



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
Studiengang Lebensmitteltechnologie
Sommersemester 2012

Entwicklung einer Antikörpersäule zum Nachweis von Fischparvalbumin unter Verwendung der Affinitätschromatographie

Masterthesis

Zur Erlangung des akademischen Grades
„Master of Science“ (M. Sc.)

Elisabeth Mack

21.09.2012

Betreuer: Prof. Dr. rer. Nat. Christine Wittmann
Manuela Henke, M. Eng.

Zeitraum: 18.04.2012 – 21.09.2012

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2012-0190-6

Abstract

The affinity chromatography is based on the partition chromatography, which was developed by Martin and Synge. Thereby specific interactions between the sample protein and the stationary phase will occur.

This master thesis deals with the development of an antibody column to validate or obtain the pure parvalbumins. The gained fish protein can be used for further researches by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

At the beginning of the work the primary monoclonal antibodies are cleaned on a HiTrap Protein G column and their concentrations are calculated by using a BSA standard curve. After that standard dilution series of three samples of fish, like redfish, Alaska Pollock or cod fish, are prepared and their protein concentrations are determined by a sandwich-ELISA. During this work appeared that a milk powder solution is the best medium to block unspecific bonding sites. To reach the goal of this thesis five columns are developed. Three of them are purchased from Thermo Scientific and include agarose beads for the protein immobilization. The two other columns are from GE Health Care and they are dosed with NHS-activated sepharose. Besides six performed sandwich-ELISA, also two indirect ELISA are done, to proof the resulting flow-through and elutions of the columns. Finally, two SDS-pages have taken place to examine the molecular size of the components of the flow through, the elutions and some fish samples.

To sum up, for the development of antibody columns for the detection of fish parvalbumin should more attempts be done with other substances, like magnetic beads, aptamers, or molecular imprinted polymers (MIP).

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| Abstract | - 1 - |
| Abkürzungsverzeichnis | - 4 - |
| 1. Einleitung..... | - 5 - |
| 1.1 Affinitätschromatographie | - 6 - |
| 1.2 Methoden zur Ergebnisüberprüfung..... | - 8 - |
| 1.2.1 ELISA | - 8 - |
| 1.2.2 SDS-Page..... | - 10 - |
| 1.3 Fischallergie..... | - 12 - |
| 1.4 Zielformulierung | - 13 - |
| 2. Material und Methoden:..... | - 14 - |
| 2.1 Material: | - 14 - |
| 2.1.1 Chemikalien | - 14 - |
| 2.1.2 Geräte..... | - 14 - |
| 2.1.3 Sonstige Materialien..... | - 15 - |
| 2.1.4 Pufferlösungen und Reagenzien: | - 15 - |
| 2.1.5 Monoklonale Antikörper | - 16 - |
| 2.1.6 Antigene | - 16 - |
| 2.2 Methoden:..... | - 17 - |
| 2.2.1 Entwicklung von Antikörpersäulen..... | - 17 - |
| 2.2.2 Reinigung der gelieferten Antikörper..... | - 21 - |
| 2.2.3 Erstellen einer BSA-Standardkurve zur Proteinbestimmung | - 23 - |
| 2.2.4 Durchführung der ELISA-Versuche | - 24 - |
| 2.2.5 SDS-Page..... | - 28 - |
| 3. Ergebnisse | - 30 - |
| 3.1 Entwicklung von Antikörpersäulen..... | - 30 - |
| 3.2 Antikörperreinigung mit Konzentrationsbestimmung | - 31 - |
| 3.3 ELISA-Versuch 1: Vergleich verschieden gereinigter Antikörper | - 33 - |
| 3.4 ELISA-Versuch 2: Vergleich von Blockmitteln..... | - 34 - |
| 3.5 ELISA-Versuch 3: Verdünnungsreihe Rotbarsch..... | - 35 - |
| 3.6 Versuch 4: Vergleich Rotbarsch- Elutionen zweier Säulen..... | - 36 - |
| 3.7 Versuch 5: Antikörpersäule vom 5.6.12 mit Rotbarsch | - 37 - |
| 3.8 Versuch 6: Überprüfung von drei Säulen mit Rotbarsch und Alaska Seelachs | - 37 - |
| 3.9 Versuch 7: Neue Säule mit Kabeljau | - 39 - |

| | |
|--|--------|
| 3.10 Indirekter ELISA 1: Überprüfung verschiedener Durchflüsse..... | - 40 - |
| 3.11 Indirekter ELISA 2: Rückgewinnung von Antikörpern von zwei Säulen | - 41 - |
| 3.12 SDS-Page..... | - 42 - |
| 4. Diskussion..... | - 44 - |
| 5. Zusammenfassung..... | - 49 - |
| 6. Verzeichnisse..... | - 51 - |
| 6.1 Abbildungsverzeichnis..... | - 51 - |
| 6.2 Tabellenverzeichnis | - 51 - |
| 8. Anhang..... | - 56 - |
| Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit..... | - 66 - |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| AK | Antikörper |
| AS | Alaska Seelachs |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CP | Coupling-Puffer |
| D | Durchfluss |
| E | Elution |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| Ig | Immunglobulin |
| Kj | Kabeljau |
| MIP | Molecular Imprinted Polymers |
| p.a. | Per analysis |
| PBS | Phosphate buffered Saline |
| pmAK | primärer monoklonaler Antikörper |
| POD | Peroxidase |
| Rb | Rotbarsch |
| S | Säule |
| SDS-Page | Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| smAK | sekundärer monoklonaler Antikörper |

1. Einleitung

Als Nahrungsmittel- bzw. Lebensmittelallergie wird die abwehrende Schutzreaktion des Immunsystems bezeichnet, die gegen spezielle Lebensmittel bzw. Nahrungsmittelinhaltsstoffe gerichtet ist. Ausgelöst wird diese Abwehrreaktion durch Allergene, wobei es sich meist um Proteine handelt. Die Häufigkeit einer Allergien ist unter anderem von dem Alter abhängig, so sind ca. 2 - 6 % der Kinder in Deutschland von einer Lebensmittelallergie betroffen, bei den Erwachsenen liegt die Quote bei nur zwei bis drei Prozent. Zu den am häufigsten Allergie auslösenden Nahrungsmitteln gehören neben der Kuhmilch, dem Hühnereiweiß und Nüssen auch Fisch und Fischerzeugnisse.

Das Hauptallergen im Fisch ist das Parvalbumin. Dies ist ein Ca^{2+} - bindendes Protein mit einem geringen Molekulargewicht von ca. 12 kDa. Darüber hinaus ist es sehr hitzestabil und kommt vorwiegend im weißen Muskelfleisch vieler Fischarten vor. Wie oft eine Fischallergie auftritt und gegen welche Fischart sie gerichtet ist, hängt stark mit den lokalen Essgewohnheiten bzw. der Fischverfügbarkeit zusammen. Zudem lösen Salzwasserfische, wie Hering, Kabeljau oder Rotbarsch eher eine Allergie aus als Süßwasserfische (Lachs, Aal oder Zander) [1, 2, 3, 4, 5].

Um das allergieauslösende Parvalbumin aus einzelnen Fischproben zu gewinnen, werden Antikörpersäulen entwickelt, die nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie arbeiten. Somit könnte das gewonnene reine Parvalbumin zum Allergienachweis bzw. für die Fischartendifferenzierung genutzt werden. Im Fokus liegt hierbei jedoch die Voranreicherung dieses Proteins für weiterführende Untersuchungen mit der Matrix gestützten Laserdesorptions-Ionisations- Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).

1.1 Affinitätschromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich allgemein um einen physikalisch-chemischen Prozess zur Stofftrennung, wobei das zu trennende Gemisch zwischen zwei Phasen verteilt wird. Diese zwei Phasen sind zum einen die stationäre (ruhende) Phase und zum anderen die mobile (sich bewegende) Phase. Grundlegend bei diesem Verfahren ist, dass die beiden Phasen nicht miteinander mischbar sind [6, 7, 8]. Das Prinzip der Verteilungschromatographie wurde von Martin und Snyge entwickelt, wofür sie 1952 den Nobelpreis erhielten [6, 7]. Anhand von chromatographischen Methoden ist es möglich verschiedene Proteine nach ihrer Löslichkeit, Größe oder Affinität an bestimmte Oberflächenstrukturen auszusortieren [9].

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde die Affinitätschromatographie für die Entwicklung von Antikörpersäulen verwendet. Das Prinzip davon ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei dieser Art der Chromatographie wird die Trennung von Substanzgemischen durch spezifische Wechselwirkungen mit der stationären Phase ausgenutzt [10, 11, 9, 12]. Das Herauslösen der einzelnen Substanzen (z.B. eines Proteins) basiert auf der Ligandenspezifität, welche einer Antigen-Antikörper-Reaktion gleich kommt [13]. Die Affinitätschromatographie ist im Prinzip nur von den individuellen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der jeweiligen Proteine abhängig und somit üben das Molekulargewicht und die Ladung keinen Einfluss aus [14]. Durch das Verfahren ist es möglich einzelne Proteine aus einem komplexen Gemisch zu reinigen, wodurch eine hohe Reinheit erreicht werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass das jeweilige Protein in einer hohen Konzentration vorliegt, da es innerhalb der Säule angereichert wird und in kleinen Mengen eluiert werden kann [14]. Allerdings gibt es auch Nachteile die diese Methode mit sich bringt. Zum einen entstehen hohe Kosten bei der Beschaffung der einzelnen Materialien, sofern es auch passende Säulen erhältlich sind und möglicherweise kann nur eine einmalige Benutzung vorliegen. Auf der anderen Seite muss die Matrix bzw. die gesamte Säule selbst hergestellt werden, wenn für das entsprechende Protein noch nichts verfügbar ist. Dies bedeutet gleichzeitig einen höheren Zeitaufwand [14, 10, 12]. Bei der Affinitätschromatographie ist die Säule mit der stationären Phase gefüllt. Diese besteht aus kleinen Körnern (Beads), an die sich die Antikörper binden [15]. Beispiele für diese Phase sind u. a. Agarose- und Sepharose-Verbindungen. Wenn anschließend ein Proteingemisch als mobile Phase durch die Säule läuft, kommt es nur zu der Interaktion zwischen dem Antikörper auf der Säule und dem Protein, welches die passende Epitopstruktur besitzt. Nach dem ein Waschschrift erfolgt ist, wodurch unerwünschte Begleitstoffe beseitigt werden sollen [9], wird die Elution eingeleitet um das Protein wieder von dem Antikörper zu trennen [15]. Es gibt unterschiedliche Methoden für die Elution, u. a. durch Veränderungen der Temperatur oder des pH-Wertes [13]. Darüber hinaus

auch durch unterschiedliche Pufferzusammensetzungen im Bezug auf die Konzentration an chaotropen Salzen [12]. Um die erhaltenen Elutionen zu überprüfen bzw. um zu gewährleisten, dass das gewünschte Protein in der Probe vorhanden ist, empfiehlt es sich einen SDS-Page durchzuführen [9].

