

**IV ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 1 UND OPTIMIERUNG (L3-LABOR)**  
**V ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 2**

**INHALT**

IV.	Arbeitsprotokolle Validierung 1 und Optimierung (L3-Labor) .....	2
IV.1.	02 07 18 .....	2
IV.2.	02 07 22 .....	7
IV.3.	02 07 23 .....	11
IV.4.	02 07 24 .....	16
IV.5.	02 07 25 .....	22
IV.6.	02 07 26 .....	29
IV.7.	02 07 29 .....	33
IV.8.	02 07 30 .....	37
V.	Arbeitsprotokolle Validierung 2 .....	41
V.1.	02 08 02 .....	42
V.2.	02 08 05 .....	49
V.3.	02 08 06 .....	56
V.4.	02 08 07 .....	64

#### IV. ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 1 UND OPTIMIERUNG (L3-LABOR)

##### IV.1. 02 07 18

BAvmU, L3, 18./19.07.2002

#### Versuche

- neue Gelelektrophorese der Proben vom 17.07.02:
  - 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%
- höhere Antikörperkonzentration AK 1 (6H4) 1:10.000  
AK 2 (AP) 1: 5.000
- Vergleich AK1: 6H4 und P4
- Vergleich AK 1 bei Raumtemp. (22°C) und Kühlraum (4°C) bzw. 1h und über Nacht
- kein Waschen der Membranen nach dem Blot mit Methanol

#### Conclusio:

- In den Proben mit mesophilem Schlamm und Inokulum konnte PrP<sup>SC</sup> mit breiten Banden nachgewiesen werden.
- Aus thermophilem Schlamm wurde PrP<sup>SC</sup> mit stark zusammengezogenen Banden nachgewiesen werden
- 1 Stunde Inkubation mit AK 1: 6H4 erkannte PrP<sup>SC</sup> - P4- Antikörper erkannte PrP<sup>SC</sup> nicht.
- Inkubation mit AK1 über Nacht: bei 4°C erfolgte ein perfektes Ergebnis; bei RT wurde PrP<sup>SC</sup> nicht erkannt.
- In Wasser ergab sich keine bessere Bestimmung als aus Schlamm - erhöhung der BSA-Konz: 1 mg / Probe (= 10  $\mu\text{l}$  10% BSA-Lösung)

#### HH SC - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

#### HH SC- /0,25

250  $\mu\text{l}$  HH SC- /1,0 + 750  $\mu\text{l}$  Wasser

#### HH SC+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500  $\mu\text{l}$  Wasser

#### HH SC+ /0,30

15  $\mu\text{l}$  HH SC+ /10,0 + 485  $\mu\text{l}$  Wasser

#### HH SC+ /0,60

30  $\mu\text{l}$  HH SC+ /10,0 + 470  $\mu\text{l}$  Wasser

#### HH SC+ /1,20

60  $\mu\text{l}$  HH SC+ /10,0 + 440  $\mu\text{l}$  Wasser

#### HH SC+ /2,50

125  $\mu\text{l}$  HH SC+ /10,0 + 375  $\mu\text{l}$  Wasser

#### ADM

mesophil: 06.07.02

thermophil: 06.07.02

Inokulum: 20.01.00

#### PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

#### PK:

10  $\mu\text{l}$  PK-Stock + 310  $\mu\text{l}$  (soll-Endconc. in  
Probe: 50  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  L.Sarco (10%)

#### PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol

( - 17°C)

17.07.02			Ges. Vol.	AD-M	Wasser	HH				Sarco		BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK		SDB	PMSF		
			[µl]	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	on Blot	10%	in Lsg	5%	konz			susp.	Vol	conc		100mM				
					[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	[µl]	[%]	[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	<b>85</b>	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	<b>85</b>	125	10	50	25	10	8,0		
<b>1</b>	5 / 6	67%	604,00	<b>350</b>	<b>175</b>	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	<b>1400</b>	96	70,6	<b>85</b>	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	<b>85</b>	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	<b>85</b>	120	10	49,9	30	10	8,3
	11 / 12	67%	604,00	<b>350</b>	<b>175</b>	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	<b>1400</b>	96	70,6	<b>85</b>	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	<b>85</b>	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	<b>85</b>	120	10	49,9	30	10	8,3
<b>2</b>	25 / 26	67%	604,00	<b>350</b>	<b>175</b>	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	<b>1400</b>	96	70,6	<b>85</b>	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	<b>85</b>	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	<b>85</b>	120	10	49,9	30	10	8,3
	31 / 32	67%	604,00	<b>350</b>	<b>175</b>	39	0,30	0,3008	300,8	59	30	0,50	10	0,08	<b>1400</b>	96	70,6	<b>85</b>	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	<b>85</b>	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	<b>85</b>	120	10	49,9	30	10	8,3
<b>840</b>										<b>240</b>				<b>2380</b>				<b>280</b>		<b>820</b>				

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)

Membranen:  
30 sek. Wasser  
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake  
Membran 1: AK I (**6H4**) 1: 5.000 in TBST  
1 h, RT(25°C); slow shake  
Membran 2: AK I (**P4**) 1: 5.000 in TBST  
1 h, RT(25°C); slow shake  
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake  
30 min AK II; 1: 10.000; 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  
15 min. Expositur / 1 min. Entwicklung  
5 min. Fixierung

+ 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)

4 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 3: AK I (**6H4**) 1: 10.000 in TBST  
über Nacht 13 h, RT (25°C); slow shake

Membran 4: AK I (**6H4**) 1: 10.000 in TBST  
Über Nacht 13 h, Kühlraum (4°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  
15 min. Expositur  
20 sek. Entwicklung  
5 min. Fixierung



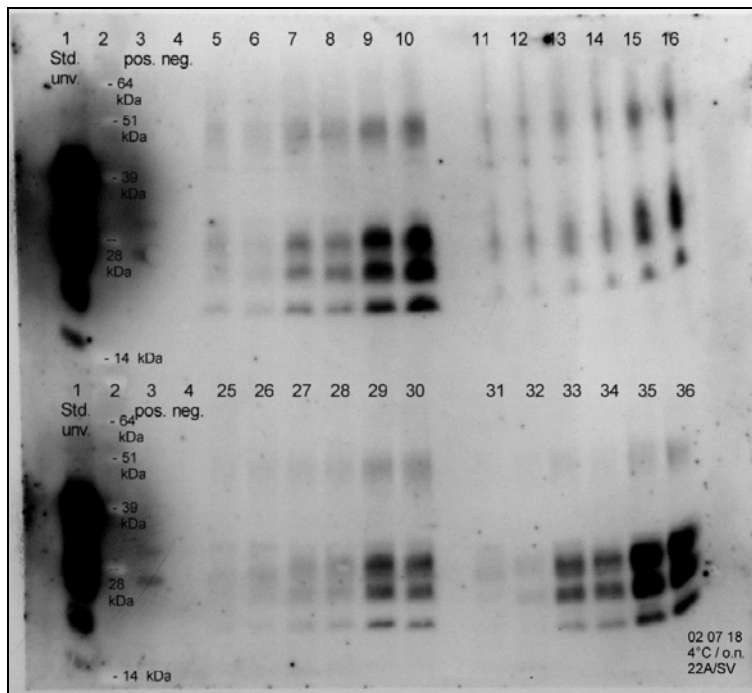


Abbildung 1: 02 07 18: =22A 1.1  
 1.Antikörper 6H4, 1:10 000, über Nacht, 4°C

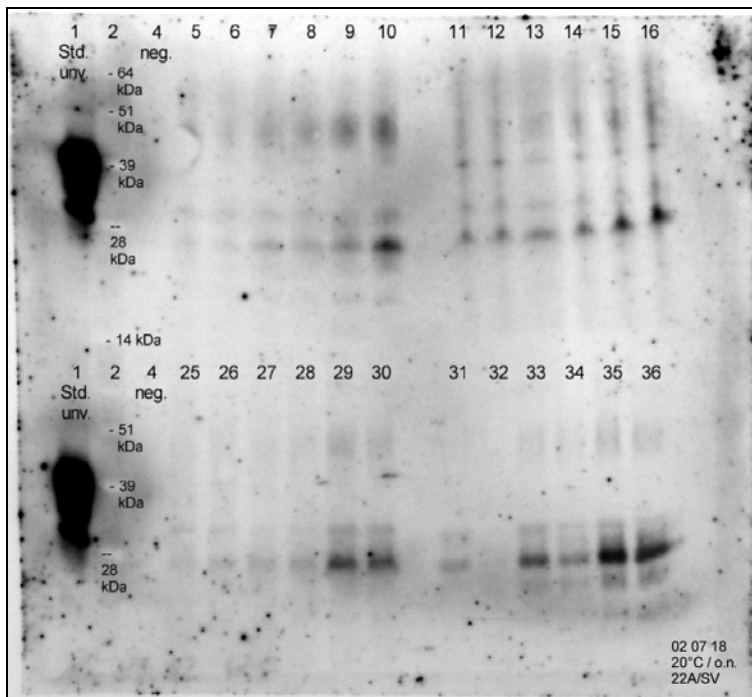


Abbildung 2: 02 07 18: 1.Antikörper 6H4, 1:10 000, über Nacht, Raumtemperatur (20°C)

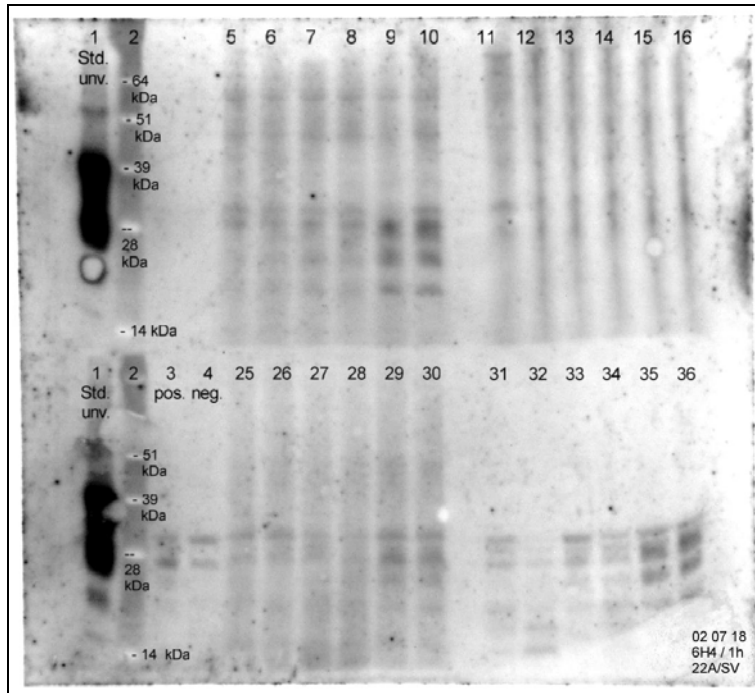


Abbildung 3: 02 07 18: 1Antikörper 6H4, 1:5 000, 1Stunde, Raumtemp. (20°C)

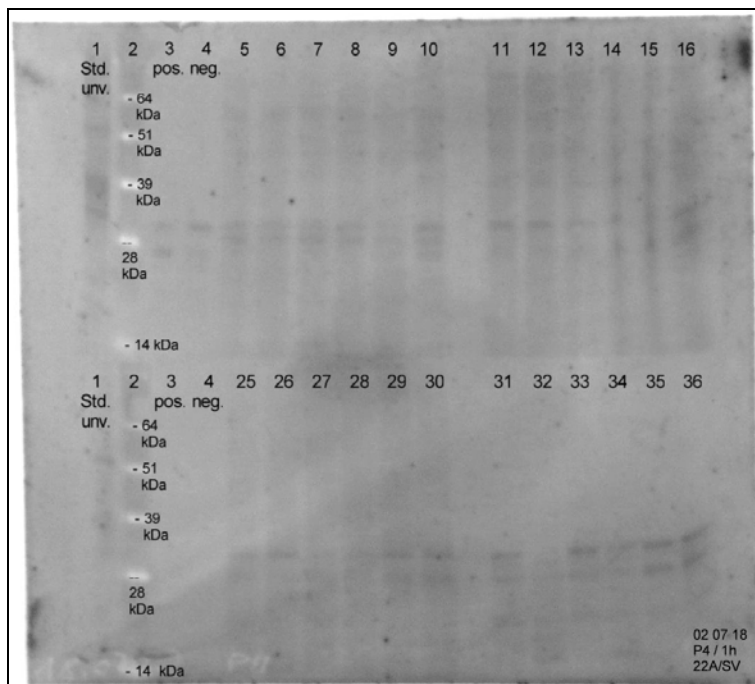


Abbildung 4: 02 07 18: 1.Antikörper P4, 1:5 000, 1Stunde, Raumtemp. (20°C)

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 300 - 1200 ng<sub>HH</sub>/ml<sub>FS</sub>
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, meso (Schlamm, Lederabf.), Wasser
- Verdünnung bei der L.Sarcosinbehandlung auf 50%
- Waschen der Membran mit TBST
- AK 1: 1:10.000 / ü.N. (13 h); AK 2: 1:10.000 / 1,0 h

**Conclusio:**

- Antikörper binden. Blot kann eindeutig ausgewertet werden.
- Inkubation des AK1 bei 4°C führt zu eindeutigen Signalen (auch schwerere PrP<sup>SC</sup> Banden)
- Inkubation des AK1 führt zu schlechten Signalen bzw. nur zur Detektion der leichteren PrP<sup>SC</sup> Bande.

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: 22.07.02

thermophil: 22.07.02

Meso-boxm.: 22.07.02

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)



1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
30 µl Hirnhomogenat  
270 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (1 %ig oder 10 %)  
+ 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 (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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  
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 3,5 µl)  
2 Gele parallel geladen  
Elektrophorese  
40 min 200 V / 360 mA, MOPS  
Membranvorbereitung:  
60 sek. in Methanol  
60 sek. In Wasser  
25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)  
Blot:  
60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer  
Membran:  
2 x 1 min. TBST waschen  
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake  
Membran1: AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST  
über Nacht: 13 h, RT(22-25°C); slow shake  
Membran2: AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST  
über Nacht: 13 h, 4°C; slow shake  
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake  
60 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake  
1x 1 min, 5x 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  
1 min. Entwicklung  
5 min. Fixierung

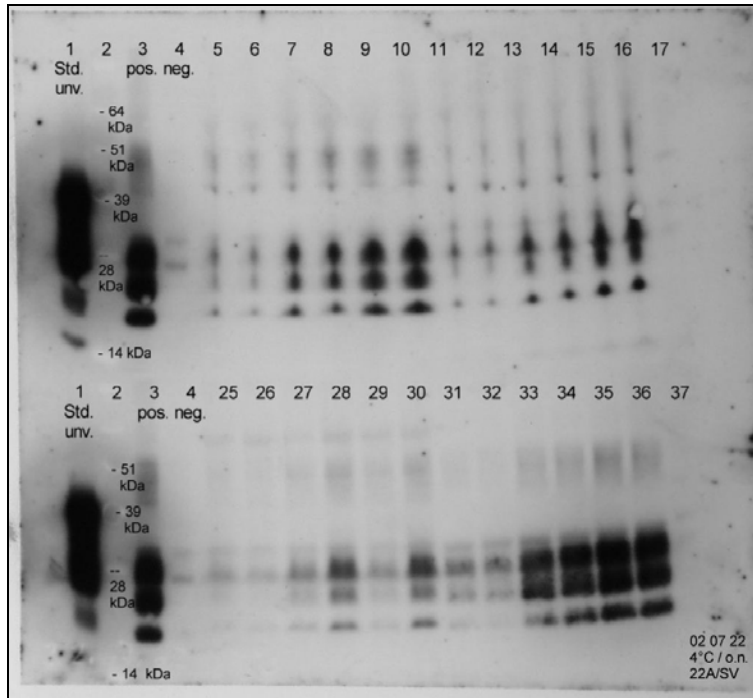


Abbildung 5: 02 07 22: 1. Antikörper 6h4: über Nacht, 4°C 22A1.2

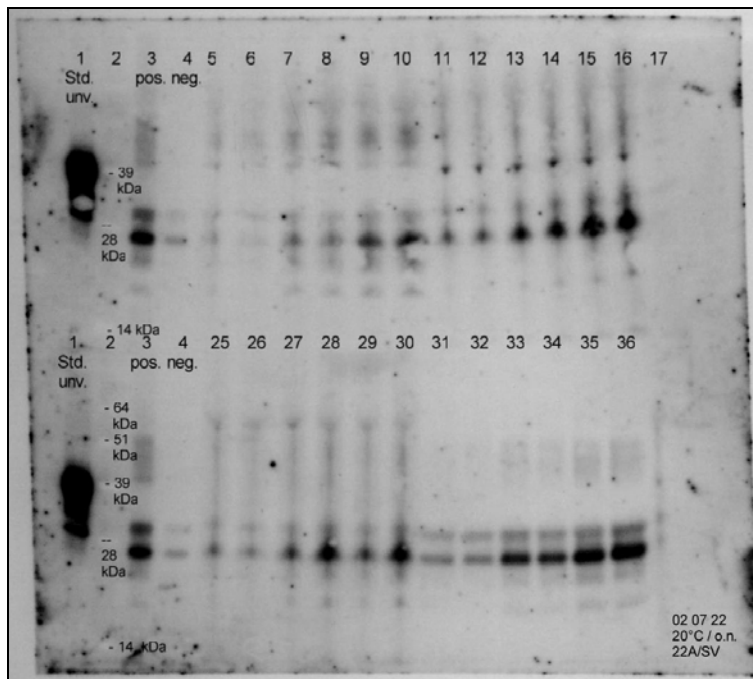


Abbildung 6: 02 07 22: 1. Antikörper 6H4: über Nacht, Raumtemperatur (20°C)

