

Facharbeit
aus dem Bereich Chemie

Thema: Suche nach Klonen unter Berücksichtigung verschiedener Detektionsmethoden

Verfasser/in: Sebastian Pütz

Leistungskurs: Chemie LK, 2007/09

Kursleiter/in: LAss Herr Gallenberger

Abgabetermin: 30.01.2009

Gymnasium Penzberg
Naturwissenschaftlich- technologisches und Sprachliches Gymnasium
Leistungskurs Chemie 07/09

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Theoretischer Teil	4
2.1	Antikörper.....	4
2.2.1	Allgemein.....	4
2.1.2	Molekülstruktur	4
2.1.3	Antigen- Antikörper- Bindung.....	5
2.1.4	Gewinnung von monoklonalen Antikörpern	6
2.2	Das ELISA- Verfahren	8
2.2.1	Allgemein.....	8
2.2.2	Aufbau	8
2.2.3	ELISA- Arten.....	9
2.3	Verschiedene Detektionsmethoden.....	11
2.3.1	Allgemein.....	11
2.3.2	Enzyme	12
2.3.3	Photometrie	13
2.3.4	Fluoreszenz	14
2.3.5	Lumineszenz	15
3	Durchführung	17
3.1	Methoden	17
3.2	Auswertung und Ergebnisse	19
4	Diskussion der Ergebnisse	21
5	Quellenverzeichnis	22
5.1	Literaturverzeichnis	22
5.2	Internetquellen (Siehe beigefügte CD)	22
5.3	Bildquellen.....	22
5.4	Mündliche Quellen	23
6	Danksagung	24
7	Selbständigkeitserklärung	24

1 Einleitung

Die Facharbeit befasst sich mit der Suche nach Klonen und deren Verwendung im ELISA-Verfahren, sowie verschiedenen Detektionsmethoden, womit das Reaktionsprodukt im ELISA-Verfahren sichtbar gemacht werden kann. Allgemein versteht man unter einem Klon genetisch identische Tiere/ Pflanzen oder identische Zellen. Die folgende Arbeit konzentriert sich auf die „Suche“ nach Klonen in Form von Zellen, die bestimmte Antikörper produzieren. Hierbei kann z.B. die so genannte Hybridom-Technik ihre Anwendung finden: Antikörperproduzierende B- Zellen werden mit Zellen einer Myelom- Zelllinie verschmolzen, die dann monoklonale Antikörper in großen Mengen produzieren können. Die so entstandene „Hybridomzelle“ wird als Klon bezeichnet. Ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein „immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.“ Antikörper können im ELISA-Verfahren zum Nachweis von Proteinen, Viren oder niedermolekularen Substanzen (Hormone, Toxine, etc.) in einer Probe (Blutserum, Milch, etc.) verwendet werden. Um das „Ergebnis“ sichtbar zu machen, z.B. durch eine enzymatische Farbreaktion, kommen verschiedene Detektionsmethoden zum Einsatz. Als Solche bezeichnet man z.B. die Photometrie, „die Messverfahren im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes bezeichnet“ und unter anderem in der Arbeit noch genauer beschrieben wird.

Kommentar [Ihr Benut1]: Nicht nur im sichtbaren Bereich

2 Theoretischer Teil

2.1 Antikörper

2.2.1 Allgemein

Antikörper, auch bekannt als Immunglobuline (Ig), sind Eiweißstoffe, die von weißen Blutzellen produziert werden und im Blut fließen. Sie erkennen und binden fremdartige Proteine, Mikroorganismen oder Giftstoffe, um sie zu neutralisieren.

Die Produktion von Antikörpern basiert auf einer Immunreaktion in Wirbeltieren auf bestimmte Antigene, die normalerweise die Bildung dazu passender Antikörper hervorruft.

Antigene sind in der Regel Proteine oder Polysaccharide, die Teile (Zellwände, Geißeln, Giftstoffe, etc.) von Bakterien, Viren oder anderen Mikroorganismen enthalten.

Antikörper sind aufgeteilt in fünf Hauptklassen (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE), basierend auf ihrer Struktur der konstanten Region, die weiterhin in Nebenklassen untergliedert werden (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3).

Des Weiteren unterscheidet man zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Erstere sind Antikörper, die von identischen Plasmazellklonen hergestellt werden und dementsprechend ein Epitop (spezifische Antikörper-Bindungsstelle auf dem Antigen) des Antigens erkennen können. Polyklonale Antikörper werden dagegen von unterschiedlichen Plasmazellklonen produziert und erkennen/ binden somit mehrere Epitope.

2.1.2 Molekülstruktur

Wie Abbildung 1 verdeutlicht, ähneln zumindest Antikörper vom Typ IgG in ihrer räumlichen Struktur stark dem Buchstaben „Y“. IgG ist aus zwei identischen schweren- (Heavy Chains) und zwei identischen leichten (Light Chains) Ketten aufgebaut.

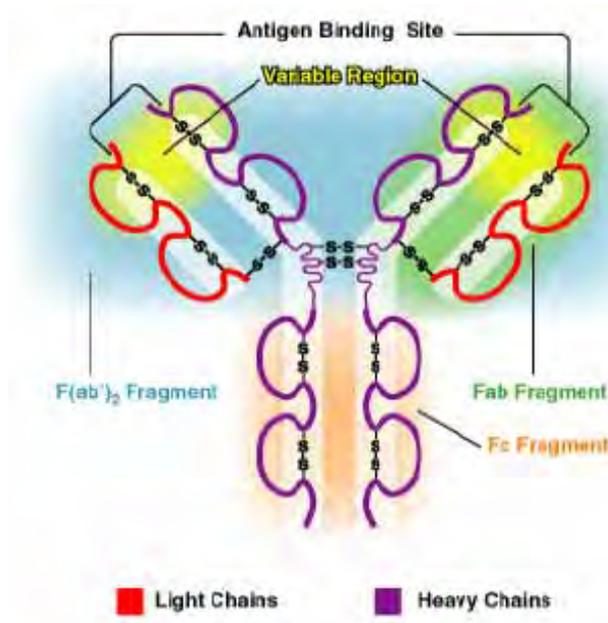


Abb. 1: Molekülstruktur eines Antikörpers

Die Ketten sind durch kovalente Disulfidbrücken (-S-S-) miteinander verbunden. Man unterscheidet zwischen konstanten und variablen Regionen der Antikörper. Die zwei Antigen-Bindestellen (Paratope) bilden sich aus dem variablen Bereich der schweren- und der leichten Kette.

