

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 25 1990

Immunkemisk detektion af
mikroorganismer i miljøprøver

Miljøministeriet **Miljøstyrelsen**

Strandgade 29, 1401 København K, tlf. 31 57 83 10

57.08 : 579

B11

Ex. 2

3734

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, nr. 25/1990

Immunkemisk detektion af
mikroorganismer i miljøprøver

Ole Nybroe
Vandkvalitetsinstituttet

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
Strandgade 29
1401 København K

Miljøstyrelsen vil, når lejlighed gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

FORORD

Dette projekt er udført af Vandkvalitetsinstituttet ATV og er finansieret af Levnedsmiddelstyrelsen. Miljøstyrelsen står for trykning af projektrapporten.

Lic.Scient. Ole Nybroe, Mikrobiologisk Afdeling, Vandkvalitetsinstituttet har gennemført de undersøgelser, der er indeholdt i projektet, og han har ligeledes forestået udarbejdelsen af projektrapporten.

Projektet er blevet fulgt af en styringsgruppe bestående af:

Morten Laake, Vandkvalitetsinstituttet
Merete Reuss, Levnedsmiddelstyrelsen/Danmarks Miljøundersøgelser
Thomas D. Leser, Levnedsmiddelstyrelsen/Danmarks Miljøundersøgelser.

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
1. INDLEDNING	1
2. BAGGRUND	2
2.1 Antistoffer og mikroorganismer	2
2.2 <u>Pseudomonas</u> serologi	3
2.3 <u>Bacillus</u> serologi	4
2.4 Anvendte immunoassays	6
3. RESULTATER	11
3.1 Resultater, <u>Pseudomonas fluorescens</u>	11
3.1.1 Sammenligning af kvantiteringsmåder for <u>Pseudomonas</u>	11
3.1.2 Fremstilling af antigen	12
3.1.3 Specificitetstests af antistoffer	14
3.1.4 Undersøgelse af antistoffets robusthed	20
3.1.5 Indkøring af kompetitiv ELISA	22
3.1.6 Anwendung af kompetitiv ELISA til påvisning af <u>Pseudomonas fluorescens</u> i miljøprøver	26
3.2 Resultater, <u>Bacillus licheniformis</u>	28
3.2.1 Fremstilling af antigen	28
3.2.2 Indirekte ELISA for <u>Bacillus licheniformis</u>	30
3.2.3 Undersøgelse af antistoffernes specificitet	33
3.2.4 Undersøgelse af antistoffets robusthed	37
3.2.5 Påvisning ved immunfluorescens mikroskopi	40
3.3 Resultater, <u>Bacillus subtilis</u>	41
3.3.1 Fremstilling af antigen	41
3.3.2 Undersøgelse af antistoffernes specificitet	42

4.	SAMMENFATNING	43
5.	REFERENCER	45
6.	BILAG	50
6.1	De anvendte mikroorganismer	50
6.2	Ekstraktion fra sediment	51
6.3	Absorbtion af antistoffer	52
6.4	Oprensning af antistoffer	53
6.5	DOT-immunobinding	54
6.6	Direkte ELISA til bestemmelse af mikroorganismer	56
6.7	Kompetitiv ELISA	57
6.8	Immunfluorescens mikroskopi	58
6.9	Western Blotting	59
6.10	Præparation af ydermembraner fra <u>Pseudomonas</u>	60
6.11	Præparation af SDS-ekstrakt af <u>Bacillus</u> cellevægge	61
6.12	Buffere	62

1. INDLEDNING

Påvisning og kvantitering af mikroorganismer har gennem mange år været baseret på opformering i laboratoriet gennem et eller flere dyrkningstrin. En egentlig identifikation har som regel krævet en række yderligere biokemiske test udført med renkulturer.

Udover at disse procedurer er tidskrævende, forudsætter de, at de relevante organismer befinner sig i en kulturabel tilstand. Det er imidlertid blevet påvist, at en stor del af den miljølevende bakteriepopulation findes i en tilstandsform, der ikke umiddelbart lader sig opdyrke. Disse organismer kan være fysiologisk aktive, og er derved økologisk relevante, hvorfor det bliver af betydning at kunne påvise dem i miljøet.

Man råder i dag over to typer af detektionsmetoder, som er uafhængige af målorganismens vækst i laboratoriet. Immunkemiske teknikker, som er baseret på antigen-antistof binding, kan anvendes til at påvise specifikke fænotyper. Genprobe-teknikker baseret på DNA hybridisering kan tilsvarende anvendes til at påvise specifikke genotyper. Disse detektionsmetoder er hurtige at udføre, og deres anvendelse på miljøprøver er blevet stimuleret af behovet for at kunne følge specifikke gensplejsede mikroorganismers overlevelse og spredning i miljøet.

Formålet med det nærværende arbejde har været at belyse immunkemiske detektionsmetoders anvendelighed på miljø-prøver. I projektet er der anvendt forskellige strategier for at opnå antistoffer, der specifikt kan anvendes til at påvise stammer af Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis og Pseudomonas fluorescens. De mest lovende antistoffer er benyttet til at etablere immunkemiske detektionsmetoder, og der er gennemført en indledende afprøvning af disse teknikker på miljøprøver.

2.

BAGGRUND

2.1

Antistoffer og mikroorganismer

En immunkemisk metodes anvendelighed til at påvise en bestemt mikroorganisme afhænger af det anvendte antistofs specifikitet. Antistoffer der, uover at reagere med målorganismen, udviser krydsreaktioner med andre organismer er ikke anvendelige i et specifikt detektionsassay. Kravene til antistoffets specifikitet kan variere. I visse tilfælde ønskes f.eks. reaktion med alle medlemmer af en sygdomsfremkaldende art - i andre tilfælde ønskes et antistof, der specifikt reagerer med en snæver undergruppe indenfor en art.

For mange arter af mikroorganismer har det været muligt at fremstille antistoffer, der er specifikke for undergrupper af en art. Disse grupper benævnes serotyper. Inden for mange gram-negative bakterier bygger den serologiske klassifikation på antistoffer mod de såkaldte O-antigener, som er lipopolysakkarider (LPS) lokaliseret til organismernes ydermembran (Chester and Meadow, 1973; Fricker, 1987; Clausen, 1988). LPS er det immunodominante antigen i gram-negative bakterier. Derfor kan antistoffer mod LPS opnås både ved immunisering med oprensede LPS og med varmebehandlede hele celler, hvor proteiner er søgt denatureret. (Nakajima et al., 1980; Clausen, 1988). Da oprensede LPS ofte er toxiske for de immuniserede dyr, (se Moon et al., 1988), kan immunisering med varmebehandlede celler være at foretrække.

Immunkemiske teknikker til påvisning af mikroorganismer har primært været anvendt til at foretage en hurtig identifikation af en organisme isoleret fra f.eks. en patientprøve. Når immunkemiske metoder skal anvendes på miljøprøver er det nødvendigt først at foretage en oprensningstrin, hvor mikroorganismen separeres fra større jord- og sedimentpartikler. Som vist i et arbejde af

Hedegaard og Rasmussen (1989) er det nødvendigt at optimere dette oprensningstrin for hvert enkelt forsøgssystem, da både modelorganismens og miljøprøvens egenskaber i høj grad påvirker oprensningsprocedurens effektivitet. Desuden kan interferens fra mindre ler og humuspartikler påvirke detektionsmetodens følsomhed.

I de følgende 3 afsnit gennemgås kort den eksisterende baggrundsviden om antistof-baseret detektion og arts-typning af de valgte modelorganismer. Desuden er principippet bag de anvendte immunkemiske metoder opridset.

2.2 Pseudomonas serologi

Der findens ingen undersøgelser af serologien indenfor arten Pseudomonas fluorescens. Denne art tilhører familien Pseudomonaceae, som imidlertid er en særdeles heterogen gruppe. Inden for familien kan der afgrænses en gruppe af fluorescerende Pseudomonader. Gruppen defineres ud fra en positiv reaktion med, dels en DNA-probe mod ribosonalt DNA, se (Hedegaard og Rasmussen, 1989), dels et monoklonalt antistof mod et ydermembranprotein (Mutharia and Hancock, 1985; Festl et al., 1986). Udeover Pseudomonas fluorescens omfatter gruppen bl. a. Pseudomonas anguilliseptica og Pseudomonas aeruginosa, og for de to sidst-nævnte arter har man erfaringer med antistof-baserede detektions og typningsmetoder.

Pseudomonas aeruginosa er serologisk velkarakteriseret, da den kan optræde som et humant patogen. Arten kan opdeles i 17 serotyper baseret på antistoffer mod LPS (Chester and Meadow, 1973), som således også her kan danne basis for et typningssystem.

Antistoffer mod hele ydermembraner har en bredere specifitet, da de foruden LPS indeholder krydsreagerende proteinkomponenter (Mutharia et al., 1982; Moon et al.,

1988). Antistoffer mod ydermembraner er derfor mindre velegnede til specifik detektion end LPS-antistoffer i denne art.

Derimod kan både antistoffer mod ydermembraner og mod varmedenaturerede celler benyttes til at inddæle Pseudomonas anguilliseptica i to serotyper (Nakajima et al., 1983). Antistofferne krydsreagerer med andre fluorescerende Pseudomonader, men deres titer er 10-40 gange lavere end mod Pseudomonas anguilliseptica.

Da såvel LPS som ydermembran proteiner er makromolekyler, som eksponeres på ydersiden af organismen, er det logisk at basere en immunkemisk detektionsmetode på antistoffer mod disse komponenter. For at indhøste erfaringer ved Pseudomonas fluorescens serologi er der fremstillet antistoffer mod såvel varmedenaturerede celler som mod oprensede ydermembraner.

2.3

Bacillus serologi

I et klassisk arbejde undersøgte Norris and Wolf (1964) de serologiske forhold inden for slægten Bacillus. De sammenlignede specificiteten af tre typer antistoffer:

1. Antistoffer mod spore-antigener
2. Antistoffer mod O-antigener fra vegetative celler. Disse antistoffer er rettet mod kulhydratepitoper og blev fremstillet ved immunisering med varmebehandlede celler.
3. Antistoffer mod H-antigener fra vegetative celler. Disse antistoffer er primært rettet mod protein-epitoper og blev fremstillet ved immunisering med formalin-fikserede celler.

Ved anvendelse af agglutineringsmetoder og immunprecipitation blev det påvist, at de tre klasser af antigener

ikke krydsreagerer. Antistoffer mod O- og H-antigener viste sig at være mere artsspecifikke end antistoffer mod sporeantigener. Således kunne der ikke påvises krydsreaktioner mellem 12 undersøgte Bacillus arter med anvendelse af antistoffer med O-antigener (Norris and Wolf, 1964; Hill and Gray, 1967).

Antistoffer mod O- og H-antigener har varierende anvendelighed til at påvise serotyper inden for forskellige Bacillus arter. For Bacillus subtilis viste det sig, at et O-antistof reagerede med 26 ud af 26 testede stammer, mens et H-antistof kun genkendte de 10. Omvendt forholdt det sig for Bacillus licheniformis, hvor et O-antistof reagerede med 5 ud af 18 stammer, mens et H-antistof reagerede med 14 ud af 18.

Selv om Bacillus megaterium ikke er tæt beslægtet med Bacillus subtilis eller Bacillus licheniformis er arbejdet med denne organisme alligevel af interesse. Baumann-Grace and Tomcsik fandt i 1957, at antistoffer mod hele celler gav den mest pålidelige genkendelse. Antistoffet reagerede med såvel cellevæggen som en eventuel kapsel. På basis af antistoffer mod hele celler kunne B. megaterium opdeles i 38 serotyper, mens antistoffer mod et detergентekstrakt af cellevægge havde en bredere specificitet (Baumann-Grace and Tomcsik, 1957).

Mitze and Hellmann (1980) og Hartung and Hellmann (1987) har anvendt antistoffer mod cytoplasmatiske komponenter til at undersøge slægtskabet mellem blandt andet Bacillus subtilis og Bacillus licheniformis. Deres antistoffer viser en høj grad af krydsreaktivitet mellem de to arter, hvilket gør dem mindre velegnede til en specifik detektion.

Bacillus udviser forskelle i sammensætningen af protein antigener i forhold til vækstfasen (Mitze and Hellman, 1980), hvilket man skal være opmærksom på ved immunologiske undersøgelser. Slutningen af den logaritmiske vækstfase

kan anvendes som et velkarakteriseret referencepunkt (Mitze and Hellmann, 1980). Også for antistoffer mod O-antigener har det vist sig, at detektionen afhænger af organismens vækstbetingelser (Hill and Gray, 1967). Disse forfattere foreslog derefter, at immuniseringsorganismen opdyrkes under realistiske forhold, f.eks. i jordekstrakt.

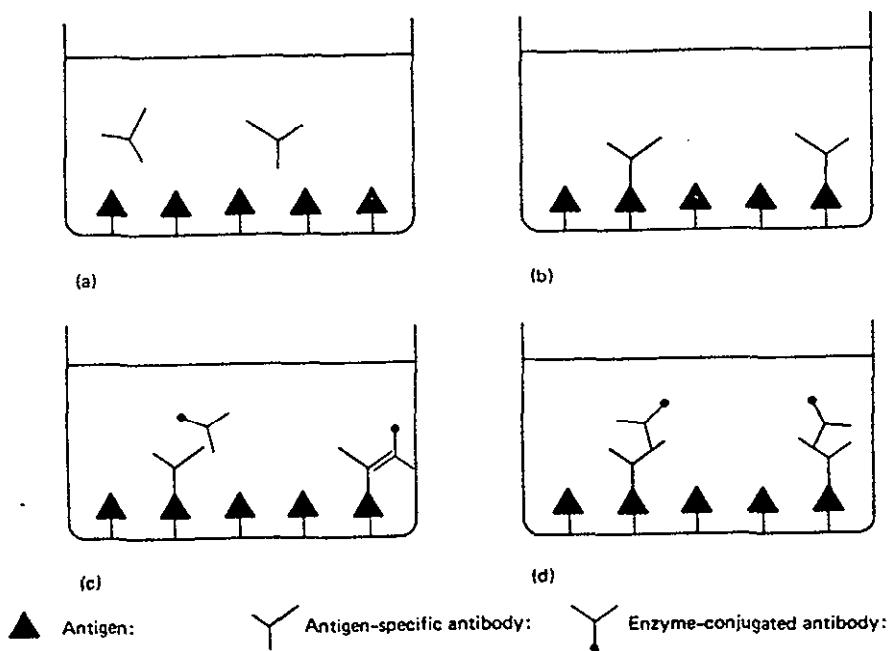
Som det kan ses af ovenstående, varierer det fra art til art om kulhydrat-antistoffer eller protein-antistoffer er mest velegnede til en specifik detektion. I dette projekt er der derfor fremstillet antistoffer mod både varmebehandlede celler og mod et detergентekstrakt af cellevægge. For at opnå et reproducerbart antigenmateriale er kulturerne dyrket i næringsmedie til slutningen af den logaritmiske vækstfase. Dette afspejler ikke naturlige vækstbetingelser, men til gengæld er kulturbetingelserne veldefinerede og reproducerbare. Det vil næppe være muligt at fremstille et veldefineret jord- eller sedimentekstrakt, som kan afspejle "generelle vækstbetingelser" i naturen.

