

## Methodische und gerätetechnische Probleme und Erfahrungen bei der Anwendung immunologischer Verfahren in der Tierzuchtforschung

FRANC KLOBASA

Institut für Tierzucht und Tierverhalten

### Einleitung

Aggression und Abwehr sind Grundelemente des Lebens. Die Erforschung ihrer Komponenten und ihrer Mechanismen ist das Arbeitsgebiet der Immunologie. Dieser Wissenschaftszweig hat in den letzten Dekaden eine stürmische Entwicklung erfahren, deren Ende noch nicht abzusehen ist. Immunologische Aspekte und Verfahren müssen heute in der Tierzucht als ebenso aussichtsreich gesehen werden, wie sie es in der Medizin sind.

Da sowohl (die meisten) Antigene (= reaktionsauslösende Aggressionsstrukturen), als auch die Antikörper (= reaktiv gebildete Abwehrstoffe) Eiweißkörper sind, kann man die Immunologie als ein Teilgebiet der Protein- und Zellchemie bezeichnen. Sie arbeitet mit den Methoden dieser Disziplinen. Die besondere Empfindlichkeit des Antikörpers (Immunglobulin), etwa im Vergleich zu der des robusten Blutplasmaproteins Albumin, hat jedoch die Entwicklung spezieller Verfahren erfordert. Ihre Beschreibung in der Literatur ist zwar meistens für den Fachmann ausreichend, nicht jedoch für den Novizen, der sich in das Gebiet einarbeiten will.

Diesem Umstand in gewissem Maße abzuhelpen, ist die Absicht dieser Publikation. Sie soll als ein „Kochbuch mit ausgewählten Rezepten“ angesehen werden, das natürlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann. Es wird als Beispiel für das methodische Vorgehen zur Isolierung von Immunglobulinen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM und IgA sowie der Plasmaproteine  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Albumin, Transferrin und der Milchproteine  $\beta$ -Laktoglobulin und Laktoferrin vom Schaf als auch über die Gewinnung von monospezifischen Antisera gegen diese Proteine berichtet.

Ich hoffe, daß vor allem die Abbildungen und Beschreibungen der „Küchengeräte“ aus eigenen Konstruktionen hilfreich sein werden.

### 1 Material und Methoden

#### 1.1 Material

##### 1.1.1 Blutserum

Zur Gewinnung von Serum als Ausgangsmaterial wurde das Blut aus der Vena Jugularis von mehreren erwachsenen Schafen entnommen. Das Blutgemisch stand zunächst 3 bis 4 Stunden bei Zimmertemperatur und danach über Nacht bei 4°C. Der Blutkuchen wurde durch Zentrifugation (Christ Universal Junior III KS, Winkelrotor 5040, 2500 U/Min. und 4°C 20 Minuten) komprimiert, das Blutserum abgenommen und durch hochtourige Zentrifugation (Beckmann J2-21, Winkelrotor J-20, 1, 15000 U/Min. und 4°C 30 Minuten) geklärt. Wenn das Serum nicht sofort weiterverarbeitet werden konnte, wurde es bei -20°C gelagert.

##### 1.1.2 Kolostrummolke

Kolostralmilch aus den ersten 6 Laktationsstunden von älteren Mutterschaften wurde durch Zentrifugation (bei 3000 U/Min. und 4°C 20 Min.) entfettet. Für die Ausfällung des Kaseins benutzten wir Labpulver (Gebr. Bayer, Augsburg), das der auf 38°C erwärmten Magermilch zugesetzt wurde. Nach 2-3 stündiger Inkubation bei 38°C wurde das Kasein abzentrifugiert. Auch die Molke wurde nochmals hochtourig zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

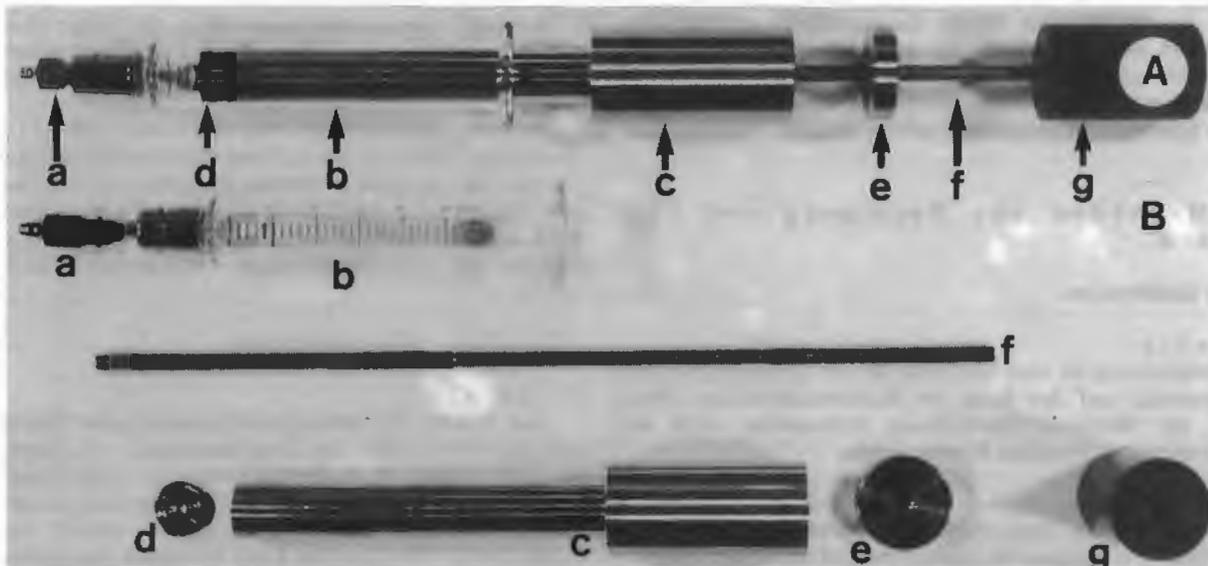


Abb. 1: Vorrichtung zum Emulgieren der Antigenlösungen mit Adjuvans. A: zum Mischen bereit; B: zerlegt. a - Verschlusskappe; b - Glasspritze; c - Kolben; d - Siebplatte (mit den Löchern von 0,6 mm); e - Arretierschraube; f - Gewindestab zur Bewegung der Siebplatte; g - Handgriff.

### 1.1.3 Lungenwäsche

Die Lungen erwachsener Schafe wurden beim Schlachten, unter Vermeidung des Hineinlaufens von Blut, von der Luftröhre abgetrennt und am Hauptbronchus aufgehängt. Sie wurden dann durch den Bronchus mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS: 0,5 g Natriumhydrogenphosphat Monohydrat + 2,61 g di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat/Liter; 0,15 M Natriumchlorid) gefüllt und leicht massiert. Zum Absaugen der Flüssigkeit wurde ein Silicon-Kautschuk-Schlauch ( $\varnothing$  außen 7 mm;  $\varnothing$  innen 4,5 mm), möglichst tief in die Seitenbronchien der Lungenlappen eingeführt. Die Lavage wurde zunächst durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 595 1/2) gegeben und dann durch Ultrafiltration (Nuclepore UF Membrane, Typ C, molekulare Trenngrenze 50 000) bei Raumtemperatur konzentriert. Das Konzentrat wurde hochtourig zentrifugiert und der klare Überstand verwendet.

### 1.1.4 Antiseren

Antiseren wurden durch Immunisierung von Schweinen und Kaninchen gewonnen. Zum Emulgieren der Antigenlösungen mit kompletten (FAC, Difco) oder inkompletten Freund's Adjuvans (FAI Difco) benutzten wir den in Abb. 1 dargestellten Spritzensatz mit Siebkolben. Mastschweine wurden im Alter von 4 Monaten erstmals immunisiert. Antigene (3-5 mg) wurden an zwei Stellen hinter den Ohren s.c. appliziert. Für weitere Immunisierungen, durchgeführt auf die gleiche Art und im Abstand von 4 Wochen, wurden Antigene (3-5 mg) mit FAI gemischt. 10 Tage nach der dritten Injektion kamen die Schweine zum Schlachten. Das aus dem Blut gewonnene Serum wurde mit Konservierungslösung (0,12 M Ethylendiamintetraessigsäure Na<sub>2</sub>-salz; 0,8 % Natriumazid; 0,1 M 6-Aminohexansäure) konserviert (25  $\mu$ l/ml Serum) und bei -20°C gelagert.

Bei der Gewinnung von Antiseren vom Kaninchen wurden mit FAC emulgierte reine Antigene (2-3 mg) erstmals interdigital in Pfoten, die Antigengemische, z.B. Schafblut-Serum oder Schafmolke, subcutan an mehreren Stellen injiziert. Bei allen Immunisierungen folgten im Abstand von 4 Wochen weitere s.c. Injektionen von Emulsionen mit FAI. 10 Tage nach der vierten Injektion wurde zum ersten Mal Blut genommen. Eine Woche danach wurde nochmals immunisiert und 10 Tage danach erneut Blut aus der Ohrvene mit Hilfe einer Saugglocke aus Glas (Serolab/Aidenbach) abgenommen. Das Serum wurde auf die gleiche Art wie beim Schwein gewonnen und aufbewahrt.

## 1.2 Methoden zur Reinigung von Proteinen

### 1.2.1 Gelfiltration

#### Prinzip:

Gelfiltration ist eine Methode für die Trennung der Makromoleküle auf der Basis der Molekulargewichte. Dabei wird die Molekularfilterwirkung hydrophiler Gele mit raumvernetzter Struktur herangezogen.

Der Fraktionierungsbereich eines Gelchromatographie-Mediums ist der ungefähre Molekulargewichtsbereich, in welchem Trennungen bei genügender Differenz der Molekulargewichte durchgeführt werden können. Moleküle, die nicht in die Poren des Gels penetrieren können, kommen zuerst durch die Säule, kleinere Moleküle, welche in die Gel-Matrix eindringen können, später.

Für die Gelfiltration benutzten wir quervernetztes Dextran (Sephadex G 200 und G 100, Pharmacia), quervernetzte Agarose (Sephacryl S 300, Pharmacia), perlförmige Agarose (Sephacryl S 300, Pharmacia) und Polyacrylamid (Sephacryl S 300, Pharmacia). Die gequollenen Gele wurden durch Evakuieren entlüftet und in 100 cm lange Glas-säulen mit 2,5 cm Durchmesser (K 26/100 von Pharmacia) gefüllt. Um eine bessere Trennung zu erreichen, wurden jeweils zwei Säulen hintereinander geschaltet. In Abhängigkeit von der Konzentration wurden bis zu 8 ml Eiweißlösung aufgetragen. Größere Volumina erbrachten unbefriedigende Trennergebnisse. Die Elution erfolgte von unten nach oben mit Hilfe von Pumpen bei Durchflußgeschwindigkeiten von 20 bis 30 ml/h. Die Messung der Eiweißkonzentration im Eluat erfolgte mit einem ISCO-Monitor (ISCO) bei 280 nm.

Als „Gelfiltrationspuffer“ diente 0,01 M Tris-Essigsäure, pH 7,3; 0,01 M Tris (hydroxymethyl) aminomethan; 0,2 M Essigsäure; 1,0 M Natriumchlorid; 0,02 % Natriumazid; 0,003 M Ethylendiamintetraessigsäure Na<sub>2</sub>-salz mit einer Leitfähigkeit von 82 mS. Auch der Puffer wurde vor Gebrauch entlüftet. Die Gelfiltration fand bei Raumtemperatur (ca. 20°C) statt.

### 1.2.2 Ionenaustauscherchromatographie

#### Prinzip:

An ein unlösliches Gerüst (die Matrix) – z.B. Zellulose – sind kationische bzw. anionische Ionen chemisch gebunden. Die frei beweglichen Gegenionen können die Ladung der gebundenen Ionen kompensieren. Die Gegenionen lassen sich reversibel gegen andere Ionen gleicher Ladung austauschen, ohne daß die Matrix beeinträchtigt wird. Die gebundenen Gruppen und frei beweglichen Ionen sind gegenpolig geladen. Enthält die Matrix positive Gruppen, ist das ein Anionenaustauscher, ein Kationenaustauscher enthält dagegen negative Gruppen.

Zur Ionenaustauscherchromatographie wurden modifizierte Zellulosen: DEAE Sephacel (Pharmacia), DE 32, DE 52 (beide Whatman) und CM Sephadex C 50 (Pharmacia) verwendet. Die gequollenen Ionenaustauscher wurden vor dem Einfüllen in die Säulen entlüftet. Als Säulen verwendeten wir einfache Glasröhren von 3,5 cm Durchmesser und 40 cm Länge mit unterer Einengung und Glaswollstopfen.

Pufferlösungen: DEAE: 0,01 M Tris-HCl, pH 8,3; lineare Gradienten von 0,02 bis 0,3 mol Natriumchlorid/Liter. CM 50 und DE 32: 0,02 M Natriumphosphat, pH 7,0; Gradient von 0,02 bis 0,5 mol/Liter. DE 52: 0,01 M Kaliumphosphat, pH 7,3; Gradient von 0,02 bis 1,0 mol/Liter. Zur Herstellung der Gradienten wurde ein Ultrograd (LKB) benutzt.

### 1.2.3 Affinitätschromatographie

#### Prinzip:

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, daß Oberflächen des Trägermaterials – z.B. Sepharose, ein perlförmiges Agarosegel (Pharmacia) – mit Substanzen beladen werden, mit denen eine Subgruppe aus der zu trennenden Lösung von Proteinen spezifisch reagiert und sich dabei bindet. Die Bindung kann reversibel oder irreversibel sein. Die Begleitsubstanzen passieren das Affinitätsharz ungehindert. Durch Änderung des Chromatographiemilieus kann man Bindungskomplexe zerlegen und die gewünschte Substanz eluieren.

