

## **VI. ARBEITSPROTOKOLLE ABBAUVERSUCHE**

### **INHALT**

VI.	Arbeitsprotokolle Abbauversuche.....	1
VI.1.	Abbau 1.....	2
VI.2.	Abbau 2.....	11
VI.3.	Abbau 3.....	21
VI.4.	Abbau 4.....	34
VI.5.	Abbau 5.....	45
VI.6.	Abbau 6.....	60
VI.7.	Abbau 7.....	69

**Versuche**

- *Abbauversuch 1:*
  - je 2 Ansätze mesophil und thermophil*
  - 7,5 ml Ansatz*
  - 1 % Hirn 22A/SV in Faulschlamm als Homogenat (10%)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 35°C im Wasserbad*
- *Inokulum thermophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle: Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *PrP<sup>SC</sup>: in Maus passiertes ovines Scrapie: 22A/SV: 10,0% Hirn in Wasser*
- *Inkubation 281 Stunden (11,7 Tage)*
- *Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung*

**Conclusio**

- *keine Reduktion von PrP<sup>SC</sup>*
  - keine/geringe irreversible Adsorbierung von PrP<sup>SC</sup> an die Biomasse.*
  - zu hohe Hirnhomogenatkonz. um Abbau nachvollziehen zu können.*
  - zu geringes Biomassevolumen im Verhältnis zum Gefäßvolumen (zu viel CO<sub>2</sub>)*
  - ev. Hemmung durch Sauerstoffeintrag bei Transport und Inokulation*

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

Hirnhomogenat: 380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

**Tris/HCl 0,1M:**

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

**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

**Verdaupuffer 0,1 M/0,32**

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

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

63 µl HH 301V+ /10,0 + 187 µl Wasser

**PMSF 100**

100 mM PMSF in i-Propanol  
( - 17°C)

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

30 µl HH 301V+ /10,0 + 220 µl Wasser

**ADM**

thermophil: 06.08.02  
mesophil: 06.08.02

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

Sigma

**PK:**

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

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 1

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
1-2	07.-19.08.02	281	mesophil	mesophil	Abbau	22A/SV	6,8	750
3-4	07.-19.08.02	281	thermophil	thermophil	Abbau	22A/SV	6,8	750

Tabelle 2: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 1

Probenauftragsvolumen:	30	10	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	10,00	10,00	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	734,3	243,1	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,12	0,37	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	82,50	27,31	

Tabelle 3: Abbaumatrix Abbauersuch 1

Zeit			0	4,5	4,5	17,0	17,0	24,0	24,0	39,5	39,5	166	214	233	257	281
Auftragsvolumen			30	10	30	10	30	10	30	10	30	10	10	10	10	10
Reduktionsfaktor			82,5	27,3	82,5	27,3	82,5	27,3	82,5	27,3	82,5	27,3	27,3	27,3	27,3	27,3
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	Probe														
meso	22A	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
thermo	22A	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>Sc</sup> Bande erkennbar

+/- .....Detektionsgrenze

+ .....positiver PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis negativ

### Inkubation

750 µl Hirnhomogenat

7,0 ml Faulschlamm

vortexen

CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Röhrchens

Inkubation im Wasserbad:

mesophil: 35,5°C (Wasserbadtemp.)

thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

### Probenahmezeiten:

<b>Probenahme:</b>	<b>[h]</b>
07.08.02 16:00	0
07.08.02 20:30	4,5
08.08.02 09:00	17,0
08.08.02 16:00	24,0
09.08.02 07:30	39,5
14.08.02 14:00	166,0
16.08.02 14:00	214,0
17.08.02 09:00	233,0
18.08.02 09:30	257,5
19.08.02 09:00	281,0
END	

### Probenahme:

vortexen

Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Gefäßes

### Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

500 µl Probe

+ 30µl 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

gesamter Überstand hinübergeleert

Entnahme von 50 µl = n.p.-Probe

+ 10 µl BSA (10 %)

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung 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

### n.p.-Proben:

+ 5 µl PK

vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ 5 µl PMSF 100

vortexen

+ 15 µl Sample Buffer 5x

vortexen

Alle Proben:

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  
10µl oder 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

Abbau 1 Schlamm	Hirnhomog. Hirnhomog.	GesVol [µl]	Sample AD-M+HH [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat					L.Sarco		BSA		EtOH			Re- susp. [µl]	Ges. Vol [µl]	PK		PMSF		SDB [µl]	Sample on Blot [µl]		
					conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	theoret. HH on Blot [µg/10µl]	10%	in Lsg [%]	10%	[µl]	[mg]	[µl]	[%]	[%]			[µl]	[µg/ml]	100mM [µl]	µmol/ml [µl]				
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA		
		=G+H+M+O	=G+H						$=\frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$ $=\frac{H \cdot I}{100} \cdot \frac{1}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$ $=\frac{H \cdot I}{100} \cdot \frac{1}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$	$=M \cdot 10/E$		$=O \cdot 0,1$			$=\frac{Q \cdot (R/100)}{100} = \frac{Q \cdot R}{10000}$ $=\frac{Q \cdot (R/100)}{100} = \frac{Q \cdot R}{10000}$ $=\frac{Q \cdot (R/100)}{100} = \frac{Q \cdot R}{10000}$		$=25+T+V$		$=V \cdot 1000 \cdot 0,6/U$		$=X \cdot 0,1/U \cdot 1000$					
mesophil (30µl)	22A/SV	538	500	450	50	10,0	1,00	10,00	734,3	30	0,56	8	0,80	1400	96	75,2	80	113	8	42,4	8	7,1	30	30		
mesophil (10 µl)	22A/SV	539	500	450	50	10,0	1,00	10,00	243,1	30	0,56	9	0,90	1400	96	75,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	10		
thermophil (30µl)	22A/SV	540	500	450	50	10,0	1,00	10,00	724,1	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,1	10	8,7	30	30		
thermophil (10 µl)	22A/SV	540	500	450	50	10,0	1,00	10,00	241,4	30	0,56	10	1,00	1400	96	75,1	80	115	10	52,1	10	8,7	30	10		
		=G+H+M+O	=G+H						$=\frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000} = \frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$ $=\frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000} = \frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$ $=\frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000} = \frac{H \cdot (I/100)}{100} = \frac{H \cdot I}{10000}$									$=F+T+V$		$=V \cdot 1000 \cdot 0,6/U$		$=X \cdot 0,1/U \cdot 1000$				
meso	22A/SV	50	47	42,453	4,717	10,0	0,9	10,00	202,2	2,830	0,57						0	55	5	50	5	9,1	15	30		
mesophil Ü (30µl)	22A/SV	50	47	42,453	4,717	10,0	0,9	10,00	202,2	2,830	0,57						0	55	5	54,5	5	9,1	15	30		
thermophil Ü (30µl)	22A/SV	50	47	42,453	4,717	10,0	0,9	10,00	202,2	2,830	0,57						0	55	5	54,5	5	9,1	15	30		

L<sup>(1)</sup>: \*0,7Überstand; abzügl. 100µl Pellet und 50µl Probe (B)

S<sup>(2)</sup>: Überstand abzügl. 100µl Pellet und 50µl Probe (B)

Abbau 1		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]	[µg/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	$\frac{H \cdot (I/100)}{(H+500)} \cdot \frac{(H^*/I/100)}{1000} = \frac{(H^* \cdot (I/100))}{((H+500) \cdot ((G+H)/1000) \cdot AA) / (U+Z)}$												=H+T+V		=V*1000* 0,6/U		=X*0,1/U *1000				
1	Molekularmarke																							7	
2	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>357,1</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>10</b>	
3	Kontrolle pos.	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>178,6</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>5</b>	
		G+H+M+O		=G+H	$\frac{H \cdot (I/100)}{(H+500)} \cdot \frac{(H^*/I/100)}{1000} = \frac{(H^* \cdot (I/100))}{((H+500) \cdot ((G+H)/1000) \cdot AA) / (U+Z)}$												=H+T+V		=V*1000* 0,6/U		=X*0,1/U *1000				
4	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>71,4</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>20</b>	
5	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>35,7</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>10</b>	
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>17,9</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>5</b>	
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>8,9</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>2,5</b>	
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>4,5</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>1,25</b>	
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>2,1</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>0,6</b>	
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100	100	10,0	16,7	100	<b>1,1</b>								<b>100</b>	<b>220</b>	20	54,5	20	9,1	60	<b>0,3</b>	

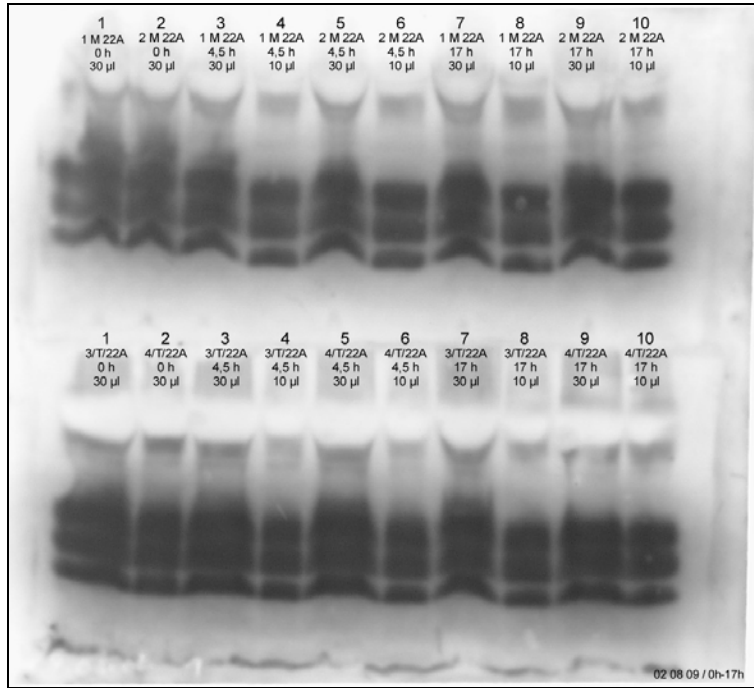


Abbildung 1: Abbau 1 (Proben 1, 2: mesophil; Proben 3, 4 thermophil): 0-17 Stunden

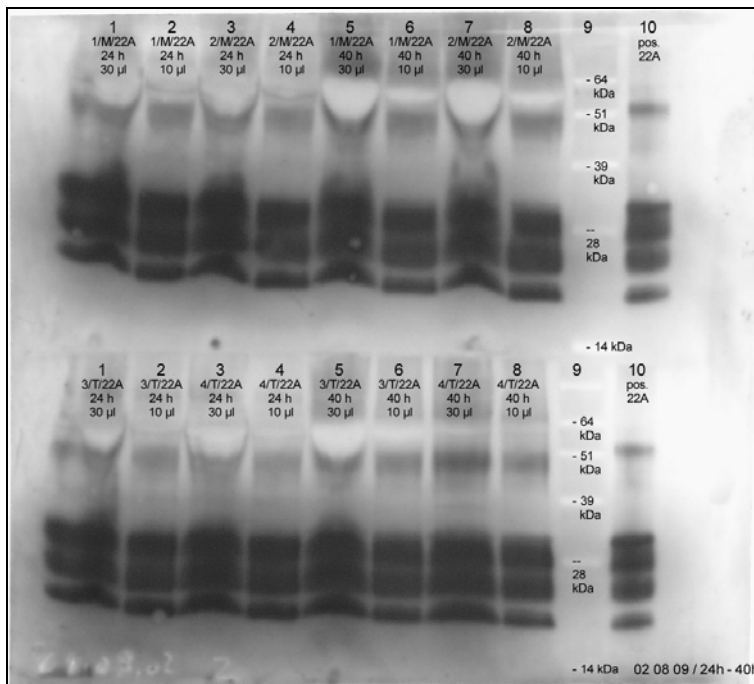


Abbildung 2: Abbau 1 (Proben 1, 2: mesophil; Proben 3, 4 thermophil): 24-40 Stunden



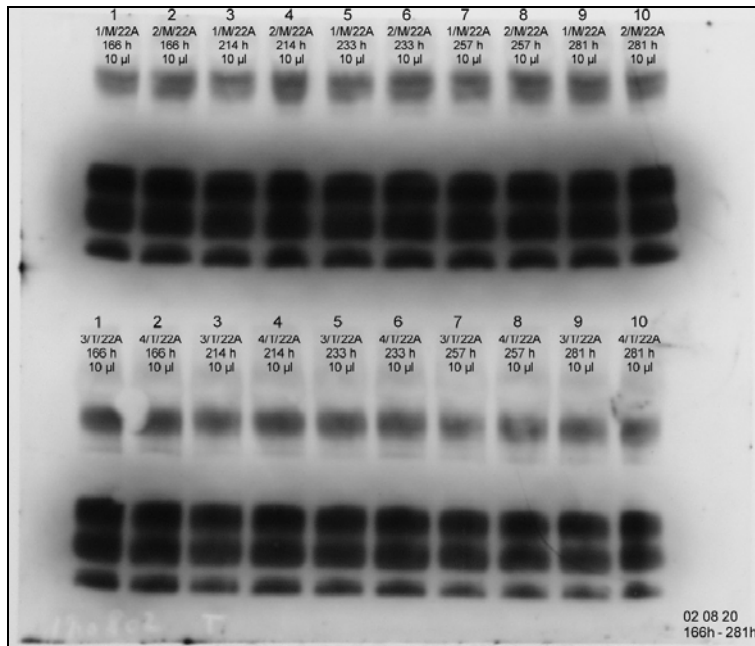


Abbildung 3: Abbau 1 (Proben 1, 2: mesophil; Proben 3, 4 thermophil): 166-281 Stunden

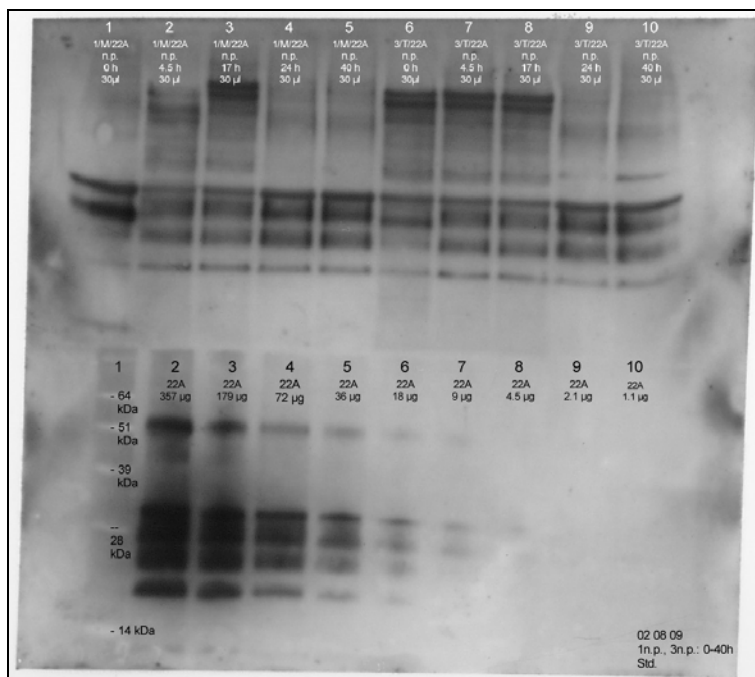


Abbildung 4 Abbau 1 (Proben 1, 2: mesophil; Proben 3, 4 thermophil):

n.p.-Proben (keine Fällung) um zu überprüfen ob ev. PrP<sup>SC</sup>-Fragmente zwar vorhanden, aber nicht ethanol-fällbar sind.

Kalibrationskurve: um Größenordnungen des Abbaus abschätzen zu können (9 µg Hirn pro aufgetragener Probe wären noch nachweisbar; Die Ausgangsprobe der Abbauelemente enthält bei 30 µl Probenauftragsvol. 730µg Hirn, bei 10 µl Probenauftragsvol. 240 µg Hirn)

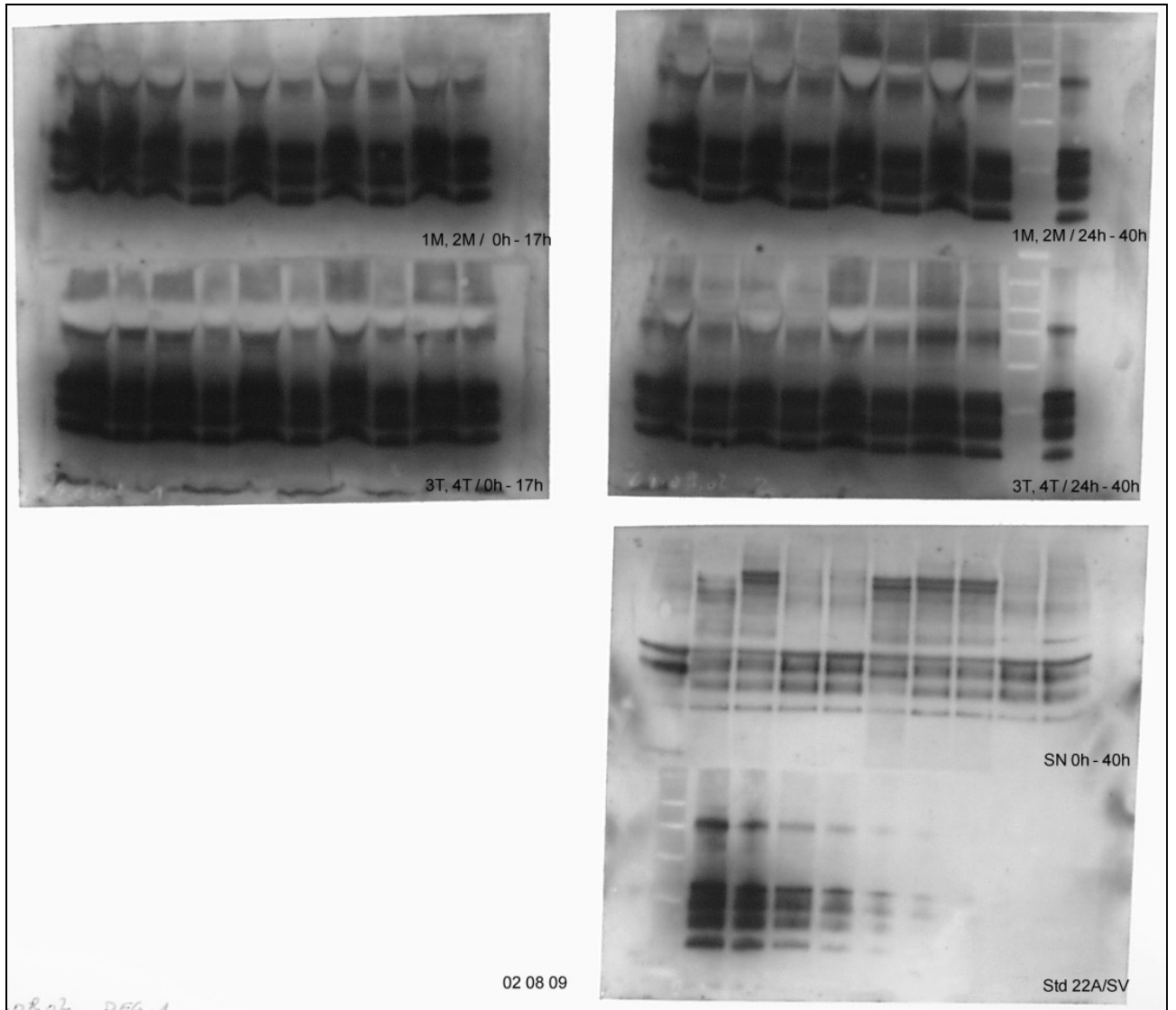


Abbildung 5: Abbau 1 (Proben 1, 2: mesophil; Proben 3, 4 thermophil): 0-40 Stunden

**Versuche**

- *Abbauversuch 2 mesophil:*
  - je 3 Ansätze mesophil 15 ml*
  - 14 ml Inokulum*
  - 0,700 ml Hirnhomogenat (10%)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 35°C im Wasserbad*
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,5 % Hirn in Faulschlamm:*

<i>22A/SV: in Maus passiertes ovines Scrapie</i>	<i>10,0% Hirn in Wasser</i>
<i>301V/nm: in Maus passiertes bovines BSE</i>	<i>10,0% Hirn in Wasser</i>
<i>BSE: bovines BSE</i>	<i>10,0% Hirn in Wasser</i>
- *Inkubation 382 Stunden (16 Tage)*
- *Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung*

**Conclusio:**

- *keine signifikante Reduktion von PrP<sup>SC</sup>*

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**

HH 22A+ /10,0

380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

**PK:**

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

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**

HH 301V+ /10,0

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

**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 BSE pos.:**

Weybrige Referenzmaterial:

16-C615-1-00 00-167 13626

LF0230-00180

HH BSE+ /10,0

Hirnhomogenat: 850 mg in 3500 µl  
Wasser

**PMSF 100**

100 mM PMSF in i-Propanol  
( - 17°C)

**ADM**

mesophil: 14.08.02

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

Sigma

Tabelle 4: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 2

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
5-7	14.-30.08.02	382	mesophil	mesophil	Abbau	22A/SV	14,0	700
8-10	14.-30.08.02	382	mesophil	mesophil	Abbau	301V/VM	14,0	700
11-13	14.-30.08.02	382	mesophil	mesophil	Abbau	BSE	14,0	700

Tabelle 5: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 2

Probenauftragsvolumen:	30	10	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	352,4	116,7	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,12	0,37	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	39,60	13,11	

Tabelle 6: Abbaumatrix Abbauersuch 2

Zeit		0	48,0	67,0	91,5	115,5	187,5	258,0	306,5	382,0
Auftragsvolumen		10	10	10	10	10	10	10	10	10
Reduktionsfaktor		13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	13,11
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	Probe								
mesophil	22A	5	+	+	+	+	+	+	+	+
		6	+	+	+	+	+	+	+	+
		7	+	+	+	+	+	+	+	+
meso	301V	8	+	+	+	+	+	+	+	+/-
		9	+	+	+	+	+	+	+	+/-
		10	+	+	+	+	+	+	+	+/-
meso	BSE	11	+	+	+	+	+	+	+	+
		12	+	+	+	+	+	+	+	+
		13	+	+	+	+	+	+	+	+

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>Sc</sup> Bande erkennbar

+/- .....Detektionsgrenze

+ .....positiver PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis negativ

### Inkubation

700 µl Hirnhomogenat  
14,0 ml Faulschlamm  
unter CO<sub>2</sub>-Spülung  
Verschließen des Röhrchens  
vortexen

Inkubation im Wasserbad:  
mesophil: 35,5°C (Wasserbadtemp.)

### Probenahmezeiten:

<b>Abbau 2</b>	<b>[h]</b>
14.08.02 14:00	0
16.08.02 14:00	48,0
17.08.02 09:00	67,0
18.08.02 09:30	91,5
19.08.02 09:30	115,5
22.08.02 09:30	187,5
25.08.02 08:00	258,0
27.08.02 08:30	306,5
30.08.02 12:00	382,0
END	

### Probenahme:

vortexen  
Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung  
Verschließen des Gefäßes

### Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
500 µl Probe  
+ 30µl 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  
gesamter Überstand hinübergeleert

Entnahme von 50 µl = n.p.-Probe  
+ 10 µl BSA (10 %)

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung 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

### n.p.-Proben:

+ 5 µl PK

vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ 5 µl PMSF 100

vortexen

+ 15 µl Sample Buffer 5x

vortexen

Alle Proben:

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

Zentrifugation: 4000 xg / 10 min

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Ansatz	Abbau 2 Schlamm	Hirn- homog.	GesVol [ µl ]	Sample AD-M+ HH [ µl ]	AD-M [ µl ]	Hirnhomogenat					theoret.		L.Sarco		BSA			EtOH			Re- susp.	Ges. Vol [ µl ]	PK		PMSF		SDB	Sample on Blot [ µl ]
						conc [ µl ]	in AD-M [ % ]	in AD-M [ % ]	in AD-M [ µg/ml ]	in AD-M [ µg ]	10% [ µl ]	in Lsg [ % ]	10% [ µl ]	[ mg ]	[ µl ]	[ % ]	[ % ]	[ µl ]	[ µg/ml ]	100mM [ µl ]			µmol/ml	[ µl ]	[ µl ]			
			E	F	G	H	I	J	K	L (1)	M	N	O	P	Q	R	S (2)	T	U	V	W	X	Y	Z	AA			
			$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H}{100}$	$\frac{I}{(H+G)}$	$\frac{J}{100}$	$\frac{K}{(G+H)}$	$\frac{L}{100} \cdot 0,7 \cdot A$	$\frac{M}{100}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{O}{100}$	$\frac{P}{100}$	$\frac{Q}{100}$	$\frac{R}{(Q+E)}$	$\frac{S}{150}$	$\frac{T}{25}$	$\frac{U}{100}$	$\frac{V}{100}$	$\frac{W}{6}$	$\frac{X}{1000}$	$\frac{Y}{1000}$					
5-7	mesophil (30 µl)	22A/SV	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	352,4	30	0,56	8	0,80	1400	96	75,2	80	113	8	42,4	8	7,1	30	30			
	mesophil (10 µl)	22A/SV	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	116,7	30	0,56	9	0,90	1400	96	75,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	10			
8-10	mesophil (30 µl)	301V	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	352,4	30	0,56	8	0,80	1400	96	75,2	80	113	8	42,4	8	7,1	30	30			
	mesophil (10 µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	116,7	30	0,56	9	0,90	1400	96	75,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	10			
11-13	mesophil (30 µl)	BSE	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	352,4	30	0,56	8	0,80	1400	96	75,2	80	113	8	42,4	8	7,1	30	30			
	mesophil (10 µl)	BSE	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	116,7	30	0,56	9	0,90	1400	96	75,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	10			
	mesophil Ü (30 µl)		50	47	42,45	4,717	10,0	0,9	10,00	202,2	2,830	0,57						0	55	5	54,5	5	9,1	15	30			
			$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H}{(H+500)}$	$\frac{I}{(G+H)}$	$\frac{J}{100}$	$\frac{K}{(G+H)}$	$\frac{L}{1000}$								$\frac{F}{100}$	$\frac{T}{100}$	$\frac{V}{100}$	$\frac{W}{0,6}$	$\frac{X}{1000}$	$\frac{Y}{1000}$					
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4								100	220	20	54,5	20	9,1	60	20			
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7								100	220	20	54,5	20	9,1	60	10			
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	5			
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5			
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5								100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25			
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5								100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25			
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5			
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	5			
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7								100	220	20	54,5	20	9,1	60	10			
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4								100	220	20	54,5	20	9,1	60	20			

L<sup>(1)</sup>: \*0,7Überstand; abzügl. 100µl Pellet und 50µl Probe (B)

S<sup>(2)</sup>: Überstand abzügl. 100µl Pellet und 50µl Probe (B)