2.4 Anvendte immunoassays

De immunoassays, som er anvendt som screeningsmetoder i denne rapport indebærer alle, at det antigen som undersøges bindes til en fast fase, Figur 2.1. Det immobiliserede antigen kan binde tilsatte antistoffer (primært antistof), således at mængden af bundet antistof afspejler mængden af antigen. Bundet antistof påvises ved hjælp af et andet antistof, som genkender det første. Det såkaldte sekundære antistof er kovalent koblet til en markør, hvis tilstedeværelse let kan påvises. Metoder som anvender såvel primært som sekundært antistof benævnes indirekte metoder.

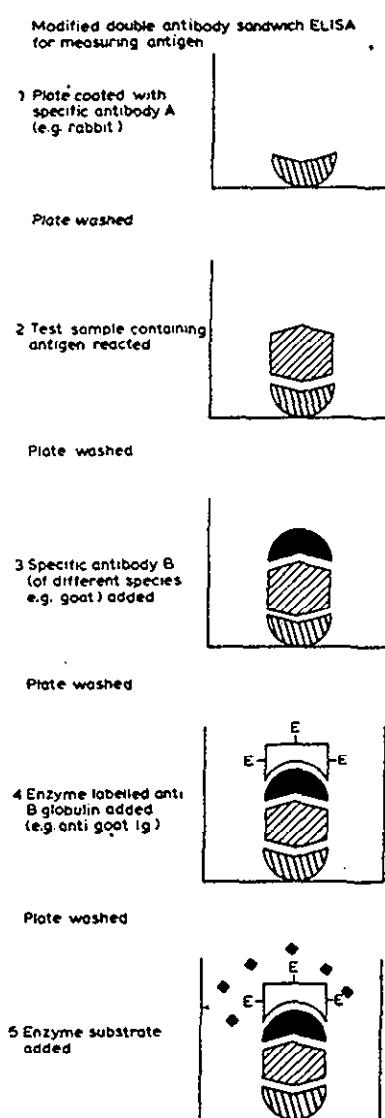
I det såkaldte DOT-immunobinding assay (DOT-blot) immobiliseres antigenet på en nitrocellulosemembran. Efter blokering af membranens frie bindingssteder inkuberes

med primært- og sekundært antistof. Det sekundære antistof er koblet til et enzym. Assayet kan derfor fremkaldes ved en enzymreaktion, hvor ufarvet substrat omdannes til et farvet, uopløseligt produkt, der fælder ud på membranen. Der dannes derved en farvet plet, hvis intensitet er afhængig af mængden af immobiliseret antigen. DOT immunobinding er som nævnt primært et screeningsværktøj, der kan anvendes til at karakterisere renkulturer af mikroorganismer. Det er dog også anvendt til at kvantitere mikroorganismer i vandprøver (Arredondo and Jerez, 1989).



Figur 2.1 Diagram af et indirekte immunoassay. a) Antigen adsorberes til den faste fase, der derefter inkuberes med primært antistof. b) Antistoffet binder specifikt til antigenet. c) Assayet inkuberes nu med sekundært antistof, som er koblet til et enzym. d) Bundne sekundære antistoffer påvises ved at foretage en enzymreaktion, hvor den dannes et farvet produkt. Farveudviklingen er proportional med mængden af antigen. (Modifieret fra Stanier et al., 1988).

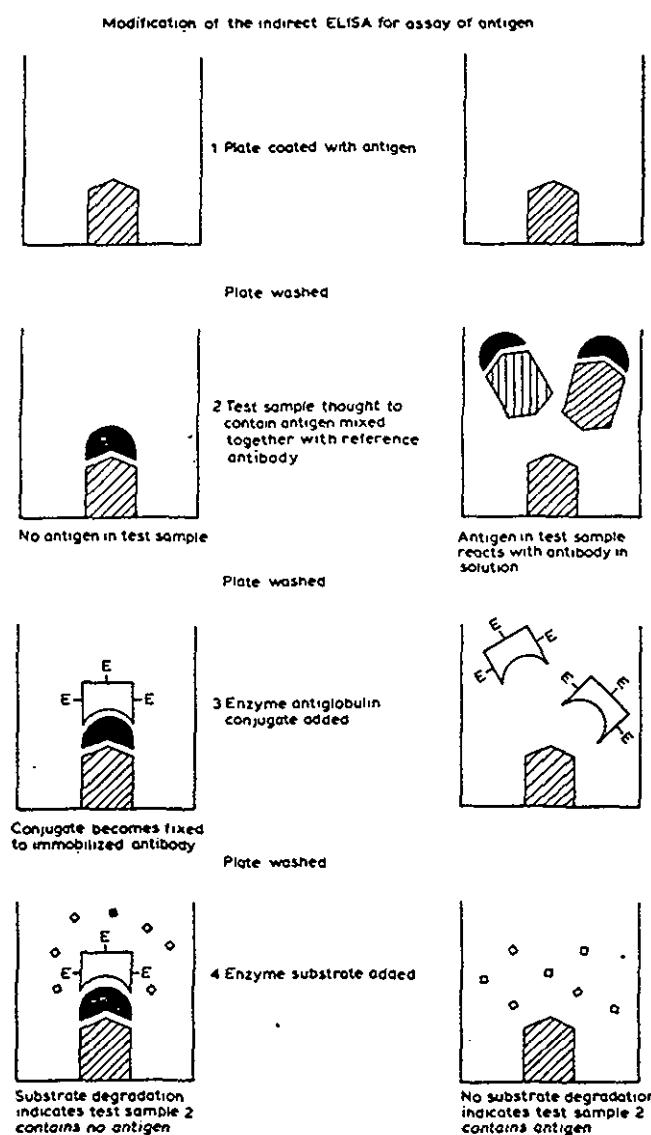
En opbygning, der svarer til DOT-blot assayet findes i en indirekte Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA. Dog fungerer brøndene i en plast mikrotiterbakke som fast fase, og ved enzymfarvningen dannes et opløseligt produkt, som kan kvantiteres fotometrisk. ELISA er derfor et fuldt kvantitativt assay, mens DOT-blot kun er semi-kvantitativt. Den indirekte ELISA er primært en hurtig screeningsmetode, og er som sådan anvendt til en serologisk



Figur 2.2 Dobbelt antistof sandwich ELISA anvendt til at påvise antigen (fra Clausen, 1988).

karakterisering af f.eks. Pseudomonas anguilliseptica og Rhizobium meliloti (Nakajima et al., 1983; Olsen and Rice, 1984).

De ovennævnte teknikker er velegnede til en hurtig karakterisering af renkulturer. Derimod kan det antages, at deres anvendelse på mikroorganismer oprenset fra jord- eller sedimentprøver er problematisk. Begge metoderne



Figur 2.3 Kompetitiv ELISA til påvisning af antigen (fra Clausen, 1988).

kræver, at antigen adsorberes til den faste fase, men denne proces kan formodentlig forstyres af ler- og humusprikler, som uvægerligt vil være til stede i præparationen af oprensede mikroorganismer.

Ud fra disse overvejelser vil enten en "Dobbelt Sandwich ELISA", se Figur 2.2 eller en kompetitiv ELISA, se Figur 2.3, være mere velegnede til detektion af mikroorganismer i miljøprøver. I begge disse assays er måleresultatet uafhængigt af en interaktion mellem den faste fase og test-antigenet, og afhænger af den specifikke antigen-antistofbinding. ELISA assays er endnu ikke særlig udbredt inden for den mikrobielle økologi, men både sandwich ELISA og kompetitiv ELISA er med held anvendt til påvisning af methanbakterier i anaerobt slam (Kemp et al., 1988).

En lidt mere udbredt metode til påvisning af mikroorganismer i miljøprøver er immunfluorescens mikroskopi (Bohlool and Schmidt, 1980). Assayets opbygning minder meget om de ovenfor omtalte indirekte enzymkoblede assays, men visualiseringen foregår ved et antistof koblet til en fluorescerende markør. Assayet aflæses i et fluorescensmikroskop ved direkte optælling og er derfor meget tidskrævende i forhold til enzymteknikkerne.

3. RESULTATER

3.1 Resultater, Pseudomonas fluorescens

3.1.1 Sammenligning af kvantiteringsmåder for Pseudomonas

For at kunne foretage en hurtig vurdering af, hvilke mængder af bakterier, der blev arbejdet med, blev der foretaget en sammenligning mellem celleantal bestemt ved "Acridin Orange Direct Counts", total protein koncentration bestemt ved Lowrys metode, se (Dubre, 1986), og kulturens absorbans ved 600 nm (A_{600}).

Resultaterne er vist i Tabel 3.1.1 og 3.1.2. Det ses, at 1 ml kultur med A_{600} på 0,1 indeholder ca. $2,4 \times 10^8$ celler og 28 µg total protein (TP). Dette betyder, at 1 ng cellulært TP svarer til ca. 8.500 celler, eller at 1 celle indeholder ca. 0,1 pg TP, og denne omregningsfaktor er benyttet ved arbejdet i denne rapport. For methanbakterier antager man, at en celle indeholder ca. 0,5 pg TP (Kemp et al., 1988), hvilket antyder, at vort skøn er i den rette størrelsesorden. Dog skal man naturligvis være opmærksom på, at en bakteriecelles proteinindhold varierer med dens fysiologiske tilstand.

TABEL 3.1.1 Sammenhæng mellem antal bakterier af Pseudomonas fluorescens bestemt ved Acridin orange metoden og A_{600} af kulturen.

Total celletal celler/ml	A_{600}	Celler/ml kultur med $A_{600} = 0,1$
7×10^8	0,14	$5,0 \times 10^8$
$9,5 \times 10^7$	0,07	$1,3 \times 10^8$
$7,6 \times 10^7$	0,05	$1,5 \times 10^8$
$3,1 \times 10^8$	0,17	$1,8 \times 10^8$

TABEL 3.1.2 Sammenhæng mellem A_{600} af en kultur af Pseudomonas fluorescens og koncentration af total protein

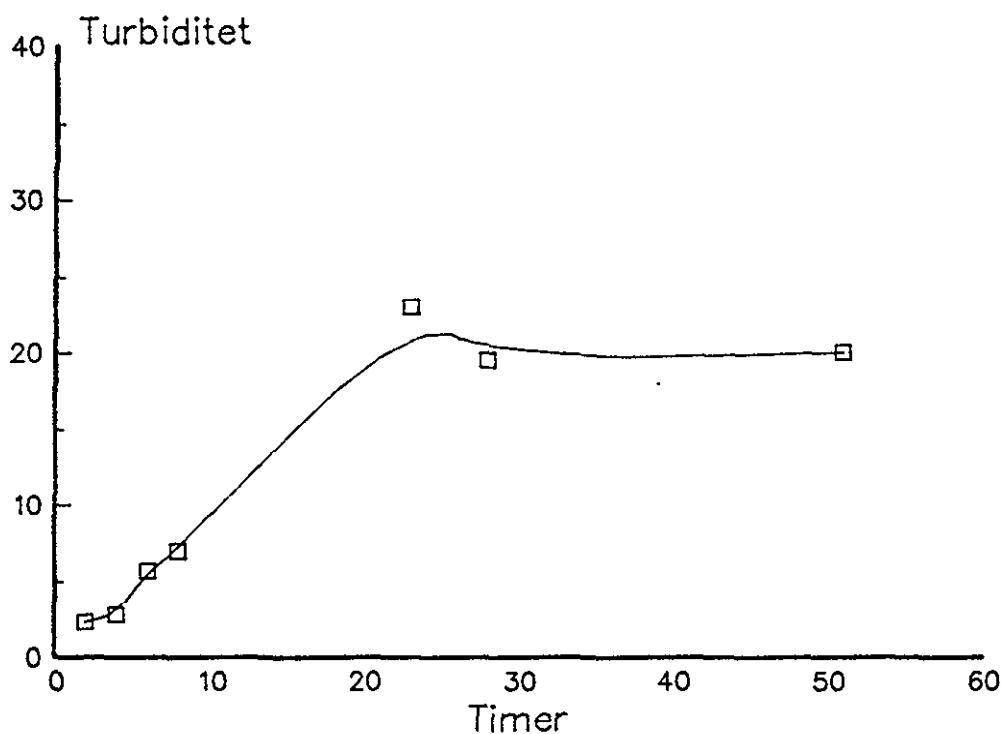
A_{600}	Total protein µg/ml	µg total protein pr ml kultur med $A_{600} = 0,1$
2,24	600	27
1,52	450	30
2,76	775	28

3.1.2 Fremstilling af antigen

Modelorganismen for Pseudomonas fluorescens, som er benævnt G5.5, er isoleret fra ferskvands sediment ved Qaanaaq i Grønland. G5.5 er en oxidase positiv, fluorescerende stav, som vokser på medier, som er selektive for Pseudomonader. Ved typning med API 2ONE-systemet, blev G5.5 bestemt til arten Pseudomonas fluorescens, biotype 1.

For at kunne anvende kulturer på et veldefineret vækststadie til immunisering blev der fremstillet en vækstkurve for Pseudomonas fluorescens G5.5, se figur 3.1.1. Kulturer der skulle anvendes til antigenfremstilling blev dyrket i LB-medie ved stuetemperatur under omrystning til slutningen af den logaritmiske vækstfase i ca. 20 timer.