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 300 - 1200 ng<sub>HH</sub>/ml<sub>FS</sub>
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, meso (Schlamm, Lederabf.), Wasser
- Scrapie pos.: 22A/SV Scrapie in Maus
- BSE pos.: 301V/VM BSE in Maus

**Conclusio:**

- Eindeutiger Nachweis von PrP<sup>SC</sup> (22A/SV) in mesophilem Schlamm in thermophilem und meso(box) Schlamm zusammengezogene Banden, jedoch eindeutig PrP<sup>SC</sup>.
- PrP<sup>SC</sup> (301V) nur eindeutig in mesophilem Schlamm. Vergleich der Banden in Wasser ergibt geringere PrP<sup>SC</sup>-Konzentration im Vergleich zu 22A/SV
- eindeutig erkennbare Banden der PrP<sup>SC</sup>-Dimere.
- höhere Konz. an HH für die Proben mit 301V-Hirnmateriale

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>SC</sup> neg.**HH PrP<sup>SC</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>SC</sup> - /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**HH 22A+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

HH 22A+ /0,30

15 µl HH 22A+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH 22A+ /0,60

30 µl HH 22A+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH 22A+ /1,20

60 µl HH 22A+ /10,0 + 440 µl Wasser

HH 22A+ /2,50

125 µl HH 22A+ /10,0 + 375 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /0,30

15 µl HH 301V+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH 301V+ /0,60

30 µl HH 301V+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

60 µl HH 301V+ /10,0 + 440 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

125 µl HH 301V+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 22.07.02

thermophil: 22.07.02

Meso-boxm.: 22.07.02

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)

Schlamm		Hirnhomog.	GesVol	Sample	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			on Blot	L.Sarco			BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK		SDB	PMSF			
23.07.02			[µl]	AD-M+HH	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	[ng/10µl]	1%	10%	in Lsg	10%	[mg]	konz	[µl]	[%]	[%]	susp.	Vol	conc	[µl]	[µg/ml]	[µl]	100mM	µmol/ml
			D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
			=F+G+M+H+ N+P	=F+G+H			=H*(I/100) /((H+F)/ 1000)	=H*(I/100)/((F+ H)/1000)	=H*(I*10) 10/(W+Z)		=E	=M*1/D		=P*0,1			=R*(S/10 0)/(R+D- 100)*100			=25+U+W		=W*1000* 0,599/V			=Z*0,1/V* 1000		
1	Std Prionics																										
2	Molekularmarker																										
3	Kontrolle pos.	22A/SV	545,0	505		<b>395</b>	110	2,50	4,508	25,000	688		30	0,55	10		1500	74,0	<b>170</b>	220	20	50	60	20	20	9,1	
4	Kontrolle neg.	22A/SV	545,0	505		395	110	2,50	4,508	25,000	688		30	0,55	10		1500	74,0	<b>170</b>	220	20	50	60	20	20	9,1	
<b>1</b>	5 / 6	mesophil	22A/SV	610,0	300	<b>270</b>	30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	7 / 8	mesophil	22A/SV	610,0	300	270	30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	9 / 10	mesophil	22A/SV	610,0	300	270	30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	11 / 12	thermophil	22A/SV	610,0	300	<b>270</b>	30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	13 / 14	thermophil	22A/SV	610,0	300	270	30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	15 / 16	thermophil	22A/SV	610,0	300	270	30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	17	neg. meso	22A/SV neg.	610,0	300	270		30	2,50	2,500	2,500	375	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3	
<b>2</b>	25 / 26	mesophil box	22A/SV	610,0	300	<b>270</b>	30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	27 / 28	mesophil box	22A/SV	610,0	300	270	30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	29 / 30	mesophil box	22A/SV	610,0	300	270	30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	31 / 32	Wasser	22A/SV	610,0	300	<b>270</b>	30	0,30	3,000	3,000	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	33 / 34	Wasser	22A/SV	610,0	300	270	30	0,60	6,000	6,000	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	35 / 36	wasser	22A/SV	610,0	300	270	30	1,25	12,50	12,500	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3		
	17	neg. thermo	22A/SV neg.	610,0	300		270	30	1,25	12,50	12,500	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3	



	Schlamm	Hirnhomog.	GesVol [µl]	Sample AD-M+HH [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	Hirnhomogenat			in AD-M [ng/ml]	on Blot [ng/10µl]	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- susp. [µl]	Ges. Vol [µl]	PK		SDB [µl]	PMSF 100mM	
							conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]			1% [µl]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]			[µl]	[µg/ml]		[µl]	[µl]
<b>3</b>	45 / 46	mesophil	301V	610,0	300	<b>270</b>		30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	47 / 48	mesophil	301V	610,0	300	270		30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	49 / 50	mesophil	301V	610,0	300	270		30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	51 / 52	thermophil	301V	610,0	300	<b>270</b>		30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	53 / 54	thermophil	301V	610,0	300	270		30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	55 / 56	thermophil	301V	610,0	300	270		30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	57	neg. meso	22A/SV neg.	610,0	300	270		30	2,50	2,500	2,500	375	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
<b>4</b>	65 / 66	mesophil box	301V	610,0	300	<b>270</b>		30	0,30	0,300	0,300	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	67 / 68	mesophil box	301V	610,0	300	270		30	0,60	0,600	0,600	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	69 / 70	mesophil box	301V	610,0	300	270		30	1,25	1,250	1,250	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	71 / 72	Wasser	301V	610,0	300		<b>270</b>	30	0,30	3,000	3,000	45	<b>300</b>	0,49	10	1,00	<b>1400</b>	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	73 / 74	Wasser	301V	610,0	300		270	30	0,60	6,000	6,000	90	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	75 / 76	wasser	301V	610,0	300		270	30	1,25	12,50	12,500	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	77	neg. thermo	22A/SV neg.	610,0	300		270	30	1,25	12,50	12,500	188	300	0,49	10	1,00	1400	96	70,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
												<b>16800</b>	<b>120</b>	<b>600</b>		<b>5440</b>			<b>640</b>		<b>1920</b>					

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
30 µl Hirnhomogenat  
270 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (1 %ig oder 10 %)  
+ 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 (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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 3,5 µl)

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 360 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

60 sek. In Wasser

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST

über Nacht: 13 h, RT(22-25°C); slow shake

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

60 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

#### Filmbelichtung

20min / 45 min. Expositur

1 min / 20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

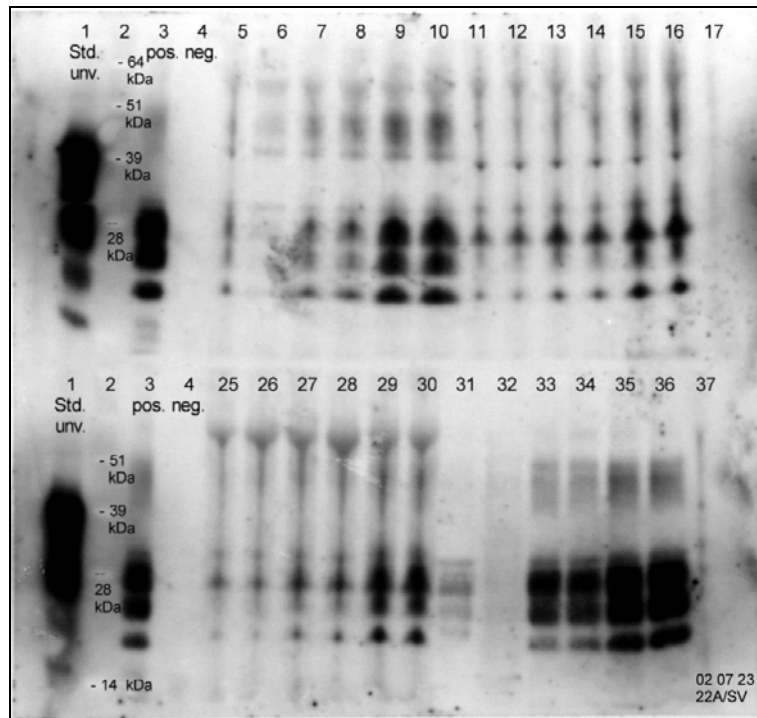


Abbildung 7: 02 07 23: 22A/SV 1.3

Proben 5 - 10: mesophiler Schlamm

Proben 11 - 16: thermophiler Schlamm

Proben 25 - 30: mesophiler Schlamm II

Proben 31 - 36: Wasser

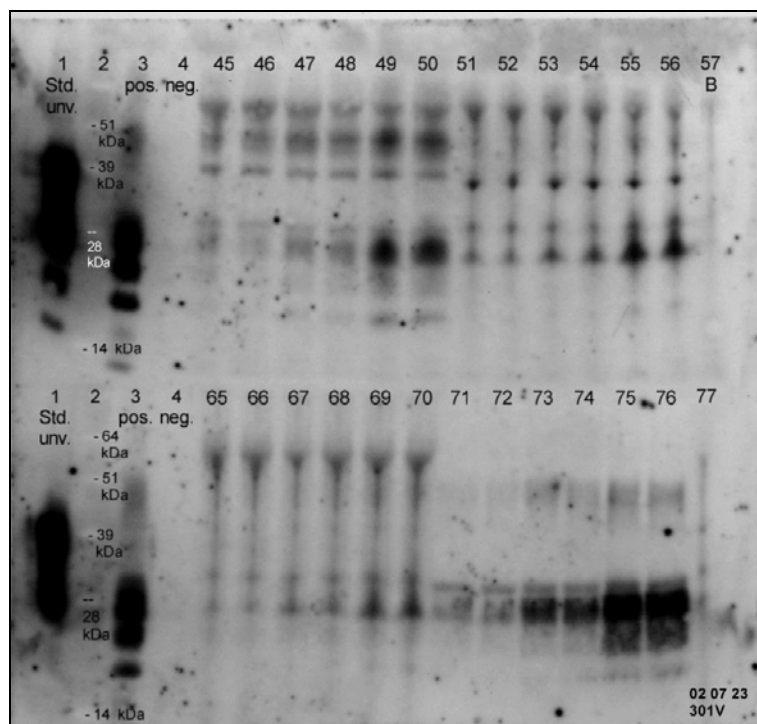


Abbildung 8: 02 07 23: 301V/vm 1.1

Proben 45 - 50: mesophiler Schlamm

Proben 51 - 56: thermophiler Schlamm

Proben 65 - 70: mesophiler Schlamm II

Proben 71 - 76: Wasser

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 600 - 2500 µg<sub>HH</sub>/ml<sub>FS</sub>
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, meso (Schlamm, Lederabf.), Wasser
- BSE pos.: „natürliches“ BSE
- BSE pos.: 301V/VM BSE in Maus

**Conclusio:**

- BSE in meso und Wasser nur Schatten erkennbar; in thermo und meso(box) nicht. zu geringe HH-Konz.
- 301V nur Schatten erkennbar (in Wasser etwas besser)

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>Sc</sup> neg.**HH PrP<sup>Sc</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>Sc</sup> - /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /0,30

15 µl HH BSE+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH BSE+ /0,60

30 µl HH BSE+ /10,0 +470 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

60 µl HH BSE+ /10,0 +440 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

125 µl HH BSE+ /10,0 + 375 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /0,30

15 µl HH 301V+ /10,0 + 485 µl Wasser

HH 301V+ /0,60

30 µl HH 301V+ /10,0 +470 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

60 µl HH 301V+ /10,0 +440 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

125 µl HH 301V+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 22.07.02

thermophil: 22.07.02

Meso-boxm.: 22.07.02

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)

	Schlamm	Hirnhomog.	GesVol	Sample AD-M+HH	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			on Blot	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK		SDB	PMSF		
							conc	in AD-M	in AD-M		1%	10%	in Lsg	10%			konz					conc			100mM	
	23.07.02		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µg/10µl]	[µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	µmol/ml
			D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA
			=F+G+M+H+ N+P	=F+G+H			=H*(I/100) /((H+F)/ 1000)	=((H*I/100)/((F+ H)/1000)	=((H*I*10)* 10/(W+Z))	=E	=M*1/D	=P*0,1				=R*(S/10 0)/(R+D- 100)*100			=25+U+W		=W*1000* 0,599/V			=Z*0,1/V* 1000		
1	Std Prionics																									
2	Molekularmarker																									
3	Kontrolle pos.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,000	688	30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1	
4	Kontrolle neg.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,000	688	30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1	
1	5 / 6	mesophil	301V	510,00	250	225	25	0,60	0,600	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	7 / 8	mesophil	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,200	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	9 / 10	mesophil	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,500	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	11 / 12	thermophil	301V	510,00	250	225	25	0,60	0,600	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	13 / 14	thermophil	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,200	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	15 / 16	thermophil	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,500	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	17	neg. meso	22A/SV neg.	600,00	295	270		25	2,50	2,119	2,119	313	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	85	120	10	50,0	30	10	8,3
2	25 / 26	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	0,60	0,600	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	27 / 28	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,200	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	29 / 30	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,500	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	31 / 32	Wasser	301V	510,00	250		225	25	0,60	6,000	6,000	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	33 / 34	Wasser	301V	510,00	250		225	25	1,20	12,00	12,000	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	35 / 36	wasser	301V	510,00	250		225	25	2,50	25,00	25,000	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	17	neg. thermo	22A/SV neg.	610,00	300		270	30	1,25	12,50	12,500	188	300	0,49	10	1,00	1500	96	71,6	85	120	10	50,0	30	10	8,3

	Schlamm	Hirnhomog.	GesVol	Sample AD-M+HH	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			in AD-M	on Blot	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK		SDB	PMSF	
							conc	in AD-M	in AD-M			1%	10%	in Lsg	10%	10%	konz	Re-	Vol			conc	100mM		µmol/ml	
	23.07.02		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µg/10µl]	[µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	µmol/ml
3	45 / 46	mesophil	BSE	510,00	250	225		25	0,60	0,600	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	47 / 48	mesophil	BSE	510,00	250	225		25	1,20	1,200	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	49 / 50	mesophil	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,500	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	51 / 52	thermophil	BSE	510,00	250	225		25	0,60	0,600	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	53 / 54	thermophil	BSE	510,00	250	225		25	1,20	1,200	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	55 / 56	thermophil	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,500	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	57	neg. meso	22A/SV neg.	600,00	295	270		25	2,50	2,119	2,119	313	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	85	120	10	50,0	30	10	8,3
4	65 / 66	mesophil box	BSE	510,00	250	225		25	0,60	0,60	0,600	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	67 / 68	mesophil box	BSE	510,00	250	225		25	1,20	1,20	1,200	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	69 / 70	mesophil box	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,50	2,500	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	71 / 72	Wasser	BSE	510,00	250		225	25	0,60	6,00	6,000	75	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	73 / 74	Wasser	BSE	510,00	250		225	25	1,20	12,00	12,000	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	75 / 76	wasser	BSE	510,00	250		225	25	2,50	25,00	25,000	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	77	neg. thermo	22A/SV neg.	600,00	295		270	25	1,25	12,50	12,500	156	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	85	120	10	50,0	30	10	8,3
												16800	120	600				5440	640	1920						

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
25 µl Hirnhomogenat  
225 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (1 %ig oder 10 %)  
+ 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 (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 µl Ethanol 96 % / -17°C  
überkopf schütteln, vortexen  
Proben 5 - 37: 40 min  
Proben 45 - 77: 90 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 3,5 µl)

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 360 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST