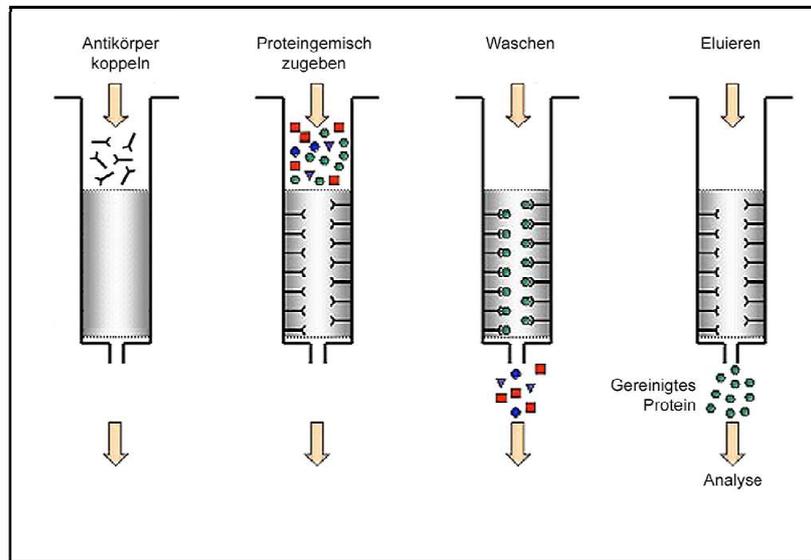


Abbildung 1: Prinzip Affinitätschromatographie (1)

Für die Immobilisierung der Antikörper an die Säule mittels der Affinitätschromatographie werden in dieser Arbeit Agarose- und Sepharose-Beads verwendet.

Die Agarose ist ein glycosidisch verbundenes Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-galactose, das aus verschiedenen Rotalgenarten gewonnen wird. Es handelt sich dabei um ein lineares ungeladenes Molekül, das mit Proteinen und Nukleinsäuren nur geringfügig interagiert. Darüber hinaus ist Agarose ein guter Gelbildner. Dieses Polysaccharid hat eine weiße bis gelbliche Färbung und ist als geruchloser Feststoff kommerziell erhältlich. Die Summenformel der Agarose ist $C_{12}H_{18}O_9$ mit einer Molaren Masse von 306,46 g/mol und die Abbildung 2 zeigt die dazugehörige Strukturformel [16, 17].

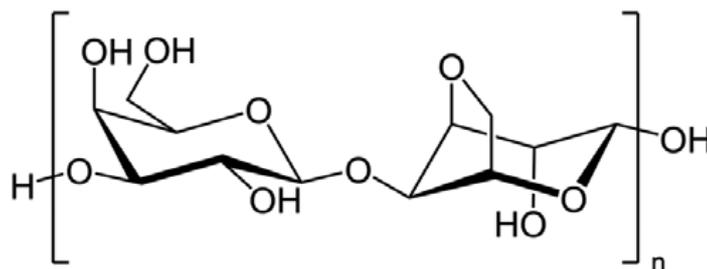


Abbildung 2: Struktur von Agarose (2)

Bei der Sepharose hingegen handelt es sich lediglich um einen Handelsnamen für quervernetzte Agarose und steht für Separation-Pharmacia-Agarose. Diese wird häufig als stationäre Phase bei Chromatographie-Verfahren verwendet. Die für diese Arbeit genutzte Sepharose ist noch mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) versetzt und wird als NHS-aktivierte Sepharose bezeichnet. Diese ist ein in kristalliner Form vorliegender, farb- und geruchsloser Feststoff. Die folgende Abbildung 3 zeigt die Struktur einer NHS-aktivierten Sepharose [17, 18].

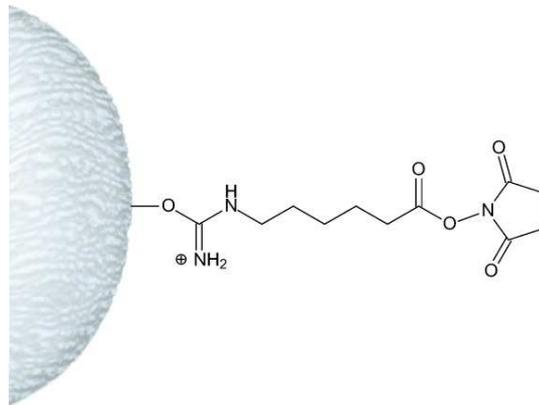


Abbildung 3: Struktur NHS-aktivierter Sepharose (3)

1.2 Methoden zur Ergebnisüberprüfung

Für diese Arbeit werden verschiedene Verfahren angewendet, um die Effektivität der Affinitätschromatographie zu untersuchen, dazu gehören der ELISA und die SDS-Page. Nach der Immobilisierung der Antikörper an die Säule werden die erhaltenen Durchflüsse mit möglichen Antikörperrückständen mit Hilfe eines Indirekten ELISA auf ihre Proteinkonzentration getestet. Weiterhin wird der direkte Sandwich-ELISA genutzt, um die entstehenden Durchflüsse der Fischproben interpretieren zu können. Abschließend ermöglicht die SDS-Page die Bestimmung der Molekülgrößen der Substanzen in den Durchflüssen und Elutionen, um zu Prüfen ob das Fischeiweiß Parvalbumin darin enthalten ist.

1.2.1 ELISA

Die Abkürzung „ELISA“ bedeutet Enzyme Linked Immunosorbent Assay und es handelt sich dabei um ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen beruht. Aufgrund eines Farbumschlages können die Antigenkonzentrationen bestimmt werden. Dieses Verfahren bietet einige Vorteile, wie einen hohen Probendurchlauf, eine relativ einfache Handhabung und eine Automatisierung ist möglich. Jedoch zählt die Verfügbarkeit und Selektion der Antikörper eher zu den Nachteilen [20]. Zum

Nachweis der Konzentrationen an Parvalbumin in den jeweiligen Lösungen wurden während dieser Arbeit zwei verschiedene Arten des ELISA verwendet, zum einen der Sandwich-ELISA und zum anderen ein Indirekter ELISA. Es handelt sich bei beiden Verfahren um Nicht-kompetitive Tests und diese beruhen somit auf dem Grundprinzip der Antigen-Antikörper-Komplexbildung. Als Messgröße dienen dabei die Antigene, deren Konzentration direkt gemessen werden kann. Denn die Intensität der Enzym-Substrat-Reaktion stimmt mit der Antigenkonzentration bei dem nicht-kompetitiven Test überein [21, 22].

Der Sandwich-ELISA wird zumeist eingesetzt, wenn eine Quantifizierung von Antigenen in geringen Konzentrationen erfolgen soll. Abbildung 4 veranschaulicht den Aufbau eines Sandwich-ELISA, bei dem zwei monoklonale Antikörper an zwei unterschiedlichen Stellen auf der Oberfläche des nachzuweisenden Antigens binden (4). Als Antigen dienen für diese Arbeit Proben verschiedener Fischarten, wie Rotbarsch, Alaska Seelachs und Kabeljau.

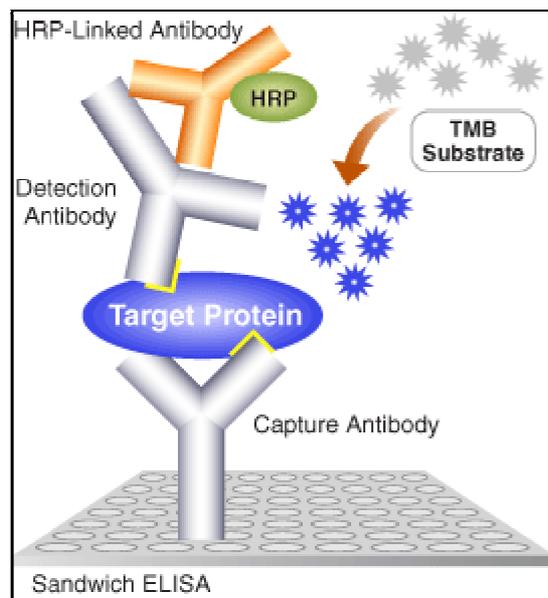


Abbildung 4: Aufbau eines Sandwich-ELISA (5)

Bei dem Indirekten ELISA handelt es sich um eine mit Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte und zählt somit zu den einfacheren Assaytypen [22]. Die Antigene werden mit Hilfe eines Coating- bzw. Bindungspuffers an die Platte gebunden. Anschließend wird eine Probe mit Antikörpern auf die Mikrotiterplatte gegeben. Die enthaltenen Antikörper binden dann an die Antigene. Der Nachweis der Reaktion erfolgt auch hier über einen enzymmarkierten Antikörper, wie z.B. über eine Anti-Maus IgG Peroxidase [22]. Darauf folgt die Zugabe einer Substratlösung, wodurch es genauso wie bei dem Sandwich-ELISA zu einer Blaufärbung kommt, welche mit Schwefelsäure gestoppt wird.