Ved fremstilling af antigen bestående af hele mikroorganismer, blev celler høstet ved centrifugering og vasket 2 gange i fosfatbufret isotont saltvand (PBS) for at fjerne rester af næringsmediet inklusiv antigener, som måtte være secerneret til dette under kulturens vækst. Cellerne blev dernæst resuspended i demineraliseret vand og varmebehandlet ved 95°C i 2 timer. Celler blev nu frysetørret og den frysetørrede bakteriepellet



Figur 3.1.1 Vækstkurve for Pseudomonas fluorescens G5.5. Bakterierne blev dyrket i LB-medium under omrystning ved stuetemperatur. Efter de angivne tidsforløb blev kulturens turbiditet aflæst.

blev resuspendederet i demineraliseret vand til en koncentration på 2 mg/100 µl. Udbyttet var på ca. 40 mg pr. 100 ml kultur. Immuniseringsportioner på 2 mg, som anbefalet af Harboe and Ingild (1983), blev fremsendt til DAKOPATTS A/S, som tilsatte Freunds inkomplette adjuvans og forestod immunisering i overensstemmelse med firmaets immuniseringsprotokol.

Ydermembraner fra G5.5 blev fremstillet efter Sarkosyl-metoden (Filip et al., 1973) (bilag 6.10). Kort beskrevet blev vaskede celler lyseret ved sonikering og ekstraheret med Sarkosyl. Sarkosyl er en ionisk detergent, der solubiliserer de cytoplasmatiske membraner, men ikke kan solubilisere ydermembranen. Efter solubilisering blev ydermembraner høstet ved centrifugering, vasket 2 gange i demineraliseret vand og resuspended ved en koncentration på ca. 500 µg/100 µl. Udbyttet var ca. 3 mg fra 100 ml kultur. Immuniseringsdosis var 500 µg pr. injektion målt som total protein.

Proteinindholdet af ydermembranerne blev yderligere analyseret ved natrium-dodecylsulfat polyakrylamid gel-elektroforese (SDS-PAGE), Figur 3.1.2, bane A. Proteinindholdet i ydermembranpræparationen ligner cellevægge fra samme organisme, Figur 3.1.2, bane B, men indeholder færre proteinkomponenter, som tegn på at præparationen er beriget for ydermembraner.

3.1.3 Specificitetstests af antistoffer

Før man kan anvende antistoffer som molekulære prober i immunoassays er det væsentligt at sikre sig, at antistofferne er specifikke for den mikroorganisme, man ønsker at detektere.

For at vurdere omfanget af krydsreaktioner er anti Pseudomonas fluorescens G5.5 antistofferne testet mod et panel af tættere og fjerne beslægtede organismer, se bilag 6.1. Alle forsøgene er foretaget med anti-Pseudomonas fluorescens G5.5 total tap 1 og anti-Pseudomonas fluorescens G5.5 ydermembran, tap 1. For nemheds skyld kaldes disse herefter anti-total G5.5 og anti-ydermembran G5.5.

I figur 3.1.3 er vist de to antistoffers reaktionsmønstre i DOT-blot. Det kan ses af figuren, at antistoffet

har kraftigst reaktion med immuniseringsorganismen G5.5, men at det krydsreagerer med alle de testede Pseudomonader.

A B

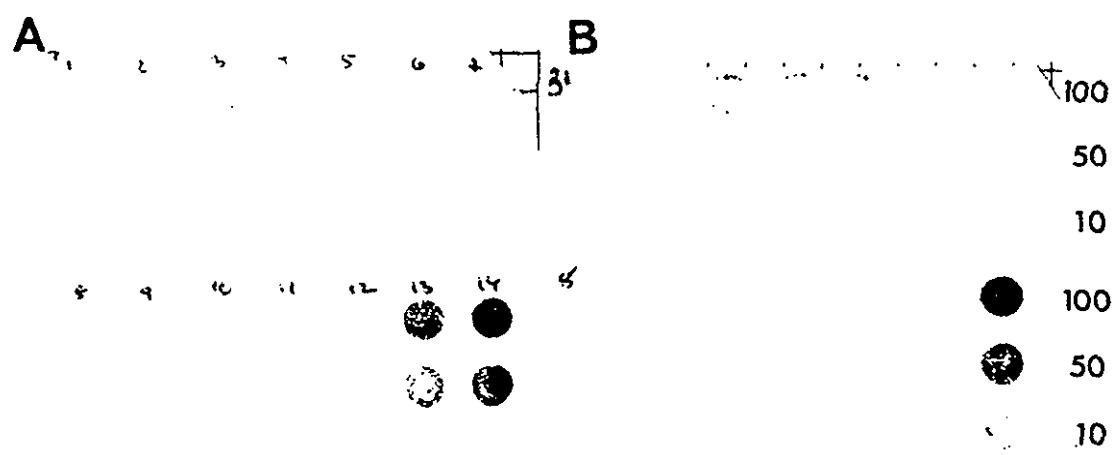


Figur 3.1.2 Analyse af Pseudomonas fluorescens G5.5 ydermembraner (bane A) og cellevægge (bane B) ved SDS-PAGE. Migrationen af standardproteiner er vist i margen. Disse er phosphorylase B (92,500), Bovint serum albumin (60,000), Ovalbumin (46,000), Carbonic anhydrase (30,000), Soyabønne trypsin inhibitor (21,500).

Imidlertid er DOT-blot metoden kun semikvantitativ og derfor blev krydsreaktivitetstests også gennemført i et indirekte ELISA-assay (se bilag 6.6), der tillader, at krydsreaktivitet udtrykkes i procent af reaktionen med immuniseringsorganismen.

Ved brug af denne metode bekræftes det, at både antistofferne mod hele celler og mod ydermembraner krydsreagerer med medlemmer af Pseudomonas gruppen, Tabel 3.1.3. Når antistoffet testes overfor små mængder antigener er det dog i praksis monospecifikt. Reak-

tionsmønsteret for anti-total G5.5 og anti-ydermembran G5.5 er ret ens men antistoffet mod ydermembraner krydsreagerer mest. Dette resultat er i god overensstemmelse med erfaringerne med antistoffer mod andre fluorescerende Pseudomonader, se afsnit 2.2.



Figur 3.1.3 Undersøgelse af anti Pseudomonas fluorescens G5.5 total (A) og anti Pseudomonas fluorescens G5.5 ydermembrans (B) krydsreaktion til andre arter af mikroorganismen. Der er påsat 100, 50, og 10 µg af hver organisme og antiserum er benyttet i en fortynding på 1:100. Ved specificitetstesten er benyttet følgende organismer: 1) P. aeruginosa, 2) P. fluorescens, biotype 1, 3) P. fluorescens, biotype 2, 4) P. putida, 5) P. chlororaphis, 6) P. cepacia, 7) A. eutrophus, 8) E. coli, 9) B. subtilis, 10) B. cereus, 11) B. licheniformis, 12) B. pumilus, 13) B. brevis, 14) G.5.5. Nærmere oplysninger om disse referenceorganismér findes i bilag 6.1.

Det blev dernæst undersøgt, om krydsreaktioner kunne fjernes fra antistofferne ved absorbtion med de relevante organismér. Absorbtion blev foretaget ved at blande antistof med hele vaskede celler og inkubere i time ved stuetemperatur og derefter natten over ved 8°C. Herefter blev antistoffet centrifugeret og

sterilfiltreret for at fjerne mikroorganismerne, se bilag 6.3.

Tabel 3.1.3 Undersøgelse af anti-G5.5 antistoffers krydsreaktion med andre arter af mikroorganismer. Der er påsat 100 og 10 ng TP af hver organisme og antistoffet er anvendt i en fortynding på 1:400 (anti-total) eller 1:100 (anti-ydermembran). Reaktionen med G5.5 er sat til 100% og de øvrige udtrykt relativt til denne.

Organisme	Anti-total G5.5		Anti-ydermembran G5.5	
	100 ng	10 ng	100 ng	10 ng
<u>P. aeruginosa</u>	10 %	1 %	1 %	0
<u>P. fluorescens</u> 1	16 %	1 %	27 %	5 %
<u>P. fluorescens</u> 2	14 %	1 %	17 %	12 %
<u>P. putida</u>	3 %	1 %	5 %	0
<u>P. chlororaphis</u>	10 %	1 %	62 %	41 %
<u>P. cepacia</u>	3 %	0	1 %	0
<u>A. eutrophus</u>	3 %	0	0	0
<u>E. coli</u>	0	0	0	0
<u>B. subtilis</u>	0	0	0	0
<u>B. cereus</u>	0	0	0	0
<u>B. licheniformis</u>	0	0	0	0
<u>B. pumilus</u>	0	0	0	0
 <u>P. fluorescens</u>	 —	 —	 —	 —
G.5.5	100 %	100 %	100 %	100 %

I Tabel 3.1.4 er opført krydsreaktioner for anti-total antistoffet efter 2 absorbtioner med henholdsvis P. aeruginosa og P. chlororaphis. Værdierne i tabellen er direkte sammenlignelige med værdierne for det uabsorberede antistof vist i Tabel 3.1.3. Det kan ses, at gentagne absorbtioner øger antistoffets specifitet,

men at man kan forvente, at absorbtioner skal gentages flere gange før antistoffet bliver monospecifikt. Det er ikke muligt at angive en nøjagtig vejledning for udabsorbtioner af antistoffer, da der i hvert tilfælde skal tages hensyn til antistoffets reaktionsmønster og titer (Chantler and McIlmmurray, 1987).

Tabel 3.1.4 Krydsreaktion af anti-total G5.5 antistof efter absorbtion med P. aeruginosa og P. chlororaphis. Der er påsat 100 henholdsvis 10 ng af hver testorganisme. Antistof anvendt fortyndet 1:400. Reaktionen med immuniseringsorganismen er sat til 100 % og de øvrige udtrykt i forhold til denne.

Organisme	100 ng påsat	10 ng påsat
<u>P. aeruginosa</u>	5 %	0
<u>P. fluorescens</u> 1	7 %	0
<u>P. fluorescens</u> 2	5 %	0
<u>P. putida</u>	3 %	0
<u>P. chlororaphis</u>	3 %	0
<u>P. cepacia</u>	3 %	0
<u>A. eutrophus</u>	2 %	0
<u>E. coli</u>	0	0
<u>B. subtilis</u>	0	0
<u>B. cereus</u>	0	0
<u>B. licheniformis</u>	0	0
<u>B. pumilus</u>	0	0
<hr/>		
<u>P. fluorescens</u>		
G.5.5	100 %	100 %

Ved de ovenfor beskrevne specificitetstests ses det, at total antistoffet har en vis krydsreaktion med andre isolater tilhørende arten Pseudomonas fluorescens, se tabel 3.1.3 og 3.1.4, men at reaktionen er betydeligt svagere end mod G5.5. Dette antyder, at antistoffet er serotype-specifikt og for at undersøge dette nærmere

blev reaktionen mod et panel af Pseudomonas fluorescens stammer isoleret fra miljøprøver undersøgt.

Resultatet er vist i tabel 3.1.5, og det ses, at anti-total G5.5 kun reagerer ved 2 ud af de 11 stammer. De øvrige mindre krydsreaktioner vil kunne fjernes ved absorbtion ifg. ovenstående afsnit. Antistoffet mod ydermembraner viser en højere grad af krydsreaktivitet. Det er dog ikke så bredspektret, at det kan anvendes som et artsspecifikt antistof.

Tabel 3.1.5 Anti G5.5 antistoffers reaktion med andre stammer af Pseudomonas fluorescens isoleret fra miljø-prøver. Der er påsat 100 henholdsvis 10 ng af hver organisme. Antistof benyttet i fortynding 1:100. Reaktion med G5.5 sat til 100 % og øvrige reaktioner er udtrykt relativt til denne værdi.

Organisme	Anti total		Anti ydermembran	
	100 ng	10 ng	100 ng	10 ng
G 5.5	100 %	100 %	100 %	100 %
BI 9.8	2 %	0	3 %	0
BI 10.1	12 %	1 %	59 %	17 %
G 1.2	91 %	75 %	95 %	68 %
G 1.3	9 %	1 %	20 %	3 %
H 1.5	2 %	0	0	0
Ag 1	5 %	0	14 %	2 %
R 8	1 %	0	5 %	0
R 12	0	0	0	0
R 13	1 %	0	10 %	0
<u>E. coli</u>	1 %	0	0	0

Antistoffer fremstillet ved immunisering med varmedenaturerede celler er således specifikke mod under-

grupper inden for P. fluorescens. De må derfor foretrækkes fremfor ydermembran-antistoffer, når det gælder at opnå en specifik detektion.

3.1.4 Undersøgelse af antistoffets robusthed

Mikroorganismer i miljøet kan forventes at findes i mange forskellige fysiologiske tilstandsformer og vil derfor variere med hensyn til hvilke enzymsystemer og cellevægskomponenter de udtrykker. Når man ønsker at detektere en miljølevende organisme med antistof-baserede metoder, er det derfor væsentligt, at antistoffet genkender mere end et antigen i/på cellerne. Dermed bliver antistoffet robust overfor ændringer i mikroorganismens sammensætning.

Anti-total G5.5 antistoffets reaktion med G5.5 er derfor blevet analyseret nærmere ved Western blotting (bilag 6.9) og figur 3.1.4. Antistoffet reagerer med flere komponenter, hvis migration minder meget om det der ses for LPS isoleret fra f.eks. Salmonella og Eschericia coli (Tsai and Frasch, 1982; Hitchcock and Brown, 1983).

Samtidig ses en uønsket baggrundsfarvning, som antyder, at antistoffet har en tendens til at binde uspecifikt, hvilket er en særdeles uheldig egenskab for et anti-stof, der ønskes anvendt til f.eks. ELISA. Samtidig har specifitetstesterne af antistoffet omtalt i afsnit 3.1.3 dog vist, at antistoffet er specifikt mod G5.5 og ikke bindes uspecifikt til en hvilken som helst mikroorganisme eller overflade.

For nærmere at kunne bedømme antistoffets evne til at detektere G5.5 under forskellige vækstbetingelser blev bakterien dyrket i 3 uger i henholdsvis næringsmedie og PBS. Til forskellige tidspunkter blev der udtaget

prøver af kulturerne. Disse prøver blev sluttelig analyserset ved DOT-blot, se figur 3.1.5.

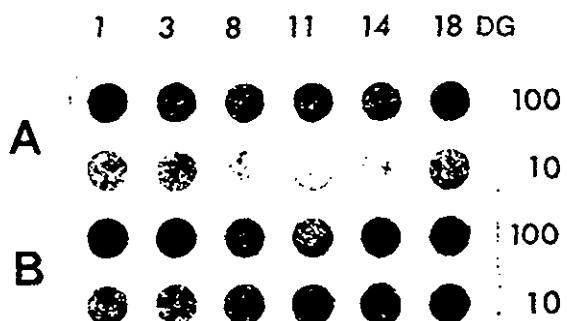
Figur 3.1.4 Immunoblot med antitotal G5.5. G5.5 (100 ng TP pr. bane) blev separeret i SDS-PAGE, og overført til nitrocellulose. Blottet blev inkuberet med oprenset anti-total G5.5, 1:200.

