl Wasser

PK-Stock (32 U/mg)

20 mg PK /ml
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK (0,55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

28 μl PK-Stock +991 μl
(Endconc. in Probe: 50 μg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges.Vol. [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat			L.Sarcosin		Inhibitormix		Vol. nach Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10 % [µl]	in Lsg [%]	10 % [µl]	conc [nMol/ml]				
	1 Std Prionics													
	2 Molekularmarker													
	3 SC + 2,5%	586	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			100	10	30
	4 SC - 2,5%	586	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			100	10	30
1	5 / 6 mesophil, Inh.Mix	564	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,532	20	5567,4	100	10	30
	7 / 8 mesophil, Inh.Mix	578	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,519	20	5432,5	100	10	30
	9 / 10 mesophil, Inh.Mix	606	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	11 / 12 mesophil, Inh.Mix	606	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	13 / 14 mesophil, Inh.Mix	606	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
	15 / 16 neg, mesophil, Inh.Mix	606	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
2	25 / 26 mesophil	544	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,551			100	10	30
	27 / 28 mesophil	558	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,538			100	10	30
	29 / 30 mesophil	586	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,512			100	10	30
	31 / 32 mesophil	586	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,512			100	10	30
	33 / 34 mesophil	586	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,512			100	10	30
	35 / 36 neg, mesophil	586	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			100	10	30
	3	45 / 46 Wasser, BSA, Inh.Mix	564	500 Wasser	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,532	20	5567,4	100	10
47 / 48 Wasser, BSA, Inh.Mix		578	500 Wasser	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,519	20	5432,5	100	10	30
49 / 50 Wasser, BSA, Inh.Mix		606	500 Wasser	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
51 / 52 Wasser, BSA, Inh.Mix		606	500 Wasser	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
53 / 54 Wasser, BSA, Inh.Mix		606	500 Wasser	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495	20	5181,5	100	10	30
55 / 56 neg.Wasser, BSA, Inh.Mix		606	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,495	20	5181,5	100	10	30

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
Proben 5 - 36:
500 µl AD-M
Proben 3; 4; 45 - 56:
500 µl Wasser

Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 5 - 16:
+ L.Sarcosin (10%)
+ Proteaseinhibitormix

Proben 3; 4; 25 - 36:
+ L.Sarcosin (10%)

Proben 45 - 56:
+ L.Sarcosin (10%)
+ BSA
+ Proteaseinhibitor

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku:
1500 µl Ethanol 98% / -17°C vorlegen
gesamten Überstand hinüberleeren
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 Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ PK
vortexen

45 min 40°C (Wasserbad: 39°C)

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 30 µl Sample Buffer 5x
vortexen

5 min 95°C
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+
je 2,5 µl)

Elektrophorese:
35 min 200 V / 200 mA, MOPS

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

Blot:
60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:
20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer
AK I (6H4) 1:5000 in Blockingpuffer
Über Nacht, 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
45 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

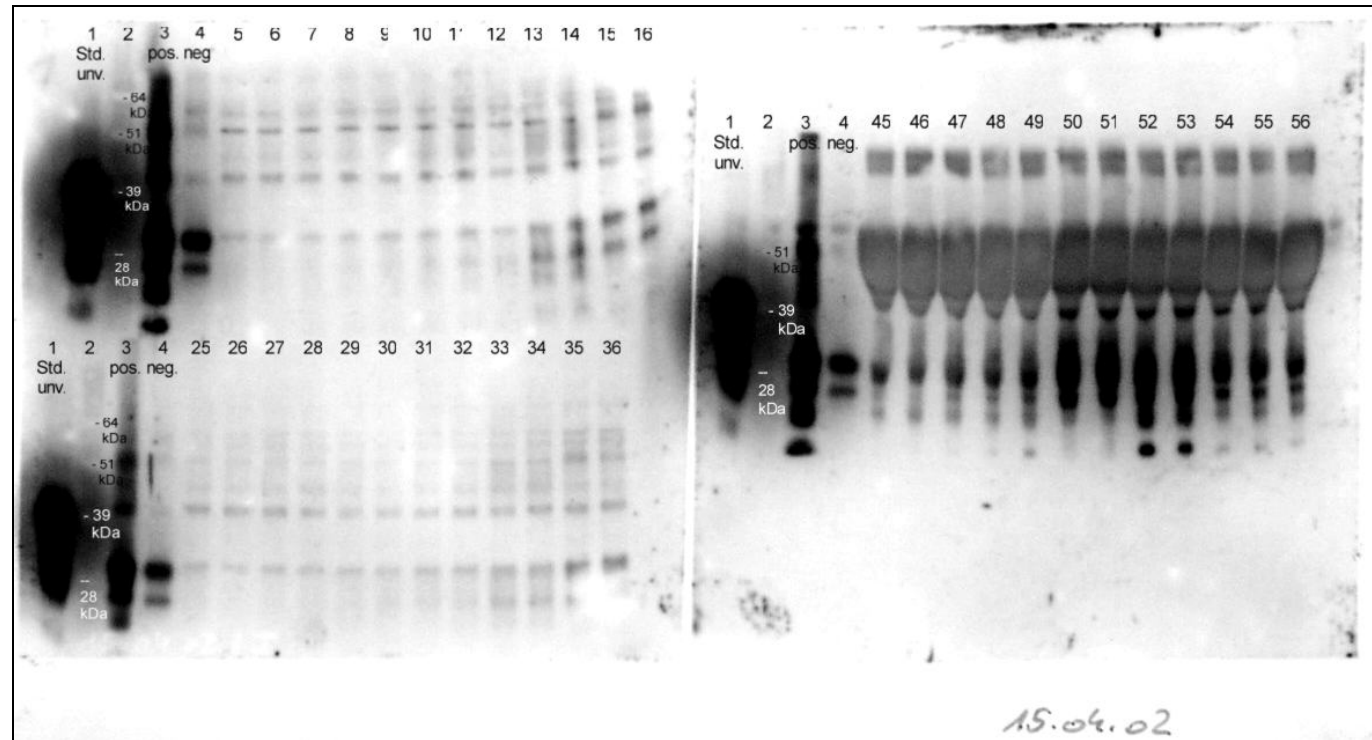


Abbildung 2: 02 04 15

Proben 5 - 16: mesophil, Inhibitor-Mix

Proben 25 - 36: mesophil

Proben 25 - 56: Wasser, BSA, Inhibitor-Mix

- Verdünnungsreihe HH: 19 - 300 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{AD-M}}$
- Einfluß von Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma)
- Detektionsgrenzenvergleich zur Hirnhomogenatverdünnung in Wasser (Ethanolpräzipitation mit BSA-Zusatz)

Conclusio:

- BSA-Zusatz ergibt bessere PrP^{Sc} Detektion schlechter Verdau (Negativproben ergeben falschpositives Signal)
- Proteaseinhibitor-Cocktail zusatz ergibt eine bessere Detektion von PrP^{Sc} Negativproben sind eindeutig neg., haben aber eine Bande im oberen PrP^{Sc}-Bereich
- Schlechte Befüllbarkeit der Gele: längere Denaturierung bei offenen Röhrchen (oder mehr Samplepuffer)

Versuche:

- *Detektionsgrenze von PrP^{SC} (bis 19 µg_{Hirnhomogenat} / ml_{Faulschlamm})*
- *mesophiler und thermophiler Schlamm*

Conclusio:

- *schlechte Detektion von PrP^{SC}: lediglich 150 - 300 µg /ml sind nachweisbar*
- *PrP^{SC} ist in themophilem Schlamm geringfügig besser nacheisbar als in mesophilem Schlamm*

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

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /1,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

L.Sarco

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

PK-Stock (32 U/mg)

20 mg PK /ml
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK (0,55µg/µl)

28 µl PK-Stock +991 µl
(Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSE

100 mM PMSF in i-Propanol

			Ges. Vol.	AD-M	HH	HH conc	conc HH in AD-M	conc HH in AD-M	Sarco 10 %	conc Sarco in Lsg	Verdau puffer	PK	SDB
			[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]
	1	Std Prionics											
	2	Molekularmarker											
	3	SC + 2,5%	586,0	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512	100	10	30
	4	SC - 2,5%	586,0	500 Wasser	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512	100	10	30
1	5 / 6	meso	544,0	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,551	100	10	30
	7 / 8	meso	558,0	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,538	100	10	30
	9 / 10	meso	586,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,512	100	10	30
	11 / 12	meso	586,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,512	100	10	30
	13 / 14	meso	586,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,512	100	10	30
	15 / 16	neg meso	586,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512	100	10	30
	3	SC + 2,5%	500,0										
			500,0										
2	25 / 26	thermo	544,0	500	14	0,070	0,0191	19,07	30	0,551	100	10	30
	27 / 28	thermo	558,0	500	28	0,070	0,0371	37,12	30	0,538	100	10	30
	29 / 30	thermo	586,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,512	100	10	30
	31 / 32	thermo	586,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,512	100	10	30
	33 / 34	thermo	586,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,512	100	10	30
	35 / 36	neg thermo	586,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			
	3	SC + 2,5%											

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)
+ L.Sarcosin (10%)
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku:
1500 µl Ethanol 98% / -17°C vorlegen
gesamten Überstand hinüberleeren
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 Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
+ PK
vortexen
30 min 39°C (Wasserbad: 39°C)
+ 10 µl PMSF
vortexen
+ 15 µl Sample Buffer 5x
vortexen

15 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+
je 2,5 µl)

Elektrophorese:

35 min 200 V / 200 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in Blockingpuffer

Über Nacht, 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

40 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

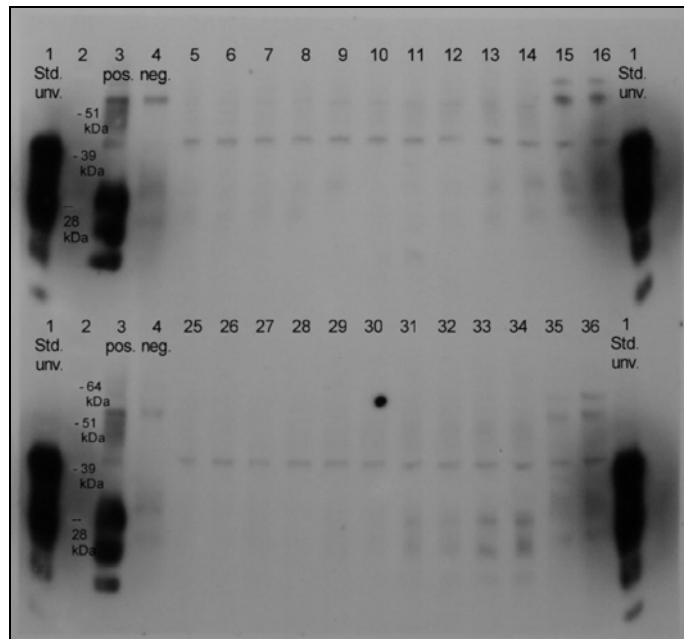


Abbildung 3: 02 04 18

Proben 5 - 16: mesophiler Schlamm

Proben 25 - 36: thermophiler Schlamm

- Detektionsgrenze von PrP^{SC} (bis 19 µg_{Hirnhomogenat} / ml_{Faulschlamm})
- mesophiler und thermophiler Schlamm

Conclusio:

- schlechte Detektion von PrP^{SC}: lediglich 150 - 300 µg /ml sind nachweisbar
- PrP^{SC} ist in themophilem Schlamm geringfügig besser nacheisbar als in mesophilem Schlamm

Versuche:

- *Einfluß der Schlammalterung auf die Detektion von PrP^{SC}*
- *Einfluß von BSA-Zugabe um bessere Mitfällung von PrP^{SC} zu erzielen.*
- *Einfluß von Proteaseinhibitormix (Sigma) um ev. Abbau bei der L.Sarcosinbehandlung zu minimieren*
- *Reduktion der Resuspensionspuffermenge nach der Ethanolfällung*
- *PK-Verdau des Schlamm pellets und Auftrennung um ev. noch vorhandenes PrP^{SC} nachzuweisen.*

Conclusio:

- *PrP^{SC} kann gealtertem Schlamm besser nachgewiesen werden als in neuem (Proben 5 - 17)*
- *BSA-Zugabe verbessert die Detektion von PrP^{SC} beträchtlich (Proben 31 - 36 und Pr. 51 - 56)*
- *Zugabe von Proteaseinhibitormix verbessert die Auflösung bei BSA Anwesenheit (Pr. 51 - 56)*
- *Reduktion der Resuspensionspuffermenge verbessert die Detektionsgrenze (Proben 45 - 56)*
- *In den Schlamm pelletproben konnte PrP^{SC} kaum bzw. schlecht 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+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /1,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /1,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

Inibitormix

(Proteaseinhibitor Cocktail Sigma P2714)
Phiole in 2000 µl Wasser aufgelöst

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

PK-Stock (32 U/mg)

20 mg PK /ml
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK (0,55µg/µl)

28 µl PK-Stock +991 µl
(Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSE

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges.Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH			L.Sarcosin		Inhibitormix		BSA		Verdau puffer [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	in Lsg [µl]	in Lsg [%]	conc [µl]	10% [µl]	conc [%]					
	1 Std Prionics															
	2 Molekularmarker															
	3 SC + 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				100	10	30	
	4 SC - 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				100	10	30	
1	5 / 6 meso alt, Inhib	564,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,532	20	5567,4		100	10	30	
	7 / 8 meso alt, Inhib	578,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,519	20	5432,5		100	10	30	
	9 / 10 meso alt, Inhib	606,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,495	20	5181,5		100	10	30	
	11 / 12 meso neu, Inhib	606,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,495	20	5181,5		100	10	30	
	13 / 14 meso neu, Inhib	606,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,495	20	5181,5		100	10	30	
	15 / 16 meso neu, Inhib	606,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,495	20	5181,5		100	10	30	
	17 neg, meso neu, Inhib	586,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				100	10	30	
2	25 / 26 meso neu	564,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,532				100	10	30	
	27 / 28 meso neu	578,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,519				100	10	30	
	29 / 30 meso neu	606,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,495				100	10	30	
	31 / 32 meso neu, BSA	616,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,487			10,0	0,2	100	10	30
	33 / 34 meso neu, BSA	616,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,487			10,0	0,2	100	10	30
	35 / 36 meso neu, BSA	616,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,487			10,0	0,2	100	10	30
		37 neg, meso neu, Inhib, BSA	616,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,487			10,0	0,2	100	10

		Ges.Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH			L.Sarcosin in Lsg		Inhibitormix conc		BSA 10% conc		Verdau puffer [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[nMol/ml]	[µl]	[%]				
3	45 / 46 meso neu, Inhib,	564,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,532	20	5567,4		50	10	15	
	47 / 48 meso neu, Inhib,	578,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,519	20	5432,5		50	10	15	
	49 / 50 meso neu, Inhib,	606,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,495	20	5181,5		50	10	15	
	51 / 52 meso neu, Inhib, BSA	616,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	53 / 54 meso neu, Inhib, BSA	616,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	55 / 56 meso neu, Inhib, BSA	616,0	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	57 neg, meso neu, Inhib,BSA	616,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
4	65 / 66 Schlamm 9/10												200	20	50	
	67 / 68 Schlamm 15/16												200	20	50	
	69 / 70 Schlamm 29/30												200	20	50	
	71 / 72 Schlamm 35/36												200	20	50	
	73 / 74 Schlamm 49/50												200	20	50	
	75 / 76 Schlamm 55/56												200	20	50	
	77 Schlamm 37												200	20	50	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

56 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M oder Wasser

Schütteln: 10 min RT

(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 5 - 17:

+ L.Sarcosin (10%)

+ Proteaseinhibitor

Proben 25 - 30:

+ L.Sarcosin (10%)

Proben 31 - 37:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

Proben 45 - 50:

+ L.Sarcosin (10%)

+ Proteaseinhibitor

Proben 51 - 57:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

+ Proteaseinhibitor

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku:

1500 µl Ethanol 98% / -17°C vorlegen

gesamten Überstand hinüberleeren

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)

Alle Proben (3 - 77):

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze

resuspendiert und dann Vortexen mit

Pipettenspitze)

+ PK

Shortspin 4s auf 1400 rpm

vortexen

60 min 39°C (Wasserbad: 39°C)

+ 10 µl PMSF

vortexen

+ 15 µl Sample Buffer 5x

vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

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

10 µl Probe

(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+

je 2,5 µl)

Elektrophorese:

35 min 200 V / 400 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in Blockingpuffer

Über Nacht, no shake

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

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

1x 1 min, 4x 3,5 min TBST, fast shake

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

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

Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

40 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

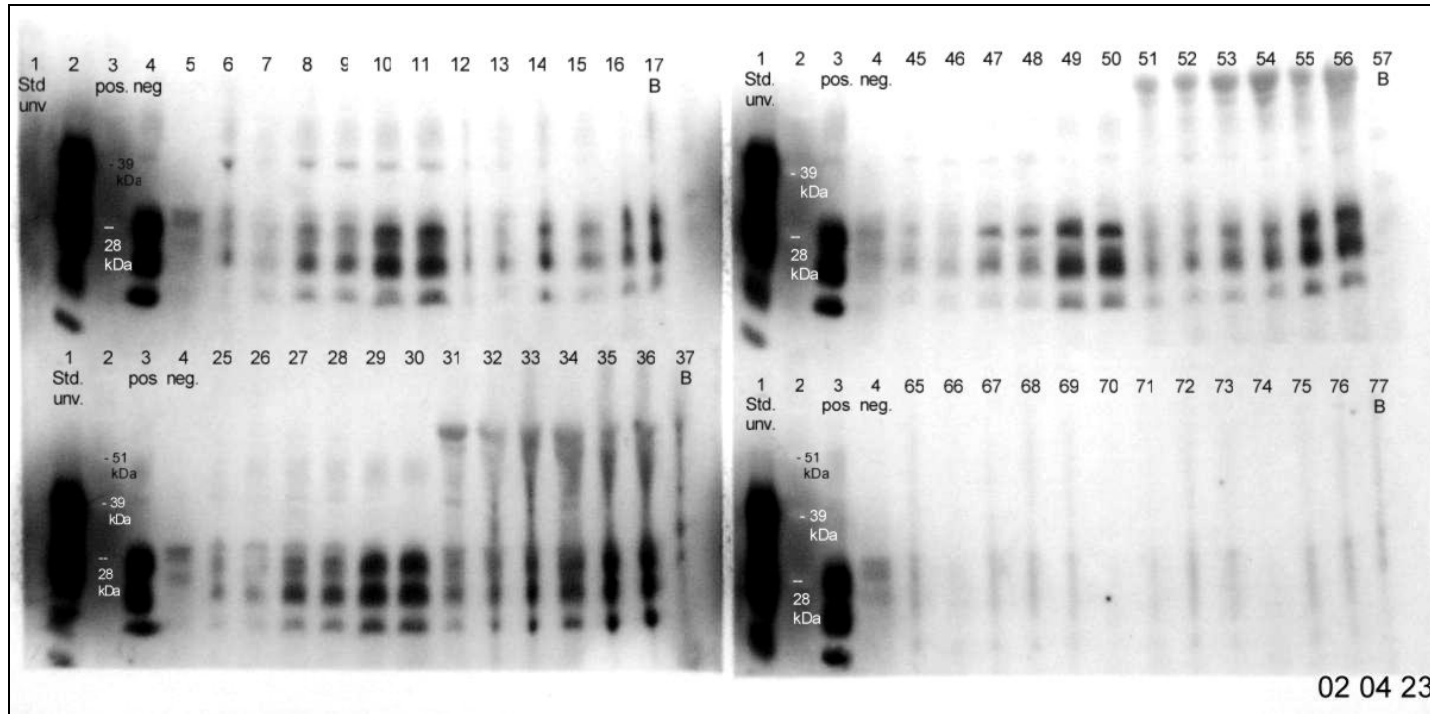


Abbildung 4: 020423

Proben 6 - 10: alt, Inhibitor,
100µl DB

Proben 11 - 16: Inhibitor,
100µl DB

Proben 25 - 30: 100µl DB

Proben 31 - 36: BSA, 100µl
DB

Proben 45 - 50: 50 µl DB

Proben 51 - 56: Inhibitor, BSA
50 µl DB

Proben 65 - 76:

Schlammpellets der Proben

11, 12; 15, 16; 29, 30; 35,
36; 49, 50; 55, 56

Versuche

- Einfluß der Schlammalterung auf die Detektion von PrP^{SC}
- Einfluß von BSA-Zugabe um bessere Mitfällung von PrP^{SC} zu erzielen.
- Einfluß von Proteaseinhibitor (Sigma) um ev. Abbau bei der L.Sarcosinbehandlung zu minimieren
- Reduktion der Resuspensionspuffermenge nach der Ethanol-fällung
- PK-Verdau des Schlammpellets und Auftrennung um ev. noch vorhandenes PrP^{SC} nachzuweisen.