Der Antikörper kann mit Pepsin und mit Papain behandelt werden. Bei der Behandlung mit Pepsin spaltet sich der Antikörper in ein F(ab)₂-Fragment (kompletter oberer Bereich des Antikörpers) sowie Fc-Bruchstücke. Eine Behandlung mit Papain führt zur Spaltung zu zwei Fab-Fragmenten und einem Fc-Fragment. Ein Fab-Fragment besteht aus einer leichten- und einem Teil der schweren Kette und stellt den antigenbindenden-Teil des Antikörpers dar. Das Fc-Fragment ist der konstante Teil des Antikörpers, wodurch auch die Einteilung in verschiedene Nebenklassen stattfindet.

2.1.3 Antigen- Antikörper- Bindung

Die variablen Bereiche der Fab-Fragmente beinhalten die Paratope des Antikörpers und binden spezifisch an das Epitop, welches die spezifische Antikörper-Bindungsstelle auf dem Antigen ist. Hierfür nähern sie sich dem Epitop bis in den Nanometer-Bereich und umschließen es nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“. Die Bindungsstärke zwischen Paratop und Epitop wird durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, sowie Wasserstoff-Brückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte beeinflusst (Abb. 2, Antigen-Antikörperbindung). Die Bindungsstärke einer Paratop-Epitop-Bindung wird als Affinität bezeichnet. Bei multivalenten Bindungen, also Bindungen mehrerer Antikörper an Antigene, ergibt sich die Gesamtaffinität als Avidität. Die Maßangabe erfolgt in der Dimension mol/l. Umso höher die Affinität eines Antikörpers ist, desto weniger Antigene benötigt man zur Absättigung aller Antigene mit Antikörpern. Man verwendet eher hochaffine, stark-bindende Antikörper, da diese fester an das Antigen binden und zudem durch kürzere Inkubationszeiten und geringere Arbeitskonzentrationen Zeit und Geld sparen. Letztendlich basieren alle immunologischen Methoden auf der Ausnutzung der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung.

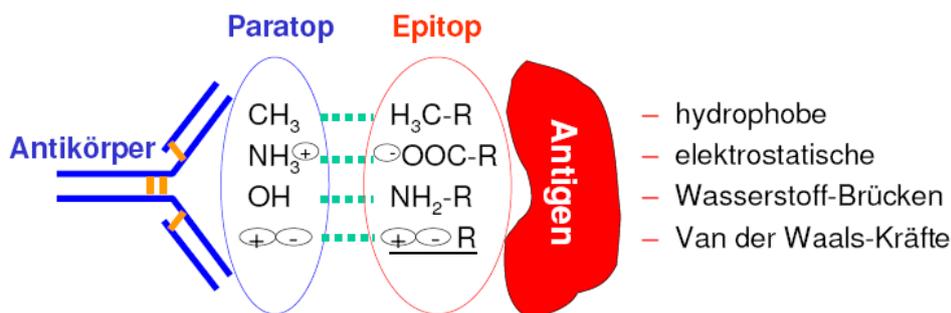


Abb. 2: Antigen- Antikörperbindung

2.1.4 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, kann man die sogenannte „Hybridom- Technik“ anwenden. „Monoklonal“ heißt, dass sie von dem gleichen Abkömmling einer einzeln geklonten Antikörper- produzierenden Zelle

hergestellt werden. Hierbei wird zuerst ein Tier (i.d.R. eine Maus) mit dem Antigen per Injektion immunisiert (siehe Abb. 3, Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mittels Hybridom- Technik (1)). Es findet eine Immunreaktion statt, die zur Produktion von B-

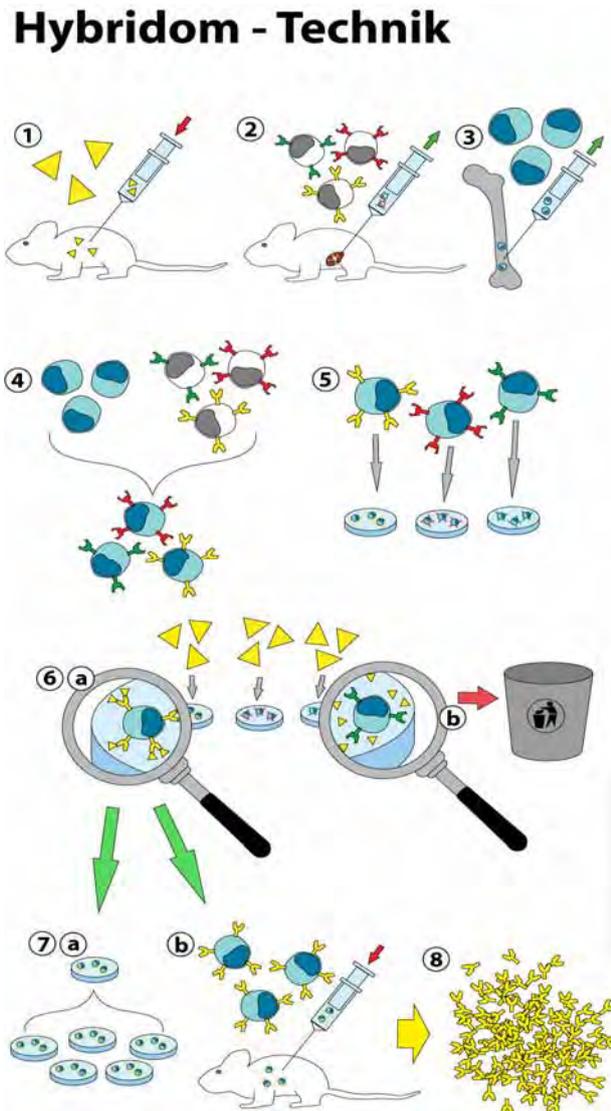


Abb.3: Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mittels Hybridom- Technik

Lymphozyten führt. B- Lymphozyten können durch körperfremde Antigene aktiviert werden und sich so zu Plasmazellen entwickeln. Diese Plasmazellen werden aus der Milz der Maus

entnommen (2) und isoliert, die dann die Fähigkeit besitzen, Antikörper zu bilden. Die Entnahme findet aus der Milz statt, da dort die Lymphozyten- Anzahl ca. 50mal höher ist als im Blut. Die Plasmazellen haben die Fähigkeit verloren, sich zu teilen, sodass sie mit unsterblichen Myelomzellen (3, krebsartige B- Lymphozyten) zu „Hybridomzellen fusioniert werden (4). Nun besitzt die Hybridomzelle die Eigenschaft der Plasmazelle, einen bestimmten Antikörper herzustellen und die Eigenschaft der Myelomzelle, diese Produktion unendlich fortführen zu können. Es werden nun die Hybridomzellen ausgewählt, deren Antikörper am besten an das Epitop des Antigens binden (6a), die anderen Hybridomzellen werden nicht mehr gebraucht (6b). Diese Zelllinie wird nun bei Bedarf geerntet (7+8).