über Nacht: 13 h, RT(22-25°C); slow shake

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

60 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

#### Filmbelichtung

35 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

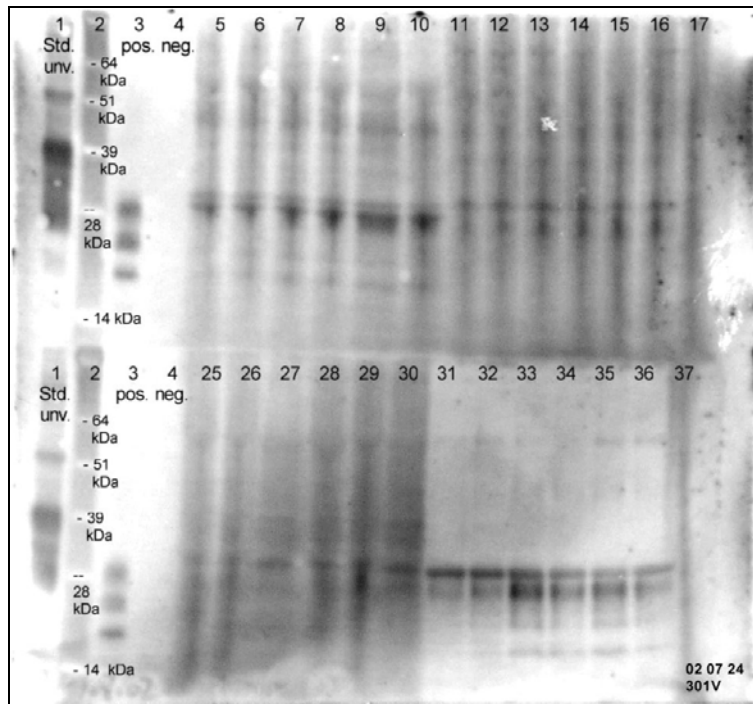


Abbildung 9: 02 07 24: 301V/vm 1.2

Proben 5 - 10: mesophiler Schlamm/301V

Proben 11 - 16: thermophiler Schlamm/301V

Proben 25 - 30: mesophiler Schlamm II/301V

Proben 31 - 36: Wasser/301V

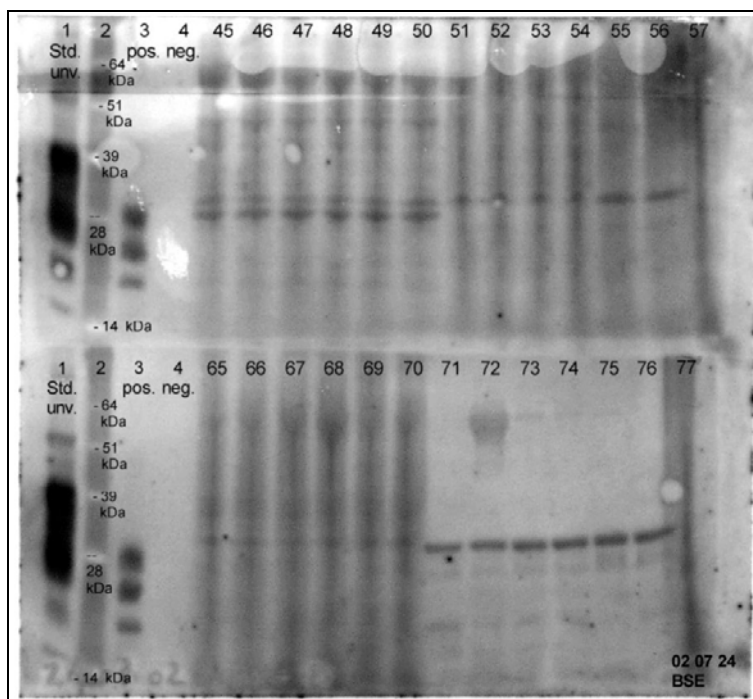


Abbildung 10: 02 07 24: BSE 1.1

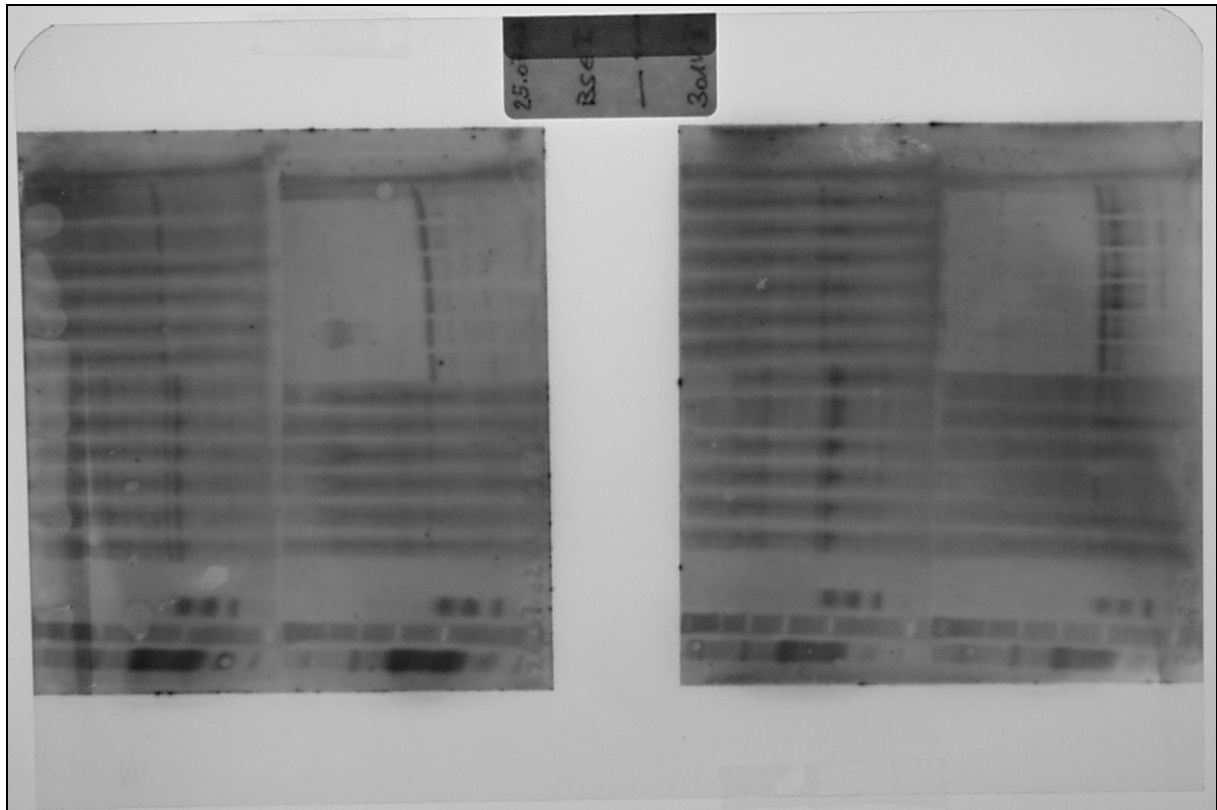
Proben 45 - 50: mesophiler Schlamm/BSE

Proben 51 - 56: thermophiler Schlamm/BSE

Proben 65 - 70: mesophiler Schlamm II/BSE

Proben 71 - 76: Wasser/BSE





A

B

Abbildung 11: 02 07 24

A: BSE als PrP<sup>Sc</sup> Quelle (Abbildung 10)

B: 301V als PrP<sup>Sc</sup> Quelle (Abbildung 9)

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 1200 - 5000 ng<sub>HH</sub>/ml<sub>FS</sub>
- Vergleich Faulschlamm meso, thermo, meso (Schlamm, Lederabf.), Wasser
- BSE pos.: „natürliches“ BSE
- BSE pos.: 301V/NM BSE in Maus

**Conclusio:**

- BSE in meso und Wasser nur Schatten erkennbar; in thermo und meso(box) nicht. zu geringe HH-Konz.
- 301V in meso erkennbar, in meso(box) und thermo zusammengezogene Banden

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>Sc</sup> neg.**HH PrP<sup>Sc</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>Sc</sup> - /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybridge Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 + 220 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

68,5 µl HH BSE+ /10,0 + 187,5 µl Wasser

HH BSE+ /5,00

125 µl HH BSE+ /10,0 + 125 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

125 µl HH BSE+ /10,0 + 375 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

68,5 µl HH 301V+ /10,0 + 187,5 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

125 µl HH 301V+ /10,0 + 125 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

125 µl HH 301V+ /10,0 + 375 µl Wasser

ADM

mesophil: 22.07.02

thermophil: 22.07.02

Meso-boxm.: 22.07.02

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)

	Schlamm	Hirnhomog.	GesVol [µl]	Sample AD-M+HH [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	Hirnhomogenat			in AD-M [µg/ml]	on Blot [ng/10µl]	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- susp. [µl]	Ges. Vol [µl]	PK		SDB [µl]	PMSF	
							conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]			1% [µl]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]			conc [µg/ml]	100mM [µl]		µmol/ml AA	
	23.07.02		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA
			=F+G+M+H+N+P	=F+G+H			=H*(I/100)/((H+F)/1000)	=((H*I/100)/(F+H)/1000)	=((H*I*10)*10/(W+Z))	=E	=M*1/D	=P*0,1					=R*(S/100)/(R+D-100)*100		=25+U+W		=W*1000*0,599/V			=Z*0,1/V*1000		
1	Std Prionics																									
2	Molekularmarker																									
3	Kontrolle pos.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,000	688	30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1	
4	Kontrolle neg.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,000	688	30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1	
1	5 / 6	mesophil	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,2	1,20	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	7 / 8	mesophil	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	9 / 10	mesophil	301V	510,00	250	225	25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	11 / 12	thermophil	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,2	1,20	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	13 / 14	thermophil	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	15 / 16	thermophil	301V	510,00	250	225	25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	17	neg. meso	22A/SV neg.	600,00	295	270		25	2,50	2,1	2,12	313	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	85	120	10	50,0	30	10	8,3
2	25 / 26	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	1,20	1,2	1,20	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	27 / 28	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	29 / 30	mesophil box	301V	510,00	250	225	25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3	
	31 / 32	Wasser	301V	510,00	250		225	25	1,20	12,0	12,00	150	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	33 / 34	Wasser	301V	510,00	250		225	25	2,50	25,0	25,00	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	35 / 36	wasser	301V	510,00	250		225	25	5,00	50,0	50,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3
	17	neg. thermo	22A/SV neg.	610,00	300		270	30	1,25	12,5	12,50	188	300	0,49	10	1,00	1500	96	71,6	85	120	10	50,0	30	10	8,3

	Schlamm	Hirnhomog.	GesVol [µl]	Sample AD-M+HH [µl]	AD-M [µl]	Wasser [µl]	Hirnhomogenat					L.Sarco			BSA		EtOH			Re- susp. [µl]	Ges. Vol [µl]	PK		SDB [µl]	PMSF 100mM	
							conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	on Blot [ng/10µl]	1% [µl]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	konz [µl]	[%]	[%]			conc [µg/ml]	[µl]		[µl]	µmol/ml
<b>3</b>	45 / 46	mesophil	BSE	510,00	250	<b>225</b>		25	1,20	1,2	1,20	150	<b>250</b>	0,49	10	1,00	<b>1500</b>	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	47 / 48	mesophil	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	49 / 50	mesophil	BSE	510,00	250	225		25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	51 / 52	thermophil	BSE	510,00	250	<b>225</b>		25	1,20	1,2	1,20	150	<b>250</b>	0,49	10	1,00	<b>1500</b>	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	53 / 54	thermophil	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	55 / 56	thermophil	BSE	510,00	250	225		25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	57	neg. meso	22A/SV neg.	600,00	295	270		25	2,50	2,1	2,12	313	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
<b>4</b>	65 / 66	mesophil box	BSE	510,00	250	<b>225</b>		25	1,20	1,2	1,20	150	<b>250</b>	0,49	10	1,00	<b>1500</b>	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	67 / 68	mesophil box	BSE	510,00	250	225		25	2,50	2,5	2,50	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	69 / 70	mesophil box	BSE	510,00	250	225		25	5,00	5,0	5,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	71 / 72	Wasser	BSE	510,00	250		<b>225</b>	25	1,20	12,0	12,00	150	<b>250</b>	0,49	10	1,00	<b>1500</b>	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	73 / 74	Wasser	BSE	510,00	250		225	25	2,50	25,0	25,00	313	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	75 / 76	wasser	BSE	510,00	250		225	25	5,00	50,0	50,00	625	250	0,49	10	1,00	1500	96	75,4	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
	77	neg. thermo	22A/SV neg.	600,00	295		270	25	1,25	12,5	12,50	156	295	0,49	10	1,00	1500	96	72,0	<b>85</b>	120	10	50,0	30	10	8,3
							<b>16800</b>	<b>120</b>	<b>600</b>				<b>5440</b>	<b>640</b>	<b>1920</b>											

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
25 µl Hirnhomogenat  
225 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (1 %ig oder 10 %)  
+ 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 (10 %) vorlegen  
gesammter Überstand hinübergeleert  
1400 µl Ethanol 96 % / -17°C  
überkopf schütteln, vortexen  
Proben 5 - 37: 40 min  
Proben 45 - 77: 90 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 3,5 µl)

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 360 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST