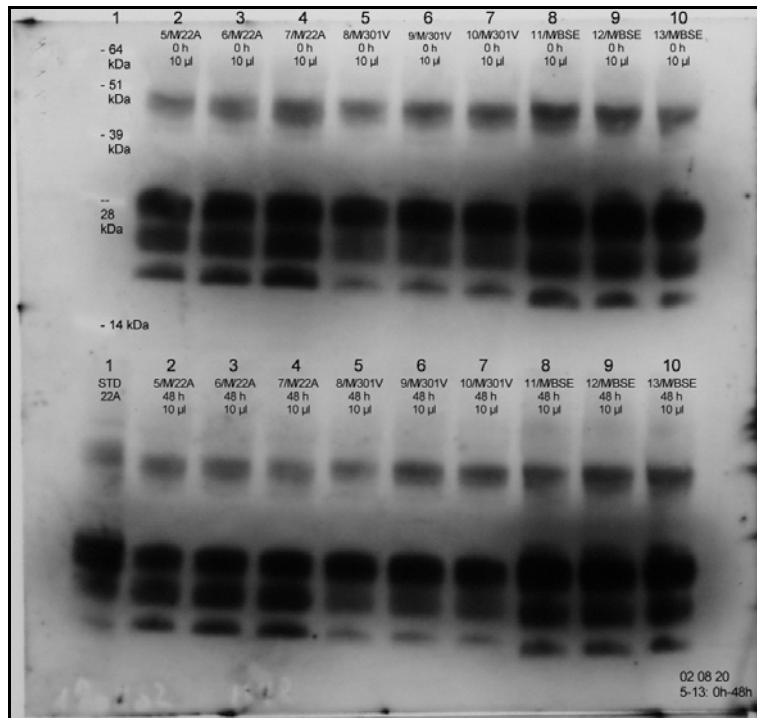


Abbildung 6: Abbau 2, mesophil: 0 und 48 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 5, 6, 7: 22A/SV  
 Proben 8, 9, 10: 301V/NM  
 Proben 11, 12, 13: BSE

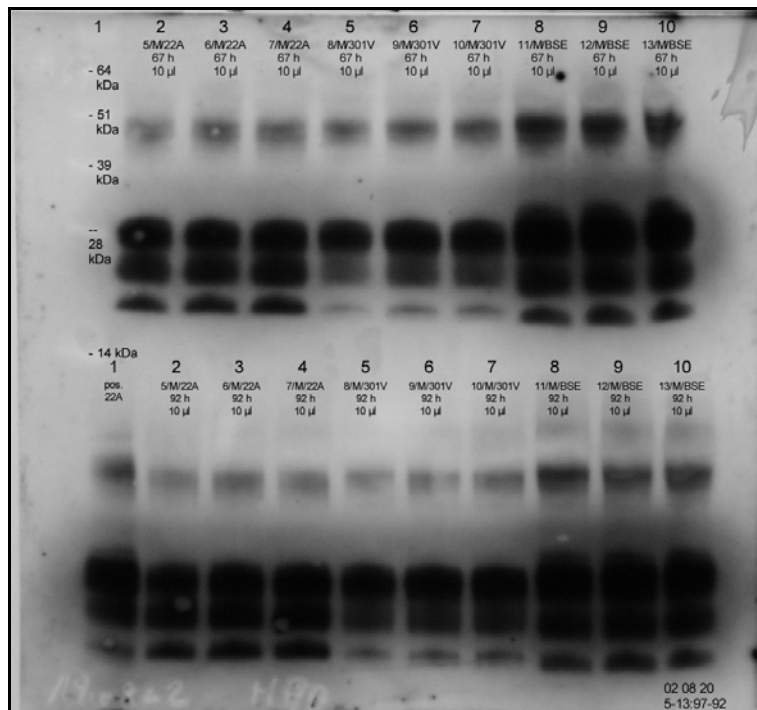


Abbildung 7: Abbau 2, mesophil: 67 und 92 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 5, 6, 7: 22A/SV  
 Proben 8, 9, 10: 301V/NM  
 Proben 11, 12, 13: BSE



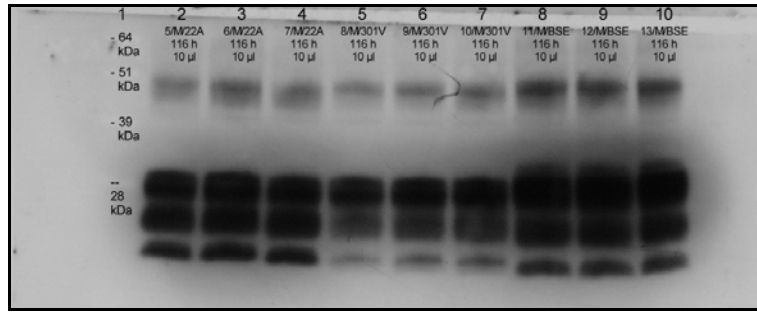


Abbildung 8: Abbau 2, mesophil: 116 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 5, 6, 7: 22A/SV  
 Proben 8, 9, 10: 301V/NM  
 Proben 11, 12, 13: BSE

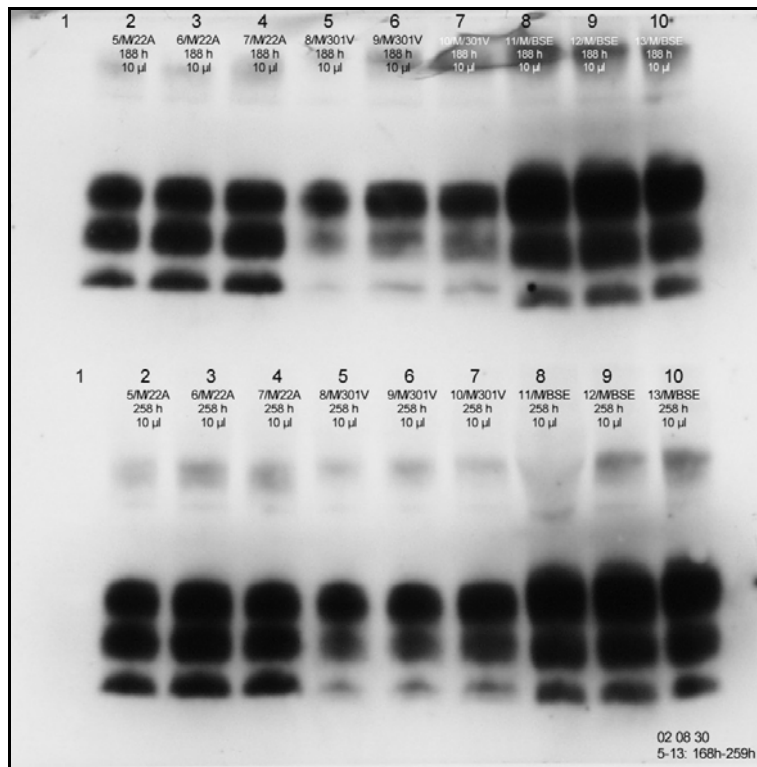


Abbildung 9: Abbau 2, mesophil: 168 und 256 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 5, 6, 7: 22A/SV  
 Proben 8, 9, 10: 301V/NM  
 Proben 11, 12, 13: BSE

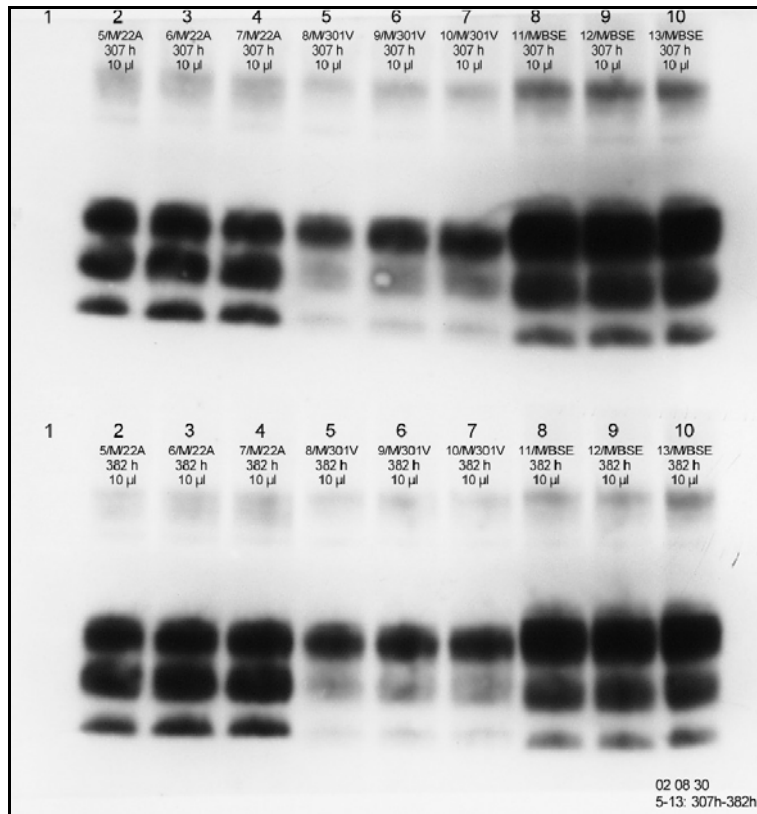


Abbildung 10: Abbau 2, mesophil: 307 und 382 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen  
 Proben 5, 6, 7: 22A/SV; Proben 8, 9, 10: 301V/NM; Proben 11, 12, 13: BSE

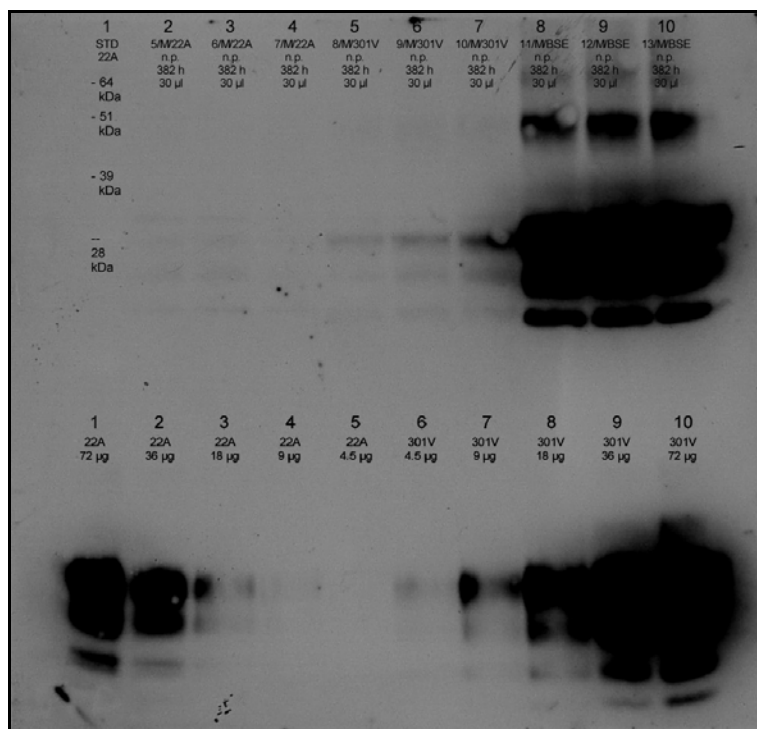


Abbildung 11: Abbau 2, mesophil: 382 Stunden ohne Ethanolfällung; 30 µl Probenauftragsvolumen (Proben 5, 6, 7: 22A/SV; Proben 8, 9, 10: 301V/NM; Proben 11, 12, 13: BSE)  
 "Kalibration": 72 µg - 4,5 µg Hirn Probenauftragsmenge 22A/SV Scrapie und 301V BSE

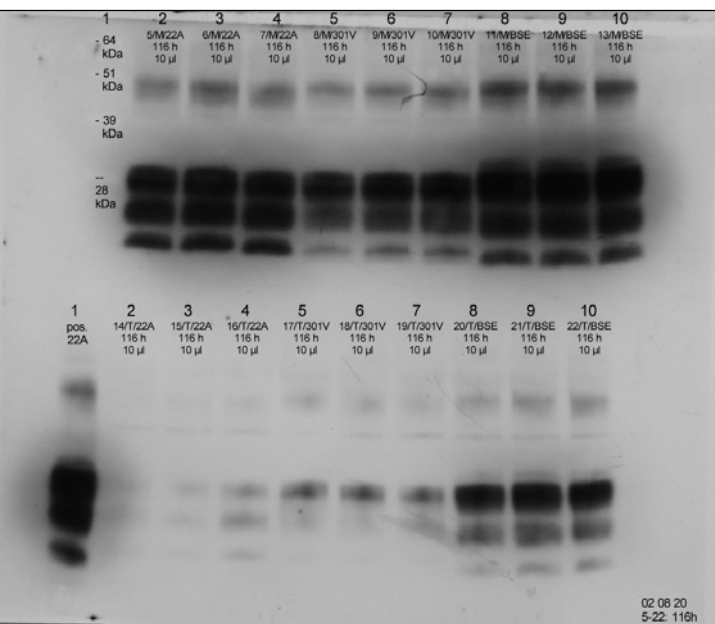
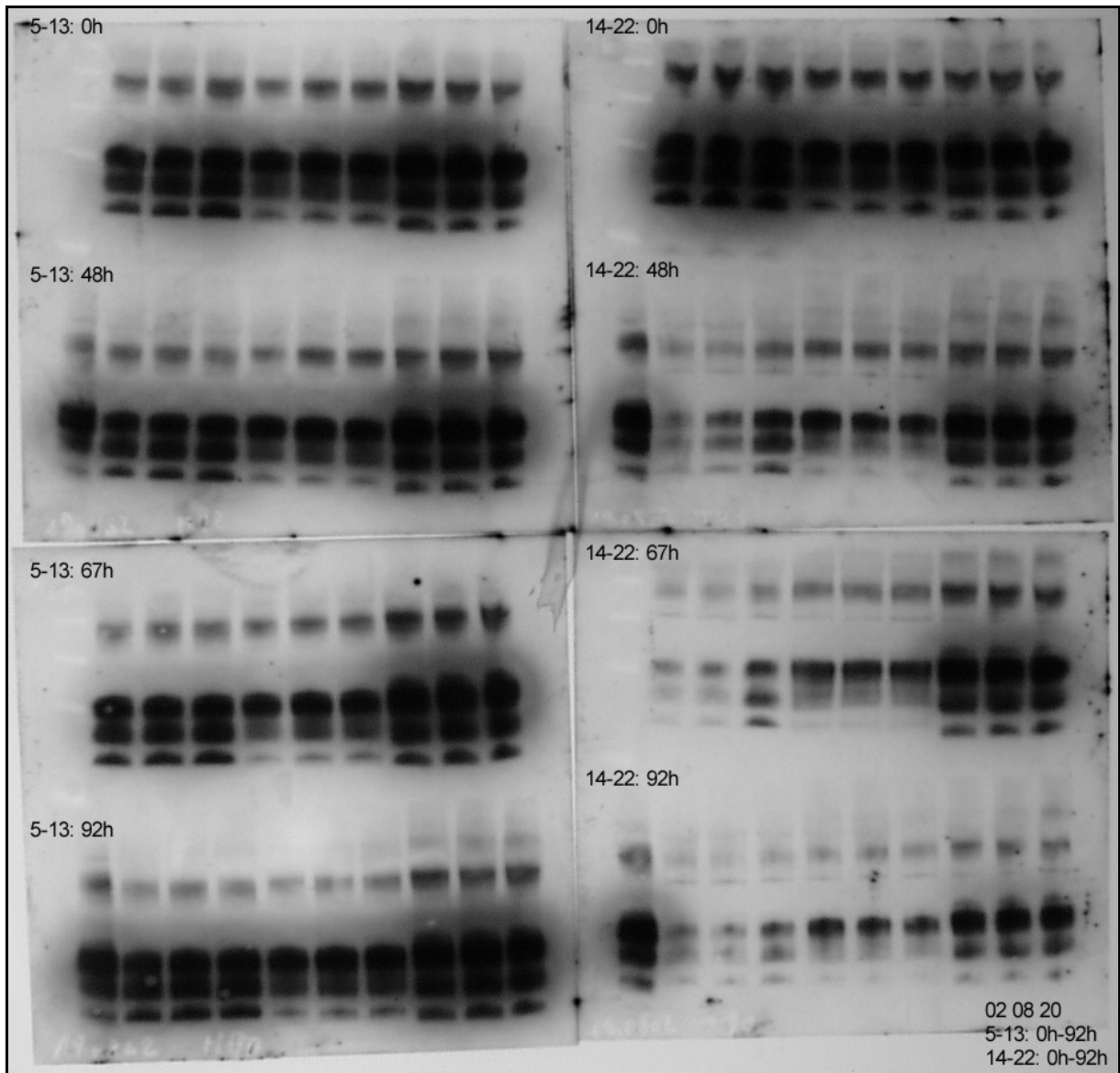


Abbildung 12 (oben): Vergleich Abbau 2 (Ansätze 5-13; mesophil) u. Abbau 3 (Ansätze 14 - 22 thermophil). 0h, 48h, 67h und 92h

Abbildung 13 (links): Vergleich Abbau 2 (mesophil) und Abbau 3 (thermophil). 116h

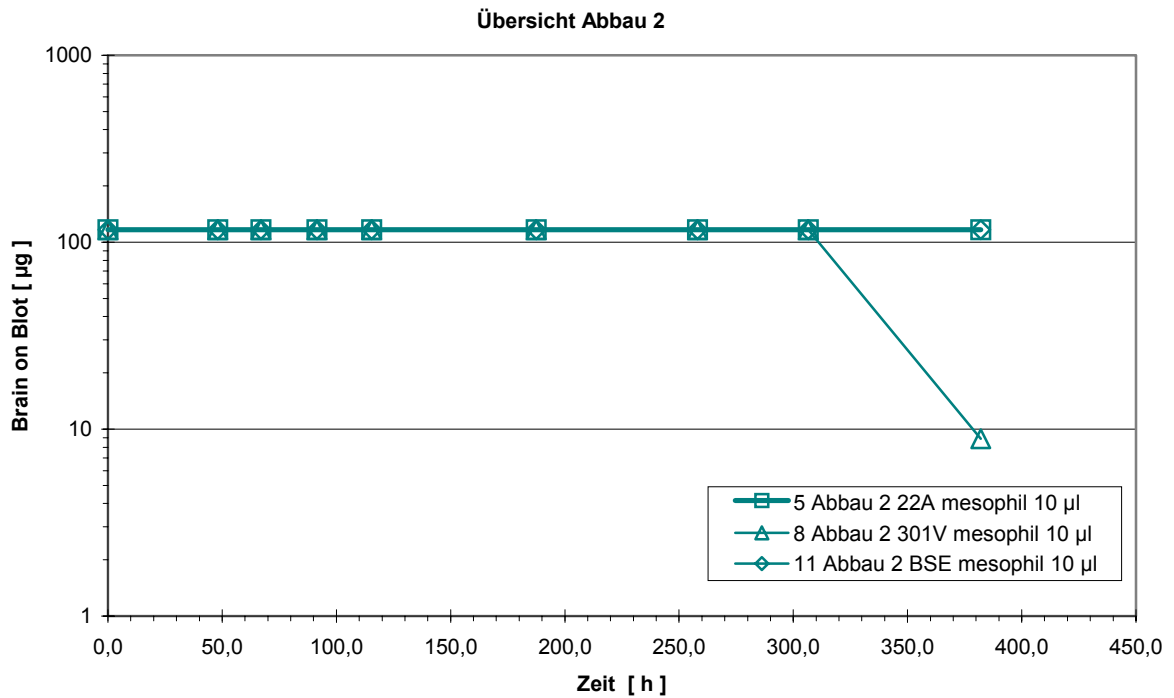


Abbildung 14: Grafische Darstellung des Abbaubversuches 2

*Proben mit eindeutigem PrP<sup>SC</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.*

**Versuche**

- *Abbauversuch 3 thermophil:*
  - je 3 Ansätze thermophil 15 ml*
  - 14 ml Inokulum*
  - 0,700 ml Hirnhomogenat (10%)*
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,48 % Hirn in Faulschlamm: 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>*
  - 22A/SV: in Maus passiertes ovines Scrapie 10,0% Hirn in Wasser*
  - 301V/nm: in Maus passiertes bovines BSE 10,0% Hirn in Wasser*
  - BSE: bovines BSE 10,0% Hirn in Wasser*
- *Blindwert (PrP<sup>SC</sup>: 301V/nm): Wasser (Temperatureffekt)*  
*dampfersterilisierter Faulschlamm (122°C/20min; Matrixeffekt)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *Inkubation 356 Stunden (15 Tage), 55°C*  
*Blindwert: 217 Stunden*
- *Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung*

**Conclusio:**

- *signifikante Reduktion von PrP<sup>SC</sup>: Reduktionsfaktor 10 - 100 innerhalb von 356 h*
- *Die Detektionsgrenze liegt zwischen 4,5 und 9 µg Hirn Probenauftragsmenge*  
*10 µl Auftragsvol.: < 4,5 µg Hirn am Gel entsprechen < 0,18 mg<sub>H</sub>/ml<sub>FS</sub> (Reduktionsfaktor: 26,0)*  
*30µl Auftragsvol.: < 4,5 µg Hirn am Gel entsprechen < 0,0613 mg<sub>H</sub>/ml<sub>FS</sub> (Reduktionsfaktor: 78,3)*
- *PrP<sup>SC</sup>(22A/SV): Reduktion der nachweisbaren PrP<sup>SC</sup>-Konz von 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>:*  
*nach 116 auf < 0,18mg/ml, nach 356 Stunden auf ca. 0,06 mg/ml.*
- *PrP<sup>SC</sup>(301V): Reduktion der nachweisbaren PrP<sup>SC</sup>-Konz von 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>:*  
*nach 284 auf 0,18mg/ml, nach 356 Stunden auf > 0,06 mg/ml. Keine Red. auf < 0,06mg/ml*
- *PrP<sup>SC</sup>(301V): Reduktion der nachweisbaren PrP<sup>SC</sup>-Konz von 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>:*  
*nach 284 auf 0,18mg/ml, nach 356 Stunden auf > 0,06 mg/ml. Keine Red. auf < 0,06mg/ml*
- *Der schlechtere Abbau von BSE kann auch auf das 1-Wöchige lagern des Inokulums im Kühlschrank und die daraus resultierende länger lag-Phase zurückzuführen sein.*

**Hirnhomogenat Scrapie pos.: 22A/SV**

HH 22A+ /10,0

380 mg Nr. 6975

in 3500 µl Wasser

**Hirnhomogenat Maus-BSE pos.: 301V/NM**

HH 301V+ /10,0

915 mg Nr. 5908 und 5888

in 9 ml Wasser in 3500 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

**ADM**

thermophil: 14.08.02

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)

Inkubation

700 µl Hirnhomogenat  
14,0 ml Faulschlamm  
unter CO<sub>2</sub>-Spülung  
Verschließen des Röhrchens  
vortexen

Inkubation im Wasserbad:  
thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

Probenahmezeiten:

<b>Abbau 3 (14-22)</b>	<b>[h]</b>
14.08.02 14:00	0
16.08.02 14:00	48,0
17.08.02 09:00	67,0
18.08.02 09:30	91,5
19.08.02 09:00	115,0
20.08.02 13:00	143,0
21.08.02 10:00	164,0
22.08.02 09:30	187,5
23.08.02 08:00	210,0
24.08.02 08:00	234,0
26.08.02 10:00	284,0
27.08.02 08:30	306,5
29.08.02 10:00	356,0
END	

<b>Blank (23-28)</b>	<b>[h]</b>
21.08.02 11:00	0
23.08.02 08:00	45,0
26.08.02 10:00	119,0
30.08.02 12:00	217,0
END	

Probenahme:

vortexen  
Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung  
Verschließen des Gefäßes

Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)  
500 µl Probe  
+ 30 µl 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  
gesamter Überstand hinübergeleert

Entnahme von 50 µl = n.p.-Probe  
+ 10 µl BSA (10 %)  
vortexen

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C  
überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf  
Küchenrolle (10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:  
80 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

n.p.-Proben:

+ 5 µl PK  
vortexen

35 min 48°C (Wasserbad 48,5°C)

+ 5 µl PMSF 100

vortexen

+ 15 µl Sample Buffer 5x  
vortexen

Alle Proben:

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

Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Tabelle 7: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 3

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
14-16	14.-30.08.02	382	thermophil	thermophil	Abbau	22A/SV	14,0	700
17-19	14.-30.08.02	382	thermophil	thermophil	Abbau	301V/VM	14,0	700
20-22	14.-30.08.02	382	thermophil	thermophil	Abbau	BSE	14,0	700
23-25	14.-30.08.02	217	thermophil	Wasser	Blindwert	301V/VM	14,0	700
26-28	14.-30.08.02	217	thermophil	sterilisierte Biomasse	Blindwert	301V/VM	14,0	700

Tabelle 8: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 3

Probenauftragsvolumen:	30	10	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	352,4	116,7	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,12	0,37	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	39,60	13,11	

Tabelle 9: Abbaumatrix Abbauversuch 3

		Zeit [h]																		
		0	48,0	67,0	91,5	115,0	143,0	164,0	187,5	210,0	234,0	284,0	306,5	356,0						
Auftragsvolumen [ $\mu$ l]		10	10	10	10	10	10	30	10	10	30	10	30	10	30	10	30	30,0	30,0	
Reduktionsfaktor		13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	13,11	39,6	13,11	13,11	39,6	13,11	39,6	13,11	39,6	13,11	39,6	39,6	39,61	
Matrix	PrP <sup>SC</sup>	Probe																		
mesophil	22A	14	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
		15	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
		16	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+
meso	301V	17	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+
		18	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+
		19	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+
meso	BSE	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+
		21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+
		22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+

Tabelle 10: Abbaumatrix Abbauversuch 3 - Blindwerte

		Zeit [h]			
		45,0	119,0	217,0	
Auftragsvolumen [ $\mu$ l]		10	10	10	
Reduktionsfaktor		13,11	13,11	13,11	
Matrix	PrP <sup>SC</sup>	Probe			
sterile Bio- masse	301V	23	+	+/-	+/-
		24	+	+/-	+/-
		25	+	+/-	+/-
Wasser	301V	26	+	+	+
		27	+	+	+
		28	+	+	+

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>SC</sup> Bande erkennbar

+/- .....Detektionsgrenze

+ .....positiver PrP<sup>SC</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>SC</sup>-Nachweis negativ