Conclusio:

- PrP^{SC} kann gealtertem Schlamm besser nachgewiesen werden als in neuem (Proben 5 - 17)
- BSA-Zugabe verbessert die Detektion von PrP^{SC} beträchtlich (Proben 31 - 36 und Pr. 51 - 56)
- Zugabe von Proteaseinhibitor verbessert die Auflösung bei BSA Anwesenheit (Pr. 51 - 56)
- Reduktion der Resuspensionspuffermenge verbessert die Detektionsgrenze (Proben 45 - 56)
- In den Schlammpelletproben konnte PrP^{SC} kaum bzw. schlecht nachgewiesen werden

Versuche:

- Homogenisierung mit Glaskugeln um Zellen aufzubrechen (Inkorporiertes PrP^{SC} soll freigesetzt werden)
- Unterschiedliche Glaskugelmenge
- Vergleich Ethanolfällung und Gradientenzentrifugation (OIE-WB)
- Einfluß von BSA und Proteaseinhibitormix

Conclusio:

- Inhibitormix führt zu keiner Verbesserung der Detektion von PrP^{SC}
- BSA verbessert die Detektion die Linien verschmälern sich jedoch (→ intensiveres Singal, verschmierte Banden)
- Glaskugelzugabe führt zu keiner Verschlechterung der Detektion von PrP^{SC}
- Die Gradientenzentrifugation führt im Vergleich zur Ethanolfällung (mit BSA-Zugabe) zu breiteren, saubereren Banden, jedoch auch zu einer schlechteren 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+ /0,07

7 µl HH SC+ /1,0 + 995 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /1,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

Inibitormix

(Proteaseinhibitor Cocktail Sigma P2714)
Phiole in 2000 µl Wasser aufgelöst

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

Glaskugeln

Ø 0,1mm

PK-Stock (32 U/mg)

20 mg PK /ml
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK (0,55µg/µl)

28 µl PK-Stock +991 µl
(Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSE

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges.Vol [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat			L.Sarcosin		Inhibitormix		BSA	BSA	Verdau puffer [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	conc [µl]	[nMol/ml]	10% [µl]				conc [%]
	1 Std Prionics															
	2 Molekularmarker															
	3 SC + 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,518	2518,0	30	0,512				50	10	15	
	4 SC - 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,518	2518,0	30	0,512				50	10	15	
1	5 / 6 meso neu, EtOH	586,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,512				50	10	15	
	7 / 8 meso neu, EtOH	586,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,512				50	10	15	
	9 / 10 meso neu, EtOH	586,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,512				50	10	15	
	11 / 12 meso neu, Inhib, EtOH	606,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,495	20	5181,5		50	10	15	
	13 / 14 meso neu, Inhib, EtOH	606,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,495	20	5181,5		50	10	15	
	15 / 16 meso neu, Inhib, EtOH	606,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,495	20	5181,5		50	10	15	
	17 neg. meso neu, Inhib, EtOH	606,0	500	56	2,500	2,518	2518,0	30	0,495	20	5181,5		50		15	
2	25 / 26 meso neu, BSA, EtOH	596,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,503			10,0	0,2	50	10	15
	27 / 28 meso neu, BSA, EtOH	596,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,503			10,0	0,2	50	10	15
	29 / 30 meso neu, BSA, EtOH	596,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,503			10,0	0,2	50	10	15
	31 / 32 meso neu, Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	33 / 34 meso neu, Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	35 / 36 meso neu, Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	37 neg. meso neu, Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	2,500	2,518	2518,0	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15

		Ges.Vol	AD-M	Hirnhomogenat			L.Sarcosin		Inhibitormix		BSA	BSA	Verdau puffer	PK	SDB		
		[µl]	[µl]	conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	conc [µl]	10% [µl]	conc [%]						
3	45 / 46	0,1g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	47 / 48	0,1g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	49 / 50	0,1g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	51 / 52	0,2g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	53 / 54	0,2g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	55 / 56	0,2g Glask., Inhib, BSA, EtOH	616,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
	57	neg. 0,2g Glask., BSA, EtOH	616,0	500	56	2,500	2,518	2518,0	30	0,487	20	5097,4	10,0	0,2	50	10	15
4	65 / 66	0,2g Glask., Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
	67 / 68	0,2g Glask., Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
	69	0,2g Glask., Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
	71 / 72	Schüttlen, Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,070	0,071	70,5	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
	73 / 74	Schüttlen, Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,150	0,151	151,1	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
	75	Schüttlen, Inhib, Gradient	606,0	500	56	0,300	0,302	302,2	30	0,495	20	5181,5			50	10	15
									1800	880				3000	580	900	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 5 - 10:

+ L.Sarcosin (10%)

Proben 11 - 17; 71 - 75:

+ L.Sarcosin (10%)

+ Proteaseinhibitor

Proben 25 - 30:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

Proben 31 - 37:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

+ Proteaseinhibitor

Proben 45 - 50:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

+ Proteaseinhibitor

+ 0,1 g Glaskugeln (0,1 mm)

Proben 51 - 57:

+ L.Sarcosin (10%)

+ BSA

+ Proteaseinhibitor

+ 0,2 g Glaskugeln (0,1 mm)

Proben 65 - 69:

+ L.Sarcosin (10%)

+ Proteaseinhibitor

+ 0,2 g Glaskugeln (0,1 mm)

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku:
gesamten Überstand mit einer Pipette
überführen

Proben 5 - 57:

1500 µl Ethanol 98% / -17°C

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)

Proben 65 - 75:

in 13 ml Ultrazentrifugationsröhrchen

2,0 ml 20% Sucroselösung vorlegen

Überstand darüberschichten

Röhrchen mit Tris/HCl füllen

Versiegeln

Ultrazentrifugation:

Rotor Ti 70 / 10°C / 51 000 rpm / 150 min

(=122000 xg)

Röhrchen aufstechen

Überstand abziehen

Röhrchen überkopf auf Zellstoff 10 min

stehenlassen

Alle Proben:

Pellet in 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze

resuspendiert und dann Vortexen mit

Pipettenspitze)

Proben 65 - 75:

Überführung in ein 2,0 ml Eppi

Alle Proben:

+ PK

Shortspin 4s auf 1400 rpm

vortexen

40 min 48°C (Wasserbad: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF

vortexen

+ 15 µl Sample Buffer 5x

vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

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

10 µl Probe

(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+ je 2,5 µl)

Elektrophorese

35 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in Blockingpuffer
Über Nacht, no shake

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

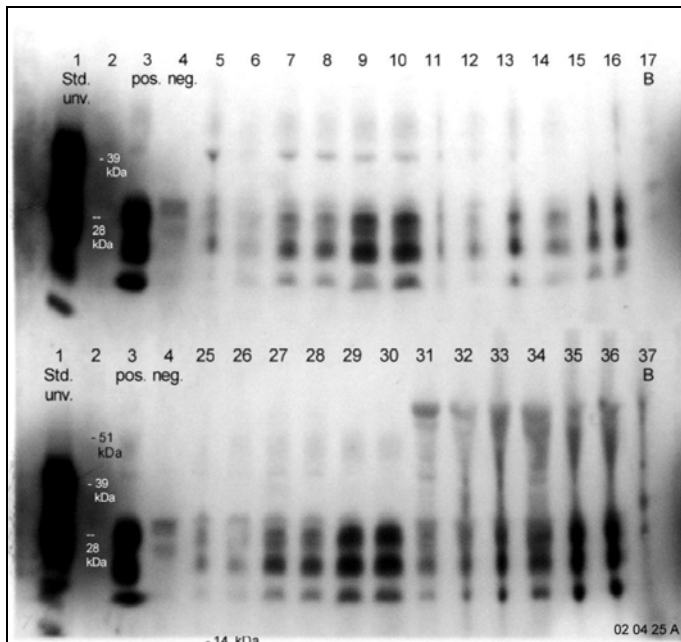
60 min AK II; 1:5000; RTemp. slow shake

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

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

Filmbelichtung

30 min. Expositur / 20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



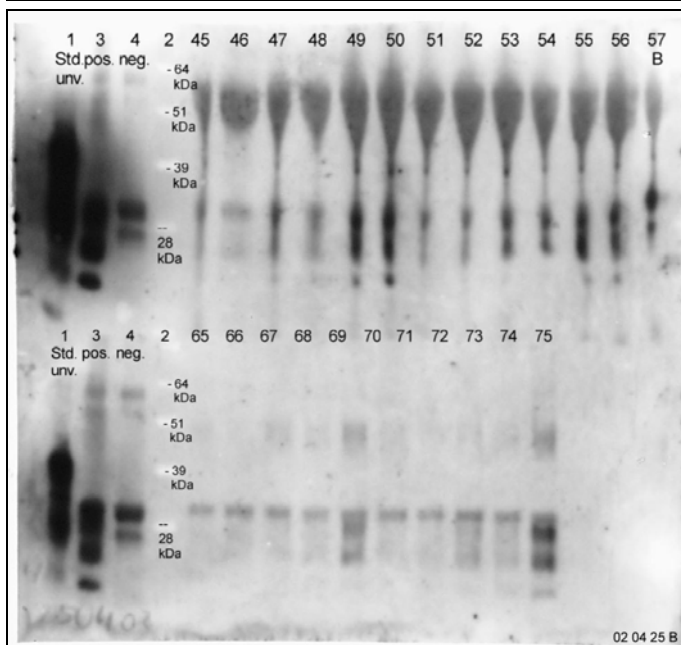
02 04 25 A:

Proben 5 - 10: Ethanol fällung

Proben 11 - 16: Inhibitor, Ethanol fällung

Proben 25 - 30: BSA, Ethanol fällung

Proben 31 - 36: Inhibitor, BSA, Ethanol f.



02 04 25 B

Proben 45 - 50: 0,1g Glaskugeln,
Ethanol fällung

Proben 51 - 56: 0,2g Glaskugeln,
Ethanol fällung

Proben 65 - 69: 0,2g Glaskugeln,
Gradientenzentrifugation

Proben 70 - 75: Gradientenzentrifugation

Abbildung 5: 02 04 25

Versuche:

- Homogenisierung mit Glaskugeln um Zellen aufzubrechen (Inkorporiertes PrP^{SC} soll freigesetzt werden)
- Unterschiedliche Glaskugelmenge
- Vergleich Ethanol fällung und Gradientenzentrifugation (OIE-WB)
- Einfluß von BSA und Proteaseinhibitormix

Conclusio:

- Inhibitormix führt zu keiner Verbesserung der Detektion von PrP^{SC}
- BSA verbessert die Detektion die Linien verschmälern sich jedoch (→ intensiveres Singal, verschmierte Banden)
- Glaskugelzugabe führt zu keiner Verschlechterung der Detektion von PrP^{SC}

Die Gradientenzentrifugation führt im Vergleich zur Ethanol fällung (mit BSA-Zugabe) zu breiteren, saubereren Banden, jedoch auch zu einer schlechteren Detektion von PrP^{SC}.

Versuche:

- Homogenisierung mit Glaskugeln um Zellen aufzubrechen (Inkorporiertes PrP^{SC} soll freigesetzt werden)
- Unterschiedliche Glaskugelmenge (gleiches und halbes Glaskugelvolumen wie Probenvolumen)
- Ausgleich des Volumenverlustes durch die Glaskugeln durch Auswaschen mit Puffer
- Vergleich Ethanol-fällung und Gradientenzentrifugation (OIE-WB)

Conclusio:

- Glaskugelbehandlung führt zu schlechterer Detektion von PrP^{SC}
(Volumenverlust, da das Glaskugel-Faulschlamm-Pellet ein Vol von ca. 500 µl im Vergleich zum Faulschlamm-pellet mit ca. 100 µl aufweist)
- Die Gradientenzentrifugation führt zur gleichen Detektionsgrenze wie die Ethanol-fällung (ist jedoch bedeutend aufwendiger)

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 + 995 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /1,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

Waschpuffer (Tris/HCl + 0,5% Lauroylsarcosin)

20 ml Tris/HCl (pH 7,4)
+ 1,0ml L.Sarco (10%)

PK-Stock (32 U/mg)

20 mg PK /ml
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK (0,55µg/µl)

28 µl PK-Stock +991 µl
(Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat			Gl.Kugeln 0,1mm [mg]	Waschen Tris/HCl [µl]	L.Sarco		Inhibitor		BSA		Resusp. DB [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]			10% [µl]	[%]	conc [µl]	[nmol/µl]	10% [µl]	conc [%]				
1	1 Std Prionics 1µl 2 Molekularmarker 5 µl 3 SC+ 2,5% 4 SC - 2,5%																	
1	5/6 350 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	350	500	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	7/8 350 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	350	500	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	9/10 350 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	350	500	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	11/12 750 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	750	800	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	13/14 750 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	750	800	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	15/16 750 mg GK; 10 µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	750	800	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
	17 neg; 750 mg GK; 10µl BSA; Inh.; EtOH	616,00	500	56	2,500	0,2518	2518,0	750	800	30	0,49	20	5,13	10,00	0,16	50	10	20
2	25/26 750 mg GK; 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	750	800	30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	27/28 750 mg GK; 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	750	800	30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	29/30 750 mg GK; 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	750	800	30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	31/32 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,070	0,0071	70,5			30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	33/34 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,150	0,0151	151,1			30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	35/36 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	0,300	0,0302	302,2			30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
	37 neg 5 µl BSA; Inh.; EtOH	611,00	500	56	2,500	0,2518	2518,0			30	0,49	20	5,17	5,00	0,08	50	10	20
3	45/46 750 mg GK; Inh.; Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	750	800	30	0,50	20	5,21			50	10	20
	47/48 750 mg GK; Inh.; Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	750	800	30	0,50	20	5,21			50	10	20
	49 750 mg GK; Inh.; Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	750	800	30	0,50	20	5,21			50	10	20
	51/12 Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,070	0,0071	70,5			30	0,50	20	5,21			50	10	20
	53/54 Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,150	0,0151	151,1			30	0,50	20	5,21			50	10	20
	55 Gradientenzentrifug.	606,00	500	56	0,300	0,0302	302,2			30	0,50	20	5,21			50	10	20
														210		2000	400	800

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 5 - 30:

+ L.Sarcosin (10%)
+ BSA (10%)
+ Proteaseinhibitor
+ Glaskugeln (0,1 mm)

Proben: 31 - 37:

+ L.Sarcosin (10%)
+ BSA (10%)
+ Proteaseinhibitor

Proben 45 - 49:

+ L.Sarcosin (10%)
+ Proteaseinhibitor
+ Glaskugeln (0,1 mm)

Proben 51 - 55:

+ L.Sarcosin (10%)
+ Proteaseinhibitor

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku:
gesamten Überstand mit einer Pipette
überführen

Pellet Proben 5 - 30; 45 - 49:

+800 µl Waschpuffer
3 x Vortexen
Zentrifugation: 2000 xg / 1 min
Überstand mit erstem Überstand im 2,0ml
Eppi vereinen

Proben 5 - 37:

1000 - 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
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)

Proben 45 - 55:

in 13 ml Ultrazentrifugationsröhrchen
2,0 ml 20% Sucroselösung vorlegen
Überstand darüberschichten
Röhrchen mit Tris/HCl füllen
Versiegeln
Ultrazentrifugation:
Rotor Ti 70 / 10°C / 51 000 rpm / 150 min
(=122000 xg)

Röhrchen aufstechen
Überstand abziehen
Röhrchen überkopf auf Zellstoff 10 min
stehenlassen

Alle Proben:

Pellet in 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

Proben 45 - 55:

Überführung in ein 2,0 ml Eppi

+ PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 48°C (Wasserbad: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 20 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+ je 2,5 µl)

Elektrophorese

35 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in Blockingpuffer
Über Nacht no shake

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

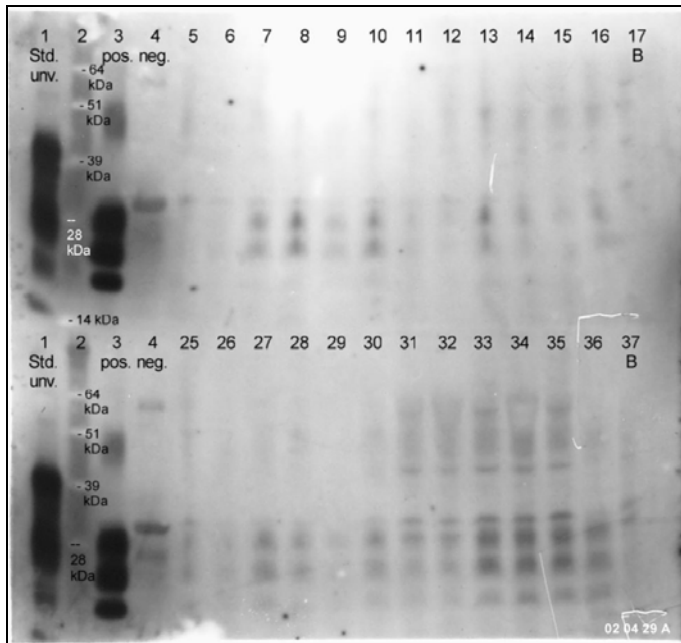
60 min AK II; 1:5000; RTemp. slow shake

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

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

Filmbelichtung

30 min. Expositur / 20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



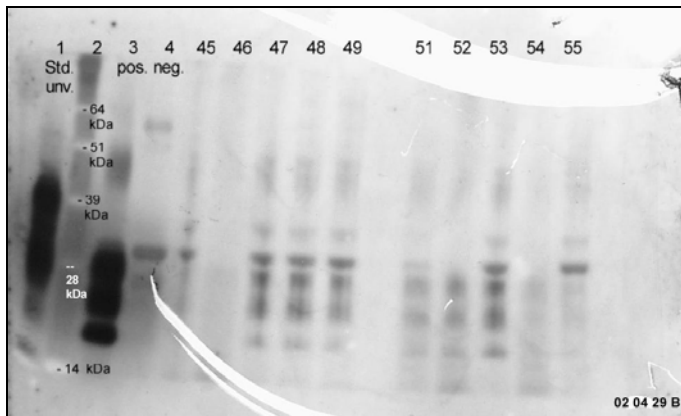
02 04 29 A:

Proben 5 - 10: 500µl Probe +250µl Glaskugeln, waschen des GK-Pellets 0,16% BSA, Ethanol fällung

Proben 11 - 16: 500µl Probe +500µl Glaskugeln, waschen des GK-Pellets 0,16% BSA, Ethanol fällung

Proben 25 - 30: 500µl Probe +500µl Glaskugeln, waschen des GK-Pellets 0,08% BSA, Ethanol fällung

Proben 31 - 36: 500µl Probe Inhibitor, 0,08% BSA, Ethanol fällung



02 04 29 B:

Proben 45 - 49: 500µl Probe +500µl Glaskugeln, waschen des GK-Pellets Gradientenzentrifugation

Proben 51 - 55: Gradientenzentrifugation

Abbildung 6: 02 04 29

Versuche:

- Homogenisierung mit Glaskugeln um Zellen aufzubrechen (Inkorporiertes PrP^{SC} soll freigesetzt werden)
- Unterschiedliche Glaskugelmenge (gleiches und halbes Glaskugelvolumen wie Probenvolumen)
- Ausgleich des Volumenverlustes durch die Glaskugeln durch Auswaschen mit Puffer
- Vergleich Ethanol fällung und Gradientenzentrifugation (OIE-WB)

Conclusio:

- Glaskugelbehandlung führt zu schlechterer Detektion von PrP^{SC} (Volumenverlust, da das Glaskugel-Faulschlamm-Pellet ein Vol von ca. 500 µl im Vergleich zum Faulschlamm pellet mit ca. 100 µl aufweist)
- Die Gradientenzentrifugation führt zur gleichen Detektionsgrenze wie die Ethanol fällung (ist jedoch bedeutend aufwendiger)

Versuche:

- Verdünnungsreihe HH: 19-300 nmol HH/ml_{Faulschlamm}
- PK-Verdünnung: 50 µg/ml; 100 µg/ml
- Inhibitormix (2,6nmol/ml)

Conclusio:

- schlechter Nachweis von PrP^{SC} → Ergebnisse ? (300 nmol sollten auf jeden Fall nachweisbar sein)
- Überverdau?

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 + 995 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /1,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /1,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM (Schlamm)

mesophil

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

PK-Stock

5 mg PK (32 U) in 250µl
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK

28 µl PK-Stock ad 509 µl
(Endconc. in Probe: 100 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

		Vol. [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat				L.Sarco		Inhibitor		BSA		Resusp. DB [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [ng/ml]	10% [µl]	[%]	conc [µl]	[nmol/µl]	10% [µl]	conc [%]				
	1	Std Prionics 1µl															
	2	Molekularmarker 5 µl															
	3	SC+ 2,5%															
	4	SC - 2,5%															
1	5/6	15 µl BSA; 0,55 PK	559,00	500	14	0,070	0,0019	19,1	30	0,54		15,00	0,27	50	5	20	
	7/8	15 µl BSA; 0,55 PK	573,00	500	28	0,070	0,0037	37,1	30	0,52		15,00	0,26	50	5	20	
	9/10	15 µl BSA; 0,55 PK	601,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	30	0,50		15,00	0,25	50	5	20	
	11/12	15 µl BSA; 0,55 PK	601,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	30	0,50		15,00	0,25	50	5	20	
	13/14	15 µl BSA; 0,55 PK	601,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	30	0,50		15,00	0,25	50	5	20	
	15/16	<i>neg. 15 µl BSA; 0,55 PK</i>	601,00	500	56	2,500	0,2518	2518,0	30	0,50		15,00	0,25	50	5	20	
	17	SC+ 2,5%															
2	25/26	15 µl BSA; 1,10 PK;	559,00	500	14	0,070	0,0019	19,1	30	0,54		15,00	0,27	50	10	20	
	27/28	15 µl BSA; 1,10 PK;	573,00	500	28	0,070	0,0037	37,1	30	0,52		15,00	0,26	50	10	20	
	29/30	15 µl BSA; 1,10 PK;	601,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	30	0,50		15,00	0,25	50	10	20	
	31/32	15 µl BSA; 1,10 PK;	601,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	30	0,50		15,00	0,25	50	10	20	
	33/34	15 µl BSA; 1,10 PK;	601,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	30	0,50		15,00	0,25	50	10	20	
	35/36	<i>neg.; 5 µl BSA; Inh.;</i>	601,00	500	56	2,500	0,2518	2518,0	30	0,50		15,00	0,25	50	10	20	
	37	SC+ 2,5%															
3	45/46	15 µl BSA; 10 µl Inh.; 1,10 PK;	569,00	500	14	0,070	0,0019	19,1	30	0,53	10	2,78	15,00		50	10	20
	47/48	15 µl BSA; 10 µl Inh.; 1,10 PK;	583,00	500	28	0,070	0,0037	37,1	30	0,51	10	2,71	15,00		50	10	20
	49/50	15 µl BSA; 10 µl Inh.; 1,10 PK;	611,00	500	56	0,070	0,0071	70,5	30	0,49	10	2,59	15,00		50	10	20
	51/12	15 µl BSA; 10 µl Inh.; 1,10 PK;	611,00	500	56	0,150	0,0151	151,1	30	0,49	10	2,59	15,00		50	10	20
	53/54	15 µl BSA; 10 µl Inh.; 1,10 PK;	611,00	500	56	0,300	0,0302	302,2	30	0,49	10	2,59	15,00		50	10	20
	55/56	<i>neg.; 15 µl BSA; 10µl Inh.; 1,10 PK;</i>	611,00	500	56	2,500	0,2518	2518,0	30	0,49	10	2,59	15,00		50	10	20
57	SC+ 2,5%																

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L.Sarcosin (10%) \perp
+ BSA (10%) \perp gemeinsam

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesammter Überstand hinübergeleert
40 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 3000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 48°C (Wasserbad: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 20 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
(Marker 5 µl, Std.Prionics und SC+ je 2,5 µl)

Elektrophorese

35 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST
Über Nacht 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
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

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

Filmbelichtung

10 min. Expositur / 60 sek. Entwicklung
30 min. Expositur / 20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

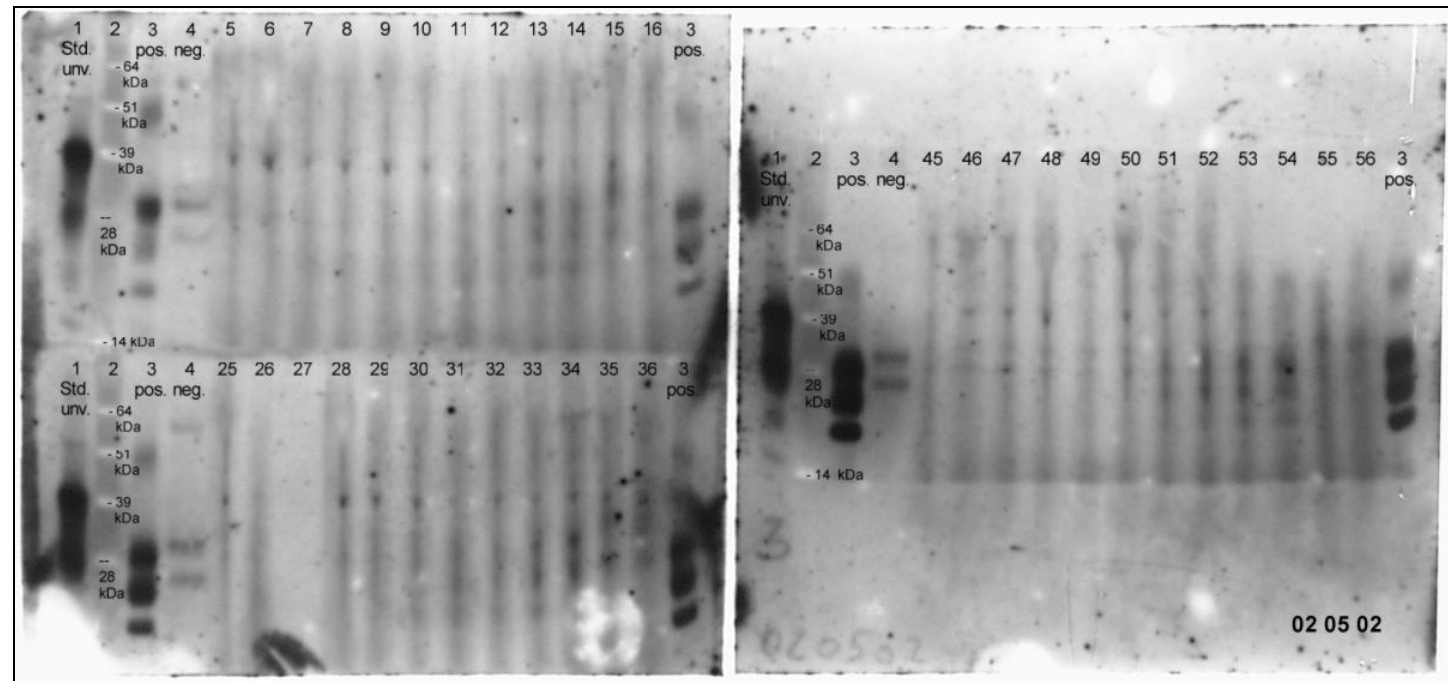


Abbildung 7: 02 05 02

Versuche:

- Verdünnungsreihe HH: 19-300 nmol HH/ml_{Faulschlamm}
- PK-Verdünnung: 50 µg/ml; 100 µg/ml
- Inhibitormix (2,6nmol/ml)

Conclusio:

- schlechter Nachweis von PrP^{SC} → Ergebnisse ? (300 nmol sollten auf jeden Fall nachweisbar sein)
- Überverdau?

