

# *Immunologische Verfahren*

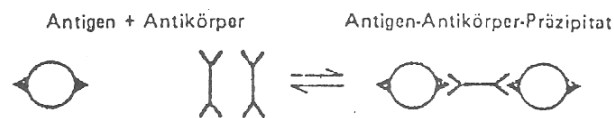
## **Inhaltsverzeichnis:**

1. Grundlagen .....	2
2. Immundiffusion in Agargelen.....	3
2.1. doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony .....	3
2.2. radiale Immundiffusion (RID).....	4
2.3. Immunelektrophorese .....	4
2.4. Rocket Elektrophorese (RIE).....	4
3. Einsatz markierter Antikörper .....	4
3.1. Enzymgebundener Immunoassay (ELISA) .....	4
3.1.1. Kompetitiver ELISA.....	5
3.1.2. Sandwichmethode.....	5
3.1.3. Indirekter ELISA.....	5
3.2. Fluoreszenzimmunoassay (FIA) .....	6
3.2.1. Direkter Immunofluoreszenz – Test.....	6
3.2.2. Indirekte Immunofluoreszenzmethode .....	6
4. Elektrophorese und Blotting.....	6
4.1. Elektrophorese .....	6
4.1.1. Grundlagen .....	6
4.1.2. Diskontinuierliche Elektrophorese (DISK – Page) .....	7
4.1.3. Nachweis von Makromolekülen in Elektrophoresegelen .....	7
4.2. Blotting.....	7
4.2.1. Vorteile.....	8
4.2.2. Kapillarblotting.....	8
4.2.3. Tankblotting .....	8
4.2.4. Nachbearbeitung .....	8

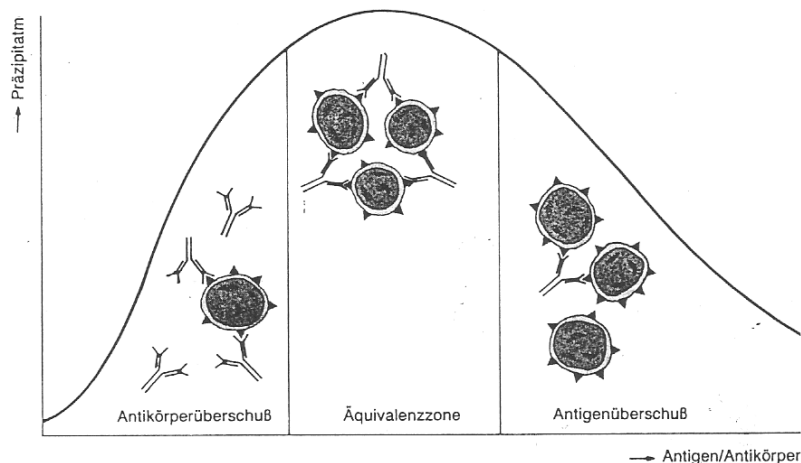
## 1. Grundlagen

Die Grundlage fast aller immunochemischer Methoden liegt in der Bindung eines spezifischen Antikörpers an sein Antigen, es entsteht ein so genannter „Antigen – Antikörper – Komplex“. Die Bindung des Antikörpers erfolgt auf der antigenen Determinante, welche sich auf dem Antigen befindet.

Für die Ausbildung des Komplexes sind außerdem intermolekulare Kräfte verantwortlich; dazu gehören z.B.: ionische, hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkungen bzw. van der Waals Kräfte.



An der Oberfläche eines Antigens können sich mehrere antigene Determinanten befinden. Diese Tatsache wurde schon 1935 nachgewiesen => multivalente Antigene, die mit zweiwertigen Antikörpern ein Netzwerk bilden. Dies ist aber abhängig wenn das Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper optimal ist – Äquivalenzbereich.



Ist jedoch ein Partner im Überschuss vorhanden, entsteht ein löslicher Immunkomplex.

Mittels Immunreaktion ist es möglich quantitativ Antigene, als auch Antikörper nachzuweisen. Ist die Konzentration eines Partners sehr gering, kann man diesen mit der Immunpräzipitationsmethode nicht mehr nachweisen. In diesem Fall wird eines der beiden Immunreagentien, mit einem Marker, gekennzeichnet; z.B.: mit fluoreszierenden Molekülen.