Det ses, at antistoffet genkender G5.5 lige godt under de forskellige vækstomstændigheder. Derfor kan antistoffet forventes at være velegnet til påvisning af mikroorganismen i miljøprøver. Serologiske markørers stabilitet er undersøgt i Rhizobium. I buffer og jordekstrakt var de stabile i mindst 2 måneder (Postma et al., 1988) og i miljøet kan serologiske markører være stabile op til 12 år (se Van Elsas, et al., 1986).

3.1.5 Indkøring af kompetitiv ELISA

Som udgangspunkt for at etablere en kompetitiv ELISA er det nødvendigt at afbalancere assayet. Det vil sige, at finde den optimale balance mellem antistofmængde og mængden af antigen immobiliseret til den faste fase.

Ved en såkaldt skakbræts titrering varieres disse to parametre. Den ønskelige kombination giver en absorbans på ca. 1,0 - 1,5 efter ca. 5 minutters farvning. Samtidig ønsker man at anvende en så stor antistoffortynding som muligt, dels for at spare på antistoffet, dels for at minimere eventuelle tilbageværende krydsreaktioner. Resultatet af en skaksbrætttitrering er vist i Tabel 3.1.6.



Figur 3.1.5

Robusthedsundersøgelse af anti total G5.5.
Pseudomonas fluorescens G5.5 blev dyrket op i LB medie natten over. Kulturen blev herefter delt, således at halvdelen blev dyrket videre i LB-medie (Panel A), mens den anden halvdel blev overført til PBS (Panel B). På de angivne tidspunkter (dages inkubation) blev der udtaget prøver og 100 henholdsvis 10 ng TP af hver prøve blev analyseret ved DOT-blot. Antiserum blev anvendt fortyndet 1:100.

Tabel 3.1.6

Skakbrætstiltrering af påsat mængde antigen (G5.5 hele celler) i første lag og antistofkoncentration (anti-total G5.5) i 2. lag. De viste data er målte absorbanser ved 490 nm.

Anti-stof fort.	Antigenmængde i 1. lag, ng							
	1250	625	312	156	78	39	20	- ag
1:100	1,455	1,463	1,512	1,485	1,434	1,328	1,043	0,188
1:200	1,403	1,368	1,498	1,472	1,379	1,337	0,979	0,124
1:400	1,520	1,513	1,478	1,378	1,406	1,194	0,876	0,088
1:800	1,453	1,610	1,483	1,449	1,418	1,240	0,819	0,069
- ab	0,059	0,049	0,489	0,058	0,057	0,054	0,049	0,047

Det kan ses, at mikrotiterplades maximale bindingskapacitet nåes ved en påsætning af ca. 80 ng TP. En ELISA-brønd kan binde ca. 500 ng protein (Løvborg, 1984), men da mikroorganismers overflader indeholder store mængder kulhydrat, er den fundne bindingskapacitet ikke overraskende.

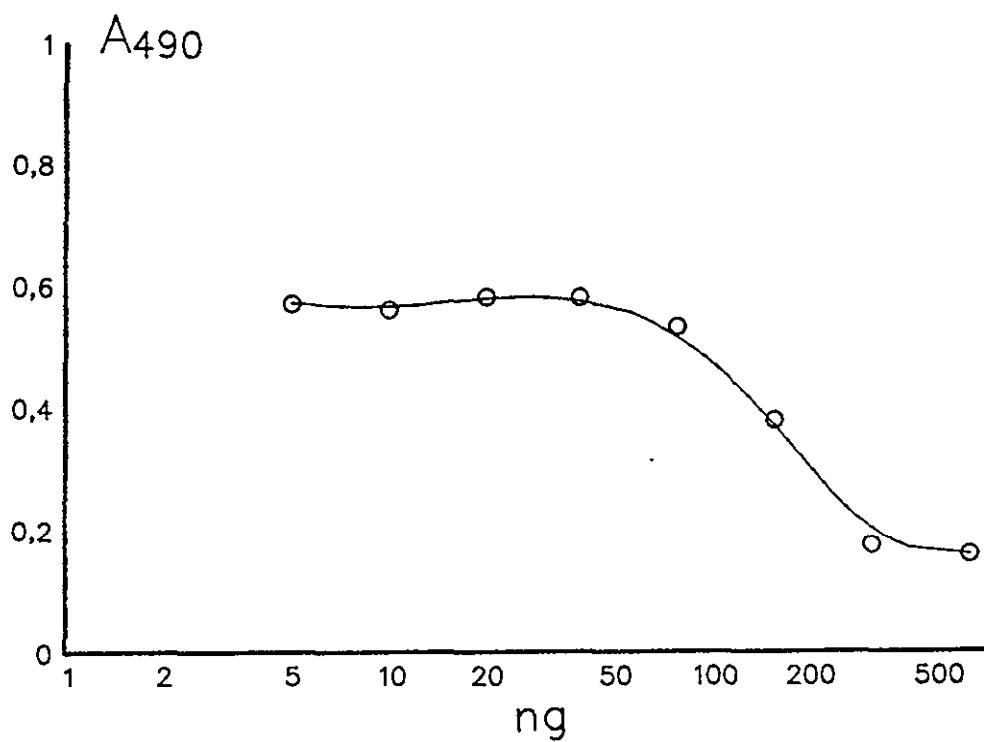
Derimod ses der kun en ganske svag tendens til, at fortynding af det anvendte antiserum giver nedsat reaktion. Dette ses også, hvis der anvendes oprenset antistof, Tabel 3.1.7, og kan måske skyldes den tendens til baggrundsfarvning, som også sås i immunoblottet, afsnit 3.1.4.

Tabel 3.1.7 Skakbrætstiltrering af antigen (G5.5, hele celler)
 i 1. lag og antistof (anti-total G5.5, oprenset)
 i 2. lag.

Anti-stof fort.	Antigenmængde i 1. lag, ng			
	40	20	10	- ag
1:400	1,905	1,448	0,962	-
1:800	1,737	1,276	0,859	0,096
1:1600	1,675	1,226	0,779	0,066
1:3200	1,619	1,131	0,685	0,082
1:6400	1,575	1,081	0,692	0,048
1:12800	1.460	0.995	0.609	0.044
- ab	0.334	0.229	0.162	0.040

Det blev undersøgt, om tendensen til baggrund kunne fjernes ved at indføre buffere ved høj salt (500 mM NaCl) og høj pH (pH 10,2), men dette var ikke tilfældet. Der blev også foretaget et enkelt forsøg med at ændre den faste fase fra NUNC Maxisorb til NUNC Polysorb. Skakbrætstiltringer på de to faste faser var imidlertid ens i dette forsøg.

Det blev nu forsøgt at etablere en kompetitiv ELISA på basis af anti-total G5.5 anti-serum. I denne type ELISA konkurrerer antigen i prøven med antigen på den faste fase om binding til antistoffet, se afsnit 2.4. ELISA-brønde blev coatet med G5.5, 80 ng TP;brønd. Dernæst blev det inkuberet med antistof og prøvemateriale. Prøvematerialet var her en renkultur af organismen. I figur 3.1.6 er der vist en standardkurve for denne ELISA.



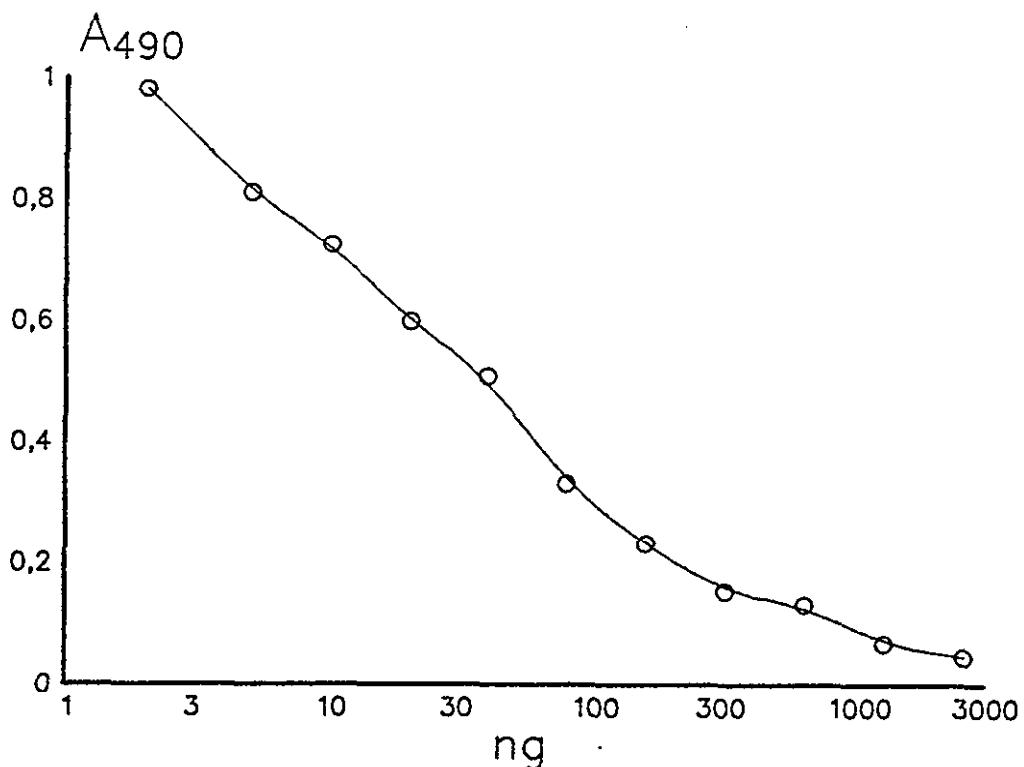
Figur 3.1.6 Standardkurve for Pseudomonas fluorescens G5.5 ELISA. Der blev coatet med hele celler, 80 ng TP/brønd og antiserum anvendt i fortynding 1:400.

Standardkurven udviser det forventede forløb, men det kan samtidig ses, at følsomheden er utilfredsstillende, ca. 75 ng svarende til ca. 5×10^5 celler.

Den ELISA, der blev udviklet på basis af anti-total G5.5 kunne imidlertid ikke udføres reproducerbart. Ofte sås det, at antigenet i prøven ikke kunne konkurrere med det coatede antigen, og der dermed ikke fremkom en standardkurve. Problemets blev løst ved

at variere på balancen mellem antigen- og antistofkoncentration samt ved at manipulere ved blokering af den non-specifikke binding. Da denne ELISA ikke kunne optimeres inden for projektets rammer, vises i følgende afsnit anvendelse af en kompetitiv ELISA til at påvise en anden stamme af Pseudomonas fluorescens. Antistoffet mod denne organisme er fremstillet ved immunisering med hele formalinfikserede celler.

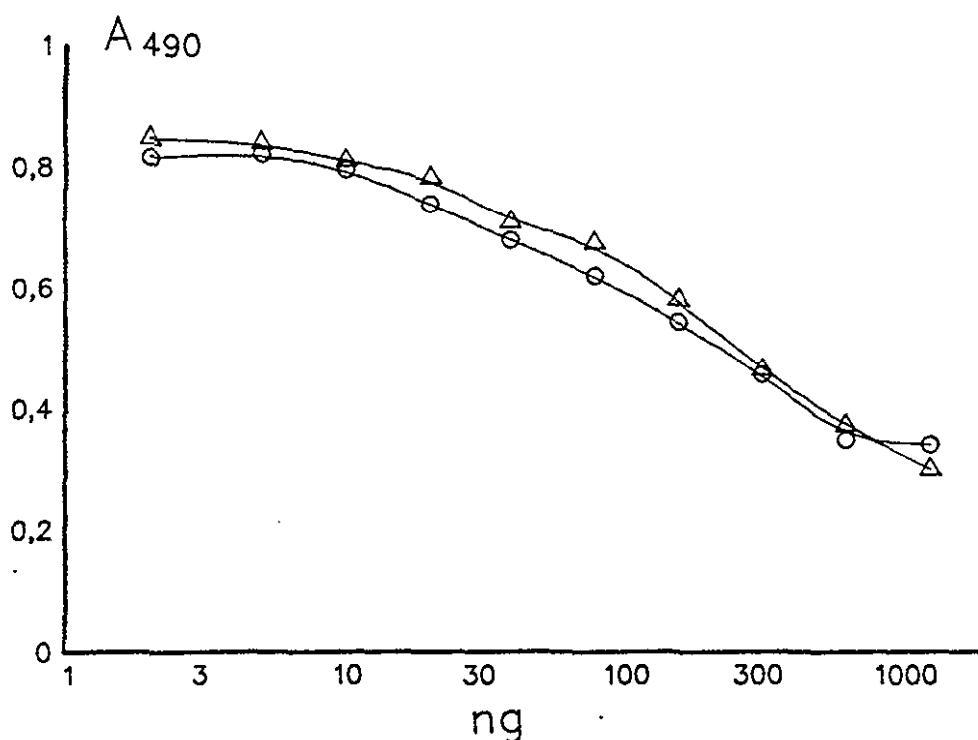
3.1.6 Anvendelse af kompetitiv ELISA til påvisning af Pseudomonas fluorescens i miljøprøver.



Figur 3.1.7 Standardkurve for Pseudomonas fluorescens Ag-1 ELISA. Den faste fase coatet med ca. 300 ng hele celler og antistof anvendt i en fortyndning på 1:1000.

Standardkurven for den kompetitive ELISA er vist i figur 3.1.7, hvoraf det ses, at detektionsgrænsen ligger på ca. 2 ng svarende til ca. 10^4 celler.

Den kompetitive ELISA kunne tænkes at være ufølsom for interferens fra jordpartikler m.v. som uværgerligt vil være til stede i et ekstrakt af bakterier fra jord eller sediment. Denne antagelses validitet blev efterprøvet ved at sammenligne en standardkurve for en renkultur med standardkurven for renkultur opstemmet i jordekstrakt. Forsøget viste (Figur 3.1.8), at jordekstraktet ikke påvirkede detektionssystemet signifikant, således at metoden vil være anvendelig til påvisning af bakterier isoleret fra miljøprøver.