2.2 Das ELISA- Verfahren

2.2.1 Allgemein

Ein „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (kurz: ELISA) ist eine hoch sensitive und präzise Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Substanzen, die auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren, bei dem Substanzen mit Hilfe von Bindungen zwischen Antigenen und Antikörpern nachgewiesen werden können. So kann zum Beispiel das Vorhandensein von Proteinen, Bakterien oder niedermolekularen Stoffen wie Hormonen in einer Probe (z.B. Blut) überprüft werden. Das Verfahren beruht auf der Antigen- Antikörper- Bindung: Der spezifische Antikörper bindet an die Substanz (Antigen), die nachgewiesen werden soll, wobei entweder der Antikörper oder das Antigen durch ein Enzym markiert werden. Durch die Enzymaktivität kann nun die Bindung detektiert und quantifiziert werden, die sich durch den Verbrauch farbiger oder fluoreszierender Substrate relativ unkompliziert feststellen lässt. Da die Signalstärke proportional mit der Konzentration der Antigene ansteigt, kann der ELISA auch zur Quantifizierung, also dem quantitativen Nachweis von dem zu bestimmenden Stoff, verwendet werden.

2.2.2 Aufbau

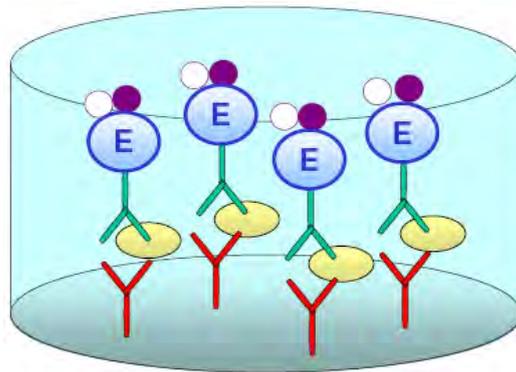
Der prinzipielle Aufbau wird anhand eines Beispiel- ELISA's gezeigt:

Als erster Schritt wird die Probe in die ELISA- Platte pipettiert und inkubiert. Dabei werden die Antikörper bzw. die Antigene an die feste Phase, i.d.R. eine 96- Well- Mikrotiterplatte aus Polystyrol (für starke Bindung von Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen), gebunden. Dieser Vorgang wird als „Coaten“ bezeichnet. Der Antikörper oder das Antigen werden zuvor mit einem Enzym, z.B. Meerrettich- Peroxidase markiert, wodurch man nachher eine Aussage über den Gehalt der Probe machen kann. Es wird nun 50- 200 µl Coating- Puffer dazugegeben und bei ca. 5°C über einen Zeitraum von ca. 14h inkubiert. Um die „Hintergrundaktivität“, also die Aktivität der unspezifisch gebundenen enzymmarkierten Antigen- bzw. Antikörpermoleküle möglichst gering zu halten, werden die freien Proteinbindestellen durch bestimmte „Blocker“ wie BSA oder Casein „geblockt“. Die Komponenten, die nicht binden, werden durch Waschen mit Hilfe eines Mikrotiterplattenwashers von der Platte entfernt. Um möglichst wenige Antigen- Antikörper-Komplexe wegzuwaschen, werden die Antigene bzw. die Antikörper kovalent mit der Mikrotiterplatte verbunden. Dann wird ein Substrat, beispielsweise ABTS für das Enzym zur Farbentwicklung (Photometrie), Fluoreszenz oder Lumineszenz dazugegeben, um ein messbares Signal zu erhalten. Alle drei Vorgehen basieren auf Reaktionen von Licht und werden in der Arbeit noch ausführlich angesprochen.

2.2.3 ELISA- Arten

Man unterscheidet verschiedene Arten von ELISA. In dieser Arbeit sollen die am häufigsten verwendeten Methoden kurz angesprochen werden. Hierbei werden Schritte wie Waschen oder Blocken nicht nochmals erläutert.

1. Bei dem sogenannten „Sandwich- ELISA“ wird das Antigen als „Antikörper- Antigen- Antikörper- Komplex“ gebunden. Der erste Antikörper wird wie bei dem kompetitiven Verfahren in die feste Phase gebracht (s. Abb. 4, Aufbau eines Sandwich- ELISA, rot) und bindet mit der danach zugegebenen Probe (nachzuweisende Antigene, gelb). Nach der Inkubation wird nun noch ein Detektionsantikörper (grün) mit Enzymmarkierung (E) dazugegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet und sich somit der genannte Komplex bildet (Das Antigen ist wie ein Sandwich von den Antikörpern umgeben). Durch Zugabe eines Substrates (weiß, lila) kann der ELISA letztendlich ausgewertet werden.

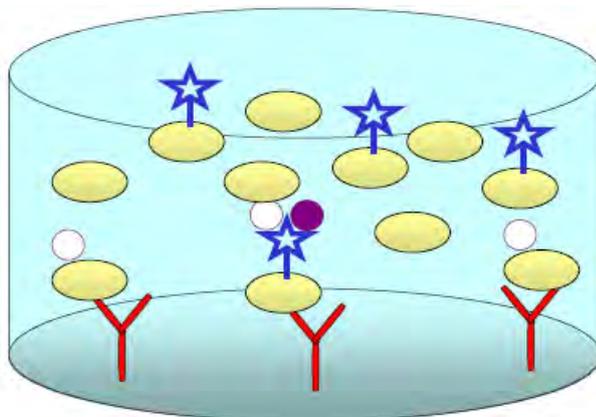


ELISA-Platte

Abb. 4: Aufbau eines Sandwich- ELISA

2. Das kompetitive Verfahren des ELISA beruht auf der Konkurrenz zwischen Antigenen der Probe und enzymmarkierten Antigenen um die freien Bindungsstellen des Antikörpers. Es werden zuerst spezifische Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden, um sie dann mit der Probe (nachzuweisende Antigene!) und enzymmarkierten Antigenen zu inkubieren. Nun können Antigene der Probe sowie Antigene, die enzymmarkiert sind, an die Antikörper binden. Je niedriger das Signal der Nachweisreaktion ist, desto weniger enzymmarkierte Antigene haben gebunden und desto höher muss die Antigen- Konzentration der nachzuweisenden Probe sein (indirekte Proportionalität). Abbildung 5 zeigt den Aufbau eines kompetitiven ELISAs.