Die Intensität der Gelbfärbung wird auch hier mittels des ELISA-Readers bestimmt. In Abbildung 5 ist der Aufbau eines Indirekten ELISA dargestellt.

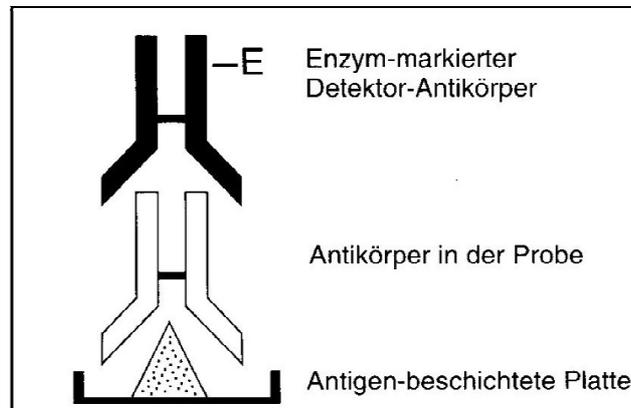


Abbildung 5: Antigen-beschichtete Platte/ Indirekter ELISA (6)

Als Antikörper werden für die einzelnen ELISA-Versuche monoklonale Antikörper verwendet, welche spezifische Antikörper sind, die nur ein Epitop eines Antigens lokalisieren können. Sie besitzen eine hohe Selektivität und es sind kaum Kreuzreaktionen mit sehr ähnlichen Epitopen zu beobachten. Daher sind sie gut geeignet für die Entwicklung eines Sandwich-ELISA [20]. Darüber hinaus sind die hier verwendeten Antikörper auch speziesmultireaktiv und gegen Fischparvalbumin gerichtet. Das bedeutet, dass sie mit einer ähnlich hohen Affinität an Parvalbumine verschiedener Fischarten binden können, wie Alaska Seelachs, Kabeljau oder Hering.

1.2.2 SDS-Page

Die Abkürzung SDS-Page steht für Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese und es handelt sich dabei um eine elektrophoretische Trennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße. Dieses Verfahren wurde 1970 von Ulrich Laemmli entwickelt. In Abhängigkeit von dem Größenspektrum der zu untersuchenden Proteine weisen die Gele unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen auf, dabei werden im Normalfall gute Auftrennungen im Bereich von 12 bis 14 %igen Gelen erreicht [24]. Für die Trennung von Proteinen in einem Größenbereich von 50 bis 200 kDa eignen sich eher Gele mit einem niedrigeren Acrylamidgehalt, während für niedermolekulare Proteine (15-50 kDa) Gele mit einem höheren Gehalt besser sind [25].

SDS-Page ist ein diskontinuierliches denaturierendes Verfahren, da es sich aus einem grobporigen Sammelgel (pH= 6,8) und einem feinporigen Trenngel (pH= 8,8) zusammensetzt (7). Das sich im oberen Bereich des Gelkonstrukts befindende Sammelgel besitzt eine deutlich

geringere Menge an Acrylamid gegenüber dem Trenngel, mit nur ca. 4 %. Aufgrund der Grobporigkeit dieses Gels wandern die Proben schnell durch das Sammelgel und werden an der Grenze zum Trenngel fokussiert [27]. Somit haben die Proteine in den Proben denselben Startpunkt und es ergibt sich dadurch eine größere Bandenschärfe [25]. In den Gelen und dem Elektrophoresepuffer befinden sich unterschiedliche Ionen, wodurch es zu unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten kommt. Die Proteine lagern sich in dem Sinne zwischen dem schnell wandernden Chlorid-Ionen (Leitton) und dem langsam wandernden Glycin-Ionen (Folge-Ion) ein. Die Chlorid-Ionen haben eine hohe elektrophoretische Mobilität aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer geringen Molekülgröße [25]. Auf der anderen Seite wandert das Glycin deutlich langsamer, da es als Zwitterion vorliegt, denn der pH-Wert des Sammelgels mit 6,8 liegt nahe dem Isoelektrischen Punkt von Glycin mit 6,06 [27, 25, 28]. Im Trenngel jedoch mit dem pH-Wert von 8,8 wandert das Glycin schneller als die Probenmoleküle.

Die Denaturierung bei dem SDS-Page erfolgt, wie der Name schon sagt, durch das Natrium Dodecyl Sulfat, die Abbildung 6 zeigt die Struktur des SDS. Dies ist ein anionisches grenzflächenaktives Detergenz, das den Proteinen in den Proben eine negative Ladung verleiht. Es koppelt sich in einer Konzentration von ca. 1,4 mg SDS pro g Protein an sie. Durch die Zugabe von SDS zerfallen die Proteine weitgehend bis in ihre Sekundärstruktur [28, 27, 25, 26]. Um anschließend die noch bestehenden Disulfidbrücken aufzubrechen wird 2-Mercaptoethanol eingesetzt.

Nach dem die Gelelektrophorese abgeschlossen ist, wird mit dem Farbstoff Coomassie Blue die Färbung der Gele durchgeführt um die einzelnen Banden sichtbar zu machen. Dabei erfolgt die Fixierung der Proteine und gleichzeitig erhalten diese eine positive Ladung [27]. Die Nachweisgrenze für diesen Farbstoff liegt zwischen 50 und 100 ng [28]. Abschließend werden die Gele in ein Entfärbungsmedium gegeben und das Ergebnis kann fotografisch dokumentiert werden.

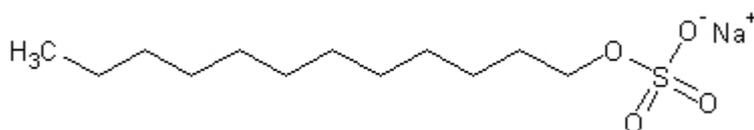


Abbildung 6: Struktur Natrium Dodecyl Sulfate (8)

1.3 Fischallergie

Neben den Nahrungsmittelallergien gegenüber Milch, Rohgemüse und Hühnereiweiß, gehört auch die Fischallergie zu den am häufigsten auftretenden Lebensmittelallergien. Darüberhinaus kann Fisch schon in nur sehr geringen Mengen Allergiesymptome auslösen [31, 32, 33]. Fisch ist in der Lage Überempfindlichkeitsreaktionen auszulösen, die durch das Immunglobulin IgE vermittelt werden. Es kann bereits nach ca. 30 Minuten zu ersten Anzeichen einer Fischallergie kommen, durch das Essen von Fisch, das Einatmen von Fischgerüchen oder Dämpfen oder nur durch direkten Kontakt. Zu diesen Symptomen gehören Veränderungen der Haut, wie Ausschläge, Anschwellen oder Ekzeme, Beschwerden des Gastrointestinaltrakts (Bauchkrämpfe), gefolgt von Atemwegsproblemen, die über einen anaphylaktischen Schock bis zum Tod führen können [34, 35]. Fischallergien treten vor allem in den Gegenden auf, wo viel Fisch verzehrt wird. Somit unterscheidet sich auch von Region zu Region gegen welche Fischarten dort die Allergie gerichtet ist (1995). Zudem lösen Salzwasserfische, wie Hering, Kabeljau oder Rotbarsch eher eine Allergie aus als Süßwasserfische (Lachs, Aal oder Zander) [1].

Auslöser für eine Fischallergie ist das Parvalbumin, was bei dieser Arbeit als Antigen eingesetzt wird. Dies ist ein Ca^{2+} - bindendes Protein mit einem geringen Molekulargewicht von ca. 12 kDa. Darüber hinaus ist es sehr hitzestabil und kommt vorwiegend im weißen Muskelfleisch vieler Fischarten vor [35, 36]. Dieses saure Protein wurde 1934 zum ersten Mal in den Muskeln von Fischen und Amphibien entdeckt und ist durch den hohen Gehalt an verschiedenen Aminosäuren gekennzeichnet. Bei den Parvalbuminen wird zwischen α - und β -Abstammungslinien unterschieden, obwohl insgesamt zwischen 2 bis max. 8 Isoformen existieren je nach Fischart [33, 34]. Für α -Parvalbumine ist die Lys-Ala-Aminosäuresequenz charakteristisch und für die β -Parvalbumine die Ala-Ala-Sequenz. Auf der einen Seite enthalten α -Parvalbumine weniger saure Aminosäuren, während auf der anderen Seite die β -Parvalbumine Ca^{2+} -Ionen besser und stärker binden können [37]. Alle Parvalbumine besitzen eine ähnliche Tertiärstruktur, die aus drei homologen Domänen aufgebaut ist. Jede Domäne verfügt über zwei Helices und werden als AB, CD und EF bezeichnet. Zwischen den Domänen befindet sich jeweils eine Schleife (loop). Die Schleifen der CD- und EF-Domäne sind in der Lage ein Calcium-Ion stark zu binden, wobei die Reaktion reversibel ist. Die EF-Domäne wird aufgrund seiner räumlichen Anordnung auch als EF-Hand bezeichnet, weil sie dem Daumen und Zeigefinger der rechten menschlichen Hand ähneln [32, 34].

Die nachfolgende Abbildung 7 macht die Struktur eines Parvalbumins mit seinen drei Domänen deutlich.

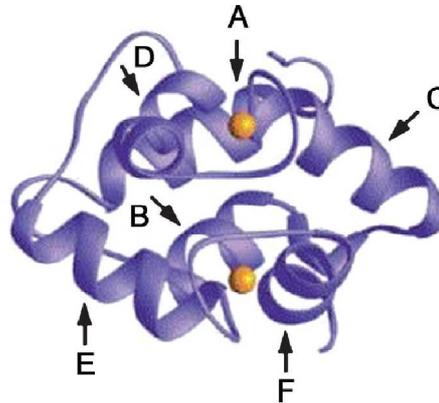


Abbildung 7: Struktur Parvalbumin (9)

1.4 Zielformulierung

Das Ziel dieser Masterthesis ist die Entwicklung einer Antikörpersäule zum Nachweis von Fischparvalbumin unter Verwendung der Affinitätschromatographie. Dazu werden verschiedene Materialien benutzt, wie Agarosebeads und NHS-aktivierte Sepharose. Im Fokus liegt dabei die Voranreicherung bzw. Vorreinigung des Parvalbumins für weiterführende Untersuchungen mit der Matrix gestützten Laserdesorptions- Ionisations- Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS). Darüberhinaus kann es auch als Vorschrift zum Allergennachweis bzw. zur Fischartendifferenzierung dienen, da das Fischeiweiß die Ursache für die Fischallergie ist.