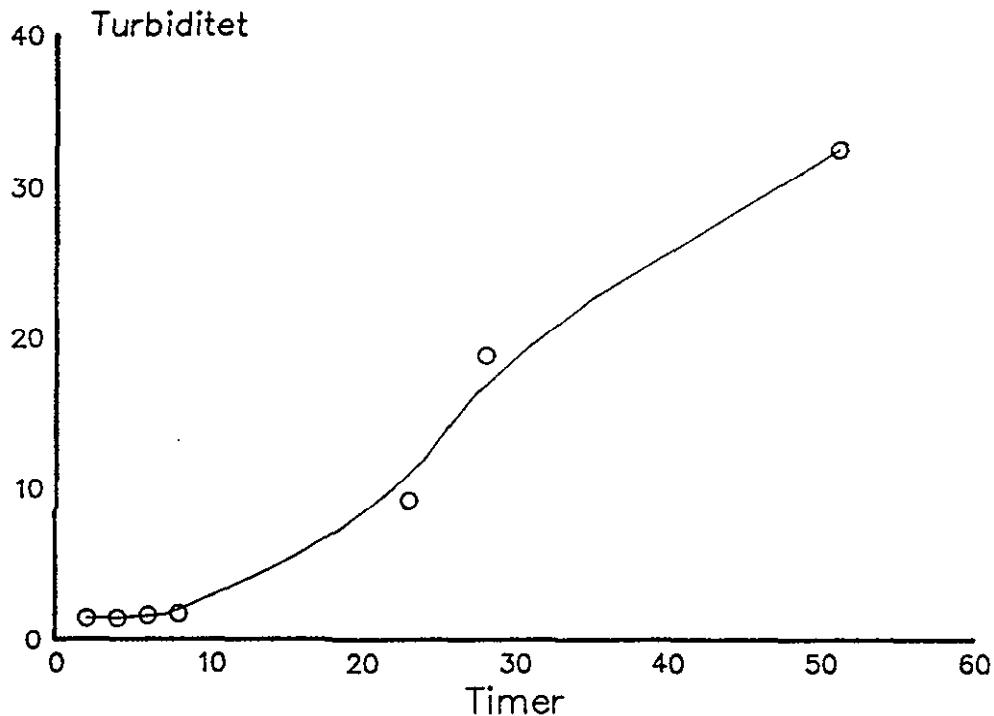


Figur 3.1.8 Sammenligning af standardkurve for renkultur af Pseudomonas fluorescens Agl (○) og det tilsvarende antal celler resuspendeder i et ekstrakt af steril jord (△).

3.2 Resultater, Bacillus licheniformis

3.2.1 Fremstilling af antigen

Modelorganisme for dette delprojekt er typestammen for Bacillus licheniformis fra Deutsche Sammlung von Mikroorganismen kaldet DSM 13. Ligesom Pseudomonas fluorescens er Bacillus licheniformis kulturer, der skulle anvendes til antigenfremstilling, dyrket op i LB medie til slutningen af den logaritmiske vækstfase. En vækstkurve for denne organisme er vist i figur 3.2.1.



Figur 3.2.1 Vækstkurve for Bacillus licheniformis DSM 13. Organismen blev opdyrket i LB under omrystning ved stuetemperatur. Efter de angivne tider blev kulturens turbiditet aflæst.

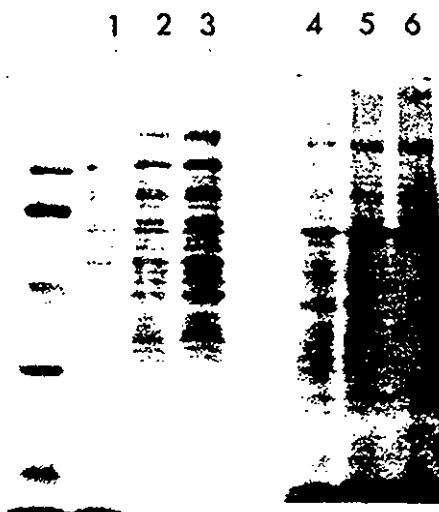
Kulturerne blev dyrket op til sent i vækstfasen, ca. 48 timer. Før disse kulturer blev anvendt, blev det undersøgt, om der fandtes sporer i kulturerne ved malakit-grønt/-safranin farvning. I kulturer med en alder mellem 2 og 51 timer fandtes generelt meget få sporer, mens en ugegammel kultur indeholdt talrige sporer. De antigenpræparationer, der er anvendt her, repræsenterer således helt overvejende det vegetative stadie af Bacillus licheniformis DSM 13.

For at kunne sammenligne forskellige typer antistoffers anvendelighed til specifikt at påvise DSM 13, blev der immuniseret både med varmedenaturerede hele celler, for at frembringe kulhydrat-specifikke antistoffer, og med et SDS-ekstrakt af cellevægge for at fremstille antistoffer mod cellevægsproteiner.

Hele, varmedenaturerede celler blev fremstillet som beskrevet i afsnit 3.1.2. Immuniseringsdosis var 2 mg tørvægt/injektion, som anbefalet i Harboe og Ingild (1983).

Et SDS-ekstrakt af cellevægge (Imagawa et al., 1985; bilag 6.11) blev fremstillet ud fra kulturer dyrket som beskrevet. Vaskede celler blev først lyseret og cellevægge høstet ved centrifugering. Cellevæggene blev vasket 2 x i demineraliseret vand for at fjerne cytoplasmatiske komponenter og dernæst ekstraheret i SDS. Udbryttet af ekstraktionen blev vurderet ved bestemmelse af total protein med Bradfords metode, se (Darbre, 1986) og var for 1 l kultur ca. 10 mg.

Yderligere blev ekstraktets sammensætning analyseret ved SDS-PAGE, Figur 3.2.2. Det kan her ses at ekstrakter fra Bacillus licheniformis og Bacillus subtilis har hvert sit artscharakteristisk båndmønster. Immuniseringsdosis var på 500 µg TP/injektion. Immunisering blev foretaget af DAKOPATTS A/S.



Figur 3.2.2 20, 40 og 80 µg TP af SDS-ekstrakter af Bacillus licheniformis cellevægge, Bane 1-3 eller Bacillus subtilis cellevægge, Bane 4-6 blev analyseret ved SDS-PAGE. Migration af standardproteiner er angivet i margen.

3.2.2 Indirekte ELISA for Bacillus licheniformis

For at etablere en hurtig kvantitativ screeningsmetode til at vurdere antistoffers specificitet, blev der etableret en indirekte ELISA for DSM 13. Anti-total DSM 13 antistoffets reaktion med DSM 13 blev afprøvet ved skakbræt-titrering som vist i Tabel 3.2.1.

Det ses, at antistofreaktionen titreres nydeligt ud med stigende fortynding og viser således ikke den tendens til "stickiness", som blev observeret for anti G5.5 antistoffet. Antistofreaktionen titreres tilsvarende ud med stigende fortynding af antigen, men det ser ud til at NUNC-maxisorb pladen har meget stor bindingskapacitet for DSM 13, idet bindingen ikke mættes ved tilsætning

Tabel 3.2.1 Skakbræt-titrering af påsat mængde antigen (DSM 13 hele celler) i første lag og antistoffortynding (anti-total DSM-13) i andet lag. De viste data er absorbanser ved 490 nm.

Anti-stof fort.	Antigenmængde i 1. lag, ng								- a g
	1250	625	312	156	78	39	20		
- ab	-0,011	-0,011	-0,015	-0,016	-0,017	-0,012	-0,001	0	
1: 20	0,973	0,727	0,495	0,346	0,236	0,178	0,164	0,155	
1: 40	0,913	0,634	0,394	0,277	0,188	0,154	0,142	0,142	
1: 80	0,787	0,531	0,345	0,248	0,156	0,129	0,125	0,118	
1:160	0,660	0,433	0,273	0,197	0,138	0,100	0,110	0,105	
1:320	0,594	0,362	0,246	0,154	0,110	0,086	0,092	0,084	

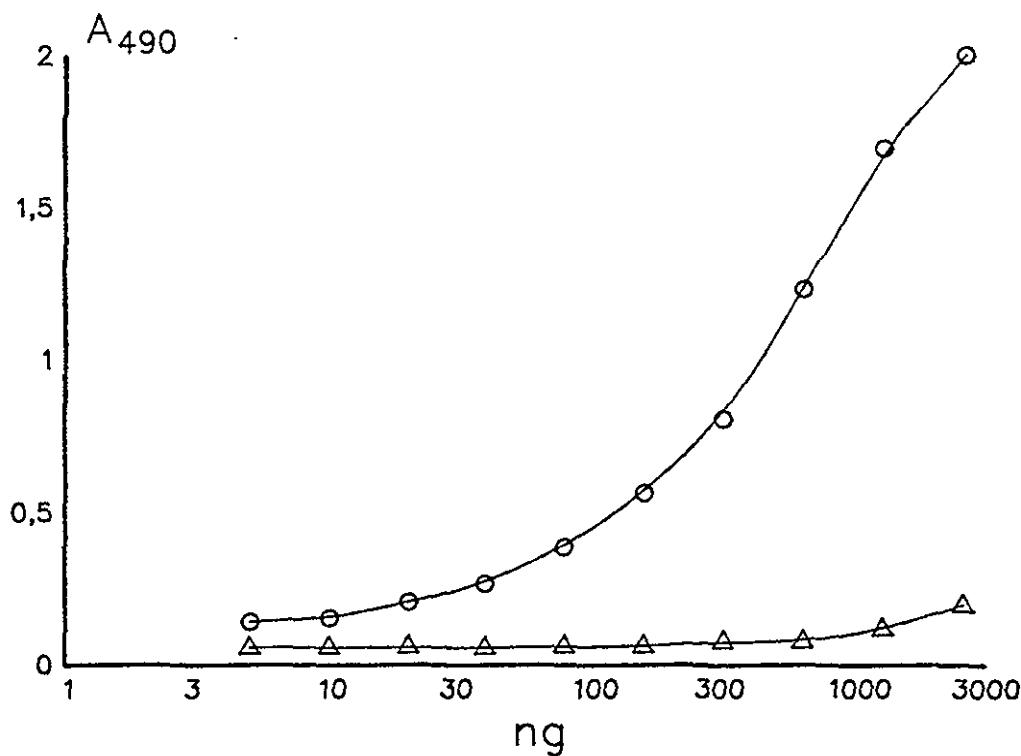
af 1 µg/brønd. Alternativt bindes kun en mindre del af det tilsatte mængde bakterier ved den anvendte coatingstid på 1 time.

På baggrund af skakbræt-titreringen er der etableret en indirekte ELISA for DSM 13, se Figur 3.2.3. Følsomheden af den indirekte ELISA er ikke helt tilfredsstillende, > 10 ng. Formodentlig kan følsomheden forbedres ved at manipulere med coatingbetingelserne. Dersom adsorptionen til den faste fase er utilfredsstillende, kan man f.eks. søge at krydsbinde mikroorganismen til plastic overfladen med glutaraldehyd (Chantler and McIlmmurray, 1987). En anden mulighed er at forsøge at coate mikrotiterpladen med nitrocellulose før antigenet påsættes (Nybroe et al., 1989).

Som vist i figur 3.2.3 er en indirekte ELISA ikke umiddelbart anvendelig på miljøprøver, da følsomheden er betrag-

telig nedsat. Der blev i dette forsøg fremstillet to standardkurver. I den ene blev mikrotiterpladen coatet med DSM 13 resuspendederet i PBS. I den anden blev der coatet med DSM 13 resuspendederet i et ekstrakt af søsediment. Dette ekstrakt blev fremstillet ved at gennemføre proceduren for "ekstraktion af bakterier fra sediment" (bilag 6.2) på en steril sedimentprøve, således at ekstraktet repræsenterer det materiale, der isoleres sammen med mikroorganismer fra en prøve.

Da det i afsnit 3.1.6 er vist, at selve antigen-antistof-bindingen ikke påvirkes af en sedimentekstrakt, må den nedsatte følsomhed skyldes, at humuspartikler m.v. fra

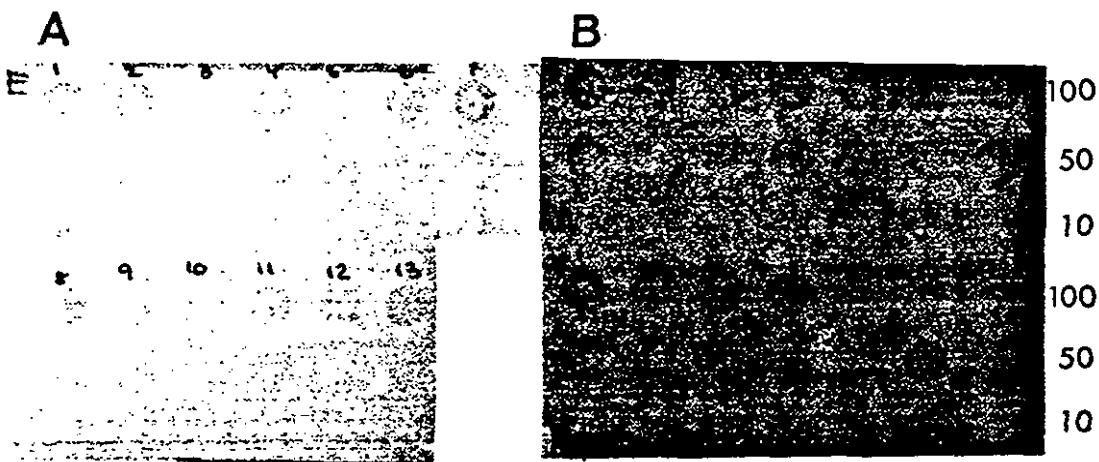


Figur 3.2.3 Sedimentprøvens påvirkning af indirekte ELISA for DSM 13. Ens mængder af DSM 13 suspenderet i enten PBS (○) eller i en ekstrakt af søsediment (△) blev coatet på en mikrotiterplade. Indirekte ELISA blev iøvrigt gennemført som beskrevet i bilag 6.6.

prøven konkurrerer med mikroorganismen om binding til plast-overfladen. Dette resultat understreger behovet for detektionsmetoder, hvor prøven ikke direkte skal immobiliseres på en fast fase.

3.2.3 Undersøgelse af antistofferne specifitet

De første to taps af antistofferne mod Bacillus licheniformis DSM 13 udviste meget lav titer, se figur 3.2.3, hvor antistoffet er anvendt i fortyndingen 1:40. Alle de beskrevne forsøg er derfor udført med tap 3. Antistofferne kaldes for nemheds skyld anti total-DSM 13 og anti-SDS DSM 13.