Versuche:

- *Einfluß von Phospholipase D (ev. bessere Auflösung)*

Conclusio:

- Phospholipase verbessert die Nachweisgrenze von PrP^{SC} nicht.
- *Zugabe von L.Sarcosin gemeinsam mit P.Lipase führt zu schlechtem Ergebnis (P.Lipase spaltet möglicherweise L.Sarcosin); (Proben 5-16)*
- *Zugabe von Proteaseinhibitormix nach der L.Sarcosinbehandlung und nachfolgende P.Lipasebehandlung führt zu den selben Ergebnissen wie ohne P.Lipase D (Proben 65-76)*
- *In wässriger Verdünnung von HH hat P.Lipase D keinen Einfluß auf die Detektion. (Pr. 45 -57)*
- *Überladung von BSA hat keinen Einfluß auf die breite der Linie (Pr. 45 -57)*

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 / thermophil alt: 22.04.02;
mesophil/thermophil neu: 06.05.2002)

P.LipaseD (Phospholipase D; Sigma P 8023)

1Flasche (20.000 U) in 1000µl Wasser

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

PK-Stock

5 mg PK (32 U) in 250µl
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK

28 µl PK-Stock ad 509 µl
(Endconc. in Probe: 100 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 (?) mM PMSF in i-Propanol

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat			L.Sarco		P.LipaseD		BSA		Verdau- puffer [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	20000U/ml [U/ml]	10% [µl]	conc [%]					
	1 Std Prionics															
	2 Molekularmarker															
	3 SC + 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				50	10	20	
	4 SC - 2,5%	586,0	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				50	10	20	
1	5 / 6 meso neu; P.ase.D 1:250; BSA	603,4	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	7 / 8 meso neu, P.ase.D 1:250; BSA	603,4	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	9 / 10 meso neu, P.ase.D 1:250; BSA	603,4	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	11 / 12 meso neu; P.ase.D 1:100; BSA	607,1	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,494	6,1	201,0	15,0	0,2	50	10	20
	13 / 14 meso neu; P.ase.D 1:100; BSA	607,1	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,494	6,1	201,0	15,0	0,2	50	10	20
	15 / 16 meso neu; P.ase.D 1:100; BSA	607,1	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,494	6,1	201,0	15,0	0,2	50	10	20
	17 neg.; meso neu P.ase.D 1:100; BSA	607,1	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,494	6,1	201,0	15,0	0,2	50		20
2	25 / 26 meso neu, BSA	601,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	27 / 28 meso neu, BSA	601,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	29 / 30 meso neu, BSA	601,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	31 / 32 meso alt, BSA	601,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	33 / 34 meso alt, BSA	601,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	35 / 36 meso alt, BSA	601,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
		37 neg. meso neu, BSA	601,0	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,499			15,0	0,2	50	10

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat			L.Sarco		P.LipaseD		BSA		Verdau- puffer [µl]	PK [µl]	SDB [µl]		
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	20000U/ml [U/ml]	10% [µl]	conc [%]						
3	45 / 46	Wasser; P.ase.D 1:250, BSA	603,4	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	47 / 48	Wasser; P.ase.D 1:250, BSA	603,4	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	49 / 50	Wasser; P.ase.D 1:250, BSA	603,4	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	51 / 52	Wasser; BSA	601,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	53 / 54	Wasser; BSA	601,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	55 / 56	Wasser; BSA	601,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	57	neg. Wasser; P.ase.D 1:250, BSA	603,4	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
4	65 / 66	Inhib., meso neu, BSA	603,4	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	67 / 68	Inhib., meso neu, BSA	603,4	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	69 / 70	Inhib., meso neu, BSA	603,4	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
	71 / 72	meso neu ; P.ase.D 1:250, Inhib., BSA	601,0	500	56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	73 / 74	meso neu ; P.ase.D 1:250, Inhib., BSA	601,0	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	75 / 76	meso neu ; P.ase.D 1:250, Inhib., BSA	601,0	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499			15,0	0,2	50	10	20
	77	neg. meso neu; BSA	603,4	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,497	2,4	79,5	15,0	0,2	50	10	20
									1380	82,4	630	2300	440	920			

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 5-16; 45-50:

+ L.Sarcosin (10%) \perp
+ BSA (10%) \perp gemeinsam
+ P.Lipase D

Proben 25-36; 51-56; 71-76:

+ L.Sarcosin (10%) \perp
+ BSA (10%) \perp gemeinsam

Proben 65-70:

+ L.Sarcosin (10%) \perp
+ BSA (10%) \perp gemeinsam
+ Proteaseinhibitormix

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Proben 71-76

+P.Lipase D
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm

Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesammter Überstand hinübergeleert
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 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 48°C (Wasserbad: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 20 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe
(Marker 3,5 µl, Std.Prionics und SC+ je 2,5 µl)

Elektrophorese

35 min 200 V / 400 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
1x 30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST
Über Nacht no shake

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

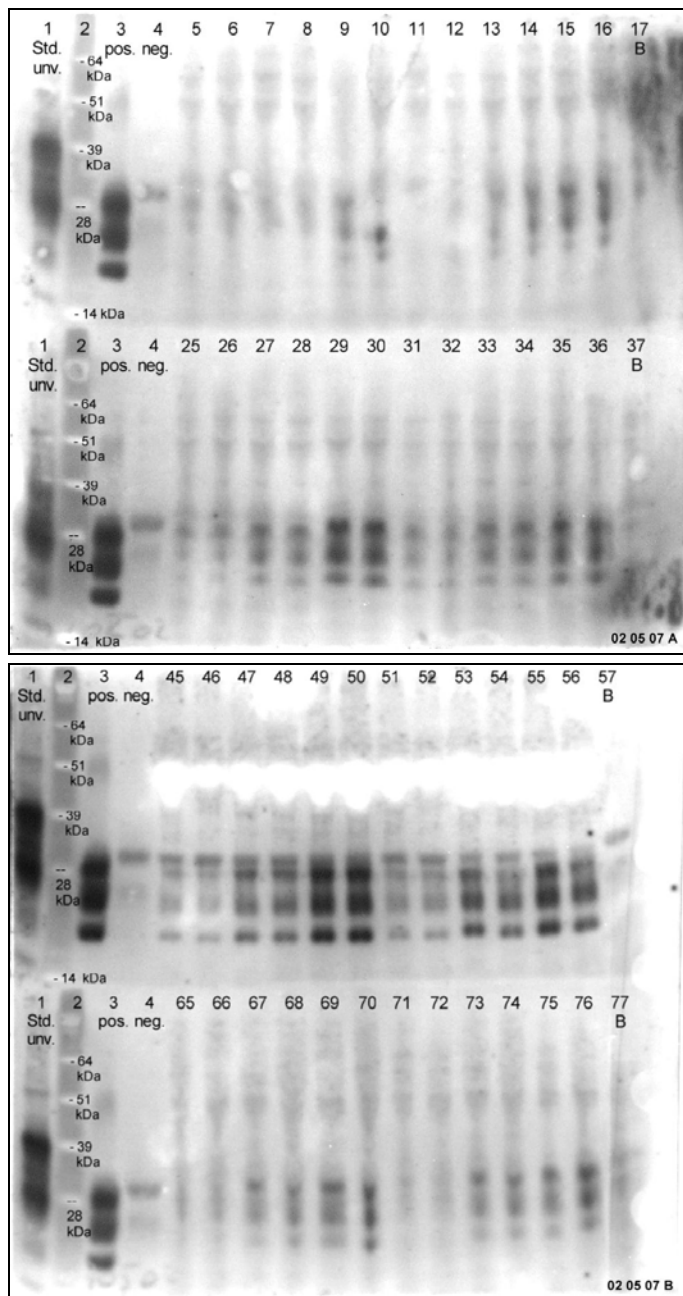
60 min AK II; 1:5000; RTemp. slow shake

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

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

Filmbelichtung

10 min. Expositor / 60 sek. Entwicklung
30 min. Expositor / 20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



02 05 07 A:

Proben 5 - 10: Phospholipase 1:250,
BSA

Proben 11 - 16: Phospholipase 1:100,
BSA

Proben 25 - 30: mesophil neu, BSA

Proben 31 - 36: mesophil alt, BSA

02 05 07 B:

Proben 45 - 50: Wasser, Phospho-
lipase 1:250, BSA

Proben 51 - 56: Wasser, BSA

Proben 65 - 70: Inhibitor, BSA

Proben 71 - 76: Inhibitor, Phospho-
lipase 1: 250, BSA

Abbildung 8: 02 05 07

Versuche:

- *Einfluß von Phospholipase D (ev. bessere Auflösung)*

Conclusio:

- *Phospholipase verbessert die Nachweisgrenze von PrP^{SC} nicht.*
- *Zugabe von L.Sarcosin gemeinsam mit P.Lipase führt zu schlechtem Ergebnis (P.Lipase spaltet möglicherweise L.Sarcosin); (Proben 5-16)*
- *Zugabe von Proteaseinhibitormix nach der L.Sarcosinbehandlung und nachfolgende P.Lipasebehandlung führt zu den selben Ergebnissen wie ohne P.Lipase D (Proben 65-76)*
- *In wässriger Verdünnung von HH hat P.Lipase D keinen Einfluß auf die Detektion. (Pr. 45 -57)*
- *Überladung von BSA hat keinen Einfluß auf die breite der Linie (Pr. 45 -57)*

Versuche:

- Verdünnungsreihe AD-M;
- alter/neuer mesophiler/thermophiler Schlamm

Conclusio:

- in thermophilem Schlamm schlechtere Auflösung
- geringere AD-M Menge führen zu besserer Auflösung! (100%<50%<10%)
- alter Schlamm gibt geringfügig bessere Auflösung als neuer Schlamm

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+ /0,05

5 µl HH SC+ /1,0 + 995 µl Wasser

HH SC+ /0,10

10 µl HH SC+ /1,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,20

20 µl HH SC+ /1,0 + 980 µl Wasser

HH SC+ /2,50

250 µl HH SC+ /1,0 + 750 µl Wasser

ADM

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(mesophil / thermophil alt: 22.04.02;
mesophil/thermophil neu: 06.05.2002)

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500 µl Wasser

PK-Stock 20mg/ml

5 mg PK (32 U)
in 250µl 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK

28 µl PK-Stock + 481 µl Tris/HCl
(Endconc. in Probe: 100 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSE

200 mM PMSF in i-Propanol (?)

		Vol. [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	HH			L.Sarco		BSA		Digestio Resusp. [µl]	PK [µl]	SDB [µl]	
					conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	in Lsg [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[%]				
	1 Std Prionics														
	2 Molekularmarker														
	3 SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512		50	10	20	
	4 SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512		50	10	20	
1	5 / 6 meso neu 0,5	593	250	250	56	0,050	0,0504	50,36	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	7 / 8 meso neu 0,5	593	250	250	56	0,100	0,1007	100,72	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	9 / 10 meso neu 0,5	593	250	250	56	0,200	0,2014	201,44	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	11 / 12 meso neu 0,1	593	50	450	56	0,050	0,0915	91,50	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	13 / 14 meso neu 0,1	593	50	450	56	0,100	0,1830	183,01	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	15 / 16 meso neu 0,	593	50	450	56	0,200	0,3660	366,01	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	17 neg meso neu 0,1	593	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,506	7	0,1	50	10	20
2	25 / 26 meso neu	593	500		56	0,050	0,2642	264,15	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	27 / 28 meso neu	593	500		56	0,100	0,5283	528,30	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	29 / 30 meso neu	593	500		56	0,200	1,0566	1056,60	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	31 / 32 meso alt	593	500		56	0,050	0,0504	50,36	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	33 / 34 meso alt	593	500		56	0,100	0,1007	100,72	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	35 / 36 meso alt	593	500		56	0,200	0,2014		30	0,506	7	0,1	50	10	20
	37 neg meso neu	593	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,506	7	0,1	50	10	20
	3	45 / 46 thermo neu	593	500		56	0,050	0,0504	50,36	30	0,506	7	0,1	50	10
47 / 48 thermo neu		593	500		56	0,100	0,1007	100,72	30	0,506	7	0,1	50	10	20
49 / 50 thermo neu		593	500		56	0,200	0,2014	201,44	30	0,506	7	0,1	50	10	20
51 / 52 thermo alt		593	500		56	0,050	0,0504	50,36	30	0,506	7	0,1	50	10	20
53 / 54 thermo alt		593	500		56	0,100	0,1007	100,72	30	0,506	7	0,1	50	10	20
55 / 56 thermo alt		593	500		56	0,200	0,2014	201,44	30	0,506	7	0,1	50	10	20
57 Neg thermo neu		593	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,506	7	0,1	50	10	20

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %)
BSA (10%)
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesammter Überstand hinübergeleert
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 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 48°C (Wasserbad: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 20 µl Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

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

10 µl Probe
(Marker 3,5 µl, Std.Prionics und SC+ je 2,5 µl)

Elektrophorese

37 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

1x 30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST

1 h, RT, slow shake

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

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

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

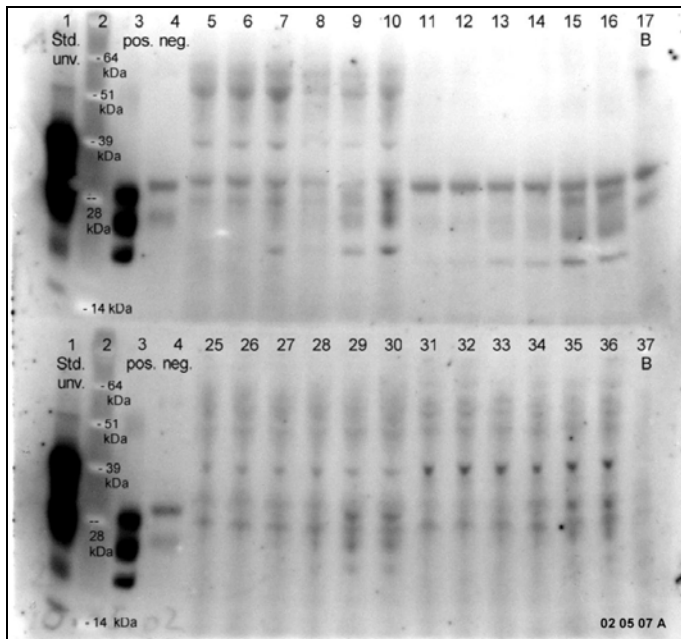
5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

10 min. Expositur

60 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung



02 05 10 A

Proben 5 - 10:

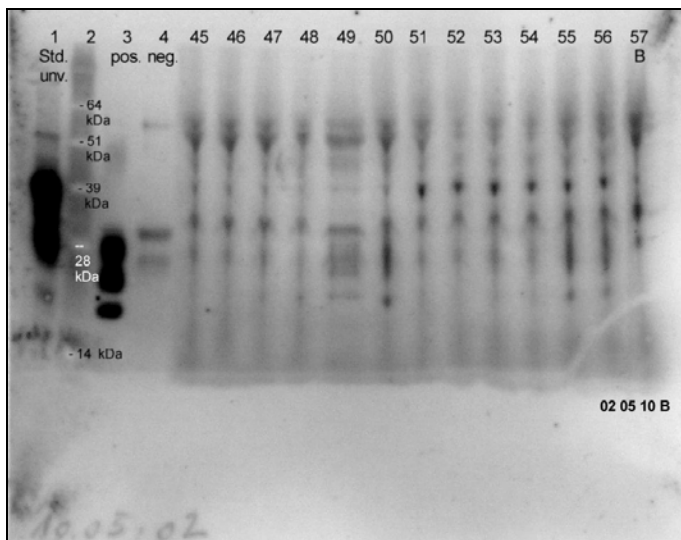
50% mesophil neu, 50% Wasser

Proben 11 - 16:

10% mesophil neu, 90% Wasser

Proben 25 - 30: 100% mesophil neu

Proben 31 - 36: mesophil alt



02 05 10 B

Proben 45 - 50: thermophil neu

Proben 51 - 56: thermophil alt

Abbildung 9: 02 05 10

Versuche:

- Verdünnungsreihe AD-M;
- alter/neuer mesophiler/thermophiler Schlamm

Conclusio:

- in thermophilem Schlamm schlechtere Auflösung
- geringere AD-M Menge führen zu besserer Auflösung! (100%<50%<10%)
- alter Schlamm gibt geringfügig bessere Auflösung als neuer Schlamm

Versuche:

- *Einfluß der Konz von BSA, PK und L.Sarcosin auf mesophilem und thermophilem Schlamm*
- *PK: 100µg/ml, 50 µg/ml (= 3,0 bzw. 1,5 U/ml)*
- *BSA: 0,1% u. 0,2%*
- *Laurylsarcosin: 0,5% und 1,0% zum Ablösen von PrP^{SC}*

Conclusio:

- *kein PrP^{SC}-Nachweis (??)*
- *starkes Hintergrundrauschen (Auffrischen der Entwicklerlösung?)*
- *BSA schlecht verdaut → PK-Lösung nicht stabil (?), Einwaage im mg-Bereich nicht möglich*
- *Schlechterer Verdau von BSA aus dem Proben mit thermophilem Schlamm (Pr. 51-56)*
- *Doppelter L.Sarcosinmenge führt zu keiner besseren Ablösung von PrP^{SC} (Proben 45-57)*

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+ /10,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADMm

Schlamm mesophil

BSA

0,15g BSA (Fraktion V; Sigma)
in 1500µl Wasser

L.Sarco

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

PK-Stock 10 mg/ml

30 mg PK (32 U) in 3000µl
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK 50 (soll-Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

11 µl PK-Stock + 189 µl Tris/HCl (= 0,55
µg/µl)

PK 100 (soll-Endconc. in Probe: 100 µg PK/ml)

77 µl PK-Stock + 623 µl Tris/HCl (= 1,11
µg/µl)

Verdaupuffer

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

PMSF

200 mM PMSF in i-Propanol

Mi. 15.05.2002		Vol.	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			L.Sarco		BSA		Verdau	Proteinase KK			PMSF	SDB		
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	conc [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	conc [%]	puffer [µl]	conc [µg/µl]	Probe [µg/ml]	30 U/mg [U/ml]	10 µl [mMol]	[µl]	
1	Std Prionics																		
2	Molekularmarker																		
3	SC + 2,5%	586,0		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			50	10	1,1	100	3,0	200	20
4	SC - 2,5%	586,0		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			50	10	1,1	100	3,0	200	20
1	5 / 6 meso	601,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	7 / 8 meso	601,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	9 / 10 meso	601,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	11 / 12 meso, BSA 0,5; PK 0,5	593,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,506	7,0	0,1	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	13 / 14 meso, BSA 0,5; PK 0,5	593,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,506	7,0	0,1	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	15 / 16 meso, BSA 0,5; PK 0,5	593,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,506	7,0	0,1	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	17 neg meso 0,1	601,0	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,499	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
2	25 / 26 meso; PK 0,5	601,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15,0	0,2	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	27 / 28 meso; PK 0,5	601,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15,0	0,2	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	29 / 30 meso; PK 0,5	601,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499	15,0	0,2	50	10	0,55	50	1,5	200	20
	31 / 32 meso; BSA 0,5	593,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,506	7,0	0,1	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	33 / 34 meso; BSA 0,5	593,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,506	7,0	0,1	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	35 / 36 meso; BSA 0,5	593,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,506	7,0	0,1	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	37 neg. meso, PK 0,5; BSA	601,0	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,499	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
3	45 / 46 meso; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	47 / 48 meso; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	49 / 50 meso; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	51 / 52 thermo; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,070	0,0705	70,50	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	53 / 54 thermo; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,150	0,1511	151,08	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	55 / 56 thermo; Sarco 1,0	631,0	500		56	0,300	0,3022	302,16	60	0,951	15,0	0,2	50	10	1,1	100	3,0	200	20
	57 neg. meso, PK 0,5; BSA	631,0	500		56	2,500	2,5180	2517,99	60	0,951	15,0	0,2	50	10	0,55	50	1,5	200	20

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %) + BSA (10%) (Aliquote Mischung)
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesamnter Überstand hinübergelert
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 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze resuspendiert und dann Vortexen mit Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ PMSF (200mM)
vortexen

+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

10 µl in SDS-Gel
(Marker, Std.Prionics und SC+ je 5 µl)
NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

37 min 200 V / 250 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:25000 in TBST
über Nacht, no shake

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

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

1x 1 min, 4x 3,5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

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

Filmbelichtung:

10 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

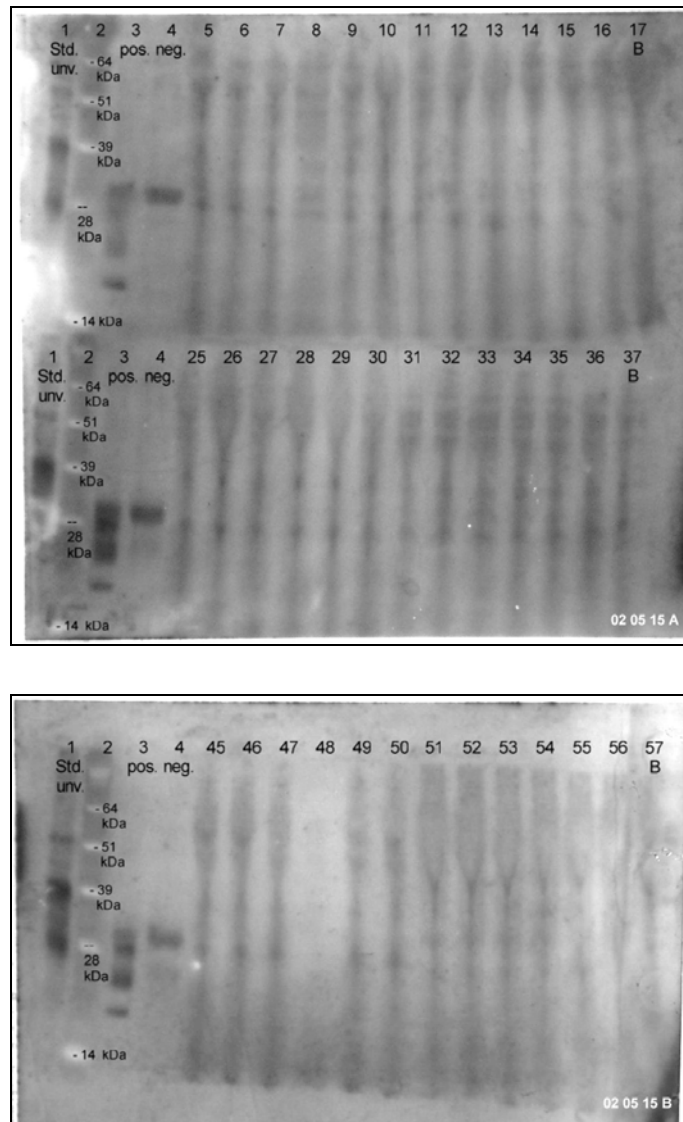


Abbildung 10: 02 05 15

Versuche:

- *Einfluß der Konz von BSA, PK und L.Sarcosin auf mesophilem und thermophilem Schlamm*
- *PK: 100µg/ml, 50 µg/ml (= 3,0 bzw. 1,5 U/ml)*
- *BSA: 0,1% u. 0,2%*
- *Laurylsarcosin: 0,5% und 1,0% zum Ablösen von PrP^{SC}*

Conclusio:

- *kein PrP^{SC}-Nachweis*
- *starkes Hintergrundrauschen (Auffrischen der Entwicklerlösung?)*
- *BSA schlecht verdaut → PK-Lösung nicht stabil (?), Einwaage im mg-Bereich nicht möglich*
- *Schlechterer Verdau von BSA aus dem Proben mit thermophilem Schlamm (Pr. 51-56)*
- *Doppelter L.Sarcosinmenge führt zu keiner besseren Ablösung von PrP^{SC} (Proben 45-57)*

Versuche:

- Vergleich: alter, neuer mesophiler und neuer thermophiler Schlamm.
- Vergl. oftmalig aufgetautes Hirnhomogenat und erstmalig aufgetautes HH.

Conclusio:

- Doppelte Menge PMSF (22,8 µmol/ml) in i-Prop. als Verdaustopf führt zu schlechterem Ergebnis (Proben 10, 16, 30, 36)
- Thermophiler Schlamm gibt schlechteres Ergebnis, auch schlechterer Verdau des BSA
- Hirnhomogenatqualität (oftmalig aufgetaut) hat nur geringen Einfluß.

