



Abb.13

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein an humanen Hemizonae. Die Inkubation der korrespondierenden Hemizona einer Eizelle erfolgte mit Antiserum AS ZP 3-6 (A) bzw. mit dem entsprechenden Präimmunserum (B) (jeweils 1:100 verdünnt). Gebundene anti-ZP3 Antikörper wurden durch anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidase-anti-Peroxidase und Diaminobenzidin als Substrat nachgewiesen. (Originalvergrößerung x 500)

3.5.2 Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae nach Inkubation mit Spermatozoen

Zum Einsatz kamen menschliche Hemizonae, die zu klinisch diagnostischen Zwecken im Hemizona Assay am Jones Institut in Norfolk eingesetzt wurden. Als Testzellen dienten Metaphase I oder II Eizellen; die daraus gewonnenen Hemizonae wurden dem Hemizona Assay zugeführt. Eingesetzt wurden Hemizonae, die im Hemizona Assay betreffend der Bindung von Spender Spermatozoen an die Hemizona normwertig waren. Nach Ablauf des Hemizona Assays wurden die Hemizonae und die gebundenen Spermatozoen auf Objektträger fixiert.

Eine Hälfte der Zona pellucida wurde mit Antiserum inkubiert, die korrespondierende Hälfte diente als interne Kontrolle. Diese Hemizonae wurden eingesetzt, um zu überprüfen, ob Unterschiede im Färbeverhalten zu Hemizonae, die nicht mit Spermatozoen inkubiert wurden, festzustellen waren. Die an die Hemizonae gebundenen Spermatozoen waren auch nach Durchlaufen der Färbeprozedur gut erkennbar (Abb.14 A und B).

Eine positive Immunreaktion des Antiserums an der mit AS ZP3-6 inkubierten Hemizona stellte sich durch eine intensive Braunfärbung der Zona pellucida dar. Besonders intensiv angefärbt erschien der ringförmige Rand der Hemizona. Der zentrale Anteil der Hemizona dagegen war in geringerem Ausmaß braun tingiert (Abb.14 A).

Als Negativkontrolle wurde die korrespondierende Hemizona mit dem entsprechenden Präimmenserum inkubiert. Wie erwartet zeigte sich eine nur schwache, ockerfarbene Anfärbung der Hemizona (Abb.14 B).

Hinsichtlich der Bindung von anti ZP3 Antikörpern (gemessen anhand der Intensität der Braunfärbung) an spermatozoenfreie Hemizonae und an Hemizonae nach Durchlaufen des Hemizona Assay war kein Unterschied feststellbar. Nach Inkubation mit dem Antiserum war in beiden experimentellen Ansätzen eine positive Immunreaktion in Form einer starken Braunfärbung nachweisbar. Die jeweils korrespondierenden Kontrollhemizonae zeigten eine nur schwache Anfärbung.