Um die spezifische Bindung von Proteinen an das Gel zu verhindern bzw. zu reduzieren, wurde die Sepharose 4 B (Pharmacia) mit Epichlorhydrin behandelt. Es folgte eine Aktivierung mit Bromcyan. Zur Herstellung der Säuren wurden 40 mg Protein mit 10 ml Sepharose gebunden. Die Bindung erfolgte unter Anwendung des Citronensäurepuffers, pH 6,7 (0,2 M tri Natriumcitrat Dihydrat; 0,5 M Natriumchlorid) und 1 M Ethanolamin, pH 8,3. Dabei wurden folgende Schritte angewendet: Die gegen mit Citronensäurepuffer equilibrierte Sepharose und gegen den gleichen Puffer dialysierten Proteine wurden vermischt und unter Rühren über Nacht bei 4°C zur Reaktion stehen gelassen. Die überschüssigen Proteine wurden mit gekühltem Citronensäurepuffer ausgewaschen. Es folgte eine Zugabe von 1 M Ethanolamin (15 ml) und Rühren für 2 Stunden bei 4°C. Nach Beendigung der Reaktion wurde Sepharose-Protein-Komplex abwechselnd, je 4-5 mal, mit Glycin-HCl-Puffer, pH 2,8 (0,05 M Glycerin; 0,5 M Natriumchlorid; 1,0 M Salzsäure) und 0,02 M Tris-Puffer pH 7,9 (TBS: 0,02 M Tris (hydroxymethyl) aminomethan; 0,2 M Essigsäure; 0,15 M Natriumchlorid; 0,005 M 6 Aminohexansäure; 0,003 M Ethylendiamintetraessigsäure Na<sub>2</sub>-salz; 0,02 % Natriumazid), ausgewaschen; letzte Wäsche muß mit TBS sein.

Das Gel, gekoppelt mit Protein, wurde entlüftet und in die Säulenkunststoffspritzen von 20 ml mit Glaswolle als Filter gefüllt. Auf eine solche Säule trugen wir 5-10 ml Antiserum auf und eluierten mit entgastem 0,02 M TBS. Zum Auswaschen zurückgebliebener Antikörper wurde 3,5 M Magnesiumchlorid Hexahydrat benutzt. Das Konzentrieren der durch Affinitätschromatographie gereinigten Antiseren auf das Ausgangsvolumen erfolgte über Amicon-Geräte.

#### 1.2.4 Dialyse und Konzentrierung

##### Prinzip:

Die Proteinmoleküle sind sehr groß und können durch bestimmte Membranen, die Wasser und niedermolekulare gelöste Stoffe hindurchtreten lassen, nicht diffundieren. Auf diese Weise – mit Dialyse – kann man kleine gelöste Moleküle und Salze von der Proteinlösung entfernen. Eine der Konzentrierungsmethoden ist die Ultrafiltration. Dabei werden Wasser oder wäßrige Lösungen kleinerer Moleküle oder Salze von den Proteinlösungen über Ultrafiltrationsmembranen abgetrennt und makromolekular gelöste Substanzen oder Suspensionen angereichert. Die Membranen haben definierte, abgestufte Trenngrenzen für Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Die Dialyse erfolgte in Viskinschläuchen oder bei gleichzeitigem Konzentrieren durch Ultrafiltration (Amicon). Für kleinvolumige Proben (unter 3,5 ml) benutzten wir die auf Abb. 2 dargestellte Kammer.

#### 1.2.5 Immunelektrophorese

##### Prinzip:

Elektrophoretische Beweglichkeit und Antigenität eines Proteins werden in zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Arbeitsgängen bestimmt. Proteinantigene eines Gemisches werden zunächst elektrophoretisch getrennt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine von ihrer Nettoladung, der anliegenden Feldstärke und dem Reibungswiderstand der Gelmatrix abhängig ist. Dann diffundieren diese gegen eine parallel zur Wanderungsrichtung aufgetragene

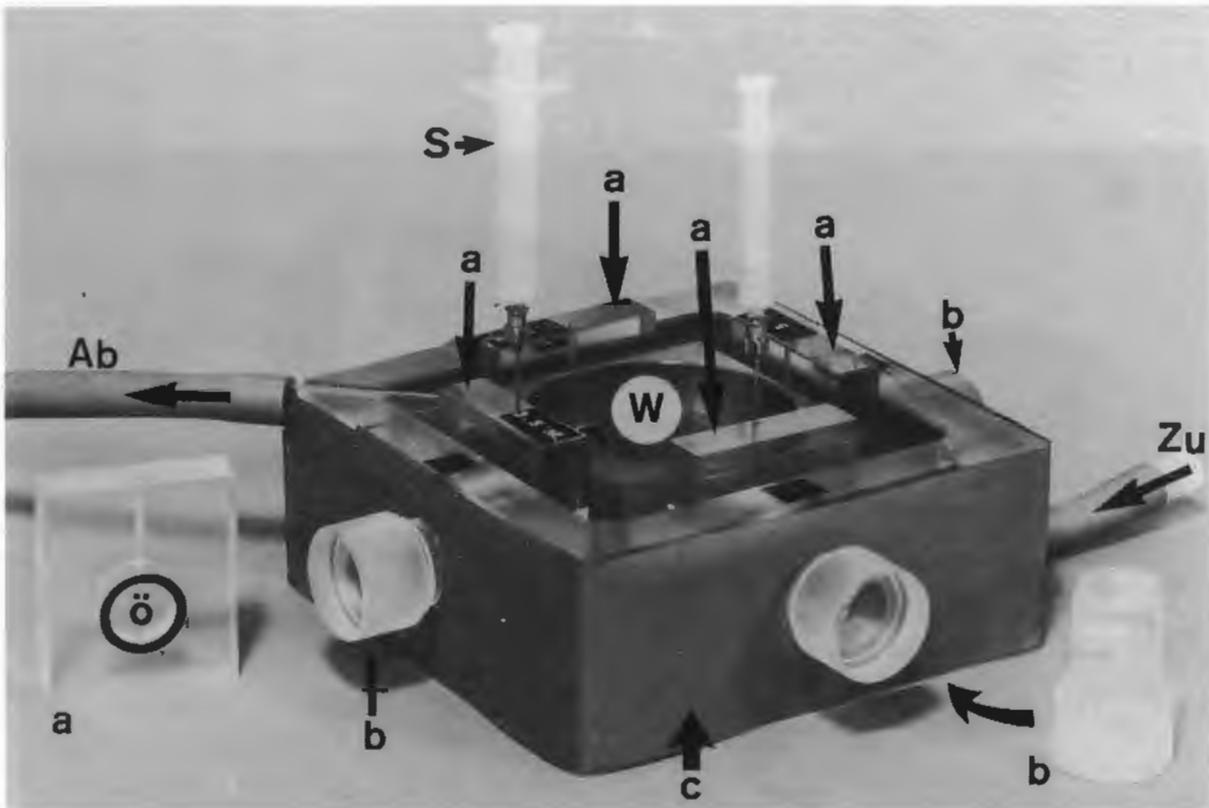


Abb. 2: Dialyse-Gerät. Mit der Spitze (S) wird die Probe in die kleine Kammer (a), wie sie auch links neben dem Gerät zu sehen ist, gefüllt und nach Beendigung der Dialyse wieder daraus entnommen. In der Mitte des Gerätes befindet sich destilliertes Wasser (W), das rechts unten zu- und links oben abläuft. Die Öffnung (ö) der Kammer wird mit der Dialysiermembrane verschlossen und die Kammer mit der Schraube (b) in dem Gehäuse des Gerätes (c) befestigt.

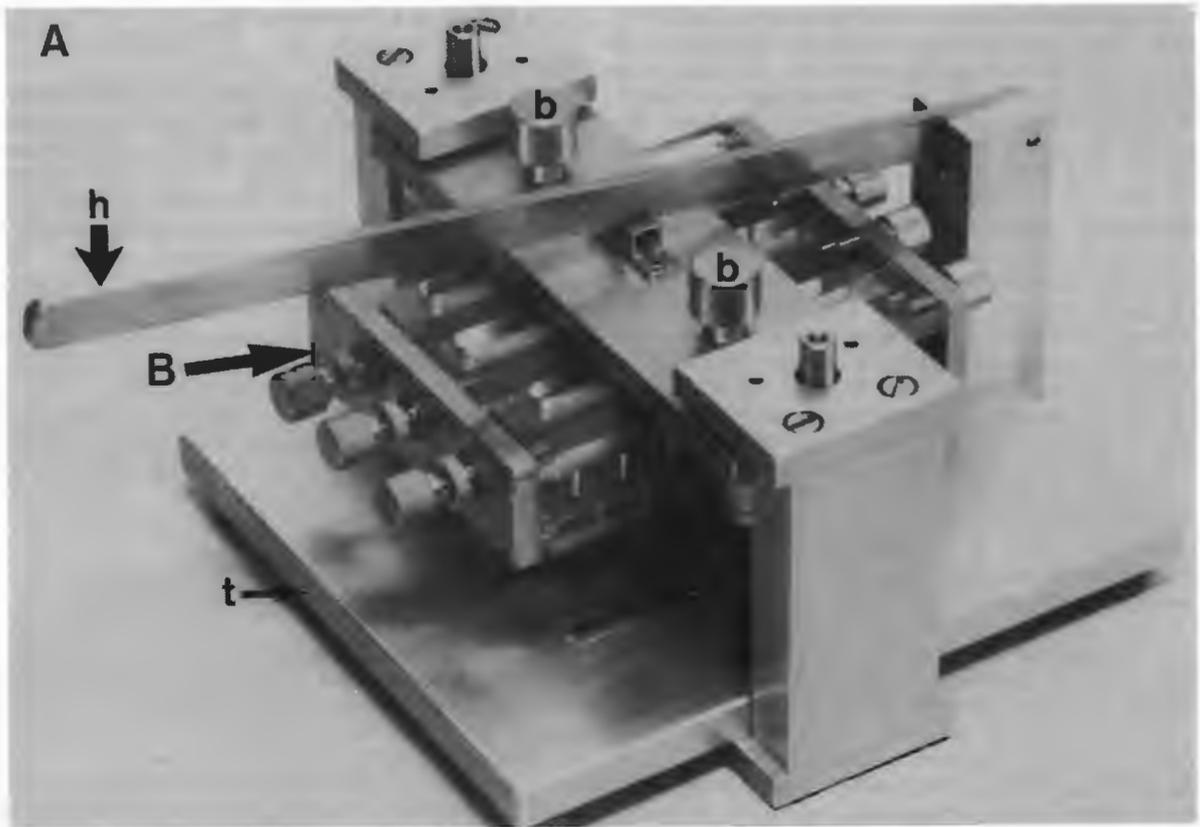


Abb. 3a: Stanze für die Platten der Immunelektrophorese: Die Glasplatte mit dem Agar wird auf den Tisch (t) gelegt und das Messerteil (B) mit Hilfe des Hebels (h) nach unten gedrückt. Nach dem Lösen von zwei Schrauben (b) kann man das Messerteil herausnehmen.

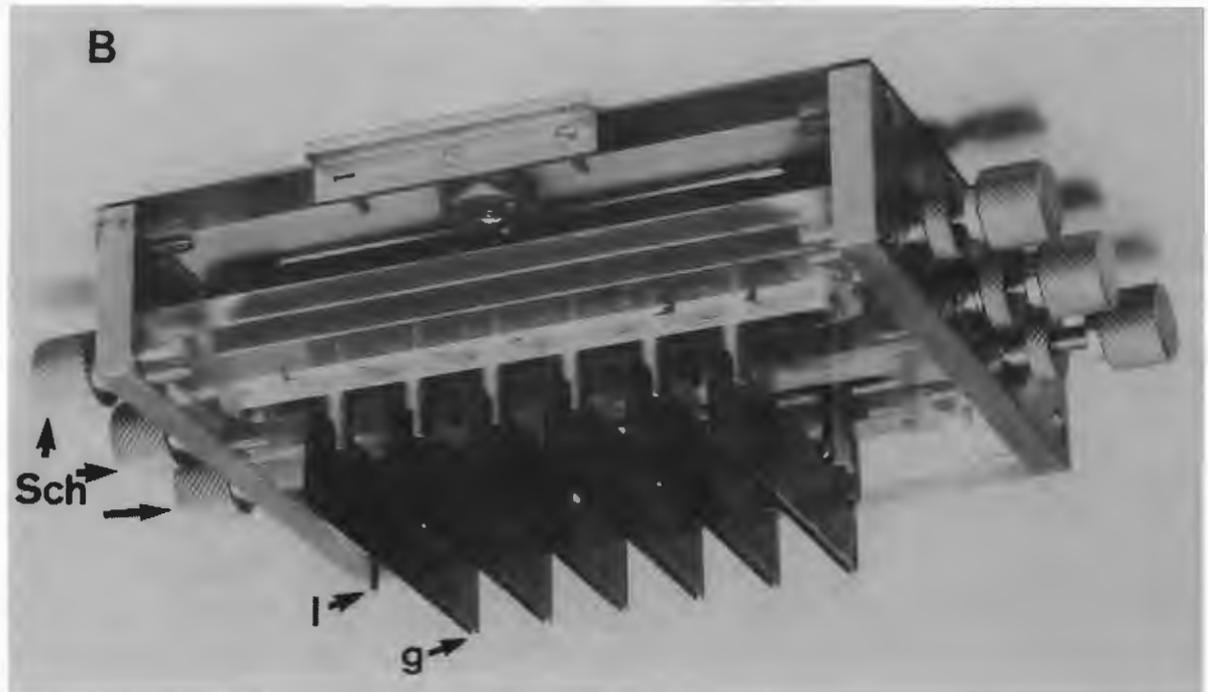


Abb. 3b: Messerteil der Stanze für die Immunelektrophorese. Mit den sechs Seitenschrauben (Sch) ist es möglich, die Abstände zwischen Auftragstellen für Antigene (Loch, l) und für Antiseren (Gräben, g) beliebig zu variieren.

Antikörperlösung. Das Antigen\*1) diffundiert hierbei radial, das Antiserum\*2) linear. Anzahl, Lage und Form der bei dem Zusammentreffen der Reagenten entstehenden Präzipitate sind neben der Nettoladung von der Molekülgröße – der Diffusionskoeffizient ist von der Temperatur, der Viskosität des Mediums und dem Radius des Moleküls abhängig – und den Konzentrationsverhältnissen von Antigen und Antikörper abhängig und geben einen Einblick in die Zusammensetzung des Antigengemisches.

Immoelektrophorese dient zur Analyse der Zusammensetzung eines Proteingemisches,

– für den Nachweis von Antigenverwandtschaften und von Strukturveränderungen bei Antigenen;

– zur Identifizierung von Sonderformen im Serumproteingemisch.