Abbau 3		Hirn-homog.	GesVol [µl]	Sample AD-M+ HH [µl]	AD-M [µl]	Hirnhomogenat				theoret. HH on Blot [µg]	L.Sarco		BSA		EtOH			Re- susp. [µl]	Ges. Vol [µl]	PK		PMSF		SDB [µl]	Sample on Blot [µl]
Slamm	conc [µl]					in AD-M [µl]	in AD-M [µl]	conc [%]	in AD-M [%]		in AD-M [µg/ml]	in AD-M [µg]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	konz [µl]			[%]	[%]	[µl]	[µl]		
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
		$=G+H+M+O$	$=G+H$			$=H^*I/100$	$=(H+G)/100$	$=(H^*I/100)/((H+G)/100)$	$=(H^*I/100)/((H+G)/100)$	$=M^*10/E$		$=O^*0,1$			$=Q^*R/100$	$=(Q+E-150)^*100$	$=25+T+V$		$=V^*1000^*0,6/U$		$=X^*0,1/U^*1000$				
14-16	thermophil (30 µl)	22A/SV	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>352,4</b>	30	0,56	8	0,80	<b>1400</b>	96	75,2	<b>80</b>	113	8	42,4	8	7,1	30	<b>30</b>
	thermophil (10 µl)	22A/SV	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>116,7</b>	30	0,56	9	0,90	<b>1400</b>	96	75,1	<b>80</b>	114	9	47,3	9	7,9	30	<b>10</b>
17-19	thermophil (30 µl)	301V	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>352,4</b>	30	0,56	8	0,80	<b>1400</b>	96	75,2	<b>80</b>	113	8	42,4	8	7,1	30	<b>30</b>
	thermophil (10 µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>116,7</b>	30	0,56	9	0,90	<b>1400</b>	96	75,1	<b>80</b>	114	9	47,3	9	7,9	30	<b>10</b>
20-22	thermophil (30 µl)	BSE	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>352,4</b>	30	0,56	8	0,80	<b>1400</b>	96	75,2	<b>80</b>	113	8	42,4	8	7,1	30	<b>30</b>
	thermophil (10 µl)	BSE	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>116,7</b>	30	0,56	9	0,90	<b>1400</b>	96	75,1	<b>80</b>	114	9	47,3	9	7,9	30	<b>10</b>
B	23-25 sterilisiert (10 µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>116,7</b>	30	0,56	9	0,90	<b>1400</b>	96	75,1	<b>80</b>	114	9	47,3	9	7,9	30	<b>10</b>
B	26-28 Wasser (10 µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	<b>116,7</b>	30	0,56	9	0,90	<b>1400</b>	96	75,1	<b>80</b>	114	9	47,3	9	7,9	30	<b>10</b>
			$=G+H+M+O$	$=G+H$				$=H^*I/100$	$=(H+G)/100$	$=(H^*I/100)/((H+G)/100)$							$=F+T+V$		$=V^*1000^*0,6/U$		$=X^*0,1/U^*1000$				
	thermophil Ü (30 µl)		50	47	42,45	4,717	10,0	0,9	10,00	<b>202,2</b>	2,830	0,57					<b>0</b>	<b>55</b>	5	54,5	5	9,1	15	<b>30</b>	
			$=G+H+M+O$	$=G+H$				$=H^*I/100$	$=(H+500)/100$	$=(H^*I/100)/((H+500)/100)$							$=H+T+V$		$=V^*1000^*0,6/U$		$=X^*0,1/U^*1000$				
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>71,4</b>	L <sup>(1)</sup> : *0,7 Überstand abzügl. 100 µl Pellet und 50 µl Probe (B) S <sup>(2)</sup> : Überstand abzügl. 100 µl Pellet und 50 µl Probe (B)						<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>20</b>	
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>35,7</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>10</b>	
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>17,9</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>5</b>	
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>8,9</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>2,5</b>	
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>4,5</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>1,25</b>	
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>4,5</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>1,25</b>	
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>8,9</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>2,5</b>	
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>17,9</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>5</b>	
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>35,7</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>10</b>	
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	<b>71,4</b>							<b>100</b>	220	20	54,5	20	9,1	60	<b>20</b>	

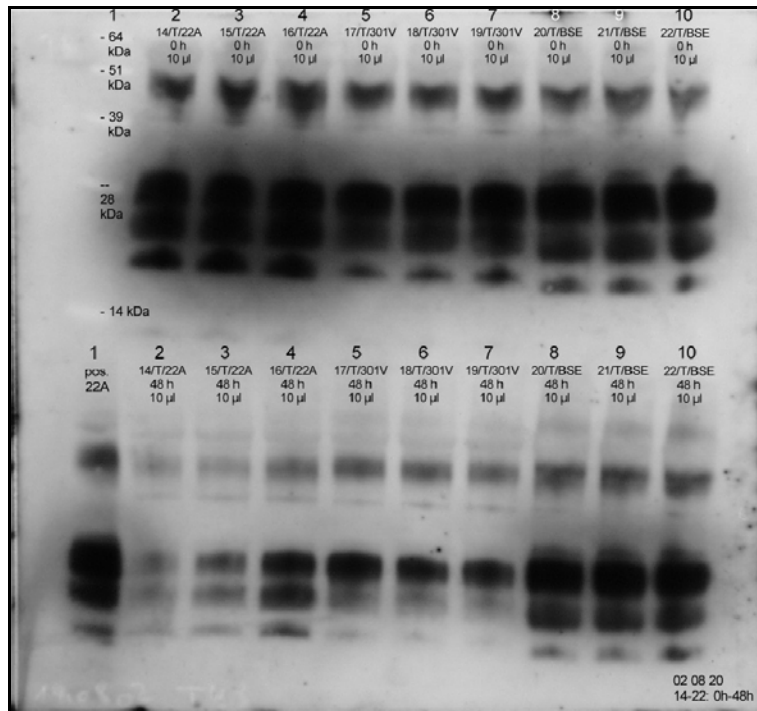


Abbildung 15: Abbau 3 (thermophil): 0 und 48 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV  
 Proben 17, 18, 19: 301V/NM  
 Proben 20, 21, 22: BSE

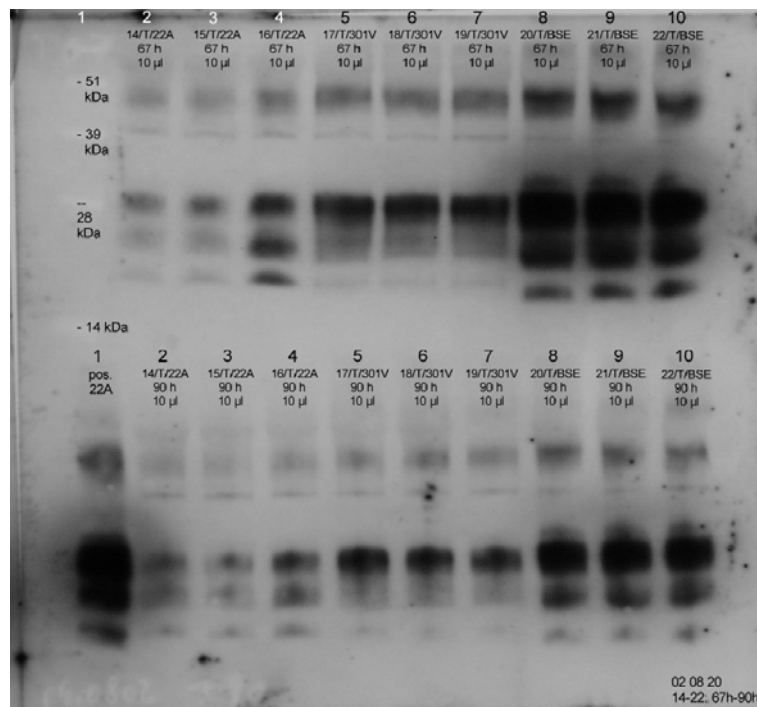


Abbildung 16: Abbau 3 (thermophil): 67 und 90 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV  
 Proben 17, 18, 19: 301V/NM  
 Proben 20, 21, 22: BSE

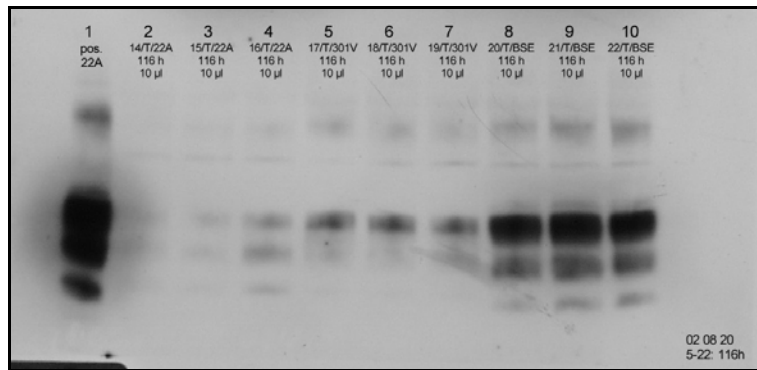


Abbildung 17: Abbau 3 (thermophil): 116 Stunden; **10 µl** Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV  
 Proben 17, 18, 19: 301V/NM  
 Proben 20, 21, 22: BSE

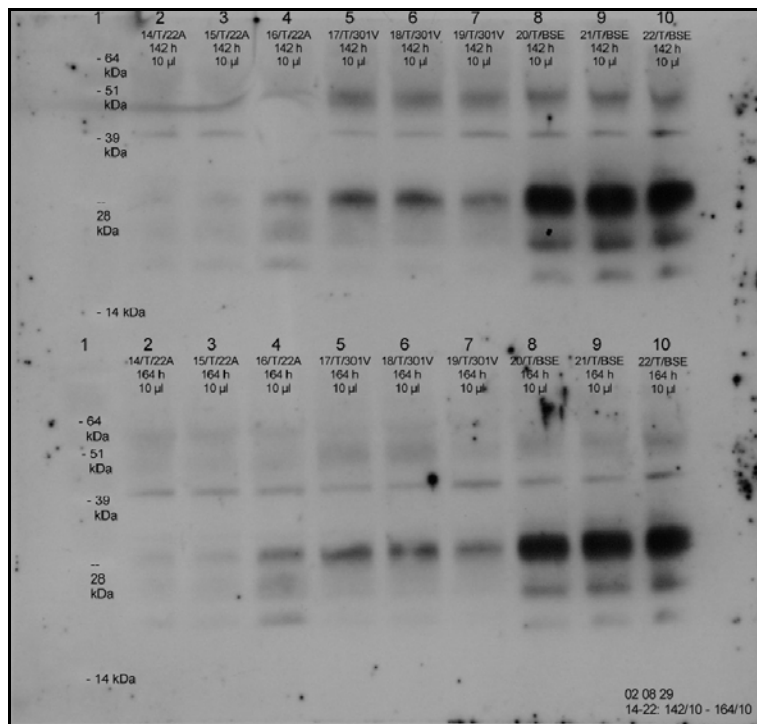


Abbildung 18: Abbau 3 (thermophil): 142 und 164 Stunden; **10 µl** Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV  
 Proben 17, 18, 19: 301V/NM  
 Proben 20, 21, 22: BSE

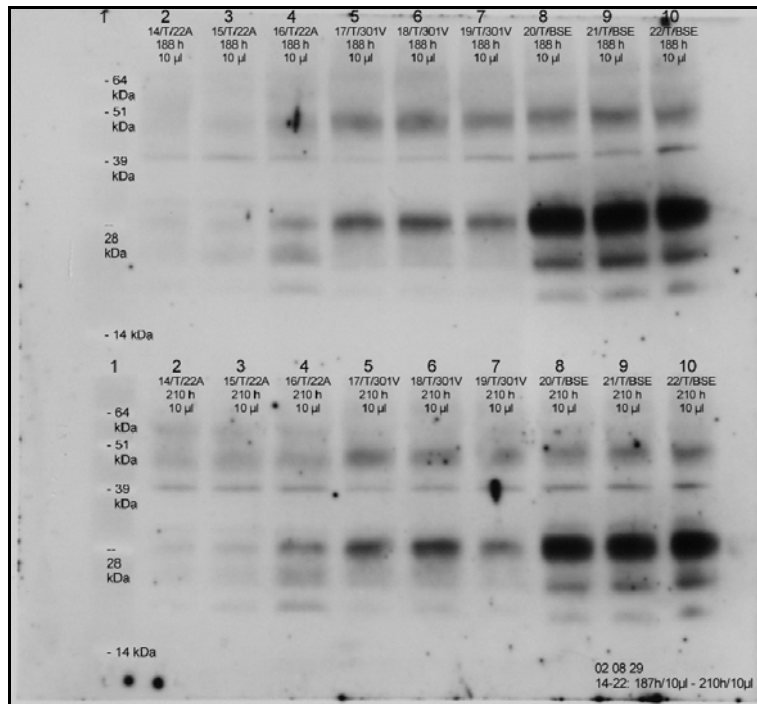


Abbildung 19: Abbau 3 (thermophil): 187 und 210 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

- Proben 14, 15, 16: 22A/SV
- Proben 17, 18, 19: 301V/NM
- Proben 20, 21, 22: BSE

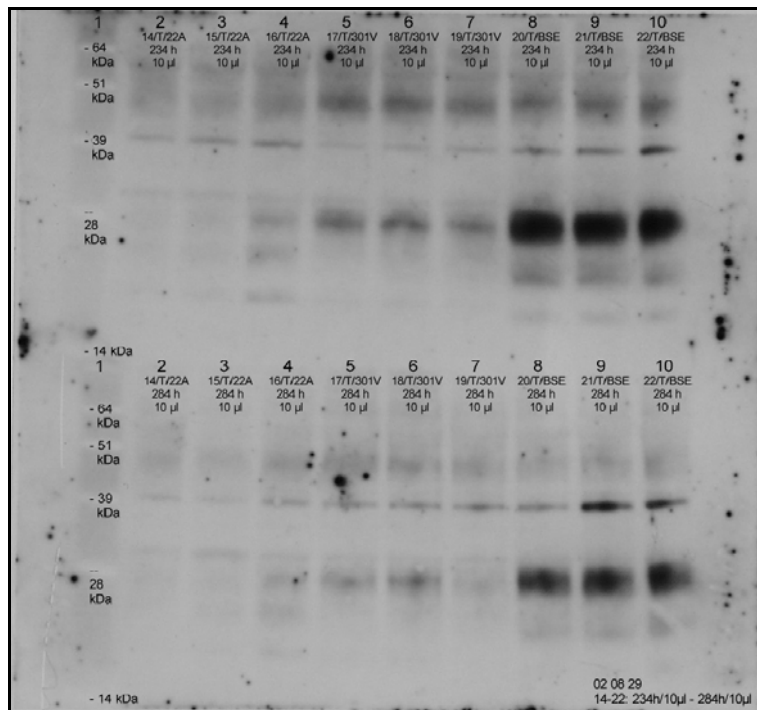


Abbildung 20: Abbau 3 (thermophil): 234 und 284 Stunden; 10 µl Probenauftragsvolumen

- Proben 14, 15, 16: 22A/SV
- Proben 17, 18, 19: 301V/NM
- Proben 20, 21, 22: BSE

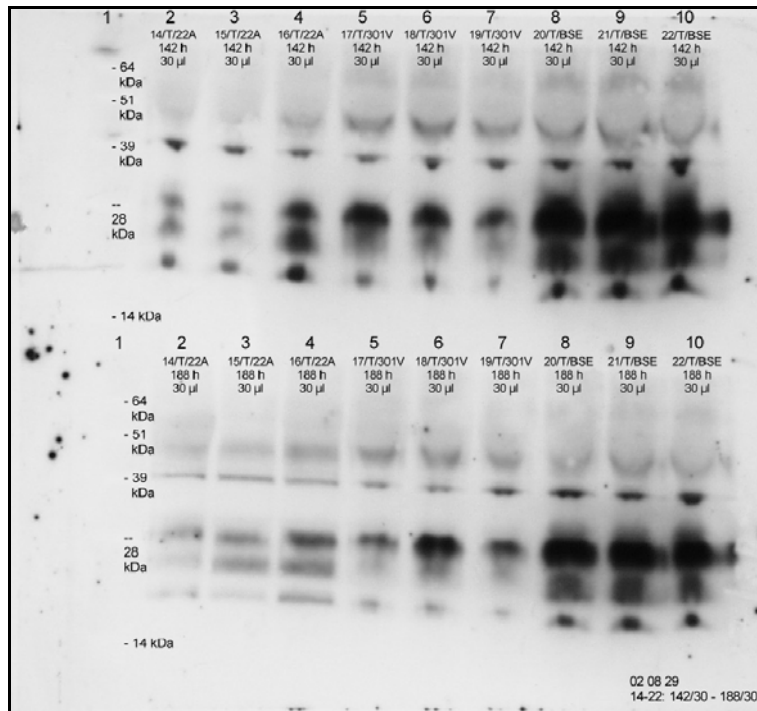


Abbildung 21: Abbau 3 (thermophil): 142 und 188 Stunden; **30**  $\mu$ l Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV

Proben 17, 18, 19: 301V/NM

Proben 20, 21, 22: BSE

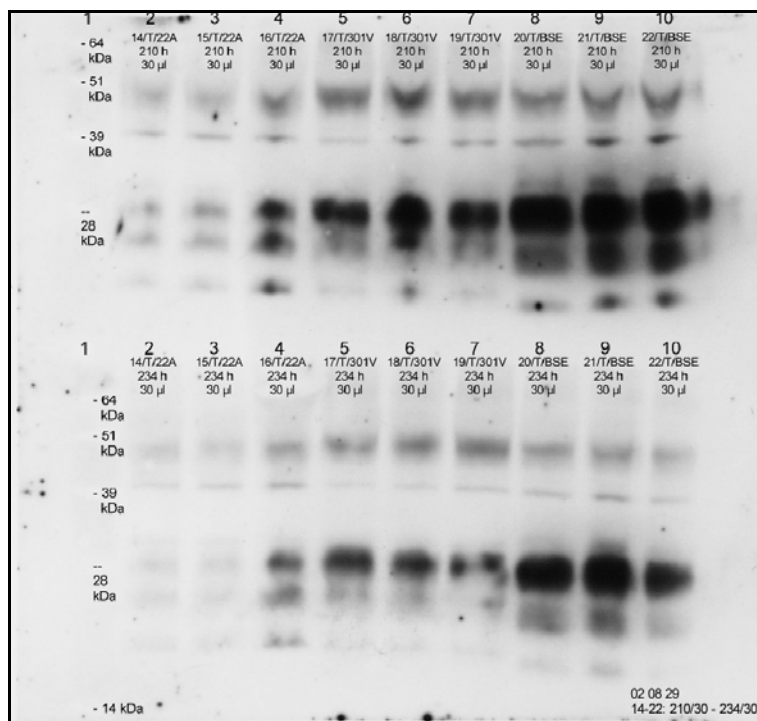


Abbildung 22: Abbau 3 (thermophil): 210 und 234 Stunden; **30**  $\mu$ l Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV

Proben 17, 18, 19: 301V/NM

Proben 20, 21, 22: BSE

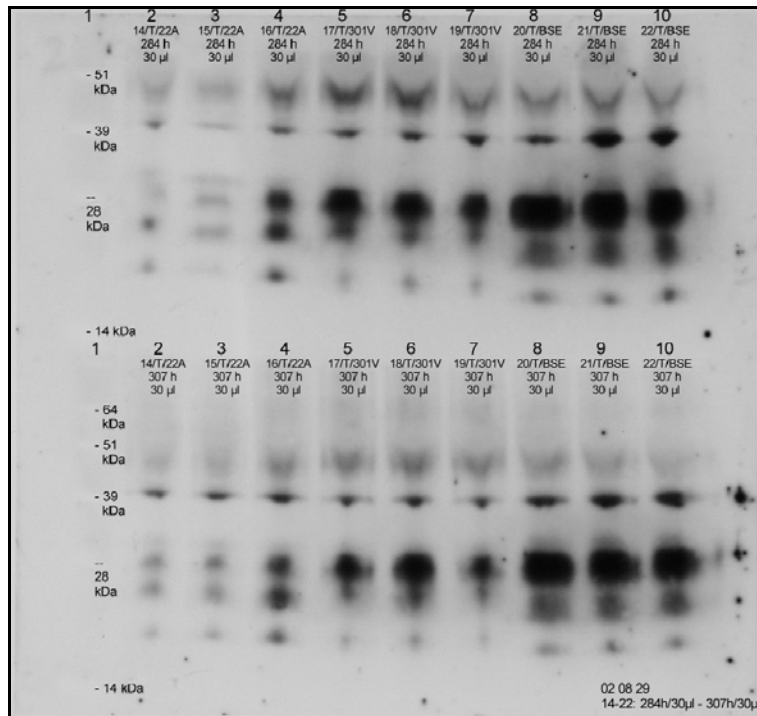


Abbildung 23: Abbau 3 (thermophil): 264 und 307 Stunden; **30** µl Probenauftragsvolumen

Proben 14, 15, 16: 22A/SV

Proben 17, 18, 19: 301V/NM

Proben 20, 21, 22: BSE

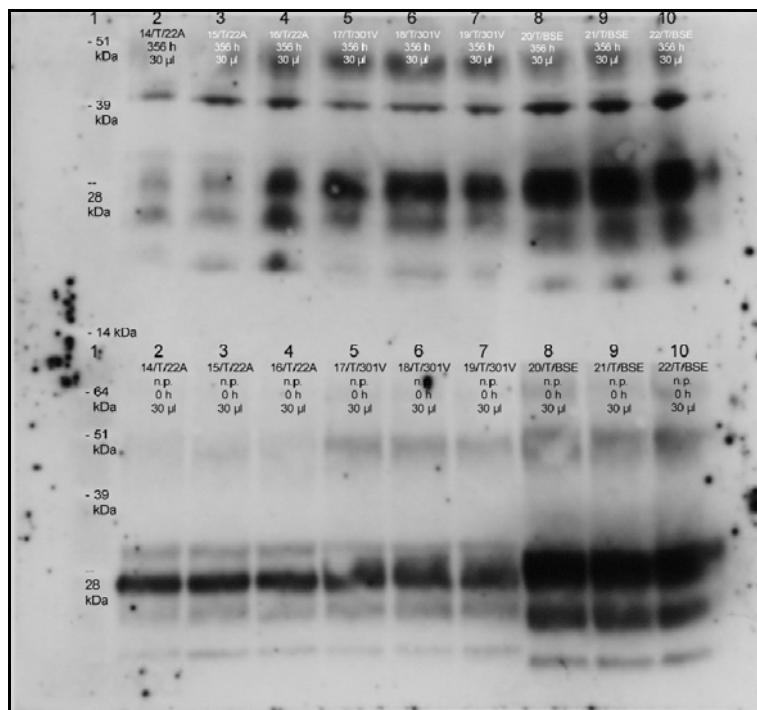


Abbildung 24: Abbau 3 (thermophil): 356 Stunden; **30** µl Probenauftragsvolumen (oben)

Abbau 3 (thermophil): 0 Stunden ohne Ethanol fällung (unten)

Proben 14, 15, 16: 22A/SV

Proben 17, 18, 19: 301V/NM

Proben 20, 21, 22: BSE

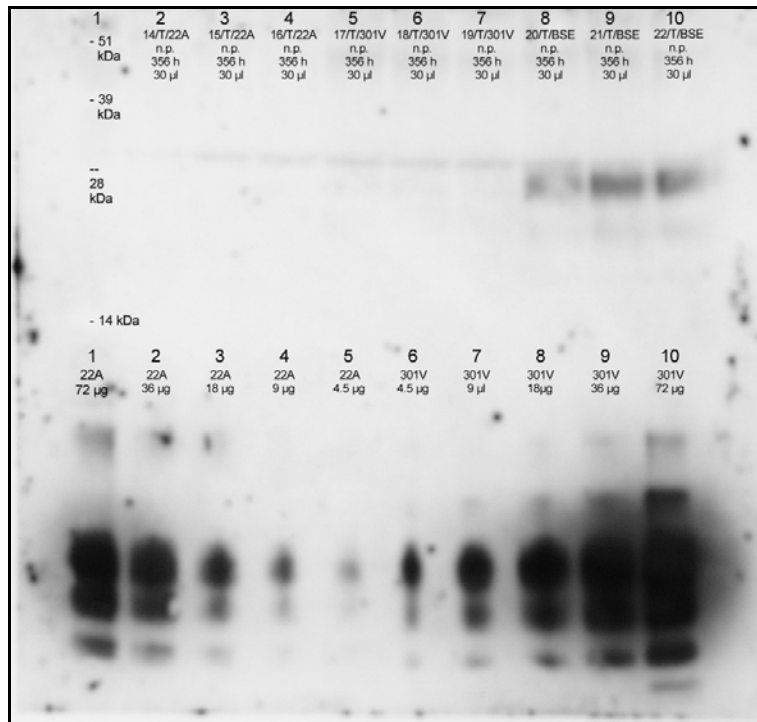


Abbildung 25 oben: Abbau 3 (55°C): 356 h ohne Ethanol-fällung; 30 µl Auftragsvol.  
 Proben 14, 15, 16: 22A/SV; Proben 17, 18, 19: 301V/NM; Proben 20, 21, 22: BSE  
 unten: „Kalibration“: 72 µg - 4,5 µg Hirn Probenauftragsmenge

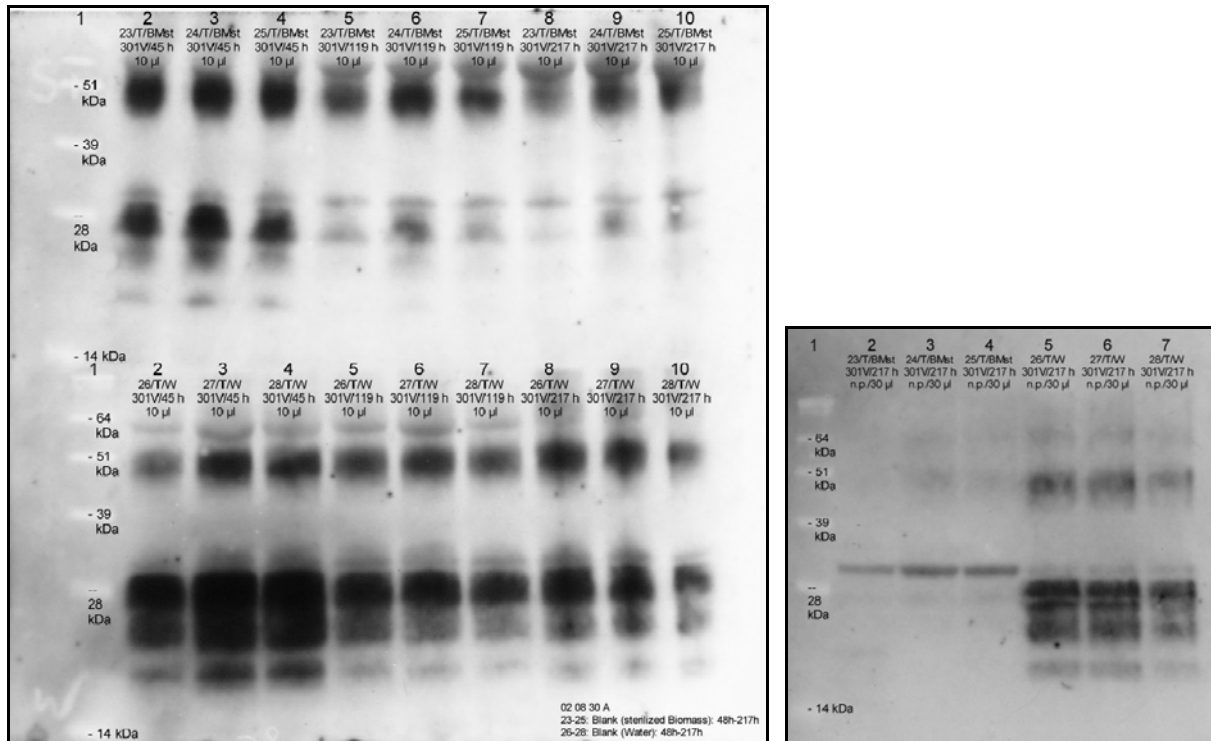


Abbildung 26: links: Blindwert thermophile Inkubation (301V): 45, 119 und 217 Stunden  
 23 - 25: steriler Faulschlamm (Matrixeffekt?)  
 26 - 28: Wasser (Temperatureffekt?)  
 Abbildung 26: rechts: Blindwert thermophile Inkubation (301V): ohne Ethanol-fällung 217 h