Figur 3.2.4 Specificitetstest af anti-Bacillus licheniformis tap 1 antistoffers krydsreaktion med andre mikroorganismer. A: anti-total DSM 13, B: anti-SDS DSM 13. Der er påsat 100, 50, og 10 ng af hver organisme og antistoffet er brugt fortyndet 1:40. Ved specificitettesten er benyttet følgende organismer: 1) P. aeruginosa, 2) P. fluorescens, biotype 1, 3) P. fluorescens, biotype 2, 4) P. putida, 5) P. chlororaphis, 6) P. cepacia, 7) A. eutrophus, 8) E. coli, 9) B. subtilis, 10) B. cereus, 11) B. licheniformis, 12) B. pumilus, 13) B. brevis, 14) G.5.5. Nærmere oplysninger om disse referenceorganismer findes i bilag 6.1.

Den tilsvarende specifikitetstest blev udført for anti-total DSM 13 og anti-SDS DSM 13 med anvendelse af indirekte ELISA som testmetode og resultaterne er opført i Tabel 3.2.2.

Tabel 3.2.2 Krydsreaktion af anti-total DSM 13 og anti-SDS DSM 13 med et panel af mikroorganismer. Antistofferne er testet mod 100 ng af de opførte organismer og er anvendt i en fortynding på 1:100. Reaktionen med DSM 13 er sat til 100 % og de øvrige reaktioner angivet i forhold til denne.

	Anti-total DSM 13	Anti-SDS DSM 13
Testorganisme		
<u>P. aeruginosa</u>	5 %	15 %
<u>P. fluorescens 1</u>	2 %	14 %
<u>P. fluorescens 2</u>	2 %	10 %
<u>P. putida</u>	3 %	9 %
<u>P. chlororaphis</u>	2 %	13 %
<u>P. cepacia</u>	11 %	6 %
<u>A. eutrophus</u>	5 %	13 %
<u>E. coli</u>	3 %	8 %
<u>B. subtilis</u>	9 %	7 %
<u>B. cereus</u>	2 %	10 %
<u>B. pumilus</u>	20 %	69 %
DSM 13	100 %	100 %

Anti-total DSM 13 krydsreagerer med B. pumilus og i mindre grad med B. subtilis og P. cepacia. Det udviser dermed flere krydsreaktioner end forventet fra litteraturen, se afsnit 2.3, hvilket kan skyldes at de anvendte detektionsmetoder er meget følsomme. Den brede specifikitet af anti-SDS DSM 13 er i overensstemmelse med Baumann-Grace og Tomesiks (1957) erfaringer med antistoffer mod et detergent ekstrakt af B. Megaterium.

Det blev undersøgt, om krydsreaktion med B. pumilus kunne ned sættes ved at absorbere antistoffet og resultatet af en enkelt absorbtion er vist i Tabel 3.2.3.

Tabel 3.2.3 Krydsreaktion af anti-total DSM 13 før og efter absorbtion med B. pumilus. Antistoffet er testet mod 100 ng af hver organisme ved en fortynding på 1:160.

Testorganisme	Krydsreaktion	
	før	efter
<u>P. aeruginosa</u>	3 %	6 %
<u>P. fluorescens 1</u>	4 %	6 %
<u>P. fluorescens 2</u>	4 %	6 %
<u>P. putida</u>	4 %	8 %
<u>P. chlororaphis</u>	9 %	7 %
<u>P. cepacia</u>	14 %	12 %
<u>A. eutrophus</u>	5 %	3 %
<u>E. coli</u>	4 %	4 %
<u>B. subtilis</u>	21 %	18 %
<u>B. cereus</u>	7 %	7 %
<u>B. pumilus</u>	33 %	16 %
DSM 13	100 %	100 %

Den uønskede reaktion med B. pumilus kan formindskes ved absorbtion, mens antistoffets krydsreaktion med de andre testorganismes ikke påvirkes. Derfor vil fremstillingen af et monospecifikt antistof forudsætte et omfattende arbejde med udabsorbtion.

Under arbejdet med det absorberede anti-total DSM 13 blev det konstateret, at antiserummets baggrundsreaktion blev drastisk øget. Det må derfor anbefales, at udabsorbtion foretages med det rå antiserum, og at IgG fraktionen derefter oprenses ved udsaltnings (bilag 6.4) eller ved kromatografi på Protein A-agarose.

Anti-total DSM 13s reaktion med et panel af Bacillus licheniformis isolater blev ligeledes undersøgt, og disse resultater er afbildet i Tabel 3.2.4. Det ses, at der er en vis grad af krydsreaktion, men at antistoffet må vurderes at kunne blive monospecifikt ved gentagne udabsorptioner. Dette er i overenstemmelse med tidligere erfaringer med antistoffer mod O-antigener fra Bacillus licheniformis (Norris and Wolf, 1964). Antistoffet mod en SDS ekstrakt reagerede med alle de undersøgte Bacillus licheniformis isolater med krydsreaktionsprocenter mellem 65 og 115, og har derfor muligvis egenskaber, der gør det egnet som et artsspecifikt antistof.

Tabel 3.2.4 Anti-total DSM 13s reaktion med et panel af Bacillus licheniformis isolater. Antistoffet er testet mod 100 henholdsvis 50 ng af hver organisme og anvendt fortyndet 1:160.

<u>Bacillus licheniformis</u>	100 ng	50 ng
65	25 %	20 %
67	11 %	8 %
69	13 %	8 %
71	35 %	26 %
117	37 %	17 %
118	28 %	18 %
220	15 %	7 %
DSM 13	100 %	100 %

Som for antistoffet mod Pseudomonas fluorescens er også Bacillus licheniformis antistoffets reaktion blevet undersøgt ved immunoblotting, se figur 3.2.5. Antistoffet reagerer mod adskillige bånd, der må formodes at være kulhydratkomponenter i cellevæggen. Det har ikke været muligt at finde eksempler i litteraturen, hvor tilsvarende antistoffer er benyttet til Western blotting.

Derfor er det ikke her muligt at vurdere præcis hvilke antigener antistoffet genkender.

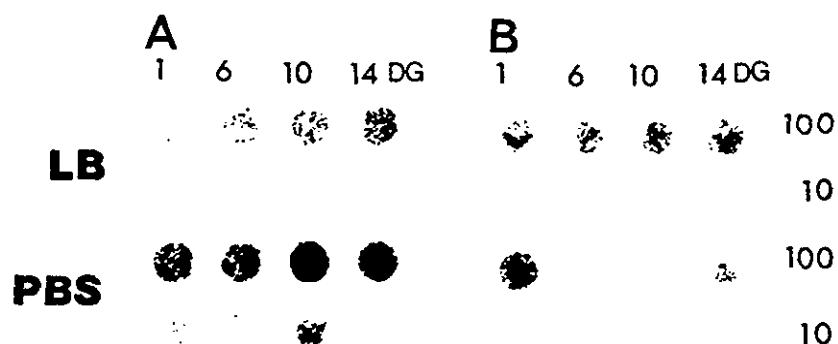


Figur 3.2.5 Immunoblot med anti-total DSM 13. DSM 13 (100 µg TP/bane) blev separeret ved SDS-PAGE. Gelen blev herefter blottet over på nitrocellulose. Blottet blev inkuberet ved oprenset anti-total DSM 13, 1:100.

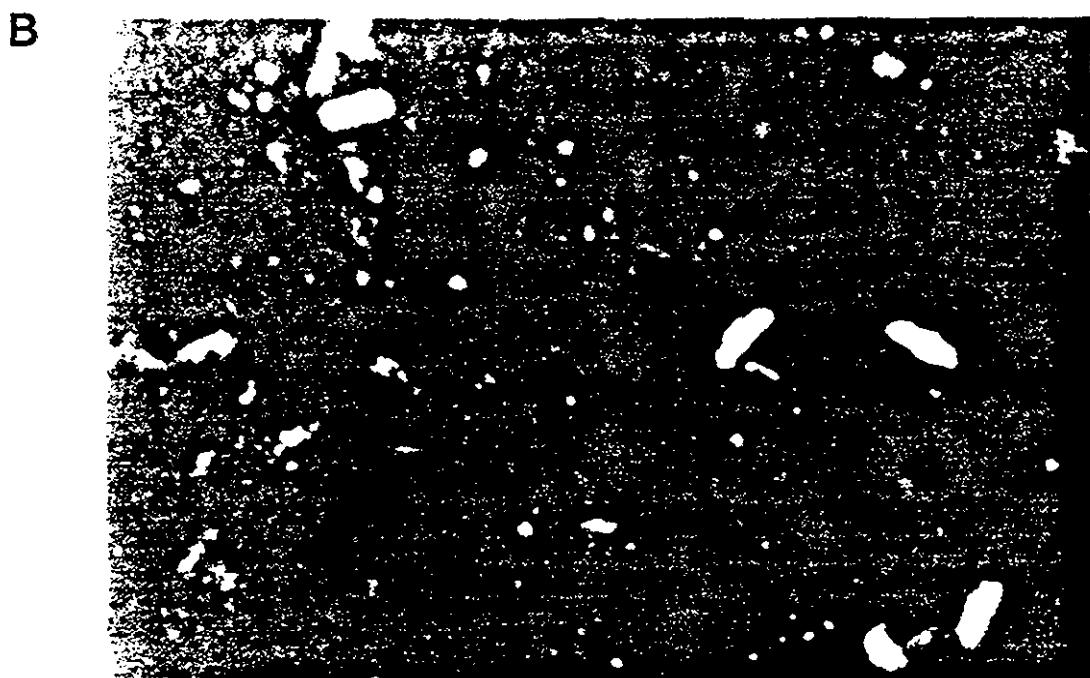
3.2.4 Undersøgelse af antistoffets robusthed

En undersøgelse af anti-DSM 13 antistofferne's evne til at genkende DSM 13 dyrket under forskellige vækstbetingelser i op til 3 uger viste forskelle mellem antistofferne's reaktionsmønstre, se figur 3.2.6. Anti-total DSM 13 reagerede kraftigere med organismer inkuberet i PBS end med organismer dyrket i LB-medie, mens dyrkningstidens længde ikke påvirkede genkendelsen. Derimod syntes sammensætningen af de antigener, som genkendes af anti-SDS DSM 13 at variere med såvel dyrkningsbetingelser

som dyrkningstid. Dette forhold gør, i sammenhæng med antistoffets høje krydsreaktivitet, at antistoffer mod ekstraherede cellevægsproteiner synes uegnede til påvisning af Bacillus licheniformis i miljøprøver. Antistoffet mod varmedenaturerede organismer er mere velegnet. Dog kan ELISA eller DOT-blot baseret på dette antistof give unøjagtige kvantiteringer på grund af variationerne i antigen-mængden i organismerne under forskellige vækstbetingelser. Den mest velegnede immunkemisk detektionsmetode i denne situation er derfor immunfluorescens mikroskopi, hvor enkelte cellers reaktion med antistoffet kan iagttages.



Figur 3.2.6. Robusthedsundersøgelse af anti-total DSM 13, Panel A og anti-SDS DSM 13, Panel B. DSM 13 blev dyrket i LB-medie i ca. 1 døgn. Derefter blev kulturen delt, således at halvdelen blev dyrket videre i LB-medie, mens resten blev inkuberet i PBS. Til de angivne tider blev der udtaget prøver, hvoraf 100 henholdsvis 10 ng blev analyseret ved DOT-blot.



Figur 3.2.7 B. licheniformis visualiseret ved fluorescens. A. Renkultur af DSM 13 påvist med immunfluorescens mikroskopi. Antitotal DSM 13 blev anvendt fortyndet 1:200. B. DSM 13 ekstraheret fra søsediment og derefter påvist ved immunofluorescens mikroskopi. Antistof som i A.

3.2.5 Påvisning ved immunfluorescens mikroskopi

Den klassiske immunkemiske metode inden for mikrobiel økologi er, som nævnt i indledningen, immunfluorescens mikroskopi. I figur 3.2.7 A ses en renkultur af DSM farvet med en indirekte immunfluorescensteknik, se bilag 6.10. I figur 3.2.7 B er DSM 13 ekstraheret fra en sedimentprøve og derefter påvist med fluorescerende antistof. Det ses af figuren, at der er en øget baggrundsfluorescens i forhold i renkulturen, men at DSM 13 ikke desto mindre let kan detekteres i miljøprøver ved denne teknik.

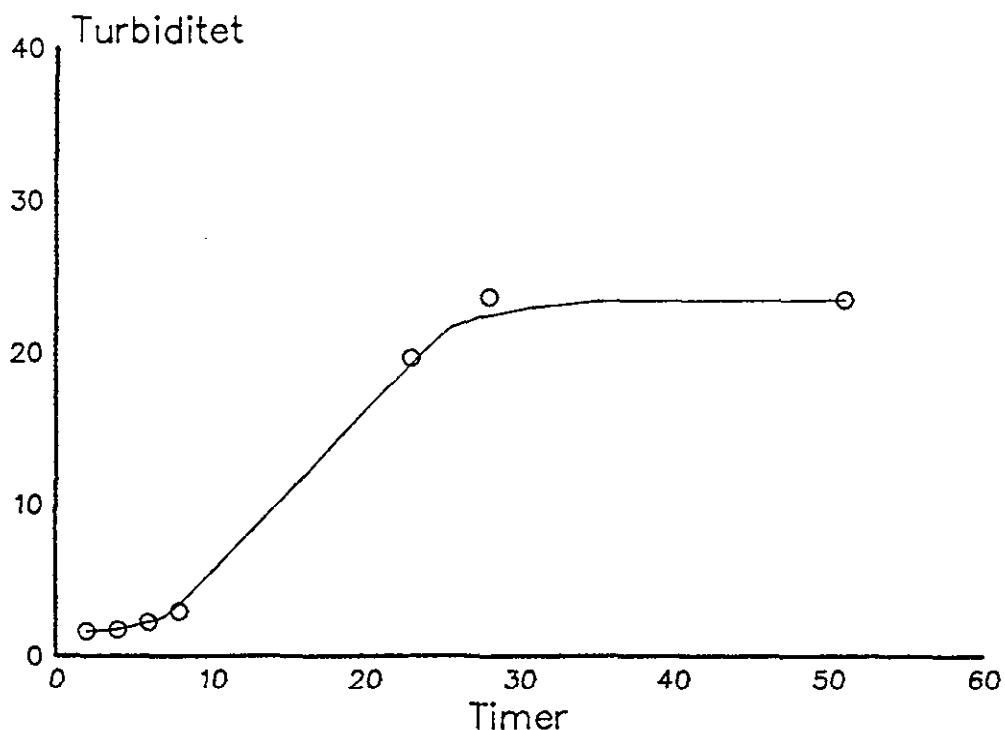
Det blev endeligt undersøgt, om DSM 13-lignende Bacillus licheniformis var til stede i sediment fra Brådebæk Sø, men organismen kunne ikke påvises.