Es wurde die von Scheidegger (1955) beschriebene Methode mit geringen Modifikationen benutzt. Hierzu wurde ein LKB-Multiphor-Gerät mit Kühlung verwendet. Die Trennungen erfolgten bei 15°C. Als Trennmedium diente 1 % Agar (Purified Agar, Oxoid), der in kochendem Wasser in Michaelispuffer, pH 8,6 (Serva) aufgelöst und auf 10,5 x 8,5 cm große, nivellierte Glasplatten in einer 1 bis 1,5 mm dicken Schicht aufgetragen wurde. Auf der Platte wurden 7 Löcher und 6 Gräben gestanzt (Abb. 3a, 3b). Die in die Stanzlöcher aufgetragenen volumine Antigenlösungen lagen zwischen 1 µl (bei über 20 mg Protein/ml) und 15 µl (bei unter 2 mg/Protein/ml), die nach Beendigung der Elektrophorese in die ausgehobenen Gräben eingetragenen Antiserumvolumine zwischen 0,10 und 0,15 ml. Die Trennung wurde in 2,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Platte durchgeführt. Elektrodenpuffer: 0,027 M 5,5 Diethylbarbitursäure; 0,08 M 5,5 Diethylbarbitursäure Na-Salz; pH 8,3. Die anschließende Immundiffusion erfolgte in einer Feuchtekammer für 24 bis 48 Stunden.

Abb. 4 zeigt den Lichtkasten für die Beurteilung der Präzipitationslinien und das Fotografieren der Platten.

#### 1.2.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

##### Prinzip:

Das Trennprinzip bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese beruht physikalisch auf der Kombination von elektrophoretischer Beweglichkeit mit Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekten. Die Teilchen lassen sich nicht nur nach ihrer Ladung, sondern auch nach ihrer Molekülgröße und Molekülgestalt auftrennen. Dabei spielt die Porengröße eine wichtige Rolle. Bei dieser Elektrophorese wird Polyacrylamidgel – ein synthetisches Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid – als Träger verwendet. Mit der Wahl einer geeigneten Acrylamidkonzentration kann man die Porengröße über einen weiten Bereich variieren. Durch seine rein synthetische Herkunft wird Acrylamid von keinem Enzym angegriffen und läßt sich sehr rein darstellen. Gegenüber Hitze, pH-Einflüssen und Lösungsmitteln

ist es sehr beständig. Proteine werden nicht absorbiert und, da keine geladenen Gruppen vorhanden sind, tritt auch keine Elektrosmose auf. Dieses Gel ist glasklar und kann nach Färbungen ohne weitere Behandlungen optisch ausgewertet werden.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) wurde weitgehend nach den Angaben von Schmitt (1968) durchgeführt. Die Gele – Trenngel mit 5,75 % Acrylamid (Serva) und Sammelgel mit 3,15 % Acrylamid (Serva) – wurden in die 3 mm breiten Glaskassetten der Größe 8x14 gegossen. Die Trennung erfolgte mit Gel Elektrophoresis Apparat GE4 (Pharmacia) bei 12°C, bei einer konstanten Stromstärke von 6 mA je Probe und einer Spannung von 240 V am Anfang und von 510 V am Ende des Laufes. Als Elektrodenpuffer wurde ein 0,05 M Tris-Glycin Puffer, pH 8,5, benutzt, wobei die Stammlösung – 0,05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethan; 0,38 M Glycin – für den Gebrauch mit aqua dest. im Verhältnis 1 : 5 verdünnt wurde.

#### 1.2.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

##### Prinzip:

Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS-Sodium dodecyl sulfate) beladen. Dadurch wird die Ladungsdichte der verschiedenen Proteinarten annähernd gleich groß. Bei der Elektrophorese erfolgt also die Trennung nur nach der

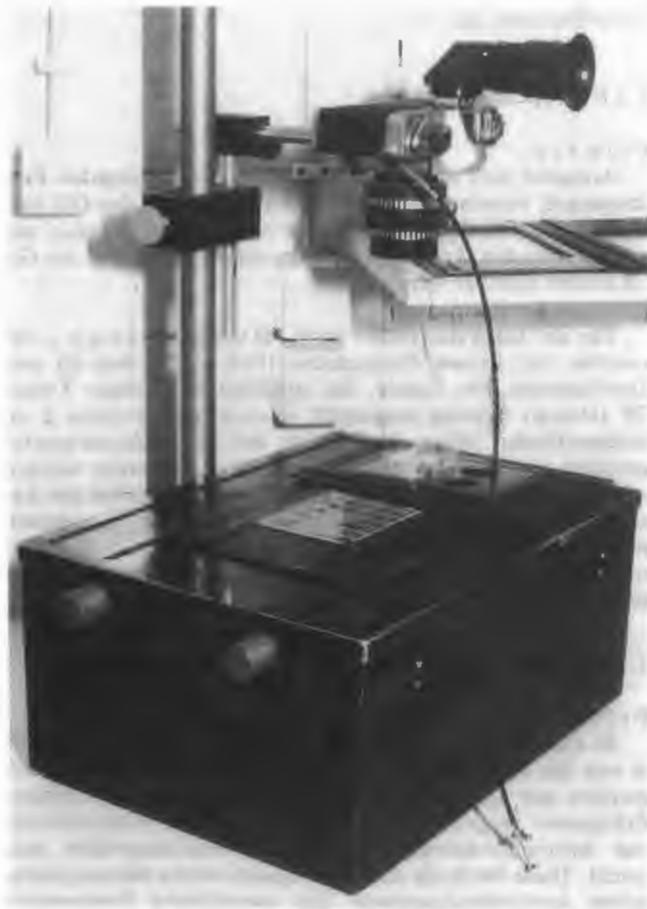


Abb. 4: Leuchtkasten – mit Durchlicht und dunklem Hintergrund – zur Beurteilung der Präzipitationslinien bei Immoelektrophorese, zwelfacher Diffusion und Radialdiffusion. Für die Dokumentation kann man ohne vorheriges Auswaschen von nicht gebundenen Proteinen oder Anfärben der Präzipitationslinien die Platten fotografieren.

\*1) Als Antigen wird eine Substanz bezeichnet, die im Organismus eine spezifische Immunreaktion auslöst, an deren Ende die de novo Synthese eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers steht.

\*2) Antiserum ist antikörperhaltiges Blutserum. Antikörper sind Immunglobuline. Die Antiseren sind die spezifischen Reagenzien modernster Eiweißforschung.

Molekülgröße (und -form), wobei man die Porengröße des Gels durch den Quervernetzungsgrad steuern kann. So kann die SDS-Technik zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden.

Die SDS-PAGE wurde in 10%iger Acrylamid (Serva), gemischt mit 0,1 % 2-Mercaptoethanol und 0,1 % Dodecylsulfat Natriumsalz nach der Standardmethode von Laemmli (1970) durchgeführt, wobei die gleiche Apparatur und die gleichen Glaskassetten, wie bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet wurden. Die elektrophoretische Trennung, bei konstantem Strom von 6 mA/Probe mit einer Spannung von 120 V am Anfang und 385 V am Ende der Trennung und Einsatz eines 0,1 M Tris-Glycin-SDS Puffers, pH 8,4 (0,1 M Tris (Hydroxymethyl) aminomethan; 2,0 M Glycin; 0,02 M Dodecylsulfat Natriumsalz), dauerte 2,5 Stunden. Nach der Trennung lagen die Platten, um die Proteine zu fixieren, über Nacht in 20%iger Trichloressigsäure und wurden anschließend mit Serva Blau R (Serva) gefärbt. Für die Entfärbung nahmen wir eine Lösung, bestehend aus 150 ml Eisessig + 100 ml Methanol + 1 750 ml aqua bidest, die wir zur weiteren Verwendung über Aktivkohle regenerierten (Abb. 5a). Auf der Abb. 5b ist das Schüttelgerät abgebildet, mit dem die Elektrophoreseplatten beim Färben und Entfärben geschwenkt wurden. Als Referenzstandards dienten Schweine- $\alpha_2$ -Makroglobulin (170 000), bovines Lactoferrin (73 000), Rinder-Albumin (66 000), Hühnereialbumin (43 000), Schweine-IgG (53 000 und 23 000), Pepsin (35 000) und Schaf- $\beta$ -Lactoglobulin (18 000) (Abb. 6).

### 1.2.8 Doppeldiffusion

#### Prinzip:

Antigene und Antiseren, aufgetragen in bestimmten Entfernungen voneinander, diffundieren radial in das Gel und treffen aufeinander. Dabei bilden spezifische Antigene mit entsprechenden Antikörpern Immunkomplexe, die im Gel als Linien sichtbar werden.

Für die Doppeldiffusion nach Ouchterlony, benutzen wir Einweg-Petrischalen (Polystyrol) von 35 mm Durchmesser. Pro Schale, die zunächst mit 1%iger Tween 20 (Merck) Lösung ausgespült worden war, wurden 2 ml kochendheiße 1%ige, in TBS (s. bei Affinitätschromatographie) gelöste Agarose gegossen. Nach Erstarren wurden mit der Stanze (Abb. 7a) Löcher ausgestanzt, wobei der Abstand zwischen dem Zentralloch und kreisförmig angeordneten Löchern, unabhängig von der Lochgröße, konstant 6 mm betrug (Abb. 7b). Die Diffusion erfolgte bei Raumtemperatur.

### 1.2.9 Radiale Immundiffusion

#### Prinzip:

In das antiserumhaltige Gel diffundieren Antigenmoleküle von der Auftragsstelle radial in die Umgebung und präzipitieren mit spezifischen Antikörpern. Die geringförmigen Präzipitate vergrößern sich so lange, wie der Antigenvorrat zur Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgefälles ausreicht. Diese Methode dient zur quantitativen immunchemischen Antigenbestimmung. Die quantitative Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen in den Flüssigkeiten erfolgte mit einfachen radialen Immundiffusionen nach Mancini et al. (1965) in einer noch zu beschreibenden technischen Variante von Klobasa. Bei Anwendung dieser Methode muß man sich auf die Monospezifität der Antiseren verlassen können. Es wurde 1,5%ige Agarose

(Serva) in Tris Essigsäure Puffer, pH 7,9, benutzt (Klobasa et al., 1983).

### 1.2.10 Isolierung von IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgM, $\alpha_2$ -Makroglobulin, Transferrin und Albumin aus dem Blutserum

Abbildung 8 zeigt das Flußdiagramm über die Präparation der Immunglobuline IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgM sowie von  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Transferrin und Albumin aus dem Blutserum des Schafes.

Die Dialyse des Serums gegen Euglobulinpräzipitationspuffer, pH 5,6 (Euppt-Puffer: Grundlösung A = 0,5 M Kaliumhydrogenphosphat, Grundlösung B = 0,5 M Di-Kaliumhydrogenphosphat. Zwischenlösung = 475 ml Lösung A + 25 ml Lösung B. Dialysepuffer = Verdünnung der Zwischenlösung mit destilliertem Wasser 1:49), dauerte etwa 48 Stunden bei 4°C, wobei der Puffer viermal gewechselt wurde (Cambier et al., 1974). Dabei fällt die IgM-reiche

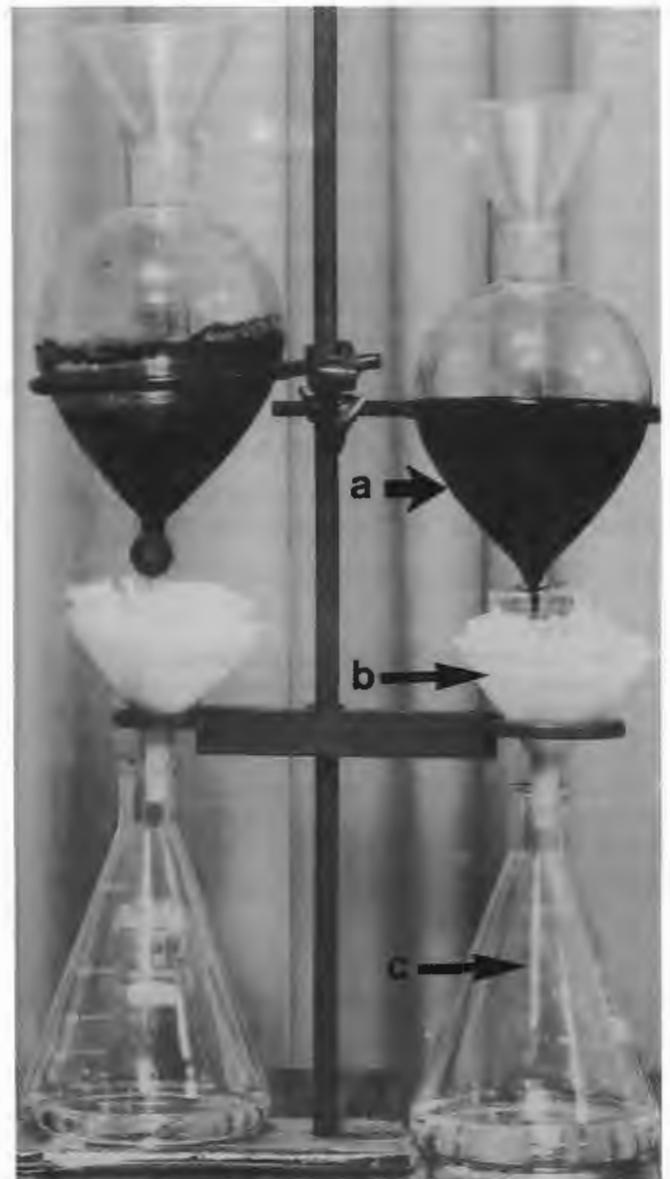


Abb. 5a: Vorrichtung zur Reinigung der Entfärbelösungen über Aktivkohle. a = Scheidetrichter mit feingemahlener Aktivkohle; b = Trichter mit Faltenfilterpapier; c = Auffanggefäß.

Fraktion aus (Niederschlag I), die für die Isolierung von IgM, IgG<sub>1</sub> und Transferrin diene. Durch die Sättigung des Überstandes (Überstand 1, Abb. 8) zu 41 % mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung präzipitiert man die wasserlöslichen Immunglobuline (Ciuperescu, 1977). Aus dem Überstand 1 (Abb. 8) wurden auch  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Albumin isoliert.

#### 1.2.11 Isolierung von IgG<sub>1</sub>, Albumin, $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin aus der Molke

Wegen ihres hohen Gehaltes an IgG<sub>1</sub> diene Kolostralmilch vom 1. und 2. Gemelk als Ausgangsmaterial. Die Bearbeitung der Molke ist im Flußdiagramm auf der Abb. 9 dargestellt. Auch die Molke wurde, um den größten Teil des IgM zu entfernen, gegen Euppt-Puffer 48 Stunden dialysiert. Der weitere Verlauf ist dem Flußdiagramm der Abb. 9 zu entnehmen. Aus dem Niederschlag 1 (Abb. 9) kann man, wie bei dem Serum beschrieben, das IgM isolieren. Aus dem Überstand 2 (Abb. 9) wurde durch 33%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat die Immunglobulinfraction ausgefällt, aus der durch Säulenchromatographie reines IgG<sub>1</sub> präpariert werden konnte. Durch Sättigung der Molke zu 80 % mit Ammoniumsulfat gewinnt man eine Fraktion (Niederschlag 4, Abb. 9), die auch Albumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin enthält.