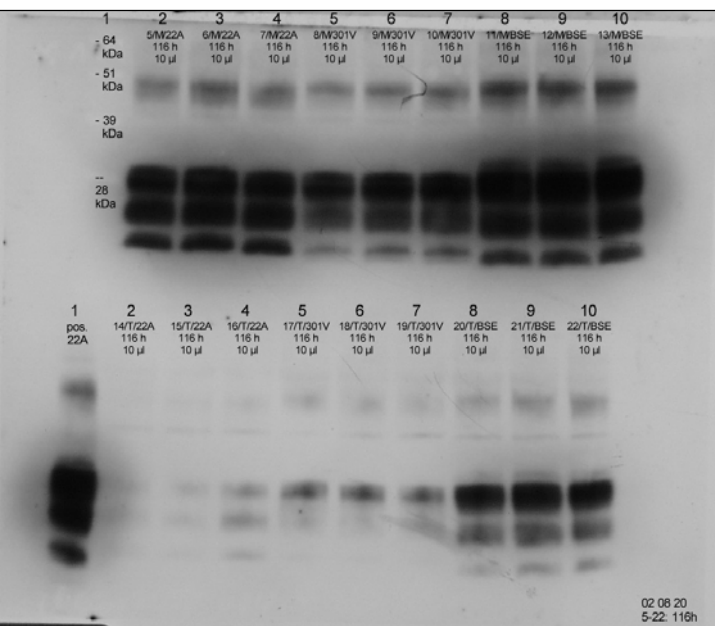
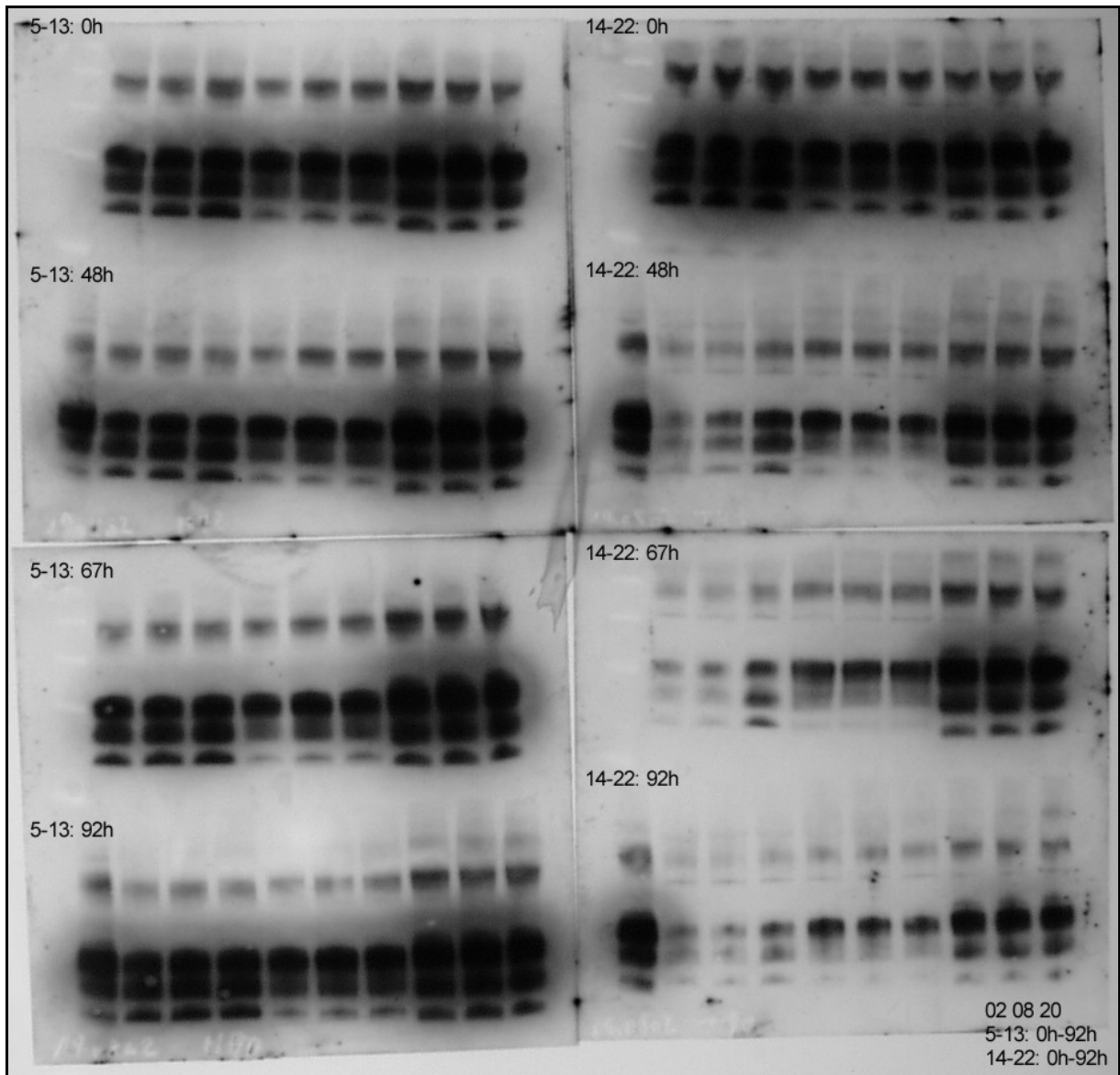


Abbildung 27 (oben): Vergleich Abbau 2 (Ansätze 5-13; mesophil) u. Abbau 3 (Ansätze 14 - 22 thermophil). 0h, 48h, 67h und 92h

Abbildung 28 (links): Vergleich Abbau 2 (mesophil) und Abbau 3 (thermophil). 116h



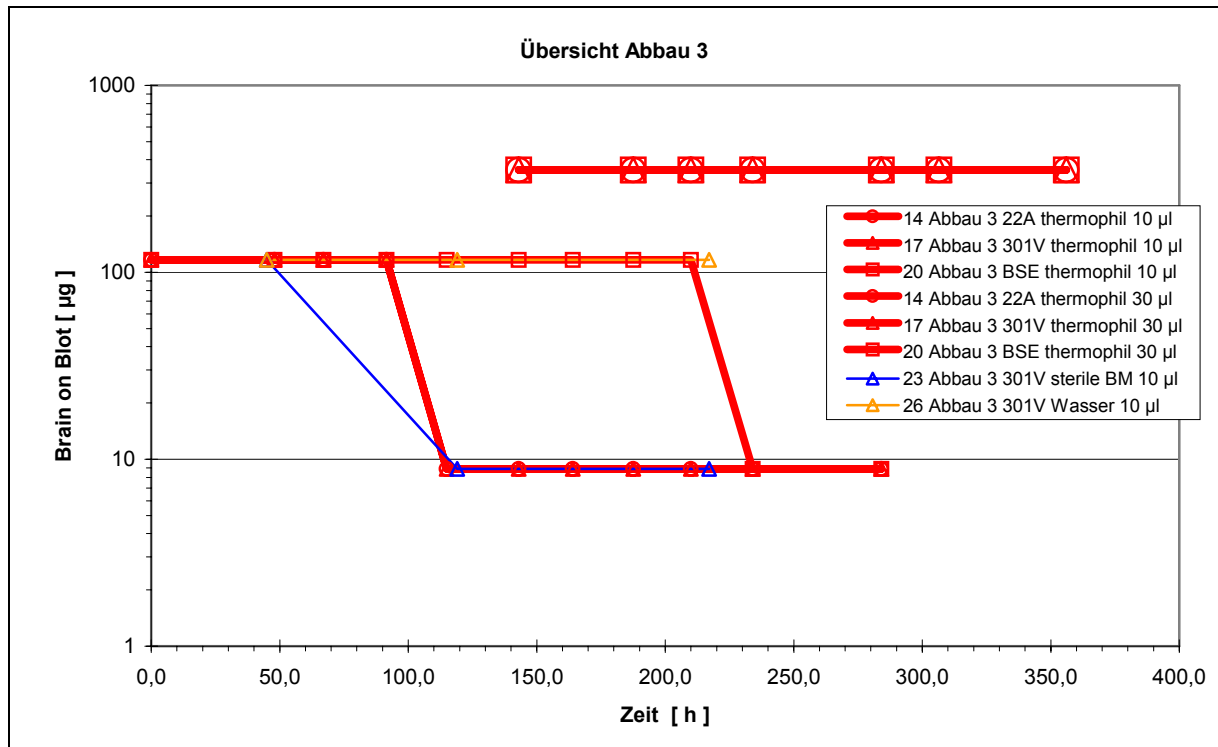


Abbildung 29 Grafische Darstellung des Abbaubversuches 3

Proben mit eindeutigem PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.

**Versuche**

- *Abbauversuch 4 thermophil:*  
je 5 Ansätze thermophil 10,5 ml  
10 ml Inokulum  
0,500 ml Hirnhomogenat (10%)
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,48 % Hirn in Faulschlamm: 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>*  
22A/SV: in Maus passiertes ovines Scrapie 10,0% Hirn in Wasser  
301V/nm: in Maus passiertes bovines BSE 10,0% Hirn in Wasser  
BSE: bovines BSE 10,0% Hirn in Wasser
- *Blindwert (PrP<sup>SC</sup>: 301V/nm): Wasser (Temperatureffekt)*  
dampfsterilisierter Faulschlamm (122°C/20min; Matrixeffekt)
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *Inkubation 260 Stunden (11 Tage), 55°C, anaerob (Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung)*

**Conclusio:**

- *Blindwert Wasser: keine Reduktion von 301V*
- *Blindwert sterilisierte Biomasse: Reduktion innerhalb von 92 Stunden unter die Detektionsgrenze: Reduktionsfaktor 44,9*
- *301V und BSE keine Reduktion innerhalb von 260 Stunden unter die Detektionsgrenze (Reduktion kleiner Faktor 10)*
- *Möglicherweise zu kleiner Ansatz*

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

380 mg Nr. 6975  
in 3500 µl Wasser

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

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

**ADM**

thermophil: 16.09.02

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)

Tabelle 11: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 4

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
29 - 31	16.09.-27.09.02	260	thermophil 55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	10,0	500
32 - 34				AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	10,0	500
35 - 37				AD-M thermo	Abbau	301V/VM	10,0	500
38 - 40				AD-M thermo	Abbau	22A/SV	10,0	500
41 - 43				AD-M thermo	Abbau	BSE	10,0	500

Tabelle 12: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 4

Probenauftragsvolumen:	10	30	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	134,3	400	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,3182	0,1068	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	15,086	44,944	

Tabelle 13: Abbaumatrix Abbauersuch 4

Abbau 4											
		Zeit [h]	0,0	44,0	92,0	164,0	164,0	211,5	211,5	260,0	260,0
		Auftragsvolumen: [µl]	10	10	10	10	30	10	30	10	30
		Reduktionsfaktor	15,1	15,1	15,1	15,1	44,9	15,1	44,9	15,1	44,9
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	ProbenNr.									
Wasser	301V	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sterile BM	301V	32	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
		33	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
		34	+	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
thermo	301V	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		36	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		37	+	+	+	+	+	+	+	+	+
thermo	22A	38	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
		39	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
		40	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
thermo	BSE	41	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
		42	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
		43	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+

### Inkubation

500 µl Hirnhomogenat

10,0 ml Faulschlamm

unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Röhrchens

vortexen

Inkubation im Wasserbad:

thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

### Probenahmezeiten:

Datum	Differenz [h]
16.09.02 12:00	0,0
18.09.02 08:00	44,0
20.09.02 08:00	92,0
23.09.02 08:00	164,0
25.09.02 07:30	211,5
27.09.02 08:00	260,0

### Probenahme:

vortexen

Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Gefäßes

### Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

500 µl Probe

+ 30 µl 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

gesamter Überstand hinübergeleert

+ 10 µl BSA (10 %)

vortexen

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

80 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 / 10 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot

10 µl oder 30 µl Probe

Marker und Std. je 7 µl)

### Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Expositur: 15 min. 30 min

Entwicklung: 60 sek. 15 sek.

Fixierung: 5 min. 5 min.

Abbau 3 Schlamm	Hirn- homog.	GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat					theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK		PMSF		SDB	Sample
		[µl]	AD-M+ HH [µl]	[µl]	[µl]	conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	HH on Blot [µg]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	konz [µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	conc [µl]	[µg/ml]	100mM [µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
		$\frac{G+H+M}{O}$	G+H		$\frac{H^*U}{100} / \frac{(H+G)}{100}$	$\frac{H^*U}{100} / \frac{(G+H)}{100}$	$\frac{H^*U}{100} / \frac{(H+G)}{100} * 0,8 * A$			$M^*10/E$			$O^*0,1$			$\frac{Q^*R}{100} / \frac{(Q+E)}{100} * 100$	$25+T+V$		$\frac{V^*1000^*}{6U}$		$\frac{X^*0,1/U^*}{1000}$				
29-31	Wasser (10µl)	301V	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	134,3	30	0,56	8	0,80	1400	96	73,1	80	113	8	42,5	8	7,1	30	10
Blind	Wasser (30µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	400,0	30	0,56	9	0,90	1400	96	73,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	30
32-34	sterilisiertes FS (10µl)	301V	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	134,3	30	0,56	8	0,80	1400	96	73,1	80	113	8	42,5	8	7,1	30	10
Blind	sterilisiertes FS (30µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	400,0	30	0,56	9	0,90	1400	96	73,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	30
35-37	thermophil (10 µl)	301V	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	134,3	30	0,56	8	0,80	1400	96	73,1	80	113	8	42,5	8	7,1	30	10
	thermophil (30 µl)	301V	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	400,0	30	0,56	9	0,90	1400	96	73,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	30
38-40	thermophil (10 µl)	22A/SV	538	500	476	24	10,0	0,48	4,80	134,3	30	0,56	8	0,80	1400	96	73,1	80	113	8	42,5	8	7,1	30	10
	thermophil (30 µl)	22A/SV	539	500	476	24	10,0	0,48	4,80	400,0	30	0,56	9	0,90	1400	96	73,1	80	114	9	47,3	9	7,9	30	30
		$\frac{G+H+M}{O}$	G+H		$\frac{H^*U/100}{(H+500)/100} / \frac{(H^*U/100)}{(G+H)/100}$	$\frac{H^*U/100}{(H+500)/100} / \frac{(H^*U/100)}{(G+H)/100}$	$\frac{H^*U/100}{(H+500)/100} / \frac{(H^*U/100)}{(G+H)/100} * \frac{AA}{(U+Z)/100}$										$H+T+V$		$\frac{V^*1000^*}{0,6U}$		$\frac{X^*0,1/U^*}{1000}$				
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4							100	220	20	54,5	20	9,1	60	20	
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7							100	220	20	54,5	20	9,1	60	10	
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	5	
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5	
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5							100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25	
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5							100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25	
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5	
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	5	
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7							100	220	20	54,5	20	9,1	60	10	
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4							100	220	20	54,5	20	9,1	60	20	

L<sup>(1)</sup>: \*0,8 Überstand abzügl. 100 µl Pellet

S<sup>(2)</sup>: Überstand abzügl. 100 µl Pellet

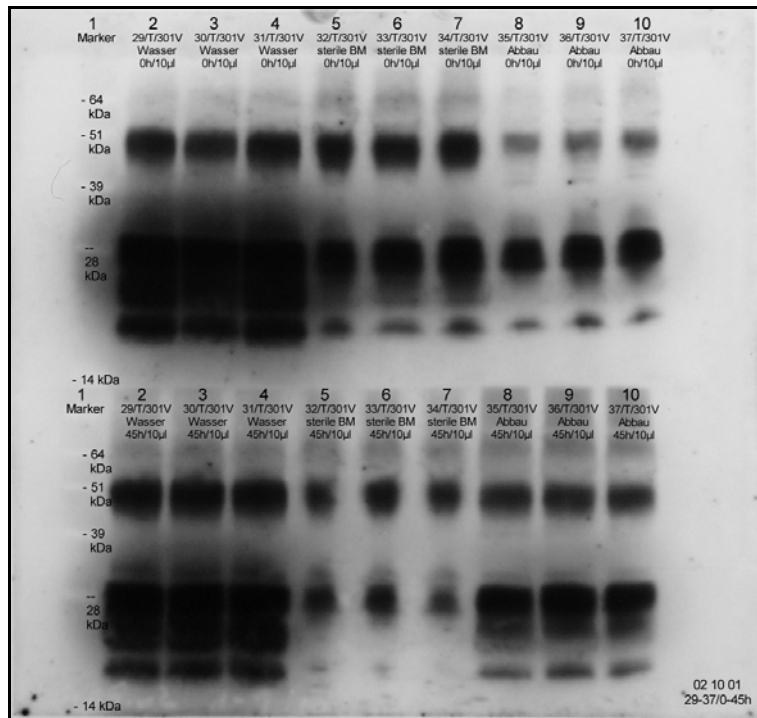


Abbildung 30: 02 10 01; 301V; 0 - 45h; Wasser, sterile BM, Abbau

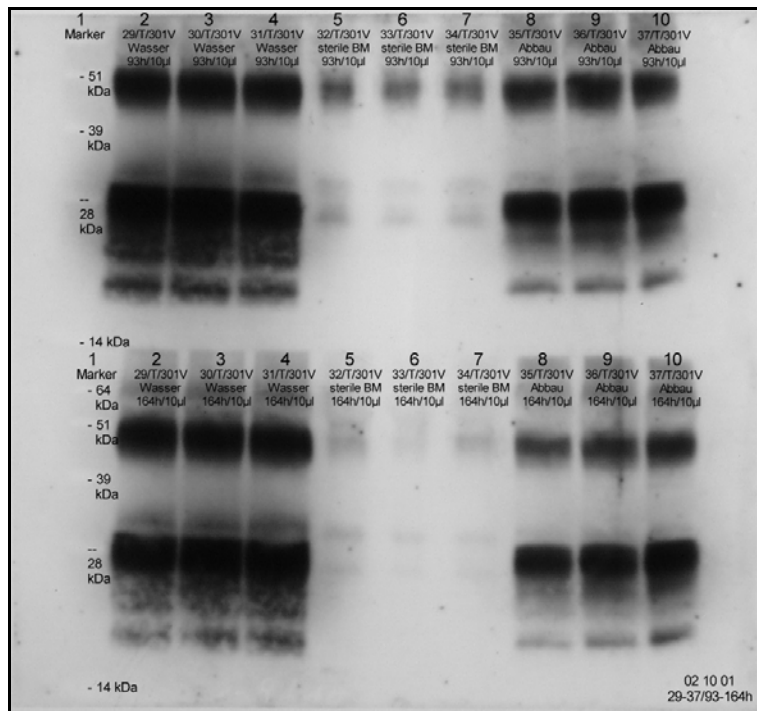


Abbildung 31: 02 10 01; 301V; 93 - 164h; Wasser, sterile BM, Abbau

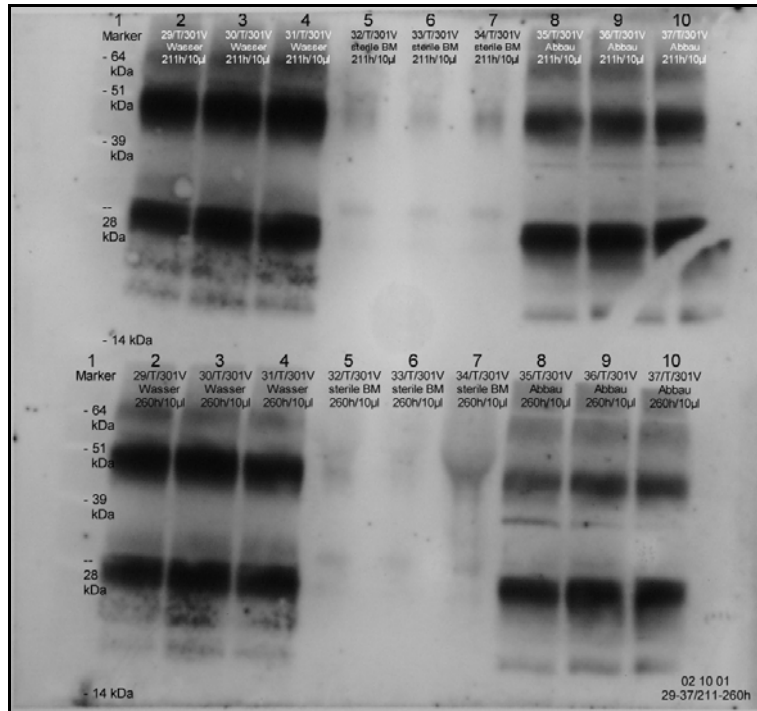


Abbildung 32: 02 10 01; 301V; 211 - 260h; Wasser, sterile BM, Abbau

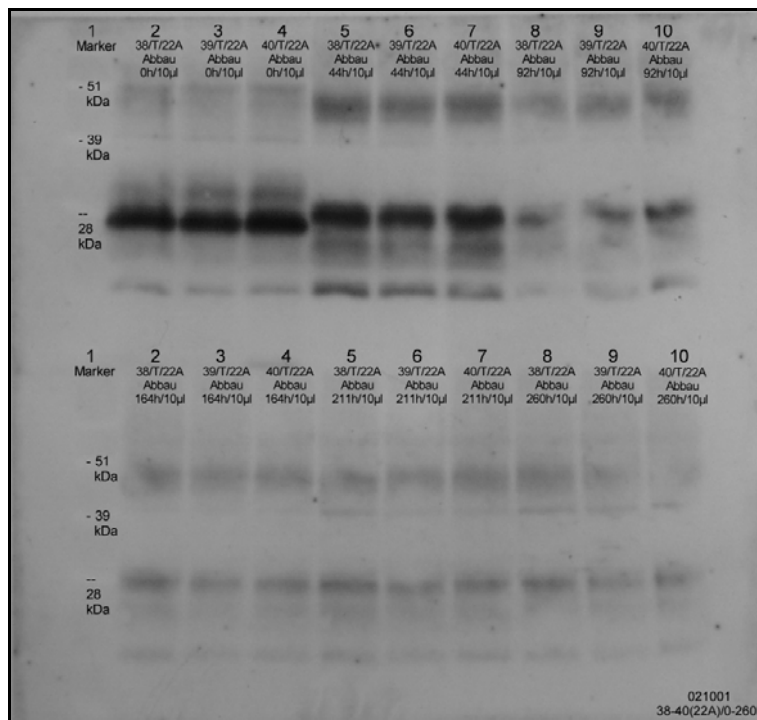


Abbildung 33: 02 10 01; 22A; 0-260h; thermophiler Abbau

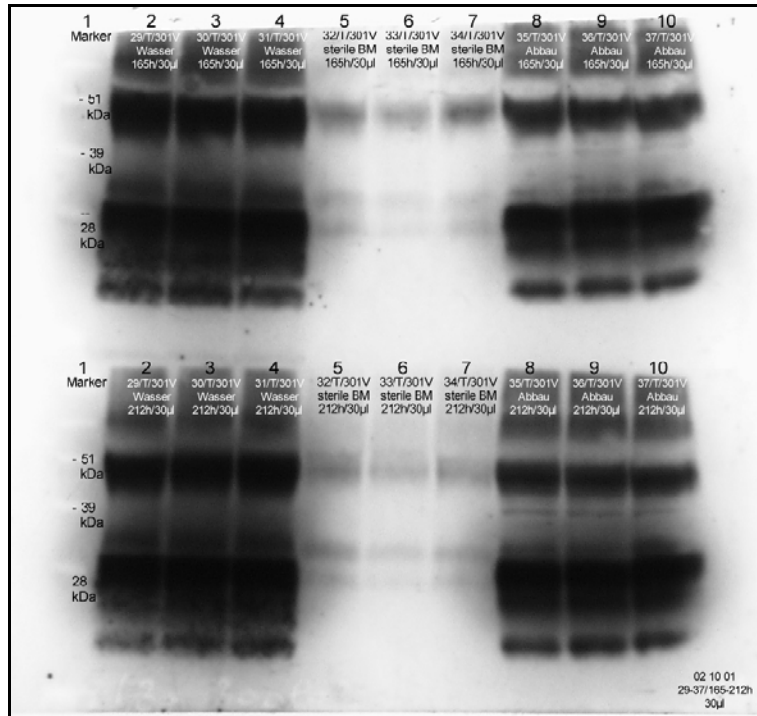


Abbildung 34: 02 10 01; 301V; 164-211h/30µl; thermophiler Abbau

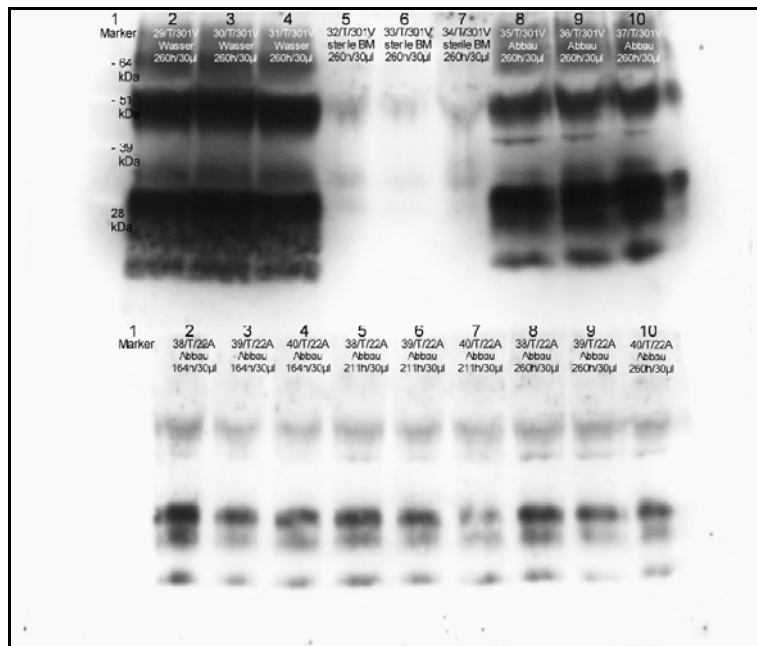


Abbildung 35: 02 10 01; 301V; 260h/30µl; thermophiler Abbau  
02 10 01; 22A; 164-260h/30µl; thermophiler Abbau