über Nacht: 13 h, RT(22-25°C); slow shake

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

60 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

5 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

#### Filmbelichtung

35 /15 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

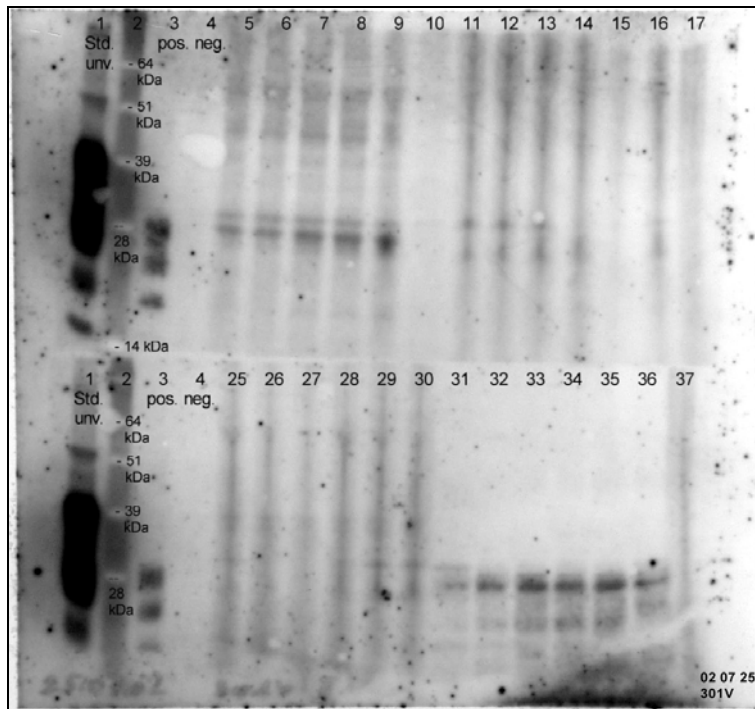


Abbildung 12: 02 07 25: 301V/nm 1.3

Proben 5 - 10: mesophiler Schlamm/301V

Proben 11 - 16: thermophiler Schlamm/301V

Proben 25 - 30: mesophiler Schlamm II/301V

Proben 31 - 36: Wasser/301V

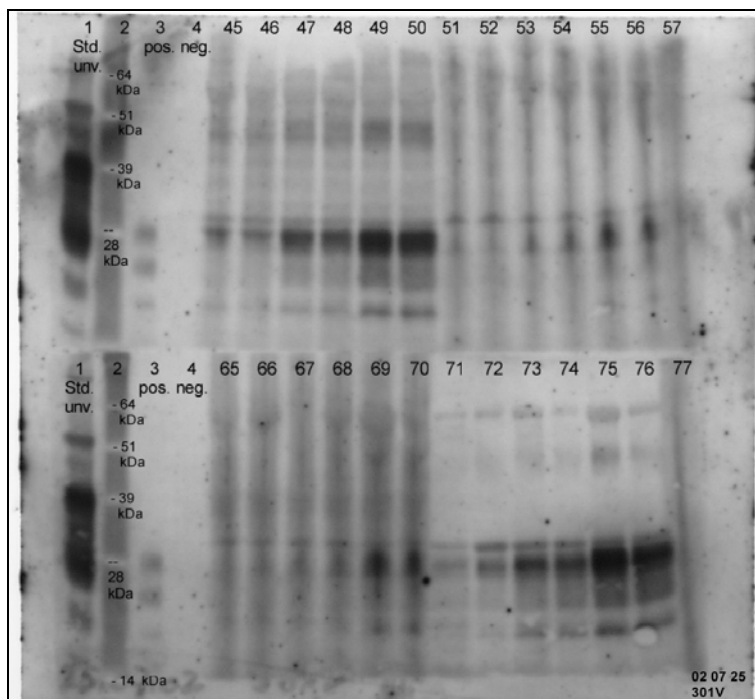


Abbildung 13: 02 07 25: 301V/nm 1.4

Proben 45 - 50: mesophiler Schlamm/301V

Proben 51 - 56: thermophiler Schlamm/301V

Proben 65 - 70: mesophiler Schlamm II/301V

Proben 71 - 76: Wasser/301V

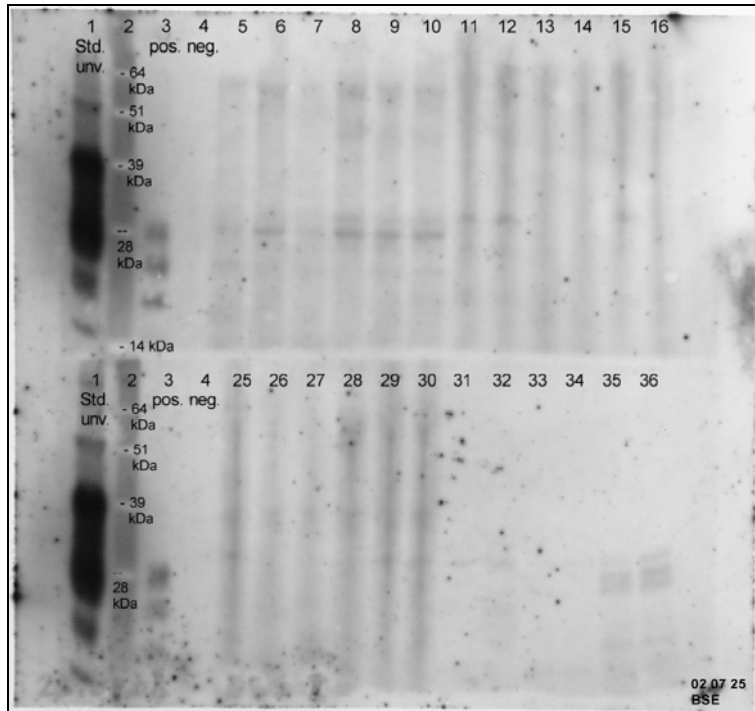


Abbildung 14: 02 07 25: BSE 1.2

Proben 5 - 10: mesophiler Schlamm/BSE

Proben 11 - 16: thermophiler Schlamm/BSE

Proben 25 - 30: mesophiler Schlamm II/BSE

Proben 31 - 36: Wasser/BSE

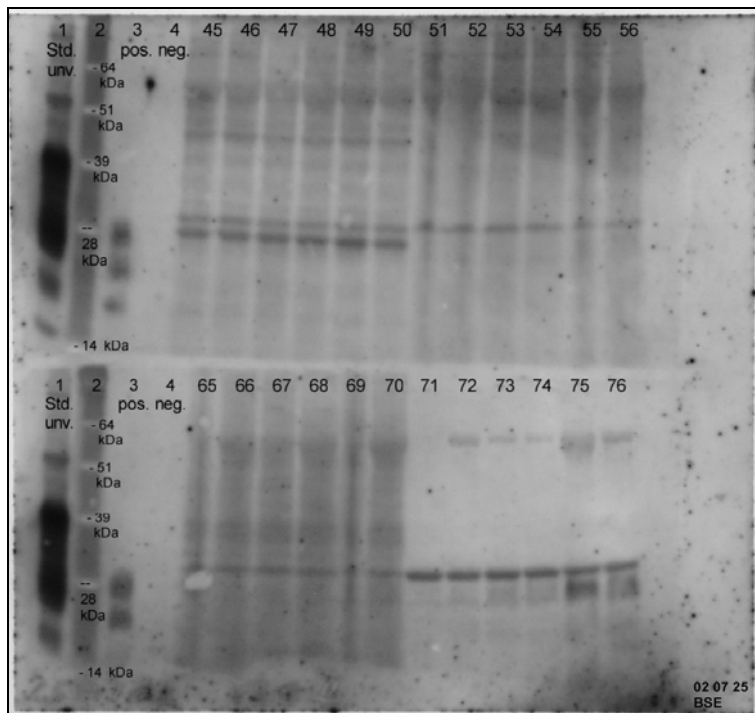


Abbildung 15: 02 07 25: BSE 1.3

Proben 45 - 50: mesophiler Schlamm/BSE

Proben 51 - 56: thermophiler Schlamm/BSE

Proben 65 - 70: mesophiler Schlamm II/BSE

Proben 71 - 76: Wasser/BSE

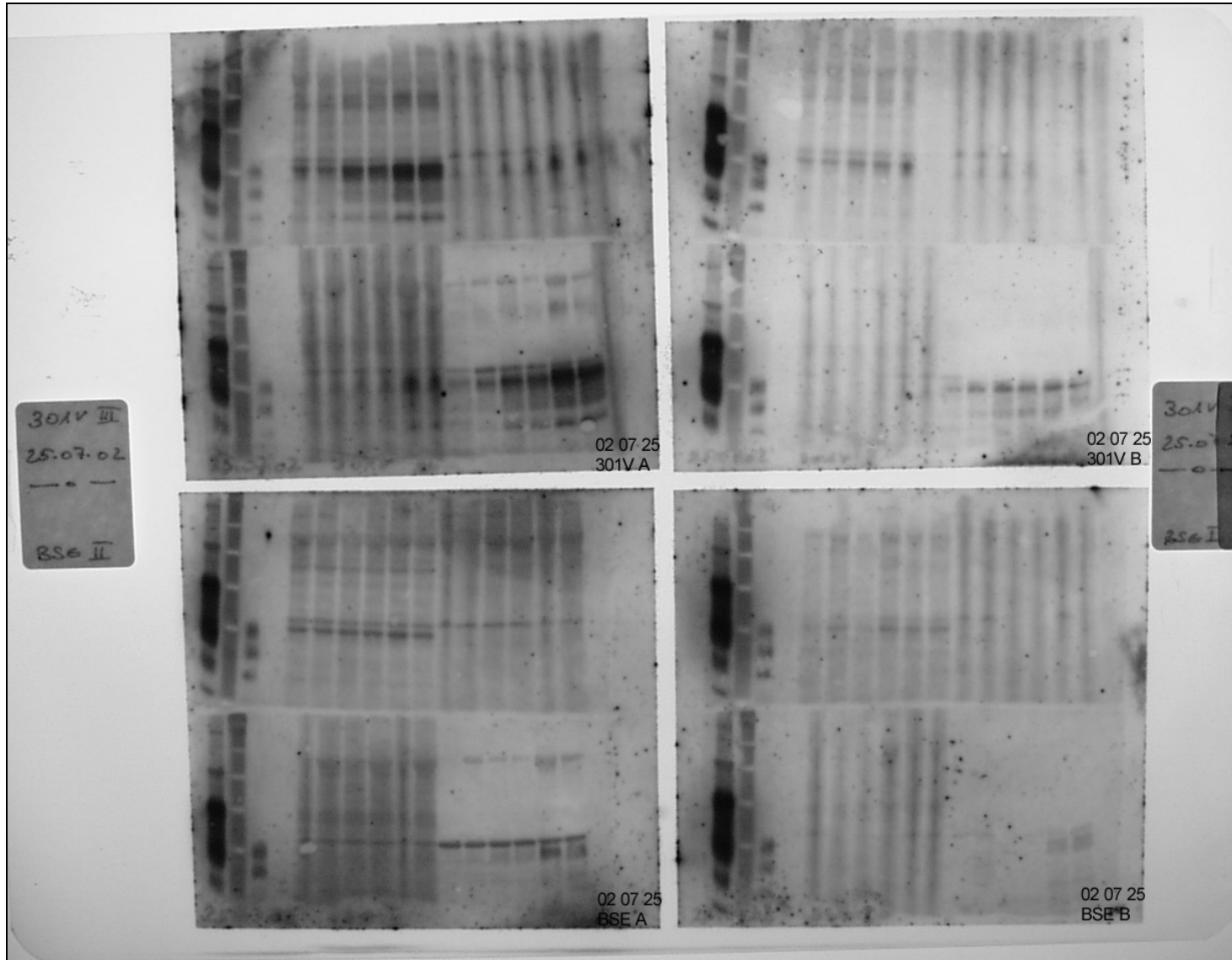


Abbildung 16: 02 07 25



**Versuche**

- Vergleich 17-Taschen Gel und 10-Taschen Gel
- Wiederauftrag der Proben mit thermophilem Schlamm mit 301V (25.07. und 24.07.)

**Conclusio:**

- 10-Slot Gel: nur die schwerere PrP<sup>SC</sup>-Bande ist zu erkennen
- 17-Slot Gel: zusammengezogene Linien

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>SC</sup> neg.**HH PrP<sup>SC</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>SC</sup> - /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

PK:

7,5 µl PK-Stock +231 µl (soll-Endconc. in  
Probe: 50 µg PK/ml)

Tris/HCl 0,1M:

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

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626  
LF0230-00180

Verdaupuffer 0,1 M/0,32

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

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 + 220 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

68,5 µl HH BSE+ /10,0 +187,5 µl Wasser

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol  
( - 17°C)

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

68,5 µl HH 301V+ /10,0 +187,5 µl Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

		26.07.02		GesVol	Sample	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat				L.Sarco			BSA		EtOH			Re- Ges.		PK		SDB	PMSF		Sample			
		Schlamm	Hirnhomog.	[µl]	AD-M+HH	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	on Blot	1%	10%	in Lsg	10%	[µl]	[mg]	konz	[µl]	[%]	[%]	susp.	Vol	conc	[µl]	[µg/ml]	[µl]	100mM	µmol/ml	on Blot
				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA			
				$\frac{F+G+M+H+N+P}{H+N+P}$	$\frac{F+G+H}{H}$			$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	$\frac{H \cdot I}{100} / \frac{(H+F)/1000}{H}$	
1	1	Std Prionics																												3,5
	2	Kontrolle pos.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,00	688		30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1		3,5	
	3	Kontrolle neg.	22A/SV	545,00	505		395	110	2,50	4,508	25,00	688		30	0,55	10		1500	96	74,0	170	220	20	50	60	20	9,1		3,5	
	4	Molekularmarker																												
17 Slot-Gel	5 / 6	thermophil	301V	510,00	250	225		25	0,60	0,600	0,60	10,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
	7 / 8	thermophil	301V	510,00	250	225		25	1,20	1,200	1,20	20,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
	9 / 10	thermophil	301V	510,00	250	225		25	2,50	2,500	2,50	41,7	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
	11 / 12	thermophil	301V	510,00	250	225		25	1,20	1,2	1,20	20,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
	13 / 14	thermophil	301V	510,00	250	225		25	2,50	2,5	2,50	41,7	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
	15	thermophil	301V	510,00	250	225		25	5,00	5,0	5,00	83,3	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		10	
10-Slot-Gel	2	1	thermophil	301V	510,00	250	225		25	0,60	0,600	0,60	30,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30
	2 / 3	thermophil	301V	510,00	250	225		25	1,20	1,200	1,20	60,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30	
	4 / 5	thermophil	301V	510,00	250	225		25	2,50	2,500	2,50	125,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30	
	6	thermophil	301V	510,00	250	225		25	1,20	1,2	1,20	60,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30	
	7 / 8	thermophil	301V	510,00	250	225		25	2,50	2,5	2,50	125,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30	
	9 / 10	thermophil	301V	510,00	250	225		25	5,00	5,0	5,00	250,0	250		0,49	10	1,00	1500	96	75,4	85	120	10	50,0	30	10	8,3		30	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
Hirnhomogenat vorlegen  
AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (1 %)  
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 (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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 / 10 min  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot  
30 µl Probe  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot  
10 µl Probe (Marker und Std. je 3,5 µl)

#### Elektrophorese

37 min 200 V / 225 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

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

#### Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen  
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

300 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

#### Filmbelichtung

25 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

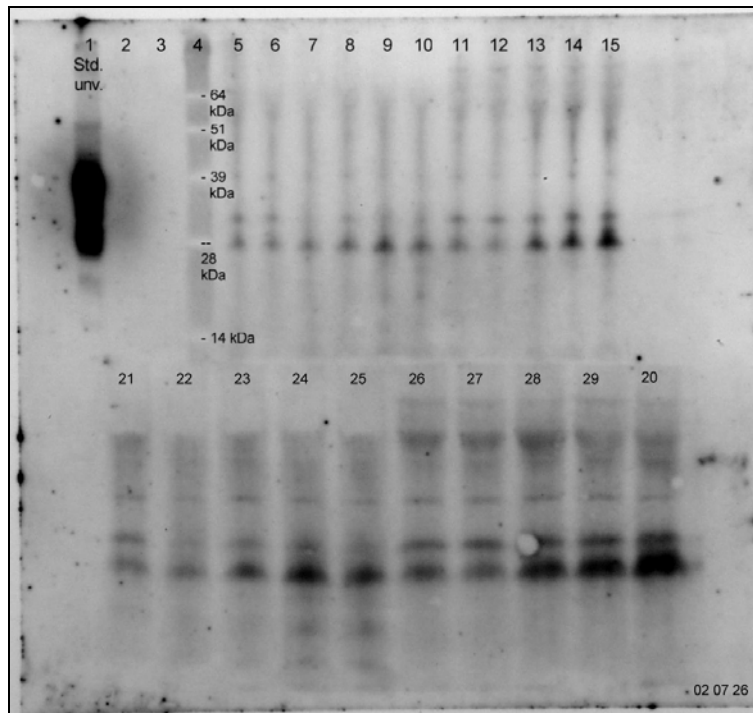


Abbildung 17: 02 07 26: Vergleich Gel mit 10 (35 µl) und 17 (12 µl) Taschen

**Versuche**

- Vergleich 17-Taschen Gel und 10-Taschen Gel

**Conclusio:**

- 10-Slot Gel: nur die schwerere PrP<sup>SC</sup>-Bande ist zu erkennen
- 17-Slot Gel: zusammengezogene Linien

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 1200 - 2500  $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Faulschlamm thermo
- BSE pos.: „natürliches“ BSE
- BSE pos.: 301V/NM BSE in Maus
- Vergleich verschiedener Beladungsmengen in 17-Taschen-Gel (5, 7 und 10  $\mu\text{l}$ ) bzw. Beladung in 10-Taschen-Gel (30  $\mu\text{l}$ )

**Conclusio:**

- schlechte Ausbeute bei BSE
- 10-Slot Gel: 301V ergibt nur die schwerere PrP<sup>SC</sup>-Bande
- 17-Slot Gel: bei BSE zusammengezogene Linien  
301V ergibt zwar breite Banden, jedoch nur die schwere PrP<sup>SC</sup>-Bande

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>SC</sup> neg.**HH PrP<sup>SC</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>SC</sup> - /0,25

250  $\mu\text{l}$  HH SC- /1,0 + 750  $\mu\text{l}$  Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500  $\mu\text{l}$  Wasser

HH BSE+ /1,20

30  $\mu\text{l}$  HH BSE+ /10,0 + 220  $\mu\text{l}$  Wasser

HH BSE+ /2,50

68,5  $\mu\text{l}$  HH BSE+ /10,0 + 187,5  $\mu\text{l}$  Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500  $\mu\text{l}$  Wasser

HH 301V+ /1,20

30  $\mu\text{l}$  HH 301V+ /10,0 + 220  $\mu\text{l}$  Wasser

HH 301V+ /2,50

68,5  $\mu\text{l}$  HH 301V+ /10,0 + 187,5  $\mu\text{l}$  Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

7,5  $\mu\text{l}$  PK-Stock + 231  $\mu\text{l}$  (soll-Endconc. in  
Probe: 50  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  L.Sarco (10%)

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol  
(- 17°C)

		29.07.02		GesVol	Sample	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			theoret.	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- Ges.	PK		PMSF		SDB	Sample			
		Schlamm	Hirnhomog.		AD-M+HH			conc	in AD-M	in AD-M	HH on Blot	1%	10%	in Lsg	10%		EtOH			susp.	Vol	conc	100mM						
				[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	[µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]	
				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z	AA	Y		
				$\frac{F+G+M+H}{D+N+P}$	$\frac{F+G+H}{E}$			$\frac{H^*I/100}{H+F/1000}$	$\frac{(H^*I/100)/(F+H)}{(F+H)/1000}$	$\frac{(H^*I/100)/(F+H)}{(F+H)/1000}$	$\frac{(H^*I/100)/(F+H)}{(F+H)/1000}$	E				$\frac{R^*S/100}{(R+D-100)/100}$				$\frac{U}{V}$	$\frac{W^*1000^0}{599V}$		$\frac{Z^*0,1V^*10}{100}$						
1	2	Molekularmarker																											
	3	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100			100	2,5	4,17	25	89,3									100	220	20	50	20	9,1	60	10	
	5 / 6	thermophil	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	60,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	30	
	7 / 8	thermophil	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	30	
	9 / 10	thermophil	BSE	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	60,0	27	0,50		10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	30	
	11 / 12	thermophil	BSE	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	30	
2	1	Std.Prionics																											
	2	Molekularmarker																											
	3	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100			100	2,5	4,17	25	89,3									100	220	20	50	20	9,1	60	10	
	4	Kontrolle pos.	301V	100	100			100	2,5	4,17	25	89,3										100	220	20	50	20	9,1	60	10
	25 / 26	= 5 / 6	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	10,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	5	
	27 / 28	= 7 / 8	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	20,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	5	
	29 / 30	= 5 / 6	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	14,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	7	
	31 / 32	= 7 / 8	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	28,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	7	
	33 / 34	= 5 / 6	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	20,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10	
35 / 36	= 7 / 8	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	40,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10		
37	thermophil	22A neg	537	500	450		50	2,5	0,25	2,50	83,3	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10		
3	1	Std.Prionics																											
	2	Molekularmarker																											
	3	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100			100	2,5	4,17	25	89,3									100	220	20	50	20	9,1	60	10	
	4	Kontrolle pos.	301V	100	100			100	2,5	4,17	25	89,3										100	220	20	50	20	9,1	60	10
	25 / 26	= 9 / 10	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	10,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	5	
	27 / 28	= 11 / 12	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	20,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	5	
	29 / 30	= 9 / 10	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	14,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	7	
	31 / 32	= 11 / 12	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	28,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	7	
	33 / 34	= 9 / 10	301V	537	500	450		50	0,6	0,06	0,60	20,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10	
35 / 36	= 11 / 12	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1,20	40,0	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10		
37	thermophil	22A neg	537	500	450		50	2,5	0,25	2,50	83,3	27	0,50		10	1,00	1500	96	74,3	85	120	10	49,9	10	8,3	30	10		

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
50 µl Hirnhomogenat  
450 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
+ 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 (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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 / 10 min

Proben 5 - 12:  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot  
30 µl Probe (Marker und Std. je 20 µl)

Proben 25 - 37:

Verdünnung mit SDB 1x:  
5µl Probe (5-8) + 5µl SDB 1x = Proben 25-28  
7µl Probe (5-8) + 3µl SDB 1x = Proben 29-32  
10µl Probe (5-8) = Proben 33 - 36  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot  
10 µl Probe (Marker und Std. je 3,5 µl)

Proben 45 - 57:

Verdünnung mit SDB 1x:  
5µl Probe (5-8) + 5µl SDB 1x = Proben 45-48  
7µl Probe (5-8) + 3µl SDB 1x = Proben 49-52  
10µl Probe (5-8) = Proben 53 - 56  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 17 Slot  
10 µl Probe (Marker und Std. je 3,5 µl)

Elektrophorese

37 min 200 V / 225 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

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

Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

2 x 1 min. TBST waschen  
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 10.000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