#### 1.2.12 Isolierung von IgA

Bei der Isolierung des sekretorischen IgA's haben wir uns weitgehend an die von Butler et al. (1980) publizierte Methode gehalten. Der Fortlauf der einzelnen Arbeitsstufen ist dem Flußdiagramm (Abb. 10) zu entnehmen. Dabei ist

darauf hinzuweisen, daß wir die Arbeiten bei Zimmertemperatur durchgeführt haben und nicht, wie üblich, bei mehr oder weniger 4°C und so zu befriedigenden Ergebnissen gekommen sind.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Isolierung der Proteine aus dem Blutserum

Durch die Dialyse des Blutserums oder der Molke gegen Euppt-Puffer wurde ein Niederschlag (Niederschlag 1, Abb. 8 und 9) gewonnen, der bei der Trennung über Sepharose CL4 B-Säule zwei Peaks ergab (Abb. 11 und 12, A). Nach mehrmaliger Gelfiltration der ersten Fraktion über Sepharose 6 B (Abb. 11, B) und anschließender Reinigung über Sephacryl S 300-Säule konnte reines IgM isoliert werden (Abb. 20-24). Aus der zweiten Hälfte des zweiten Peaks (Abb. 12, A) wurden über Ionenaustauscher zunächst an IgG<sub>1</sub> und Transferrin reiche Fraktionen (Abb. 12, B) gewonnen, die durch mehrmalige Gelfiltration über Sephacryl S 300 (Abb. 12, C,D,E) und Sephadex G 200 (Abb. 12, F) auf höchste Reinheit gebracht wurden (Abb. 20-24).

Die Filtration von Blutserum (Überstand 1, Abb. 8) über Sepharose CL 4 B ergab eine reiche  $\alpha_2$ -Makroglobulinfraction (Abb. 13, A), die durch Reinigung über Sepharose 6 B zu reinem  $\alpha_2$ -Makroglobulin führt (Abb. 20,22). Aus dem durch Albumin enthaltenen Peak (Abb. 14, A) wurde über Ionenaustauscherchromatographie (Abb. 14, B) und Gelfiltration (Abb. 14, C) reines Albumin gewonnen (Abb. 20, 21,24).

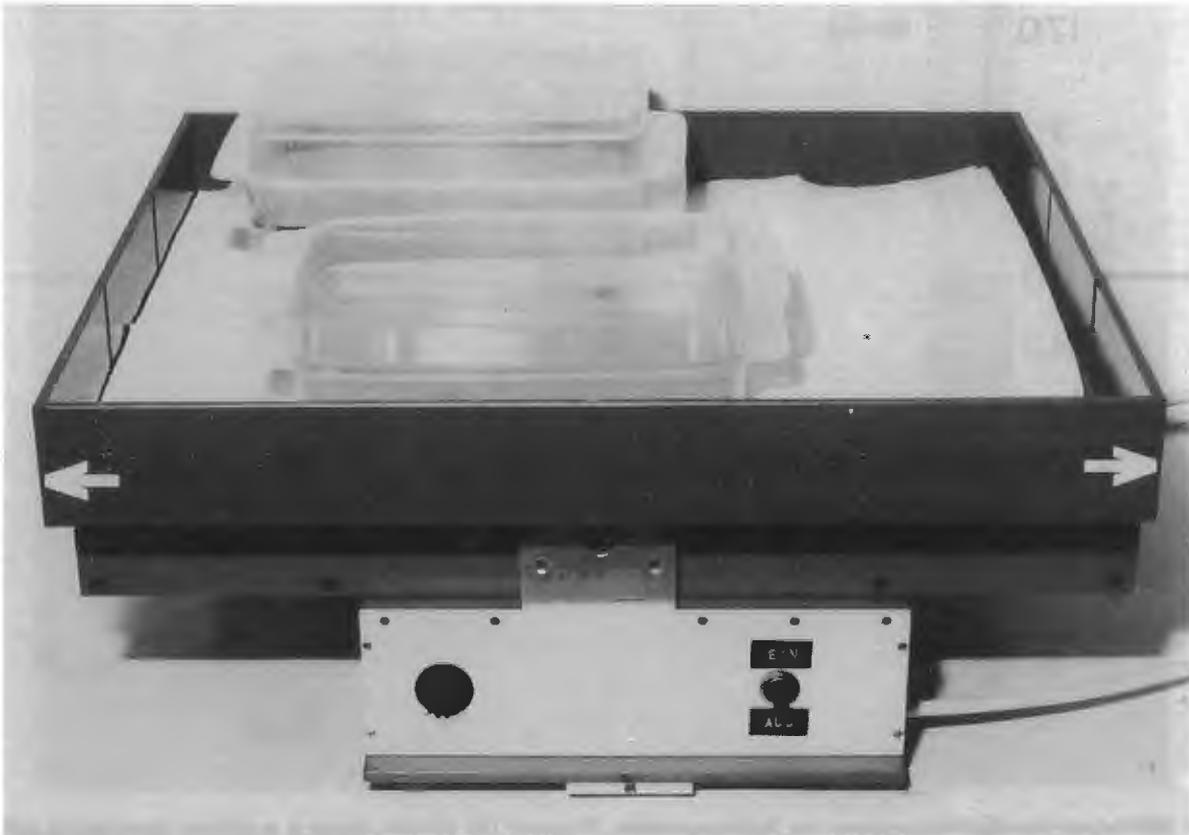


Abb. 5b: Schüttelgerät zum Entfärben der Elektrophoreseplatten. Die Wanne wird waagrecht hin- und herbewegt.

Aus der Immunglobulinfraktion (Niederschlag 2, Abb. 8) wurden IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>1</sub> isoliert. Der erste Peak, der bei der Trennung über DEAE Sephacel Säule (Abb. 15, A) eluiert wurde, war sehr reines IgG<sub>2</sub>. Ein evtl. Vorhandensein anderer Proteine wurde über Sephacryl S 300 entfernt (Abb. 20-24). Bei Anwendung eines linearen Gradienten von 0,02 M auf 0,13 M enthält die zweite Hälfte des ersten Peaks auch IgG<sub>1</sub> (Abb. 15, A), der durch Gelfiltration über Sephacryl S 300 gereinigt wurde (Abb. 15, B). Auch bei dem Auftragen des Niederschlages 2 (Abb. 8) auf eine DE 52-Zellulose-Säule wurde unter Anwendung des Gradienten von 0,02 M auf 0,15 M im ersten Peak das IgG<sub>2</sub> eluiert (Abb. 16). Die Reinigung der IgM und IgG<sub>1</sub>-Proben erfolgte entsprechend ihrer Molekulargewichte über Sepharose 6 B und Sephacryl S 300. Die Ergebnisse der Überprüfungen auf die Reinheit sind auf den Abbildungen 20-24 dargestellt.

## 2.2 Isolierung der Proteine aus der Molke

Die Fällung der Immunglobulin-Rohfraktion erfolgte durch Sättigung der Molke zu 33 % mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Die so gewonnene Fraktion dient zur Isolierung von IgG<sub>1</sub>. Die Abb. 17 zeigt das Elutionsdiagramm dieser Fraktion über Sepharose CL 4 B (A) und die weitere Reinigung der IgG<sub>1</sub>-reichen Peaks über Sephacryl S 300 (B). Für die Überprüfung der Reinheit wurden Immunelektrophorese (Abb. 20), zweifache Diffusion (Abb. 20,23) und SDS-Elektrophorese (Abb. 21) eingesetzt.

Der Niederschlag 3 (Abb.9) enthält eine hohe Konzentration an freien sekretorischen Komponenten und der Niederschlag 4 (Abb. 9) an Albumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin. Beim Eluieren aus der CM-Sephadex-C 50 Säule mit Gradienten (Abb. 18, A) erscheinen Albumin und  $\beta$ -Lactoglobulin bei 0,05 M NaCl, Lactoferrin bei 0,3 M. Entsprechende Fraktionen reinigten wir meist über Sephacryl S 300 (Abb. 18, B,C,D). Durch mehrmalige Gelfiltration über Sephadex G 200 wurden reines Albumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin gewonnen (Abb. 20,21).

## 2.3 Isolierung des sekretorischen Immunglobulin A (SIgA)

Gelfiltration des 50 %igen Niederschlages aus der Lungenwäsche (Niederschlag 1, Abb. 10) über Sepharose 6 B hat zwei Peaks ergeben (Abb. 19, A), von denen der erste reich an IgA war. Für die weitere Reinigung wurde diese Fraktion mehrmals auf die Sephacryl S 300-Säule gebracht (Abb. 19, B). Auf den Abbildungen 20 und 21 sind die Ergebnisse der elektrophoretischen Überprüfungen und auf den Abbildungen 22 und 23 die Ergebnisse der Doppeldiffusion auch für IgA zu finden.

## 2.4 Reinigung von Antisera durch Affinitätschromatographie

Das Schwein hat sich als ausgezeichneter Antisera-Produzent erwiesen. Nach drei- bis viermaliger Immunisierung

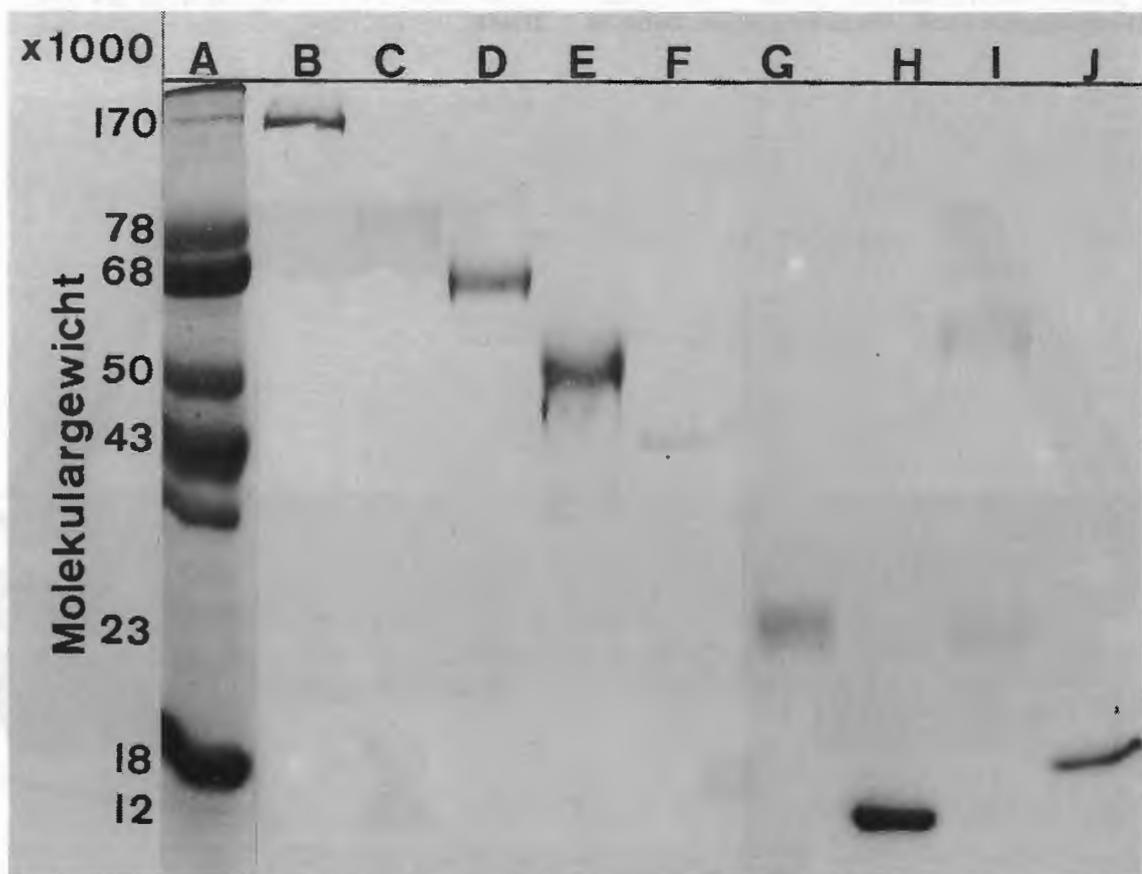
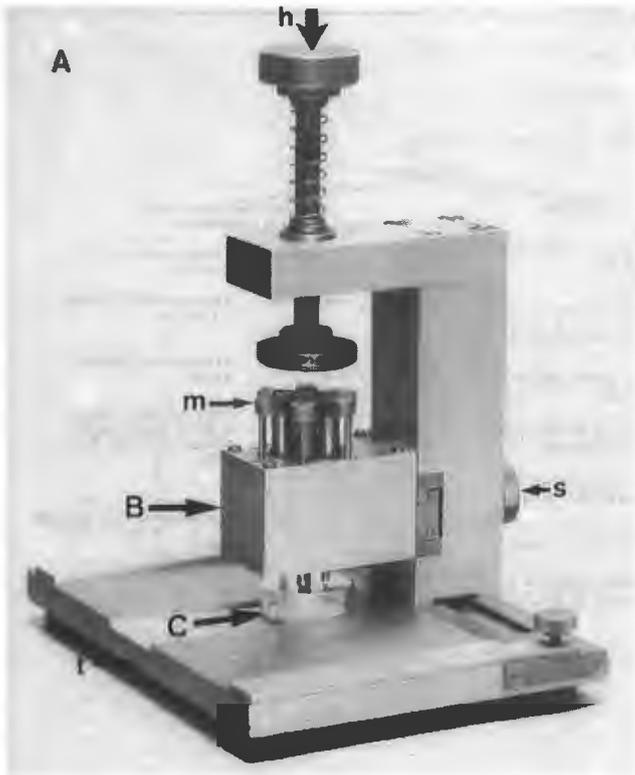


Abb. 6: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Referenzproteine. Trennzeit 105 Minuten. Strom 6 mA/Probe; Spannung am Anfang der Trennung 165, am Ende 370 V. A = Standardgemisch; B = Schweine  $\alpha_2$  Makroglobulin; C = Rinder Lactoferrin; D = Rinder-Serum Albumin; E = Schwere Kette von Schweine-IgG; F = Hühnererei-Albumin; G = Leichte Kette von Schweine-IgG; H = Cytochrom C; I = Schweine IgG; J = Schaf  $\beta$ -Lactoglobulin.



mit reinen Antigenen zeigen alle Tiere in der Immunelektrophorese starke Präzipitationslinien (Abb. 25).