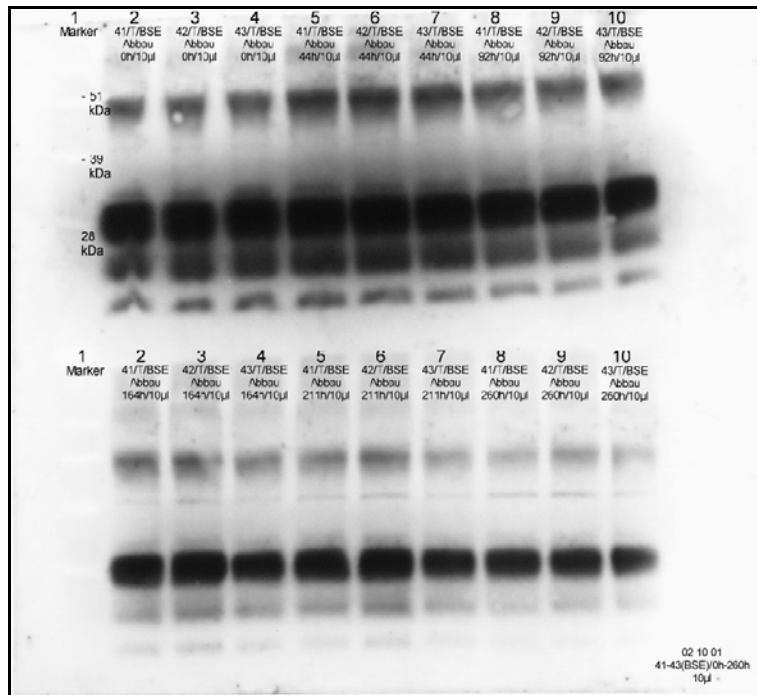


Abbildung 36: 02 10 01; BSE; 0-260h; thermophiler Abbau

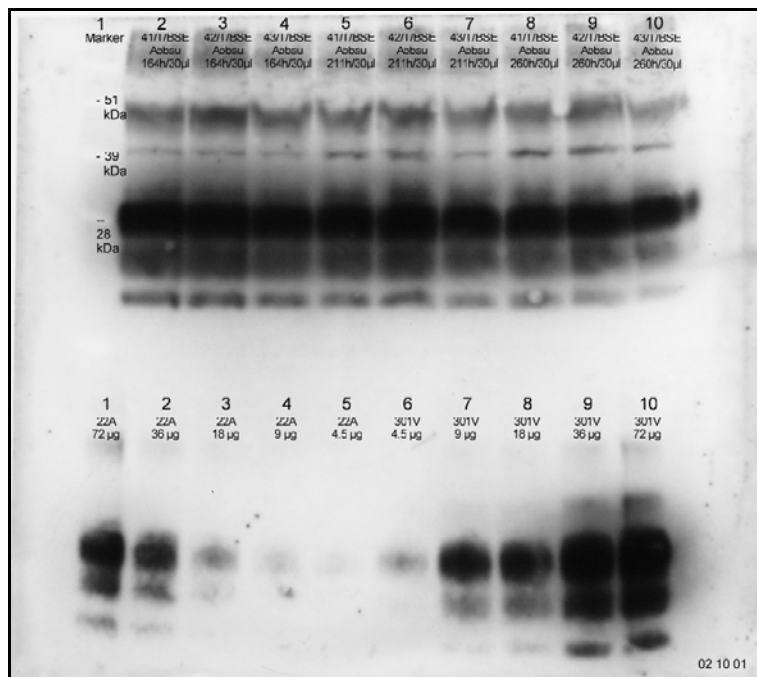


Abbildung 37: 02 10 01; 22A; 164-260h/30 µl; thermophiler Abbau

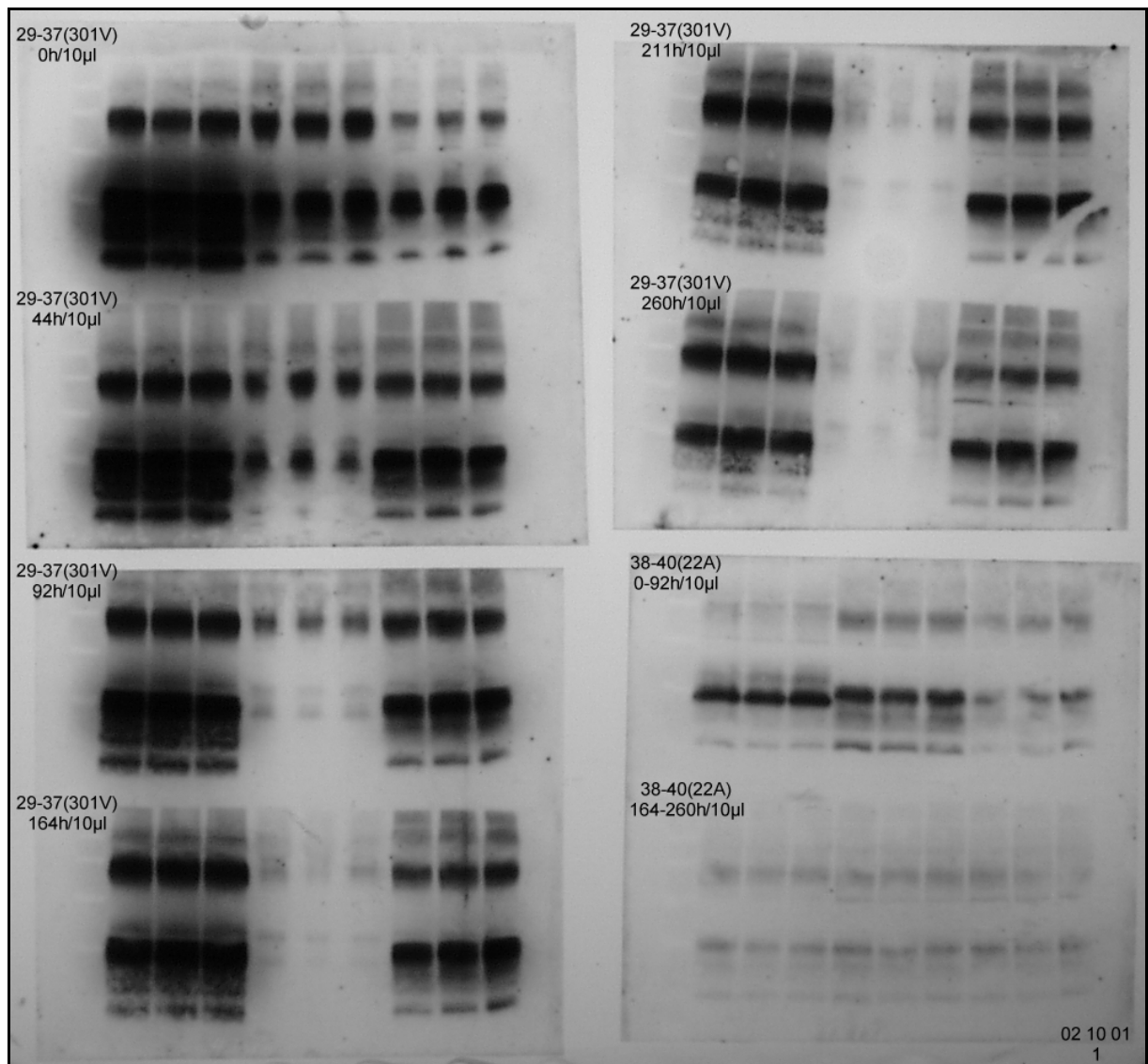


Abbildung 38: 02 10 01; Übersicht 1

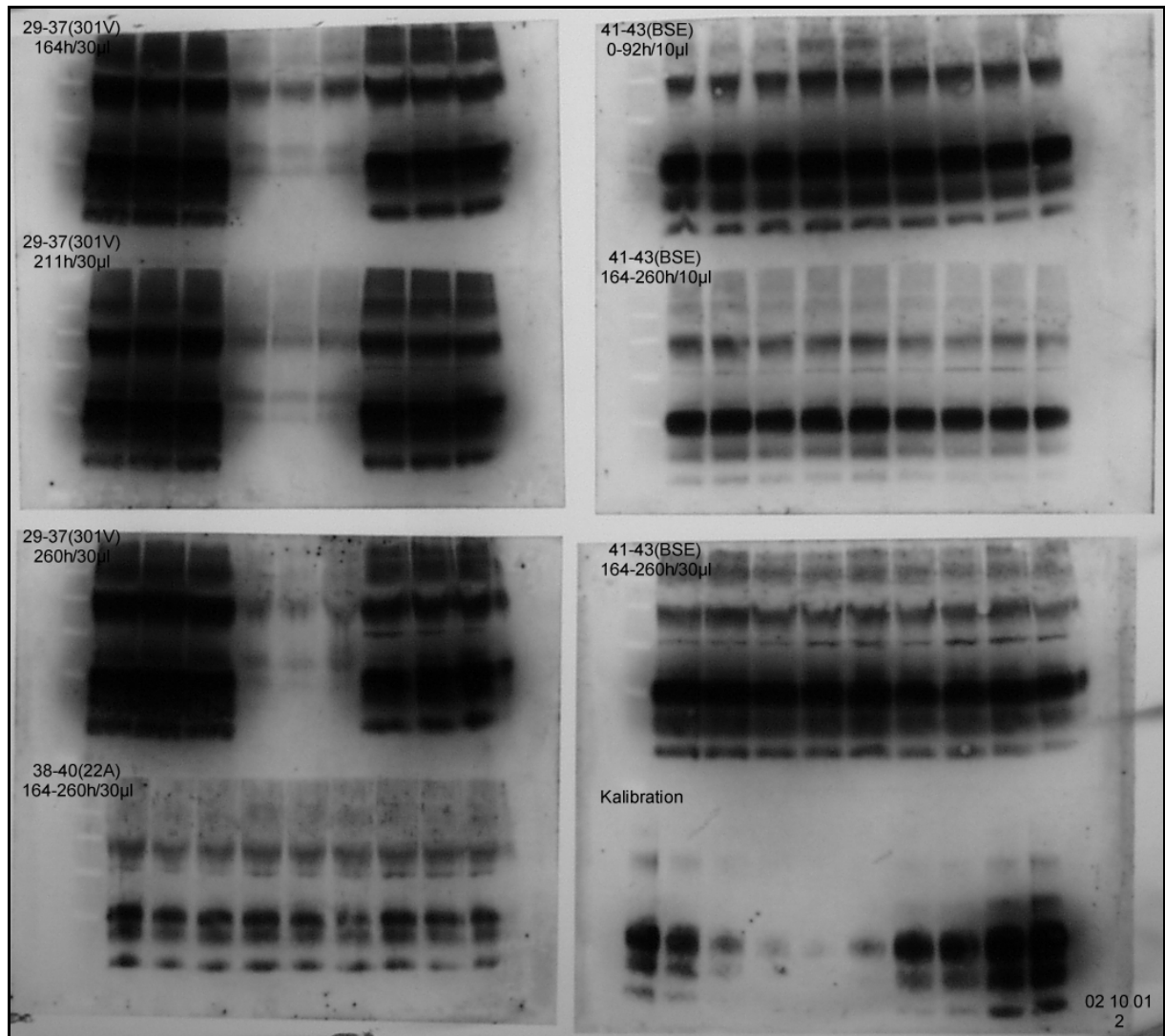


Abbildung 39: 02 10 01; Übersicht 2

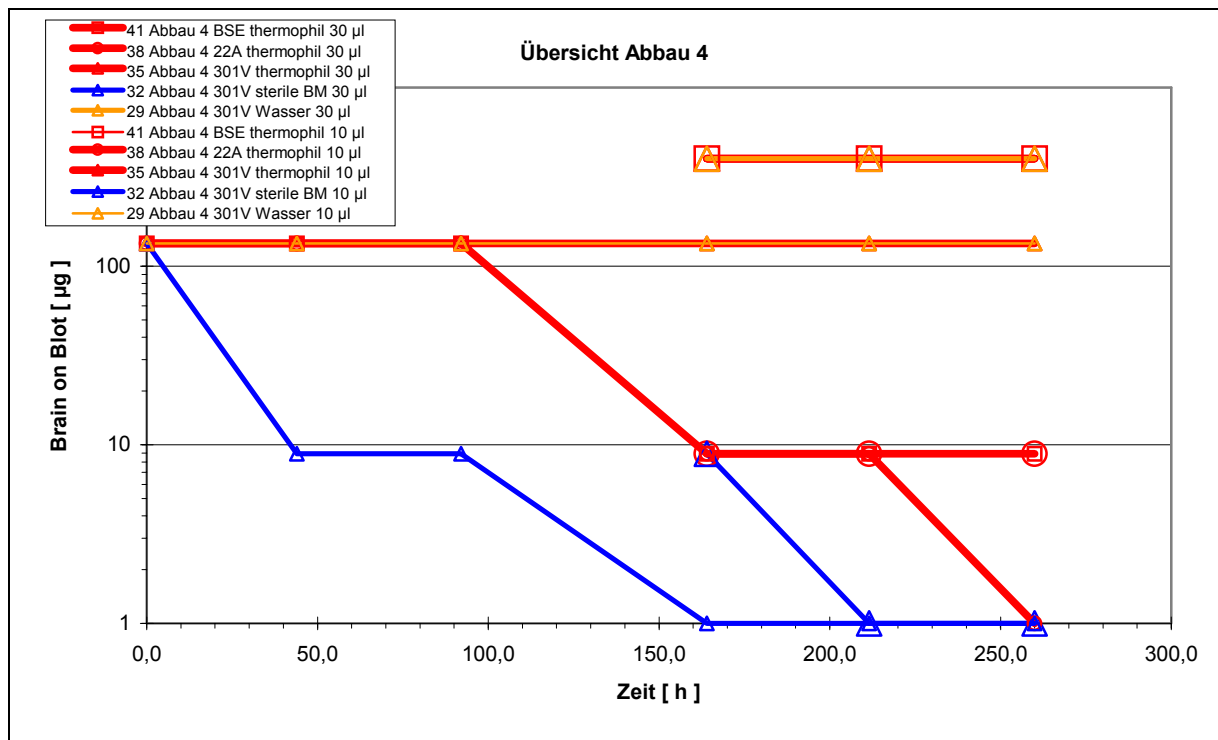


Abbildung 40: Grafische Darstellung des Abbauversuches 4

Proben mit eindeutigem PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.

**Versuche**

- *Abbauversuch 5 thermophil:*
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,48 % Hirn in Faulschlamm: 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>*
  - 301V/nm: in Maus passiertes bovines BSE      10,0% Hirn in Wasser*
  - BSE:      bovines BSE      10,0% Hirn in Wasser*
- *Blindwert (PrP<sup>SC</sup>: 301V/nm):*
  - Wasser (Temperatureffekt)*
  - Natriumazid inhibierter Faulschlamm*
  - dampfsterilisierter Faulschlamm (122°C/20min; Matrixeffekt)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *Inkubation 228 Stunden (9,5 Tage), 55°C, anaerob (Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung)*

**Conclusio:**

- *PrP<sup>SC</sup> aus 301V/VM Hirnhomogenat ergab nur eine Bande. Die Versuch waren daher nicht auswertbar.*
- *Abbauversuch von BSE ergab eine Reduktion zur Nachweisgrenze innerhalb von 228 Stunden. (Reduktionsfaktor max. 29,8)*

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

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

**ADM**

thermophil: 01.10.02

**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)

Tabelle 14: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbau 5

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
44-46	01.-11.10.02	228	thermophil 55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	5,0	250
47-49				AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	5,0	250
50-52				Azid	Blindwert	301V/VM	5,0	250
53-55				AD-M thermo	Abbau	301V/VM	15,0	750
56-58				AD-M thermo	Abbau	BSE	15,0	750

Tabelle 15: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbau 5

Probenauftragsvolumen:	10	30	20	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	8,90	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	4,80	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	134,3	400	264,8	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,3182	0,1068	0,16	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	15,086	44,944	29,76	

Tabelle 16: Abbaumatrix in Abbauversuch 5

Zeit			0,0		42,5		84,0		131,7			180,5			228,0				
Auftragsvolumen			10	20	10	20	10	20	10	30	20	10	30	20	10	30	20		
Reduktionsfaktor			15,1	29,8	15,1	29,8	15,1	29,8	15,1	44,9	29,8	15,1	44,9	29,8	15,1	44,9	29,8		
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	Probe																	
Wasser	301V	44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-	
		45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
		46	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
sterile BM	301V	47	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		48	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		49	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Azid	301V	50	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		51	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		52	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
thermo	301V	53	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		54	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		55	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
thermo	BSE	56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	
		57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
		58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>Sc</sup> Bande erkennbar

+ .....positiver PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis negativ

## Inkubation

Hirnhomogenat

Faulschlamm

unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Röhrchens

vortexen

Inkubation im Wasserbad:

thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

## Probenahmezeiten:

Datum	Differenz [h]
01.10.02 20:00	0,0
03.10.02 14:30	42,5
05.10.02 08:00	84,0
07.10.02 07:45	131,7
09.10.02 08:30	180,5
11.10.02 08:00	228,0

## Probenahme:

vortexen

Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Gefäßes

## Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

500 µl Probe

+ 30 µl 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

gesamter Überstand hinübergeleert

+ 10 µl BSA (10 %)

vortexen

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

80 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 / 10 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot

10 µl oder 30 µl Probe

Marker und Std. je 7 µl)

## Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Expositur: 15 min. 30 min

Entwicklung: 60 sek. 15 sek.

Fixierung: 5 min. 5 min.

Abbau 3 Schlamm	Hirn- homog.	GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat					theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK		PMSF		SDB	Sample
		[µl]	AD-M+ HH [µl]	[µl]	[µl]	conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [µg/ml]	HH on Blot [µg]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	konz [µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	conc [µg/ml]	100mM [µl]	µmol/ml	[µl]	[µl]	[µl]	on Blot [µl]
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
		$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H^* \cdot I}{100 \cdot ((H+G) / 100)}$	$\frac{H^* \cdot I}{100 \cdot ((G+H) / 100)}$	$\frac{((H^* \cdot I / 100) \cdot 0,8) \cdot A}{A \cdot (U+Z) \cdot 1000}$		$\frac{M \cdot 10}{E}$		$\frac{O \cdot 0,1}{P}$			$\frac{Q \cdot R}{100 \cdot (Q+E) \cdot 100}$			$25+T+V$		$\frac{V \cdot 1000 \cdot 0,6}{U}$		$\frac{X \cdot 0,1 \cdot U \cdot 1000}{1000}$				
44-46	Wasser (10µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	132,4	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	10
Blind	Wasser (30µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	397,2	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	30
	Wasser (20µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20
47-49	sterilisiertes FS (10µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	132,4	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	10
Blind	sterilisiertes FS (30µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	397,2	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	30
	sterilisiertes FS (20µl)	301V	540	500	476	24	11,0	0,53	5,28	289,3	30	0,56	10	1,00	1400	97	73,8	80	115	10	52,1	10	8,7	31	20
50-52	Azid (10 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	132,4	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	10
Blind	Azid (30 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	397,2	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	30
	Azid (30 µl)	301V	540	500	476	24	11,0	0,53	5,28	289,3	30	0,56	10	1,00	1400	97	73,8	80	115	10	52,1	10	8,7	31	20
53-55	thermophil (10 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	132,4	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	10
	thermophil (30 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	397,2	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	30
	thermophil (30 µl)	301V	540	500	476	24	11,0	0,53	5,28	289,3	30	0,56	10	1,00	1400	97	73,8	80	115	10	52,1	10	8,7	31	20
		$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H^* \cdot I / 100}{(H+500) \cdot 1000}$	$\frac{H^* \cdot I / 100}{((G+H) / 100) \cdot 1000}$	$\frac{((H^* \cdot I / 100) \cdot AA)}{AA \cdot (U+Z) \cdot 1000 \cdot 10}$											$H+T+V$		$\frac{V \cdot 1000 \cdot 0,6}{U}$		$\frac{X \cdot 0,1 \cdot U \cdot 1000}{1000}$			
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4								100	220	20	54,5	20	9,1	60	20
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7	L <sup>(1)</sup> : *0,8 Überstand abzügl. 100 µl Pellet S <sup>(2)</sup> : Überstand abzügl. 100 µl Pellet						100	220	20	54,5	20	9,1	60	10	
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	5	
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5	
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5							100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25	
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5														100	220
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9								100	220	20	54,5	20	9,1	60	5
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7								100	220	20	54,5	20	9,1	60	10
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4								100	220	20	54,5	20	9,1	60	20



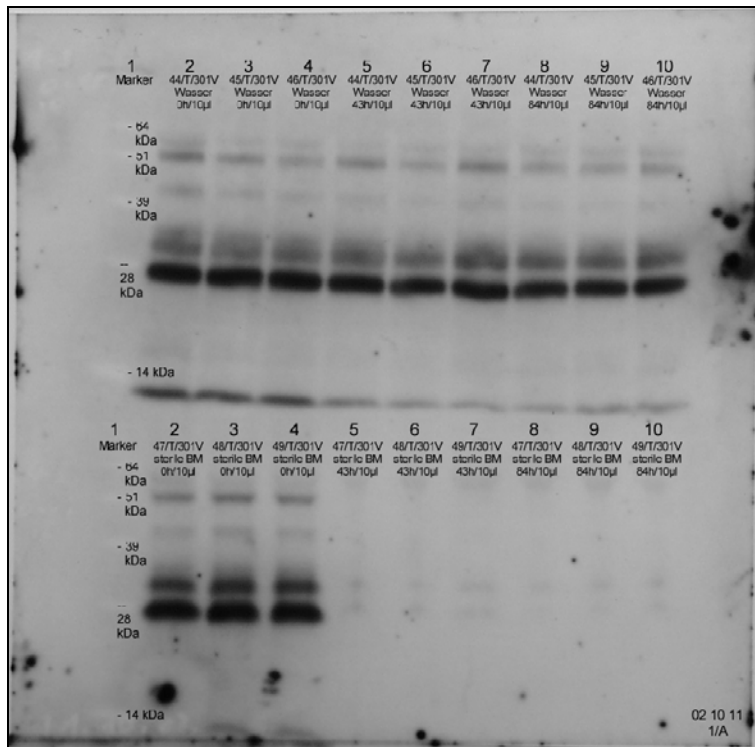


Abbildung 41: 02 10 11: Blindwert Wasser; 10µl; 301V/VM; 0-84h  
 02 10 11: Blindwert sterile Biomasse; 10µl; 301V/VM; 0-84h

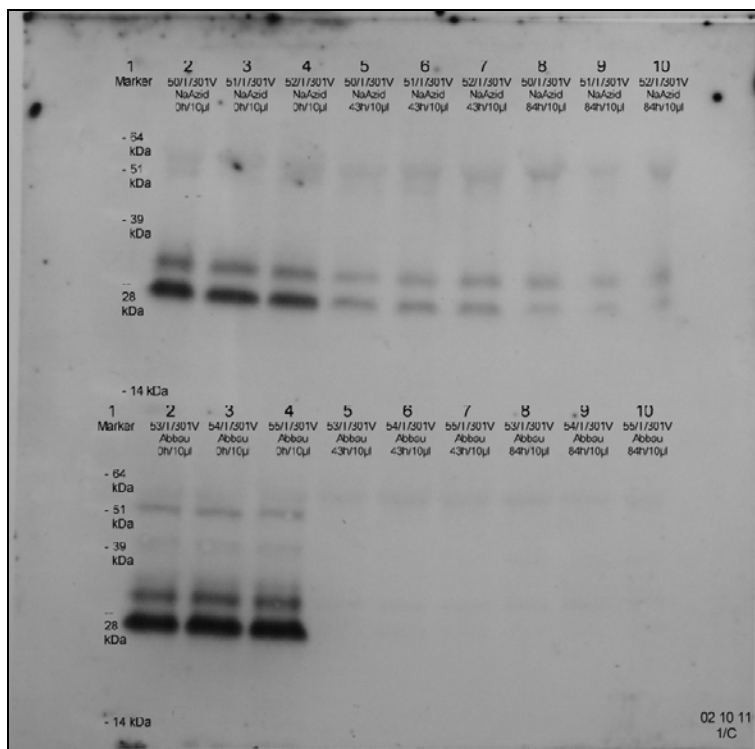


Abbildung 42: 02 10 11: Blindwert Azid inhibierte Biomasse; 10µl; 301V/VM; 0-84h  
 02 10 11: Abbau; 301V/VM; 10µl; 0-84h

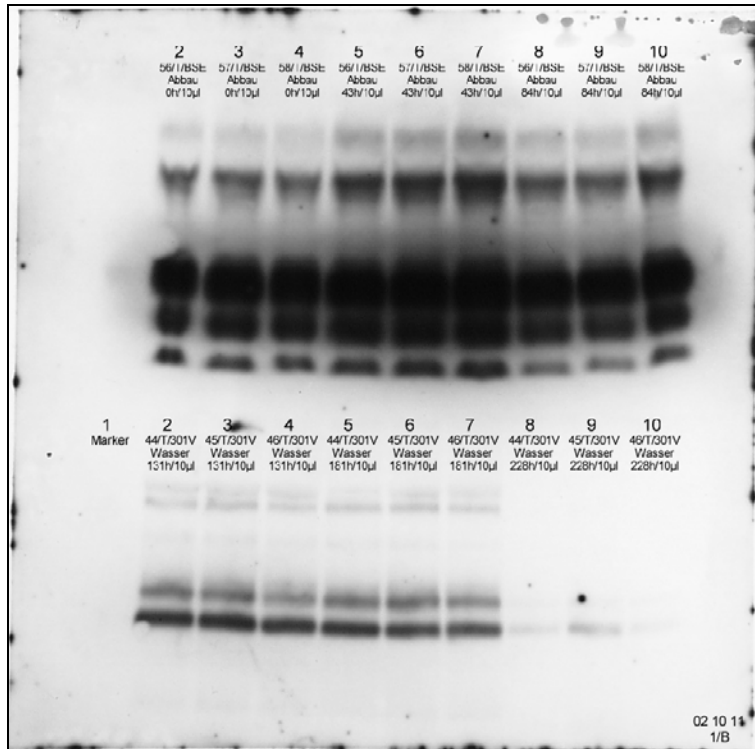


Abbildung 43 02 10 11: Abbau; BSE; 10µl; 0-84h  
 02 10 11: Blindwert Wasser; 301V/VM; 10µl; 131-228h