Abb. 5: Aufbau eines kompetitiven ELISA



3. Der indirekte ELISA dient zur Bestimmung der Antikörper- Konzentration, wobei die Antigene an die Mikrotiterplatte gebunden werden. Nun wird die Probe (enthält die zu bestimmenden Antikörper) dazugegeben, sodass die spezifischen Antikörper an das Antigen binden. Als nächsten Schritt gibt man Antikörper- spezifische Antikörper mit Enzymmarkierung dazu, sodass eine Antikörper- Antikörper- Bindung erfolgt. Schließlich kann die Enzymaktivität durch Zugabe eines Substrates gemessen werden. Diese ist direkt proportional zu der Menge der spezifischen Antikörper in der Probe (je höher die Aktivität, desto mehr AK- spezifische AK konnten binden). Abbildung 6 zeigt den Aufbau des direkten ELISAs.

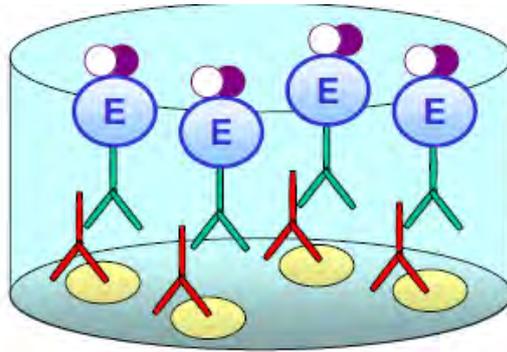


Abb. 6: Aufbau eines direkten ELISA

2.3 Verschiedene Detektionsmethoden

2.3.1 Allgemein

Als Detektionsmethode beschreibt man allgemein „eine Untersuchungsmethode, die eine bestimmte Auffälligkeit feststellen soll“. Im Falle des ELISA werden Detektionsmethoden dafür verwendet, um das Reaktionsprodukt nachzuweisen oder quantitative Aussagen darüber geben zu können. Hierfür gängige Methoden sind zum Beispiel die Photometrie, die Fluoreszenz oder die Lumineszenz. Um diese Methoden anwenden zu können, wird ein Enzym an den Antikörper gebunden und dessen Aktivität durch ein zugegebenes Substrat gemessen. Der genaue Vorgang wird im Folgenden genauer beschrieben.

Kommentar [Ihr Benutz2]:

2.3.2 Enzyme

Enzyme verwendet man im ELISA- Verfahren, um Antigen- Antikörper- Bindungen mit Hilfe von farbigen oder fluoreszierenden Substraten nachweisen zu können. Ein geeignetes Enzym sollte aufgereinigt in größeren Mengen verfügbar sein und eine hohe Enzymaktivität aufweisen, also das Substrat möglichst schnell katalysieren. Bei der Verwendung im Assay ist es von Bedeutung, dass das Enzym möglichst stabil bleibt und sich leicht an den Antikörper/ das Antigen binden lässt. Als geeignete Enzyme für den ELISA haben sich die Meerrettich-Peroxidase (HRP), Alkalische Phosphatase (AP) und β -Galaktosidase herausgestellt. Anhand der HRP als Beispiel soll eine mögliche Kopplungsmethode des Enzyms an den Antikörper/ das Antigen beschrieben werden:

Die Meerrettich- Peroxidase (abgekürzt HRP, da vom Englischen, Abbildung 7) ist, wie der Name schon erahnen lässt eine Peroxidase aus der Wurzel von Meerrettich. Bei der Peroxidase-Reaktion wird H_2O_2 zu $2 \text{H}_2\text{O}$ reduziert, wobei ein Elektronenlieferant, der e- - Donor, oxidiert wird. Das Enzym besteht aus 308 Aminosäuren, einem Häm und wird von ca. 20% Kohlenhydratresten und 2 Ca^{2+} - Ionen umgeben. HRP hat ein Molekulargewicht von ca. 44000 Dalton ($1\text{Da} = 1\text{u} = 1,66 \cdot 10^{-24}\text{g}$) und ist damit relativ leicht. Es besitzt keine freien Thiolgruppen und nur wenige freie Aminogruppen, die für eine kovalente Bindung geeignet wären. Für die Kopplung des Enzyms an den Antikörper/ das Antigen hat sich die sogenannte „Periodat- Methode“ als effizient erwiesen: Wird die Meerrettich- Peroxidase oxidiert, so werden zuerst die Kohlenhydratreste mit OH- Gruppen gespalten und dadurch Aldehydgruppen gebildet. Die Aldehydgruppen reagieren dann mit den Aminogruppen der Antikörper zu „Schiffschen Basen“, wenn das Milieu leicht alkalisch ist (pH 9-10). Als Schiffische Base bezeichnet man ein Kondensationsprodukt aus Aldehyden, Carbonylverbindungen und primären Aminen (Allgemeine Formel: $\text{CR}_1/2=\text{N-R}_3$). Nun werden die Schiffischen Basen mit Natriumborhydrid reduziert, sodass diese zu sekundären Aminen reagieren und die Bindung des Enzyms an den Antikörper ermöglichen.

Die Enzym- Antigen/ Antikörper- Verbindungen werden schließlich chromatografisch aufgereinigt und können in Kaliumphosphatpuffer mit BSA (Blockierungslösung) gelagert werden.

Wie bereits erwähnt wird die Enzymaktivität durch Substrate bestimmt, die je nach Detektionsmethode gewählt werden. In dieser Facharbeit sollen die Photometrie, die Fluoreszenz und die Lumineszenz als Auswertungsmethoden genauer beschrieben werden.