Präzipitationstests aus freien Lösungen sind von der Methodik her sehr aufwendig, da man im Äquivalenzbereich arbeiten muss und daher oft sehr große Mengen an teuren Antiseren oder Antigenen benötigt.

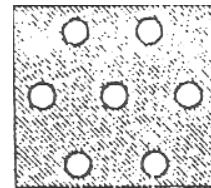
## 2. Immundiffusion in Agargelen

### 2.1. doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony

Mit diesem Test kann nachgewiesen werden, ob ein Serum, Zellhomogenisat oder eine chromatische Fraktion ein bestimmtes Antigen enthält, bzw. ob zwei Antigene miteinander identisch, nicht identisch oder nahe verwandt sind.

Hierfür wird, in einer Petrischale, eine 1 – 2 mm hohes Agarosegel gegossen und, je nach benötigter Größe der Probenröge, Löcher hineingestanz; z.B.: mit Hilfe einer Pipettenspitze.

Als Hilfestellung wird zuvor eine Schablone aus Papier gefertigt und diese dann unter die Petrischale gelegt, da der Abstand zwischen dem Probenloch in der Mitte zu jedem äußeren Probenloch gleich groß sein muss.



In das mittlere Probenloch wird das Antiserum gefüllt, die verschiedenen Verdünnungen des Antigens werden rundherum aufgetragen. Es folgt eine Diffusion in das Agarosegel; wenn das optimale Konzentrationsverhältnis erreicht ist, bildet sich ein Immunpräzipitat – Ring.

Bei der **qualitativen Anwendung** kann man mittels Aussehen der Präzipitationslinie Aussagen über die Antigene treffen:

- Bei einer verschmolzenen Präzipitationszone enthalten die Antigene, bei dem vorgegebenen Antikörper, identische Determinanten  
=> es entsteht eine identische Präzipitationslinie.
- Bei Kreuzpräzipitaten enthält das Antiserum Antikörper gegen beide Antigene, obwohl keine gemeinsame Determinante vorhanden ist. Das heißt es entstehen Präzipitationslinien mit verschiedenen Antikörpermolekülen.
- Bei Präzipitationslinien mit Sporenbildung besitzen die beiden Antigene nur teilweise identische Determinanten – nahe verwandt. Das Antiserum enthält noch Antikörper gegen Determinanten, die nur in einem Antigen nachzuweisen sind.

Bei der **quantitativen Anwendung** wird mittels Lage der Präzipitationslinie eine Aussage über die Konzentration des Antigens getroffen (je höher die Konz. des Antigens, desto näher die Präz.linie am Antiserumtrog):

Antigene mit relativen Molmassen im IgG – Bereich (150 000) zeigen eine gerade, jene mit einer Molmasse kleiner als 150 000 eine in Richtung Antigen gebogene und jene mit einer Molmasse größer als 150 000 eine in die andere Richtung gebogene Präzipitationslinie.

## **2.2. radiale Immundiffusion (RID)**

Diese Methode funktioniert eigentlich genauso wie der zuvor beschriebene Ouchterlony, nur dass hier der Antikörper vor dem Gießen in das Gel gemischt wurde. Außerdem sind die Probenlöcher nicht alle gleich groß, es entsteht jedoch wieder ein Präzipitationsring, der sich nun aber um das Probenloch bildet; je höher die Konzentration an Antigen, desto größer der Durchmesser des Rings.

## **2.3. Immunelektrophorese**

Darunter versteht man eine Kombination aus Elektrophorese und Immundiffusion. Dabei wird ein Agarosegel gegossen und in dieses wird ein Probenloch gestanzt, in welchem das Antigen aufgetragen wird. Durch anschließen an den Strom werden die einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt.

Als nächstes wird das entsprechende Antiserum in eine, sich neben der Elektrophoresestrecke befindenden, Rinne pipettiert. Es kommt wieder zu einer Diffusion und dadurch entstehen Präzipitationslinien.