Die Antiseren wurden zunächst 24 Stunden gegen 0,02 M TBS, pH 7,9, dialysiert, wobei der Puffer zweimal gewechselt werden muß. Einmalige Gabe von 5 ml Antiserum auf eine entsprechende 10 ml Affinitätssäule war ausreichend, um die für die Radialdiffusion benötigte Monospezifität der Antiseren zu erhalten. Die Ergebnisse einer immunoelektrophoretischen Überprüfung der Blutseren vor und nach der Reinigung über die Affinitätssäulen sind auf Abb. 25 zu sehen. Um die Monospezifität zu kontrollieren, haben wir die Immunelektrophorese (Abb. 26), die Doppeldiffusion (Abb. 27,28) und die radiale Immundiffusion (Abb. 29) angewendet.

### 3 Diskussion

Die in der Arbeit dargestellten Verfahren zur Isolierung einiger Proteine aus Blutserum, Molke und Lungenwäsche des Schafes sind Ergebnisse von Versuchen, in denen die Brauchbarkeit von publizierten Methoden zur Isolierung von Immunglobulinen aus Körperflüssigkeiten anderer Tier-

Abb. 7a: Stanze für Doppeldiffusionstechnik. A = Komplettes Gerät; B = Stanzkopf; C = Petrischale mit Agar. Die Petrischale mit Agar wird auf den Tisch (t) gelegt und die Messerhülsen (m) über den Drücker (h) nach unten gedrückt. Zum Auswechseln der Messerhülsen (m) kann man nach dem Lösen einer Schraube (S) den Stanzkopf (B) herausnehmen.

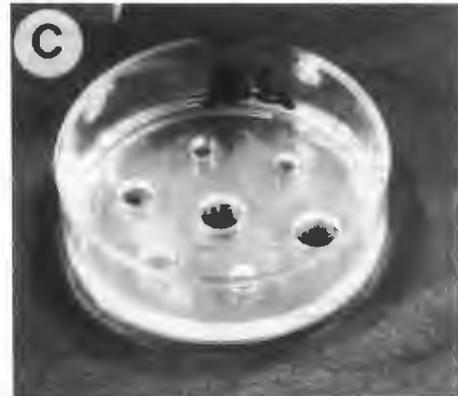
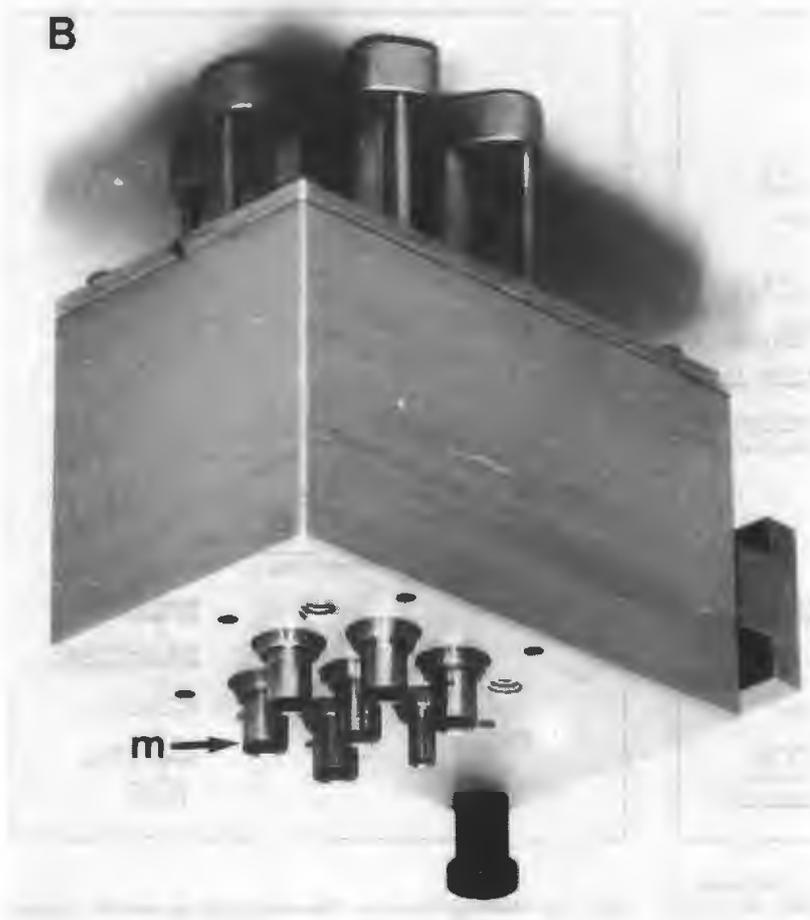


Abb. 7b: Stanzkopf (B) für Doppeldiffusionstechnik. Die Messerhülsen (m) sind auswechselbar. Man kann die Größen der Löcher ( $\phi$ ) beliebig variieren, wobei der Abstand zwischen dem Mittelloch und dem Stanzrand der äußeren Löcher konstant ist.

Petrischale (C) mit Agar. Die ausgestanzten Löcher haben unterschiedliche Durchmesser.

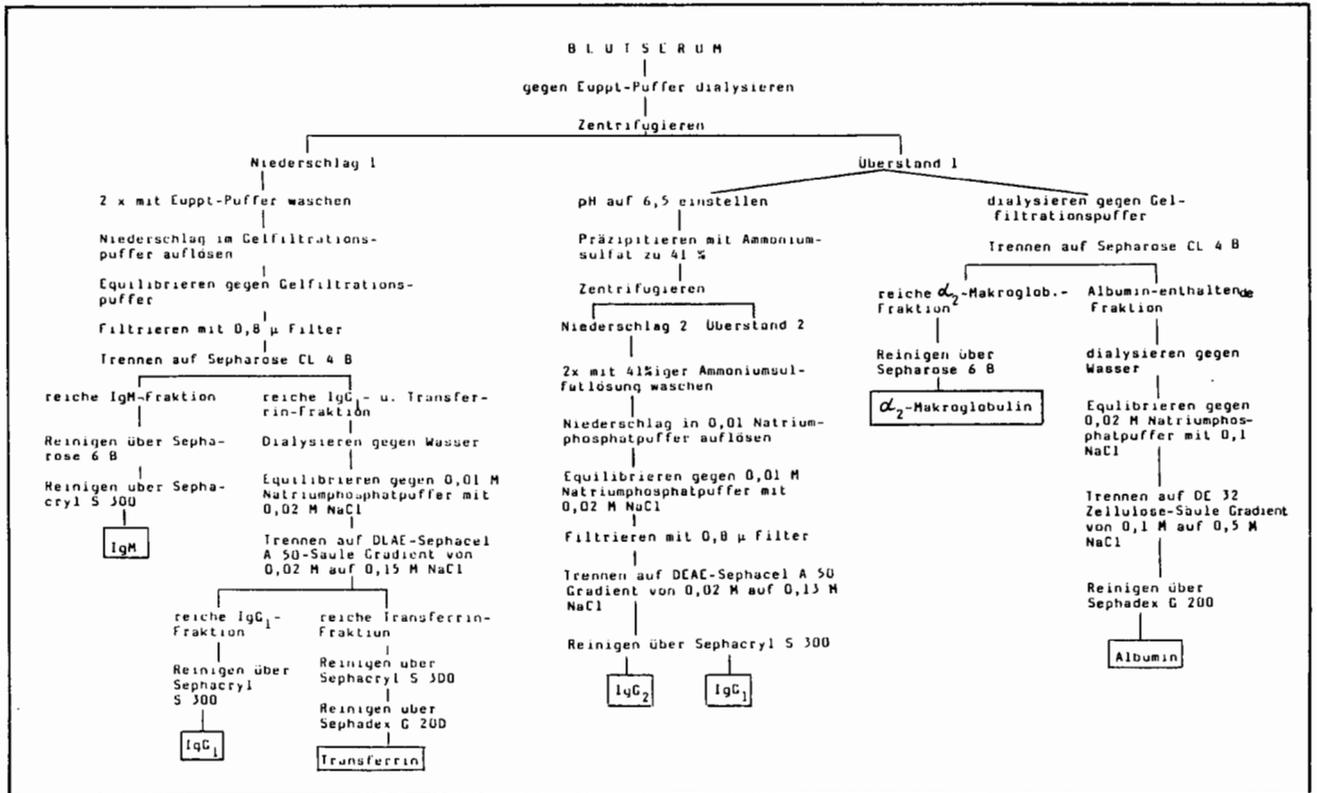


Abb. 8: Flußdiagramm über Präparation von IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM, Transferrin, α<sub>2</sub> Makroglobulin und Albumin aus dem Blutserum des Schafes.

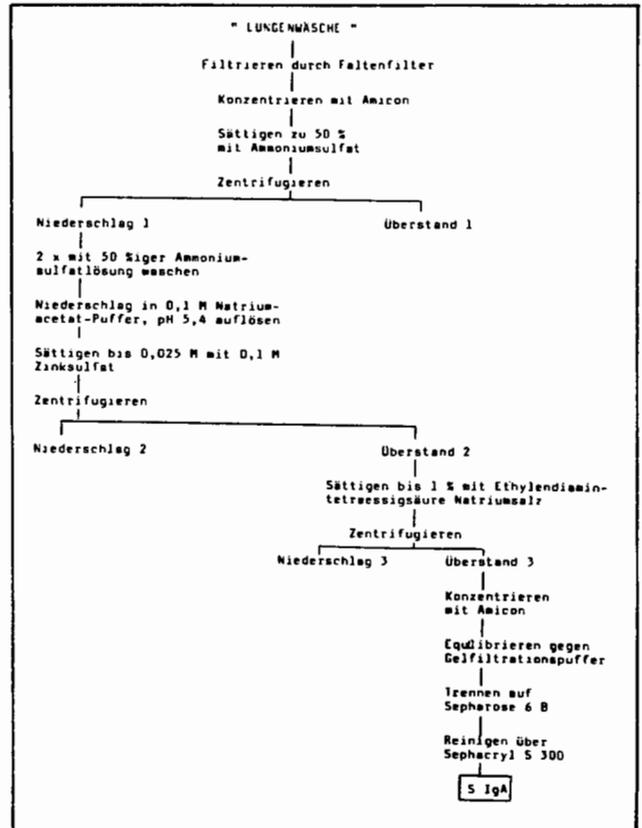
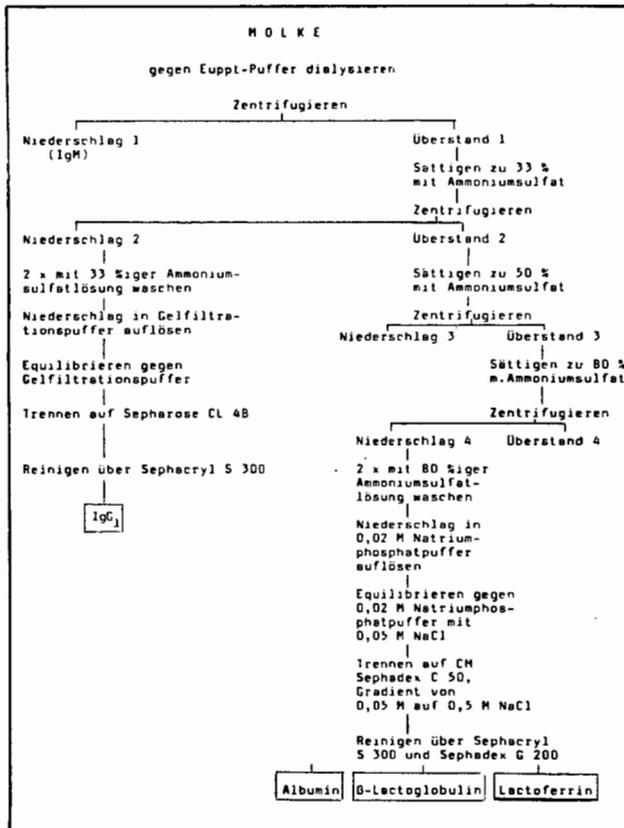


Abb. 9: Flußdiagramm über Präparation von IgG<sub>1</sub>, Albumin, β-Lactoglobulin und Lactoferrin aus der Molke der Schafmilch.

Abb. 10: Flußdiagramm über Präparation von IgA aus der „Lungenwäsche“ beim Schaf.

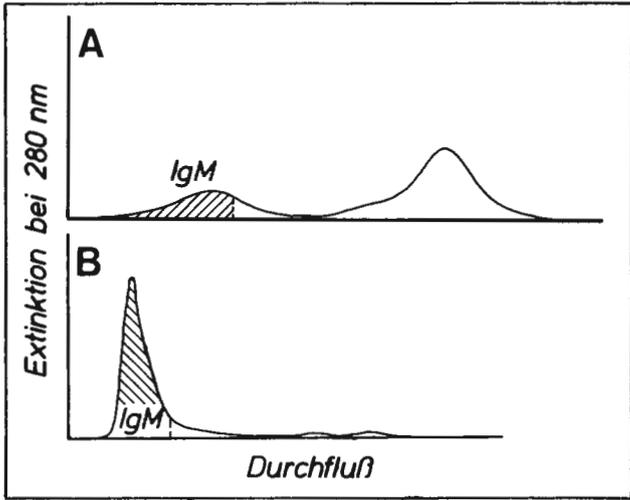


Abb. 11: Elutionsdiagramm vom Niederschlag des Blutserums nach der Dialyse gegen Euglobulinpräzipitationspuffer (Niederschlag 1, Abb. 9) über Sepharose CL 4 B (A) und weitere Reinigung der IgM-Fraktion über Sepharose 6 B-Säule (B).