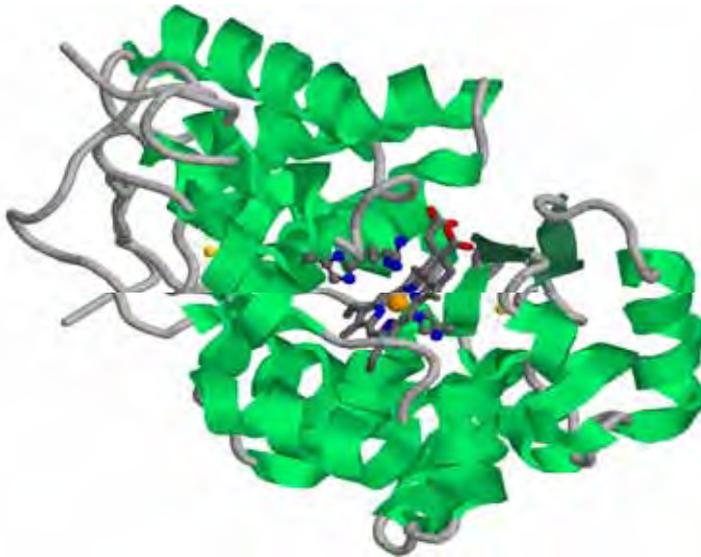


Abb. 7: 3D- Struktur der Meerrettich- Peroxidase (Protein Data Bank)

2.3.3 Photometrie

Bei der Photometrie wird die Konzentration einer Lösung durch ein Photometer bestimmt, indem man die Abschwächung der Intensität elektromagnetischer Strahlung misst. Je nachdem, welche Lösung und wie viele Moleküle der Strahl durchläuft, wird er unterschiedlich stark absorbiert. Licht ist im Prinzip nichts anderes als elektromagnetische Wellen, die eine bestimmte Frequenz (f) bzw. eine dazugehörige Wellenlänge (λ) aufweisen und sich in Lichtgeschwindigkeit (c) ausbreiten. Wenn die Wellenlänge zwischen 400 und 700 nm (Nanometer) liegt, so ist das Licht für den Menschen sichtbar und hat für jede Wellenlänge eine charakteristische Farbe (z.B. 600nm => rot). Die nachzuweisende Substanz kann nur Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und verändert somit je nach Beschaffenheit der Substanz die Intensität des Lichtstrahls. Diese Intensität des auftreffenden Lichts kann mit einem Detektor (Photozelle) gemessen werden. Die Berechnung der Absorption des Lichtstrahls ergibt sich aus dem sogenannten Lambert- Beerschen- Gesetz:

$$\mathbf{A = \varepsilon \cdot c \cdot d}$$

- ϵ ist die Absorptionskonstante und sagt aus, wie stark die Molekülart der Substanz die Wellenlänge absorbieren kann,
- c steht für die Konzentration der Molekülart der Substanz,
- d gibt die Küvettendicke an, die durchstrahlt werden muss.

2.3.4 Fluoreszenz

Bei der Lichtbestrahlung der Substanz absorbieren verschiedene Atome oder Moleküle Licht einer bestimmten Wellenlänge und senden direkt danach Licht höherer Wellenlänge aus. Dieses Phänomen kurzwelliges Licht aufzunehmen und längerwelliges Licht wieder abzugeben wird als Fluoreszenz bezeichnet: Die Elektronen des Atoms/ Moleküls werden aus ihren Orbitalen herausgelöst und wandern zu unbesetzten Orbitalen mit höherem Energieniveau. Da der energiereiche Zustand instabil ist, fällt das Elektron jedoch nach kürzester Zeit wieder in sein Ausgangs- Orbital niedrigerem Energieniveau zurück. Die Energie wird dabei meistens als sogenannte Schwingungsenergie oder als elektromagnetische Strahlung frei. Letzteres wird als Fluoreszenzlicht bezeichnet und beruht darauf, dass die Elektronen der Atome/ Moleküle direkt in ihr ursprüngliches Orbital zurückfallen und die Energie somit eben als elektromagnetische Strahlung abgeben. Elektronen werden von Doppelbindungen leichter angeregt als von Einfachbindungen, da dessen p- Elektronen über beide Atome verteilt sind (\Rightarrow keine so starke Bindung). Wenn die Doppelbindungen konjugiert sind, ergibt sich durch die Verteilung der Elektronen über mehrere Atome ein noch leichter anzuregender Zustand.

Nach dem sogenannten „Stokes`schen Gesetz“ muss die elektromagnetische Wellenlänge des aufgenommenen Lichts kleiner oder gleich der elektromagnetischen Wellenlänge des abgegebenen Lichts sein, da die Emission von Fluoreszenzlicht immer vom angeregten Zustand mit der geringsten Energie aus erfolgt. Es findet eine „Rotverschiebung“ (Verschiebung in den längerwelligen Bereich) statt.

Wenn das wieder emittierte Licht die gleiche Wellenlänge aufweist wie das absorbierte, so spricht man von der „Resonanzfluoreszenz“.

$$\lambda_s = |\lambda_{in} - \lambda_{out}|$$

λ_s : Stokes'sche Gesetz

λ_{in} : Wellenlänge der absorbierten Strahlung

λ_{out} : Wellenlänge der emittierten Strahlung

Wenn pro Molekül/ Atom nur ein Photon absorbiert wird, ist die Wellenlänge der absorbierten Photonen kürzer als die der emittierten. Die Energiedifferenz wird für die Erzeugung eines Photons aufgewendet.

$$\Delta E = hc \left(\frac{1}{\lambda_{in}} - \frac{1}{\lambda_{out}} \right)$$

h: Plancksches Wirkungsquantum

c: Lichtgeschwindigkeit

2.3.5 Lumineszenz

Allgemein versteht man unter dem Begriff Lumineszenz die Abgabe von sichtbarer ultravioletter oder infraroter Strahlung eines angeregten Zustands. Der angeregte Zustand wird durch verschiedene Energiezufuhren erreicht, wodurch man auch die unterschiedlichen Lumineszenzprozesse einteilt. Der ELISA verwendet die „Chemolumineszenz“ als Detektionsmethode für das Reaktionsprodukt. Hierbei wird der elektronisch angeregte Molekülzustand durch eine chemische Reaktion erreicht, was zu einer Lichtemission führt. Das ausgesandte Licht wird als „kaltes Licht“ bezeichnet, da dessen Temperatur deutlich unter einer Glühtemperatur liegt.