2. Material und Methoden:

2.1 Material:

2.1.1 Chemikalien

Die einzelnen Versuche wurden mit unterschiedlichen Chemikalien durchgeführt. Für die Entwicklung der Antikörpersäulen wird zunächst das AmminoLink Plus Immobilization Kit von Thermo Scientific heran gezogen. Darin enthalten sind neben den Säulen auch Natriumcyanoborohydrid und ein Quenchingpuffer. Anschließend werden leere Säulen (illustra™ Column PD-10, empty) und NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow von GE Health Care genutzt. Um dafür nötige Puffer herzustellen wird Tris und Glycin, sowieso Tris-HCl von Carl Roth benötigt.

Für die Antikörperreinigung werden HiTrap Protein G HP Säulen der Firma GE Health Care verwendet. Darüberhinaus wird Ethanol ($\geq 99,8\%$) und Natriumazid von der Carl Roth GmbH & Co. KG benutzt.

Zur Durchführung der Sandwich-ELISA und der Indirekten ELISA müssen zunächst Puffer und andere Lösungen hergestellt werden (siehe Punkt 2.1.4). Das zum Blocken verwendete Milchpulver wurde auch von Carl Roth geliefert. Ein weiteres genutztes Blockmittel ist Bovine albumin (BSA), produziert von Sigma-Aldrich. Desweiteren wurde von dieser Firma das Bradford Reagent zur Proteinbestimmung, Tween 20 zur Waschpufferherstellung, Tetramethylbenzidin (3,3', 5,5' - TMB) und Anti-Mouse IgG Peroxidase genutzt.

Für die Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese wird Roti Blue und Bromphenolblau von der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG verwendet. Desweiteren wird dafür und 2-Mercaptoethanol ($\geq 98\%$) von Sigma- Aldrich genutzt. Es wurden gekaufte Fertiggele (Pro Gel Tris Glycin 18% 1,0 m) der Firma Anamed Elektrophorese GmbH verwendet. Um die gefärbten Banden besser auswerten zu können, werden insgesamt drei verschiedene Marker genutzt: der Sigmamarker und Color Marker von Sigma Aldrich, sowie ein SDS-Page Protein Marker von Serva Electrophoresis (Anhang 1).

2.1.2 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Geräte benutzt, wie der Vortex REAX top von Heidolph, ein pH-Meter ino Lab pH 720 von WTW mit der dazugehörigen Elektrode Sen Tix 61 und das Ultraschallbad Super RK 103 H von Sonorex Bandelin. Es wurden desweiteren zwei verschiedene Zentrifugen verwendet, zum einen die Biofuge pico und zum anderen die Sigma 3-16 PK (Rotor 19776-H). Beide Zentrifugen wurden von Heraeus Instruments hergestellt. Um die

3. Waschpuffer: PBS, 8 mmol/l, pH 7,6 + 0,05 % Tween 20
(Polyoxyethylensorbitanmonolaurant)
4. Substratpuffer: Natriumacetatpuffer, 0,1 mol/ l, pH 5,5
8,2 g/ l CH₃COONa
mit 10 %iger Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen
5. Substratlösung: 400 µl Tetramethylbenzidin (6 mg in 1 ml Dimethylsulfoxid)
100 µl 1 %ige H₂O₂
in 25 ml Substratpuffer
(erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen)

Puffer für SDS-Page:

- Substanzlösungspuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH= 6,8
- Elektrophoresepuffer: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS
- Probenlösung: 400 µl Substanzlösungspuffer, 800 µl 10 % SDS, 800 µl 50 %
Glycerin, 40 µl 2-Mercaptoethanol, 50 µl 0,1 % Bromphenolblau
- Färbelösung: 60 ml dest. Wasser, 20 ml Methanol, 20 ml Roti Blue 5x
- Entfärbelösung: 10 % Isopropanol, 10 % Eisessig

2.1.5 Monoklonale Antikörper

Für die ELISA-Versuche wurden zwei verschiedene Antikörper benutzt:

Primärer AK: Wi11 3G9D5

gereinigt: IgG-Gehalt = 2,8 mg/ ml

Rohmaterial: IgG-Gehalt = 10,5 mg/ml

Sekundärer AK: Wi11 1G3G11 Fr. 3 (27.10.11)

Diese Antikörper wurden von der Firma Biometec GmbH hergestellt und dort wurde auch bereits die IgG-Konzentration ermittelt.

2.1.6 Antigene

Zum Nachweis von Fischparvalbumin wurden verschiedene Proben verwendet, wie:

- Rotbarsch (gelöst in Wasser), Konz. 3,56 mg/ml (hergestellt von St. Hartwig)
- Alaska Seelachs (gelöst in Wasser), Konz. 1,71 mg/ml (hergestellt von St. Hartwig)
- Kabeljau (gelöst in Wasser), Konz. 2,05 mg/ml (hergestellt von St. Hartwig)

2.2 Methoden:

2.2.1 Entwicklung von Antikörpersäulen

Für die Bearbeitung dieser Masterarbeit werden drei verschiedene Möglichkeiten getestet um eine funktionierende Antikörpersäule zu entwickeln.

Als erstes wurde das AminoLink Plus Immobilization Kit von Thermo Scientific verwendet. Dabei handelt es sich um mit Agarose Kügelchen (Beads) versetzte Säulen. In diesem Kit sind alle benötigten Puffer und Lösungen enthalten, so dass kein zusätzlicher Arbeitsschritt zur Herstellung dieser Puffer durchgeführt werden muss. Die nachfolgend beschriebene Durchführung erfolgt anhand der Anleitung von Thermo Scientific bezüglich des gekauften Kits (Anhang 3). Wichtig ist, bevor mit der Herstellung dieser Säule begonnen werden kann, dass zunächst alle Komponenten des Kits auf Raumtemperatur gebracht werden müssen und die Konzentration der Antikörper mittels eines Photometers bestimmt werden. Die Entfernung von Bindungs- und Waschlösungen erfolgt über Zentrifugieren für eine Minute bei 1000 x g in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen. Der erste Schritt ist nun die Proteinimmobilisierung, dazu wird die bei 4°C gekühlte Säule durch behutsames Schütteln suspendiert. Anschließend wird der enthaltene Lagerpuffer durch Zentrifugieren entfernt. Bevor 2 ml des Bindungs- oder Coupling Puffer (pH=10) auf die Säule gegeben werden können, muss das dafür vorgesehene Päckchen zunächst in 500 ml Reinstwasser gelöst werden, genauso wie bei dem zweiten Puffer: PBS mit einem pH-Wert von 7,2. Der Bindungspuffer wird ab zentrifugiert und erneut 2 ml auf die Säule gegeben. Nach dem der restliche Puffer entfernt und die untere Kappe angelegt wurde, können jetzt 2-3 ml der Proteinprobe, in diesem Fall die Antikörper gelöst in pH 10 Couplingpuffer, auf die Säule gegeben werden. Um später die Effizienz der Bindung mittels einer photometrischen Messung zu überprüfen sollten ca. 100 µl der Probe zurückbehalten werden. Darauf folgend wird die Säule auch oben verschlossen und über Nacht erfolgt das Mischen der Probe mit dem Puffer in einem „Über-Kopf-Schüttler“, um eine Bindung an die Säule zu ermöglichen. Am nächsten Tag werden dann die beiden Kappen entfernt um die nicht gebundenen Proteine durch Zentrifugieren in einem neuen Zentrifugenröhrchen zu sammeln. Dieser Durchfluss muss aufbewahrt werden, denn er wird im Weiteren zur Überprüfung der Effizienz mittels verschiedener ELISA-Versuche und SDS-Page Tests genutzt. Die Bestimmung der Bindungseffizienz erfolgt durch den Vergleich der Proteinkonzentrationen der nicht gebundenen Proteine und der Start-/ Ausgangsprobe. Es wird nun die Säule mit 2 ml Waschpuffer (PBS, pH 7,2) gewaschen und zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt bevor die untere Kappe angesetzt wird und 2 ml desselben Puffers zugefügt werden, welcher aber zuvor mit 40 µl

Natrium-Cyanoborohydrid-Lösung (NaCNBH_3) versetzt wurde. Die Säule wird komplett verschlossen und für vier Stunden bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt. Aufgrund des NaCNBH_3 könnte sich Gas in der Säule gebildet haben, daher muss die obere Kappe vorsichtig entfernt werden. Anschließend wird die untere Kappe abgenommen um den enthaltenen Bindungspuffer zu entfernen. Damit die noch freien Bindungsstellen an der Säule geblockt werden, erfolgt nun das Waschen mit 2 ml des Quenchingpuffers. Dieser wird ab zentrifugiert und der Schritt einmal wiederholt. Die verschlossene Säule wird erneut für 30 Minuten durch „über Kopf schütteln“ vermischt, nachdem 2 ml des Quenchingspuffers + 40 μl NaCNBH_3 hinzugegeben wurden. Auch hier ist wieder Vorsicht geboten bei der Öffnung der Säule. Nach dem beide Kappen entfernt wurden, wird die Säule erneut zentrifugiert um den Puffer zu beseitigen. Abschließend wird nun die Säule gewaschen und für die Lagerung vorbereitet. Das Waschen erfolgt mit 2 ml der mitgelieferten Waschlösung, welche wiederum ab zentrifugiert wird. Der Schritt des Waschens wird drei bis fünf Mal wiederholt. Ob noch Proteine in dem ab zentrifugierten Durchfluss enthalten sind, kann mit Hilfe der Bradford-Kontrolle überprüft werden. Wenn noch Protein darin enthalten ist sollte ein weiterer Waschschritt durchgeführt werden. Um die Säule auf die bevorstehende Lagerung vorzubereiten werden 2 ml Lagerpuffer (PBS + 0,05% Sodiurnazid (NaN_3)) zugefügt und wieder entfernt. Dieser Schritt wird zwei Mal wiederholt. Nach dem die untere Kappe angelegt wurde, werden erneut 2 ml des Lagerpuffers auf die Säule gegeben. Die Lagerung der verschlossenen Säule erfolgt bei 4°C. Die Abbildung 8 zeigt eine so hergestellte Säule.