## **2.4. Rocket Elektrophorese (RIE)**

Bei dieser Methode wird ein sehr dünnes Agarosegel, welches den Antikörper enthält, gegossen. Es werden Probenlöcher gestanzt, in diese die Antigenverdünnungen aufgetragen und die Diffusion mit Hilfe von einem elektrischen Feld beschleunigt.

Zu beachten ist, dass sich die Ladungen des Antigens deutlich von der des Antiserums unterscheiden (Antigen → Anode; Antiserum → Kathode). Bei einem optimalen Verhältnis von Antikörper zu Antigen entstehen Präzipitationslinien in Form einer Rakete; je höher die Rakete, umso höher Antigenkonzentration.

## **3. Einsatz markierter Antikörper**

### **3.1. Enzymgebundener Immunoassay (ELISA)**

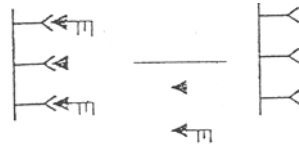
ELISA = enzyme - linked immunosorbent assay

Voraussetzungen:

- Enzym muss ohne Aktivitätsverluste an den AK gekoppelt werden können
- Die Spezifität des Antikörpers darf sich nach der Kopplung nicht verändern
- Das angehängte Enzym muss ein Substrat in ein färbiges Produkt umwandeln (=> colorimetrische oder spektralphotometr. Bestimmung der Enzymaktivität)

### 3.1.1. Kompetitiver ELISA

Bei dieser Methode wird ein spezifischer Antikörper an der Oberfläche einer Festphase fixiert. Anschließend folgt die Zugabe von Antigen und dem Kupplungsprodukt aus Antigen und einem Enzym. Nach der Bindung der Antigene wird mit Enzymsubstrat inkubiert. Als Kontrollwerte werden Ansätze gemacht, bei denen kein freies Antigen zugesetzt, oder kein Antikörper an eine feste Phase gebunden, wurde.



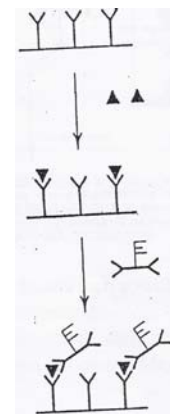
Die unbekannte Konzentration lässt sich mittels Differenz ermitteln.

### 3.1.2. Sandwichmethode

Wie schon beim komp. ELISA wird der Antikörper an einer Oberfläche fixiert und danach mit der Antigenlösung inkubiert.

Bei der Sandwichmethode wird nach dem Waschen mit einem zweiten enzymgekoppelten AK inkubiert und nach der Bindung Substrat zugegeben.

Die gemessene Enzymaktivität (Standardbedingungen) ist der Menge des spezifischen Antigens der probe direkt proportional.



### 3.1.3. Indirekter ELISA

Diese Methode dient zur Bestimmung von Antikörpertitern.

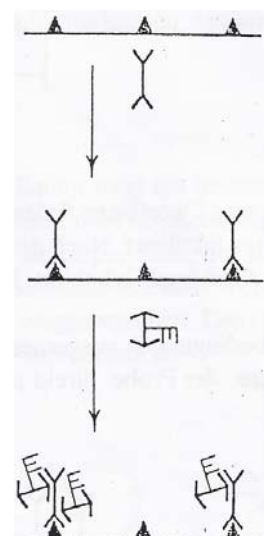
Dabei wird ein spezifisches Antigen an einer Festphase adsorbiert (locker gebunden) und anschließend mit Seren inkubiert, bei denen man spezifische Antikörper vermutet  
=> Waschung

Die spezifischen Antikörpermoleküle binden an den Antigenen. Danach wird mit Antiimmunglobulin – Serum mit gekoppeltem Enzym inkubiert  
=> Waschung

An die, an die Antigene gekoppelten, Antikörper bindet sich das gekoppelte Antiimmunglobulin – Serum.

Es folgt die Inkubation mit dem Enzymsubstrat.

Die gemessene Enzymaktivität (Standardbedingungen) ist der Menge des spezifischen Antikörpers im Versuchsserum direkt proportional.