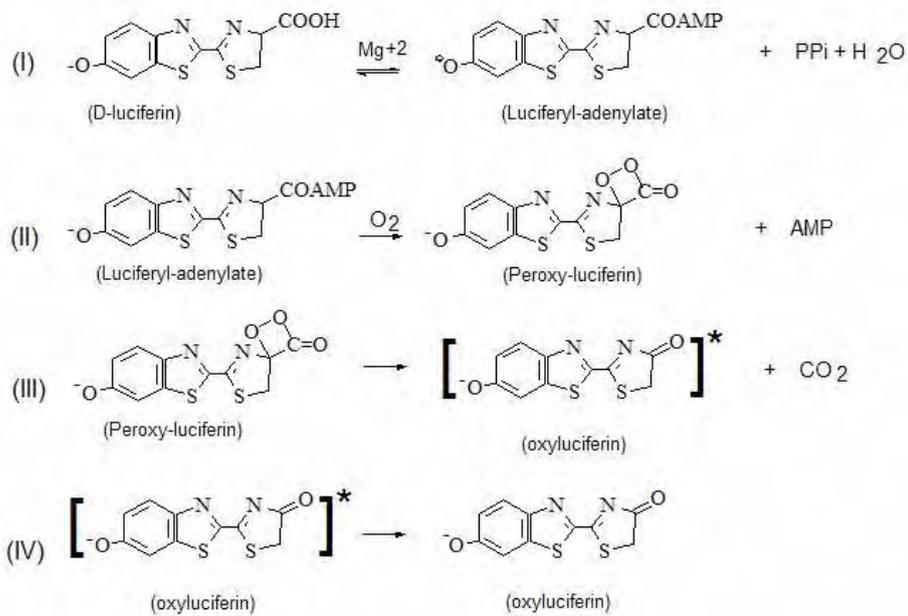
Die meisten chemischen Reaktionen bei Lumineszenzen laufen als Oxidationsreaktionen mit Sauerstoff ab. Durch eine enzymatische Katalyse wird ein bestimmter Stoff umgesetzt, wobei meistens eine Abspaltung einer Teilgruppe stattfindet.

In diesem Beispiel läuft die chemische Reaktion durch das sogenannte Substrat „Luciferin“ ab, welches in der Natur Käfer für die Lichterzeugung verwenden:

Luciferin wird zunächst mit dem Enzym „Luziferase“ und Mg^{2+} -ATP zu Luciferyl-Adenylat (s. Abb. 8, Reaktionsmechanismus des Luciferin, **(I)**) umgesetzt. Dieses wird durch molekularen Sauerstoff oxidiert, wobei als Zwischenprodukte cyclisches Peroxid, ein Dioxetanon und ein Molekül ATP entstehen (**(II)**). Das Dioxetanon wird durch eine

intramolekulare Umstrukturierung decarboxyliert, dabei entsteht eine Enol- oder Ketoform des Oxiluciferin, das sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindet (**III**). Ein Sauerstoff-Atom des entstehenden CO₂ kommt von dem molekularen Sauerstoff. Der Übergang des Oxiluciferin zum energetischen Grundzustand (**IV**) ist mit Lichtaussendung verbunden.

Abb. 8: Reaktionsmechanismus des Luciferin



3 Durchführung

3.1 Methoden

Der praktische Teil meiner Facharbeit beschäftigt sich mit dem Test verschiedener POD-Substrate bei einem mehrstufigen ELISA. Dieser Teil wurde bei der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg durchgeführt.

Bei dem mehrstufigen ELISA finden jedes Mal eine Inkubation und drei Waschschritte statt, bevor ein neuer Bindungspartner in die Mikrotiterplatte gegeben wird. Als ersten Schritt wird das „Goat Anti Human“ FC F(ab)2- Fragment (Firma Jackson) mit PBS („phosphate-buffered saline“; Phosphat- gepufferte Salzlösung) als Verdünnungspuffer in eine „Nunc MaxiSorb“ 384 Well- Mikrotiterplatte pipettiert und an die Oberfläche der Platte gebunden (s. Abb. 7, (1)). Dieser Antikörper wird mit dem verwendeten Verdünnungspuffer aus einer konzentrierten Stammlösung auf 100 ng/ml verdünnt. Um unspezifische Bindungen des Fc-Fragments mit der Mikrotiterplatte zu vermeiden, wird nur das F(ab)2- Fragment des Antikörpers verwendet. Nun wird die Platte für eine Stunde inkubiert.

Als zweiten Schritt gibt man PBST mit 2%iger BSA- Lösung als Blockierungspuffer dazu. PBST ist der oben genannte PBS- Puffer mit Zugabe eines Detergens („TWEEN- 20“), das die Oberflächenspannung des Wassers im Puffer reduzieren soll. BSA („bovines Serumalbumin“; Rinderserumalbumin) wird verwendet, um freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte abzusättigen und unspezifische Bindungen nachfolgender Komponenten zu verhindern. Nun erfolgt eine Inkubationszeit von 30 Minuten.

Im nächsten Schritt gibt man das Protein XY- humanFC Chimera, die nachzuweisende Substanz, dazu, die mit ihrem humanen FC Teil an den ersten Antikörper bindet (2). Diese wird in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (=> Verdünnungsreihe der Antigene), um danach verschiedene Signalstärken zu erhalten. Die Platte wird erneut für eine Stunde inkubiert.

Als vierten Schritt gibt man einen Mouse Anti Protein XY Antikörper dazu, welcher gegen das Protein XY- humanFC Chimera gerichtet ist und an dieses bindet (3). Die Platte wird für eine Stunde inkubiert.

Als fünften Schritt wird ein Anti Mouse POD- Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung hinzugegeben. Dieser Detektionsantikörper ist gegen das „Mouse Anti Protein XY“ gerichtet und bindet an diesen (4). Peroxidase- Enzyme (kurz: POD) sind an dem Antikörper gebunden. Die Platte wird nochmals für eine Stunde inkubiert.

Als letzten Schritt gibt man verschiedene POD- Substrate dazu. Hierbei werden ABTS, TMB, Amplex- Red („AmpRed“) und Super- Signal („SSPico“) als verschiedene Detektionssysteme eingesetzt (5).