Abbildung 8: Säule nach Thermo Scientific

Die zweite Möglichkeit, die getestet wurde um eine Antikörpersäule zu entwickeln, war die Nutzung einer NHS-aktivierten Sepharose im Batch-Verfahren. Die Durchführung erfolgte hier anhand der Anleitung von dem Lieferanten GE Health Care und ist in Anhang 4 kurz dargestellt. Da es sich um kein gesamtes Kit sondern nur die Sepharose handelt, müssen zu Beginn die verschiedenen Puffer und Lösungen hergestellt werden, wie der Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH= 8,3), eine 1 mM HCl-Lösung, 0,1 M Tris-HCl und ein Acetatpuffer (pH= 4-5). Es wird auch hier wie bei allen anderen Säulen stets derselbe Antikörper benutzt. Dazu werden als Probenlösung 0,5 ml Antikörper und 1,5 ml des Natriumhydrogencarbonat-Puffers gemischt. Da es sich um ein Batch-Verfahren handelt wird die Sepharose zunächst separat in einem Glasgefäß mit 1mM HCl-Lösung gewaschen, genutzt wird dafür das 10 bis 15 fache des eingesetzten Mediumvolumens (Sepharose). Anschließend wird die hergestellte Probenlösung dazu gegeben und das Gemisch bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgt das Blocken, dabei wird die Lösung mit 1 M Tris-HCl-Lösung versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Waschen des Gemisches werden zwei verschiedene Puffer verwendet, zum einen der 1 M Tris-HCl (pH= 8-9) und zum anderen eine 1 M Acetatpuffer (pH= 4-5). Dazu werden zunächst 3 x 1 Mediumvolumen des Tris-HCl und anschließend 3 x 1 Mediumvolumen des Acetatpuffers zu dem Gemisch gegeben. Die einzelnen Puffermengen werden durch Pipettieren wieder entfernt. Die zwei Schritte werden drei bis sechs Mal wiederholt. Nach der Anleitung von GE Health Care müsste an dieser Stelle die gewaschene Sepharose-Antikörper-Lösung über eine Pumpe (Abbildung 9) die entsprechende Säule geführt werden. Da die hergestellte Menge jedoch zu gering war für die Pumpe, wurde das Gemisch direkt in eine leere Säule gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur im „Über Kopf Schüttler“ gemischt. Abschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Lagerung erfolgt auch hier bei 4 °C und der Lagerpuffer ist ebenfalls der mit 0,05% NaN₃ versetzte PBS.



Abbildung 9: Säule mit NHS-aktivierter Sepharose und eine Pumpe

Für die dritte Variante zur Entwicklung einer Antikörpersäule wird auch die NHS-aktivierte Sepharose von GE Health Care benutzt, allerdings wird hier die Sepharose direkt in eine Säule gegeben und nicht erst separat gewaschen. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an die Anleitung von Thermo Scientific (Anhang 5). Es werden die gleichen Puffer und Lösungen verwendet, wie bei der zweiten Möglichkeit zur Säulenherstellung. Zu Beginn werden 5 ml der NHS-aktivierten Sepharose in eine leere Säule gegeben und zentrifugiert um die Lagerflüssigkeit zu entfernen. Anschließend werden 5 ml Reinstwasser der Säule zugefügt um die Sepharose zu waschen und es erfolgt wieder ein zentrifugieren. Bevor 2 ml Probenlösung, bestehend aus den Antikörpern gelöst im Couplingpuffer, in die Säule gegeben werden, werden 5 ml Natriumhydrogencarbonat zugefügt, ab zentrifugiert und die Säule unten verschlossen. Nach der Probenzugabe wird die Säule oben verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt. Es werden nun beide Kappen entfernt um die Säule zu zentrifugieren und der erhaltene Durchfluss wird zurückbehalten. Zusätzlich wird 1ml PBS zugegeben und auch dieser abzentrifugierte Durchfluss wird nicht verworfen. Genau wie bei der zweiten Methoden wird zum Blocken Tris HCl benutzt. Daher wird die untere Kappe angelegt und 2 ml dieser Lösung auf die Säule gegeben. Nach Verschließen der oberen Öffnung wird die Säule für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt. Nach einem letzten Zentrifugieren wird die Säule mit 6 ml PBS gewaschen und zu der nachfolgenden Lagerung werden erneut 6 ml PBS + 0,05% Natriumazid durch die Säule laufen gelassen. Wenn nur noch 1 ml der Lösung in der Säule enthalten ist, wird die Säule verschlossen und bei 4 °C gelagert.

Nach dem nun die einzelnen Säulen nach dem jeweiligen Schema entwickelt wurden, kann damit begonnen werden das Parvalbumin aus den Fischproben zu isolieren. Dies geschieht bei allen Säulen gleich, nach einem Generellen Protokoll für die Affinitätsreinigung. Alle Zentrifugierschritte erfolgen auch hier bei 1000 x g für eine Minute. Zunächst müssen auch hier die entsprechenden Puffer und Lösungen erzeugt werden, wie PBS als Bindungs-/ Waschpuffer, 0,1 M Glycine-HCl (pH 2,5-3) also Elutionspuffer und 1 M Tris HCl (pH 8,5-9) als Neutralisationspuffer. Die Fischproben wurden in Wasser gelöst bei -20°C tiefgefroren gelagert und müssen vor der Verwendung aufgetaut werden. Als erstes müssen die bei 4°C gelagerten Säulen auf Raumtemperatur gebracht werden und nach dem beide Kappen gelöst wurden, wird die Säule zentrifugiert um die Lagerlösung zu entfernen. Anschließend werden 6 ml des Bindungs-/ Waschpuffers durch die Säule laufen gelassen und 2 ml der Fischprobe in der jeweiligen Verdünnung (1:2, 1:10 oder 1:5) auf die Säule gegeben. Nach dem die Probe die Säule passiert hat wird die untere Kappe angelegt und weitere 200 µl des Puffers zugefügt. Die

Säule wird nun für 15- 60 min bei Raumtemperatur durch Wippen gemischt um die Bindung der Probe an die Säule zu ermöglichen. Nach Abschluss der Bindungsphase wird die Säule zentrifugiert und ohne das Zentrifugenröhrchen zu wechseln, wird 1 ml des Bindungs-/ Waschpuffer zugefügt und wieder zentrifugiert. Der erhaltene Durchfluss wird zurückbehalten um später die Effizienz zu bestimmen. Das Waschen der Säule erfolgt mit 2 ml Waschpuffer und anschließendem Zentrifugieren, dieser Schritt wird zwei bis vier Mal wiederholt. Um das Parvalbumin wieder von der Säule zu gewinnen erfolgt die Elution mit 2 ml Glycin-HCl. Die einzelnen Elutionen werden in Zentrifugenröhrchen gesammelt, in denen 100 µl des Neutralisationspuffers (Tris HCl) vorgelegt sind. Die Elution erfolgt auch hier durch Zentrifugieren und das ganze wird pro Säule zwei bis drei Mal wiederholt. Die Proteinbestimmung kann anschließend direkt mittels einem SDS-Page oder Protein Assay durchgeführt werden. Vor der Lagerung werden 4 ml Bindungs-/ Waschpuffer durch die Säule laufen gelassen, bevor die untere Kappe angelegt und abschließend 4 ml Waschpuffer mit 0,05% Natriumazid auf die Säule gegeben werden. Nach dem die Säule vollständig verschlossen wurde, wird sie wieder bei 4°C gelagert.

2.2.2 Reinigung der gelieferten Antikörper

Bevor die Antikörper mittels der Affinitätschromatographie an die Säulen gebunden werden, müssen zunächst das Antikörperrohmaterial gereinigt werden. Für die Reinigung der jeweiligen Antikörper wurden „HiTrap Protein G HP-Säulen“ von Healthcare BioSciences verwendet, wie in Abbildung 10 dargestellt. Um die Antikörper an die Säule mittels einer Affinitätschromatographie zu binden, muss zunächst eine antikörperhaltige Flüssigkeit dafür vorbereitet werden. Diese Flüssigkeit wird auch als Aszitesflüssigkeit, Kulturüberstand oder Antiserum bezeichnet. Dies geschieht in dem die Lösung mit Antikörpern bei 4000 U/min (4 °C) zentrifugiert wird und anschließend der Überstand, also das zentrifugierte Aszites, mit PBS (phosphate buffered saline) in folgendem Verhältnis verdünnt wird: 3 ml Aszites + 40 ml PBS. Die Kulturüberstände sollten dafür auf 0,5 mg/ ml mit PBS vorverdünnt werden. Die antikörperhaltige Flüssigkeit ist zur Affinitätsreinigung vorbereitet, wenn die verdünnte Lösung mittels einem 0,45 µm Filter gefiltert wurde. Anschließend wird nun als erstes die Protein G-Säule vorbereitet, in dem das in der Säule enthaltene Ethanol abgelassen wird. Das Ethanol ist enthalten um ein Trockenlaufen der Säule zu verhindern, da sie ansonsten unbrauchbar wird. Anschließend wird die Säule mit ca. 3 ml Reinstwasser gewaschen und 3 ml gefilterter PBS werden als Startpuffer auf die Säule gegeben. Die Zugabe der einzelnen Lösungen erfolgt tröpfchenweise mit Hilfe von geeigneten Spritzen. Der Startpuffer wird mit einer