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+ /10,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl
Wasser

AD-M

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhren
(mesophil / thermophil: 22.05.02)

L.Sarco

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

BSA

0,15 g BSA (Fraktion V; Sigma)

PK-Stock 5mg/ml

30mg PK (32 U) in 6000µl
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK 100 (soll-Endkonz. in Probe: 100 µg PK/ml)

222 µl PK-Stock + 280 µl Tris/HCl
(= 2,22 µg/µl)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	Hirnhomogenat			L.Sarcosin		BSA		Digestio		PK		SDB [µl]	PMSF 200mM [µl]	PMSF [µM/ml]	
					conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[%]	Resusp. [µl]	Ges. Vol [µl]	conc [µg/ml]					
	1 Std Prionics																		
	2 Molekularmarker																		
	3 SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			85	150	15	110	30	10	11,43
	4 SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			85	150	15	110	30	10	11,43
1	5 / 6 meso neu; HH neu	601	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	7 / 8 meso neu; HH neu	601	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	9 / 10 meso neu; HH neu	601	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	11 / 12 meso alt; HH neu	601	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	13 / 14 meso alt; HH neu	601	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	15 / 16 meso alt; HH neu	601	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	17 neg meso neu	601	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
2	25 / 26 thermo neu; HH neu	601	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	27 / 28 thermo neu; HH neu	601	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	29 / 30 thermo neu; HH neu	601	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	31 / 32 meso neu; HH alt	601	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	33 / 34 meso neu; HH alt	601	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	35 / 36 meso neu; HH alt	601	500		56	0,300	0,3022		30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43
	37 neg meso neu; HH alt	601	500		56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,499	15	0,2	85	150	15	110	30	10	11,43

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %) + BSA (10%) gemeinsam
vorher aliquot gemischt
(15 µl BSA und 30 µl L.Sarco)

Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesammter Überstand hinübergeleert
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 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen

40 min 48°C
(Wasserbadtemp: 48,5°C)

+ 10 µl PMSF (100 mM)
Proben 10, 16, 30, 36:
je 20 µl PMSF
vortexen

+ Sample Buffer 5x
vortexen

10 min / 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

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

Elektrophorese
37 min 200 V / 180 mA, MOPS

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

Blot:
60 min 30 V / 200 mA, Transferpuffer

Membran:
20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST
über Nacht, no shake

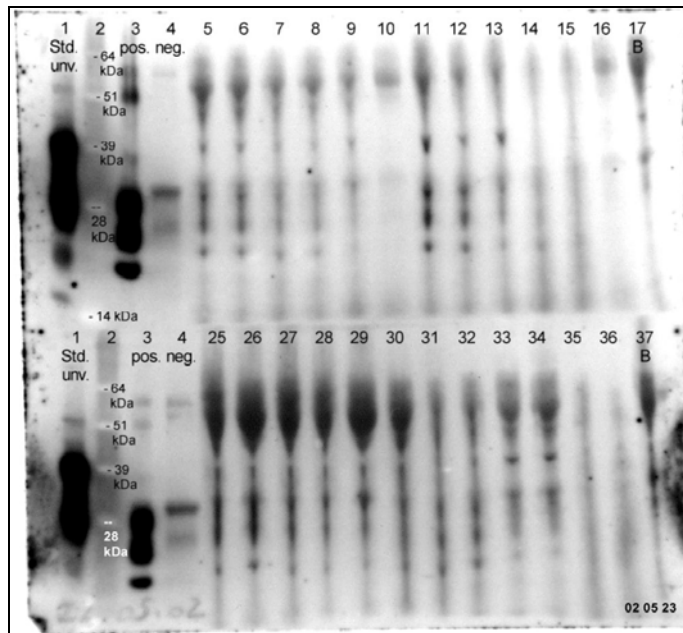
1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake

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

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

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

Filmbelichtung:
10 min. Expositur
60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



02 05 23:

Proben 5 -10: mesophil neu,
Hirnhomogenat neu

Proben 11 - 16: mesophil alt,
Hirnhomogenat neu

Proben 25 - 30: thermophil neu,
Hirnhomogenat neu

Proben 31 - 36: mesophil neu,
Hirnhomogenat alt

Proben 10, 16, 30, 36:
doppelte Menge PMSF

Abbildung 11: 02 05 23

Versuche:

- Vergleich: alter, neuer mesophiler und neuer thermophiler Schlamm.
- Vergl. oftmalig aufgetautes Hirnhomogenat und erstmalig aufgetautes HH.

Conclusio:

- Doppelte Menge PMSF (22,8 $\mu\text{mol/ml}$) in *i*-Prop. als Verdaustopp führt zu schlechterem Ergebnis (Proben 10, 16, 30, 36)
- Thermophiler Schlamm gibt schlechteres Ergebnis, auch schlechterer Verdau des BSA
- Hirnhomogenatqualität (oftmalig aufgetaut) hat nur geringen Einfluß.

Versuche:

- Vergleich mesophiler bzw. thermophiler Schlamm und Wasser
- Verdünnungsreihe 37 - 600 ng_{HH}/ml_{FS}

Conclusio:

- Zentrifugation nach Ethanolpräzipitation: nicht mehr als 2000 xg – sonst ist BSA-Pellet schlecht resuspendierbar
- Banden sind schlecht getrennt und zusammengezogen
- Wasserverdünnungsreihe: BSA schlecht verdaut, z.T schlecht verdaute Proben; z.T. überverdaut (PMSF)

Überprüfung von:

- PMSF- Zugabe bei der Lauryl-Sarcosinbehandlung.
- PK/PMSF-Verhältnis und Menge überprüfen.

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+ /0,035

500 µl HH SC+ /0,07 + 500 µl Wasser

HH SC+ /0,07

7 µl HH SC+ /10,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(mesophil / thermophil alt: 22.05.02)

PK-Stock

30mg PK (32 U) in
6000µl 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK

160 µl PK-Stock ad 800 µl
(soll-Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

			Ges.	AD-M	Wasser	HH				Sarco		BSA		Digest.	Vol.	PK		SDB
			Vol.				conc	in AD-M	in AD-M	10%	in Lsg	10%		Resusp	nach		conc	
			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[ng/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]
	1	Std Prionics																
	2	Molekularmarker																
	3	SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			85	150	15	100	30
	4	SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512			85	150	15	100	30
1	5 / 6	meso	593	500		56	0,035	0,0371	37,12	30	0,531	7	0,1	85	150	15	100	30
	7 / 8	meso	593	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	9 / 10	meso	593	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	11 / 12	meso	593	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	13 / 14	meso	593	500		56	0,600	0,6043	604,32	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	15 / 16	meso neg.	593	500		56	1,250	1,2590	1258,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	17	SC + 2,5%	593		500	56	2,500	25,0000	2517,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
2	25 / 26	thermo	593	500		56	0,035	0,0371	37,12	30	0,531	7	0,1	85	150	15	100	30
	27 / 28	thermo	593	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	29 / 30	thermo	593	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	31 / 32	thermo	593	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	33 / 34	thermo	593	500		56	0,600	0,6043	604,32	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	35 / 36	thermo neg.	593	500		56	1,250	1,2590	1258,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	37	SC + 2,5%	593		500	56	2,500	25,0000	2517,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30

			Ges.	AD-M	Wasser	HH			Sarco		BSA		Digest.	Vol.	PK		SDB	
			Vol.			conc	in AD-M	in AD-M	10%	in Lsg	10%		Resusp	nach		conc		
			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[ng/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]
3	45 / 46	wasser	593		500	56	0,035	0,7000	37,12	30	0,531	7	0,1	85	150	15	100	30
	47 / 48	wasser	593		500	56	0,070	0,7000	70,50	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	49 / 50	wasser	593		500	56	0,150	1,5000	151,08	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	51 / 52	wasser	593		500	56	0,300	3,0000	302,16	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	53 / 54	wasser	593		500	56	0,600	6,0000	604,32	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	55 / 56	wasser neg.	593		500	56	1,250	12,5000	1258,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
	57	SC + 2,5%	593		500	56	2,500	25,0000	2517,99	30	0,506	7	0,1	85	150	15	100	30
										1380		294		3910		690		1380
										1200	40	280						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %) + BSA (10%) gemeinsam
vorher aliquot gemischt (7µl BSA und 30µl
L.Sarcosin)
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesamnter Überstand hinübergeleert
40 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 3000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 40°C

+ 10 µl PMSF
vortexen

+ 20 µl Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

10 µl in SDS-Gel
(Marker, Std.Prionics und SC+ je 5 µl)
NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

37 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol
30 sek. In Wasser
20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol
30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST
1 h, RT, slow shake

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

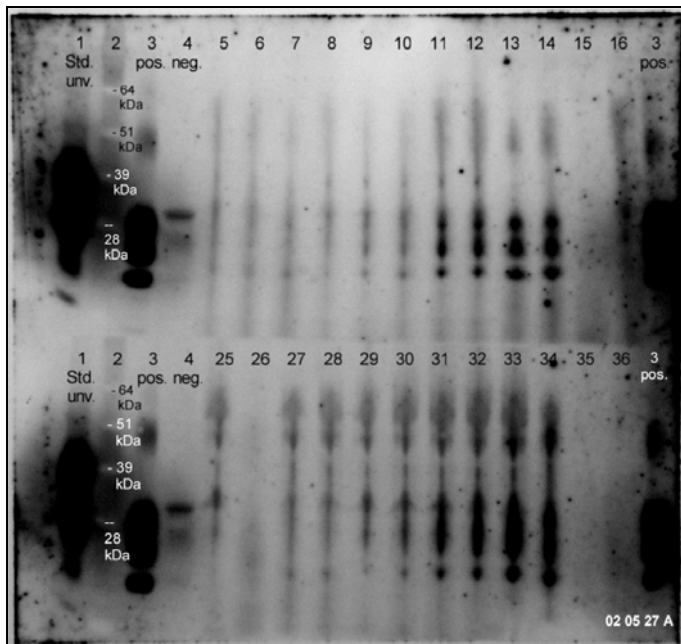
30 min AK II; 1:5000; RTemp. slow shake

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

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

Filmbelichtung I

30 min. Expositur
60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



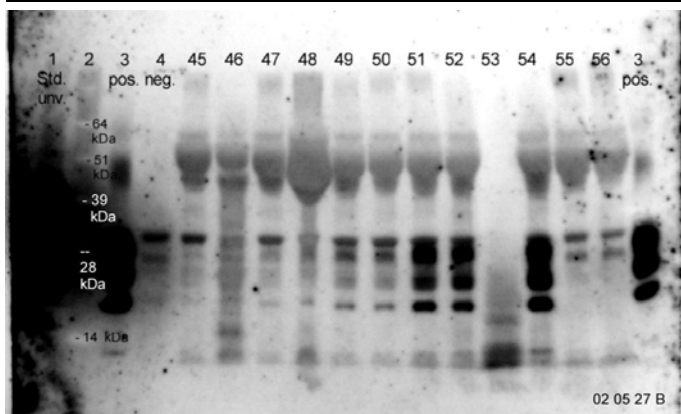
02 05 27 A:

Proben 5 - 17: mesophil

37 - 600 µg/ml Hirn in Faulschlamm

Proben 25 - 37: thermophil

37 - 600 µg/ml Hirn in Faulschlamm



02 05 27

Proben 45 - 57: Wasser

37 - 600 µg/ml Hirn in Faulschlamm

Abbildung 12: 02 05 27

Versuche:

- Vergleich mesophiler bzw. thermophiler Schlamm und Wasser
- Verdünnungsreihe 37 - 600 ng_{HH}/ml_{FS}

Conclusio:

- Zentrifugation nach Ethanolpräzipitation: nicht mehr als 2000 xg – sonst ist BSA-Pellet schlecht resuspendierbar
- Banden sind schlecht getrennt und zusammengezogen
- Wasserverdünnungsreihe: BSA schlecht verdaut, z.T schlecht verdaute Proben; z.T. überverdaut (PMSF)

Überprüfung von:

- PMSF- Zugabe bei der Lauryl-Sarcosinbehandlung.
- PK/PMSF-Verhältnis und Menge überprüfen.

Conclusio:

???

kein Resultat - zu viel PK?

Homogenat?

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+ /10,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADMm

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen

(mesophil / thermophil alt: 22.05.02)

PK-Stock 5mg/ml

30mg PK (32 U) in 6000µl in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

PK 50 (soll-Endconc. in Probe: 50 µg PK/ml)

111 µl PK-Stock + 390 µl Tris/HCl (= 1,11 µg/µl)

PK 100 (soll-Endconc. in Probe: 100 µg PK/ml)

222 µl PK-Stock + 280 µl Tris/HCl (= 2,22 µg/µl)

Verdaupuffer

0,1 M Tris/HCl pH 7,4 + 0,05% Lauroylsarcosin

(50 µl 10% Laurylsarcosin-Stock auf 10 ml Tris/HCl)

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

	31.05.02	Vol.	AD-M	Wasser	HH			L.Sarco		BSA		PMSF		Digestio		PK		SDB	PMSF			
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	in Lsg	10%	0,2M	Resusp.	concentration	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	100mM		
	1	Std Prionics																				
	2	Molekularmarker																				
	3	SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,512				50	105	5	105,71	25	5	4,348	
	4	SC - 2,5%	586		500	56	1,250	1,2590	1258,99	30	0,512				50	105	5	105,71	25	5	4,348	
1	5 / 6	meso, PK 100	592	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,507	6	0,101		50	105	5	105,71	25	5/10	4,348	
	7 / 8	meso, PK 100	592	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,507	6	0,101		50	105	5	105,71	25	5/10	4,348	
	9 / 10	meso, PK 100	592	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,507	6	0,101		50	105	5	105,71	25	5/10	4,348	
	11 / 12	meso, PMSF, PK 100	622	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	105,71	25	5/10	4,348
	13 / 14	meso, PMSF, PK 100	622	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	105,71	25	5/10	4,348
	15 / 16	meso, PMSF, PK 100	622	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	105,71	25	5/10	4,348
	17	neg. meso, PMSF	622		500	56	1,250	1,2590	1258,99	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	105,71	25	5/10	4,348
2	25 / 26	meso, PK 50	592	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,507	6	0,101		50	105	5	52,857	25	5/10	4,348	
	27 / 28	meso, PK 50	592	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,507	6	0,101		50	105	5	52,857	25	5/10	4,348	
	29 / 30	meso, PK 50	592	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,507	6	0,101		50	105	5	52,857	25	5/10	4,348	
	31 / 32	meso, PMSF, PK 50	622	500		56	0,070	0,0705	70,50	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	52,857	25	5/10	4,348
	33 / 34	meso, PMSF, PK 50	622	500		56	0,150	0,1511	151,08	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	52,857	25	5/10	4,348
	35 / 36	meso, PMSF, PK 50	622	500		56	0,300	0,3022	302,16	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	52,857	25	5/10	4,348
	37	neg. meso, PMSF	622		500	56	1,250	1,2590	1258,99	30	0,482	6	0,096	15	4,823	50	105	5	52,857	25	5/10	4,348

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)

+ L. Sarcosin (10 %) + BSA (10%) gemeinsam
vorher aliquot gemischt (6µl BSA und 40µl
L.Sarcosin)
+ 200mM PMSF in i-Propanol
Schütteln RT: 30 min Vortexschüttler 1000 rpm
Zentrifugation: 2000 xg / 5 min

neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
vorlegen: 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
gesammter Überstand hinübergeleert
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 50 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
vortexen
40 min 40°C

+ 5 µl PMSF (100 mM)
in jede 2. Probe (gerade Nummer):
je 10 µl PMSF
vortexen

+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

10 µl in SDS-Gel
(Marker, Std.Prionics und SC+ je 5 µl)
NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot

Elektrophorese

37 min 200 V / 180 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

30 sek. in Methanol

30 sek. In Wasser

20 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 200 mA, Transferpuffer

Membran:

20 sek. Methanol

30 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:25000 in TBST
über Nacht, no shake

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

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

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

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

Filmbelichtung:

10 min. Expositur

60 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

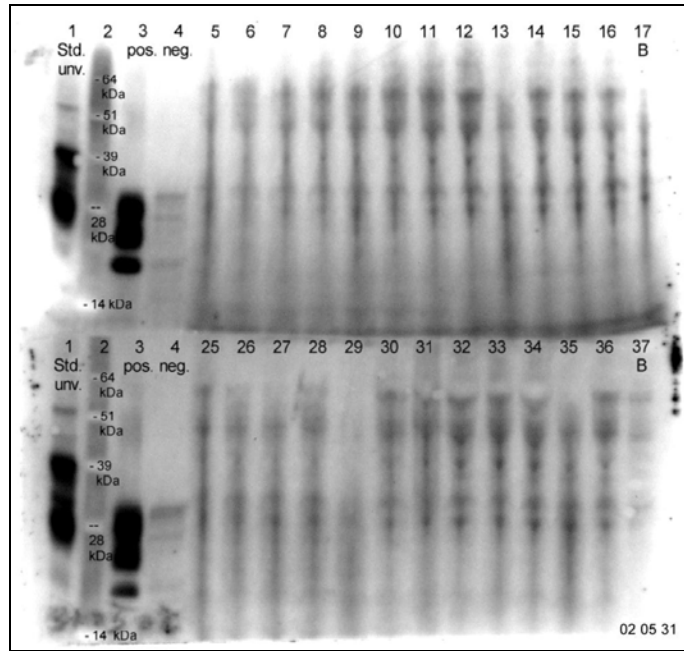


Abbildung 13: 02 05 31

Conclusio:

???

kein Resultat - zu viel PK?

Homogenat?

Versuche

- Vergleich Verdautemperaturen 48°C und 37°C
- Einfluß des Proteaseinhibitor-Cocktails
- Reduzierte PMSF-Menge zum PK-Stopp

Conclusio:

- Kein Resultat – nicht identifizierbare stark zusammengezogene Banden
- Höhere Zentrifugationsdauer nach der Denaturierung (Pellet nicht stabil)

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975 in 5 ml
Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975 in 3500 µl
Wasser

HH SC+ /0,07

7 µl HH SC+ /10,0 + 990 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

Schlamm: 30 ml in 50ml Röhrchen
(mesophil / thermophil alt: 22.05.02)

PK-Stock (5mg/ml; -20°C)

30mg PK (32 U) in 6000µl in 0,1 M Tris/HCl pH
7,4

PK

50 µl PK-Stock +150 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol

		Ges. Vol.	AD-M	Wasser	HH			Sarco		BSA		Mix	Digestio	Vol. nach	PK		SDB	PMSF			
		[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	10%	in Lsg	10%		157 µmol/ml	Resusp.	Resusp	conc		100mM				
					[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	[µmol/ml]		
1	Std Prionics																				
2	Molekularmarker																				
3	SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,52	2517,99	30	0,51			85	125	5	50	25				
4	SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,52	2517,99	30	0,51			85	125	5	50	25				
5 / 6	meso 37	592	500		56	0,070	0,07	70,50	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
7 / 8	meso 37	592	500		56	0,150	0,15	151,08	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
9 / 10	meso 37	592	500		56	0,300	0,30	302,16	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
11 / 12	meso 37 mix	624	500		56	0,070	0,07	70,50	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
13 / 14	meso 37 mix	624	500		56	0,150	0,15	151,08	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
15 / 16	meso 37 mix	624	500		56	0,300	0,30	302,16	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
17	neg. mix	624		500	56	2,500	25,00	2517,99	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
25 / 26	meso 48	592	500		56	0,070	0,07	70,50	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
27 / 28	meso 48	592	500		56	0,150	0,15	151,08	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
29 / 30	meso 48	592	500		56	0,300	0,30	302,16	30	0,51	6	0,101		85	125	5	50	25	6	4,80	
31 / 32	meso 48 mix	624	500		56	0,070	0,07	70,50	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
33 / 34	meso 48 mix	624	500		56	0,150	0,15	151,08	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
35 / 36	meso 48 mix	624	500		56	0,300	0,30	302,16	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80
37	neg. meso 48 mix	624		500	56	2,500	25,00	2517,99	32	0,51	6	0,096	30	7,55	85	125	5	50	25	6	4,80

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln: 10 min RT
(Vortexschüttler 200 rpm)
Proben 3 - 10; 25 - 30:
+ 30 µl L. Sarcosin
Proben 11 - 17; 31 - 37:
+ 32 µl L.Sarcosin
+ 30 Inhibitor-Mix
25 min Vortexschüttler (1000 rpm); RT
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
vortexen
40 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 3000 xg / 10 min

Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 5 µl PK
Shortspin 4s auf 1400 rpm
Vortexen
Proben 3 - 17:
40 min 37°C (Wasserbad 38°C)
Proben 25 - 37:
40 min 48°C (Heizblock 49°C)

+ 6 µl PMSF
vortexen

+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
Zentrifugation: 3000 xg / 5 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)
Elektrophorese
35 min 200 V / 180 mA, MOPS
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
15 min in Transferpuffer
Blot:
60 min 30 V / 200 mA, Transferpuffer
Membran:
60 sek. Methanol
60 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer
AK I (6H4) 1:5000 in TBST
1 h, RT, slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST fast shake
40 min AK II; 1:5000; RTemp. slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I
30 min. Expositur
60 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung

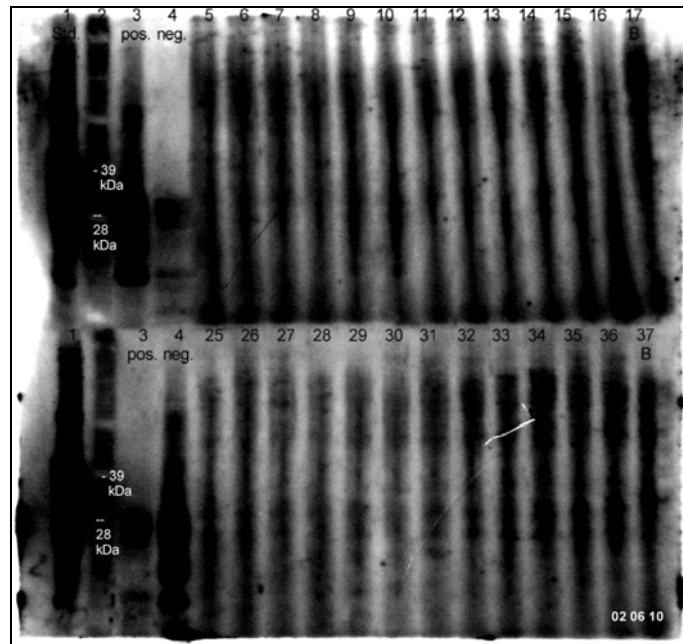


Abbildung 14: 02 06 10

Versuche

- *Vergleich Verdautemperaturen 48°C und 37°C*
- *Einfluß des Proteaseinhibitor-Cocktails*
- *Reduzierte PMSF-Menge zum PK-Stopp*

Conclusio:

- Kein Resultat – nicht identifizierbare stark zusammengezogene Banden
- Höhere Zentrifugationsdauer nach der Denaturierung (Pellet nicht stabil)

Versuche

- Vergleich Verdautemperaturen 48°C und 37°C (Verdünnungsreihe 150 – 600 µg_{HH}/ml_{FS})
- Einfluß des Proteaseinhibitor-Cocktails
- Reduzierte PMSF-Menge zum PK-Stopp
- Direkter Nachweis ohne Ethanolpräzipitation (Verdünnungsreihe 600 – 2500 µg_{HH}/ml_{FS})

Conclusio:

- Im direkten Nachweis ohne Ethanolpräzipitation ist PrP^{SC} erst ab 1200 µg_{HH}/ml_{FS} nachweisbar
Die Banden rücken sehr stark zusammen.
- PrP^{SC} kann mit Et.OH-Präcipit. Ab 150 µg/ml nachgewiesen werden
- 4 µmol/ml PMSF zum PK-Stopp führen zu schwächeren Banden bzw. keinen BSA-Banden
8 µmol/ml PMSF stoppen PK ab.
- Die Zugabe von Inhibitormix führt zu zusammengezogenen Banden.
- 48°C Verdautemperatur führen zu breiteren, deutlicheren Banden
BSA wird fast vollständig verdaut – bei 37°C ist noch eine starke verschmierte Bande erkennbar

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /10,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /1,25

60 µl HH SC+ /10,0 + 440 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil 12.06.02

PK-Stock (19 mg/ml)

Sigma

PK

22 µl PK-Stock + 680 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Verdaupuffer