Die folgende grafische Darstellung stellt den Assayablauf (Abb. 9) schematisch dar:

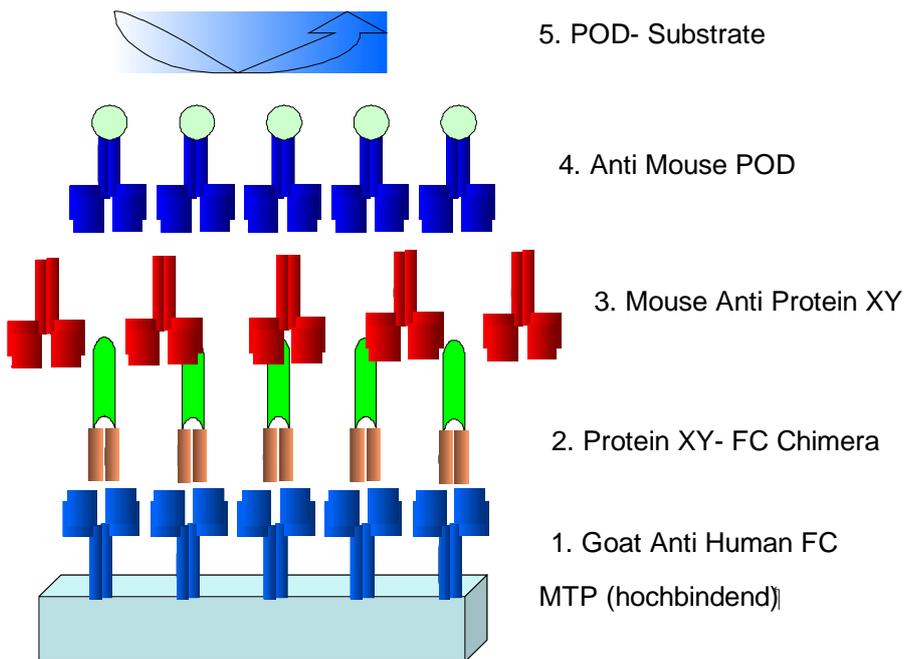


Abb. 9: Grafische Darstellung des Assayablaufs

Die Platte wird in einem Mikrotiterplattenreader („EnVision“ der Fa. Perkin Elmer) gemessen. Je nach verwendetem Substrat werden unterschiedliche Meßverfahren am Reader verwendet: ABTS und TMB werden bei 405 nm und 370 nm photometrisch gemessen. Die Fluoreszenz von Amplex Red wird bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bestimmt. Die Lumineszenz von Super Signal wird mit einem Lumineszenzprotokoll gemessen, dass das gesamte emmitierte Licht der Proben für eine Sekunde detektiert. Hierbei läuft die chemische Reaktion durch das „Luminol“ ((C₈H₇O₃N₃), **1**) in alkalischer Wasserstoffperoxidlösung ab, das zum energiereichen Zustand oxidiert wird (**2**). Das stabile N₂ wird freigesetzt und es bildet sich das 3-Aminophthalate im angeregten Zustand, das bei Energieabgabe Licht aussendet. Abbildung 10 zeigt diesen chemischen Vorgang:

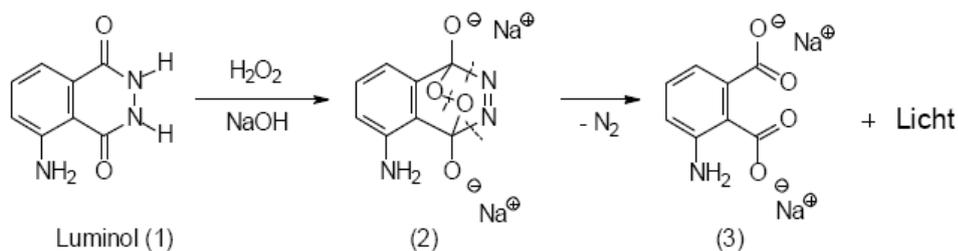


Abb. 10: Chemische Reaktion des Luminols

3.2 Auswertung und Ergebnisse

Die Abbildung 11 zeigt die graphische Auswertung der Detektion der vier verschiedenen POD- Substrate.

Die 1. Ordinate (links) gibt die Fluoreszenz- Intensität (FI) zur Messung von SupersignalPico, sowie die Relative Light Units (RLU) der Lumineszenz für das Substrat AmpRed an. Die 2. Ordinate rechts zeigt die Absorptionsunits der Substrate TMB im Wellenlängenbereich von 370 nm und des ABTS im Wellenlängenbereich von 405 nm. Die Abszisse gibt die

verschiedenen Konzentrationen des zu bestimmenden Proteins „XY- FC Chimera“ in einer 1:3 Verdünnungsreihe von $3\mu\text{g}/\text{ml}$ bis $0.037\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie einer Negativkontrolle ohne Protein XY an.

Die pinkfarbene Kurve stellt die Enzymaktivität des Substrats TMB (*Tetramethyl-benzidine*) und die dunkelblaue Kurve die Enzymaktivität des ABTS (*2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]*) dar. Die beiden Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzsubstrate AmplexRed und SupersignalPico sind in dieser Graphik zur besseren Unterscheidung von den Photometrie- Substraten als Balkendiagramme dargestellt. Die Detektion der Bindung bei verschiedenen Konzentrationen des nachzuweisenden Proteins XY ist hier für das SSPico durch hellgelbe, sowie für das AmpRed durch eine hellblaue Balken dargestellt.