Geschwindigkeit von 1 ml pro Minute langsam durch die Säule laufen gelassen. Wenn das PBS vollständig die Säule passiert hat, wird die Probe, also die antikörperhaltige Flüssigkeit, mit einer langsameren Geschwindigkeit von 0,5 ml/ Minute durch die Säule getropft. Neben den Antikörpern befinden sich auch noch andere Proteine in der Probe, diese müssen mittels gefiltertem PBS aus der Säule gewaschen werden. Um zu testen ob die durchlaufende Flüssigkeit proteinfrei ist, wird die sogenannte Bradfordkontrolle durchgeführt. Dafür werden auf einer Mikrotiterplatte 50 µl Bradford/ well vorgelegt und anschließend wird ein Tropfen der durch die Säule laufenden Lösung auf ein well gegeben. Wenn Proteine in dieser Lösung enthalten sind, entsteht bei der Reaktion mit dem Bradford Reagenz eine Blaufärbung. Erst wenn keine Proteine mehr nachgewiesen werden mit Hilfe der Bradfordkontrolle, wird die Elution des gebundenen Antikörpers durch 0,25M Essigsäure eingeleitet. Die Elution beruht auf einer pH-Wertänderung. Der als Startpuffer eingesetzte PBS besitzt einen pH-Wert von 7,6, während die Essigsäure einen pH-Wert von 3 hat. Die aus der Säule austretenden Eluate werden in 0,5 ml Aliquoten in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgefangen, die vorher mit 105 µl 1M Tris HCl, welches einen pH-Wert von 11 hat, gesammelt. Das Tris HCl dient zur Neutralisierung. Um keine bzw. nur geringe Verluste an Antikörpern zu haben, wird erst nach dem Auffangen des ersten 0,5 ml Aliquoten eine Bradfordkontrolle durchgeführt. Es ist davon auszugehen, dass die höchsten Konzentrationen an Antikörpern zu Beginn eluieren. Da es sich bei den Antikörpern um Proteine handelt, kommt es bei der Bradfordkontrolle zu einer Blaufärbung. Die Säulenchromatographie kann beendet werden, wenn keine Blaufärbung bei der Kontrolle mehr auftritt. Um das Eluat von dem Tris HCl zu befreien, muss eine Dialyse vollzogen werden. Dazu wird der Dialyseschlauch auf die entsprechende Länge zugeschnitten und für 20 Minuten in Wasser eingelegt. Die Unterseite des Schlauches wird mit Clips verschlossen und der gesamte Inhalt aller Eppendorf-Gefäße wird in den Schlauch übertragen. Mit steigender Anzahl an Aliquoten sinkt die Konzentration an Antikörpern, daher ist es auch möglich die ersten 3 bis 4 Aliquoten in einen separaten Schlauch zu überführen, um ein späteres Aufzentrifugieren zu vermeiden. Der Dialyseschlauch wird mit Clips luftdicht verschlossen und über Nacht in ein mit PBS gefüllten Gefäß gegeben. Die Dialyse erfolgt im Kühlschrank (4°C). Am nächsten Tag wird der Inhalt des Schlauches in entsprechend große Gefäße gegeben und die Konzentration der Antikörper kann mittels eines Photometers bei 280 nm bestimmt werden. Die erhaltenen Extinktionswerte können mit Hilfe einer erstellten BSA-Standardkurve auf die Antikörperkonzentration umgerechnet werden. Sollten diese Werte zu gering sein, muss eine Aufkonzentrierung bei 4000 U/ min bei 4 °C vorgenommen werden. Anschließend werden dann erneut die aufkonzentrierten Eluate photometrisch vermessen (4).



Abbildung 10: HiTrap Protein G HP-Säule zur Antikörperreinigung

2.2.3 Erstellen einer BSA-Standardkurve zur Proteinbestimmung

Um die Konzentrationen der gereinigten Antikörper zu bestimmen ist es vorher nötig eine BSA-Standardkurve zu erstellen. Mit der daraus ermittelten Geradengleichung kann dann aus den Extinktionswerten der photometrischen Messung die Konzentration in mg/ ml berechnet werden. Zur Ermittlung dieser Kurve muss zunächst eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt werden, ausgehend von der größten Konzentration. Tabelle 1 zeigt die durchgeführte Berechnung zur Herstellung der Verdünnungsreihe.

Tabelle 1: Berechnung für BSA-Verdünnung

| Konzentration in mg/ ml | Menge an BSA-Lösung | Menge an PBS (ml) |
|-------------------------|---------------------|-------------------|
| 2,5 (= Stammlösung) | 25 mg | 10 |
| 2,0 | 1,6 ml | 0,4 |
| 1,5 | 1,2 ml | 0,8 |
| 1,0 | 0,8 ml | 1,2 |
| 0,5 | 0,4 ml | 1,6 |
| 0,25 | 0,2 ml | 1,8 |

Anhand dieser Werte lassen sich die Mengen an BSA-Lösung und PBS-Puffer ablesen, die zur Herstellung der Verdünnungsreihe benötigt werden. Anschließend werden die einzelnen Konzentrationen in einem Photometer mit einer UV-Lampe vermessen. Dafür werden 100 µl der jeweiligen Lösung in eine UV-Küvette pipettiert und zur Messung in das Photometer gestellt. Bevor die Messung mit Hilfe einer Software auf einem Computer per Mausklick ausgeführt wird, müssen die Parameter eingestellt werden. In diesem Fall wurde nur eine Wellenlänge von 280 nm eingestellt. Es wird jeweils eine Dreifachbestimmung vollzogen. Diese Extinktionswerte der einzelnen Konzentrationen können dann mit Hilfe von Microsoft Excel in einem Diagramm

dargestellt werden, woraus sich die BSA-Standardkurve mit der Geradengleichung ergibt. Die Abbildung 11 zeigt eine solche BSA-Standardkurve (4).

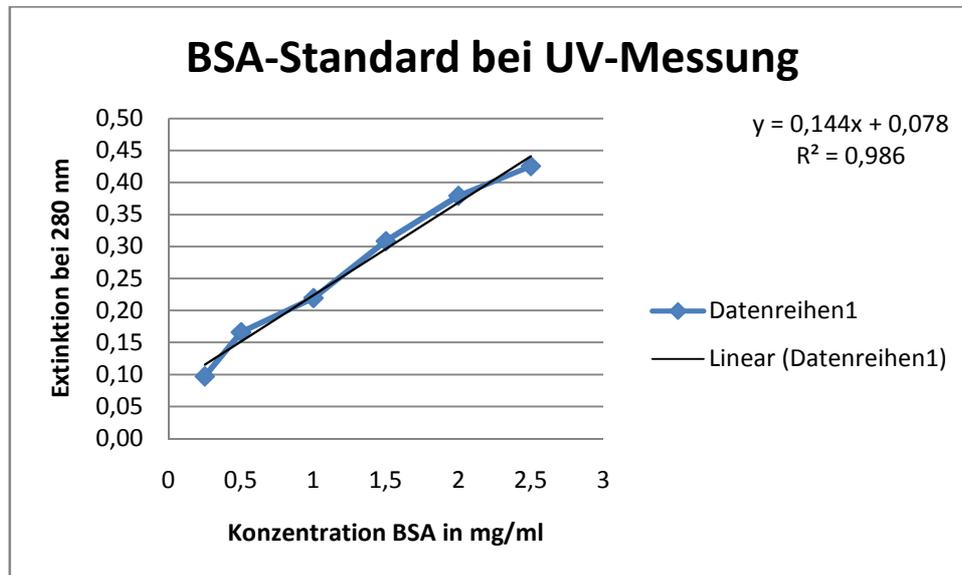


Abbildung 11: BSA-Standardkurve vom 19.01.2011

2.2.4 Durchführung der ELISA-Versuche

Zunächst wurden verschiedene Sandwich-ELISA vollzogen, um die Elutionen und möglicherweise parvalbuminhaltigen Durchflüsse zu überprüfen. Das dazugehörige Durchführungsprotokolls ist dem Anhang 6 zu entnehmen. Es ist zu beachten, dass bei allen Inkubationsschritten die Platte immer mit Alufolie abgedeckt werden muss! Die Abbildung 12 zeigt einen schematischen Ablauf der einzelnen Schritte für einen Sandwich-ELISA.

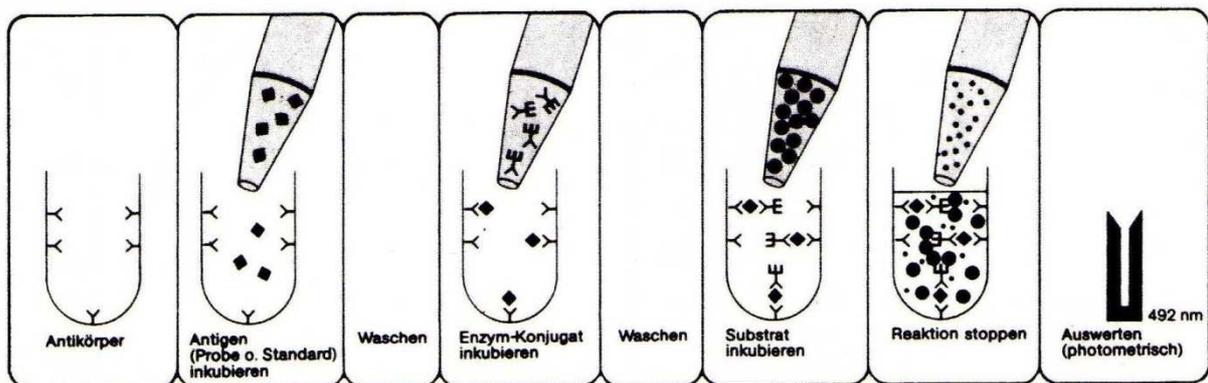


Abbildung 12: Testprinzip für Sandwich-ELISA (10)

Der erste Schritt bei der Durchführung eines Sandwich-ELISA ist die Erstellung eines ELISA-Plans, wie er in Tabelle 2 dargestellt ist. Darauf wird festgehalten, mit welchen Antikörper-Verdünnungen und mit welchen nachzuweisenden Antigen-Konzentrationen die Mikrotiterplatte benetzt werden soll.