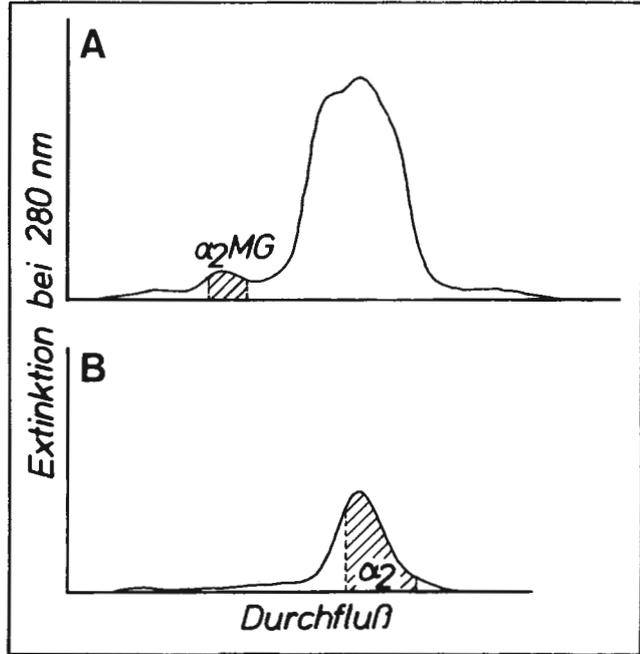


Abb. 13: Elutionsdiagramm des Blutserums (Überstand 1, Abb. 9) über Sepharose CL 4 B-Säule (A) und weitere Reinigung der  $\alpha_2$ -Makroglobulin reichen Fraktion über Sepharose 6 B-Säule (B).

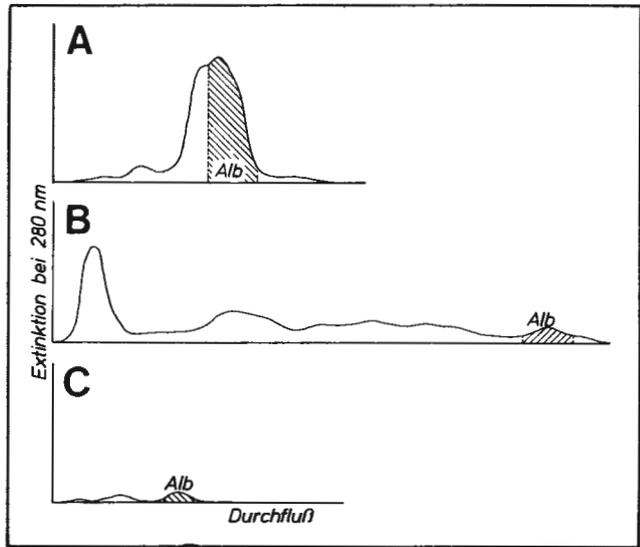
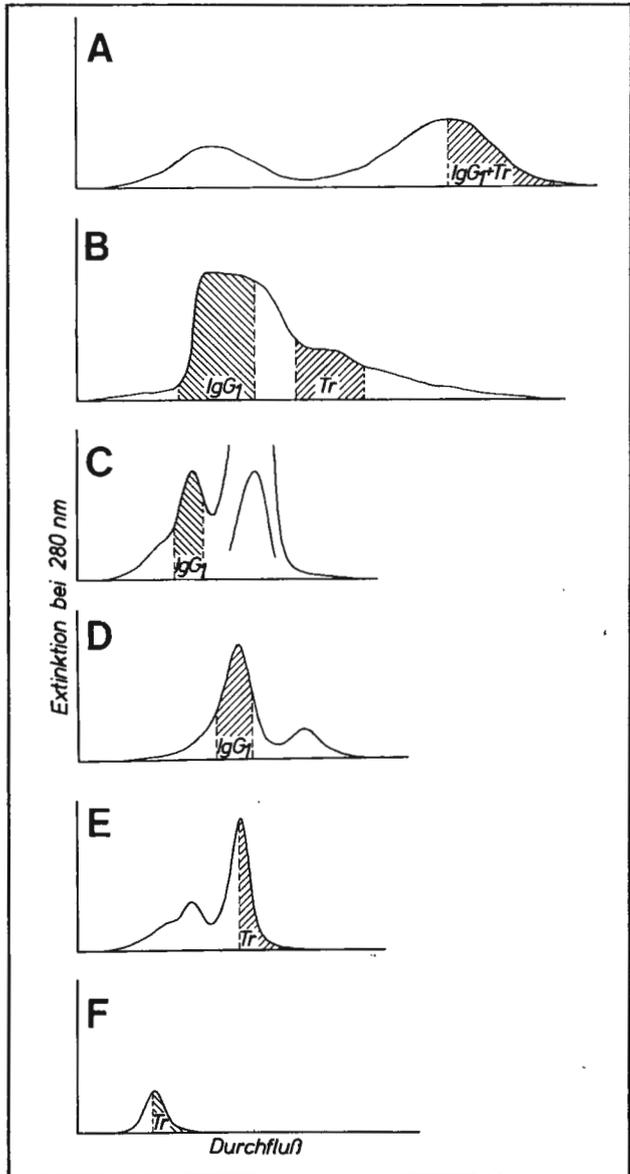


Abb. 14: Elutionsdiagramm des Blutserums (Überstand 1, Abb. 9) über Sepharose CL 4 B-Säule (A), weitere Präparation des Albumins über DE 32-Zellulose-Säule durch Anwendung des Gradienten von 0,1 M auf 0,5 M NaCl (B); Reinigung der Albumin-reichen Fraktion über Sephadex G 200 (C).

Abb. 12: Elutionsdiagramm vom Niederschlag des Blutserums nach der Dialyse gegen Euglobulin-Präzipitationspuffer (Niederschlag 1, Abb. 9) über Sepharose CL 4 B-Säule (A), der an IgG<sub>1</sub> und Transferrin reichen Fraktion über DEAE Sephacel A-50-Säule mit Gradienten von 0,05 auf 0,15 mol pro Liter (B) und weitere Reinigung der IgG<sub>1</sub>-Fraktion über Sephacryl S 300 (C, D) und der Transferrinfraktion über Sephacryl S-300 (E) und Sephadex G 200 (F).

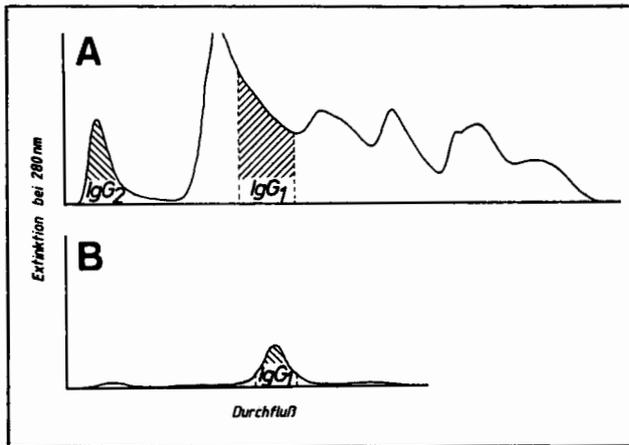


Abb. 15: Elutionsdiagramm von 41%igem Niederschlag des Blutserums (Niederschlag 2, Abb. 9) über DEAE-Sephacel A-50-Säule (A). Elution des IgG<sub>2</sub> mit 0,02 mol, danach Gradient von 0,05 auf 0,13 mol. Weitere Reinigung der IgG<sub>1</sub>-Fraktion über Sephacryl S-300 (B).

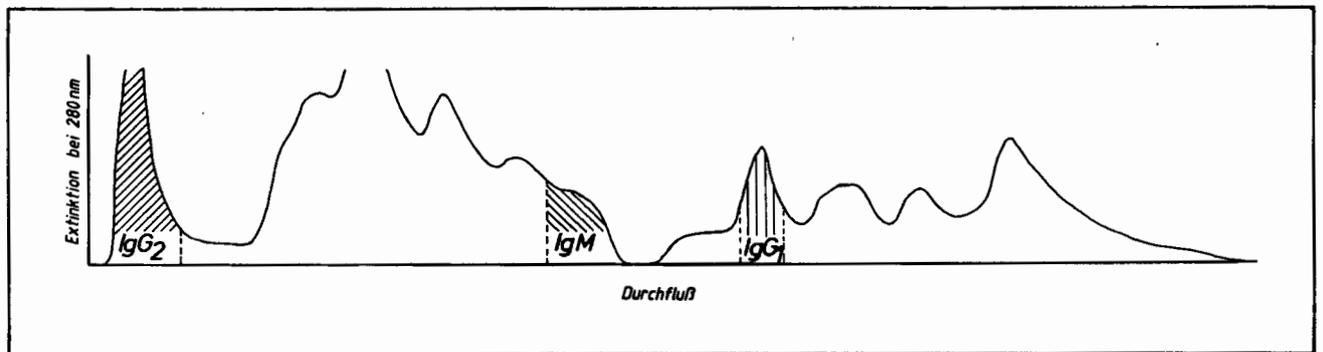


Abb. 16: Elutionsdiagramm von 41%igem Niederschlag des Blutserums (Niederschlag 2, Abb. 9) über DE 52-Zellulose-Säule. Gradient von 0,02 auf 0,15 mol/Liter.

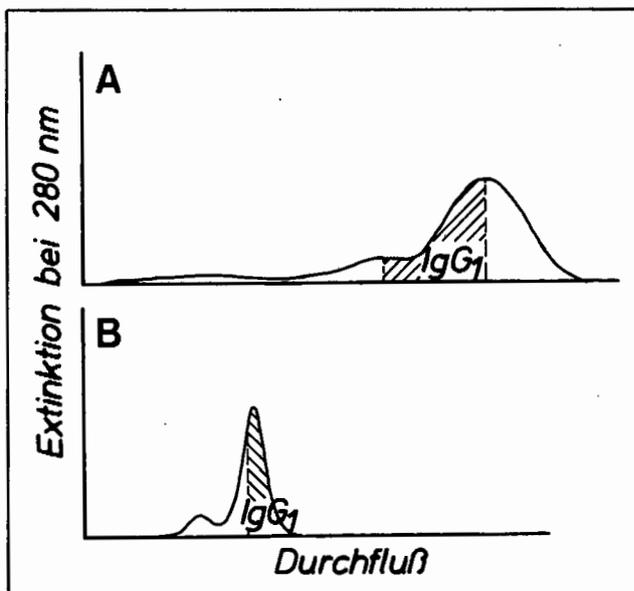


Abb. 17: Elutionsdiagramm von 33%igem Niederschlag der Molke (Niederschlag 2, Abb. 10) über Sepharose Cl 4 B-Säule (A) und weitere Reinigung der IgG<sub>1</sub>-reichen Fraktion über Sephacryl S-300-Säule (B).

arten (Cambier und Butler, 1974, Butler et al., 1980, Ciuperescu, 1977, Habe, 1974) für die Anwendung beim Schaf erprobt wurde.

Die Anwendung einer Methode, die bei einer Tierart zur Isolierung eines bestimmten Proteins führt, bringt bei einer anderen Tierart kaum den gleichen Erfolg. Um zu befriedigenden Ergebnissen zu gelangen, sind einige Modifikationen erforderlich. Der Grund hierfür kann in den verschiedenen Eigenschaften der Proteine wie Molekulargewicht, elektrophoretische Mobilität und Elutionsverhalten, um nur einige zu nennen, liegen. Auch der technische Fortschritt – Verbesserung und Neuentwicklung von Geräten – führt zu besseren Resultaten einzelner Isolierungsverfahren. Aus den Bemühungen, eine Methode zu verbessern, ergibt sich nicht selten, daß ein bestimmter Schritt überflüssig wird.

Es gibt Verfahren, die zur Präparation z. B. eines einzelnen Proteins aus den Körperflüssigkeiten führen, aber auch solche, bei denen man in einem Schritt gleichzeitig mehrere Proteine isolieren kann. Zu solchen Isolierungsverfahren gehören Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie.

So war es möglich, aus dem Niederschlag, gewonnen durch die Dialyse des Blutserums gegen Euppt-Puffer, mit Gelfiltration über Sepharose CL 4 B, gleichzeitig die drei Proteine: IgM, IgG<sub>1</sub> und Transferrin zu isolieren (Abb. 12,13). Der Anteil an  $\alpha_2$ -Makroglobulin in der IgM-Fraktion war im Vergleich zum Schwein viel geringer und ließ sich über Sepharose 6 B leicht entfernen.

Noch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Tierarten wurde festgestellt. Die Auftrennung des Schaf-Niederschlags über Sepharose CL 4 B ergab zwei fast gleichgroße Fraktionen, dagegen war beim Schwein der zweite Peak wesentlich größer als die IgM enthaltene Fraktion. Die Dauer der Dialyse hat verschiedene Auswirkungen; wurde sie über 36 Stunden hinaus ausgedehnt, so vergrößerte sich die Menge an Niederschlag, gleichzeitig aber erhöhte sich der Anteil an unerwünschten Proteinen, was zu keiner höheren Ausbeute an reinem Protein führen konnte. Aus dem durch Sättigung der Molke zu 80 % mit Ammoniumsulfat gewonnenen Niederschlag war es möglich, über den Kationenaustauscher CM Sephadex C 50 und unter Anwendung des Gradienten von 0,05 auf 0,4 mol NaCl/Liter die drei Proteine: Albumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin gleichzeitig zu erhalten (Abb. 18).

Man kann Immunglobuline und Albumin sowohl aus dem Blutserum als auch aus der Molke isolieren. Um ein be-

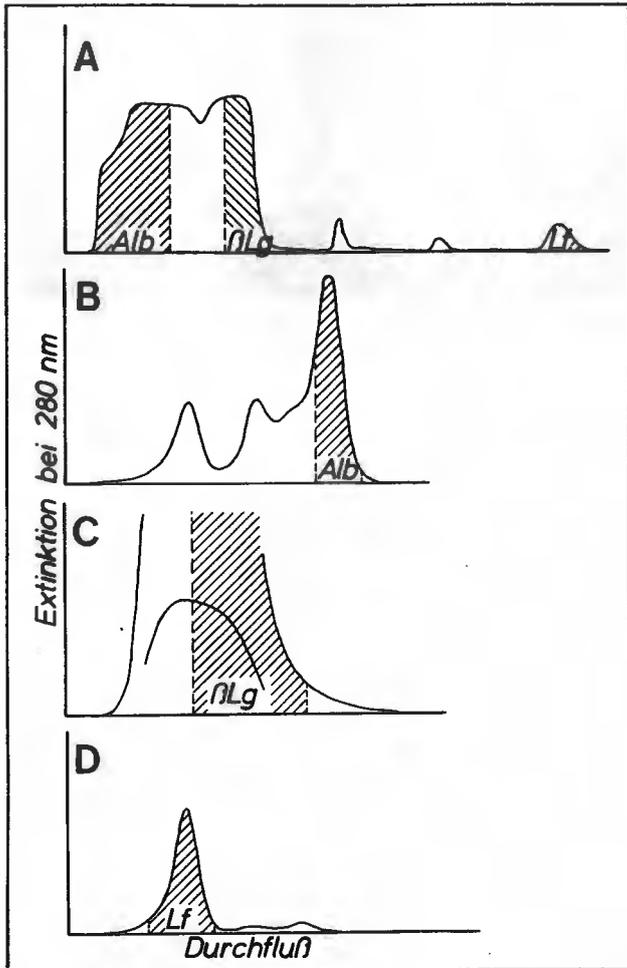


Abb. 18: Elutionsdiagramm von 80%igem Niederschlag der Molke (Niederschlag 4, Abb. 10) über CM-Sephadex C-50-Säule (A) und weiterer Reinigung der Albumin- (B), der  $\beta$ -Lactoglobulin (C) und der Lactoferrinfraktion (D) über Sephacryl-S-300-Säule.