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

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		GesVol [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	Hirnhomogenat					Sarco		BSA		Mix		Digest	Vol.	PK		SDB	PMSF	
					conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	on Blot [µg/10µl]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[%]	157 µmol/ml [µl]	µMol/ml [µl]	Resusp [µl]	Resusp [µl]	conc [µg/ml]	[µl]	[µl]	100mM [µl]	µMol/ml [µMol/ml]	
1	Std Prionics																					
2	Molekularmarker																					
3	SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2518,0	93,33	30	0,51				80	125	10	50,0	25			
4	SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2518,0	93,33	30	0,51				80	125	10	50,0	25			
1	5 / 6 meso 37	596	500		56	0,150	0,1511	151,1	5,60	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	7 / 8 meso 37	596	500		56	0,300	0,3022	302,2	11,20	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	9 / 10 meso 37	596	500		56	0,600	0,6043	604,3	22,40	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	11 / 12 meso 37 mix	626	500		56	0,150	0,1511	151,1	5,60	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	13 / 14 meso 37 mix	626	500		56	0,300	0,3022	302,2	11,20	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	15 / 16 meso 37 mix	626	500		56	0,600	0,6043	604,3	22,40	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	17 neg. mix	626	500		56	2,500	2,5180	2518,0	93,33	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
2	25 / 26 meso 48	596	500		56	0,150	0,1511	151,1	5,60	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	27 / 28 meso 48	596	500		56	0,300	0,3022	302,2	11,20	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	29 / 30 meso 48	596	500		56	0,600	0,6043	604,3	22,40	30	0,50	10	0,224		80	125	10	50,0	25	10	8,00	
	31 / 32 meso 48 mix	626	500		56	0,150	0,1511	151,1	5,60	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	33 / 34 meso 48 mix	626	500		56	0,300	0,3022	302,2	11,20	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	35 / 36 meso 48 mix	626	500		56	0,600	0,6043	604,3	22,40	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	37 neg. meso 48 mix	626	500		56	2,500	2,5180	2518,0	93,33	30	0,48	10	0,210	30	7,52	80	125	10	50,0	25	10	8,00
2	45 / 46 VP meso 37	293	250		28	0,600	0,6043	604,3	4,40	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	47 / 48 VP meso 37	293	250		28	1,250	1,2590	1259,0	9,17	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	49 / 50 VP meso 37	293	250		28	2,500	2,5180	2518,0	18,34	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	51 / 52 VP meso 48	293	250		28	0,600	0,6043	604,3	4,40	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	53 / 54 VP meso 48	293	250		28	1,250	1,2590	1259,0	9,17	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	55 / 56 VP meso 48	293	250		28	2,500	2,5180	2518,0	18,34	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		
	57 VP neg. meso 48	293	250		28	2,500	2,5180	2518,0	18,34	15	0,51				318	25	49,1	63,6	25	7,86		

Proben 3 – 37:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

56 µl Hirnhomogenat

500 µl AD-M oder Wasser

Schütteln: 10 min RT

(Vortexschüttler 200 rpm)

Proben 3 - 10; 25 – 30:

+ 30 µl L. Sarcosin

Proben 11 – 17; 31 – 37:

+ 30 µl L.Sarcosin

+ 30 Inhibitor-Mix

25 min Vortexschüttler (1000 rpm); RT

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

neues 2,0 ml Eppendorf

10 µl BSA (5%) vorlegen

gesammter Überstand hinübergeleert

1500 µl Ethanol 98% / -17°C

vortexen

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 80 µl Verdaupuffer resuspendiert:

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze

resuspendiert und dann Vortexen mit

Pipettenspitze)

+ 10 µl PK

Shortspin 4s auf 1750 rpm

Vortexen

Proben 45 – 57:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

28 µl Hirnhomogenat

250 µl AD-M

Schütteln: 10 min RT

(Vortexschüttler 200 rpm)

+ 15 µl L. Sarcosin

25 min Vortexschüttler (1000 rpm); RT

+ 25 µl PK

Shortspin 4s auf 1750 rpm

Vortexen

Proben 3 – 17; 45 - 50:

40 min 37°C (Wasserbad 37,5°C)

Proben 25 – 37; 51 - 57:

40 min 48°C (Heizblock 49°C)

+ PMSF:

(Proben 26, 28, 30, 32, 34 u. 36 nur 5µl)

vortexen

+ Sample Buffer 5x

vortexen

10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

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

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 280 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

60 sek. In Wasser

25 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

60 sek. Methanol

60 sek. Wasser

30 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; no shake

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

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

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

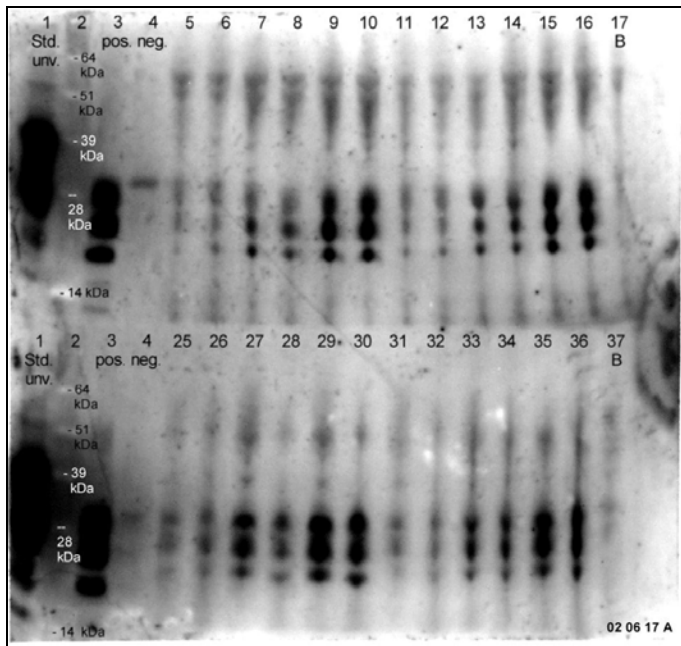
5 min CDP Star (Tropix), 200 µl ad 10 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

30 min. Expositor

20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung



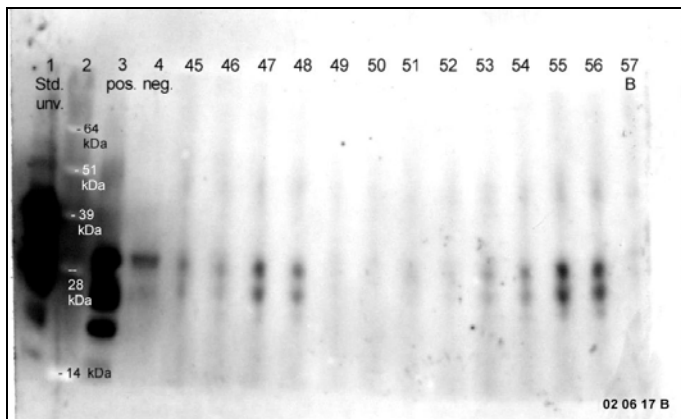
02 06 17 A:

Proben: 5 - 10: Verdautemp. 37°C

Proben: 11 -16: Verdautemp. 37°C
Inhibitormix

Proben 25 - 30: Verdautemp. 48°C

Proben 25 - 30: Verdautemp. 48°C
Inhibitormix



02 06 17 B: Vollproben, keine
Extraktion und Ethanol-fällung

Proben 45 -50: Verdautemp.: 37°C

Proben 51 - 57: Verdautemp.: 48°C

Abbildung 15: 02 06 17

Versuche

- Vergleich Verdautemperaturen 48°C und 37°C (Verdünnungsreihe 150 – 600 µg_{HH}/ml_{FS})
- Einfluß des Proteaseinhibitor-Cocktails
- Reduzierte PMSF-Menge zum PK-Stopp
- Direkter Nachweis ohne Ethanolpräzipitation (Verdünnungsreihe 600 – 2500 µg_{HH}/ml_{FS})

Conclusio:

- Im direkten Nachweis ohne Ethanolpräzipitation ist PrP^{SC} erst ab 1200 µg_{HH}/ml_{FS} nachweisbar
Die Banden rücken sehr stark zusammen.
- PrP^{SC} kann mit Et.OH-Präcipit. Ab 150 µg/ml nachgewiesen werden
- 4 µmol/ml PMSF zum PK-Stopp führen zu schwächeren Banden bzw. keinen BSA-Banden
8 µmol/ml PMSF stoppen PK ab.
- Die Zugabe von Inhibitormix führt zu zusammengezogenen Banden.
- 48°C Verdautemperatur führen zu breiteren, deutlicheren Banden
BSA wird fast vollständig verdaut – bei 37°C ist noch eine starke verschmierte Bande erkennbar

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 – 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Einfluß der Verdaupufferkonzentration
- Vergleich mesophil alt und neu
- Höhere PMSF-Menge

Conclusio:

- kein PrP^{SC} Nachweis

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 μl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 μl HH SC+ /10,0 + 493 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /10,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /0,60

60 μl HH SC+ /10,0 + 940 μl Wasser

HH SC+ /2,50

125 μl HH SC+ /10,0 + 375 μl Wasser

ADM

mesophil neu: 12.06.02
mesophil alt: 20.05.02

PK-Stock (19 mg/ml)

Sigma

PK:

11 μl PK-Stock +340 μl (soll-Endconc. in
Probe: 50 μg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M

10 ml 0,1 M Tris/HCl
50 μl 10% Laurylsarcosin-Stock

Verdaupuffer 0,05 M

5 ml 0,1M Tris/HCl
5 ml Wasser
50 μl L.Sarco (10%)

Verdaupuffer 0,01 M

1 ml 0,1M Tris/HCl
9 ml Wasser
50 μl L.Sarco (10%)

PMSE

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

	19.06.02	Ges.Vol.	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat				L.Sarcosin		BSA		Digestio Vol.nach		PK		SDB	PMSF			
		[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	on Blot	10%	in Lsg	5 %		Resusp.	Resusp	conc		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µMol/ml]
1	Std Prionics																				
2	Molekularmarker																				
3	SC + 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	93,33	30	0,51			80	125	10	50,0	25			
4	SC - 2,5%	586		500	56	2,500	2,5180	2517,99	93,33	30	0,51			80	125	10	50,0	25			
1	5 / 6	meso alt, 48, DB 0,1	596	500		56	0,150	0,1511	151,08	5,60	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	7 / 8	meso alt, 48, DB 0,1	596	500		56	0,300	0,3022	302,16	11,20	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	9 / 10	meso alt, 48, DB 0,1	596	500		56	0,600	0,6043	604,32	22,40	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	11 / 12	meso neu, 48, DB 0,1	596	500		56	0,150	0,1511	151,08	5,60	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	13 / 14	meso neu, 48, DB 0,1	596	500		56	0,300	0,3022	302,16	11,20	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	15 / 16	meso neu, 48, DB 0,1	596	500		56	0,600	0,6043	604,32	22,40	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	17	neg. meso neu, DB 0,1	596	500		56	2,500	2,5180	2517,99	93,33	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
2	25 / 26	meso neu, 48, DB 0,05	596	500		56	0,150	0,1511	151,08	5,60	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	27 / 28	meso neu, 48, DB 0,05	596	500		56	0,300	0,3022	302,16	11,20	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	29 / 30	meso neu, 48, DB 0,05	596	500		56	0,600	0,6043	604,32	22,40	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	31 / 32	meso neu, 48, DB 0,01	596	500		56	0,150	0,1511	151,08	5,60	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	33 / 34	meso neu, 48, DB 0,01	596	500		56	0,300	0,3022	302,16	11,20	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	35 / 36	meso neu, 48, DB 0,01	596	500		56	0,600	0,6043	604,32	22,40	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00
	37	neg. meso 48, DB 0,01	596	500		56	2,500	2,5180	2517,99	93,33	30	0,50	10	0,11	80	125	10	50,0	25	10	8,00

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln:
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ 30 µl L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm); RT
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln
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 80 µl Verdaupuffer resuspendiert:
Proben: 3 – 16: 0,1 M
Proben: 25 – 30: 17: 0,05 M
Proben: 31 – 37: 0,01 M
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
+ 10 µl PK
Shortspin 6s auf 2200 rpm
Vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ PMSF:
(Proben 12, 14, 16, 26, 28, 30, 32, 34 u. 36
je 15 µl)
vortexen

+ Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C (offene Röhrchen; Laminair)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)

Elektrophorese

35 min 200 V / 280 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

60 sek. In Wasser

25 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST

über Nacht: 13 h, 4°C; no shake

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

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

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

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

Filmbelichtung I

30 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung

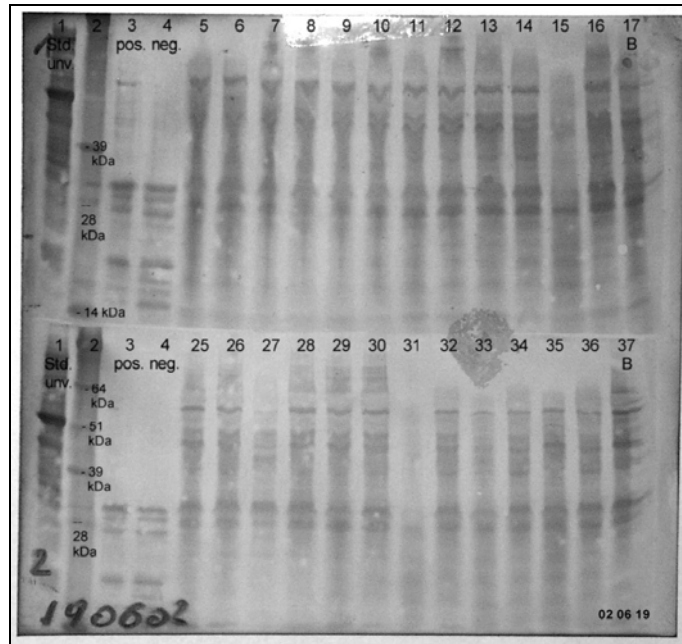


Abbildung 16: 02 06 19:
mit BCIP/NPT Substrat gefärbte Membran

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 – 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Einfluß der Verdauerpufferkonzentration
- Vergleich mesophil alt und neu
- Höhere PMSF-Menge

Conclusio:

- kein PrP^{SC} Nachweis

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 – 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Verdaupuffer mit 0,05% und 0,32% L.Sarcosin
- Waschen des Ethanol-fällungspellet mit 75% Ethanol
- Verdau der Gesamtprobe und Ethanol-fällung nach dem Verdau
- Manipulation im 0°C Kühlakku

Conclusio:

- höhere L.Sarcosinkonz. gibt besseres Signal.
- Waschen des Pellets ergibt sauberer getrennte Banden
- Verdau nach der Fällung führt zu BSA Schmierbanden.
- Nur 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben sauber getrennte Banden
150 und 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben nur zusammengezogene Punkte

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 μl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 μl HH SC+ /10,0 + 493 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /10,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /0,60

60 μl HH SC+ /10,0 + 940 μl Wasser

HH SC+ /2,50

125 μl HH SC+ /10,0 + 375 μl Wasser

ADM

mesophil neu: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

23 μl PK-Stock + 687 μl (soll-Endconc. in
Probe: 50 μg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,05%

10 ml 0,1 M Tris/HCl

50 μl 10% Laurylsarcosin-Stock

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl

320 μl L.Sarco (10%)

PMSF

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				Sarco		BSA		Digestio Vol.		PK		SDB [µl]	PMSF	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	50% [µl]	[%]	Resusp. [µl]	Resusp [µl]	conc [µl]	[µg/ml]	100mM [µl]		µmol/ml	
	1 Std Prionics																	
	2 Molekularmarker																	
	3 SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,51			85	125	10	50	25	10	10,8
1	4 / 5 meso neu; DB: 0,05%L.S	592,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	6 / 7 meso neu; DB: 0,05%L.S	592,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	8 / 9 meso neu; DB: 0,05%L.S	592,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	11 / 12 DB 0,32%L.S.	592,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	13 / 14 DB 0,32%L.S.	592,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	15 / 16 DB 0,32%L.S.	592,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	17 <i>neg meso neu</i>	592,00	500	56	2,500	2,5180	2517,99	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
2	24 / 25 Waschen DB0,32%LS	592,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	26 / 27 Waschen DB0,32%LS	592,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	28 / 29 Waschen DB0,32%LS	592,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,51	10	0,05	85	125	10	50	25	10	10,8
	31 / 32 Fällung nachher, DB 0,32%	582,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	20	0,34	10	0,05	85	115	47	50,5	23	10	10,87
	33 / 34 Fällung nachher, DB 0,32%	582,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	20	0,34	10	0,05	85	115	47	50,5	23	10	10,87
	35 / 36 Fällung nachher, DB 0,32%	582,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	20	0,34	10	0,05	85	115	47	50,5	23	10	10,87
	37 <i>neg, Fällg. nachher</i>	582,00	500	56	2,500	2,5180	2517,99	20	0,34	10	0,05	85	115	47	50,5	23	10	10,87

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / 0°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

Proben 3 – 30:

neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln
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)

Proben 25 – 30:

Resuspension in 1500 µl Ethanol
(75% / -17°C); (Pellet an der Wand mit
Pipettenspitze resuspendiert und dann
Vortexen mit Pipettenspitze)
40 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Pellet in 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:

Proben: 3 – 10: 0,1 M / 0,05

Proben: 11 – 30: 0,1 M / 0,32%

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Shortspin 6s auf 2200 rpm
Vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ PMSF:
vortexen

+ Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C: offene Röhrchen; Laminair
15 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 280 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
25 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST

über Nacht: 13 h, 4°C; no shake

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

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

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

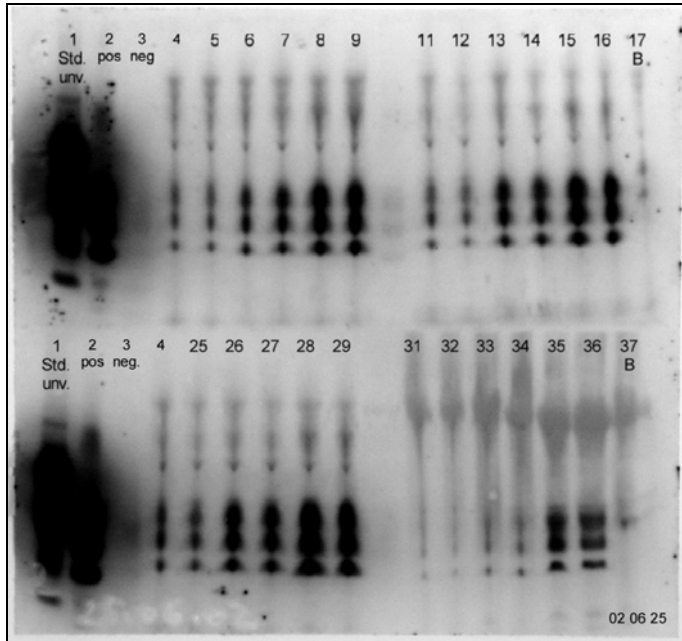
5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

15 min. Expositor

30 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung



02 06 25:

Proben 4 - 9: Verdaupuffer
0,05% Lauroylsarcosin

Proben 11 - 16: Verdaupuffer
0,32% Lauroylsarcosin

Proben 25 - 29: Waschen des
Ethanol-fällungspelletts; Verdau-
puffer: 0,32% Lauroylsarcosin

Proben 31 - 36: Ethanol-fällung nach
dem PK-Verdau

Abbildung 17: 02 06 25

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 – 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Verdaupuffer mit 0,05% und 0,32% L. Sarcosin
- Waschen des Ethanol-fällungspellet mit 75% Ethanol
- Verdau der Gesamtprobe und Ethanol-fällung nach dem Verdau
- Manipulation im 0°C Kühlakku

Conclusio:

- höhere L. Sarcosinkonz. gibt besseres Signal.
- Waschen des Pellets ergibt sauberer getrennte Banden
- Verdau nach der Fällung führt zu BSA Schmierbanden.
- Nur 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben sauber getrennte Banden
150 und 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben nur zusammengezogene Punkte

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 - 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich Aufreinigung bei hohen Temp ($RT = 32^\circ\text{C}$) und Manipulation im Kühlakku
- Vergleich Verdaupuffer: 0,1M; 0,05M; 0,01M; bei gleichbleibenden 0,32% Lauroylsarcosin.
- Waschen mit 75% Ethanol

Conclusio:

- schlechte performance (starker Hintergrund)
- keine deutliche Verbesserung der Ergebnisse durch die L.Sarcosinbehandlung im Kühlakku im Vergleich zur Behandlung bei RT (32°C)

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 μl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 μl HH SC+ /10,0 + 493 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /10,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /0,60

30 μl HH SC+ /10,0 + 470 μl Wasser

HH SC+ /2,50

125 μl HH SC+ /10,0 + 375 μl Wasser

ADM

mesophil: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

13 μl PK-Stock + 388 μl (soll-Endconc. in
Probe: 50 μg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 μl L.Sarco (10%)

Verdaupuffer 0,05 M/0,32

5 ml 0,1M Tris/HCl
320 μl L.Sarco (10%)

5 ml Wasser

Verdaupuffer 0,01 M/0,32

1 ml 0,1M Tris/HCl
320 μl L.Sarco (10%)
9 μl Wasser

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges.Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH				Sarco		BSA		70% EtOH [ml]	Digestio Vol. nach		PK		SDB [µl]	PMSF	
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	10% [µl]	in Lsg [%]	5% [µl]	[%]	Resusp. [µl]		Resusp [µl]	conc [µg/ml]	100mM [µl]	µmol/ml			
	1 Std Prionics																		
	2 Molekularmarker																		
	3 SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,51				85	125	10	50	25	10	10,8
	4 SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,51				85	125	10	50	25	10	10,8
1	5 / 6 HT / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	7 / 8 HT / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	9 / 10 HT / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	11 / 12 KA / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	13 / 14 KA / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	15 / 16 KA / DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	17 KA / neg. DB 0,1M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
2	25 / 26 KA / DB 0,05M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	27 / 28 KA / DB 0,05M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	29 / 30 KA / DB 0,05M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	31 / 32 KA / DB 0,01M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	33 / 34 KA / DB 0,01M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	35 / 36 KA / DB 0,01M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	37 KA / neg. DB 0,01M / 0,32%L.S.	596,00	500	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
Proben 5 - 10: RT
Proben 3 - 4; 11 - 37: Kühlakku 0°C
25 min Vortexschüttler (1000 rpm)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert
+ 1500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln, vortexen
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert
+ 1500µl Ethanol 75%
Resuspension des Pellets am Vortex
(+Pipettenspitze)
35 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 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
+ 10 µl PK
Vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 10 µl PMSF 100
vortexen
+ Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
15 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)

Elektrophorese
50 min 200 V / 180 mA, MOPS

Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
15 min in Transferpuffer

Blot:
60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

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

AK I (6H4) 1: 25.000 in TBST
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
90 min AK II; 1: 5.000; 4°C; slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix),
100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I
20 min. Expositur
20 sek. Entwicklung
5 min. Fixierung

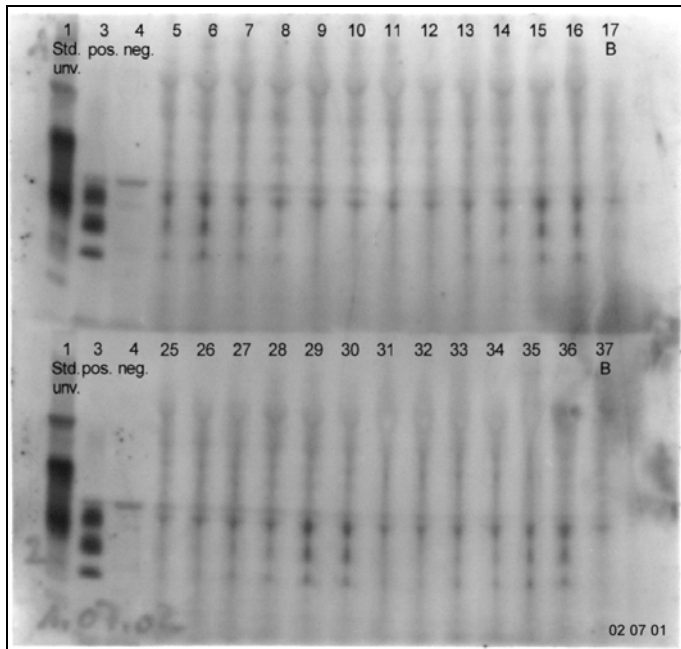


Abbildung 18: 02 07 01

Versuche

- Verdünnungsreihe 150 - 600 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich Aufreinigung bei hohen Temp (RT = 32°C) und Manipulation im Kühlakku
- Vergleich Verdaupuffer: 0,1M; 0,05M; 0,01M; bei gleichbleibenden 0,32% Lauroylsarcosin.
- Waschen mit 75% Ethanol