Tabelle 2: Schema eines ELISA-Plans

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Zunächst sollten die Parameter festgelegt werden, welche für den Versuch genutzt werden. Dazu werden Ergebnisse aus vorhergegangenen Versuchen genutzt. Diese Parameter sind die Länge der Inkubationszeiten aller Proben zur Bindung an die Mikrotiterplatte, die Konzentrationen der Antigene und welches Blockmittel genutzt werden soll.

Bei dem ersten Schritt, dem Coating, werden zunächst die zu verwendenden primären monoklonalen speziessmultireaktiven Antikörper (pmAK) ausgewählt und damit anschließend eine aus Vorversuchen festgelegte 1:1000 Verdünnung mit Coating-Puffer hergestellt. Die pmAK's können direkt verwendet werden, da sie bei 4 °C in löslicher Form im Kühlschrank gelagert werden. Bei dem Coating-Puffer handelt es sich um einen selbst angesetzten Natriumcarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,6. Von dieser Verdünnung werden 150 µl in die dafür vorgesehenen Kapazitäten oder wells auf der Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Platte wird nun mit Alufolie bedeckt und über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C in einem Kühlschrank inkubiert, somit wird der pmAK an die Mikrotiterplatte gebunden. Die Alufolie dient dabei dem Schutz vor Fremdstoffen, wie Speichel oder Staub. Desweiteren wird so eine Hemmung der lichtempfindlichen Reagenzien, wie die Substratlösung oder die Meerrettichperoxidase, die an die smAK's (sekundäre monoklonale speziessmultireaktiven Antikörper) gebunden ist, vermieden.

Am nächsten Tag werden die nicht an die Platte gebundenen Antikörper durch Waschen mit einem Waschpuffer entfernt. Für alle Waschvorgänge eines Versuches wird stets dasselbe Waschprogramm verwendet, in diesem Fall Programm 4: EIA 3x mit 3 Waschdurchgängen a 300 µl. Freie unspezifische Bindungsstellen werden im nächsten Schritt mit 1 %iger Milchpulver-Lösung in PBS geblockt. Bei der Herstellung der Milchpulver-Lösung in PBS ist zu beachten, dass es zu einer Schaumbildung kommen kann. Von dieser Verdünnung werden 200 µl

auf jede zu blockende Kapazität gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit sollten die einzelnen Antigenlösungen hergestellt werden. Zunächst wurden für die einzelnen Fischproben Verdünnungsreihen hergestellt mit folgenden Konzentrationen: 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 und 0,1 mg/ml und außerdem auch 1:5; 1:10 und 1:100 Verdünnungen, welche mit PBS hergestellt wurden. Darüber hinaus wurden die von den jeweiligen Säulen gewonnenen Durchflüsse unverdünnt benutzt.

Nach dem die Platten mit dem Blockmittel gewaschen wurden, um somit nicht adsorbierte Substanzen zu entfernen, werden 150 µl der Antigenlösungen auf die entsprechenden Kapazitäten aufgebracht. Da es sich um mehrere Antigenlösungen handelt, ist dem vorher angefertigten ELISA-Plan zu entnehmen welche Kapazität mit welchem Antigen zu beschichten ist. Nach einer einstündigen Bindungsphase der Antigene an die primären Antikörper können anschließend die nicht gebundenen überschüssigen Bestandteile durch den Waschpuffer entfernt werden. Der nächste Schritt ist das Auftragen der Enzym-konjugierten sekundären monoklonalen speziesspezifischen Antikörper (smAK) auf die entsprechenden Kapazitäten. Das Enzym, welches vorher durch den Prozess der POD-Labelung an die smAK's gebunden wurde, ist die Meerrettichperoxidase. Auch von diesen Antikörpern, welche bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden, wird eine 1:1000 Verdünnung in PBS hergestellt und 150 µl werden pro well auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Nach einer einstündigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wird die Platte erneut gewaschen.

Von der erst kurz vor dem Gebrauch erzeugten Substratlösung werden nun 200 µl/ well auf die Platte gegeben und mit Alufolie abgedeckt wird die Platte dann 15-30 Minuten lang inkubiert, bis eine nicht zu starke Blaufärbung eintritt. Ist eine ausreichende Färbung erreicht, wird die Enzymreaktion in den einzelnen Kapazitäten in der gleichen Reihenfolge, wie die Substratlösung aufgegeben wurde, mit 4N Schwefelsäure (50µl/ well) gestoppt. Durch das Einhalten der gleichen Reihenfolge und der gleichmäßigen Zeitabstände wird einer höheren Substratumsetzung aufgrund einer längeren Einwirkzeit entgegengewirkt. Somit sollten ähnlich hohe Signalwerte zustande kommen. Die Messung der Signale erfolgt in einem speziellen Photometer, dem ELISA-Reader, bei 450 nm. Mit Hilfe einer Software (Magellan 3.1x) auf einem an dem Photometer angeschlossenen Computer werden die Signalwerte ausgewertet und in tabellarischer Form wiedergegeben, wie in Tabelle 3 [20].

Tabelle 3: Signalwerte eines ELISA-Versuchs

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| A | 0,712 | 0,578 | 0,580 | 0 | 0,366 | 0,386 | 0,359 | 0,001 | 1,856 | 2,345 | 0,606 |
| B | 0 | 0 | 0,001 | 0 | 0,001 | 0 | 0 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 |
| C | 0,609 | 0,561 | 0,586 | 0,003 | 0,332 | 0,332 | 0,324 | 0,002 | 0,001 | 0 | 0,002 |
| D | 0,001 | 0 | 0,001 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0,001 | 0,003 | 0,002 | 0,001 |
| E | 0,560 | 0,581 | 0,624 | 0 | 0,266 | 0,315 | 0,232 | 0,001 | 0 | 0,001 | 0,001 |
| F | 0 | 0,001 | 0,001 | 0 | 0 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 |
| G | 0,564 | 0,487 | 0,479 | 0 | 0,055 | 0,052 | 0,050 | 0,002 | 0,034 | 0,040 | 0,056 |
| H | 0,001 | 0 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,003 |

Anschließend wurden Indirekte ELISA durchgeführt, um die Durchflüsse mit eventuellen Antikörperrückständen zu testen. Die zwei Versuche zum Indirekten ELISA wurden nach dem in Anhang 7 dargestellten Protokoll realisiert, in Anlehnung an ein Durchführungsprinzip nach Kemeny (6). Es ist auch hier zu beachten, dass bei allen Inkubationsschritten die Platte immer mit Alufolie abgedeckt werden muss, genauso wie bei dem Sandwich-ELISA. Eine weitere Gemeinsamkeit zum Sandwich-ELISA ist das Anlegen eines Plattenplans zu Beginn des jeweiligen Versuches, auf dem die verwendeten Antigene und Antikörperproben vermerkt sind. Der erste Schritt beim Indirekten ELISA ist das Coating, also das Binden der Antigene an die Mikrotiterplatte. Dazu werden die hier als Antigene verwendeten Fischproben auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit Coating-Puffer verdünnt. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung von jeder Probe und pro well werden 150 µl aufgetragen. Die Inkubation verläuft über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

Am nächsten Tag erfolgt das Waschen der Platte mit einem Waschpuffer, wozu auch hier das gleiche Waschprogramm wie bei dem Sandwich-ELISA genutzt wird: Programm 4: EIA 3x mit 3 Waschdurchgängen a 300 µl. Anschließend werden 150 µl der Durchflussproben, welche Antikörper enthalten, in die wells pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Alufolie abgedeckt inkubiert. Die Durchflussproben sind das Ergebnis der einzelnen Elutionen der Fischproben bei der Entwicklung der Antikörpersäulen und wurden in Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Nachdem ein weiterer Waschschritt vollzogen wurde, wird jetzt die Anti-Maus IgG Peroxidase in einer Verdünnung von 1:1000 auf die entsprechenden wells gegeben. Es handelt sich dabei um ein Antikörper bzw. Immunglobulin, das mit dem Enzym Meerrettichperoxidase enzymatisch verändert wurde. Von dieser Verdünnung werden 150 µl pro Kavität aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Es erfolgt ein letzter Waschvorgang und von der kurz vor dem Gebrauch hergestellten Substratlösung werden 200 µl pro well pipettiert. Die Inkubationszeit dafür liegt zwischen 5 und maximal 30 Minuten. Wird eine ausreichend hohe Blaufärbung erreicht, wird die Reaktion der einzelnen Kavitäten, in der gleichen Reihenfolge wie das Substrat aufgetragen wurde, mit Hilfe von 50 µl einer 4N Schwefelsäure gestoppt. Die dadurch entstehende Gelbfärbung wird auch hier mittels des ELISA-Readers bei 450 nm vermessen und die Auswertung erfolgt über die Software Magellan 3.1x.