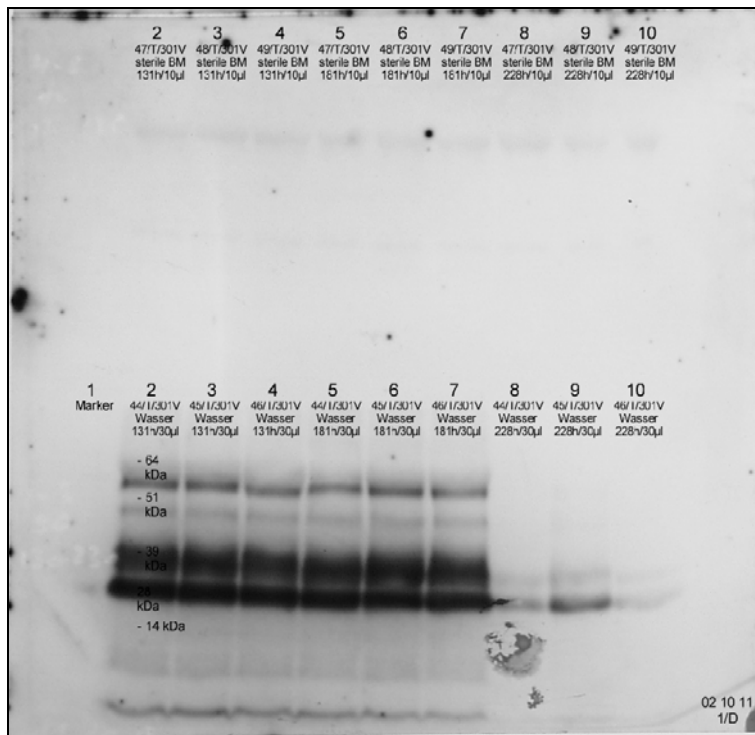


Abbildung 44: 02 10 11: Blindwert sterile Biomasse; 10µl; 301V/VM; 131-228h  
 02 10 11: Blindwert Wasser; 30µl; 301V/VM; 0-84h

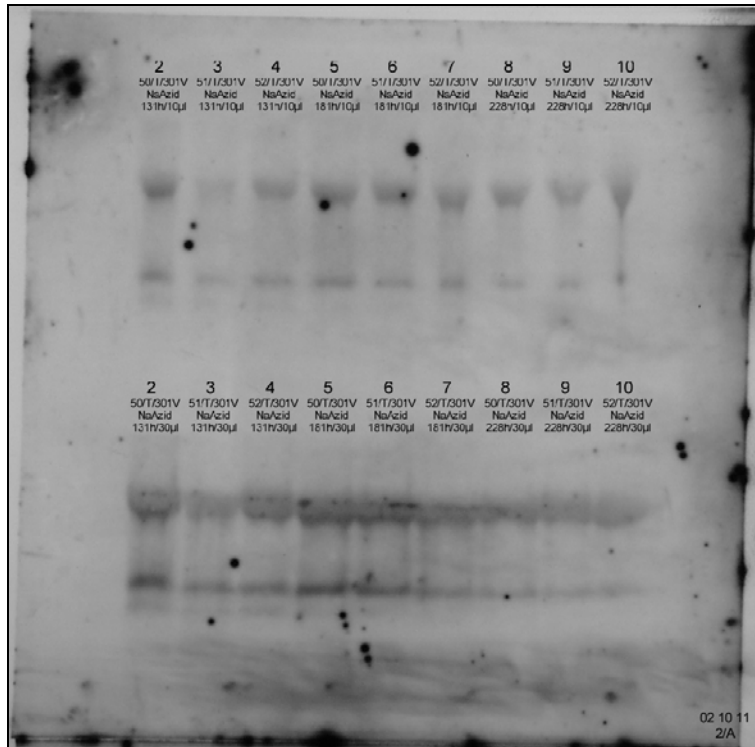


Abbildung 45: 02 10 11: Blindwert Natriumazid; 10µl; 301V/VM; 131-228h  
 02 10 11: Blindwert Natriumazid; 30µl; 301V/VM; 131-228h

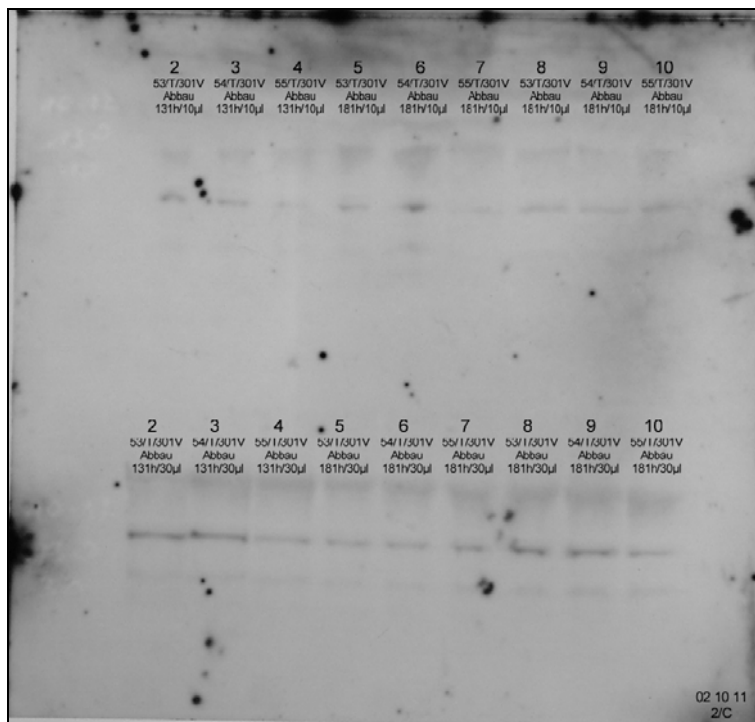


Abbildung 46: 02 10 11: Abbau; 10µl; 301V/VM; 131-228h  
 02 10 11: Abbau; 30µl; 301V/VM; 131-228h

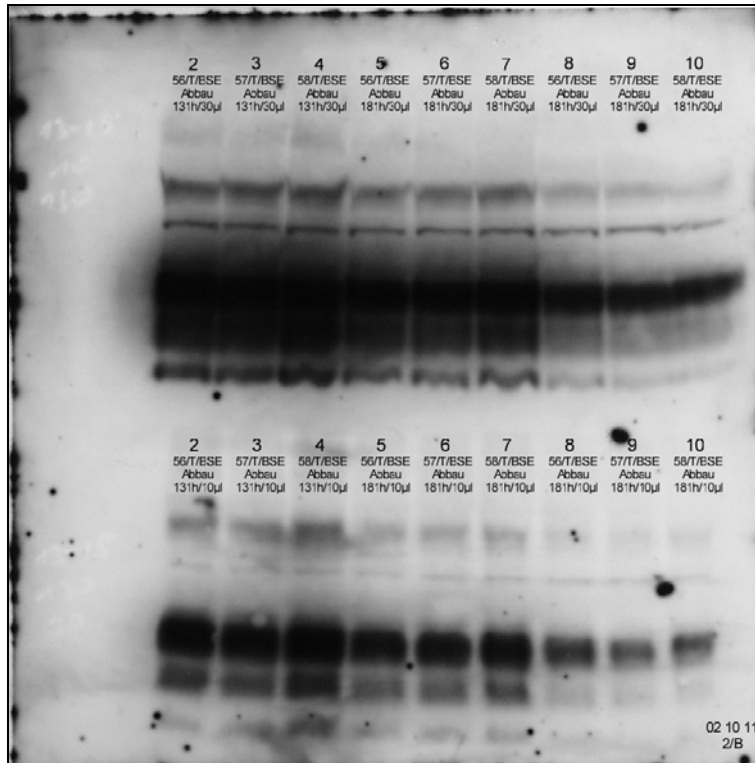


Abbildung 47: 02 10 11: Abbau; 30µl; 301V/VM; 131-228h  
 02 10 11: Abbau; 10µl; 301V/VM; 131-228h

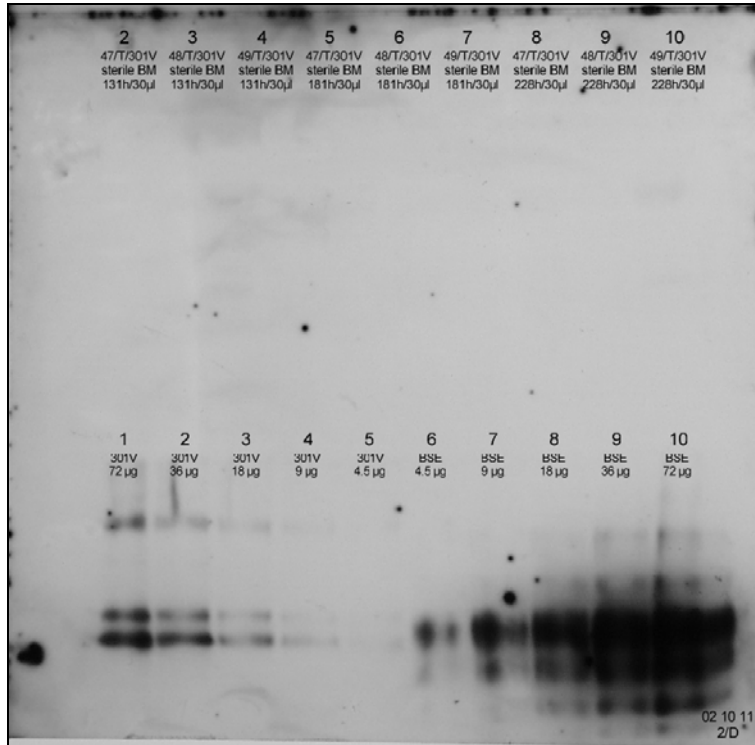


Abbildung 48: 02 10 11: Blindwert sterile Biomasse; 30µl; 301V/VM; 131-228h  
 02 10 11: Kalibration; 301V/VM und BSE

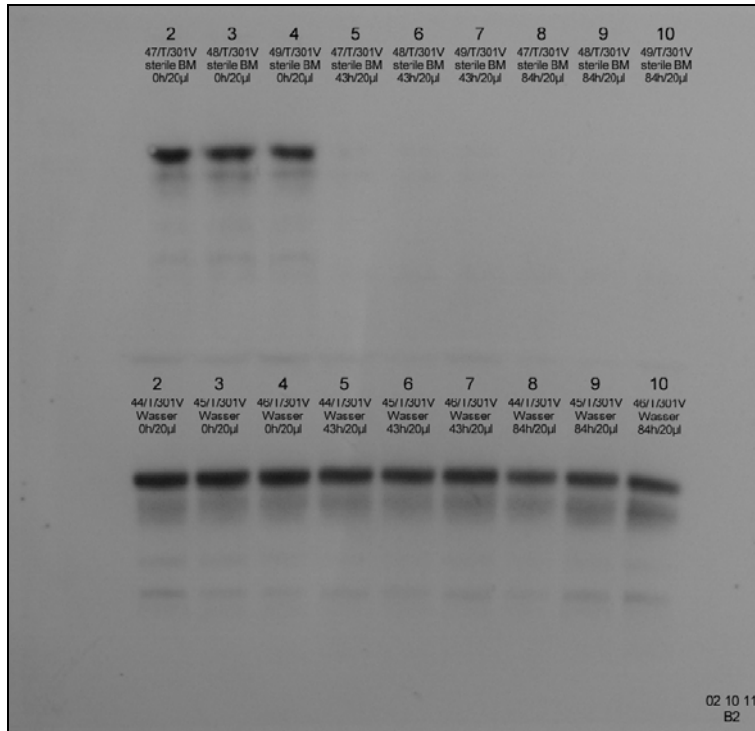


Abbildung 49: 02 10 11: Blindwert sterile Biomasse; 20µl; 301V/VM; 0-84h  
02 10 11: Blindwert Wasser; 20µl; 301V/VM; 0-84h

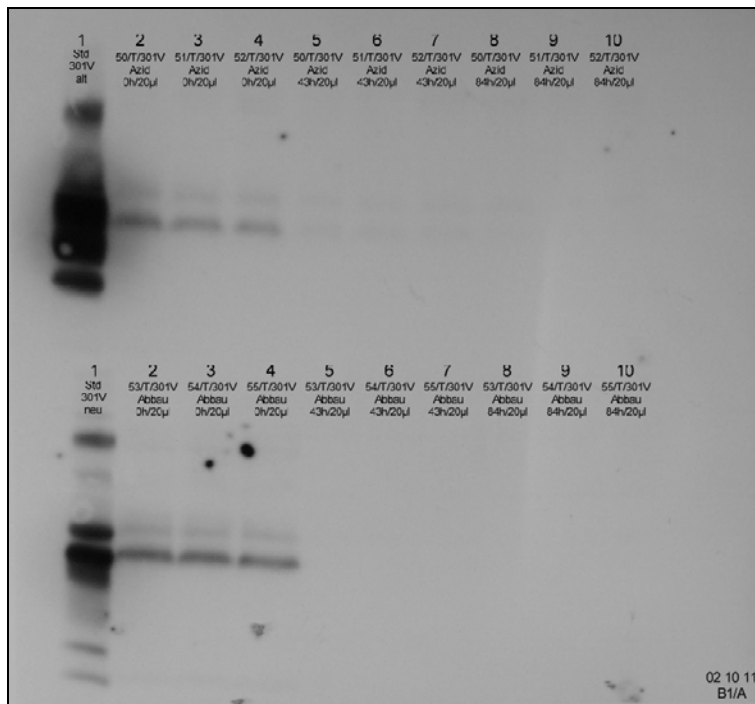


Abbildung 50: 02 10 11: Blindwert Azid; 20µl; 301V/VM; 0-84h  
02 10 11: Abbau; 20µl; 301V/VM; 0-84h

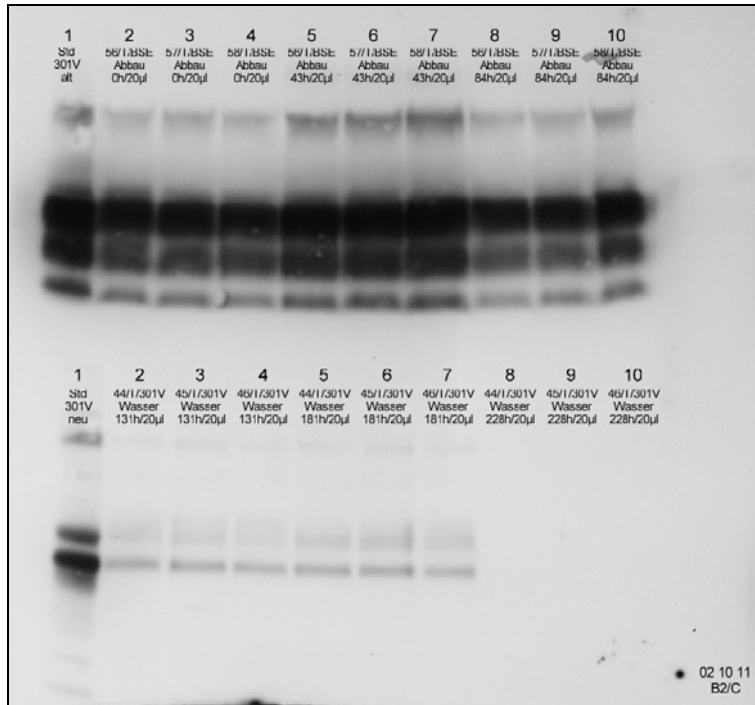


Abbildung 51: 02 10 11: Abbau; 20 $\mu$ l; BSE; 0-84h  
02 10 11: Blindwert Wasser; 20 $\mu$ l; 301V/VM; 131-228h

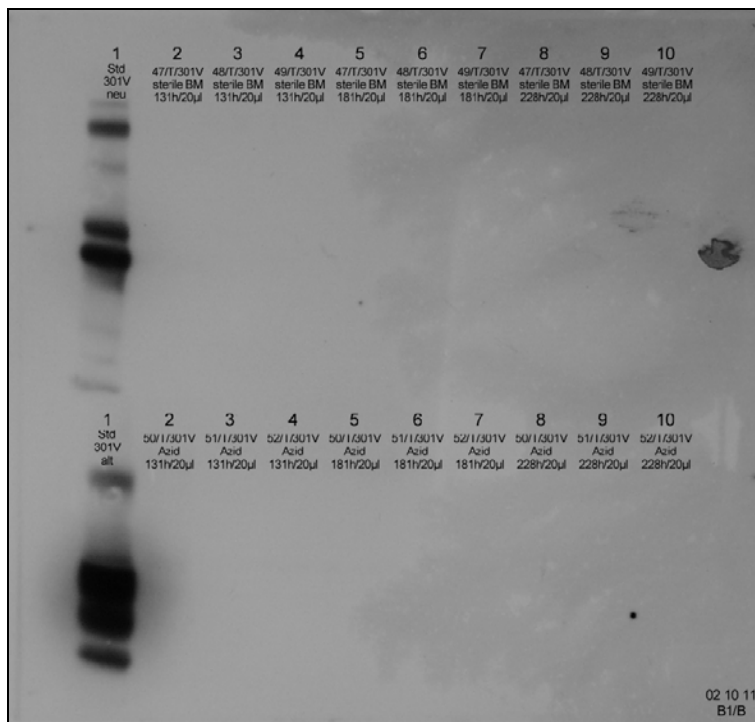


Abbildung 52: 02 10 11: Blindwert sterile Biomasse; 20 $\mu$ l; 301V/VM; 131-228h  
02 10 11: Blindwert Azid; 20 $\mu$ l; 301V/VM; 131-228h

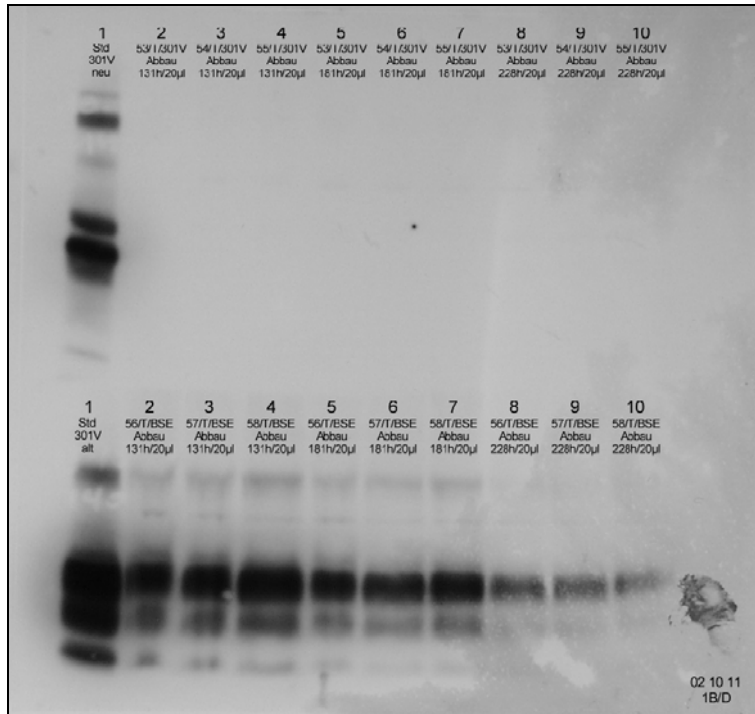


Abbildung 53: 02 10 11: Abbau; 20µl; 301V/VM; 131-228h  
02 10 11: Abbau; 20µl; BSE; 131-228h