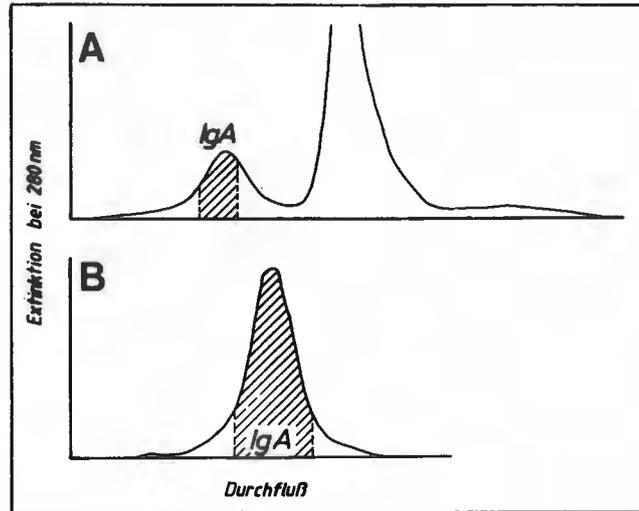


Abb. 19: Elutionsdiagramm der an IgA reichen Probe aus der Lungenwäsche (Überstand 3, Abb. 11) über Sepharose 6 B-Säule (A) und weitere Reinigung der IgA-Fraktion über Sephacryl S 300-Säule (B).

stimmtes Protein zu gewinnen, muß man bei der Präparation aus dem Blutserum andere Trennschritte als bei der Isolierung aus der Molke anwenden (Abb. 15 und 17). Dieses wurde für IgG<sub>1</sub> und Albumin ermittelt. Weiterhin gelang es uns, IgG<sub>1</sub> aus dem Blutserum durch zwei verschiedene Methoden zu gewinnen (Abb. 15 und 16).

IgG<sub>2</sub> war das einzige Immunglobulin, das durch nur einen Trennungsschritt in reiner Form isoliert werden konnte. Dieses Protein zeigt sich im ersten Peak, das als nicht gebundenes Material beim Auftragen der Immunglobulinfraktion auf einen Anionenaustauscher mit 0,02 mol/Liter NaCl eluiert wurde. Die Trennung auf zwei verschiedenen Gelen und Puffern hat die gleichen Ergebnisse gebracht (Abb. 15 und 16).

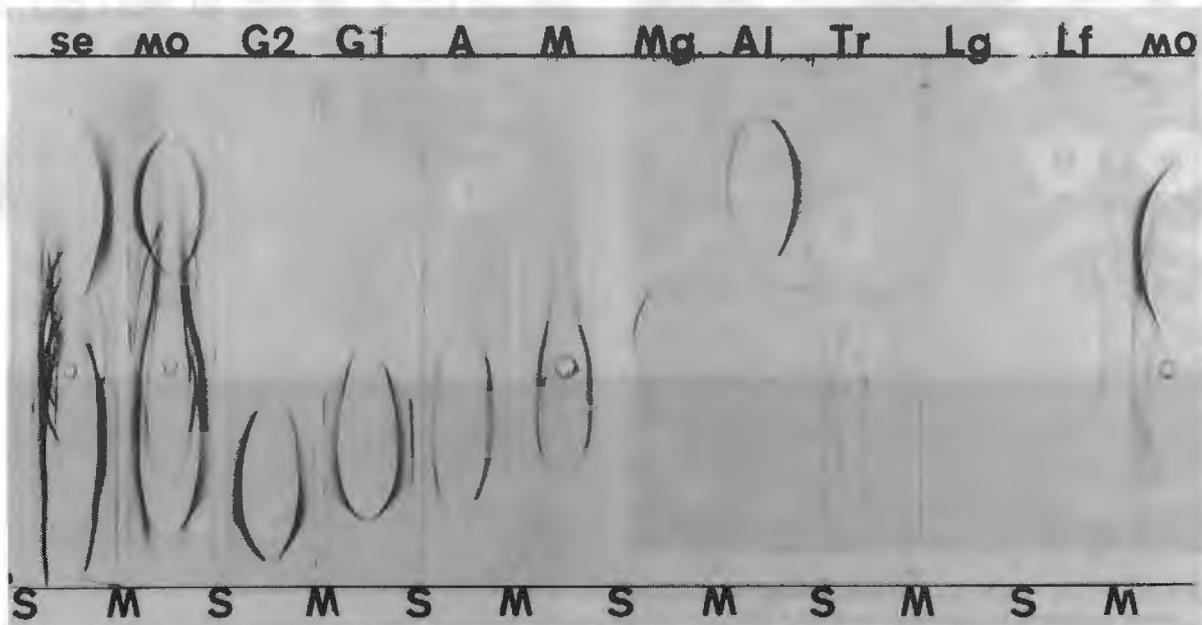


Abb. 20: Immunelektrophorese der isolierten Schafproteine: se = Blutserum; mo = Molke; G<sub>2</sub> = IgG<sub>2</sub>; G<sub>1</sub> = IgG<sub>1</sub>; A = IgA; M = IgM; Mg =  $\alpha_2$  Makroglobulin; Al = Albumin; Tr = Transferrin; Lg =  $\beta$ -Lactoglobulin; Lf = Lactoferrin; Antiseren: S = Kaninchen anti Schaf Blutserum; M = Kaninchen anti Schaf Molke.

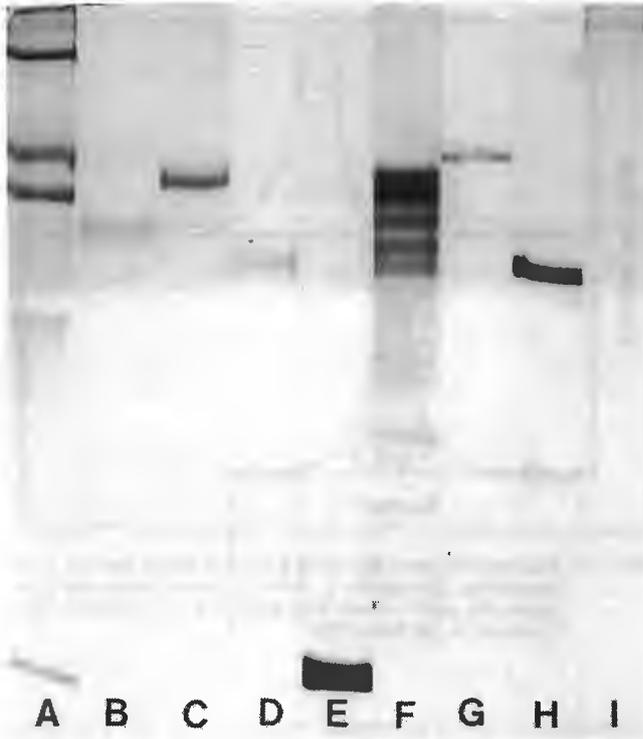


Abb. 21: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der präparierten Schafproteine: A = Standard (s. Abb. 6); B = SIgA; C = IgM; D = IgG<sub>1</sub>; E =  $\beta$ -Lactoglobulin; F = Albumin; G = Lactoferrin; H = IgG<sub>2</sub>; I =  $\alpha_2$  Makroglobulin.

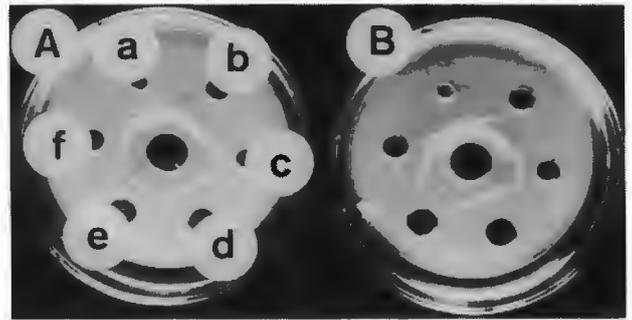


Abb. 22: Prüfung von Schaf-Immunglobulinen gegen anti-Blutserum (A) und anti-Molke (B). Im Kreis: a = Blutserum (bei B Molke); b = IgG<sub>2</sub>; c = IgM; d = IgA; e =  $\alpha_2$  Makroglobulin; f = IgG<sub>1</sub>.

Entscheidend für eine erfolgreiche Isolierung des IgA's aus der Lunge sind ihre saubere Entnahme und die Durchführung der Arbeiten bei Zimmertemperatur. Es darf zu keiner Kontamination mit Blut, das IgG<sub>1</sub> enthält, kommen.

Die Ausfällung des Kaseins mit einer Erniedrigung des pH-Wertes hat bei der Kolostralmilch kaum zu befriedigenden Ergebnissen geführt. Oftmals haben wir keine Molke erhalten. Bei Verwendung von Labpulver sind solche Probleme selten aufgetreten. Dieses wurde nicht nur bei Kolostrum vom Schaf, sondern auch bei Schweine-, Kuh- und Ziegenkolostrum festgestellt. Auf die Immunglobuline hat das Lab keinen Einfluß.

Die Erfahrungen haben gezeigt, daß beim Auftragen auf eine 10 ml Affinitätssäule das Volumen von 5 ml Antiserum nicht überschritten werden soll. Bei solchen Mengen war eine einmalige Gabe auf die entsprechende Affinitätssäule ausreichend (Abb. 25), um für die Radialdiffusion benötigte Monospezifität der Antiseren zu erhalten (Abb. 29).

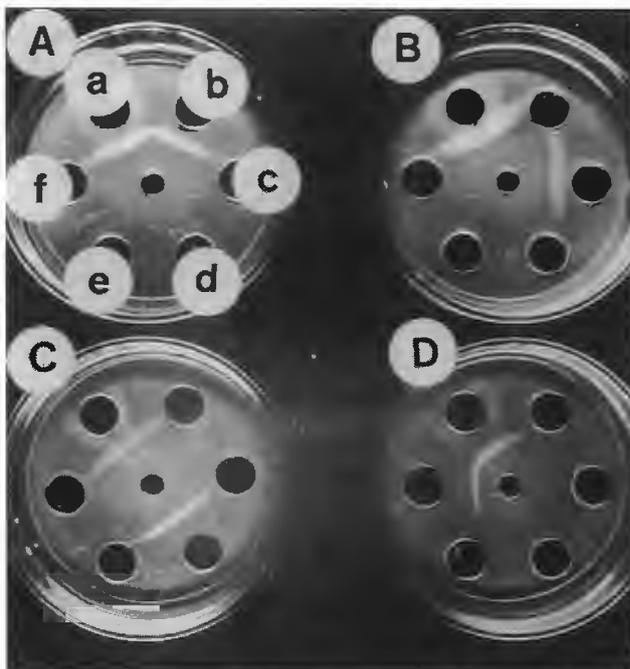


Abb. 23: Prüfung von Schaf-Immunglobulinen mit monospezifischen Antiseren. Im mittleren Loch: A = IgG<sub>2</sub>; B = IgG<sub>1</sub>; C = IgA; D = IgM. Im Kreis bei allen Prüfungen die gleichen Antiseren: a = SAK-Sh-Serum (bei C SAK-Sh Molke); b = SAK-Sh IgG<sub>2</sub>; c = SAK-Sh IgG<sub>1</sub>; d = SAK-Sh IgA; e = SAK-Sh  $\alpha_2$  Makroglobulin; f = SAK-Sh IgM.

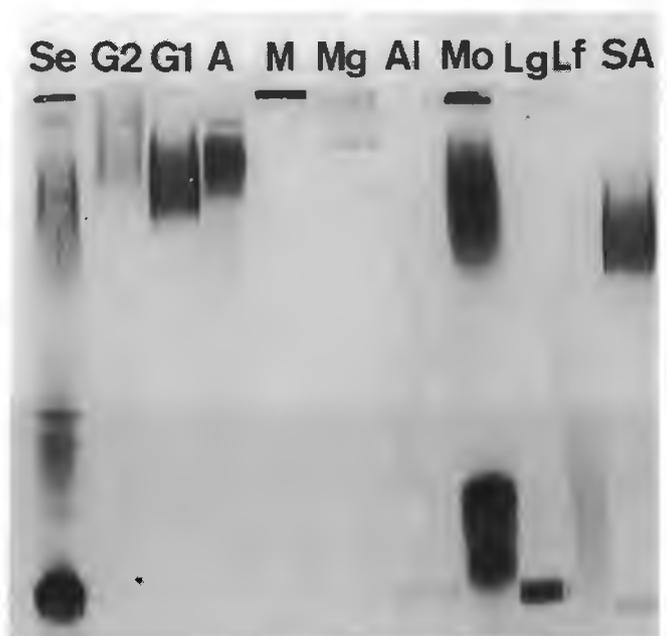


Abb. 24: Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Se = Blutserum; G<sub>2</sub> = IgG<sub>2</sub>; G<sub>1</sub> = IgG<sub>1</sub>; A = IgA; M = IgM; Mg =  $\alpha_2$  Makroglobulin; Al = Albumin; Mo = Molke; Lg =  $\beta$ -Lactoglobulin; Lf = Lactoferrin; SA = SIgA.