3.3 Resultater, Bacillus subtilis

3.3.1 Fremstilling af antigen

Proceduren for fremstilling af antigenpræparationer af varmedenaturerede Bacillus subtilis 168, Deutsche Sammling von Mikroorganismen no. 402, er helt identisk med proceduren anvendt for Bacillus licheniformis DSM 13.

Ligesom Bacillus licheniformis blev kulturerne høstet i sen vækstfase, d.v.s. efter ca. 20 timers vækst, se vækstkurven i figur 3.3.1. Kulturen blev undersøgt for tilstedeværelse af sporer for brug.

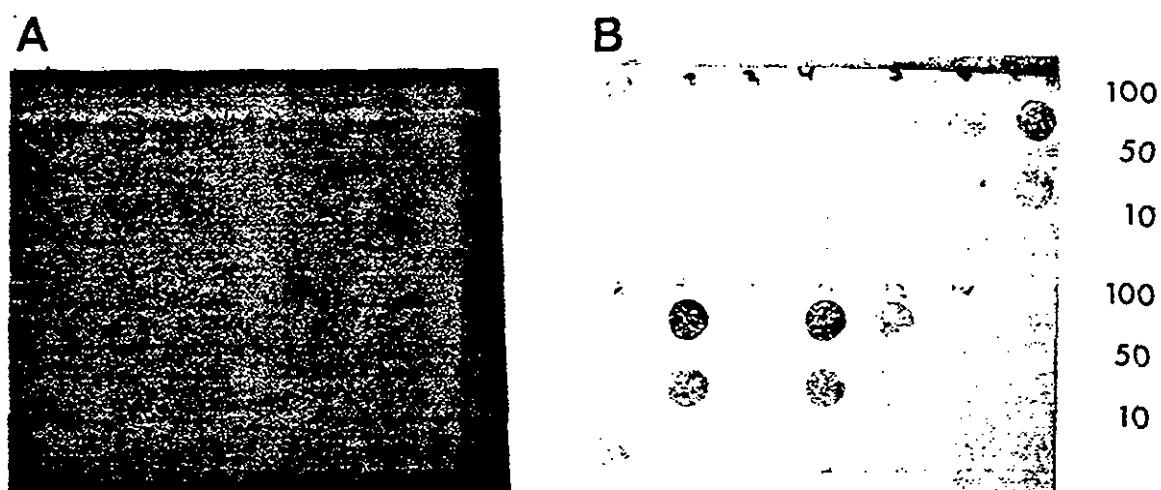


Figur 3.3.1 Vækstkurve for Bacillus subtilis DSM 402. Organismen blev opdyrket i LB under omrystning ved stueterminatur. Efter de angivne tider blev kulturernes turbiditet aflæste.

Udbyttet af SDS-ekstraktionsproceduren var ca. 10 mg TP/l kultur, og proteinsammensætningen af ekstraktet er vist i figur 3.2.2.

3.3.2 Undersøgelse af antistofferne specifitet

Såvel antistoffet mod hele celler som mod SDS-ekstraktet af cellevægge udviste en meget dårlig reaktion med immuniseringsorganismen. Som det kan ses af DOT-blottene i Figur 3.3.2, var reaktionen med DSM 402 ikke større end med flertallet af testorganismerne. På denne baggrund blev der ikke arbejdet videre med antistofferne mod Bacillus subtilis.



Figur 3.3.2 Specificitets test af anti-total DSM-402 og anti-SDS DSM 402. Til nitrocellulosefiltret blev påsat 100, 50 og 10 µg af hver organisme fra testpanelet. Antistoffet blev benyttet i fortyndingen 1:40.

4.

SAMMENFATNING

Formålet med dette projekt har været at indhøste erfaringer med anvendelse af immunkemiske metoder til at påvise mikroorganismer direkte i miljøprøver. Der er benyttet tre modelorganismer i projektet. En stamme af Pseudomonas fluorescens repræsenterer en gram-negativ mikroorganisme, mens stammer af Bacillus licheniformis og Bacillus subtilis er gram-positive modelorganismer. Projektet medvirker til at etablere et metodegrundlag, der kan gøre det muligt at følge gensplejsede mikroorganismers overlevelse og spredning i miljøet. Derfor har det været målet at fremstille antistoffer, der specifikt genkender modelorganismen, og ikke krydsreagerer med andre arter eller andre stammer inden for en art. For hver modelorganisme er der anvendt to strategier for at frembringe antistoffer med de ønskede egenskaber. Antistofferne er blevet anvendt til at etablerer immunkemiske detektionsmetoder. Det er tilstræbt at udvikle metoder, der muliggør en hurtig behandling af et stort antal prøver, f.eks. DOT-immuno-binding og Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

For Pseudomonas fluorescens er der fremstillet antistoffer, dels mod hele varmebehandlede celler, dels mod oprensede ydermembraner. Det førstnævnte antistof gav den mest specifikke detektion. Ydermere var antistoffet robust overfor ændringer i modelorganismens antigensammensætning, idet denne blev genkendt lige godt, selv om den var dyrket under forskellige forhold.

En indirekte ELISA var velegnet til at karakterisere renkulurer, men kunne ikke benyttes på miljøprøver. Der blev derfor udviklet en kompetitiv ELISA, som imidlertid ikke kunne optimeres inden for projektets rammer. Med anvendelse af et optimeret assay baseret på et andet antistof med Pseudomonas fluorescens er det vist, at en kompetitiv ELISA kan anvendes til påvisning af ca. 10^4 celler direkte i en miljøprøve. Det må derfor forventes,

at kompetitiv ELISA baseret på "robuste" antistoffer generelt vil være velegnet til påvisning af mikroorganismer i miljøet.

Antistoffer mod stammer af Bacillus licheniformis og Bacillus subtilis blev fremstillet dels ved immunisering med hele varmebehandlede celler, dels med detergenteeks-trakter indeholdende cellevægsproteiner. For Bacillus licheniformis gav antistof mod varmebehandlede celler den mest specifikke detektion, mens de to immuniseringer med Bacillus subtilis ikke resulterede i brugbare anti-stoffer.

Den antistofbaserede detektion af Bacillus licheniformis var påvirket af hvilke vækstbetingelser, organismen havde haft. Dette betyder, at antigenmængden i miljølevende bakterier er anderledes end i den standardkultur, der benyttes til at etablere en standardkurve for et ELISA-assay. En mængdebestemmelse af bakterier med ELISA vil følgelig blive unøjagtig. Derfor blev der anvendt immun-fluorescens mikroskopi, hvor enkelte cellers reaktion med antistoffet kan vurderes, til detektion af Bacillus licheniformis. Det er vist, at metoden problemfrit kan anvendes til påvisning af organismen ekstraheret fra sedimentprøver.

Perspektiverne for den fremtidige anvendelse af immun-kemiske teknikker til påvisning af gensplejsede mikro-organismer ligger i deres kombinering med genprobe-teknikker. En præcis lokalisation af et rekombinant gen til en bestemt fænotype kan f.eks. ske ved at immunkemiske oprensningsmetoder benyttes til at isolere en relevant gruppe mikroorganismer. En genprobe kan dernæst bruges til at undersøge om et bestemt gen forekommer i den isolerede organisme, men også til at undersøge, om genet har spredt sig til andre mikroorganismer.

5.

REFERENCER

- Arredondo, R. and C.A. Jerez (1989)
Specific DOT-immunobinding assay for detection and enumeration of Thiobacillus ferroxidans.
Appl. Environ. Microbiol., 55, 2025-2029.
- Baumann-Grace, J.B. and J. Tomcsik (1957)
The surface structure and serological typing of Bacillus megaterium.
J. Gen. Microbiol. 17, 227-237.
- Bohlool, B.B. and E.L. Schmidt (1980)
The immunofluorescence approach in microbial ecology.
I: *Advances in microbial ecology*. Alexander, M., ed.
- Chantler, S.M. and M.B. McIlmmurray (1987)
Labelled-antibody methods for detection and identification of microorganisms.
I: *Methods in microbiology*, vol. 19, Collwell, R.R. and R. Gregorova, eds., Academic Press, New York.
- Chester, I.R. and P.M. Meadow (1973)
The relationship between the O-antigenic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of Pseudomonas aeruginosa of different O-serotypes.
J. Gen. Microbiol. 78, 305-318.
- Clausen, J. (1988)
Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules.
Elsevier, Amsterdam.
- Dambre, A. (1986)
Analytical methods.
I: *Practical Protein Chemistry, A Handbook*, A. Dambre, ed., John Wiley, Chichester.

Festl, H., et al. (1986)
DNA Hybridization probe for the Pseudomonas fluorescens
group.
Appl. Environ. Microbiol. 52, 1190-1194.

Filip, C. et al. (1973)
Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium lauroyl sarcosinate.
J. Bacteriol. 115, 717-722.

Fricker, C.R. (1987)
Serotyping of mesophilic Aeromonas spp. on the basis of lipopolysaccharide antigens.
Lett. Appl. Microbiol. 4, 113-116.

Harboe, N.M.G. and A. Ingild (1983)
Immunization, isolation of immunoglobulins and antibody titre determination.
Scand. J. Immunol. 10: 345-351.

Hartung, M. and E. Hellmann (1987)
Examination of 20 Bacillus species by crossed immunoelctrophoresis under taxonomic aspects.
Zbl. Bakt. Hyg., A 263, 509-524.

Hedegaard, A. og O.F. Rasmussen (1989)
Detektion af mikroorganismer i miljøprøver.
Levnedsmiddelstyrelsens publikation nr. 175.

Hill, I.R. and T.R.G. Gray (1967)
Application of the fluorescent-antibody technique to an ecological study of bacteria in soil.
J. Bacteriol. 93: 1888-1896.

- Hitchcock, P.J. and T.M. Brown (1983)
Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels.
J. Bacteriol. 154, 269-277.
- Imagawa, M., Y. Oku, H.I. El-Belbasi, M. Teraoka, T. Nishihara, and M. Kondo (1985)
Synthesis and deposition of spore coat proteins during sporulation of Bacillus megaterium.
Microbiol. Immunol., 29, 1151-1162.
- Kemp, H.A., D.B. Archer and M.R.A. Morgan (1988)
Enzyme-linked immunosorbent assays for the specific and sensitive quantification of Methanosarcina mazei and Methanobacterium bryantii.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 1003-1008.
- Løvborg, U. (1984)
Guide to solid phase immuno assays.
NUNC A/S, Roskilde.
- Mitze, H. and E. Hellmann (1980)
Serologische untersuchungen an bazillenstämmen mittels zweidimensionaler immunelektrophorese: Diagnostische und taxonomische möglichkeiten.
Zbl. Bakt. Hyg., A 248, 401-413.
- Moon, M.M., L.D. Hazlett, R.E.W. Hancock, R.S. Berk, and R. Barrett (1988)
Monoclonal antibodies provide protection against ocular Pseudomonas aeruginosa infection.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29: 1277-1284.

Mutharia, L.M. and R.E. W. Hancock (1985)
Monoclonal antibody for an outer membrane lipoprotein of
the Pseudomonas fluorescens group of the family Pseudomonadaceae.

Int. J. Syst. Bacteriol., 35, 530-532.

Mutharia, L.M., T.I. Nicas, and R.E.W. Hancock (1982)
Outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa serotype
strains.

J. Infect. Dis. 146, 770-779.

Nakajima, K., K. Muroga, and R.E.W. Hancock (1983)
Comparison of fatty acid, protein, and serological pro-
perties distinguishing outer membranes of Pseudomonas
anguilliseptica strains from those of fish pathogens and
other Pseudomonads.

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 1-8.

Norris, J.R. and J. Wolf (1969)
A study of antigens of the aerobic sporeforming bacteria.
J. Appl. Bact. 24, 42-26.

Nybroe, O., A.M. Dalsgård, and E. Bock (1989)
A developmental study of soluble L1.
Int. J. Develop. Neurosci. (I trykken).

Olsen, P.E. and W.A. Rice (1984)
Minimal antigenic characterization of eight Rhizobium
meliloti strains by indirect enzyme-linked immunosorbent
assay.

Can. J. Microbiol. 30, 1093-1099.

Postma, J., J.E. van Elsas, J.M. Govaert, and J.A. van
Veen (1988)

The dynamics of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii
introduced into soil as determined by immunofluorescence
and selective plating techniques.

FEMS Microbiol. Ecol., 53, 251-260.

Mutharia, L.M. and R.E. W. Hancock (1985)
Monoclonal antibody for an outer membrane lipoprotein of
the Pseudomonas fluorescens group of the family Pseudomonadaceae.

Int. J. Syst. Bacteriol., 35, 530-532.

Mutharia, L.M., T.I. Nicas, and R.E.W. Hancock (1982)
Outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa serotype
strains.

J. Infect. Dis. 146, 770-779.

Nakajima, K., K. Muroga, and R.E.W. Hancock (1983)
Comparison of fatty acid, protein, and serological pro-
perties distinguishing outer membranes of Pseudomonas
anguilliseptica strains from those of fish pathogens and
other Pseudomonads.

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 1-8.

Norris, J.R. and J. Wolf (1969)
A study of antigens of the aerobic sporeforming bacteria.
J. Appl. Bact. 24, 42-26.

Nybroe, O., A.M. Dalseg, and E. Bock (1989)
A developmental study of soluble L1.
Int. J. Develop. Neurosci. (I trykken).

Olsen, P.E. and W.A. Rice (1984)
Minimal antigenic characterization of eight Rhizobium
meliloti strains by indirect enzyme-linked immunosorbent
assay.

Can. J. Microbiol. 30, 1093-1099.

Postma, J., J.E. van Elsas, J.M. Govaert, and J.A. van
Veen (1988)

The dynamics of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii
introduced into soil as determined by immunofluorescence
and selective plating techniques.

FEMS Microbiol. Ecol., 53, 251-260.

Stanier, R.Y., B.L. Ingraham, M.L. Wheelis, and P.R. Painter (1988)
General Microbiology.
MacMillan, London.

Tsai, C.M. and C.E. Frasch (1982)
A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides
in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 119, 115-119.

Van Elsas, J.D., A.F. Dijkstra, J.M. Govaert, and J. A. Van Veen (1986).
Survival of Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis
introduced into two soils of different texture in field
microplots.
FEMS Microbiol. Ecol., 38, 151-160.