Conclusio:

- schlechte performance (starker Hintergrund)
- keine deutliche Verbesserung der Ergebnisse durch die L.Sarcosinbehandlung im Kühlakku im Vergleich zur Behandlung bei RT (32°C)

02 07 01:

Proben 5 - 10: Raumtemp.; Verdaupuffer:
0,1M Tris/HCl / 0,32%Lauroylsarcosin

Proben 11 - 16: Kühlakku.; Verdaupuffer:
0,1M Tris/HCl / 0,32%Lauroylsarcosin

Proben 25 -30: Raumtemp.; Verdaupuffer:
0,01M Tris/HCl / 0,32%Lauroylsarcosin

Proben 31 - 36: Kühlakku.; Verdaupuffer:
0,01M Tris/HCl / 0,32%Lauroylsarcosin

Versuche

- *Ethanol-fällung nach PK-Verdau:*
 - Resuspension des Pellets in Wasser
 - Resuspension in 0,1m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco
 - Waschen des Pellets in 75% Ethanol und Resuspension in Wasser
- *Ethanol-fällung vor PK-Verdau:*
 - Waschen des Pellets
 - Verdau-puffer 0,1m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco
 - Verdau-puffer 0,1m Tris/HCl / 0,05% L.Sarco
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*

Conclusio:

- *Fällung nach dem PK-Verdau gibt schlechte PrP^{SC} Ausbeute und starke BSA Schmierbanden*
- *höhere L.Sarcosinkonz. im Verdau-puffer ergibt nur leicht bessere Auftrennung von PrP^{SC}.*
- *Waschen des Pellets führt nicht eindeutig zu einer besseren Performance.*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /10,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

30 µl PK-Stock +896 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdau-puffer 0,1 M/0,05%

10 ml 0,1 M Tris/HCl

50 µl 10% Laurylsarcosin-Stock

Verdau-puffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl

320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol

(- 17°C)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol

(- 17°C)

		Ges.Vol [µl]	AD-M [µl]	HH			Sarco		BSA		Waschfl 75%EtOH [ml]	Vol.		PK		SDB [µl]	PMSF			
				conc	in AD-M	in AD-M	10%	in Lsg	50%	Resusp.		Resusp	conc	100mM						
				[µl]	[%]	[%]	[ng/ml]	[µl]	[%]	[µl]		[%]	[µl]	[µl]	[µl]		[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	
1	Std Prionics																			
2	Molekularmarker																			
3	SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,51			85	125	10	50	25	10	10,8		
4	SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,51			85	125	10	50	25	10	10,8		
1	5 / 6	Verdau vorher, resusp Wasser	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	20	0,34	10	0,09		85	125	47	50,1	25	10	10,8
	7 / 8	Verdau vorher, resusp Wasser	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	20	0,34	10	0,09		85	125	47	50,1	25	10	10,8
	9 / 10	Verdau vorher, resusp DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	20	0,34	10	0,09		85	125	47	50,1	25	10	10,8
	11 / 12	Verdau vorher, resusp DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	20	0,34	10	0,09		85	125	47	50,1	25	10	10,8
	13 / 14	Verdau vorher, +waschen, W.	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	20	0,34	10	0,09	1500	85	125	47	50,1	25	10	10,8
	15 / 16	Verdau vorher, +waschen, W.	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	20	0,34	10	0,09	1500	85	125	47	50,1	25	10	10,8
	17		586,00	500	56	2,500	2,5180	2518,0	20	0,34	10	0,09		85	125	47	50,1	25	10	10,8
2	25 / 26	DB 0,1/0,32	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08		85	125	10	50	25	10	10,8
	27 / 28	DB 0,1/0,32	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08		85	125	10	50	25	10	10,8
	29 / 30	DB 0,1/0,05	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08		85	125	10	50	25	10	10,8
	31 / 32	DB 0,1/0,05	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08		85	125	10	50	25	10	10,8
	33 / 34	+ Waschen, DB 0,1/0,05	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	35 / 36	+ Waschen, DB 0,1/0,06	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8
	37	KA / neg.DB 0,01M / 0,32%L.S	596,00	500	56	2,500	2,5180	2518,0	30	0,50	10	0,08	1500	85	125	10	50	25	10	10,8

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / 0°C)

Proben 3, 4, 25 – 37:

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)

Proben 33-36:

Resuspension in 1500 µl Ethanol
(75% / -17°C); (Pellet an der Wand mit
Pipettenspitze resuspendiert und dann
Vortexen mit Pipettenspitze)
35 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 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:

Proben: 25 – 28: 0,1 M / 0,32%

Proben: 29 – 37: 0,1 M / 0,05%

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 10µl PMSF 100
vortexen

Proben 5 – 17

+47µl PK
vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 25 µl PMSF 200
vortexen
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
1500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand weggeleert,
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)

Proben 13-16:

Resuspension in 1500 µl Ethanol
(75% / -17°C); (Pellet an der Wand mit
Pipettenspitze resuspendiert und dann
Vortexen mit Pipettenspitze)
35 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 85 µl Verdaupuffer resuspendiert:

Proben: 5 – 8: 0,1 M / 0,32%

Proben: 9 – 17: 0,1 M / 0,05%

(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C: offene Röhrchen; Laminair
15 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 280 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

60 sek. In Wasser

25 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:5000 in TBST

über Nacht: 13 h, 4°C; no shake

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

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

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

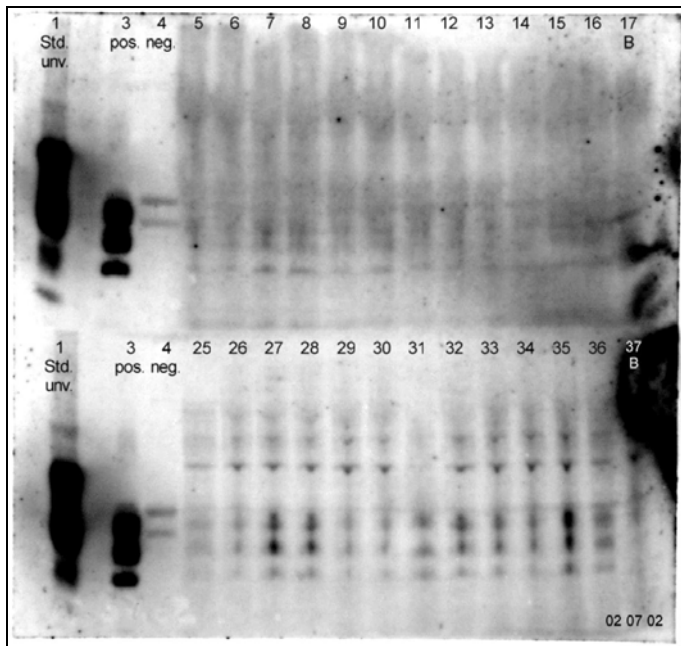
5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

30 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung



02 07 02:

Proben 5 -8: Wasser, Verdau vor Ethanolfällung

Proben 9 - 12: Verdau vor Fällung, Resusp. in Verdaupuffer (0,1M/0,32%)

Proben 13 - 16: Verdau vor Fällung, Waschen des Pellets, Resup. in Wasser

Proben 25 - 28: Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32% Lauroylsarcosin

Proben 29 - 32: Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,05% Lauroylsarcosin

Proben 33 - 36: Waschen des Ethanol-fällungspellets, Verdaupuffer: 0,1m Tris/HCl / 0,05% Lauroylsarcosin

Abbildung 19: 02 07 02

Versuche

- *Ethanol-fällung nach PK-Verdau:*
 - Resuspension des Pellets in Wasser
 - Resuspension in 0,1m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco
 - Waschen des Pellets in 75% Ethanol und Resuspension in Wasser
- *Ethanol-fällung vor PK-Verdau:*
 - Waschen des Pellets
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,05% L.Sarco
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*

Conclusio:

- *Fällung nach dem PK-Verdau gibt schlechte PrP^{SC} Ausbeute und starke BSA Schmierbanden*
- höhere L.Sarcosinkonz. im Verdaupuffer ergibt nur leicht bessere Auftrennung von PrP^{SC}.
- Waschen des Pellets führt nicht eindeutig zu einer besseren Performance.

Versuche

- 1.Fällung mit 500µl 96% Ethanol: 50% Ethanol Endkonzentration
- 2. Fällung nach Auffüllen auf 3000µl mit 96% EtOH: 83% Ethanol Endkonzentration
- Verdau nach Ethanolfällung
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32 % L.Sarco
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32 % L.Sarco
- Ethanolfällung nach Verdau
 - Resuspension in Wasser
 - Resuspension in 0,05m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco.
- Manipulation im 0°C Kühlakku

Conclusio:

- schön getrennte Banden in der ersten Fraktion (1500 µl 75 % Ethanol)
- stärkeres Signal bei „Fällung nach Verdau“ und Resuspension in Wasser
- starker Hintergrund

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /10,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil neu: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

30 µl PK-Stock +896 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,05%

10 ml 0,1 M Tris/HCl

50 µl 10% Laurylsarcosin-Stock

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl

320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH [µl]	conc [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	on Blot [µg/10µl]	Sarco 10% [µl]	in Lsg [%]	BSA 50% [µl]	[%]	Vol. nach Resusp. [µl]	Resusp. [µl]	PK [µl]	conc [µg/ml]	SDB [µl]	PMSF Verdau- [µl]	Stopp [µmol/ml]
	1 Std Prionics																		
	2 Molekularmarker																		
	3 SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518	700	30	0,51			100	140	10	50	28	10	7,1
	4 SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518	700	30	0,51			100	140	10	50	28	10	7,1
100mM																			
1	5 / 6 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	42	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	7 / 8 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	84	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	9 / 10 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	168	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	11 / 12 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	42	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	13 / 14 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	84	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	15 / 16 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	168	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	17 neg. 1500 µl 0,75% EtOH; DB 0,1/0,05	586,00	500	56	2,500	2,5180	2518		20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
200mM																			
2	25 / 26 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	15	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	27 / 28 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	31	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	29 / 30 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	61	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	31 / 32 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	15	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	33 / 34 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	31	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	35 / 36 1500 µl 0,75% EtOH; Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	61	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	37 neg. 1500 µl 0,75% EtOH; Verd vorher, DB 0,05/0,32	596,00	500	56	2,500	2,5180	2518		30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH			on Blot [µg/10µl]	Sarco		BSA		Vol. nach		PK		SDB [µl]	PMSF		
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]		10% [µl]	in Lsg [%]	50% [µl]	[%]	Resusp. [µl]	Resusp [µl]	conc [µg/ml]	Verdau- [µl]		Stopp µmol/ml		
1	Std Prionics																		
2	Molekularmarker																		
3	SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518	700	30	0,51			100	140	10	50	28	10	7,1
4	SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518	700	30	0,51			100	140	10	50	28	10	7,1
100mM																			
3	45 / 46 + 1500µl EtOH; DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	42	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	47 / 48 + 1500µl EtOH;DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	84	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	49 / 50 + 1500µl EtOH;DB 0,1/0,32	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	168	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	51 / 52 + 1500µl EtOH;DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	42	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	53 / 54 + 1500µl EtOH;DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	84	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	55 / 56 + 1500µl EtOH;DB 0,05/0,32	586,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	168	20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
	57 neg. DB 0,1/0,05	586,00	500	56	2,500	2,5180	2518		20	0,34	10	0,09	100	140	10	50	28	10	7,1
200mM																			
4	65 / 66 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	15	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	67 / 68 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	31	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	69 / 70 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp Wasser	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	61	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	71 / 72 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	15	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	73 / 74 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	31	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	75 / 76 + 1500µl EtOH;Verdau vorher, resusp DB 0,05/0,32	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	61	30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
	77 neg. + 1500µl EtOH;Verd vorher, DB 0,05/0,32	596,00	500	56	2,500	2,5180	2518		30	0,50	10	0,08	100	130	35	49	26	20	8,1
									820	280	3200	670	868						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm

+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / 0°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert

Proben 3 – 17, 37:

+ 500 µl Ethanol 96% / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand: je 500 µl in 2 neue 2,0 ml
Eppendorf = Proben 45(A, B) - 57(A, B)
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:
Proben: 5 – 10: 100 µl 0,1 M / 0,32%
Proben: 3, 4, 11 – 17, 37:
100 µl 0,05 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
Proben 45(A/B) - 57(A/B):
+1500 µl Ethanol 96%(-17°C)
4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand verwerfen
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:
Proben: 45 (A/B) – 50 (A/B):
50 µl 0,1 M / 0,32%
nach der Resuspension Vereinigung der
Proben A+B = Proben 45 - 50 (100 µl)
Proben: 51 (A/B) – 57 (A/B):
50 µl 0,05 M / 0,32%
nach der Resuspension Vereinigung der
Proben A+B = Proben 51 - 57 (100 µl)

+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 10 µl PMSF 100
+ 28 µl Sample Buffer 5x
vortexen

Proben 25 – 36:

+ 35 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 20 µl PMSF 200
+ 500 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand: je 500 µl in 2 neue 2,0 ml
Eppendorf = Proben 65(A, B) - 77(A, B)

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:
Proben: 25 – 30: 100 µl Wasser
Proben: 31 - 36:
100 µl 0,05 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
Proben 65(A/B) - 77(A/B):
+1500 µl Ethanol 96%(-17°C)
4 x überkopf schütteln

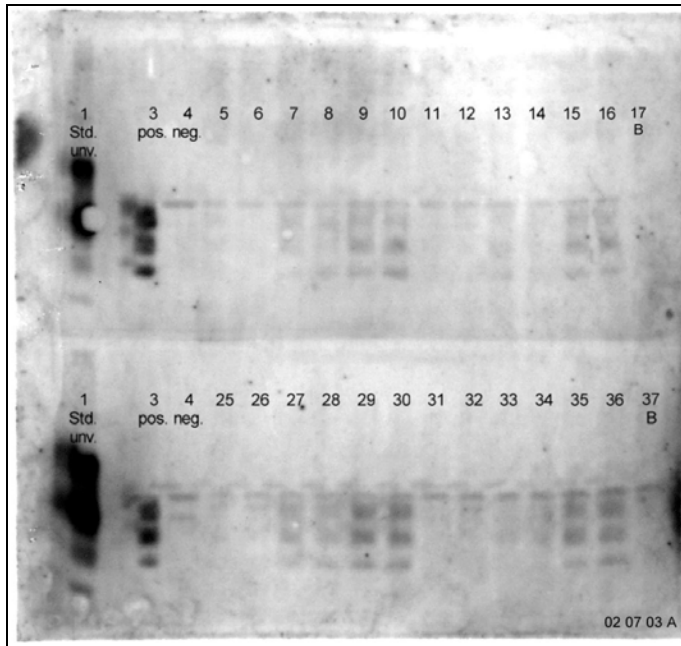
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min
Überstand verwerfen
Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)
Pellet resuspendiert:
Proben: 65 (A/B) – 70 (A/B):
50 µl Wasser

nach der Resuspension Vereinigung der
Proben A+B = Proben 65 - 70 (100 µl)
Proben: 71 (A/B) – 77 (A/B):
50 µl 0,05 M / 0,32%
nach der Resuspension Vereinigung der
Proben A+B = Proben 71 - 77 (100 µl)

+ 28 µl Sample Buffer 5x
vortexen

10 min 95°C: offene Röhrchen
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)
Elektrophorese
35 min 200 V / 240 mA, MOPS
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
25 min in Transferpuffer
Blot:
60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer
Membran:
30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:2500 in TBST
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
40 min AK II; 1:25000; RTemp.; slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer
Filmbelichtung I
25/10 min. Expositur
20 sek. Entwicklung
3 min. Fixierung



02 07 03 A:

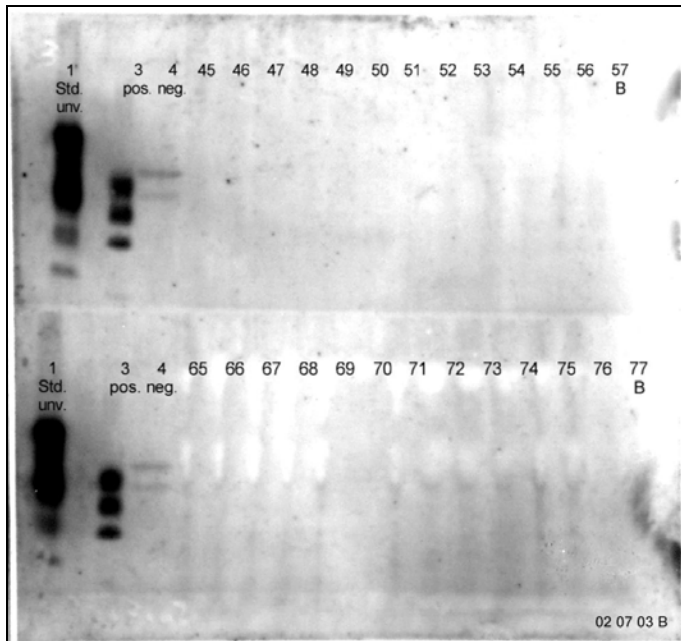
1. Fällung (50% Ethanol)

Proben 5 - 10: Pellet in 0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin; PK nach Fällung

Proben 11 - 16: Pellet in 0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin; PK nach Fällung

Proben 25 - 30: PK-Verdau vor Fällung, 50% Ethanol; Pellet in Wasser

Proben 31 -36: PK-Verdau vor Fällung, 50% Ethanol; Pellet in 0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin



02 07 03 B

2. Fällung (83% Ethanol)

Proben 45 - 50: Pellet in 0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin; PK nach Fällung

Proben 51 - 56: Pellet in 0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin; PK nach Fällung

Proben 65 - 70: PK-Verdau vor Fällung, 50% Ethanol; Pellet in Wasser

Proben 71 -76: PK-Verdau vor Fällung, 50% Ethanol; Pellet in 0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarcosin

Abbildung 20: 02 07 03

Versuche

- 1.Fällung mit 500µl 96% Ethanol: 50% Ethanol Endkonzentration
- 2. Fällung nach Auffüllen auf 3000µl mit 96% EtOH: 83% Ethanol Endkonzentration
- Verdau nach Ethanolfällung
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32 % L.Sarco
 - Verdaupuffer 0,1m Tris/HCl / 0,32 % L.Sarco
- Ethanolfällung nach Verdau
 - Resuspension in Wasser
 - Resuspension in 0,05m Tris/HCl / 0,32% L.Sarco.
- Manipulation im 0°C Kühlakku

Conclusio:

- schön getrennte Banden in der ersten Fraktion (1500 µl 75 % Ethanol)
- stärkeres Signal bei „Fällung nach Verdau“ und Resuspension in Wasser
- starker Hintergrund

Versuche

- *Fraktionierte Ethanolpräzipitation (48% und 72% Ethanol)*
- *Resuspension in 100µl DB*
- *Verdaupuffer 0,1M und 0,05M Tris/HCl*
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*

Conclusio:

- *Besseres Singal bei 0,1M Verdaupuffer (im Vergl. zu 0,05M)*
- *50% Ethanol – Pellet gibt leichte aber saubere Signale*
- *2. Fraktion (72%) gibt deutlich stärkeres Singal, tw. jedoch zusammengezogen*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

60 µl HH SC+ /10,0 + 940 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil neu: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

30 µl PK-Stock +896 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,05%

10 ml 0,1 M Tris/HCl

50 µl 10% Laurylsarcosin-Stock

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl

320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol

(- 17°C)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol

(- 17°C)

		Ges. Vol.	AD-M	HH				on Blot [µg/10µl]	Sarco		BSA		EtOH		Vol. nach		PK		SDB	PMSF		
		[µl]	[µl]	[µl]	conc [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]		10% [µl]	in Lsg [%]	5% [µl]	[%]	96% [µl]	[%]	Resusp [µl]	Vol. [µl]	conc [µg/ml]	[µl]	200mM [µl]	100mM µmol/ml		
	1																					
	2																					
	3	596,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	824	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0	
	4	596,00	500 W	56	2,500	2,5180	2518,0	824	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0	
1	5 / 6	100 µl DB 0,1M/0,32%	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	49	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	7 / 8	100 µl DB 0,1M/0,32%	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	99	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	9 / 10	100 µl DB 0,1M/0,32%	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	198	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	11 / 12	100 µl DB 0,05M/0,32%	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	49	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	13 / 14	100 µl DB 0,05M/0,32%	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	99	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	15 / 16	100 µl DB 0,05M/0,32%	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	198	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
	<i>neg. / 0,1M/0,32%</i>		596,00	500	56	2,500	2,5180	2518,0	824	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	140	10	50	28	7	10,0
2	25 / 26	Frakt. Fällung: 500 µl EtOH	596,00	500	56	0,150	0,1511	151,08	49	30	0,50	10	0,08	500	48,2	100	140	10	50	28	7	10,0
	27 / 28	Frakt. Fällung: 500 µl EtOH	596,00	500	56	0,300	0,3022	302,16	99	30	0,50	10	0,08	500	48,2	100	140	10	50	28	7	10,0
	29 / 30	Frakt. Fällung: 500 µl EtOH	596,00	500	56	0,600	0,6043	604,32	198	30	0,50	10	0,08	500	48,2	100	140	10	50	28	7	10,0
	31 / 32	Frakt. 2 / 1500 µl EtOH											1500	72,0	50	70	5	50	14	7	10,0	
	33 / 34	Frakt. 2 / 1500 µl EtOH											1500	72,0	50	70	5	50	14	7	10,0	
	35 / 36	Frakt. 2 / 1500 µl EtOH											1500	72,0	50	70	5	50	14	7	10,0	
	<i>neg. / 0,05M / 0,32%</i>												1500	102,9	100	140	10	50	28	7	10,0	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / 0°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert

Proben 3 – 17, 37:
1500 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 25 – 30:
500 µl Ethanol 98% / -17°C

4 x überkopf schütteln
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Proben 3 – 17, 37:
Überstand weggeleert

Proben 25 – 30:
Überstand in neues 2,0 ml Eppendorf
(= Proben 31 – 36)

Proben 31 – 36:
+ 1000 µl Ethanol 98% / -17°C
35 min in Kühlakku 0°C im Tiefkühler (-17°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf
Küchenrolle (> 10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

Proben: 5 – 10: 100 µl 0,1 M / 0,32%

Proben: 3, 4, 11 – 30, 17, 37:

100 µl 0,05 M / 0,32%

Proben 31 – 36: 50 µl 0,05 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

Proben 3 – 30: + 7 µl PMSF 200

Proben 31 – 36: + 7 µl PMSF 100

vortexen

+ Sample Buffer 5x

vortexen

10 min 95°C: offene Röhrchen

25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;

Proben 31 – 36: 5 min offen / 25 min

geschlossen, Zentrifugation (s.u.)

5 min offen, Zentrifugation (s.u.)