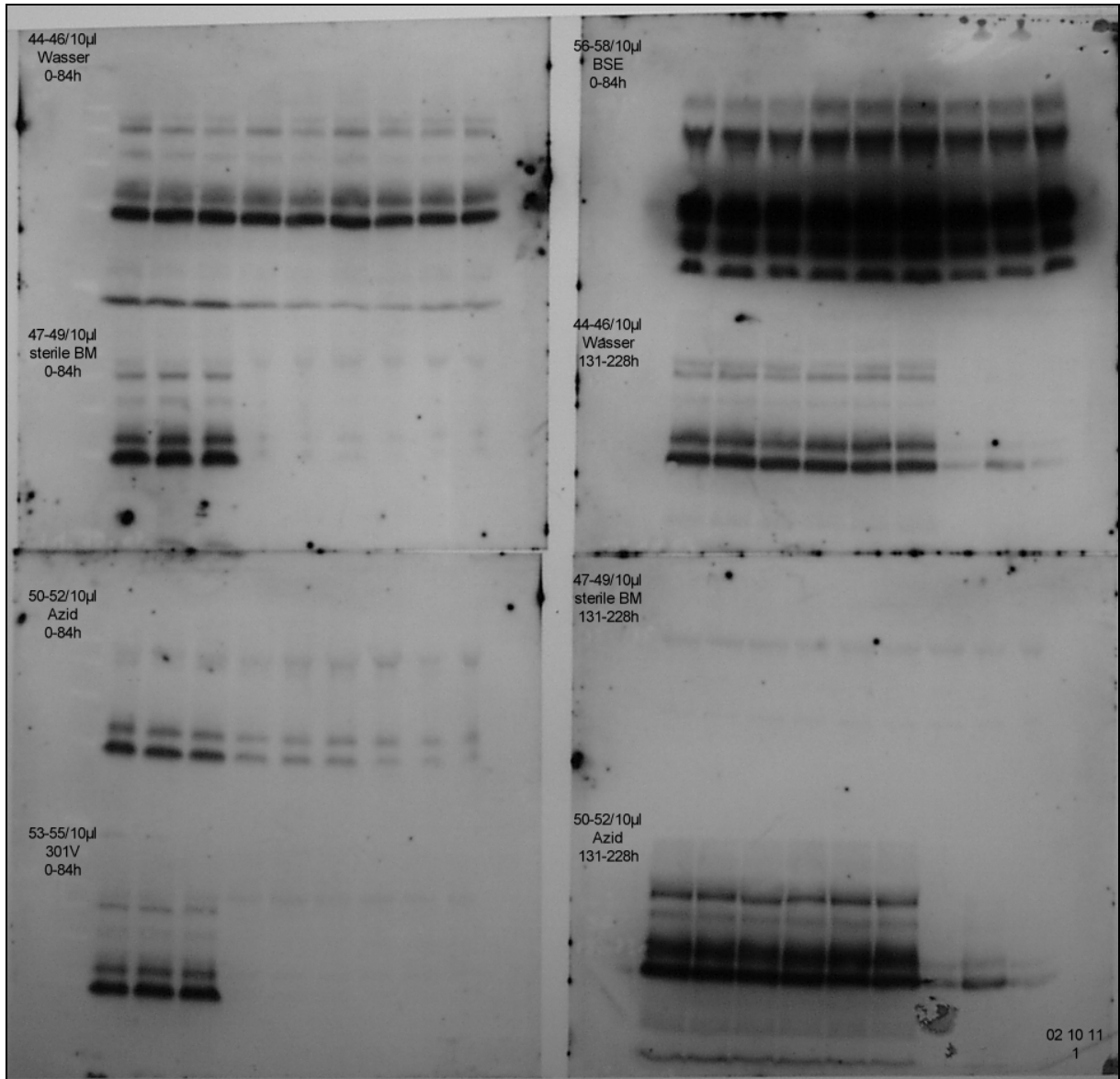


Abbildung 54: 02 10 11: Übersicht 1



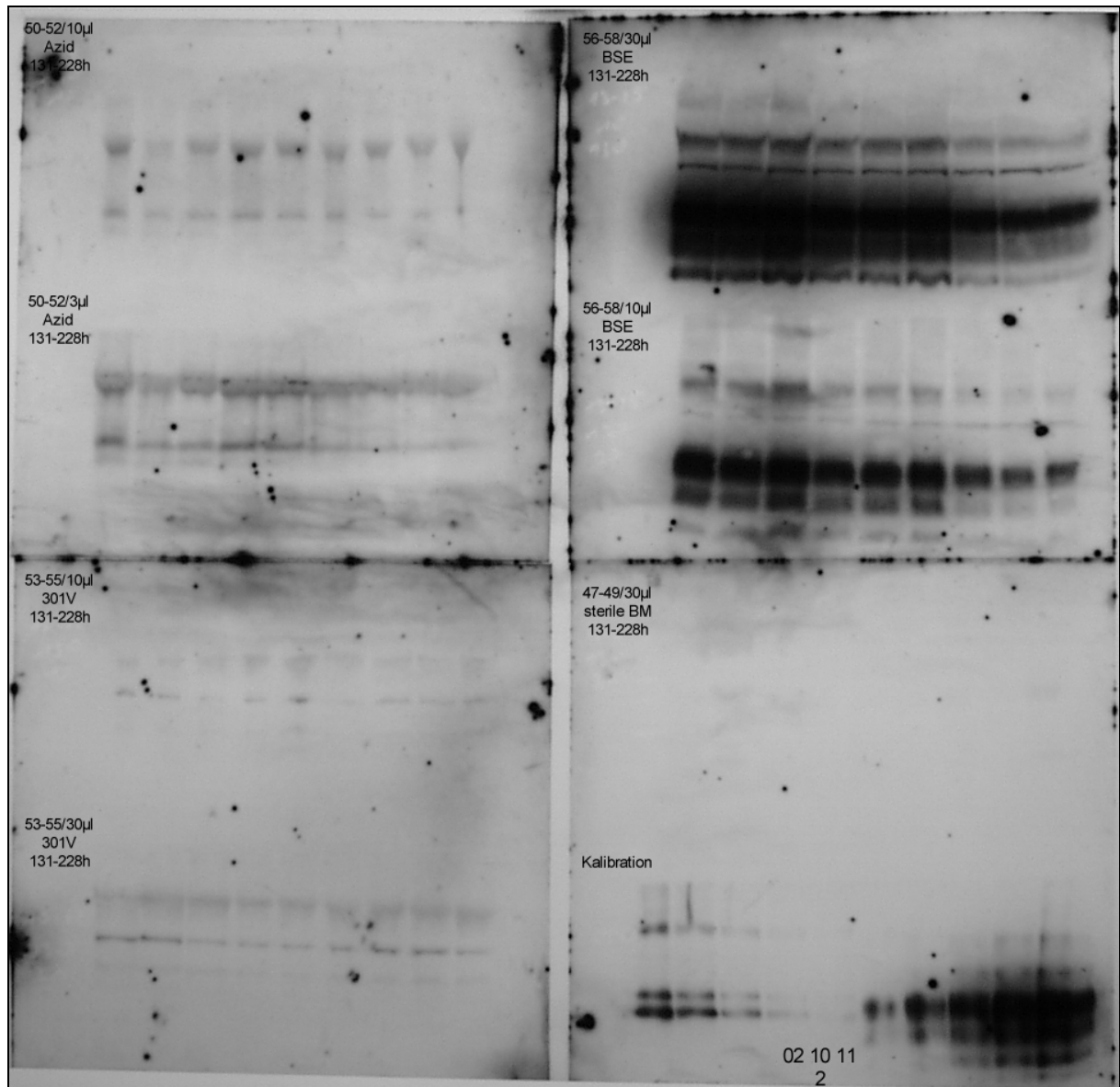


Abbildung 55: 02 10 11: Übersicht 2

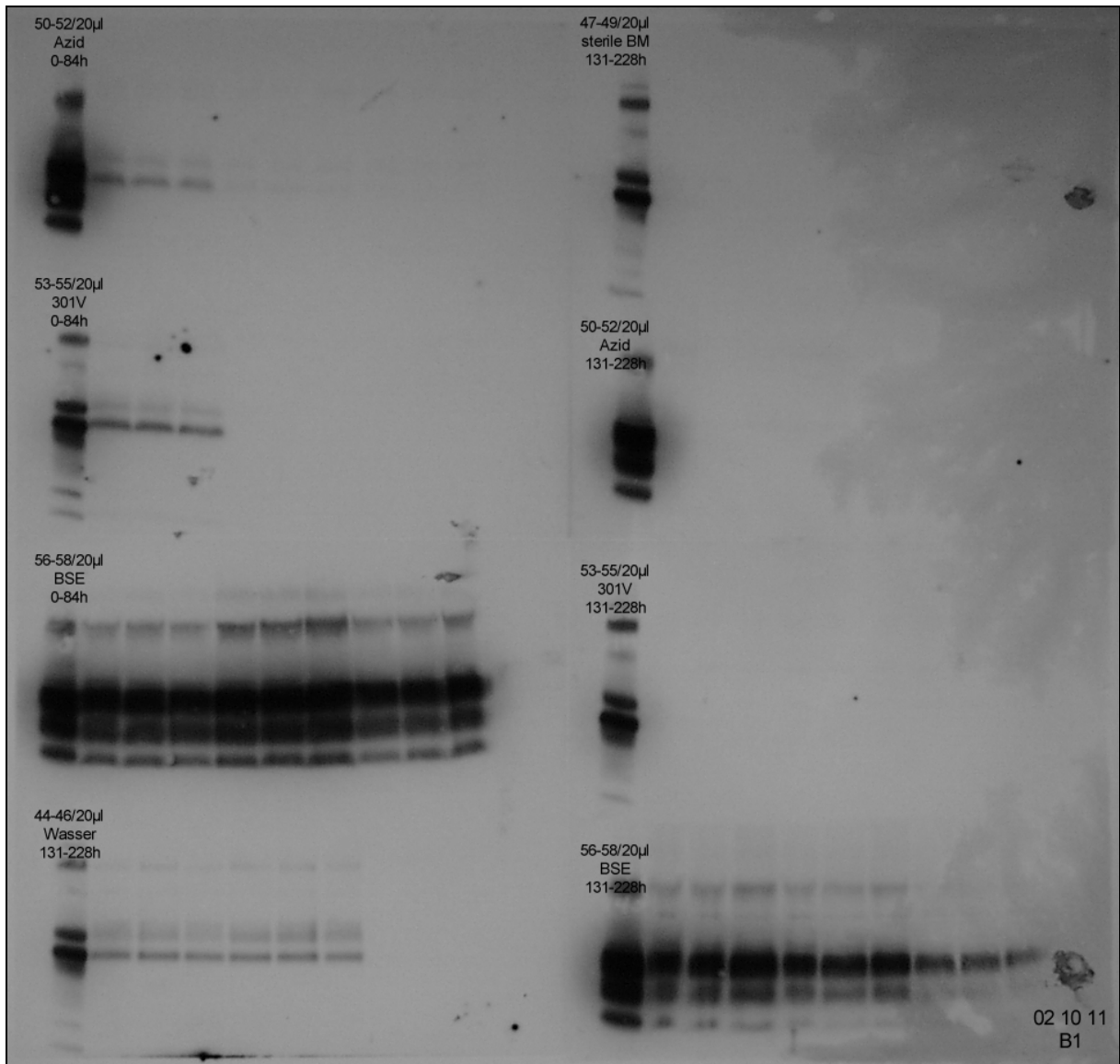


Abbildung 56: 02 10 11: Übersicht 3

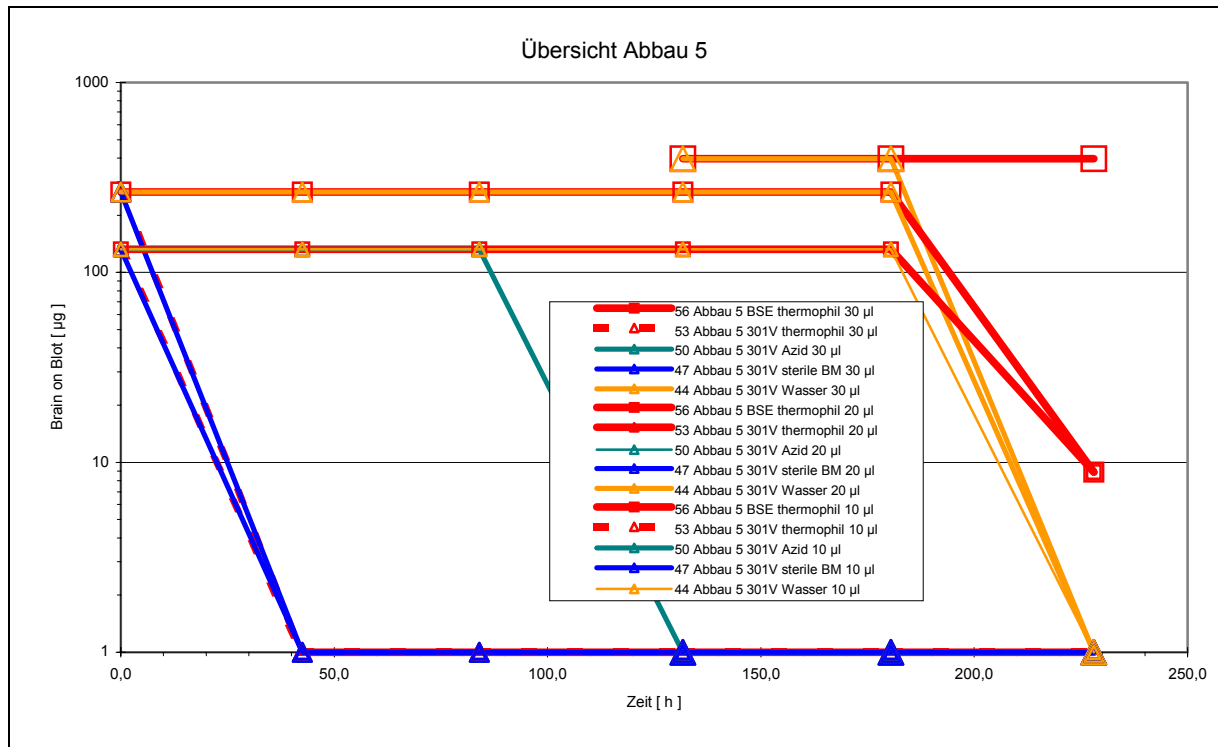


Abbildung 57: Grafische Darstellung des Abbauersuches 5

*Proben mit eindeutigem PrP<sup>SC</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.*

**Versuche**

- *Abbauversuch 6 thermophil:*
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,48 % Hirn in Faulschlamm: 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>*
  - 301V/nm: in Maus passiertes bovines BSE      10,0% Hirn in Wasser*
  - Blindwert (PrP<sup>SC</sup>: 301V/nm):*
    - ~ Wasser (Temperatureffekt)*
    - ~ Natriumazid inhibierter Faulschlamm*
    - ~ dampfsterilisierter Faulschlamm (122°C/20min; Matrixeffekt)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *Inkubation 302 Stunden (12,5 Tage), 55°C, anaerob (Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung)*

**Conclusio:**

- *Sowohl in Wasser als auch im Abbauversuch reduziert sich die PrP<sup>SC</sup>-Konzentration innerhalb von 302 Stunden parallel an die Detektionsgrenze (Reduktionsfaktor 29,8).*
- *In Na-Azid inhibierter Biomasse ist PrP<sup>SC</sup> nach 89 Stunden an der Detektionsgrenze.*
- *In sterilisierter Biomasse ist PrP<sup>SC</sup> bei 89 Stunden Inkubationsdauer nicht mehr nachweisbar.*

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

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

**ADM**

thermophil: 15.10.02  
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)

Tabelle 17: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 6

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
59-61	15.-28.10.02	302	thermophil 55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	5,0	250
62-64				Azid	Blindwert	301V/VM	5,0	250
65-67				AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	5,0	250
68-70				AD-M thermo	Abbau	301V/VM	15,0	750

Tabelle 18: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 6

Probenauftragsvolumen:	20	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	264,8	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,16	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	29,76	

Tabelle 19: Abbaumatrix des Abbauersuches 6

Zeit			0,0	41,5	89,0	157,5	229,0	302,0
Auftragsvolumen			20	20	20	20	20	20
Reduktionsfaktor			29,8	29,8	29,8	29,8	29,8	29,8
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	Probe						
Wasser	301V	59	+	+	+	+	+	+/-
		60	+	+	+	+	+	+/-
		61	+	+	+	+	+	+/-
Azid	301V	62	+	+	+/-	-	-	-
		63	+	+	-	-	-	-
		64	+	+	+/-	-	-	-
sterile BM	301V	65	+	+/-	-	-	-	-
		66	+	+/-	-	-	-	-
		67	+	+/-	-	-	-	-
thermo	301V	68	+	+	+	+	+	+/-
		69	+	+	+	+	+	+/-
		70	+	+	+	+	+	+/-

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>Sc</sup> Bande erkennbar

+/- .....Detektionsgrenze

+ .....positiver PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis negativ

## Inkubation

Hirnhomogenat

Faulschlamm

unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Röhrchens

vortexen

Inkubation im Wasserbad:

thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

## Probenahmezeiten:

Datum	Differenz [h]
15.10.02 18:30	0,0
17.10.02 12:00	41,5
19.10.02 11:30	89,0
22.10.02 08:00	157,5
25.10.02 07:30	229,0
28.10.02 08:30	302,0

## Probenahme:

vortexen

Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Gefäßes

## Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

500 µl Probe

+ 30 µl 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

gesamter Überstand hinübergeleert

+ 10 µl BSA (10 %)

vortexen

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

80 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 / 10 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot

20 µl Probe

Marker und Std. je 7 µl)

## Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Expositur: 20 min. 60 min

Entwicklung: 60 sek. 15 sek.

Fixierung: 5 min. 5 min.

Abbau 3		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%		EtOH	Re-	Ges.	PK	PK	PMSF	PMSF	SDB	Sample			
		[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µg]	[µl]	[%]	[µl]	[mg]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/ml]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]		
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
		$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H^*I}{100} / \frac{(H+G)}{100}$	$\frac{H^*I}{100} / \frac{(G+H)}{100}$	$\frac{H^*I}{100} / \frac{(G+H)}{100} / \frac{A}{(U+Z)}$	$\frac{H^*I}{100} / \frac{(G+H)}{100} / \frac{A}{(U+Z)}$	$\frac{H^*I}{100} / \frac{(G+H)}{100} / \frac{A}{(U+Z)}$	$\frac{M^*10}{E}$		$\frac{O}{0,1}$		$\frac{Q^*R}{100} / \frac{(Q+E)}{100}$			$\frac{H+T+V}{100}$		$\frac{V^*1000}{0,6U}$		$\frac{X^*0,1/U^*1}{1000}$				
59-61	Wasser (20µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20
62-64	Azid (20 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	97	73,8	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20
65-67	sterilisierter FS (20µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20
68-70	thermophil (20 µl)	301V	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4							100	220	20	54,5	20	9,1	60	20	
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7	L <sup>(1)</sup> : *0,8 Überstand abzügl. 100 µl Pellet S <sup>(2)</sup> : Überstand abzügl. 100 µl Pellet					100	220	20	54,5	20	9,1	60	10		
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9						100	220	20	54,5	20	9,1	60	5		
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9						100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5		
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5						100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25		
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5						100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25		
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9	100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5							
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9	100	220	20	54,5	20	9,1	60	5							
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7	100	220	20	54,5	20	9,1	60	10							
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4	100	220	20	54,5	20	9,1	60	20							

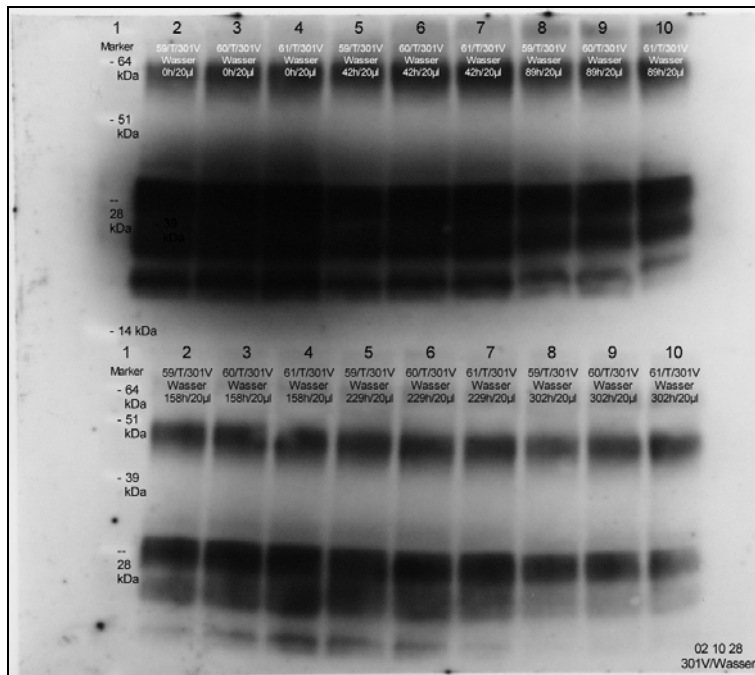


Abbildung 58: 02 10 28: Blindwert Wasser; 301V; 20µl; 0-302h

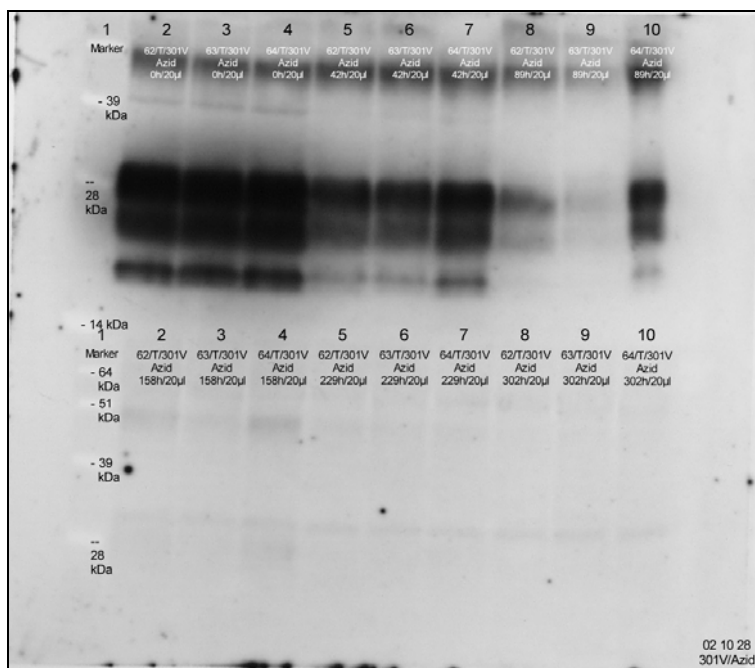


Abbildung 59: 02 10 28: Blindwert Azid inhibiert; 301V; 20µl; 0-302h



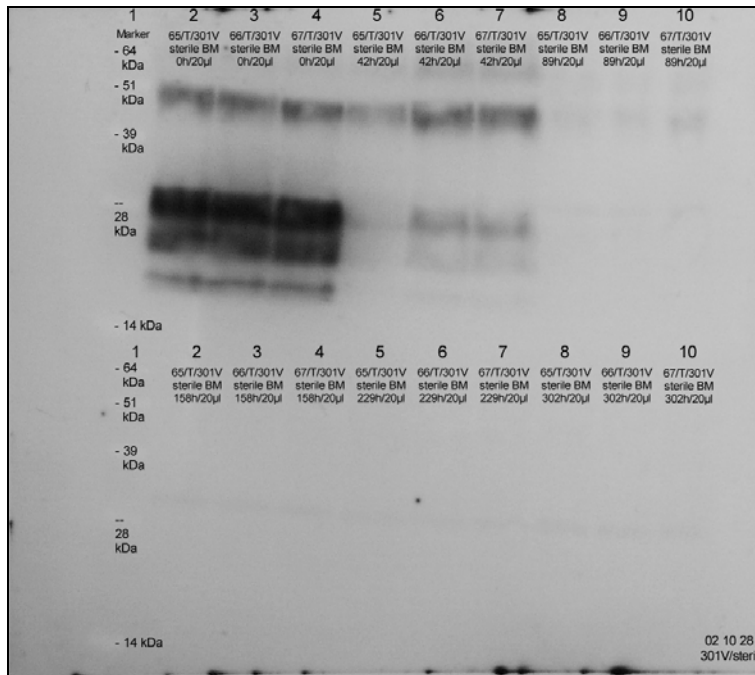


Abbildung 60: 02 10 28: Blindwert sterile Biomasse; 301V; 20µl; 0-302h

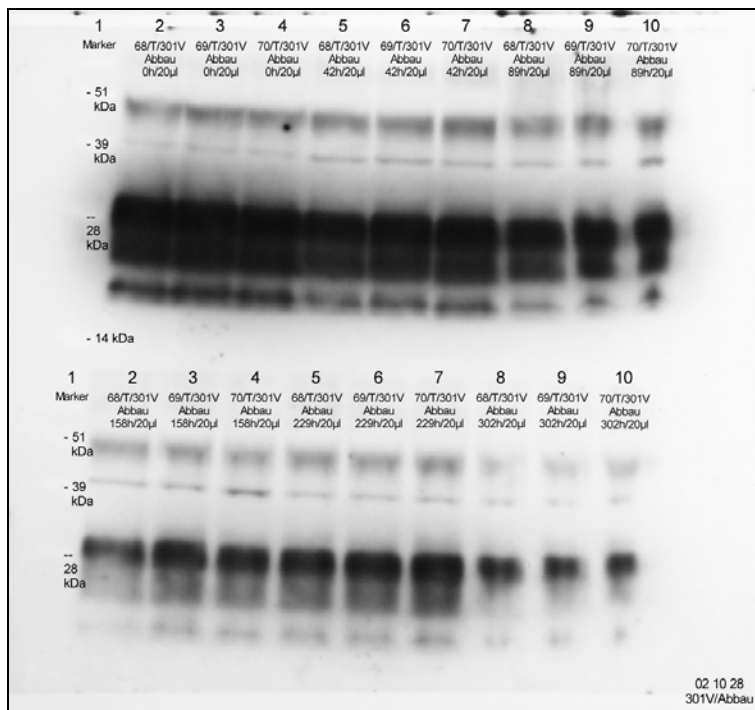


Abbildung 61: 02 10 28: Abbau; 301V; 20µl; 0-302h

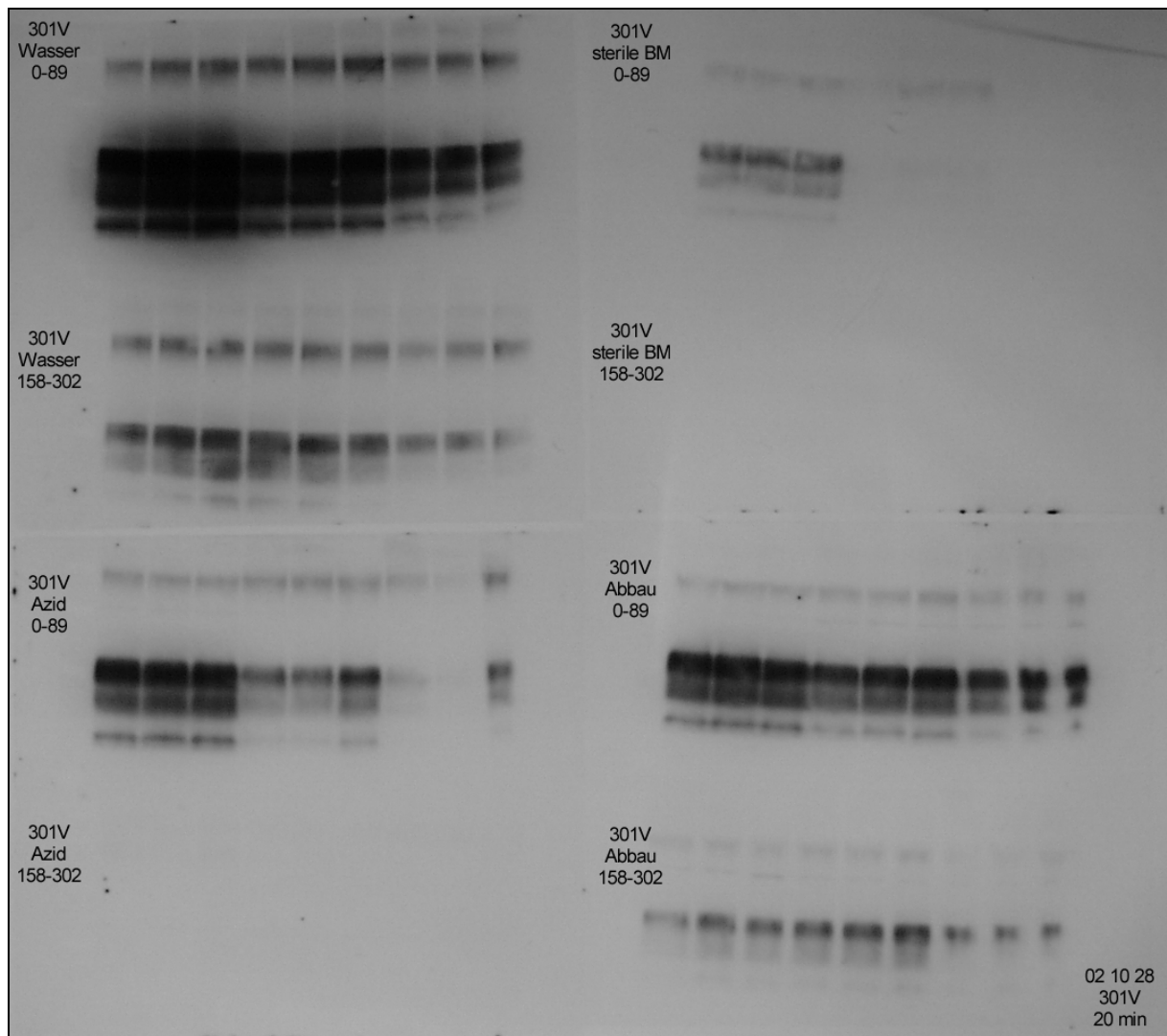


Abbildung 62: 02 10 28: Übersicht Abbauprobungen 301V; 20 min. Belichtungsdauer

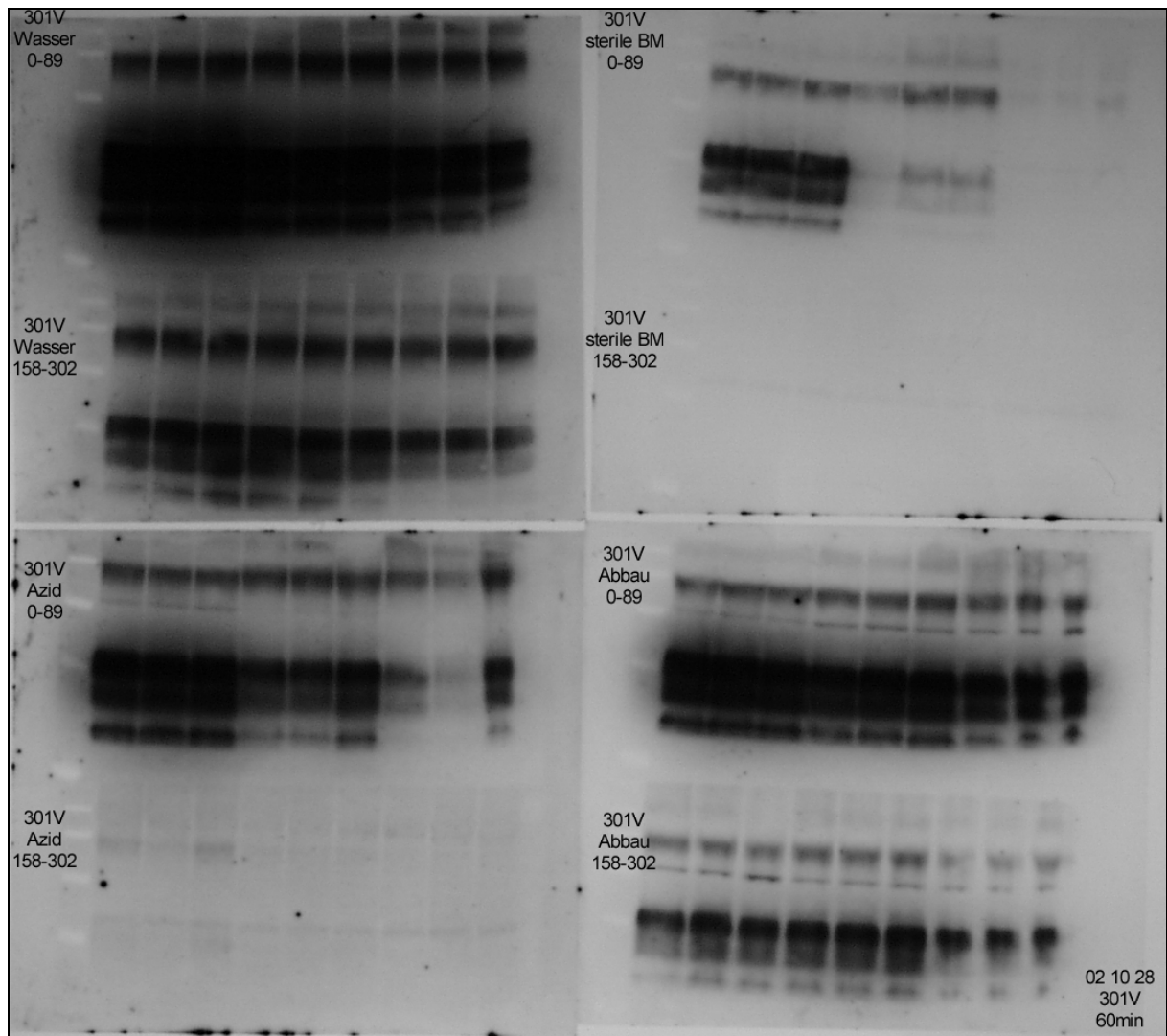


Abbildung 63: 02 10 28: Übersicht Abbauprobe 301V; 60 min. Belichtungsdauer

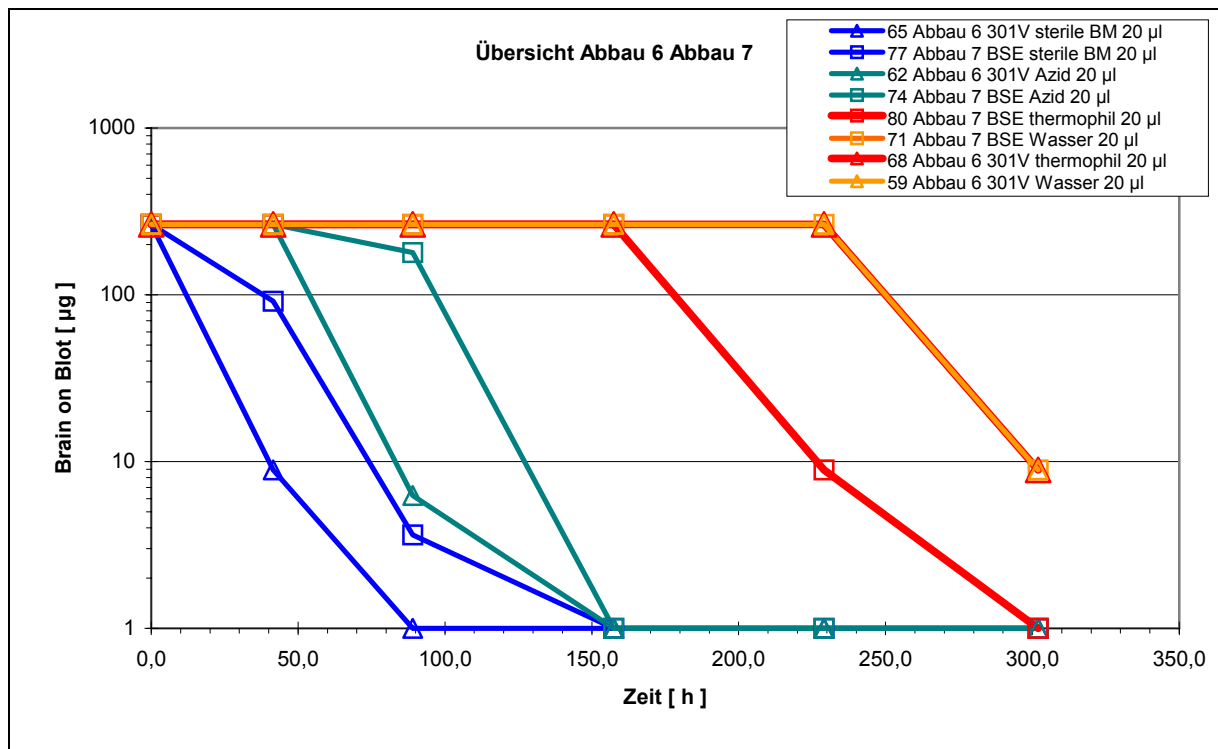


Abbildung 64: Grafische Darstellung der Abbauprobungen 6 und 7

Proben mit eindeutigem  $PrP^{Sc}$ -Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von  $8,9 \mu\text{g}$  und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.