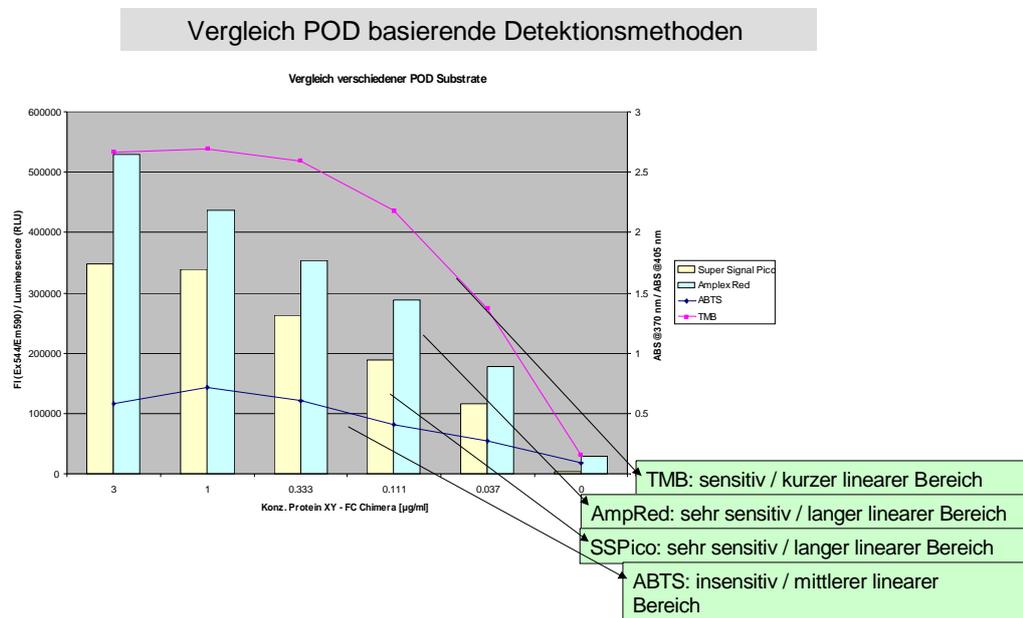


Abb. 11: Auswertung der POD- Substrate

4 Diskussion der Ergebnisse

1. TMB erweist sich als sehr sensitiv, da es selbst bei relativ geringen Konzentrationen des Proteins XY noch ein hohes Signal liefert (1.4 Absorbanceunits bei einer Konzentration von $0.037\mu\text{g/ml}$). Der lineare Bereich, also der Bereich, in dem das Signal möglichst proportional zu der Konzentration des Proteins zunimmt, ist relativ kurz. Bei der Erhöhung der Konzentration des Protein XY von $1\mu\text{g/ml}$ auf $3\mu\text{g/ml}$ kann man keine Erhöhung des Absorptionssignals mehr erkennen, da der Fangantikörper (Goat Anti human FC) nur begrenzte Bindekapazitäten aufweist (Sättigung).

2. Die Detektion mit dem Substrat AmplexRed (blaue Balken) ist ebenfalls sehr sensitiv. Auch bei der niedrigsten Konzentration an Protein XY ($0.037\mu\text{g/ml}$) kann man schon ein gegenüber der Negativkontrolle sehr hohes Fluoreszenzsignal erkennen. Zudem hat es den entscheidenden Vorteil, dass ein langer linearer Bereich vorliegt. Das Signal nimmt gleichmäßig mit der Protein- Konzentration ab.

3. SupersignalPico weist ebenfalls noch eine relativ hohe Sensitivität auf. Der lineare Bereich ist wie bei dem Substrat AmpRed sehr groß.

4. ABTS zeigt sich als sehr insensitive (Bsp: 0,6 Absorbanceunits bei $3\mu\text{g/ml}$). Das Signal ist selbst bei hohen Protein- Konzentrationen relativ gering. Es ergibt sich ein mittlerer linearer Bereich.

Aus der Graphik ergibt sich, dass die Substrate AmpRed sowie SSPico die Substrate der Wahl sind. Sie bieten den längeren linearen Bereich und sind sensitiver als die Substrate TMB und ABTS.

5 Quellenverzeichnis

5.1 Literaturverzeichnis

- W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek: Der Experimentator, Immunologie (2. Auflage, 2006)
- ELISA- Kurs 22.- 23.10.07 bei Roche, Penzberg (erhaltenes Adobe Acrobat Reader Dokument von Frau M. Paul)
- Referenten: Dr. Werner Stock (XR- IE4), Prof. Dr. Baron (FH Weihenstephan), Dr Konrad Kürzinger (XR- RP): Diverse Unterlagen von Kursen über Antikörper und Immunoassays

5.2 Internetquellen (Siehe beigelegte CD)

- <http://de.wikipedia.org/wiki/B-Lymphozyt>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz>
- http://www.google.de/searchhl=de&safe=off&defl=de&q=define:detektionsmethoden&sa=X&oi=glossary_definition&ct=title
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Peroxidase>
- <http://lexikon.meyers.de/wissen/schiffsche+Basen>
- <http://www.elhardt.de/matthias/chemie/photometer/Photometer.htm>
- <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/fluoreszenz.htm>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Stokes-Shift>
- <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>

5.3 Bildquellen

- ELISA- Kurs 22.- 23.10.07 bei Roche, Penzberg (erhaltenes Adobe Acrobat Reader Dokument von Frau M. Paul)
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Hybridomtechnik.png/200px-Hybridomtechnik.png>
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T. und Poulos, T.L., *Crystal Structure of Horseradish Peroxidase C at 2.15 Å Resolution*, Nature Structural Biology, 1997, 4 (12): 1032-1038.

- <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>

- http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/fileadmin/08020000/pdf/erlebnis/chemolumi_hexacyano.pdf

- Diverse grafische Darstellungen wurden von meinen Facharbeitsbetreuern bereitgestellt

5.4 Mündliche Quellen

Einen Teil der Informationen meiner Facharbeit habe ich durch Gespräche mit Frau Manuela Paul und Herrn Alex Fidler der Roche Diagnostics GmbH Penzberg bekommen.

6 Danksagung

Die vorliegende Facharbeit wurde vom 10.05 bis zum 29.01.2009 angefertigt. Im praktischen Teil der Arbeit, welcher vom 10.05.2008 bis zum 15.05.08 andauerte, wurde ich unter Leitung von Frau Manuela Paul und Herrn Alexander Fidler betreut.

Nur durch die gute Einführung in die vorliegende Themenstellung, wofür sich Herr Alexander Fidler sehr viel Zeit nahm, sowie die exzellente Betreuung von Seiten Manuela Pauls, wurde mir diese Arbeit ermöglicht.

Ich danke deshalb Frau Manuela Paul und Herrn Alexander Fidler vielmals für Ihre Unterstützung, Geduld und Verständnis.

Ein Dankeschön auch an die Roche Diagnostics GmbH Penzberg, welche die Materialien zur Verfügung gestellt hat.

7 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Quellenverzeichnis aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

....., den

.....

Ort

Datum

Unterschrift des Schülers