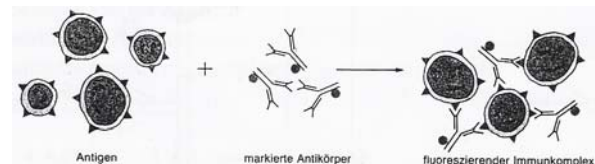
### 3.2. Fluoreszenzimmunoassay (FIA)

Diese Methode dient zur Bestimmung von Antigenen in Gewebsschnitten oder lebensfähigen Zellen.

Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher nach der Bindung im UV – Licht nachweisbar ist.

#### **3.2.1. Direkter Immunofluoreszenz – Test**

Antigene auf Zelloberflächen können direkt mit markierten Antikörpern nachgewiesen werden.

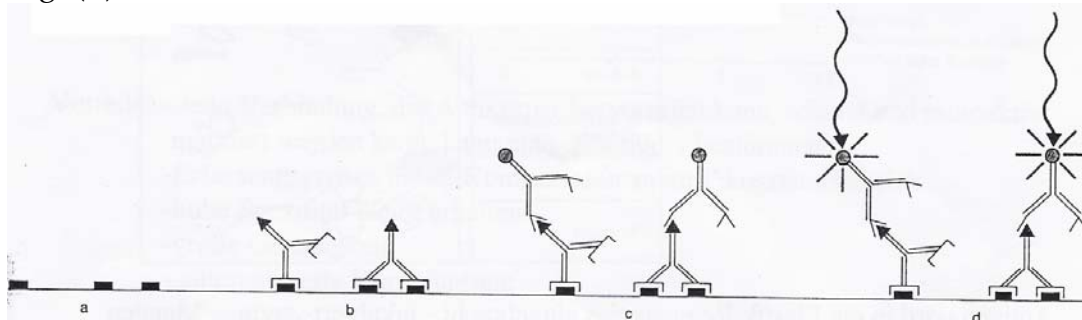


#### **3.2.2. Indirekte Immunofluoreszenzmethode**

Auf der zu untersuchenden Probe befindet sich ein bestimmtes Antigen (a), an welchem sich ein zugefügter Antikörper bindet. Überschüssige Antikörper werden ausgewaschen (b).

Es folgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurde, welcher an den ersten bindet. Überschüssige Antikörper werden wieder ausgewaschen (c).

Durch Bestrahlung mit UV – Licht werden die Markermoleküle zur Fluoreszenz angeregt (d).



## 4. Elektrophorese und Blotting

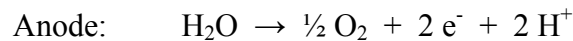
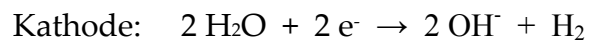
### 4.1. Elektrophorese

#### **4.1.1. Grundlagen**

Proteine besitzen Ladungen und können daher im elektrischen Feld wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe der Ladung, der Größe und Form der Moleküle bzw. der Kraft des elektrischen Feldes.

Damit Strom fließen kann, müssen Trägermedium (Matrix) und Probenmaterial in einem Elektrolyten (Puffer) gelöst sein. Der Strom wird zwischen den Elektroden über Probe und auch Pufferionen geleitet.

An den Elektroden selbst findet die Elektrolyse von Wasser statt:



Als Trägermedium werden für Proteine meist Polyacrylamidgele verwendet, für DNA oder RNA Agarosegele. Bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen wird eine wässrige Lösung von Acrylamid mit einem Vernetzer, N,N – Methylenebisacrylamid, unter Verwendung eines Katalysatorsystems, welches freie Radikale erzeugt, polymerisiert.

#### 4.1.2. Diskontinuierliche Elektrophorese (DISK – Page)

Hier werden zwei hochvernetzte Acrylamidgele mit unterschiedlichem pH – Wert übereinandergeschichtet:

<b>Sammelgel</b>	weitmaschig, pH 6.8, dient zur Konzentrierung der Gele
<b>Trenngel</b>	engmaschig, pH 8.8

Im Sammelgel werden die Proteine zu schmalen Banden zusammengeschoben und dadurch aufkonzentriert; Proteine mit gleicher Beweglichkeit wandern mit gleicher Geschwindigkeit (Isotachophorese) – Proteine wandern zur Anode