6. BILAG

Bilag 6.1

De anvendte mikroorganismer

Testpanel af mikroorganismer

<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Typestamme PAO 303 fra University of Massachusetts
<u>P. fluorescens</u> , biotype 1	Fra Institut for Populationsbiologi
<u>P. fluorescens</u> , biotype 2	VKI isolat IS 6.3, fra Island
<u>P. putida</u>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DSM 4011
<u>P. chlororaphis</u>	Fra Institut for Populationsbiologi
<u>P. cepacia</u>	VKI isolat BII2.4, fra Bagsværd Sø
<u>Alcaligenes eutrophus</u>	DSM 4058
<u>E. coli</u> K12	Fra Gensplejsningsgruppen, ATV
<u>Bacillus subtilis</u>	DSM 402
<u>B. cereus</u>	DSM 31
<u>B. licheniformis</u>	DSM 13
<u>B. pumilis</u>	DSM 27
<u>B. brevis</u>	DSM 30

VKIs isolater er oxidase positive stave, som vokser på selektivt medie for fluorescerende Pseudomondader. Isolaterne er yderligere typet efter API 20NE systemet.

Bilag 6.2

Ekstraktion fra sediment

1. Ca. 10^9 celler tilsættes 1 g strålesteriliseret sediment.
Blandingen inkuberes 20 min. ved 8° C.
2. Der tilsættes 9 ml 25 mM NaPO₄-buffer, pH 7,4,
 125 mM NaCl
 0,1 % Tween-20
3. Prøven rystes på et JKA-rystebord ved 300 rpm i 3 minutter
på is. Derefter centrifugeres prøven ved 200 xg ved 4°C i
10 minutter.
4. Supernatanten gemmes mens pellet reækstraheres som ovenfor.
Gentages indtil der opnås 3 supernatanter.
5. De 3 supernatanter puljes og celler sedimenteres ved centri-
fugering ved 6000 xg i 10 minutter ved 4°C.
6. Pellet vaskes 1 x i PBS og resuspenderes i ELISA-fortyndings-
buffer.

Bilag 6.3

Absorbtion af antistoffer

10 ml kultur dyrkes på rystebord til stationær fase.

Høst ved centrifugering 6.000 xg i 10 minutter.

2x vask med PBS, 15 mM NaN₃.

Afvej 250 mg bakteriepellet.

Resuspender pellet i så lidt PBS som muligt.

Inkuber antiserum med bakterier under omrystning 1 time ved stue-temperatur. Inkuber natten over ved 4°C.

Centrifuger 6.000 xg i 10 minutter.

Supernatanten sterilfiltreres, mærkes og opbevares ved 4°C.

Antiserum checkes i DOT-blot før og efter absorbtion.

Bilag 6.4**Oprensning af antistoffer**

1. A ml serum tilsættes (2/100 x A ml) 3 M acetat-buffer pH 5,0.
2. Tilsæt 25% Ammoniumsulfat og lad prøven stå natten over ved stuetemperatur.
3. Spin 15 minutter ved 10.000 rpm.
Til balance benyttes 1,75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
4. Pellet vaskes i 1,75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 x A ml).
Gentag vask.
5. Spin 15 minutter ved 10.000 xg.
6. Resuspende pellet i milliporevand.
7. Dialyser i dialysesæk med plads til dobbelt volumen ved 4°C.
2 x 12 timer over for milliporevand.
1-2 døgn over for 0,05 M acetat-buffer pH 5,0.
8. Spin 15 minutter ved 5.000 xg for at fjerne lipoprotein.
9. Tilsæt 0,27 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per ml.
1 døgn ved stuetemperatur.
10. Spin 15 minutter ved 10.000 xg.
11. Pellet resuspenderes i milliporevand.
12. Dialyser 2 x 1 døgn i 0,1 M NaCl + 15 mM NaN_3 .

OBS! Gem alle supernatanter fra proceduren indtil den færdig-oprensede antistof er testet.

UDFØRELSE:

Et passende stykke nitrocellulosepapir klippes ud (eks. 5 x 5 cm til 15 "dots")

Nitrocellulosepapiret må IKKE BERØRES med fingrene. Brug handsker eller pincet.

Der skrives på papiret med blyant.

DOT-blot-apparatet samles. Et passende stykke nitrocellulosepapir (Hybond C) klippes ud. Der markeres på papiret med blyant hvor de forskellige prøver påsættes (mål efter hullerne på apparatet).

Mindst 4 lag Whatman 1 filterpapir klippes til og placeres i apparatet mellem øverste og mellemste del. Gennemvædes med dest. vand. Apparatet spændes nu sammen, så gummiringen laver mærker i filterpapiret. Dette hjälper til at få nitrocellulosepapiret anbragt korrekt. Efter at nitrocellulosepapiret er bragt på plads, samles apparatet og det er klart til brug.

For at gøre det mere overskueligt, kan man sætte tape over hullerne ud over det område man skal benytte.

Prøverne afpipetteres nu i hullerne. Når alle prøver er afpippetteret, tændes for vandsuget, så prøvematerialet bliver filtreret ned på nitrocellulosen. Derefter åbnes apparatet, og nitrocellulosepapiret er efter tørring klar til blokering.

Blokeres 2-4 minutter med blokeringsbuffer (på vippebord).

Må ikke blokere for længe!

Vask 2 x 10 minutter i 20 ml pr. gang vaskebuffer (på vippebord).

Primært antistof tilsættes et nyt hold vaskebuffer f.eks. i konc. 1:500 til 1:2000.

Inkuberes natten over på vippebord.

Vask x 3 med vaskebuffer ca. 10 minutter per gang.

Inkuberes med sekundært antistof: svin anti-kanin konjugeret med alkalisk fosfatase, f.eks. 1:1000 i 2 timer eller længere.

Vask x 3.

Inkuberes med farvebuffer til farverreaktion (5-15 minutter eller længere). Følsomhedsforøgelse op til 18 timers farvning. Se bilag 6.12.

Farverreaktionen standses med vand (papiret vaskes)

Papiret tørres eller opbevares i vand natten over i køleskab-giver klarere farvning. Evt. farvning af selve nitrocellulose-papiret forsvinder ofte ved tørring.

HUSK POSITIV OG NEGATIV KONTROL!

Bilag 6.6

Direkte ELISA til bestemmelse af
mikroorganismer

1. **Fast fase**

Der benyttes NUNC - maxisorb immunoplade

2. **Første lag**

Den relevante mikroorganisme suspenderes i PBS i kendt koncentration. Suspensionen sonikeres 2 min. i ultralydsbad, hvorefter der påsættes f.eks. 100, 50, og 10 ng målt som TP.

Coatning foregår 1 time ved stuetemperatur, 100 µl/brønd.

3. Der vaskes 5x i vaskebuffer. Dernæst blokeres 5 min. i blokeringsbuffer, og der vaskes atter 5x.

4. **Andet lag**

Det relevante antistof fortyndes i fortyndningsbuffer, og der inkuberes fra 2 - 18 timer ved stuetemperatur, 100 µl/brønd.

5. Vask 5x i vaskebuffer.

6. **Tredje lag**

Sekundært antistof: Svin-anti-kanin HRP-konjugeret fortyndes 1:1000 i fortyndningsbuffer. Inkuberes 2 timer ved stuetemperatur, 100 µl/brønd.

7. Vask 5x i vaskebuffer.

8. **Farvning**

Fremstil farvesubstratopløsning, se bilag 6.12. Påse, at der ikke udvikles farve før udpipettering. Tilsæt 100 µl substratopløsning pr. brønd. Farv i ca. 15 min. eller til passende farveudvikling. Stop ved tilsætning af 100 µl 1M H_2SO_4 .

Bilag 6.7

Kompetitiv ELISA

1. En NUNC-maxisorb immunoplade coates med en mættende mængde antigen fortyndet i PBS. 100 µl/brønd , 1 time ved stuetemperatur.
2. Vask 5x med vaskebuffer.
3. Fremstil fortyndingsrække af standards (med kendt mængde antigen) og af diverse prøver. Fortyndinger foretages i fortyndingsbuffer.
4. Tilsæt 50 µl standard/prøve til hver brønd og umiddelbart efter 50 µl fortyndet antistof. Inkuber natten over ved 8°C.
5. Vask 5x med vaskebuffer.
6. Tilsæt sekundært antistof: peroxidase konjugeret svin anti kanin Ig, 1:1000 i fortyndingsbuffer. Inkuber 1 time ved stuetemperatur.
7. Vask 5x med vaskebuffer.
8. Udfør enzymfarvning, se bilag 6.12.

Bilag 6.8

Immunfluorescens mikroskopi

Filtrer prøven gennem 0,2 µm filter. Brug Nucleoporefilter SN 110656 med Whatman GF/C som underfilter.

Vask med 3 x 5 ml steril-filtreret PBS, 0,05% Tween 20.

Tilsæt 350 µl 15% svine serum i PBS.

Inkuber 20 min.

Vask filteret med 3 x 5 ml PBS, 0,05 % Tween 20.

Tilsæt 350 µl primært antistof, fortyndet passende, ofte ca. 1:200, i PBS.

Inkuber i 1 time ved stue-temperatur.

Vask med 3 x 5 ml PBS, 0,05% Tween 20.

Tilsæt 350 µl sekundært antistof: FITC-conjugeret svine anti-kanin immunoglobulin i fortyndingen 1:20 i PBS.

Inkuber 1 time i mørke.

Vask med 3 x 5 ml PBS, 0,05% Tween 20.

Ved mikroskopering bruges "immersion oil" fra OLYMPUS OPTICAL CO.

Brug følgende filter:

Barrier filter 0515

Supplementary exciting filter EY 455.

1. Ca. 1 time før afslutningen af SDS-polyakrylamid gelelekktroforesen tilsættes 10 µl samplebuffer/brønd for tydeligt at markere banerne.
2. Efter afslutning af elektroforesen samles blotteapparatet (JKA dry-blotter) som følger: OBS! Bær handsker under hele processen ! !
3. Grafitelektroderne vaskes i demineraliseret vand.
12 stykker filterpapir (Whatman nr. 1) klippes til, så størrelsen passer til den gel, som ønskes blottet.
4. 6 stykker filterpapir vædes i transferbuffer og placeres på den nederste grafitelektrode. Undgå luftbobler.
5. Et stykke nitrocellulose membran (Amersham Hybond C) klippes til og vædes i transferbuffer. Lægges ovenpå filterpapiret.
6. Gelen placeres på nitrocellulosemembranen. Undgå luftbobler og husk at have samhørende orienteringsmærker på gel og nitrocellulosemembran. Håndtering af gelen lettes, hvis den fugtes let med transferbuffer.
7. Ovenpå gelen placeres 6 stykker filterpapir vædet i transferbuffer og den øverste elektrode lægges på.
8. Blotting foretages ved $0,8 \text{ mA/cm}^2$ i 1,5 time. Husk kontinuert at regulere mA, hvis strømkilden ikke kan holde disse konstant.
9. Efter blotting adskilles apparatet. SDS-gelen kontrolfarves i coomassie. Nitrocellulosemembranen blokeres 5 min. i blokeringsbuffer og vaskes i vaskebuffer 3x.
10. Blottet er herefter klar til inkubering med antistoffer. Følg instruktioner for DOT-blot.

Præparation af ydermembraner fra
Pseudomonas

1. Cellerne dyrkes på rystebord natten over ved stuetemperatur.
Høstes ved 5.000 xg i 10 minutter ved 4°C.
2. Vask 2x i PBS ved 4°C og resuspende pellet i 20 ml milliporevand.
3. Cellerne sonikeres 10 x 1 minut med 30 sekunders intervaller på isbad.
4. Tilsæt Sarkosyl (N-lauroylsarcosine) til en slutkoncentration på 2%, og inkuber ved stuetemperatur i 30 minutter.
Herved solubiliceres cellemembraner mens de ydre membraner bevares.
5. Spin hele celler ned ved 3.000 xg i 10 minutter. Supernatanten centrifugeres ved 38.000 xg i 40 minutter ved 4°C.
6. Pellet indeholdende OM vaskes 1x og resuspenderes i 1 ml milliporevand. -20°C.

Der måles proteinkoncentration ved Lowry og køres SDS-PAGE.

Bilag 6.11

Præparation af SDS-ekstrakt af Bacillus
cellevægge

Vegetative celler høstes fra 1 l kultur.

6.000 xg i 10 minutter.

2x vask med 5 ml PBS.

Pellet resuspenderes

i 2 x 5 ml:

50 mM Tris HCl pH 8,0
10 mM EDTA
Trasylol 100 U/ml
Lyzozym 100 µg/ml

Inkuberes ved 37°C i 60 minutter.

Centrifugeren 15.000 xg i 30 minutter ved 4°C.

Vask precipitatet i Milliporevand ved 4°C.

Resuspender i 2.5 ml

1% SDS
50 mM DTT
100 mM NaCl
10 mM EDTA/NaOH pH 9,8

Inkuber 2 timer ved 37°C under omrøring.

Centrifugeren 15.000 xg ved 20°C.

Supernatanten er ekstraheret cellevægsprotein.

Bestem proteinkoncentration ved hjælp af Bradford og analyser ved SDS-PAGE.

Bilag 6.12**Buffere**

ELISA-fortyndingsbuffer	50 mM Tris/HCl pH 10,2 450 mM NaCl 0,5% BSA 0,05% Tween 20
BLOT-blokeringsbuffer	50 mM Tris/HCl pH 10,2 150 mM NaCl 2% Tween 20 0,5% BSA
IMMUNO-vaskebuffer	50 mM Tris/HCl pH 10,2 150 mM NaCl 0,05% Tween 20 0,05% BSA

FARVEBUFFER TIL ALKALISK PHOSPHATE

Skal være frisklavet. GIFTIG. Bær handsker.

Nitroblue tetrazolium stock solution	5,0 ml
Substrat stock solution	0,75 ml
1 M MgCl ₂	0,10 ml
Ethanolamin buffer	ad 50,0 ml

Ethanolamin buffer:

0,1 M ethanolamin buffer titreret med 4 M HCl til pH 9,6

Nitroblue tetrazolium stock solution: Opbevares ved 4°C.

Nitroblue tetrazolium	50 mg
ethanolamin buffer ad	50 ml

Substrat stock solution: Opbevares ved -20°C.

66% (v/v) methanol	8 ml
33% (v/v) acetone	4 ml
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat	48 mg