300 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

Filmbelichtung

25 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

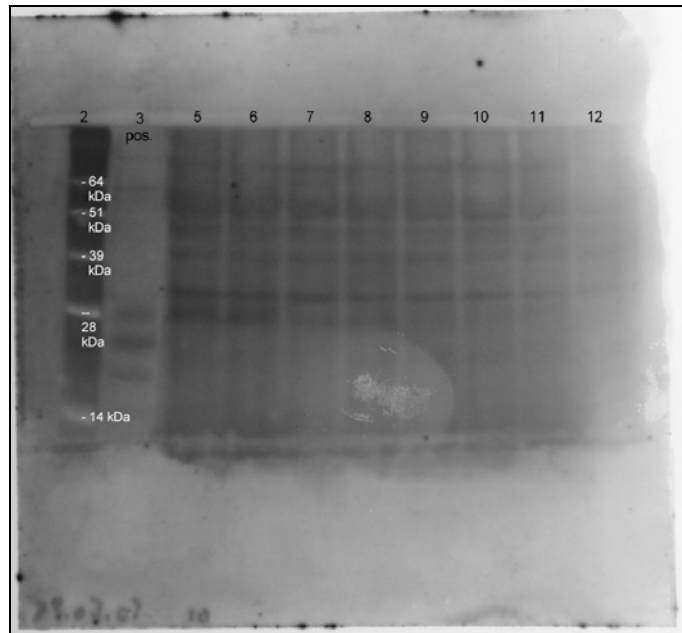


Abbildung 18: 02 07 29 10-Taschen-Gel

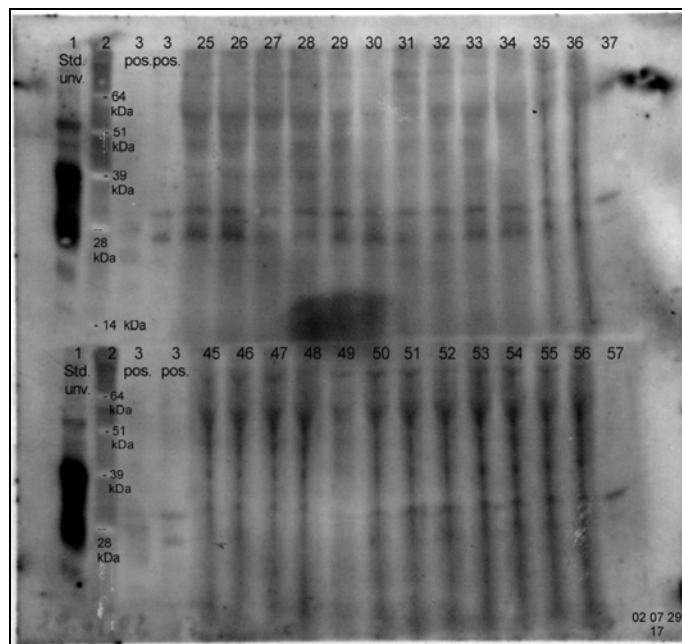


Abbildung 19: 02 07 29: 17-Taschen Gel

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 1200 - 2500  $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Faulschlamm thermo
- BSE pos.: „natürliches“ BSE
- BSE pos.: 301V/NM BSE in Maus
- Vergleich verschiedener Beladungsmengen in 17-Taschen-Gel (5, 7 und 10  $\mu\text{l}$ ) bzw. Beladung in 10-Taschen-Gel (30  $\mu\text{l}$ )

**Conclusio:**

- schlechte Ausbeute bei BSE
- 10-Slot Gel: 301V ergibt nur die schwerere PrP<sup>SC</sup>-Bande
- 17-Slot Gel: bei BSE zusammengezogene Linien  
301V ergibt zwar breite Banden, jedoch nur die schwere PrP<sup>SC</sup>-Bande



**Versuche**

- Verdünnungsreihe 1200 - 10.000 µg<sub>HH</sub>/ml<sub>FS</sub>
- Faulschlamm thermophil
- BSE pos.: „natürliches BSE“ und 301V Maus passiertes BSE
- 10 Slot Gele

**Conclusio:**

- natürliches BSE kann nicht identifiziert werden
- schlechte Ausbeute bei 301V
- keine zusammengezogenen Banden

**Hirnhomogenat Kontrolle PrP<sup>Sc</sup> neg.**HH PrP<sup>Sc</sup> - /1,0

Hirnhomogenat: 538 mg Nr. 6975  
in 5 ml Wasser

HH PrP<sup>Sc</sup> - /0,25

250 µl HH SC- /1,0 + 750 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /5,00

125 µl HH BSE+ /10,0 +125 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

63 µl HH BSE+ /10,0 +187 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 +220 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /5,0

125 µl HH 301V+ /10,0 + 125 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

7,5 µl PK-Stock +231 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)

		30.07.02		GesVol	Sample	AD-M	Wasser	Hirnhomogenat			theoret.	L.Sarco			BSA		EtOH			Re- Ges.		PK		PMSF		SDB	Sample		
Schlamm		Hirnhomog		[µl]	AD-M+HH	[µl]	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	HH on	1%	10%	in Lsg	10%		konz			susp.	Vol	conc	100mM				on Blot		
				[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	[µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]	
				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z	AA	Y		
				$=F+G+M+H+N+P$					$=H*(I/100)/((H+F)/1000)$			$=H*(I/100)/((F+H)/1000)$	$=((H*(I/100)*10)/W)*1000$	$=E$		$=M*1/D$	$=P*0,1$			$=R*(S/100)/(R+D-100)*100$	$=25+U+W$		$=W*100/0*0,599/V$		$=Z*0,1/V*1000$				
1	2	Molekularmarker																											
	3	Kontrolle pos.	301V	100	100			100	10,0	16,67	100	714,3									100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	5 / 6	thermophil	301V	537	500	450		50	1,2	0,12	1	160,0		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	7 / 8	thermophil	301V	537	500	450		50	2,5	0,25	3	333,3		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	9 / 10	thermophil	301V	537	500	450		50	5,0	0,50	5	666,7		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	11 / 12	thermophil	301V	537	500	450		50	10,0	1,00	10	1333,3		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
2	2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100			100	10,0	16,67	100	714,3									100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	3	Kontrolle pos.	BSE	100	100			100	10,0	16,67	100	714,3									100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	25 / 26	thermophil	BSE	537	500	450		50	1,2	1,20	1	160,0		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	27 / 28	thermophil	BSE	537	500	450		50	2,5	2,50	3	333,3		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	29 / 30	thermophil	BSE	537	500	450		50	5,0	5,00	5	666,7		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
	31 / 32	thermophil	BSE	537	500	450		50	10,0	10,00	10	1333,3		27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	49,9	10	8,3	30	40	
													432	160							1760	240				720			

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
50 µl Hirnhomogenat  
450 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
+ Wasser  
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 22°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min  
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku  
10 µl BSA (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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

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

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 225 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

60 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 20.000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

30 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

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

10 min Lumineszenz Puffer, fast shake

10 min CDP Star (Tropix),

200 µl ad 10 ml mit Lumineszenz Puffer

#### Filmbelichtung

25 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

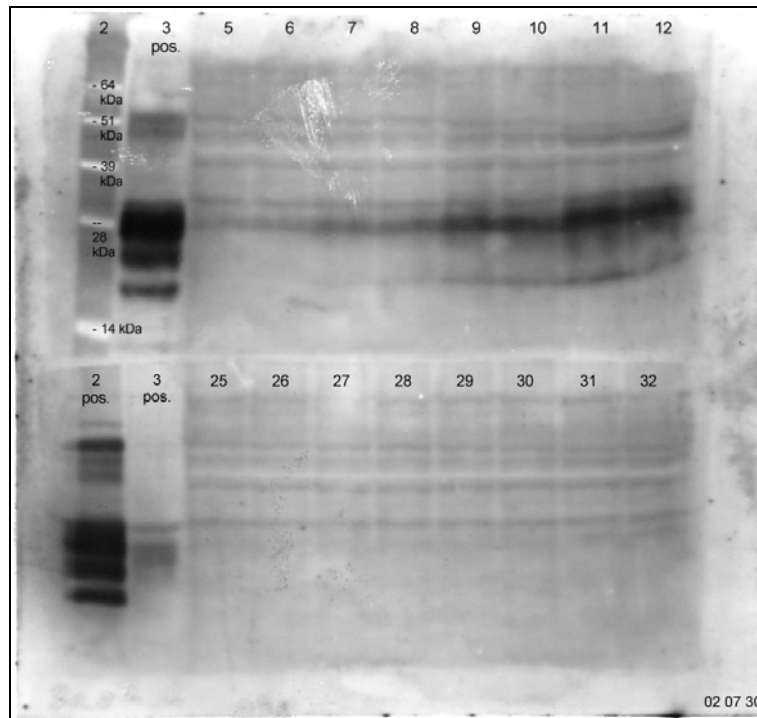


Abbildung 20: 02 07 30

**Versuche**

- Verdünnungsreihe 1200 - 10.000  $\mu\text{g}_{\text{HH}}/\text{ml}_{\text{FS}}$
- Faulschlamm thermophil
- BSE pos.: „natürliches BSE“ und 301V Maus passiertes BSE
- 10 Slot Gele

**Conclusio:**

- natürliches BSE kann nicht identifiziert werden
- schlechte Ausbeute bei 301V
- keine zusammengezogenen Banden

## **V. ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 2**

### **INHALT**

V.	Arbeitsprotokolle Validierung 2.....	41
V.1.	02 08 02.....	42
V.2.	02 08 05.....	49
V.3.	02 08 06.....	56
V.4.	02 08 07.....	64

**Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>SC</sup>
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> bovines BSE (England) 5,00% und 10,0% Hirn in Wasser
- geringere Verdautemperatur
- längere Blotzeit
- geringere Antikörper-1-konzentration (6H4): 2,5 µl in 50 ml TBST
- 10 Slot Gele

**Conclusio:**

- zu geringe Verdautemperatur (starke Überladung mit unverdaulichem BSA)
- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in Wasser und mesophilem Schlamm; in thermophilem und meso box-Schlamm nur Schatten → neues Hirnhomogenat

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV****HH 22A+ /10,0**

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

**HH 22A+ /0,60**

30 µl HH 22A+ /10,0 + 470 µl Wasser

**HH 22A+ /1,20**

60 µl HH 22A+ /10,0 + 440 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybridge Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

**HH BSE+ /10,0**

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

**HH BSE+ /5,00**

125 µl HH BSE+ /10,0 + 125 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM****HH 301V+ /10,0**

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

**HH 301V+ /2,50**

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

**HH 301V+ /1,20**

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

**ADM**

thermophil: 22.07.02

mesophil: 22.07.02

mesophil box: 22.07.02

**PK-Stock (19,3 mg/ml)**

Sigma

**PK:**

7,5 µl PK-Stock + 231 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)

02.08.02		GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat					theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re- Ges.		PK		PMSF		SDB	Sample	
Schlamm		Hirnhomog.	AD-M+HH		conc in AD-M in AD-M					HH on Blot	10% in Lsg	10%	konz			susp.	Vol	conc		100mM			on Blot			
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]		[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µmol/ml]	[µl]	[µl]	
		E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA		
		$=G+H+M+O$	$=G+H$		$=H*(I/10)$	$=H*(I/10)$	$=((H*(I/100))/(H+G))$	$=((H*(I/100))/(G+H))$	$=((H*(I/1000))/(U+Z))$	$=M*10/E$		$=O*0,1$			$=Q*(R/100)/(Q+E)$		$=25+T+V$		$=V*1000/0,6/U$		$=X*0,1/U$					
1	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	3/4	mesophil	22A/SV	537	500	450	50	0,6	0,06	0,60	60,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	5/6	mesophil	22A/SV	537	500	450	50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	7/8	thermophil	22A/SV	537	500	450	50	0,6	0,06	0,60	60,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	9/10	thermophil	22A/SV	537	500	450	50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
2	11	Std Prionics																						7		
	12	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	13/14	meso box	22A/SV	537	500	450	50	0,6	0,60	0,60	60,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	15/16	meso box	22A/SV	537	500	450	50	1,2	1,20	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	17/18	Wasser	22A/SV	537	500	450	50	0,6	0,60	0,60	60,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	19/20	Wasser	22A/SV	537	500	450	50	1,2	1,20	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
3	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	23/34	mesophil	301V	537	500	450	50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	25/26	mesophil	301V	537	500	450	50	2,5	0,25	2,50	250,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	27/28	thermophil	301V	537	500	450	50	1,2	0,12	1,20	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	29/30	thermophil	301V	537	500	450	50	2,5	0,25	2,50	250,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
4	1	Std Prionics																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	33/34	meso box	301V	537	500	450	50	1,2	1,20	1	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	35/36	meso box	301V	537	500	450	50	2,5	2,50	3	250,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	37/38	Wasser	301V	537	500	450	50	1,2	1,20	1	120,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	39/40	Wasser	301V	537	500	450	50	2,5	2,50	3	250,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30

	Schlamm	Hirnhomog.	AD-M+HH	[µl]	[µl]	[µl]	HH on				10% in Lsg		konz			susp. Vol		conc 100mM			on Blot					
							concentration	in AD-M	in AD-M	Blot	10%	in Lsg	10%	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]
5	1	Molekularmarker																				7				
	2	Kontrolle pos.	BSE	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4						100	220	20	50	20	9,1	60	30		
	43 / 44	mesophil	BSE	537	500	450	50	5,0	0,5	5,00	500,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	45 / 46	mesophil	BSE	537	500	450	50	10,0	1,0	10,00	1000,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	47 / 48	thermophil	BSE	537	500	450	50	5,0	0,5	5,00	500,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	49 / 50	thermophil	BSE	537	500	450	50	10,0	1,0	10,00	1000,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
6	1	Std Prionics																				7				
	2	Kontrolle pos.	BSE	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4						100	220	20	50	20	9,1	60	30		
	53 / 54	meso box	BSE	537	500	450	50	5,0	5,0	5	500,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	55 / 56	meso box	BSE	537	500	450	50	10,0	10,0	10	1000,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	57 / 58	Wasser	BSE	537	500	450	50	5,0	5,0	5	500,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30
	59 / 60	Wasser	BSE	537	500	450	50	10,0	10,0	10	1000,0	27	0,50	10	1,00	1400	96	73,2	85	120	10	50,0	10	8,3	30	30



1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
50 µl Hirnhomogenat  
450 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
+ Wasser  
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 22°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min  
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku  
10 µl BSA (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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 37°C (Wasserbad 37,5°C)**  
+ 10 µl PMSF 100  
vortexen  
+ 30 µl Sample Buffer 5x  
vortexen

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

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 225 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

**90 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer**

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

#### **AK I (6H4) 1: 20.000 in TBST**

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

30 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

1x 1 min, 5x 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

15 min. Expositur

10 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

#### Färben der Membranen mit BCIP/NPT

5 min Waschen mit TBST am Schüttler

20 ml BCIP/NPT + 30 ml TBST

4°C slow shake übers Wochenende

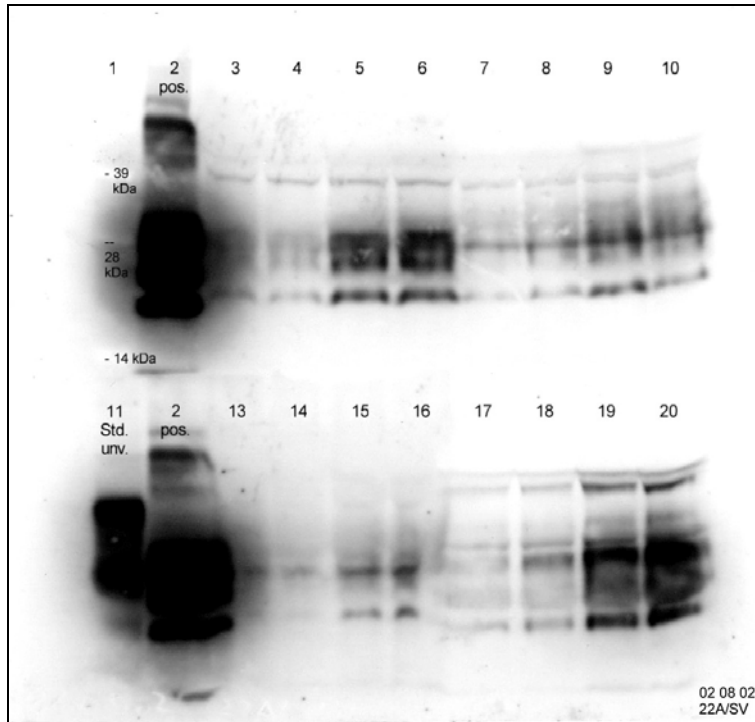


Abbildung 21: 02 08 02 22A/SV 2.1

Proben 3 - 6: mesophiler Schlamm/22A Proben 7 - 10: thermophiler Schlamm/22A  
 Proben 13 - 16: mesophiler Schlamm II/22A Proben 17 - 20: Wasser/22A

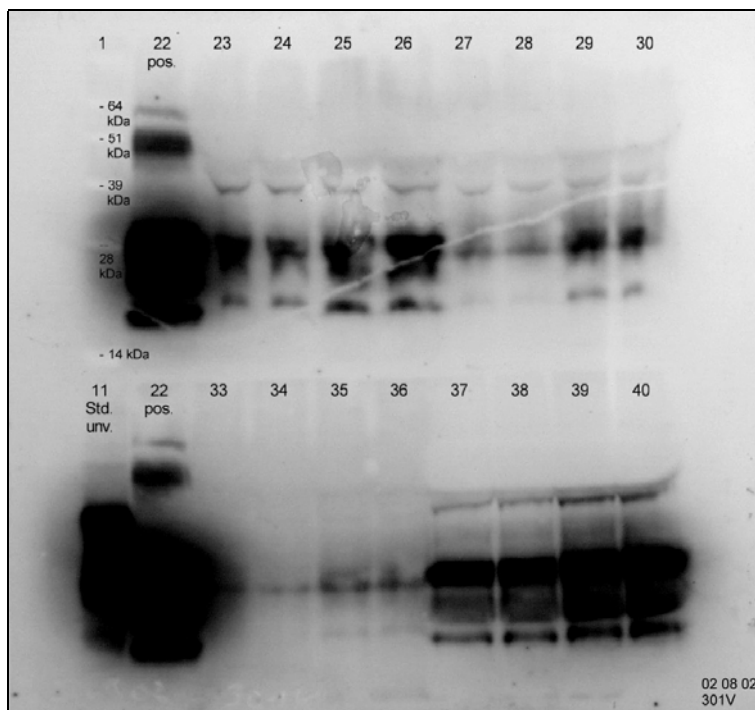


Abbildung 22: 02 08 02: 301V/vm 2.1

Proben 23 - 26: mesophiler Schlamm/301V Proben 27 - 30: thermophiler Schlamm/301V  
 Proben 33 - 36: mesophiler Schlamm II/301V Proben 37 - 40: Wasser/301V