Laminair

Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

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

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 240 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

60 sek. In Wasser

25 min in Transferpuffer

Blot:

60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol

30 sek. Wasser

35 min Blockingpuffer

AK I (6H4) 1:2500 in TBST

über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake

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

40 min AK II; 1:25000; RTemp.; slow shake

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

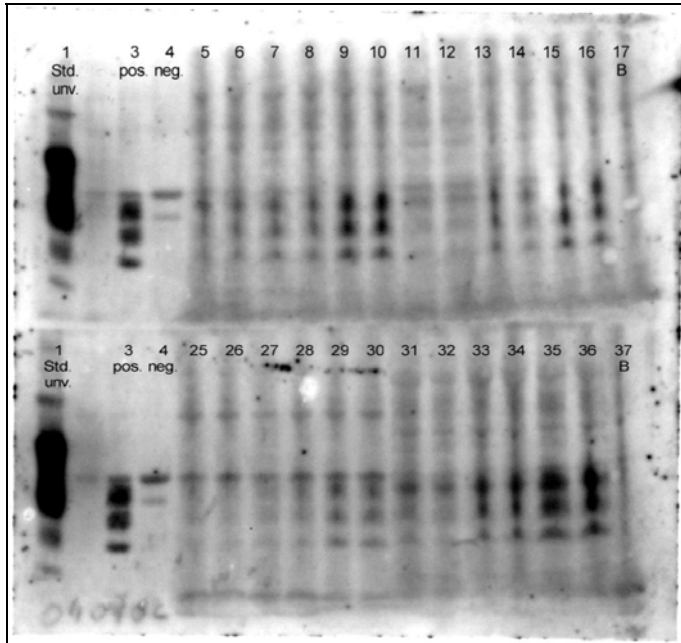
5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

25/10 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

3 min. Fixierung



02 07 04:

Proben 5 - 10: Verdaupuffer:
0,1M Tris/HCl / 0,32% L.Sarcosin

Proben 11 - 16: Verdaupuffer:
0,05M Tris/HCl / 0,32% L.Sarcosin

Proben 25 -30: 1.Fällung
(48% Ethanol)

Proben 31 - 36: 2. Fällung der
Proben 25 - 30 (72% Ethanol)

Abbildung 21: 02 07 04

Versuche

- *Fraktionierte Ethanolpräzipitation (48% und 72% Ethanol)*
- *Resuspension in 100µl DB*
- *Verdaupuffer 0,1M und 0,05M Tris/HCl*
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*

Conclusio:

- *Besseres Singal bei 0,1M Verdaupuffer (im Vergl. zu 0,05M)*
- *50% Ethanol – Pellet gibt leichte aber saubere Signale*
- *2. Fraktion (72%) gibt deutlich stärkeres Singal, tw. jedoch zusammengezogen*

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonz.:54%, 63% und 72% Ethanol*
- *Resuspension in 100µl bzw. 150 µl DB*
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*
- *geringere AK-Conz.*

Conclusio:

- *zu lange Inkubationsdauer AKII (starke Spots am Hintergrund)*
- *bei 54% EtOH erscheint das am besten getrennte Signal (wenngleich etwas heller als bei 75%)*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 +470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 12.06.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

12 µl PK-Stock +344 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges. Vol.	AD-M	HH			on Blot	Sarco		BSA		EtOH		Vol. nach		PK		SDB	PMSF		
		[µl]	[µl]	[µl]	conc [%]	AD-M [%]		AD-M [µg/ml]	[ng/10µl]	10% [µl]	in Lsg [%]	5% [µl]	[%]	96% [µl]	[%]	Resusp [µl]	Vol. nach [µl]	[µl]	conc [µg/ml]	[µl]	200mM [µl]
	1																				
	2																				
	3	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51			1500	72,5	100	140	10	46,4	28	7	10,0
	4	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51			1500	72,5	100	140	10	46,4	28	7	10,0
1	5 / 6	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	130	10	50	26	7	10,8
	7 / 8	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	130	10	50	26	7	10,8
	9 / 10	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	100	130	10	50	26	7	10,8
	11 / 12	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	35	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	150	180	14	50,6	36	10	11,1
	13 / 14	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	70	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	150	180	14	50,6	36	10	11,1
	15 / 16	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	140	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	150	180	14	50,6	36	10	11,1
2	25 / 26	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	650	54,5	100	130	10	50	26	7	10,8
	27 / 28	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	650	54,5	100	130	10	50	26	7	10,8
	29 / 30	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	650	54,5	100	130	10	50	26	7	10,8
	31 / 32	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	100	130	10	50	26	7	10,8
	33 / 34	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	100	130	10	50	26	7	10,8
	35 / 36	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	100	130	10	50	26	7	10,8

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert

Proben 3 – 16:
1500 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 25 – 30:
650 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 3 – 17, 37:
1000 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln, vortexen
35 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 Verdaupuffer resuspendiert:
Proben: 5 – 10, 25 - 36:
100 µl 0,1 M / 0,32%

Proben: 11 – 16, 150 µl 0,05 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ PMSF 200

vortexen
+ Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair
Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)

Elektrophorese
50 min 200 V / 180 mA, MOPS

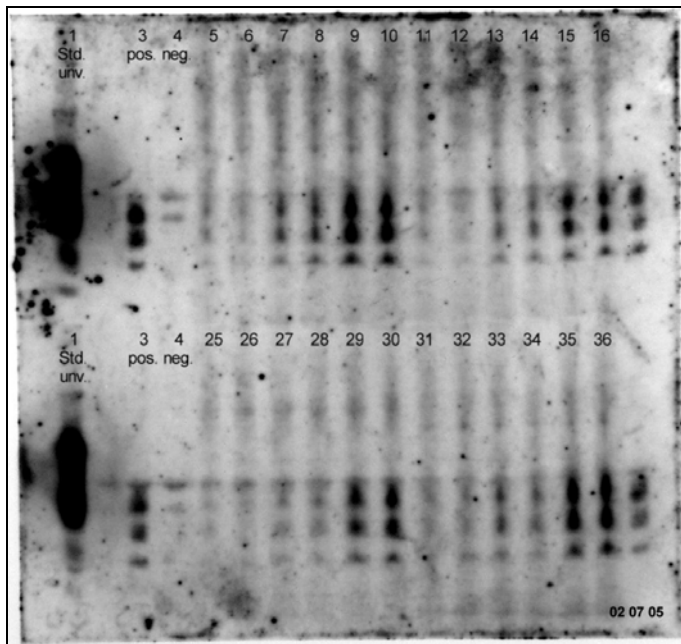
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
15 min in Transferpuffer

Blot:
60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

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

AK I (6H4) 1: 50.000 in TBST
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
90 min AK II; 1: 25.000; 4°C; slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix),
100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I
10min / 30 min. Expositur
4 min / 20 sek. Entwicklung
5 min. Fixierung



02 07 05:

Proben 5 - 10: Fällung mit 72% Ethanol
100µl Verdaupuffer

Proben 11 - 16: Fällung mit 72% Ethanol
150µl Verdaupuffer

Proben 25 - 30: Fällung mit 54% Ethanol
100µl Verdaupuffer

Proben 31 - 36: Fällung mit 63% Ethanol
100µl Verdaupuffer

Abbildung 22: 02 07 05

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonz.:54%, 64% und 72% Ethanol*
- *Resuspension in 100µl bzw. 150 µl DB*
- *Manipulation im 0°C Kühlakku*
- *geringere AK-Conz.*

Conclusio:

- *zu lange Inkubationsdauer AKII (starke Spots am Hintergrund)*
- *bei 54% EtOH erscheint das am besten getrennte Signal (wenngleich etwas heller als bei 75%)*

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen:
50%, 55%, 60% und 64% Ethanol*

Conclusio:

- *starkes Spot-Hintergrundrauschen*
- *bei 64% Ethanol die beste Ausbeute*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

12 µl PK-Stock + 344 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges. Vol.	AD-M	HH	conc	in AD-M	in AD-M	on Blot	Sarco	Lsg	BSA	EtOH	Vol.	PK	SDB	PMSF						
		[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[ng/ml]	[ng/10µl]	10%	[%]	5%	96%	Resusp.	nach	conc	200mM						
1	Std Prionics																					
2	Molekularmarker																					
3	SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51		1500	72,5	100	140	10	44,6	28	7	10,0		
4	SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51		1500	72,5	100	140	10	44,6	28	7	10,0		
1	5 / 6	50%	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	550	50,5	85	125	10	50	25	7	11,2
	7 / 8	50%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	550	50,5	85	125	10	50	25	7	11,2
	9 / 10	50%	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	550	50,5	85	125	10	50	25	7	11,2
	11 / 12	55%	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	670	55,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	13 / 14	55%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	670	55,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	15 / 16	55%	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	670	55,2	85	125	10	50	25	7	11,2
2	25 / 26	60%	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	830	60,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	27 / 28	60%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	830	60,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	29 / 30	60%	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	830	60,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	31 / 32	65%	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	33 / 34	65%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	35 / 36	65%	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert

Proben 5 - 10:
550 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 11 - 16:
670 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 25 - 30:
830 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 31 – 36:
1000 µl Ethanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln, vortexen
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 Verdaupuffer resuspendiert:
85 µl 0,1 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze
resuspendiert und dann Vortexen mit
Pipettenspitze)
+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Heizblock 49°C)
+ 7 µl PMSF 200

vortexen
+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
20 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair
Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)

Elektrophorese
50 min 200 V / 180 mA, MOPS

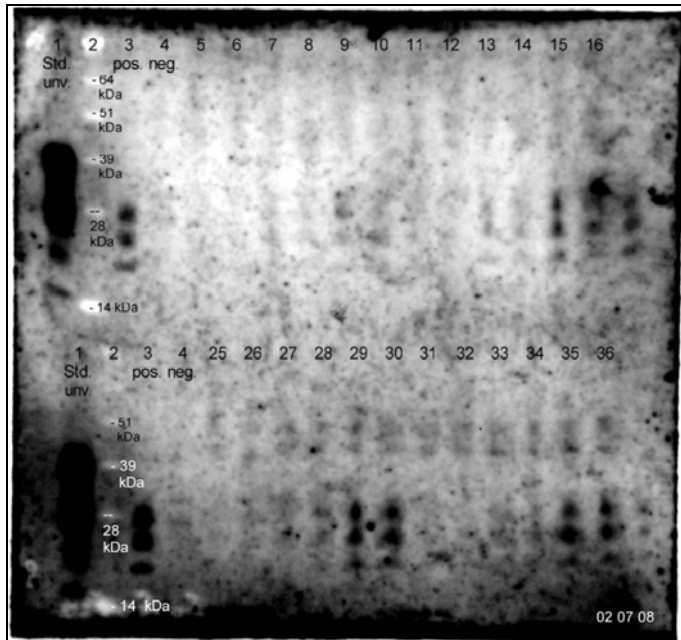
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
15 min in Transferpuffer

Blot:
60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

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

AK I (6H4) 1: 50.000 in TBST
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
60 min AK II; 1: 25.000; 4°C; slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix),
100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I
25min / 45 min. Expositur
20 sek. Entwicklung
5 min. Fixierung



02 07 08:

Proben 5 -10: Fällung mit 50% Ethanol

Proben 11 -16: Fällung mit 55% Ethanol

Proben 25 -30: Fällung mit 60% Ethanol

Proben 31 -36: Fällung mit 64% Ethanol

Abbildung 23 02 07 08

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen: 50%, 55%, 60% und 64% Ethanol*

Conclusio:

- *starkes Spot-Hintergrundrauschen*
- *bei 64% Ethanol die beste Ausbeute*

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen: 65% und 72% Ethanol*
- *Vergleich Ethanol - Methanol als Fällungsmittel*
- *Vergleich TBST und Blockingpuffer als Lösungsmittel für ersten Antikörper (6H4)*

Conclusio:

- *starke Spots im Hintergrund*
- *bei TBST als Lösemittel für AK1 erscheinen noch geringere PrPSC Mengen, starke Banden erscheinen in Blockingpuffer deutlicher.*
- *Bei Methanol als Fällungsmittel erscheinen die Banden breiter*
- *stärkere Banden bei 65% Ethanol /Methanol*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

12 µl PK-Stock + 344 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		Ges. Vol. [µl]	AD-M [µl]	HH			on Blot [ng/10µl]	Sarco		BSA		EtOH		Resusp. Vol.		PK		SDB [µl]	PMSF			
				conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]		10% [µl]	Lsg [%]	5% [µl]	[%]	96% [µl]	[%]	[µl]	[µl]	conc [µg/ml]	200mM [µl]		µmol/ml			
1	Std Prionics																					
2	Molekularmarker																					
3	SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51			1500	72,5	100	140	10	44,6	28	7	10,0	
4	SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	824	30	0,51			1500	72,5	100	140	10	44,6	28	7	10,0	
1	5 / 6	64 % Ethanol	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	7 / 8	64 % Ethanol	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	9 / 10	64 % Ethanol	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	11 / 12	72 % Ethanol	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	13 / 14	72 % Ethanol	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	15 / 16	72 % Ethanol	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	3	SC + 2,5%																				
2	25 / 26	64 % Methanol	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	27 / 28	64 % Methanol	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	29 / 30	64 % Methanol	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1000	64,2	85	125	10	50	25	7	11,2
	31 / 32	72 % Methanol	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	33 / 34	72 % Methanol	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	35 / 36	72 % Methanol	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1500	72,1	85	125	10	50	25	7	11,2
	3	SC + 2,5%																				

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert

Proben 5 - 10:
1000 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 11 - 16:
1500 µl Ethanol 98% / -17°C

Proben 25 - 30:
1000 µl Methanol 98% / -17°C

Proben 31 – 36:
1500 µl Methanol 98% / -17°C
4 x überkopf schütteln, vortexen
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 Verdaupuffer resuspendiert:
85 µl 0,1 M / 0,32%
(Pellet an der Wand mit Pipettenspitze re-
suspendiert und dann Vortexen mit Pipetten-
spitze)
+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 7 µl PMSF 200
vortexen

+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
20 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair
Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)
je 2 Gele parallel geladen → 4 Gele

Elektrophorese

40 min 200 V / 360 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
35 min in Transferpuffer

Blot:

70 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer

Membran A: AK I (6H4) 1: 50.000 in TBST

Membran B: AK I 1: 50.000 in Blockingbuffer
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake

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

60 min AK II; 1: 25.000; 4°C; slow shake

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

5 min CDP Star (Tropix),

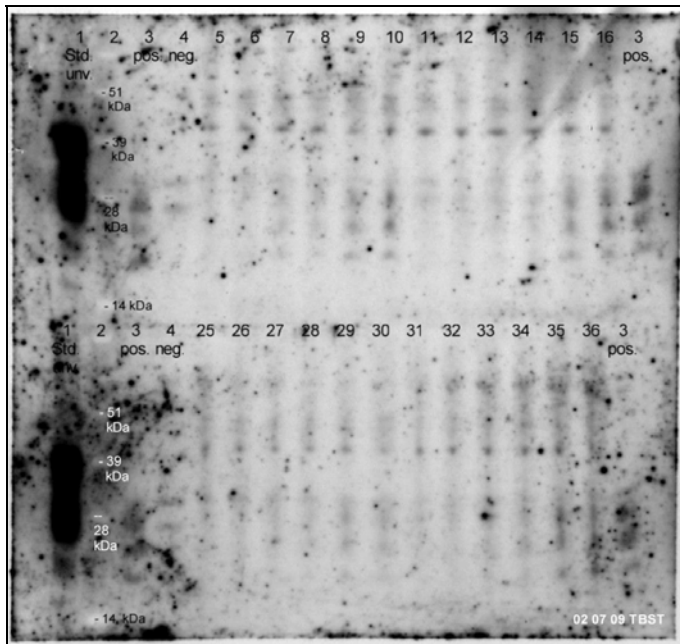
100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

10min / 30 min. Expositur

4 min / 20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung



02 07 09 A

TBST als Lösemittel für Antikörper 1 (6H4[®])

Probe 5 - 10:

Fällung mit 64% Ethanol

Probe 11 - 16:

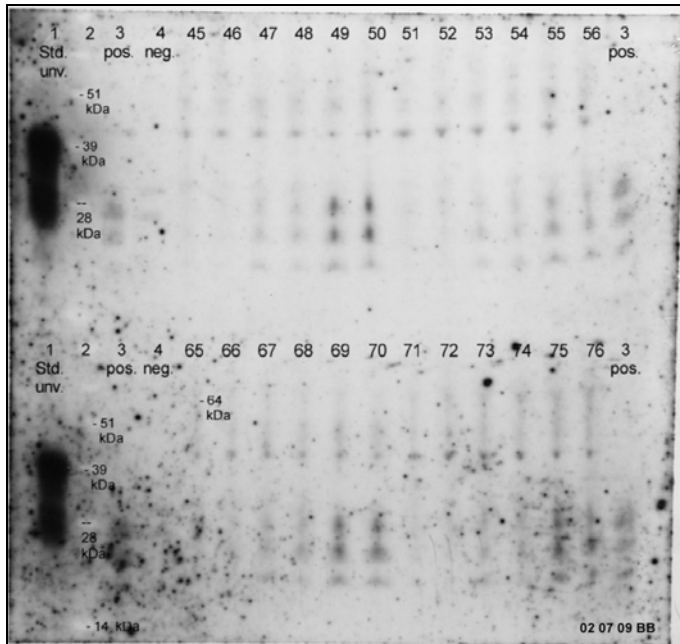
Fällung mit 72% Ethanol

Probe 25 - 30:

Fällung mit 64% Methanol

Probe 31 - 36:

Fällung mit 72% Methanol



02 07 09 B

Blocking-Buffer als Lösemittel für Antikörper 1 (6H4[®])

Proben 45 - 76 sind mit

Proben 5 -36 ident.

Abbildung 24: 02 07 09

Versuche

- Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen: 65% und 72% Ethanol
- Vergleich Ethanol - Methanol als Fällungsmittel
- Vergleich TBST und Blockingpuffer als Lösungsmittel für ersten Antikörper (6H4)

Conclusio:

- starke Spots im Hintergrund
- bei TBST als Lösemittel für AK1 erscheinen noch geringere PrPSC Mengen, starke Banden erscheinen in Blockingpuffer deutlicher.
- Bei Methanol als Fällungsmittel erscheinen die Banden breiter
- stärkere Banden bei 65% Ethanol /Methanol

Versuche

- Vergleich mesophiler - thermophiler Schlamm
- Vergleich Ethanolfällung vor / nach dem Verdau
- neue AK1 Charge

Conclusio:

- schlechte Wiederfindung von PrP^{Sc}
- starke Schmierbanden von BSA
- nicht auswertbar

HH SC - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,15

7,5 µl HH SC+ /10,0 + 493 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

12 µl PK-Stock + 344 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

10.07.02		Ges.Vol	AD-M	HH	conc in AD-M in AD-M			on Blot	Sarco		BSA		EtOH		Re-	Ges.	PK		SDB	PMSF				
		[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	10%	in Lsg	5%	[%]	75%	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	200mM	µmol/ml			
1	Std Prionics																							
2	Molekularmarker																							
3	SC + 2,5%	586,0	500 W	56	2,50	2,518	25180	824	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	7	11,2			
4	SC - 2,5%	586,0	500 W	56	2,50	2,518	25180	824	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	7	11,2			
1	5 / 6 meso, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,15	0,151	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
	7 / 8 meso, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,30	0,302	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
	9 / 10 meso, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,60	0,604	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
2	11 / 12 thermo, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,15	0,151	151,1	49	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
	13 / 14 thermo, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,30	0,302	302,2	99	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
	15 / 16 thermo, Verdau nach Fällung	596,0	500	56	0,60	0,604	604,3	198	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	90	10	50	18	7	15,6			
																				100mM in Resusp		200mM Verdau stopp		
25 / 26	meso, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,15	0,151	151,1	14	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
27 / 28	meso, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,30	0,302	302,2	28	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
29 / 30	meso, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,60	0,604	604,3	56	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
31 / 32	thermo, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,15	0,151	151,1	14	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
33 / 34	thermo, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,30	0,302	302,2	28	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
35 / 36	thermo, Fällung nach Verdau, Resusp Wasser	596,0	500	56	0,60	0,604	604,3	56	30	0,50	10	0,08	1500	56,4	50	80	55	49,9	16	5	10,0	25	10,1	
									840	240		1540				820		508						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M oder Wasser
Schütteln (RT):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
25 min Vortexschüttler (1000 rpm / 0°C)
Zentrifugation: 2000 xg / 4 min

Proben 3 - 16:

neues 2,0 ml Eppendorf
10 µl BSA (5%) vorlegen
gesamter Überstand hinübergeleert
Proben 5, 7, 9, 11, 13, 15:
1500 µl Ethanol **96%** / -17°C
Proben 6, 8, 10, 12, 14, 16:
1500 µl Ethanol **75%** / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 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 Verdaupuffer resuspendiert:
85 µl 0,1 M / 0,32% (Pellet an der Wand mit
Pipettenspitze resuspendiert und dann
Vortexen mit Pipettenspitze)
+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
7 µl PMSF 200

+ 18 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Proben 31 –36: 5 min offen / 25 min
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

Proben 25 - 36:

neues 2,0 ml Eppendorf
gesamter Überstand hinübergeleert
+ 55 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
25 µl PMSF 200
Proben 25, 27, 29, 31, 33, 35:
1500 µl Ethanol **96%** / -17°C
Proben 26, 28, 30, 32, 34, 36:
1500 µl Ethanol **75%** / -17°C
4 x überkopf schütteln
35 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 mit 50 µl Wasser resuspendiert
+ 5 µl PMSF 100 (Deaktivierung der PK-
Reste bei SDS- Behandlung
+ 16 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Proben 31 –36: 5 min offen / 25 min
Zentrifugation: 4000 xg / 5 min

Alle Proben:

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker, Std. und SC+ je 5 µl)
Elektrophorese
35 min 200 V / 240 mA, MOPS
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol

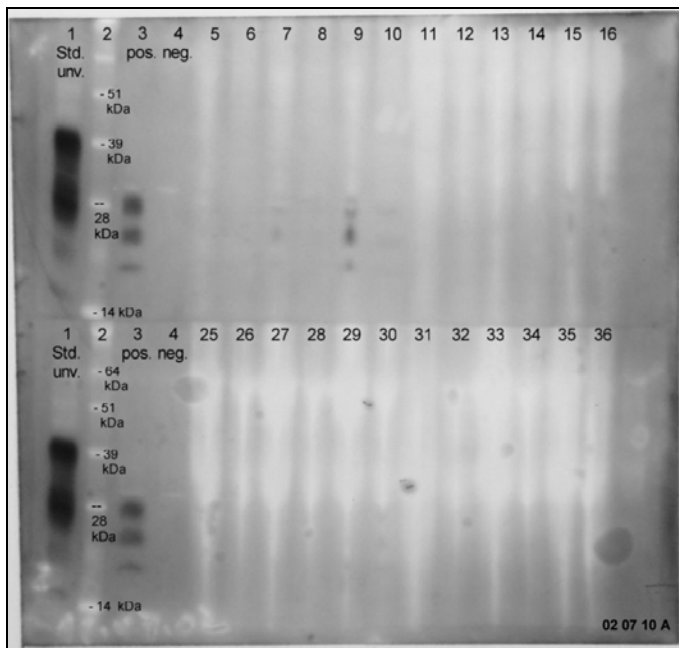
60 sek. In Wasser
25 min in Transferpuffer
Blot:
60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer
Membran:
30 sek. Methanol

30 sek. Wasser
 35 min Blockingpuffer
 AK I (6H4) 1:2500 in TBST
 über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake
 1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
 40 min AK II; 1:25000; RTemp.; slow shake
 1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
 5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

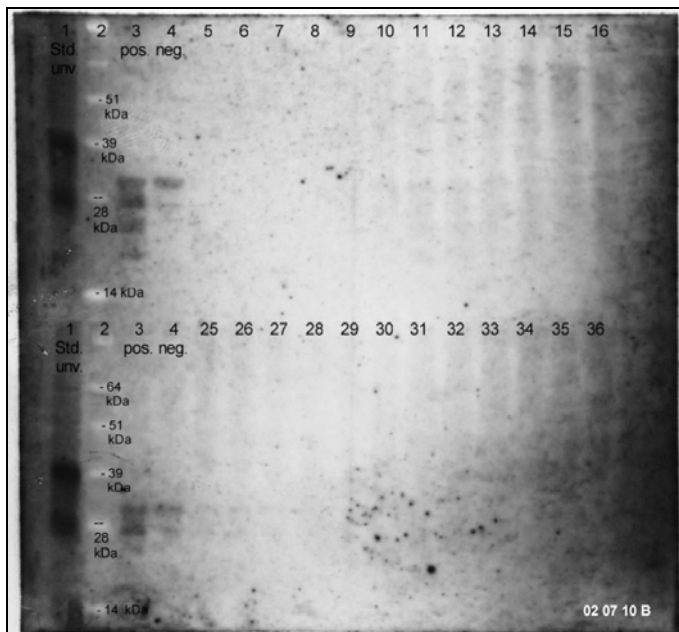
5 min CDP Star (Tropix), 100 µl ad 5 ml mit
 Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I

15 min. Expositur
 2 min. Entwicklung
 5 min. Fixierung



02 07 10 A



02 07 10 B

Abbildung 25: 02 07 10

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen:
je 1500 µl 72 %, 82 % und 96 % Ethanol*
- *Vergleich mesophiler Schlamm und thermophiler Schlamm.*

Conclusio:

- *bessere Ausbeute von PrP^{SC} mit steigender Ethanolkonzentration bei der Fällung.*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02
thermophil: 06.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