#### 4.1.3. Nachweis von Makromolekülen in Elektrophoresegele

- Färbung mit **Coomassie – Brillantblau** oder anderen Proteinfärbemitteln [ $\mu\text{g}$ ]
- **Silberfärbung** von Proteinen; hochempfindliche Methode für niedrigste Konzentrationen; Auswertung mittels Densitometer [ $\text{ng}$ ]
- **Autoradiographie**; zum Nachweis radioaktiver Substanzen
- **Blotting**

#### 4.2. Blotting

Darunter versteht man die Übertragung von (Makro-) Molekülen aus Elektrophoresegele auf eine Membran. Die Moleküle werden an der Membran adsorbiert (immobilisiert, da nicht mehr beweglich) und können dort entweder nachgewiesen werden oder von dort weiterverarbeitet werden.

Als Blotmembran wird meist Nitrocellulose, mit einer Porengröße von 0,05–0,45  $\mu\text{m}$ , verwendet. Die Vorteile einer solchen Membran sind, dass Proteine reversibel gefärbt, und daher spezifisch nachgewiesen werden können.

Der Nachteil hingegen ist, dass Nitrocellulose nur eine begrenzte Bindekapazität, und außerdem eine schlechte mechanische Stabilität, besitzt.

#### 4.2.1. Vorteile

- Moleküle sitzen an der Oberfläche der Membran und nicht diffus wie im Gel => auch geringste Mengen sind nachweisbar [pg – ng]
- Für die zuvor durchgeführte Elektrophorese sind nur geringe Mengen an Untersuchungslösungen notwendig
- Moleküle können leicht mit großmolekularen oder leicht detektierbaren Liganden (Antigene, Antikörper) verbunden werden
- Schnelle Analyse
- Leichte Handhabung und Lagerung

#### 4.2.2. Kapillarblotting

Dies ist die Standardmethode für Proteine, DNA oder RNA. Hierfür wird der Puffer, mittels Kapillarwirkung, aus einer Vorratswanne durch das Gel und die Blotfolie in einen Stapel aus trockenem Filterpapierschichten gesaugt (Dauer: 10 – 12 Stunden)

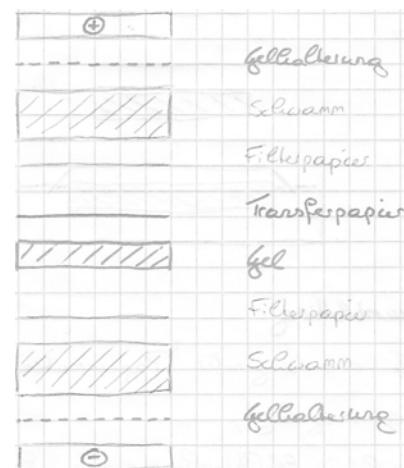
#### 4.2.3. Tankblotting

Gel und Blotfolie werden zwischen Filterpapier und Schwammtücher geklemmt. Dieses „Gelsandwich“ wird in einen horizontalen Puffertank, mit Platinelektroden, eingehängt.

**Vorteil:** quantitativer Transfer von Proteinen

**Nachteil:** Puffer muss gekühlt werden

**Dauer:** 10 – 15 Stunden bei ca. 15 V  
1 – 2 Stunden bei 90 V und 300 mA



#### 4.2.4. Nachbearbeitung

Nach dem Blotting wird blockiert, um die unbesetzten Bindungsstellen auf der Folie abzudecken. Dazu werden makromolekulare Substanzen verwendet, die jedoch an der nachfolgenden Nachweisreaktion nicht beteiligt sein dürfen (Bei Proteinen wird meist Rinderserumalbumin – RSA; 2 – 10% oder Fischgelatine; 0,25% verwendet).

Die Detektion erfolgt durch Immunnachweis:

- Nach dem Blockieren wird mit spezifisch bindenden Immunglobulinen (IgG) oder mit monoklonalen Antikörpern nach einzelnen Proteinen sondiert
- Zur Sichtbarmachung der Zonen bindet man anschließend ein weiteres markiertes Protein; z.B.: einen enzymgekoppelten Sekundär – Antikörper daran.