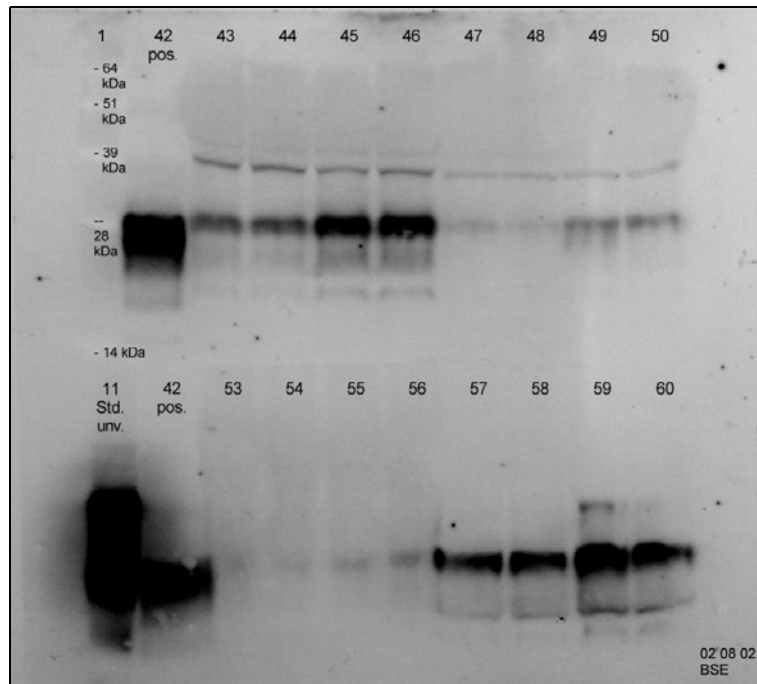


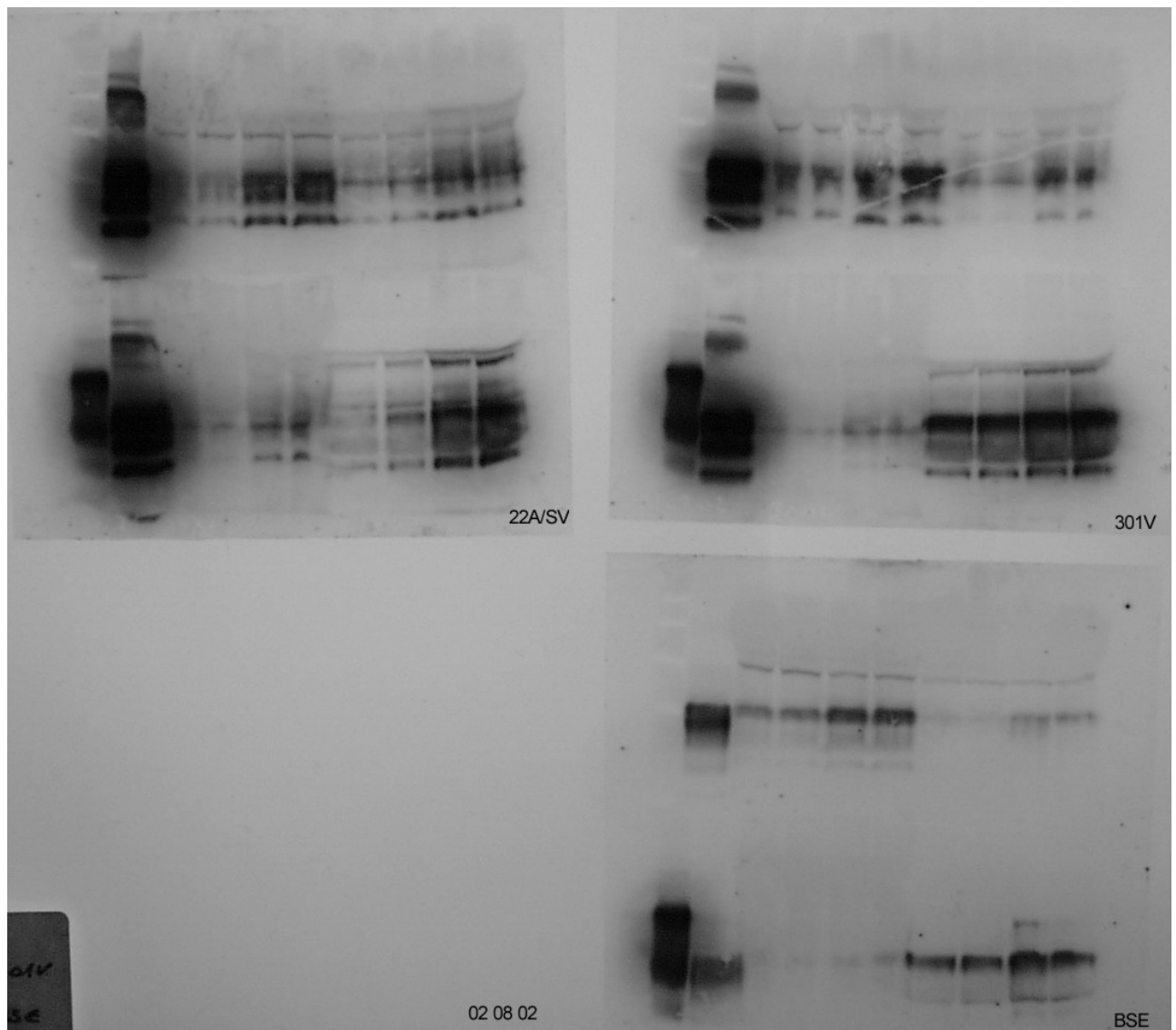
Abbildung 23: 02 08 02: BSE 2.1

Proben 43 - 46: mesophiler Schlamm/BSE

Proben 47 - 50: thermophiler Schlamm/BSE

Proben 53 - 56: mesophiler Schlamm II/BSE

Proben 57 - 60: Wasser/BSE



**Abbildung 24: 02 08 02**

**Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>Sc</sup>
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> bovines BSE (England) 5,00% und 10,0% Hirn in Wasser
- geringere Verdautemperatur (37°C)
- längere Blotzeit
- geringere Antikörper-1-konzentration (6H4): 2,5 µl in 50 ml TBST

**Conclusio:**

- zu geringe Verdautemperatur (starke Überladung mit unverdaulichem BSA)
- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in Wasser und mesophilem Schlamm; in thermophilem und meso box-Schlamm nur Schatten → neues Hirnhomogenat

**Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>SC</sup>
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
- neues Hirnhomogenat BSE

**Conclusio:**

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**HH 22A+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

HH 22A+ /0,60

30 µl HH 22A+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH 22A+ /1,20

60 µl HH 22A+ /10,0 + 440 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

63 µl HH BSE+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 + 220 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

mesophil: 22.07.02

mesophil box: 22.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

7,5 µl PK-Stock + 231 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)

02.08.02		GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat				theoret.	L.Sarco	BSA		EtOH			Re- Ges.	PK		PMSF		SDB	Sample				
Schlamm		Hirnhomog.	[µl]	AD-M+HH	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	HH on	10%	in Lsg	10%	konz			susp.	Vol	conc	100mM		on Blot					
			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]				
			E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
			=G+H+M+O	=G+H														=25+T+V		=V*1000*0,6/U		=X*0,1/U*1000				
1	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	357,1							100	220	20	50	20	9,1	60	10	
	3/4	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	5/6	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	7/8	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	9/10	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
2	11	Std Prionics																						7		
	12	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	13/14	meso box	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	15/16	meso box	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	17/18	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	19/20	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
3	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	23/34	mesophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	25/26	mesophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	27/28	thermophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	29/30	thermophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
4	1	Std Prionics																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	33/34	meso box	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	35/36	meso box	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	37/38	Wasser	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	39/40	Wasser	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30

	Schlamm	Hirnhomog.	AD-M+HH	[µl]	[µl]	[µl]	HH on					10% in Lsg		konz			susp. Vol		conc 100mM			on Blot				
							conc	in AD-M	in AD-M	Blot	10%	in Lsg	10%	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]
5	1	Molekularmarker																					7			
	2	Kontrolle pos.	BSE II	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4							100	220	20	50	20	9,1	60	30	
	43 / 44	mesophil	BSE II	540	500	450	50	1,2	0,1	1,20	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	45 / 46	mesophil	BSE II	540	500	450	50	2,5	0,3	2,50	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	47 / 48	thermophil	BSE II	540	500	450	50	1,2	0,1	1,20	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
49 / 50	thermophil	BSE II	540	500	450	50	2,5	0,3	2,50	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40	
6	1	Std Prionics																					7			
	2	Kontrolle pos.	BSE II	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4							100	220	20	50	20	9,1	60	30	
	53 / 54	meso box	BSE II	540	500	450	50	1,2	1,2	1	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	55 / 56	meso box	BSE II	540	500	450	50	2,5	2,5	3	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	57 / 58	Wasser	BSE II	540	500	450	50	1,2	1,2	1	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40
59 / 60	Wasser	BSE II	540	500	450	50	2,5	2,5	3	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	40	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
50 µl Hirnhomogenat  
450 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
+ Wasser  
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 22°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min  
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku  
10 µl BSA (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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  
5 min 95°C: offene Röhrchen  
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;  
Laminair  
Zentrifugation: 4000 xg / 10 min  
SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot  
30 µl Probe (Marker und Std. je 7 µl)

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 225 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

90 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 20.000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

30 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

1x 1 min, 5x 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

15 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

#### Färben der Membranen mit BCIP/NPT

5 min Waschen mit TBST am Schüttler

20 ml BCIP/NPT + 30 ml TBST

4°C slow shake 48 Stunden



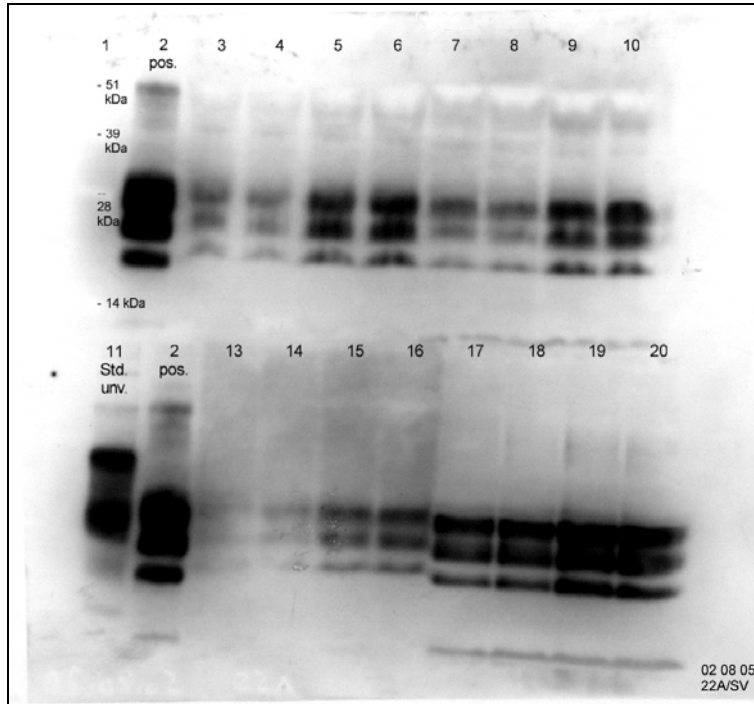


Abbildung 25. 02 08 05: 22A/SV 2.2

Proben 3 - 6: mesophiler Schlamm/22A Proben 7 - 10: thermophiler Schlamm/22A  
 Proben 13 - 16: mesophiler Schlamm II/22A Proben 17 - 20: Wasser/22A

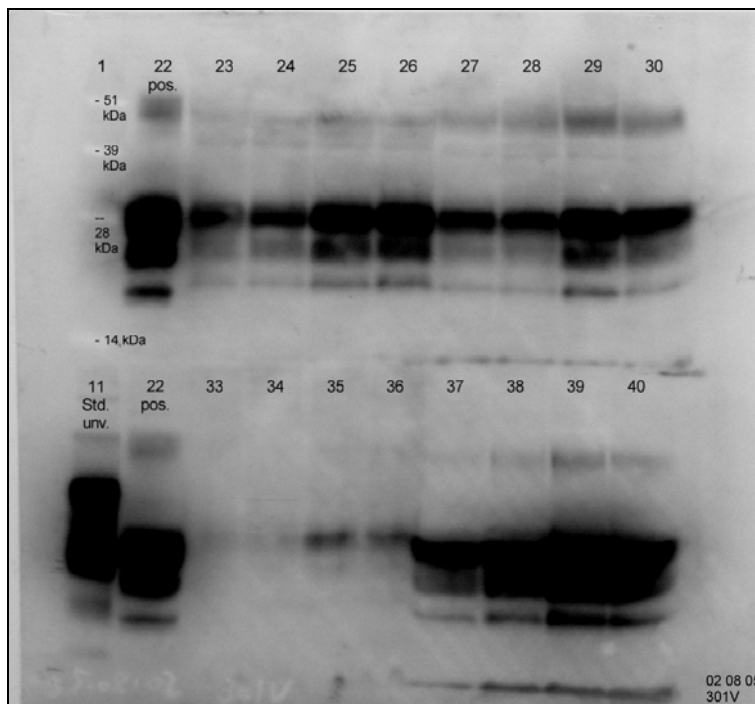


Abbildung 26: 02 0805: 301V/nm 2.2

Proben 23 - 26: mesophiler Schlamm/22A Proben 27 - 30: thermophiler Schlamm/22A  
 Proben 33 - 36: mesophiler Schlamm II/22A Proben 37 - 40: Wasser/22A