10 µl PK-Stock + 398 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 200

200 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

12.07.02		Ges. Vol.	AD-M	HH		in AD-M		in AD-M	on Blot	Sarco		BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK	SDB	PMSF		
		[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	[ng/ml]	[ng/10µl]	10%	in	5%	konz	[µl]	[%]	[%]	susp.	Vol	conc	[µl]	[µl]	100mM	µmol/ml
					[%]	[%]				[µl]	[%]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	
1	Std Prionics																						
2	Molekularmarker																						
3	SC + 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51				1500	72,5		85	125	10	50	25	10	8,0
4	SC - 2,5%	586,00	500 W	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51				1500	72,5		85	125	10	50	25	10	8,0
1	5 / 6	meso 75%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50	25	10	8,0
	7 / 8		596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50	25	10	8,0
		meso 85%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	86	64,6	85	125	10	50	25	10	8,0
			596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	86	64,6	85	125	10	50	25	10	8,0
	13 / 14	meso 96%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50	25	10	8,0
	15 / 16		596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50	25	10	8,0
2	25 / 26	thermo 75%	596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	42	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50	25	10	8,0
	27 / 28		596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50	25	10	8,0
		thermo 85%	596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	85	63,9	85	125	10	50	25	10	8,0
			596,00	500	56	0,15	0,1511	151,1	42	30	0,50	10	0,08	1500	85	63,9	85	125	10	50	25	10	8,0
	33 / 34	thermo 96%	596,00	500	56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50	25	10	8,0
	35 / 36		596,00	500	56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50	25	10	8,0
										840	240							2380	280		700		

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
56 µl Hirnhomogenat
500 µl AD-M
Schütteln (RT: 30°C):
Vortexen
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
+ L. Sarcosin
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 30°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
10 µl BSA (5 %) vorlegen
gesammter Überstand hinübergeleert

Proben 5 - 8; 25 - 28:
1500 µl Ethanol 75 % / -17°C

Proben 9 - 12; 29 - 32:
1500 µl Ethanol 85 % / -17°C

Proben 13 - 16; 33 - 36:
1500 µl Methanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen
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 Verdaupuffer resuspendiert:
85 µl 0,1 M / 0,32% (Pellet an der Wand mit
Pipettenspitze resuspendiert und dann
Vortexen mit Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
Vortexen
35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
+ 10 µl PMSF 100

vortexen
+ 25 µl Sample Buffer 5x
vortexen
10 min 95°C: offene Röhrchen
20 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
Laminair
Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
10 µl Probe (Marker und Std. je 5 µl)

Elektrophorese
42 min 200 V / 200 mA, MOPS

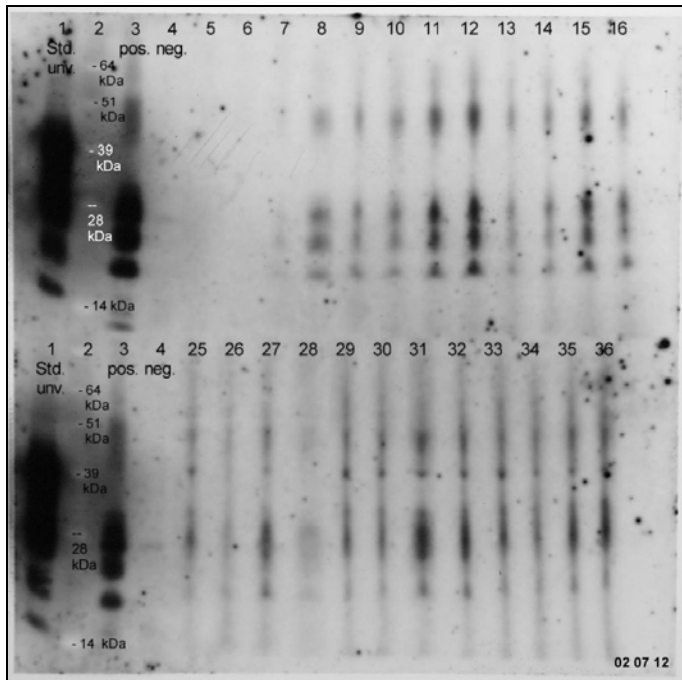
Membranvorbereitung:
60 sek. in Methanol
60 sek. In Wasser
35 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

Blot:
70 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:
30 sek. Methanol
30 sek. Wasser
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

Membran : AK I (6H4) 1: 25.000 in TBST
über Nacht: 13,5 h, 4°C; slow shake
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
45 min AK II; 1: 25.000; 20°C; slow shake
1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
5 min CDP Star (Tropix),
100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung I
10min / 30 min. Expositur
4 min / 20 sek. Entwicklung
5 min. Fixierung



02 07 12

Probe 5 - 8: mesophil, Ethanol 75%ig
(Gesamtkonz. Ethanol: 56%)

Probe 9 - 12: mesophil, Ethanol 86%ig
(Gesamtkonz. Ethanol: 65%)

Probe 13 - 16: mesophil, Ethanol
96%ig (Gesamtkonz. Ethanol: 72%)

Probe 25 - 28: thermophil, Ethanol
75%ig (Gesamtkonz. Ethanol: 56%)

Probe 29 - 32: thermophil, Ethanol
86%ig (Gesamtkonz. Ethanol: 65%)

Probe 33 - 36: thermophil, Ethanol
96%ig (Gesamtkonz. Ethanol: 72%)

Abbildung 26: 02 07 12

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen:
je 1500 µl 72 %, 82 % und 96 % Ethanol*
- *Vergleich mesophiler Schlamm und thermophiler Schlamm.*

Conclusio:

- *bessere Ausbeute von PrP^{SC} mit steigender Ethanolkonzentration bei der Fällung.*

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen:
je 1500 µl 72 %, 82 % und 96 % Ethanol*
- *Verdünnung bei der L.Sarcosinbehandlung auf 67%, 58% und 50%.*

Conclusio:

- *Inkubation des ersten Antikörpers bei RT (ca. 22 -25°C) führt zu keiner Detektion von PrP^{SC}.
Inkubation über Nacht bei tiefen Temp. (4°C) Verdünnung 1:25.000 (2 µl aMab6H4 auf 50 ml TBST) führt zu eindeutiger Detektion von PrP^{SC}.*
- *Verdünnung von AD-M mindestens 2:1 mit Wasser (250µl AD-M + 125µl Wasser) führt zu breiten und eindeutigen Banden.*
- *Fällung mit 75% und 85% Ethanol führen zum selben Ergebnis (ev. bessere Nachweisgrenze), die Gele konnten aber schlecht beladen werden, was z.T. zu helleren Banden führte.*
- *Schlechte Beladbarkeit der Gele → Erhöhung auf 30µl Samplepuffer*

HH SC – /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 µl Wasser

HH SC+ /0,30

15 µl HH SC+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH SC+ /0,60

30 µl HH SC+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH SC+ /2,50

125 µl HH SC+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

10 µl PK-Stock + 398 µl (soll-Endconc. in
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 µl L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

		16.07.02		Ges.Vol	AD-M	Wasser	HH			Sarco	BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK	SDB	PMSF					
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	on Blot	10%	in Lsg	5%	konz			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	100mM	µmol/ml				
						[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µl]	[%]	[µl]	[%]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	µmol/ml			
	1	Std Prionics																							
	2	Molekularmarker																							
	3	SC + 2,5%	586,00		500	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	10	8,0		
	4	SC - 2,5%	586,00		500	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	10	8,0		
1	5 / 6	meso 75%	596,00	500		56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	7 / 8		596,00	500		56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	75	56,4	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	9 / 10	meso 85%	596,00	500		56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	86	64,6	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	11 / 12		596,00	500		56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	86	64,6	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	13 / 14	meso 96%	596,00	500		56	0,30	0,3022	302,2	84	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	15 / 16		596,00	500		56	0,60	0,6043	604,3	168	30	0,50	10	0,08	1500	96	72,1	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
	2	25 / 26	67%	435,00	250	125	28	0,60	0,6043	604,3	84	22	0,51	10	0,11	1100	96	73,6	85	125	10	50,0	25	10	8,0
		27 / 28	Verd. auf 67%	435,00	250	125	28	1,25	1,2590	1259,0	175	22	0,51	10	0,11	1100	96	73,6	85	125	10	50,0	25	10	8,0
29 / 30		58%	493,00	250	180	28	0,60	0,6043	604,3	84	25	0,51	10	0,10	1300	96	73,7	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
31 / 32		Verd. auf 58%	493,00	250	180	28	1,25	1,2590	1259,0	175	25	0,51	10	0,10	1300	96	73,7	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
33 / 34		50%	567,00	250	250	28	0,60	0,6043	604,3	84	29	0,51	10	0,09	1500	96	73,2	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
35 / 36		Verd. auf 50%	567,00	250	250	28	1,25	1,2590	1259,0	175	29	0,51	10	0,09	1500	96	73,2	85	125	10	50,0	25	10	8,0	
										784	240				2380	280			700						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
 56 µl Hirnhomogenat
 500 µl AD-M
 Schütteln (RT: 30°C):
 Vortexen
 10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
 + L. Sarcosin
 + Wasser
 30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 25°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
 neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
 10 µl BSA (5 %) vorlegen
 gesamter Überstand hinübergeleert

Proben 5 - 8:
 1500 µl Ethanol 75 % / -17°C

Proben 9 - 12:
 1500 µl Ethanol 85 % / -17°C

Proben 13 - 16; 33 - 36:
 1500 µl Ethanol 96 % / -17°C

Proben 25 - 28:
 1100 µl Ethanol 96 % / -17°C

Proben 29 - 32:
 1300 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen
 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 Verdaupuffer resuspendiert:
 85 µl 0,1 M / 0,32% (Pellet an der Wand mit
 Pipettenspitze resuspendiert und dann
 Vortexen mit Pipettenspitze)

+ 10 µl PK
 Vortexen
 35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ 10 µl PMSF 100
 vortexen
 + 25 µl Sample Buffer 5x
 vortexen
 10 min 95°C: offene Röhrchen
 15 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
 Laminair
 Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
 SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
 10 µl Probe (Marker und Std. je 5 µl)
 2 Gele parallel geladen

Elektrophorese
 33 min 200 V / 380 mA, MOPS

Membranvorbereitung:
 60 sek. in Methanol
 60 sek. In Wasser
 25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

Blot:
 70 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

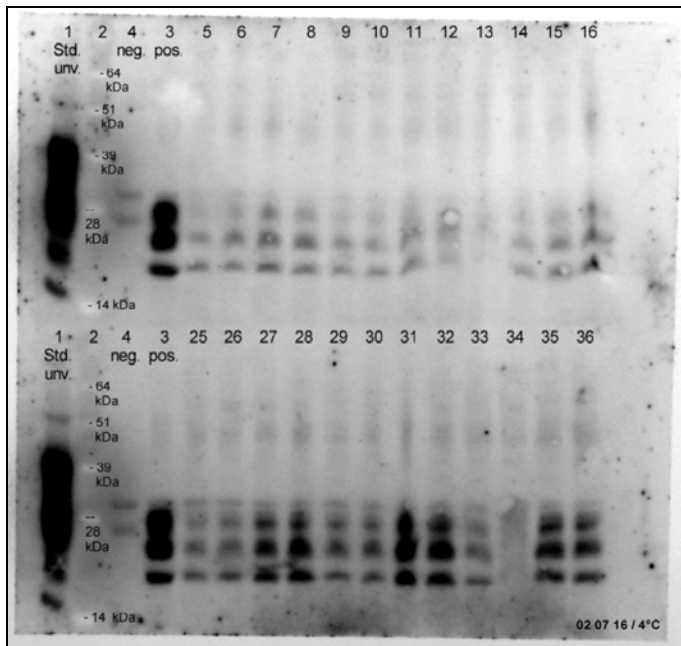
Membran:
 30 sek. Methanol
 30 sek. Wasser
 30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

Membran 1: AK I (6H4) 1: 25.000 in TBST
 über Nacht: 13,5 h, 4°C; slow shake

Membran 2: AK I (6H4) 1: 25.000 in TBST
 über Nacht: 13,5 h, RT; slow shake

1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
 30 min AK II; 1: 5.000; 20°C; slow shake
 1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
 5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
 5 min CDP Star (Tropix),
 100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung
 20 min. Expositur
 4 min (4°C) / 20 sek (RT) Entwicklung
 5 min. Fixierung



02 07 16 A

Inkubation des 1. Antikörpers über Nacht bei 4°C

Proben 5 - 8: Fällung mit 75% Ethanol (Gesamtkonz.: 56%)

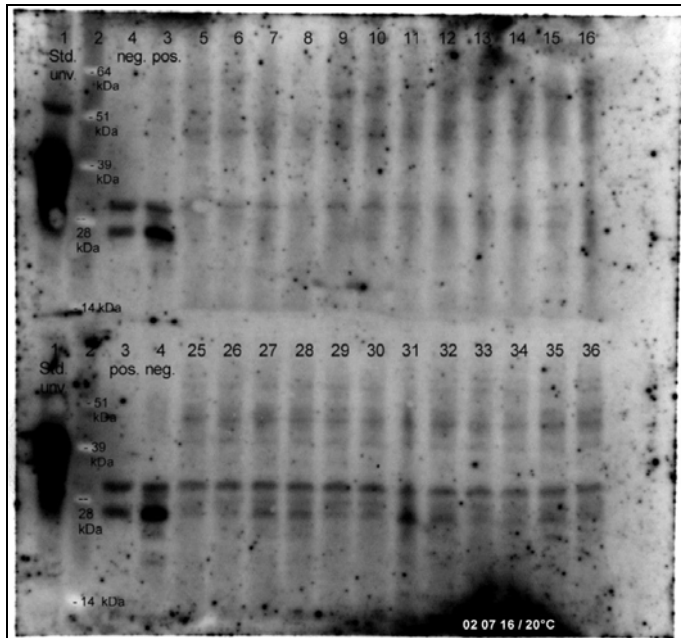
Proben 9 - 12: Fällung mit 85% Ethanol (Gesamtkonz.: 65%)

Proben 13 - 15: Fällung mit 96% Ethanol (Gesamtkonz. 72%)

Proben 25 - 28: Verdünnung des Faulschlammes auf 67%

Proben 29 - 32: Verdünnung des Faulschlammes auf 58%

Proben 33 - 36: Verdünnung des Faulschlammes auf 50%



02 07 16 B

Inkubation des 1. Antikörpers bei Raumtemp. (20°C)

Abbildung 27: 02 07 16

Versuche

- *Ethanolpräzipitation mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen:*
je 1500 µl 72 %, 82 % und 96 % Ethanol
- *Verdünnung bei der L.Sarcosinbehandlung auf 67%, 58% und 50%.*

Conclusio:

- *Inkubation des ersten Antikörpers bei RT (ca. 22 -25°C) führt zu keiner Detektion von PrP^{SC}.*
Inkubation über Nacht bei tiefen Temp. (4°C) Verdünnung 1:25.000 (2 µl aMab6H4

auf 50 ml TBST) führt zu eindeutiger Detektion von PrP^{SC}.

- *Verdünnung von AD-M mindestens 2:1 mit Wasser (250µl AD-M + 125µl Wasser) führt zu breiten und eindeutigen Banden.*
- *Fällung mit 75% und 85% Ethanol führen zum selben Ergebnis (ev. bessere Nachweisgrenze), die Gele konnten aber schlecht beladen werden, was z.T. zu helleren Banden führte.*
- *Schlechte Beladbarkeit der Gele → Erhöhung auf 30µl Samplepuffer*

Versuche

- Verdünnungsreihe 300 - 1200 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, Inokulum, Wasser
- Verdünnung bei der L.Sarcosinbehandlung auf 67%
- Vergleich Inkubationstemperatur des ersten Antikörpers: 20°C und 4°C

Conclusio:

- Eindeutiger Nachweis nach der Inkubation bei 4°C
- Kein PrP^{Sc} Nachweis bei 20°C
- stark zusammengezogene Banden bei thermophilem Faulschlamm

HH SC - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975
in 5 ml Wasser

HH SC- /0,25

250 μl HH SC- /1,0 + 750 μl Wasser

HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975
in 3500 μl Wasser

HH SC+ /0,30

15 μl HH SC+ /10,0 + 485 μl Wasser

HH SC+ /0,60

30 μl HH SC+ /10,0 + 470 μl Wasser

HH SC+ /1,20

60 μl HH SC+ /10,0 + 440 μl Wasser

HH SC+ /2,50

125 μl HH SC+ /10,0 + 375 μl Wasser

ADM

mesophil: 06.07.02
thermophil: 06.07.02
Inokulum: 20.01.00

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

10 μl PK-Stock + 310 μl (soll-Endconc. in
Probe: 50 μg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

50 ml Tris/HCl pH 7,4 1M ad 500 ml

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

10 ml 0,1M Tris/HCl
320 μl L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol
(- 17°C)

17.07.02			Ges. Vol.	AD-M	Wasser	HH			in AD-M	on Blot	Sarco		BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK		SDB	PMSF			
			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	[ng/ml]	[ng/10µl]	10%	in Lsg	5%	[%]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	conc	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]
1	Std Prionics																									
2	Molekularmarker																									
3	SC + 2,5%	586,00		500	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	10	8,0				
4	SC - 2,5%	586,00		500	56	2,50	2,5180	2518,0	700	30	0,51			1500	72,5	85	125	10	50	25	10	8,0				
1	5 / 6	67%	604,00	350	175	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
	7 / 8	meso	604,00	350	175	39	0,60	0,6015	601,5	117	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
	9 / 10	meso	604,00	350	175	39	1,25	1,2532	1253,2	244	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
11 / 12	67%	604,00	350	175	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
13 / 14	thermo	604,00	350	175	39	0,60	0,6015	601,5	117	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
15 / 16	thermo	604,00	350	175	39	1,25	1,2532	1253,2	244	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
2	25 / 26	67%	604,00	350	175	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
	27 / 28	Schlamm alt	604,00	350	175	39	0,60	0,6015	601,5	117	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
	29 / 30	Schlamm alt	604,00	350	175	39	1,25	1,2532	1253,2	244	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3		
31 / 32	67%	604,00	350	175	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
33 / 34	Wasser	604,00	350	175	39	0,60	0,6015	601,5	117	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
35 / 36	wasser	604,00	350	175	39	1,25	1,2532	1253,2	244	30	0,50	10	0,08	1400	96	70,6	85	120	10	49,9	30	10	8,3			
840										240				2380				280		820						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)
 56 µl Hirnhomogenat
 500 µl AD-M
 Schütteln (RT: 30°C):
 Vortexen
 10 min RT Vortexschüttler 200 rpm
 + L. Sarcosin
 + Wasser
 30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 25°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min
 neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku
 10 µl BSA (5 %) vorlegen
 gesamter Überstand hinübergeleert
 1500 µl Ethanol 96 % / -17°C
 überkopf schütteln, vortexen
 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 Verdaupuffer resuspendiert:
 85 µl 0,1 M / 0,32% (Pellet an der Wand mit
 Pipettenspitze resuspendiert und dann
 Vortexen mit Pipettenspitze)
 + 10 µl PK
 Vortexen
 35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)
 + 10 µl PMSF 100
 vortexen
 + 30 µl Sample Buffer 5x
 vortexen

10 min 95°C: offene Röhrchen
 15 min 95°C: geschlossene Röhrchen;
 Laminair

Zentrifugation: 4000 xg / 7 min
 SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot
 10 µl Probe (Marker und Std. je 5 µl)
 2 Gele parallel geladen

Elektrophorese

35 min 200 V / 200 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol
 60 sek. In Wasser
 25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

Blot:

60 min 30 V / 220 mA, Transferpuffer

Membran:

30 sek. Methanol
 30 sek. Wasser
 30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

Membran : AK I (6H4) 1: 25.000 in TBST
 über Nacht: 11 h, RT(22-25°C); slow shake

1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake
 30 min AK II; 1: 5.000; 22°C; slow shake
 1x 1 min, 4x 5 min TBST, fast shake
 5 min Lumineszenz Puffer, fast shake
 5 min CDP Star (Tropix),
 100 µl ad 5 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

20 min. Expositur
 4 min. Entwicklung
 5 min. Fixierung

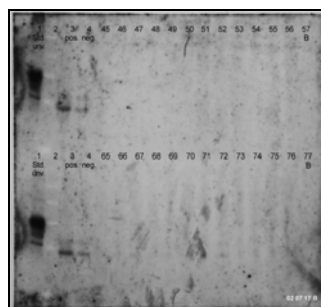
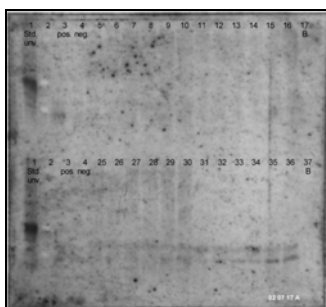
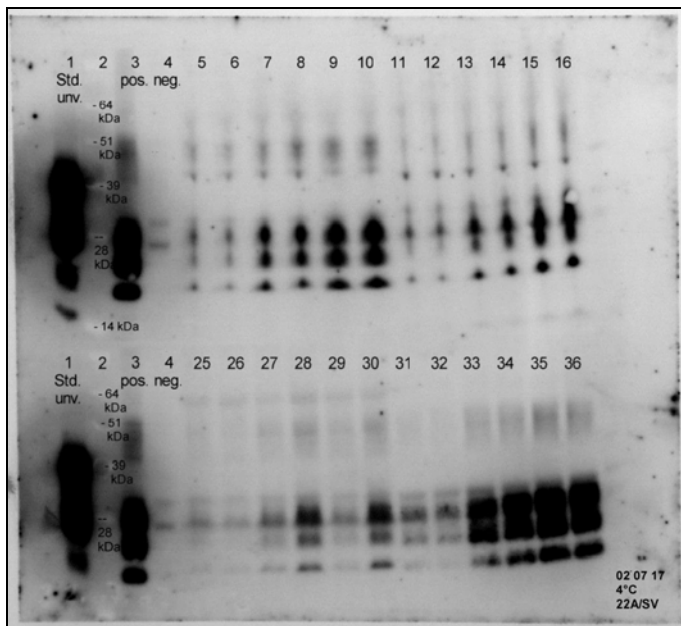


Abbildung 28: 02 07 17:
 Inkubation Anikörper 1 bei
 Raumtemperatur



02 07 17:

Inkubation des 1. Antikörpers bei 4°C

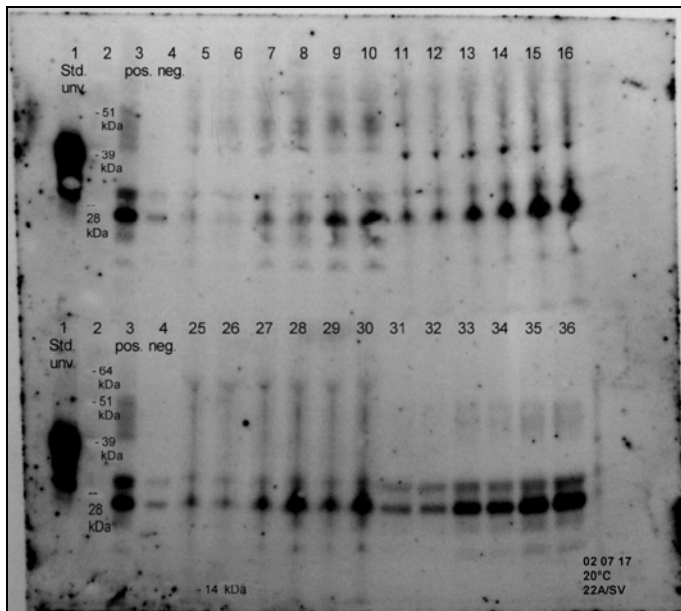
Verdünnung der Proben auf 67%

Proben 5 - 10: mesophil neu

Proben 11 -16: thermophil

Proben 25 - 30: mesophil 2

Proben 31 - 36: Wasser



02 07 17:

Inkubation des 1. Antikörpers bei 20°C

Abbildung 29: 02 07 17

Versuche

- Verdünnungsreihe 300 - 1200 $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, Inokulum, Wasser
- Verdünnung bei der L.Sarcosinbehandlung auf 67%
- Vergleich Inkubationstemperatur des ersten Antikörpers: 20°C und 4°C

Conclusio:

- Eindeutiger Nachweis nach der Inkubation bei 4°C
- Kein PrP^{Sc} Nachweis bei 20°C
- stark zusammengezogene Banden bei thermophilem Faulschlamm