**Versuche**

- *Abbauversuch 7 thermophil:*
- *PrP<sup>SC</sup>: 0,48 % Hirn in Faulschlamm: 4,8 mg<sub>Hirn</sub>/ml<sub>Faulschlamm</sub>*  
*bovines BSE: 10,0% Hirn in Wasser*  
*Blindwert (PrP<sup>SC</sup>: 301V/nm):*
  - ~ *Wasser (Temperatureffekt)*
  - ~ *Natriumazid inhibierter Faulschlamm*
  - ~ *dampfsterilisierter Faulschlamm (121°C/20min)*
- *50 ml Glasröhrchen (flexibler Teflon/Gummiverschluß)*
- *Inokulum mesophil IFA (adaptiert auf Schlachtabfälle): Inkubation 55°C im Wasserbad*
- *Inkubation 302 Stunden (12,5 Tage), 55°C, anaerob (Probenahme unter CO<sub>2</sub>-Spülung)*

**Conclusio:**

- *Inkubation von BSE unter thermophilen Bedingungen mit Faulschlamm: nach 229 Stunden an der Detektionsgrenze (Reduktionsfaktor 29,8)*
- *Inkubation in Wasser: Erreichen der Detektionsgrenze nach 302h*
- *Inkubation in Na-Azid inhibiertem Faulschlamm: Erreichen der Detektionsgrenze nach 89h*
- *Inkubation in sterilisiertem Faulschlamm: Erreichen der Detektionsgrenze nach 89h*

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

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

**ADM**

thermophil: 15.10.02

**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)

Tabelle 20: Übersicht der einzelnen Ansätze in Abbauersuch 7

Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur	Matrix		PrP <sup>Sc</sup> -Quelle	Matrix [ml]	Hirn [µl]
71-73	15.-28.10.02	302	thermophil 55°C	Wasser	Blindwert	BSE	5,0	250
74-76				Azid	Blindwert	BSE	5,0	250
77-79				AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	BSE	5,0	250
80-82				AD-M thermo	Abbau	BSE	15,0	750

Tabelle 21: Berechnung des ablesbaren Reduktionsfaktors in Abbauersuch 7

Probenauftragsvolumen:	20	[ µl ]
Detektionsgrenze der Serie:	8,90	[ µg ]
Ausgangskonzentration im Ansatz:	4,80	[ mg/ml ]
maximale Hirnmenge am Blot (Ausgangskonzentration):	264,8	[ µg ]
Unter der Detektionsgrenze am Blot entspricht in der Probe:	0,16	[ mg/ml ]
Reduktionsfaktor	29,76	

Tabelle 22: Abbaumatrix Abbauersuch 7

Zeit			0,0	41,5	89,0	157,5	229,0	302,0
Auftragsvolumen			20	20	20	20	20	20
Reduktionsfaktor			29,8	29,8	29,8	29,8	29,8	29,8
Matrix	PrP <sup>Sc</sup>	Probe						
Wasser	BSE	71	+	+	+	+	+	+
		72	+	+	+	+	+	+/-
		73	+	+	+	+	+	+/-
Azid	BSE	74	+	+	+	-	-	-
		75	+	+	+	-	-	-
		76	+	+	+/-	-	-	-
sterile BM	BSE	77	+	+	+/-	-	-	-
		78	+	+/-	-	-	-	-
		79	+	-	-	-	-	-
thermo	BSE	80	+	+	+	+	+/-	-
		81	+	+	+	+	+/-	-
		82	+	+	+	+	+/-	-

n.a. ....nicht auswertbar: lediglich die schwerere PrP<sup>Sc</sup> Bande erkennbar

+/- .....Detektionsgrenze

+ .....positiver PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis

- .....PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis negativ

## Inkubation

Hirnhomogenat

Faulschlamm

unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Röhrchens

vortexen

Inkubation im Wasserbad:

thermophil: 55,5°C (Wasserbadtemp.)

## Probenahmezeiten:

Datum	Differenz [h]
15.10.02 18:30	0,0
17.10.02 12:00	41,5
19.10.02 11:30	89,0
22.10.02 08:00	157,5
25.10.02 07:30	229,0
28.10.02 08:30	302,0

## Probenahme:

vortexen

Entnahme von 500 µl unter CO<sub>2</sub>-Spülung

Verschließen des Gefäßes

## Analyse:

1,8 ml Eppendorf (Schnellverschluss)

500 µl Probe

+ 30 µl 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

gesamter Überstand hinübergeleert

+ 10 µl BSA (10 %)

vortexen

+ 1400 µl Ethanol 96 % / -17°C

überkopf schütteln, vortexen

Aufbewahrung im Tiefkühler (-17°C)

Zentrifugation: 2000 xg / 10 min

Überstand weggeleert

Röhrchen überkopf im Kühlakku auf

Küchenrolle (10 min)

Pellet in Verdaupuffer resuspendiert:

80 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 / 10 min

SDS-Gel: NuPage 12%, 1 mm, 10 Slot

20 µl Probe

Marker und Std. je 7 µl)

## Elektrophorese

35 min 200 V / 400 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

Expositur: 20 min. 60 min

Entwicklung: 60 sek. 15 sek.

Fixierung: 5 min. 5 min.

Abbau 3 Schlamm	Hirn- homog.	GesVol	Sample	AD-M	Hirnhomogenat					theoret.	L.Sarco		BSA		EtOH			Re- susp.	Ges. Vol	PK		PMSF		SDB	Sample
		[µl]	AD-M+ HH [µl]	[µl]	[µl]	conc [µl]	in AD-M [%]	in AD-M [%]	[µg/ml]	HH on Blot [µg]	10% [µl]	in Lsg [%]	10% [µl]	[mg]	konz [µl]	[%]	[%]	[µl]	[µl]	conc [µl]	[µg/ml]	100mM [µl]	µmol/ml	[µl]	on Blot [µl]
		E	F	G	H	I	J	K	L <sup>(1)</sup>	M	N	O	P	Q	R	S <sup>(2)</sup>	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	
		$\frac{G+H+M+O}{100}$	$\frac{G+H}{100}$		$\frac{H \cdot (I/100)}{(H+500) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$	$\frac{H \cdot (I/100)}{(G+H) \cdot 1000}$						$\frac{H+T+V}{100}$		$\frac{V \cdot 1000}{0,6 \cdot U}$		$\frac{X \cdot 0,1 \cdot U}{1000}$				
59-61 Wasser (20µl)	BSE	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20	
62-64 Azid (20 µl)	BSE	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	97	73,8	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20	
65-67 sterilisierter FS (20µl)	BSE	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20	
68-70 thermophil (20 µl)	BSE	540	500	476	24	10,0	0,48	4,80	264,8	30	0,56	10	1,00	1400	96	73,0	80	115	10	52,1	10	8,7	30	20	
1	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4							100	220	20	54,5	20	9,1	60	20	
2	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7	L <sup>(1)</sup> : *0,8 Überstand abzügl. 100 µl Pellet S <sup>(2)</sup> : Überstand abzügl. 100 µl Pellet						100	220	20	54,5	20	9,1	60	10	
3	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	5	
4	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9							100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5	
5	Kontr. pos. 1:10	301V	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5							100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25	
6	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	4,5							100	220	20	54,5	20	9,1	60	1,25	
7	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	8,9	100	220	20	54,5	20	9,1	60	2,5							
8	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	17,9	100	220	20	54,5	20	9,1	60	5							
9	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	35,7	100	220	20	54,5	20	9,1	60	10							
10	Kontr. pos. 1:10	22A/SV	100	100		100	10,0	16,7	100	71,4	100	220	20	54,5	20	9,1	60	20							



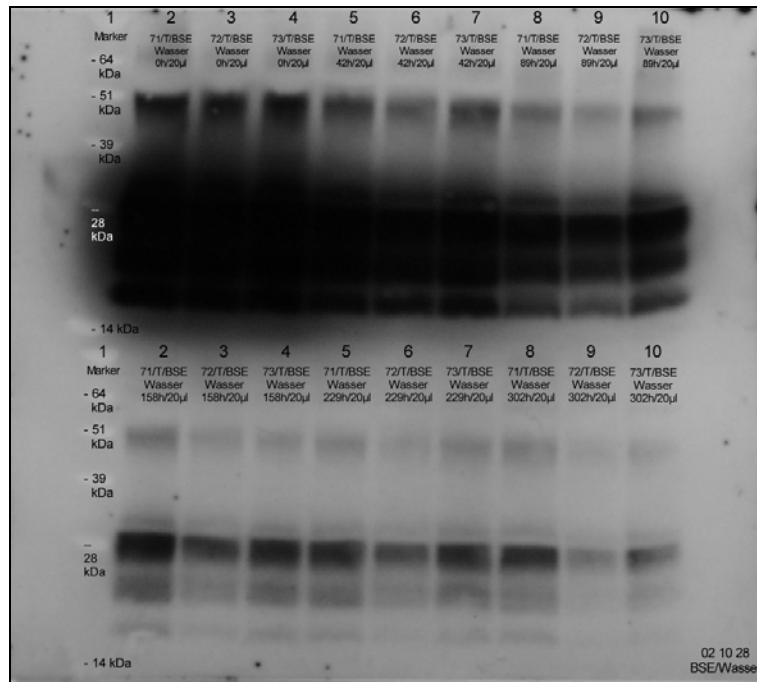


Abbildung 65: 02 10 28: Blindwert Wasser; BSE; 20µl; 0-302h

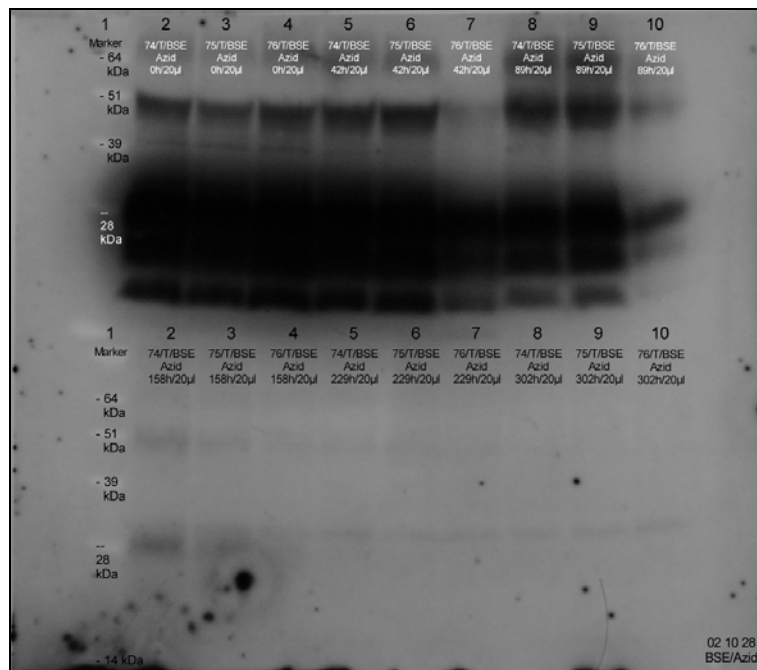


Abbildung 66: 02 10 28: Blindwert Azid inhibiert; BSE; 20µl; 0-302h

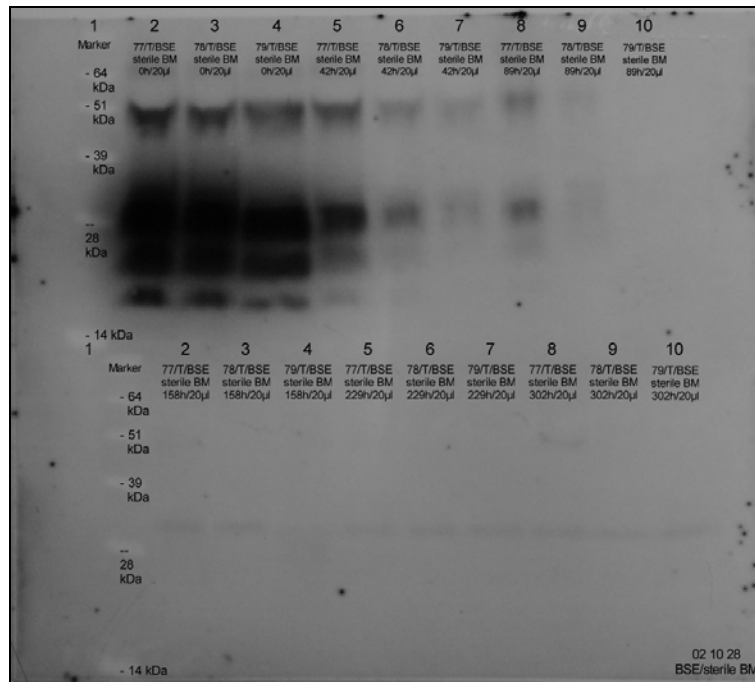


Abbildung 67: 02 10 28: Blindwert sterile Biomasse; BSE; 20µl; 0-302h

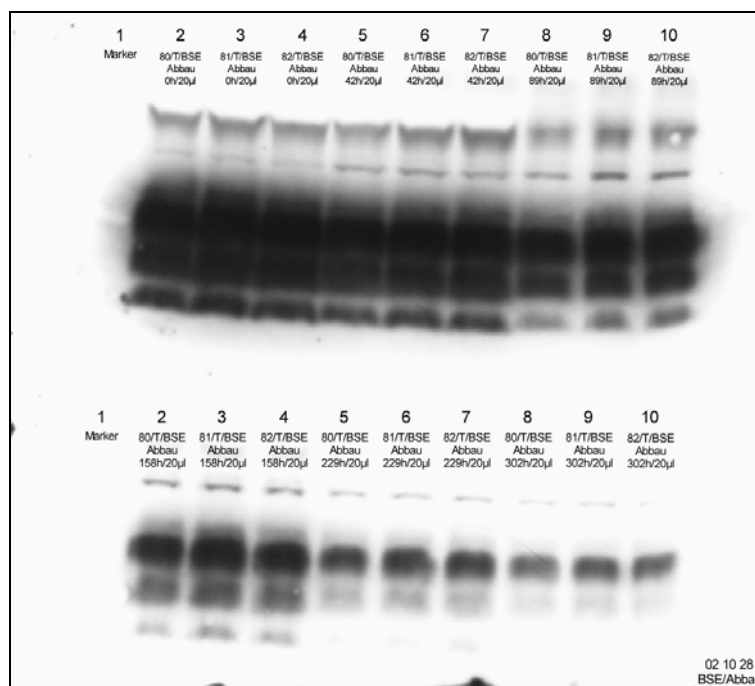


Abbildung 68: 02 10 28: Abbau; BSE; 20µl; 0-302h

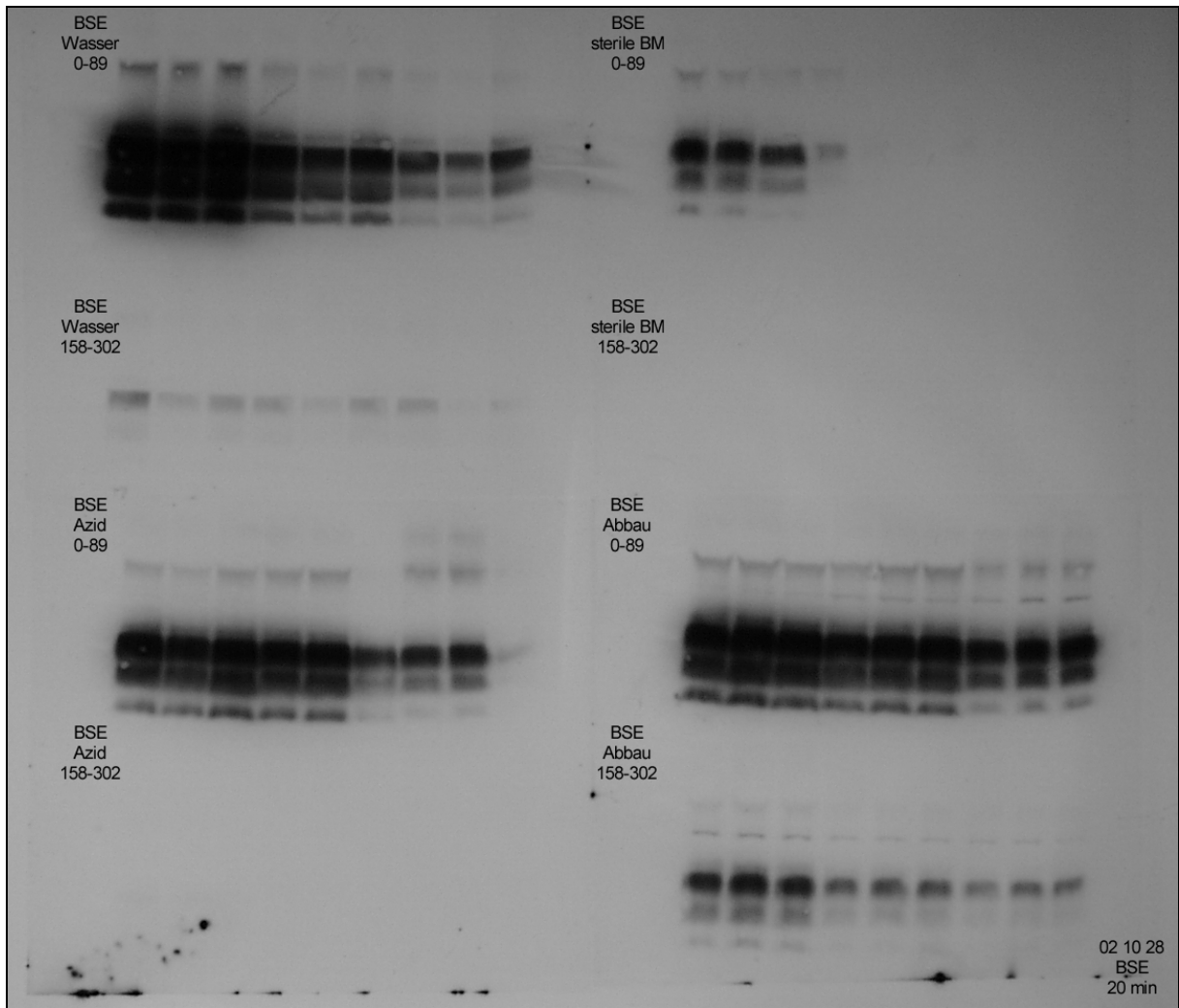


Abbildung 69: 02 10 28: Übersicht Abbaueversuche BSE; 20 min. Belichtungsdauer

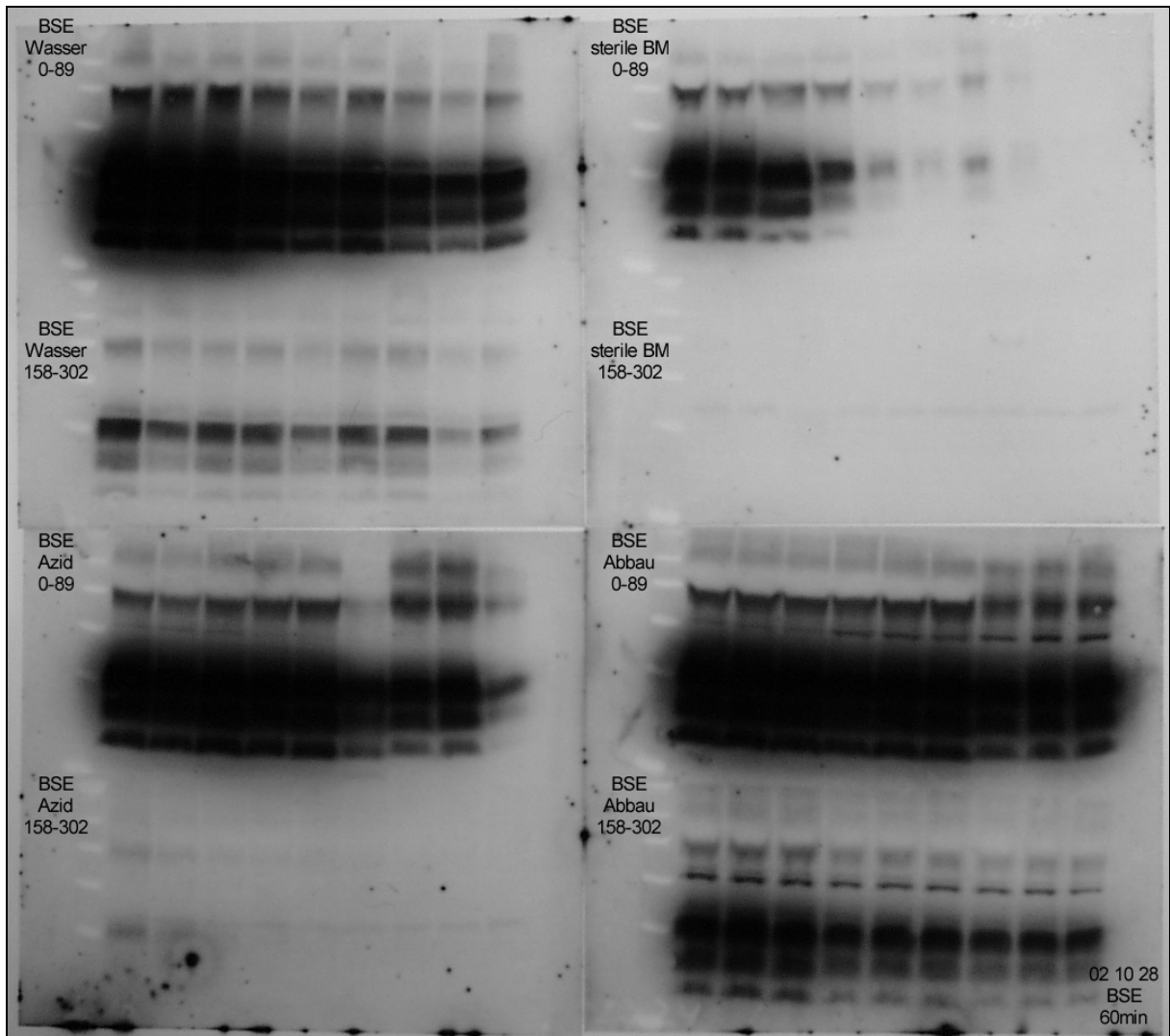


Abbildung 70: 02 10 28: Übersicht Abbauprobungen BSE; 60 min. Belichtungsdauer

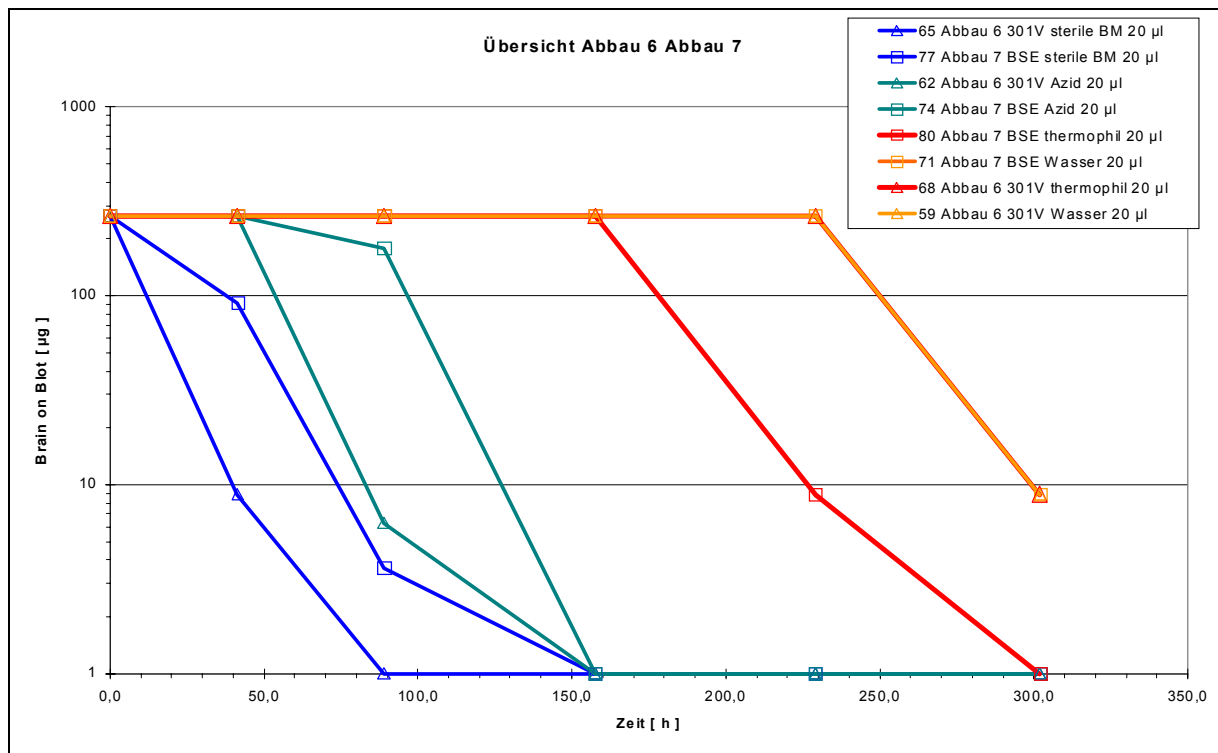


Abbildung 71 Grafische Darstellung der Abbauersuche 6 und 7

Proben mit eindeutigem PrP<sup>SC</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.