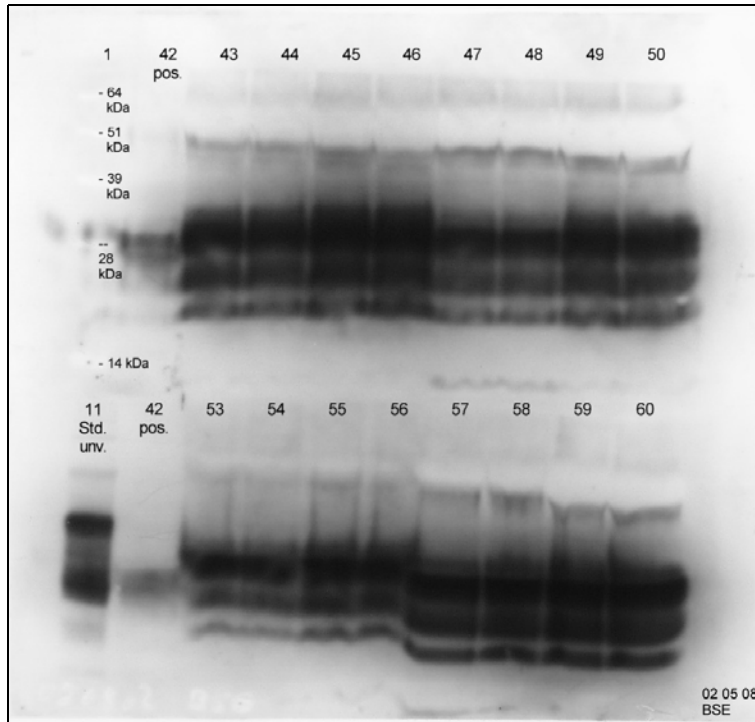


Abbildung 27: 02 08 05: *BSE 2.2*

Proben 43 - 46: mesophiler Schlamm/22A

Proben 47 - 50: thermophiler Schlamm/22A

Proben 53 - 56: mesophiler Schlamm II/22A

Proben 57 - 60: Wasser/22A

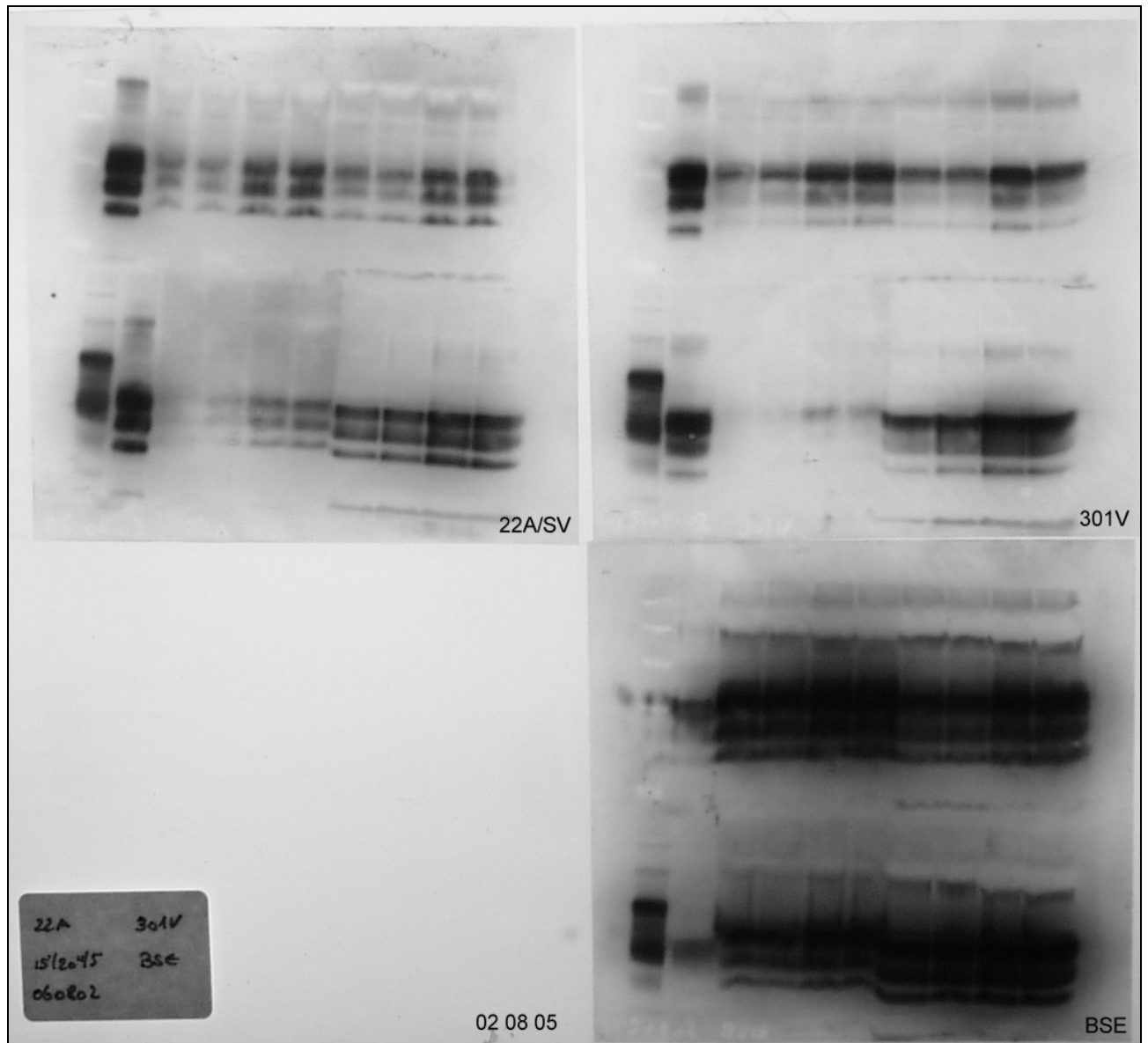


Abbildung 28: 02 08 05

### Versuche

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>Sc</sup>
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
- neues Hirnhomogenat BSE

### Conclusio:

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices

**Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>SC</sup>
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
- neues Hirnhomogenat BSE
- Elektrophorese von Proben (10% HH in Wasser) ohne Ethanol fällung (mit und ohne PK-Verdau)

**Conclusio:**

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices
- Ohne Ethanol fällung lässt sich PrP<sup>SC</sup> (in hoher Ausgangskonz.) nach dem PK-Verdau nachweisen

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**HH 22A+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

HH 22A+ /0,60

30 µl HH 22A+ /10,0 + 470 µl Wasser

HH 22A+ /1,20

60 µl HH 22A+ /10,0 + 440 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

mesophil: 22.07.02

mesophil box: 22.07.02

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

63 µl HH BSE+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 + 220 µl Wasser

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

7,5 µl PK-Stock + 231 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%)

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

PMSF 100

100 mM PMSF in i-Propanol

(- 17°C)

02.08.02			GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat				theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK		PMSF		SDB	Sample	
Schlamm		Hirnhomog.	[µl]	AD-M+HH	[µl]	conc	in AD-M	in AD-M	Blot	HH on	10%	in Lsg	10%	konz			susp.	Vol	conc	100mM				on Blot		
			[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]	
			E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
			=G+H+M+O	=G+H									=M*10/E	=O*0,1					=25+T+V	=V*1000*0,6/U		=X*0,1/U*1000				
1	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	357,1							100	220	20	50	20	9,1	60	10	
	3/4	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	5/6	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	7/8	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	9/10	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
2	11	Std Prionics																						7		
	12	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	13/14	meso box	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	15/16	meso box	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	17/18	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	19/20	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
3	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	23/34	mesophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	25/26	mesophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	27/28	thermophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	29/30	thermophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
4	1	Std Prionics																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3							100	220	20	50	20	9,1	60	20	
	33/34	meso box	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	35/36	meso box	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	37/38	Wasser	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	39/40	Wasser	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30

02.08.02			GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat				theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re-	Ges.	PK		PMSF		SDB	Sample
----------	--	--	--------	--------	------	---------------	--	--	--	----------	---------	--	-----	--	------	--	--	-----	------	----	--	------	--	-----	--------



Alle Proben:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
Hirnhomogenat  
AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 22°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min  
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku

Proben 3 - 60

10 µl BSA (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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)

Proben 3 - 60 und 72 - 80

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

Alle Proben:

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

Elektrophorese

40 min 200 V / 225 mA, MOPS

Membranvorbereitung:

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

Blot:

90 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

Membran:

2 x 1 min. TBST waschen  
30 min Blockingpuffer (RT); slow shake  
AK I (6H4) 1: 20.000 in TBST  
über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake  
1x 1 min, 5x 5 min TBST; fast shake  
30 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake  
1x 1 min, 5x 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

15 min. Expositur  
20 sek. Entwicklung  
5 min. Fixierung

Färben der Membranen mit BCIP/NPT

5 min Waschen mit TBST am Schüttler  
20 ml BCIP/NPT + 30 ml TBST  
4°C slow shake 48 Stunden

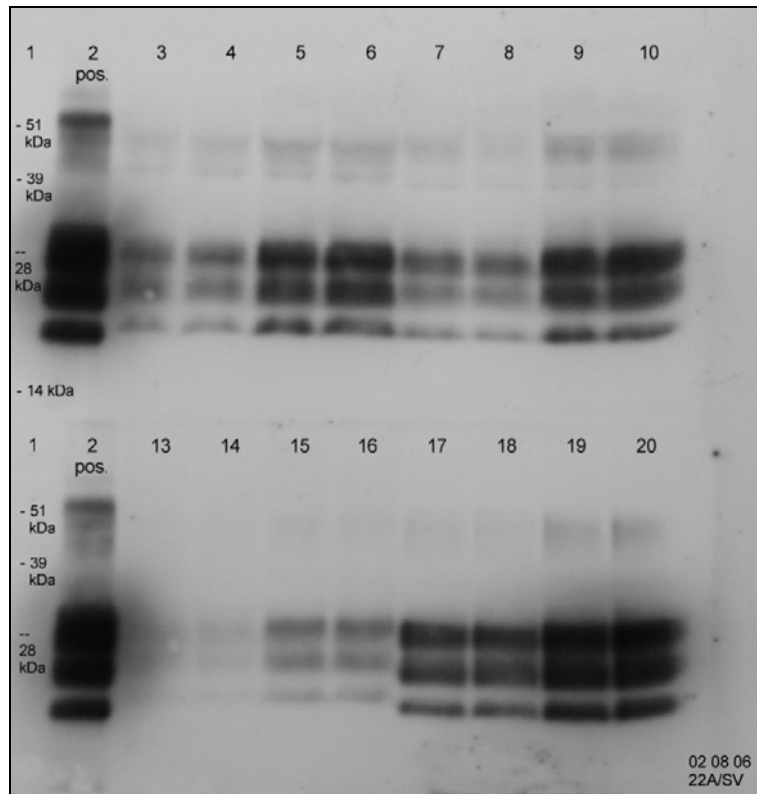


Abbildung 29: 02 08 06: **22A/SV 2.3**

Proben 23 - 26: mesophiler Schlamm/22A

Proben 27 - 30: thermophiler Schlamm/22A

Proben 33 - 36: mesophiler Schlamm II/22A

Proben 37 - 40: Wasser/22A

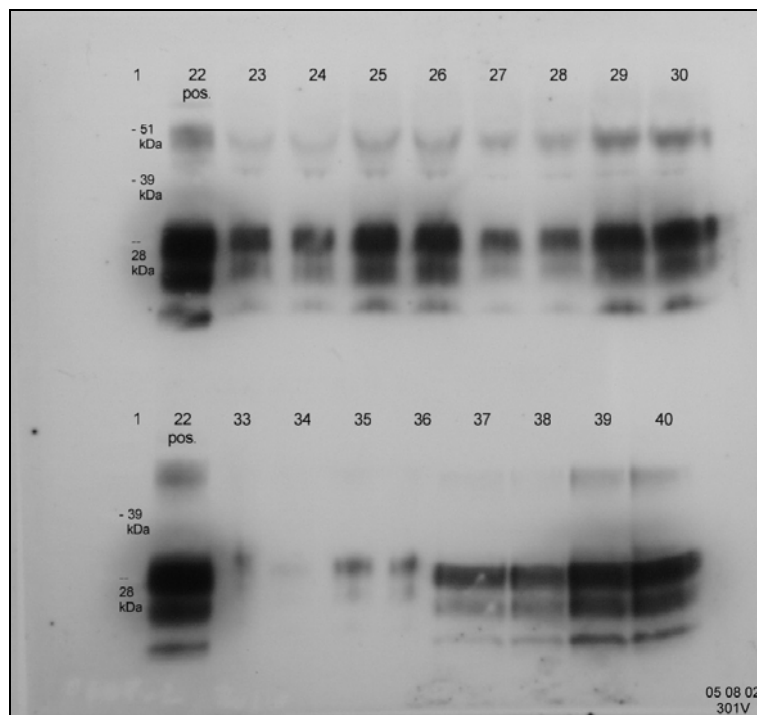


Abbildung 30: 02 08 06: **301V/nm 2.3**

Proben 23 - 26: mesophiler Schlamm/301V

Proben 27 - 30: thermophiler Schlamm/301V

Proben 33 - 36: mesophiler Schlamm II/301V

Proben 37 - 40: Wasser/301V



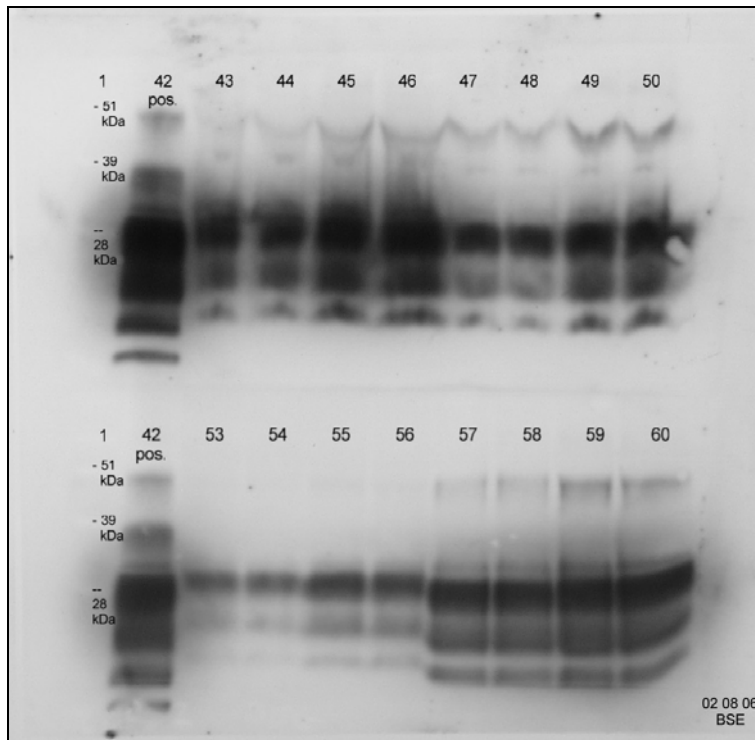


Abbildung 31: 02 08 06: **BSE 2.3**

Proben 43 - 46: mesophiler Schlamm/BSE

Proben 47 - 50: thermophiler Schlamm/BSE

Proben 53 - 56: mesophiler Schlamm II/BSE

Proben 57 - 60: Wasser/BSE

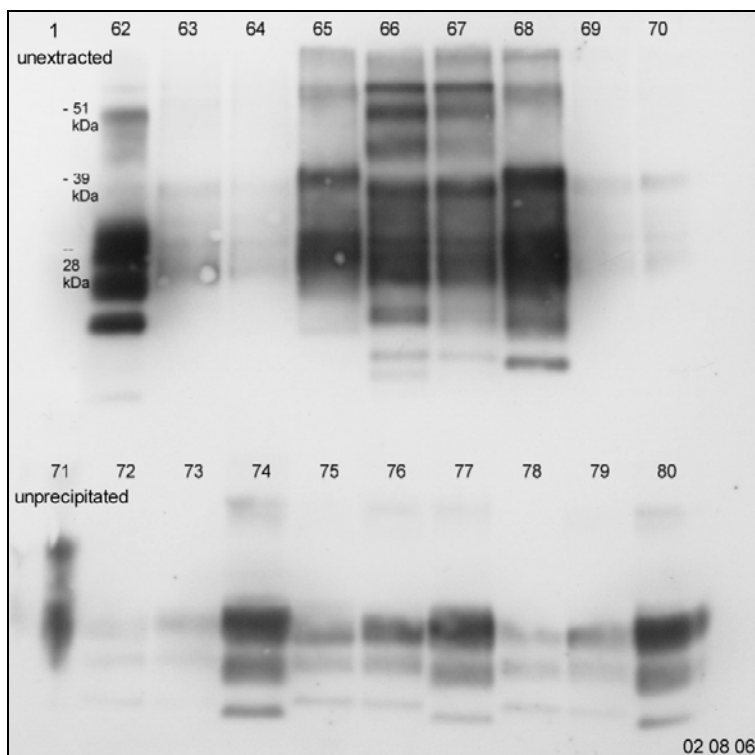


Abbildung 32: 02 08 06:

Proben 52-71: (1% Hirnhomogenat) ohne L.Sarcosinbehandlung/Ethanol-fällung

Proben 72-80: (1% Hirnhomogenat) nach L.Sarcosinbehandlung vor Ethanol-fällung

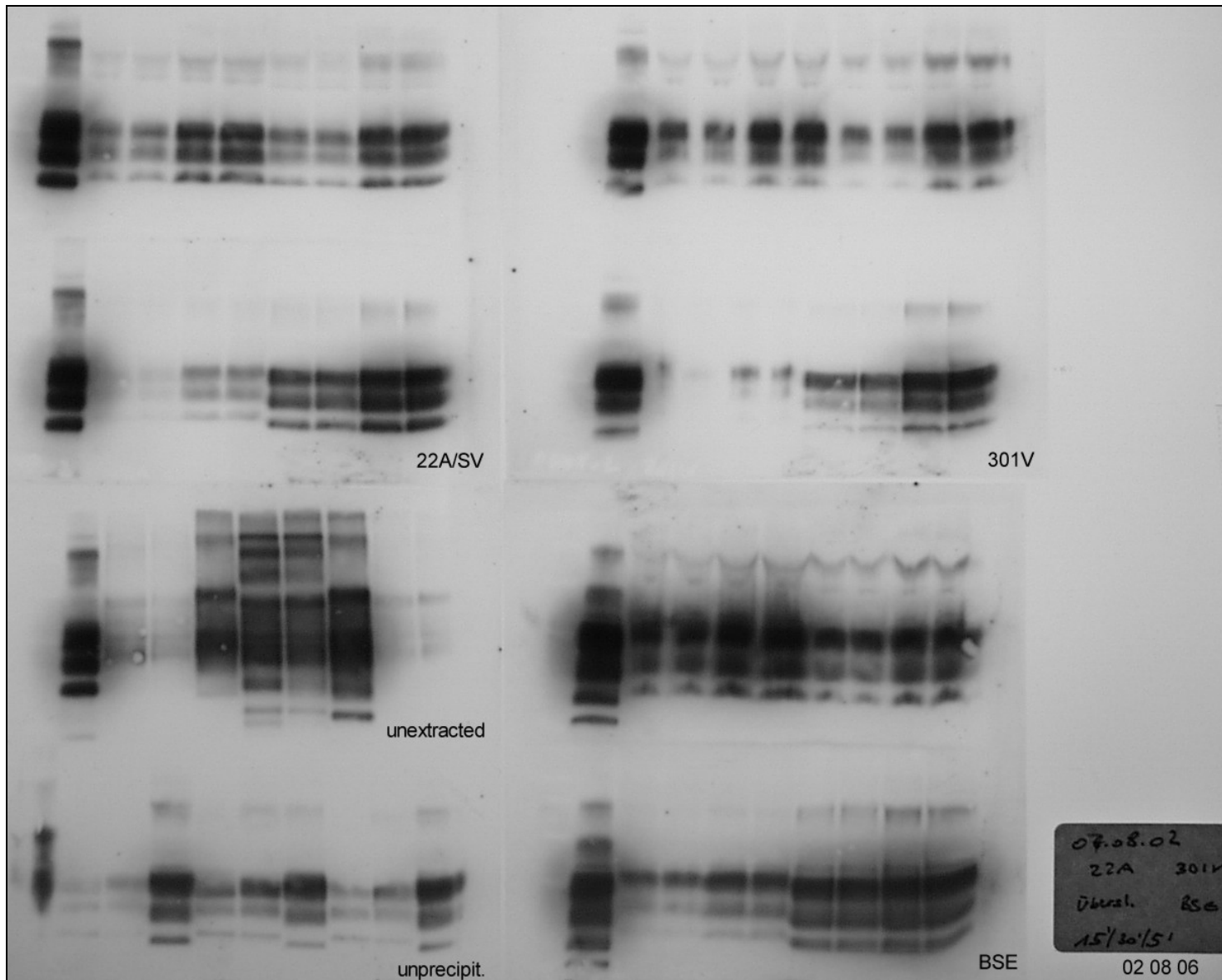


Abbildung 33: 02 08 06 (Beschreibung nächste Seite)