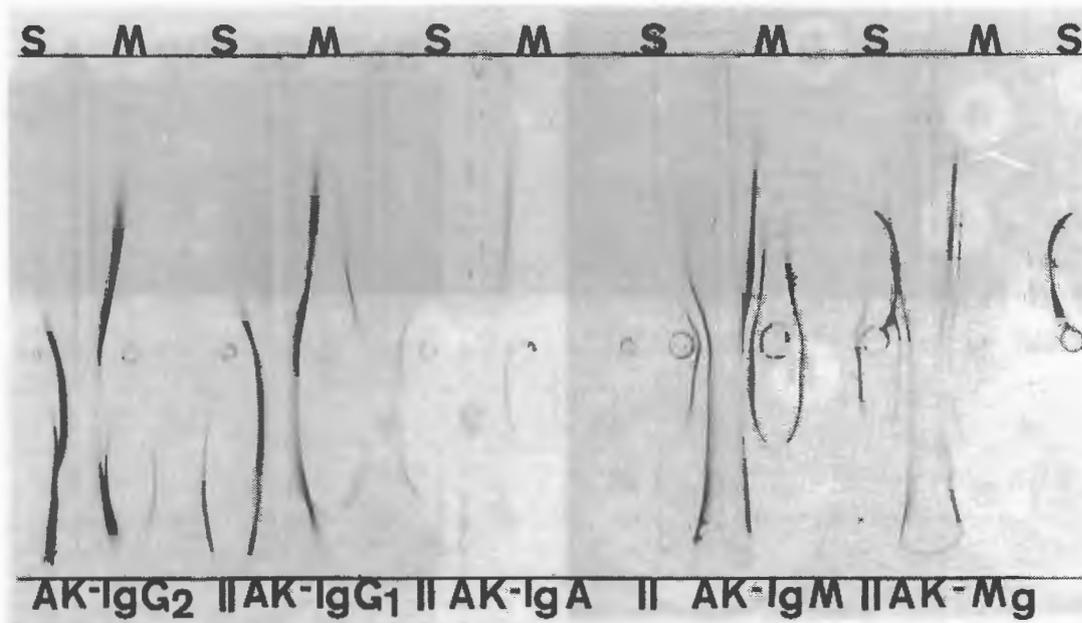


Abb. 25: Immunelektrophoretische Darstellung der Antiseren (durch Immunisierung der Schweine) gegen IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgA, IgM und  $\alpha_2$  Makroglobulin (Mg) vor und nach den Reinigungen über Affinitätssäulen, getestet mit Schaf-Blutserum (S) und Schaf-Molke (M).

Die Ziege hat sich als ungeeignete Tierart zur Gewinnung von Antiseren gegen Schafproteine erwiesen. Es sind mehrere Ziegen mit verschiedenen Immunglobulinen vom Schaf immunisiert worden. Sie haben auch nach 4maligem Boosten keine Reaktion gezeigt. Dagegen haben die Schweine auf Schafproteine sehr gut reagiert, wobei auch individuelle Unterschiede zwischen den Tieren beobachtet wurden.

#### Zusammenfassung

Es sind die Verfahren zur Isolierung von Schaf-Immunglobulinen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA und IgM sowie von Albumin,

Transferrin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin beschrieben worden. Die Gewinnung dieser Proteine aus dem Blutserum, der Molke und bei der Lungenwäsche erfolgte mit Hilfe der Säulenchromatographie: Gelfiltration und Ionenaustauscher-Chromatographie. Die Ergebnisse wurden mit Bildern der Elutionsdiagramme gezeigt. Weiterhin wurde über die Immunisierung der Schweine und Kaninchen mit isolierten Antigenen, über Gewinnung der entsprechenden Antiseren sowie deren Reinigung auf die Monospezifität über Affinitätssäulen berichtet. Die Überprüfung der isolierten Proteine auf Reinheit und der Antiseren auf ihre Monospezifität erfolgte mit Hilfe der Immun-, Polyacrylamidgel- und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese sowie

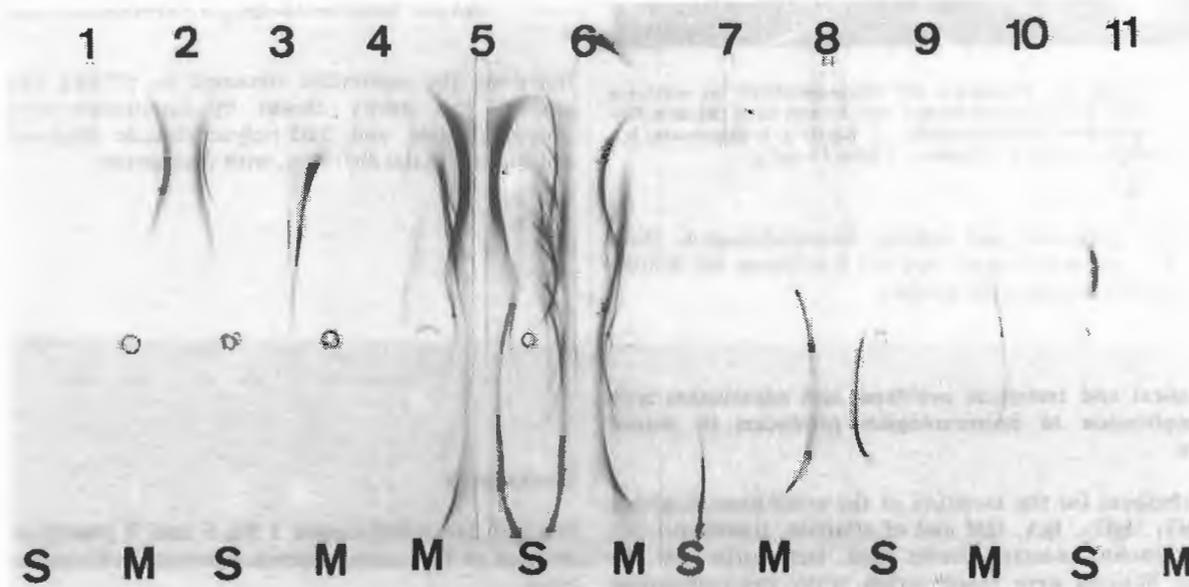


Abb. 26: Immunelektrophoretische Prüfung von Antiseren gegen Schaf-Proteine: 1 = KAK-Sh Transferrin; 2 = KAK-Sh Albumin; 3 = KAK-Sh  $\beta$ -Lactoglobulin; 4 = KAK-Sh Lactoferrin; 5 = KAK-Sh Molke; 6 = KAK-Sh Serum; 7 = SAK-Sh IgG<sub>2</sub>; 8 = SAK-Sh IgG<sub>1</sub>; 9 = SAK-Sh IgA; 10 = SAK-Sh IgM; 11 = SAK-Sh  $\alpha_2$ -Makroglobulin. S = Schafblut-Serum; M = Schaf-Molke.

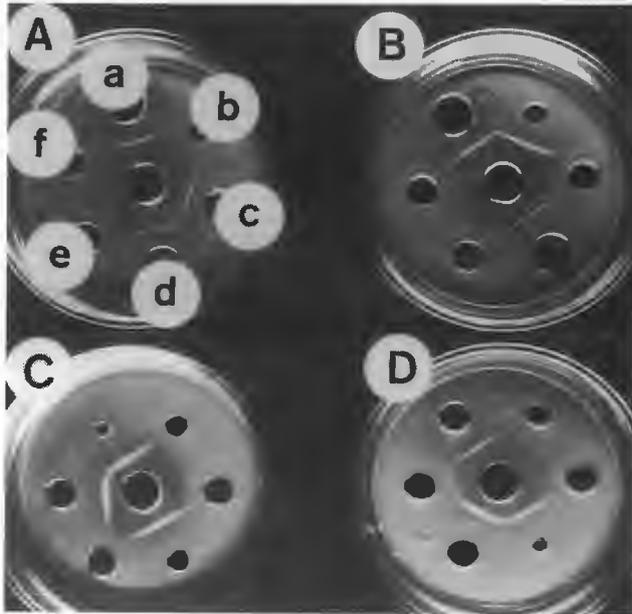


Abb. 27: Prüfung von Antiseren auf Monospezifität. Im mittleren Loch: A = SAK-Sh IgM; B = SAK-Sh IgA; C = SAK-Sh IgG<sub>1</sub>; D = SAK-Sh IgG<sub>2</sub>. Im Kreis bei allen Prüfungen die gleichen Proteine: a = Molke; b = IgA; c = IgM; d = Blutserum; e = IgG<sub>2</sub>; f = IgG<sub>1</sub>.

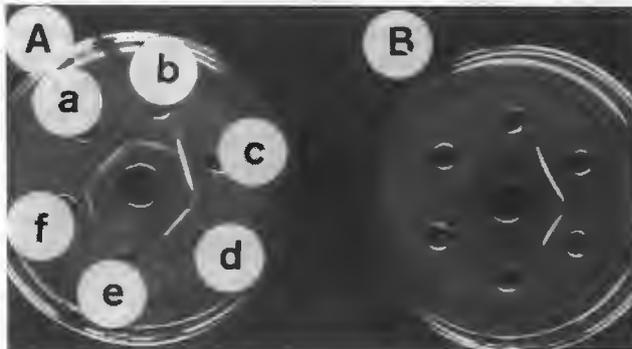


Abb. 28: Prüfung von Antiserum auf Monospezifität. Im mittleren Loch: Schweineanti-Sh IgA vor (A) und nach (B) dem Reinigen über Affinitätsäule. Im Kreis: a = Blutserum; b = IgG<sub>2</sub>; c = IgA; d = Molke; e = IgM; f = IgG<sub>1</sub>.

zweifacher Diffusion und radialer Immundiffusion. Diese Methoden sind beschrieben und die Ergebnisse der Prüfungen mit Bildern dargestellt worden.

#### Methodical and technical problems and experiences with the application of immunological producers in animal science

Techniques for the isolation of the ovine immunoglobulins IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA, IgM and of albumin, transferrin,  $\alpha_2$ -macroglobulin,  $\beta$ -lactoglobulin and lactoferrin are described. Sources were blood serum, whey and lung-lavage; gel filtration and ion-exchange chromatography were employed. Examples of elution diagrams are given. Described are also the immunization of pigs and rabbits with the afore-mentioned proteins, the purification to monospeci-

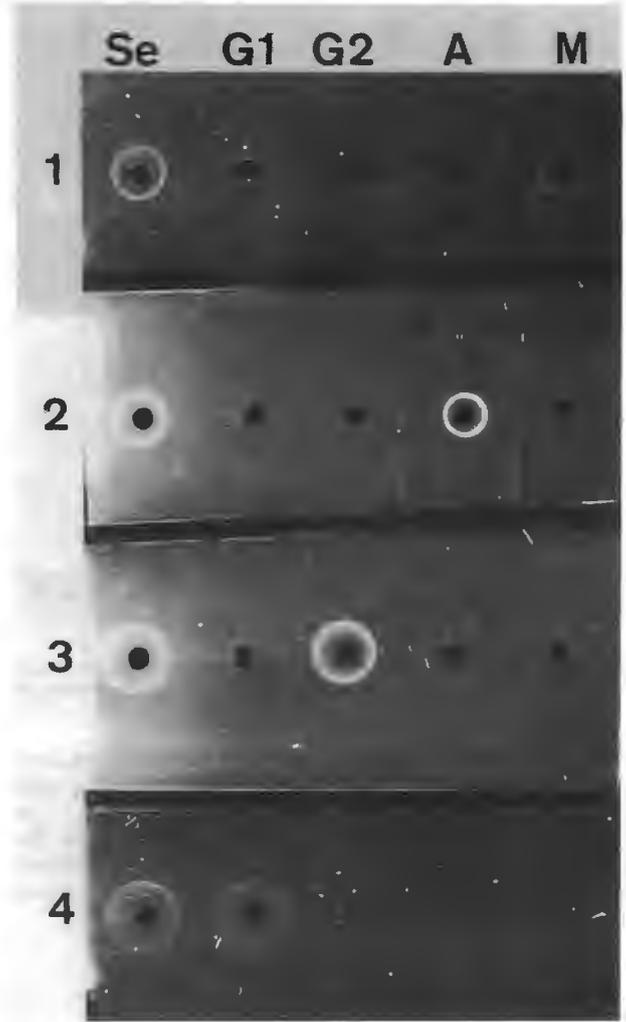


Abb. 29: Radiale Immunodiffusion von reinen Schaf-Immunglobulinen in 1,5%iger Agarose mit monospezifischen Antiseren. Se = Blutserum (bei 2 Molke); G<sub>1</sub> = IgG<sub>1</sub>; G<sub>2</sub> = IgG<sub>2</sub>; A = IgA; M = IgM. 1 = Schweine-AK-IgM; 2 = Schweine-AK-IgA; 3 = Schweine-AK-IgG<sub>2</sub>; 4 = Schweine-AK-IgG<sub>1</sub>.

ficity of the antibodies obtained by affinity chromatography and purity checks by immunoelectrophoresis, polyacrylamide and SDS-polyacrylamide electrophoresis, double and radial diffusion, with illustration.

#### Danksagung

Die auf den Abbildungen 1 bis 5 und 7 gezeigten Geräte wurden in der institutseigenen Feinmechanikerwerkstatt gebaut.

Mein Dank gilt Herrn Klaus B r e i e r , der bei der Anfertigung dieser Geräte hervorragende Arbeit geleistet hat. Ebenfalls möchte ich Herrn Dieter B u n k e für die Anfertigung der Bilder danken.

## Literatur

- Butler, J.E., Peterson, L. und McGivern, P.L.: A reliable method for the preparation of bovine secretory immunoglobulin A (SIgA) which circumvents problems posed by IgG<sub>1</sub> dimers in colostrum. – *Molecular immunology* 17 (1980), S. 757-768.
- Cambier, J.C. und Butler, J.E.: A rapid method for the purification of immunoglobulin M (IgM) from the sera of certain mammalian species. – *Prep. Biochem.* 4 (1974), S. 31-46.
- Ciupercescu, D.D.: Dynamics of serum immunoglobulin concentrations in sheep during pregnancy and lactation. – *Res. vet. Sci.* 22 (1977), S. 23-27.
- Habe, F.: Die quantitativen Veränderungen der Immunglobuline im Blutserum der Ferkel bei verschiedenen Aufzuchtverfahren. – Dissertation, Gießen 1974.
- Klobasa, F., Habe, F. und Werhahn, E.: Immunglobulin-Konzentrationen im Blutserum von Sauen. – *Landbauforschung Völkenrode* 33 (1983), S. 243-250.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. – *Nature* 227 (1970), S. 680-685.
- Mancini, G., Vaerman, J.P., Carbonara, A.D. und Heremans, J.J.: A single-diffusion method for the immunological quantitation of proteins. – *Protides Biol. Fluids* 11 (1965), S. 370-373.
- Scheidtger, J.J.: Une micro-methode de l'immuno-electrophorese. – *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 7 (1955), S. 103-110.
- Schmitt, J.: Das Differenzieren tierischer Proteine mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. I. Grundlagen, Methodik, Serumproteine des Rindes. – *Deutsch. Tierärztl. Wsch.* 75 (1968), S. 87-91.
- Verfasser: Klobasa, Franc, Dr. agr., Institut für Tierzucht und Tiervershalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsteil Mariensee, Institutsleiter: Professor Dr. med. vet. Dr. sc. agr. D. Smidt.