### **Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>SC</sup>
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
- neues Hirnhomogenat BSE
- Elektrophorese von Proben (10% HH in Wasser) ohne Ethanol fällung (mit und ohne PK-Verdau)

### **Conclusio:**

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices
- Ohne Ethanol fällung lässt sich PrP<sup>SC</sup> (in hoher Ausgangskonz.) nach dem PK-Verdau nachweisen

**Versuche**

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>SC</sup>
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>SC</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser

**Conclusio:**

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**HH 22A+ /10,0

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

HH 22A+ /0,60

30 µl HH 22A+ /10,0 +470 µl Wasser

HH 22A+ /1,20

60 µl HH 22A+ /10,0 +440 µl Wasser

**Hirnhomogenat BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl Wasser

HH BSE+ /2,50

63 µl HH BSE+ /10,0 +187 µl Wasser

HH BSE+ /1,20

30 µl HH BSE+ /10,0 +220 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**HH 301V+ /10,0

Hirnhomogenat: 915 mg Nr. 5908 und 5888  
in 9 ml Wasser in 3500 µl Wasser

HH 301V+ /2,50

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

HH 301V+ /1,20

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

ADM

thermophil: 22.07.02

mesophil: 22.07.02

mesophil box: 22.07.02

PK-Stock (19,3 mg/ml)

Sigma

PK:

7,5 µl PK-Stock +231 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)

07.08.02		GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat					theoret.	L.Sarco	BSA	EtOH			Re- Ges.	PK	PMSF	SDB	Sample						
Schlamm		Hirnhomog.	AD-M+HH		conc in AD-M in AD-M					HH on	10% in Lsg	10%	konz			susp. Vol	conc	100mM		on Blot						
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[ng/10µl]		[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]						
		E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA		
		$=G+H+M+O$	$=G+H$		$=H*(I/10) = (H*I/10) = ((H*(I/100)*AA)/0)/((H+G 0)/((G+H (U+Z))*1)/100) )/1000$					$=M*10/E$	$=O*0,1$	$=Q*(R/100)/(Q+E-150)*100$			$=25+T+V$	$=V*1000*0,6/U$	$=X*0,1/U*1000$									
1	1	Molekularmarker																					7			
	2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	357,1						100	220	20	50	20	9,1	60	10		
	3/4	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	5/6	mesophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	7/8	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,06	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	9/10	thermophil	22A/SV	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
2	11	Std Prionics																						7		
	12	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	13/14	meso box	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	15/16	meso box	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	17/18	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	0,6	0,60	0,60	62,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	19/20	Wasser	22A/SV	540	500	450	50	1,2	1,20	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
3	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	23/34	mesophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	25/26	mesophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	27/28	thermophil	301V	540	500	450	50	1,2	0,12	1,20	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	29/30	thermophil	301V	540	500	450	50	2,5	0,25	2,50	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
4	1	Std Prionics																						7		
	2	Kontrolle pos.	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	714,3						100	220	20	50	20	9,1	60	20		
	33/34	meso box	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	35/36	meso box	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	37/38	Wasser	301V	540	500	450	50	1,2	1,20	1	124,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30
	39/40	Wasser	301V	540	500	450	50	2,5	2,50	3	258,6	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,2	10	8,7	30	30

	Schlamm	Hirnhomog.	AD-M+HH	[µl]	[µl]	[µl]	HH on					10% in Lsg		konz			susp. Vol		conc 100mM			on Blot				
							conc in AD-M	in AD-M	Blot	10%	in Lsg	10%	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]	
5	1	Molekularmarker																						7		
	2	Kontrolle pos.	<b>BSE II</b>	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4							<b>100</b>	220	20	50	20	9,1	60	30	
	43 / 44	mesophil	BSE II	540	500	450	50	<b>1,2</b>	0,1	1,20	165,5	30	0,56	10	1,00	<b>1400</b>	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	45 / 46	mesophil	BSE II	540	500	450	50	<b>2,5</b>	0,3	2,50	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	47 / 48	thermophil	BSE II	540	500	450	50	<b>1,2</b>	0,1	1,20	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
49 / 50	thermophil	BSE II	540	500	450	50	<b>2,5</b>	0,3	2,50	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40	
6	1	Std Prionics																						7		
	2	Kontrolle pos.	<b>BSE II</b>	100	100		100	10,0	16,7	100	1071,4							<b>100</b>	220	20	50	20	9,1	60	30	
	53 / 54	meso box	BSE II	540	500	<b>450</b>	50	<b>1,2</b>	1,2	1	165,5	30	0,56	10	1,00	<b>1400</b>	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	55 / 56	meso box	BSE II	540	500	450	50	<b>2,5</b>	2,5	3	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
	57 / 58	Wasser	BSE II	540	500	450	50	<b>1,2</b>	1,2	1	165,5	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40
59 / 60	Wasser	BSE II	540	500	<b>450</b>	50	<b>2,5</b>	2,5	3	344,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	<b>75,1</b>	<b>80</b>	115	10	52,2	10	8,7	30	40	

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
50 µl Hirnhomogenat  
450 µl AD-M oder Wasser  
Schütteln (RT: 22°C):  
Vortexen  
10 min RT Vortexschüttler 200 rpm  
+ L. Sarcosin (10 %)  
+ Wasser  
30 min Vortexschüttler (1000 rpm / RT: 22°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 4 min  
neues 2,0 ml Eppendorf in 0°C Kühlakku  
10 µl BSA (10 %) vorlegen  
gesamter Überstand hinübergeleert  
1400 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

5 min 95°C: offene Röhrchen  
25 min 95°C: geschlossene Röhrchen;  
Laminair

Zentrifugation: 4000 xg / 10 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot  
30 µl Probe (Marker und Std. je 7 µl)

#### Elektrophorese

40 min 200 V / 225 mA, MOPS

#### Membranvorbereitung:

60 sek. in Methanol

25 min in Transferpuffer (RT: 30°C)

#### Blot:

90 min 30 V / 400 mA, Transferpuffer

#### Membran:

2 x 1 min. TBST waschen

30 min Blockingpuffer (RT); slow shake

AK I (6H4) 1: 20.000 in TBST

über Nacht: 15 h, 4°C; slow shake

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

30 min AK II; 1: 10.000; 22°C; slow shake

1x 1 min, 5x 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

15 min. Expositur

20 sek. Entwicklung

5 min. Fixierung

#### Färben der Membranen mit BCIP/NPT

5 min Waschen mit TBST am Schüttler

20 ml BCIP/NPT + 30 ml TBST

4°C slow shake 48 Stunden

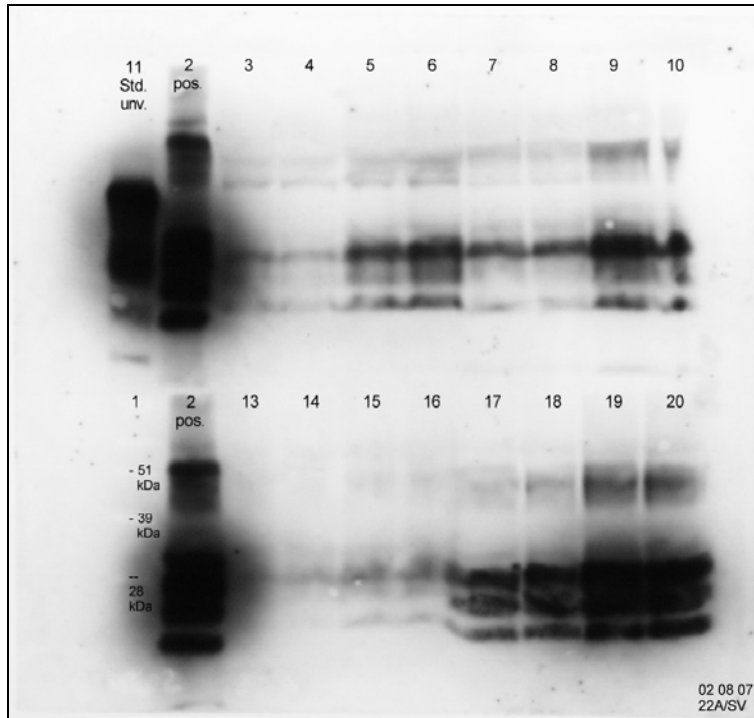


Abbildung 34: 02 08 07: **22A/SV 2.4**

Proben 3 - 6: mesophiler Schlamm/22A

Proben 7 - 10: thermophiler Schlamm/22A

Proben 13 - 16: mesophiler Schlamm II/22A

Proben 17 - 10: Wasser/22A

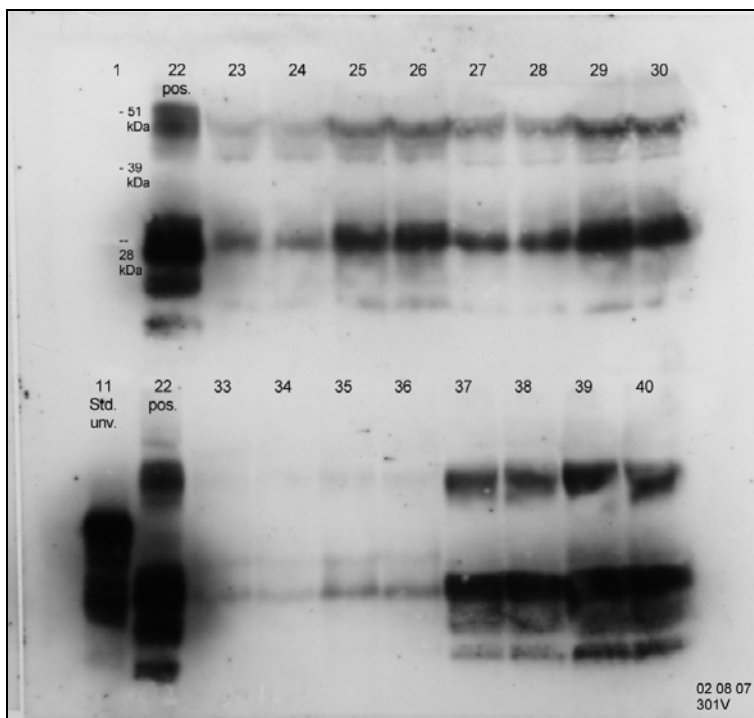


Abbildung 35: 02 08 07: **301V/nm 2.4**

Proben 23 - 26: mesophiler Schlamm/22A

Proben 27 - 30: thermophiler Schlamm/22A

Proben 33 - 36: mesophiler Schlamm II/22A

Proben 37 - 40: Wasser/22A



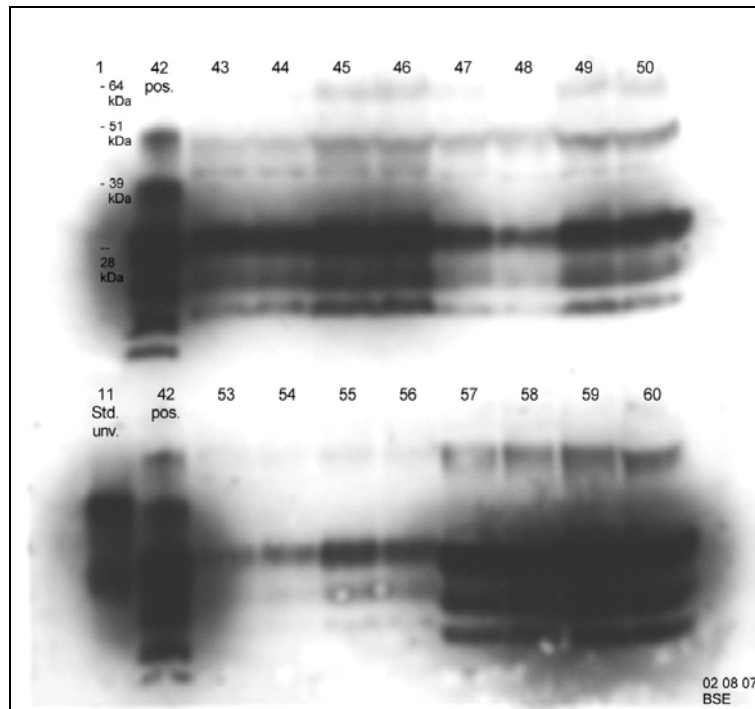


Abbildung 36: 02 08 07: **BSE 2.4**

Proben 43 - 46: mesophiler Schlamm/22A

Proben 47 - 50: thermophiler Schlamm/22A

Proben 53 - 56: mesophiler Schlamm II/22A

Proben 57 - 60: Wasser/22A

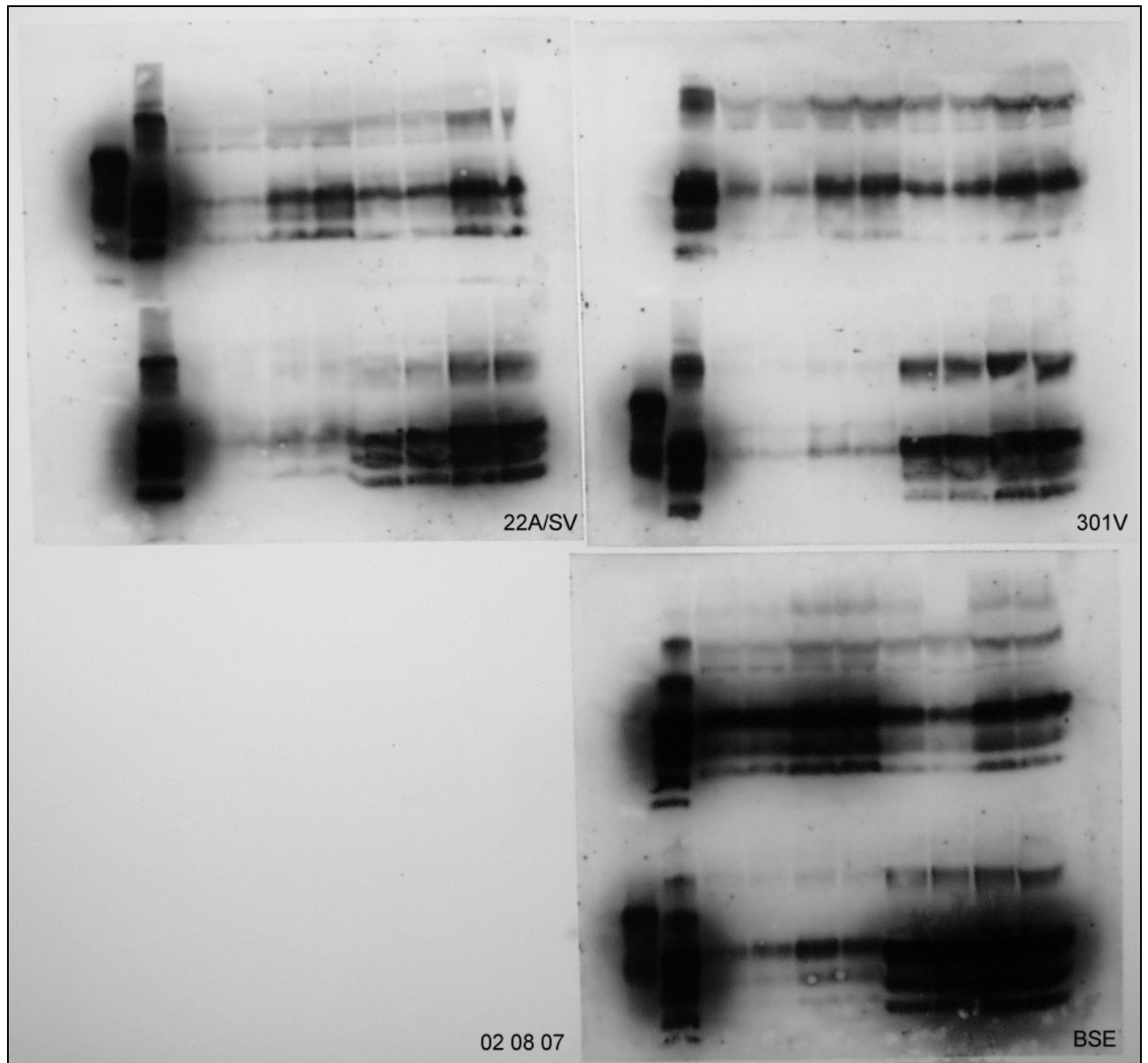


Abbildung 37: 02 08 07

### Versuche

- Validierung Schlammabhängigkeit:
  - Schlamm mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle)
  - Schlamm mesophil box IFA (adaptiert auf Lederabfälle und Abwasser)
  - Wasser
- Validierung PrP<sup>Sc</sup>
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 0,60% und 1,20% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> in Maus passiertes bovines BSE: 301V/NM 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser
  - PrP<sup>Sc</sup> bovines BSE (England) 1,20% und 2,50% Hirn in Wasser

### Conclusio:

- 22A/SV: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- 301V/NM: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices (geringere Ausbeute jedoch in meso box)
- BSE: eindeutiger Nachweis in allen 4 Matrices