2.2.5 SDS-Page

Zu abschließenden Überprüfung der Effektivität der Affinitätschromatographie wurden die Durchflüsse und Elutionen einer SDS-Page unterzogen um somit die Molekülgrößen der enthaltenen Substanzen zu ermitteln. Bevor mit der Gelelektrophorese begonnen wurde, mussten zunächst die benötigten Puffer, wie der Substanzlösungspuffer, der Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) und die Probenlösung hergestellt werden. Auch die Proben sollten bereits im Vorfeld vorbereitet werden. Dazu werden 44 µl der jeweiligen Probe mit 51 µl der Probenlösung gemischt und gevortext. Als Proben werden die Eluate der einzelnen Fischproben verschiedener entwickelter Antikörpersäulen benutzt, zum Nachweis von Fischparvalbumin bei einer Größe von ca. 12 kDa. Das Schema nach dem der SDS-Page durchgeführt wurde, ist dem Anhang 8 zu entnehmen. Da es sich um gekaufte Tris-Glycin-Gele (18%) der Firma Anamed Elektrophorese GmbH handelt, wurden die ersten Schritte nach deren Anleitung vollzogen. Als erstes wurden daher die Gelkassetten aus der Tüte entfernt und mit destilliertem Wasser gründlich abgespült. Das sich am unteren Ende der Kassette befindende Klebeband muss sorgfältig entfernt werden, um den Geldurchtrittsspalt frei zu legen. Somit ist gewährleistet, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hat und die Proben später durch das Gel wandern können. Anschließend werden zwei so vorbereitete Gele in die Elektrophoresezelle eingesetzt und die Kämmen entfernt, um die jeweils 10 Kammern pro Gel freizulegen. Diese Kammern werden zunächst mit Laufpuffer fast komplett gefüllt. Es ist dabei darauf zu achten, dass sich keine Luftbläschen im unteren Bereich der Kammern bilden. Im Folgenden werden dann die einzelnen Proben in die entsprechenden Kammern pipettiert. Es ist ratsam vorher einen Plan anzulegen, in dem festgehalten wird in welcher Kammer sich welche Probe befindet. Von jeder Probe werden 20 µl in die Kammer gegeben. Als Standard werden gekaufte Marker zusätzlich eingesetzt um eine Einteilung der Proteingröße zum Vergleich zu haben. In diesem Fall wurden drei verschiedene Marker benutzt mit unterschiedlichen Bereichen von 1,06 bis 200 kDa. Von den Markern werden auch 20 µl pro

Kammer pipettiert, jedoch wurden diese vorher nicht mit der Probenlösung verdünnt. Desweiteren wird jetzt die gesamte Elektrophoresezelle mit Laufpuffer befüllt und die Gelhalterung an die Stromquelle angeschlossen. Die Parameter dafür liegen bei ca. 23 mA und die maximale Voltleistung. Die Laufdauer liegt laut Herstellerangaben zwischen 1 und 6 Stunden, in diesem Fall war der Lauf nach 2,5 Stunden beendet. In Abbildung 13 ist der Aufbau der SDS-Page Anlage dargestellt. Nach dem nun die Proben durch das Gel gewandert sind und die Stromquelle von der Zelle abgetrennt wurde, werden die zwei Gele in eine vorher vorbereitete 10 %ige Trichloressigsäurelösung für 30 Minuten inkubiert. Dazu wurden die Gele zunächst aus den Kassetten mit Hilfe eines Spatels entfernt. Während der 30-minütigen Inkubationsphase wird die Färbelösung hergestellt, in die die Gele anschließend für 12 bis 15 Stunden unter Schütteln gelagert werden. Es handelt sich dabei um eine Coomassie-Blue-Färbung, wodurch das gesamte Gel eingefärbt wird. Am folgenden Tag wird dann die Entfärbelösung hergestellt, in welcher die Gele für eine Stunde schüttelnd inkubiert werden. Dadurch wird das Gel an sich wieder entfärbt und die einzelnen Probenbanden in den Gelen werden sichtbar. Anhand der mitgeführten Marker können nun die Probenbanden auf den Gelen ausgewertet werden.



Abbildung 13: SDS-Page Aufbau

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Masterthesis wurden fünf Antikörpersäulen hergestellt um mit Hilfe der Affinitätschromatographie einen Nachweis für Fischparvalbumin zu entwickeln. Zuvor musste jedoch das Antikörperrohmaterial gereinigt werden, damit anschließend Tests wie Sandwich-ELISA, Indirekte ELISA und SDS-Pages durchgeführt werden konnten um die Effizienz der Antikörpersäulen zu überprüfen.

3.1 Entwicklung von Antikörpersäulen

Während des Bearbeitungszeitraumes dieser Arbeit wurden insgesamt 5 Säulen entwickelt (siehe Tabelle 4). Für die Entwicklung der Säulen 1, 2 und 5 wurde das AminoLink Plus Kit von Thermo Fisher verwendet, dabei handelt es sich um Agarosemoleküle als Bindungsmaterial für die Antikörper an die Säule. Für die Säulen 3 und 4 hingegen wurde NHS-aktivierte Sepharose in einen leeren Säulenkörper von GE Health Care gegeben. Es wurde stets derselbe Antikörper genutzt für die Säulen, allerdings war es immer eine andere Fraktion des selbst gereinigten Wi 11 3G9D5. Welche Fraktionen genutzt wurden sind dem Anhang 2 zu entnehmen. Im Gegensatz zu der ersten Säule, welche mit einer Lösung von 1 ml AK und 1 ml Bindungspuffer befüllt wurde, lag das Verdünnungsverhältnis der anderen Säulen bei 1:3 von Antikörper zu Bindungspuffer.

Tabelle 4: Entwickelte Antikörpersäulen

| Datum | 1. vom 17.4. | 2. vom 5.6. | 3. vom 27.6. | 4. vom 27.6. | 5. vom 16.7. |
|--------------|---|---|---|--------------------------|---|
| Hrst. Medium | Thermo Fisher AminoLink Plus Immobilization Kit | Thermo Fisher AminoLink Plus Immobilization Kit | Ge Health Care NHS-aktivierte Sepharose | NHS-aktivierte Sepharose | Thermo Fisher AminoLink Plus Immobilization Kit |
| Benutzt | 3 mal | 3 mal | 1 mal | 1 mal | 1 mal |

Anhand der Tabelle 5 ist zu erkennen, welche Säule mit welcher Probe bzw. Probenmenge belegt worden ist und wie oft sie jeweils benutzt wurde. Für die meisten Antikörpersäulen wurde Rotbarsch als Fischprobe verwendet, welcher zunächst nur für eine Stunde auf den Säulen durch Wippen inkubiert wurde. Im weiteren Verlauf wurde die Inkubationszeit auf „über Nacht“ ausgeweitet. Für die fünfte Säule wurde statt Rotbarsch Kabeljau eingesetzt und bei dem dritten Versuch der zweiten Säule (2.7.212) wurde diese mit Alaska Seelachs benetzt.

Tabelle 5: Verwendung der einzelnen Säulen

| 1. Säule | Versuch | Probe | Dauer der Probenaufgabe |
|----------|---------|---|-------------------------|
| 23.04. | 1 | mit Rotbarsch (c = 3,56 mg/ml) 1 ml Rb + 1 ml PBS | 1 h |
| 25.04. | 2 | mit Rotbarsch 0,75 ml Rb + 1,25 ml PBS | 1 h |
| 06.06. | 3 | mit Rotbarsch 1:10 Verdünnung | 1 h |
| 2. Säule | | | |
| 06.06. | 1 | mit Rotbarsch 1:10 Verdünnung | 1 h |
| 11.06. | 2 | mit Rotbarsch 1:10 Verdünnung | über Nacht |
| 02.07. | 3 | mit Alaska Seelachs (c = 1,71 mg/ml) 1:10 Verdünnung | über Nacht |
| 3. Säule | | | |
| 02.07. | 1 | mit Rotbarsch 1:10 Verdünnung | über Nacht |
| 4. Säule | | | |
| 02.07. | 1 | mit Rotbarsch 1:10 Verdünnung | über Nacht |
| 5. Säule | | | |
| 17.07. | 1 | mit Kabeljau (c = 2,05mg/ ml) 1:5 Verdünnung | über Nacht |

Die von den Säulen gewonnen Elutionen und Durchflüsse werden mit einem ELISA überprüft. Um die Elutionen mit Antikörperrückständen zu testen werden Indirekte ELISA-Tests durchgeführt, siehe Punkt 3.10. Die Elutionen, welche bestmöglich reines Fischparvalbumin enthalten und die Durchflüsse (möglichst ohne dieses Eiweiß) werden mittels des Sandwich-ELISA beurteilt.

3.2 Antikörperreinigung mit Konzentrationsbestimmung

Nach der in Punkt 2.2.2 beschriebenen Antikörperreinigung wurden die folgenden 4 Durchgänge (siehe Tabelle 6) vollzogen. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden anschließend in einem UV-Photometer bei 280 nm vermessen, die dazu gehörigen Extinktionen und berechneten Konzentrationen sind in der Anhang 2 zu finden (4). Die gewonnenen Fraktionen des Wi 11 3G9D5 wurden für alle ELISA-Versuche und die Entwicklung der Antikörpersäulen verwendet.

Tabelle 6: durchgeführte Antikörperreinigungen

| | 22.03.2012 | | | 02.04.2012 | | 21.05.2012 | | | 12.07.2012 | |
|------------------------------|------------|----|----|------------|-----|------------|-----|-----|------------|-----|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 1. | 2. | 3. | 1. | 2. |
| Durchgang | 3 | 3 | 5 | 3 | 4,5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 4 |
| Menge Reinst-wasser (ml) | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| Menge PBS 7,6 (ml) | 3,2 | 3 | 3 | 2,3 | 1,8 | 2,4 | 2,6 | 2,9 | 2,5 | 2,6 |
| Menge PBS 7,6 (ml) | 9,5 | 8 | 9 | 11 | 9,5 | 12 | 15 | 21 | 6,5 | 7 |
| Menge Essigsäure (ml) | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4,5 | 4,3 | 4 | 2,5 | 3 |
| Anzahl gewonnener Fraktionen | 8 | 8 | 6 | 6 | 6 | 9 | 8 | 8 | 5 | 6 |

Die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der ermittelten Geradengleichung der BSA-Standardkurve, dargestellt in Abbildung 14. Die zur Erstellung der Kurve benötigten Konzentrationen wurden wie im Punkt 2.2.3 beschrieben hergestellt und bei 280 nm gemessen (Tabelle 7). Mit Hilfe der Software Microsoft Excel konnte dann eine graphische Darstellung der Extinktionsmittelwerte entwickelt werden (4).

Tabelle 7: Daten zur Erstellung der BSA-Standardkurve

| Konzentration (mg/ ml) | 1. Wert | 2. Wert | 3. Wert | Mittelwert |
|------------------------|---------|---------|---------|------------|
| 0,25 | 0,0966 | 0,097 | 0,0972 | 0,0970 |
| 0,5 | 0,1644 | 0,1666 | 0,1668 | 0,1660 |
| 1,0 | 0,2194 | 0,2196 | 0,2192 | 0,2190 |
| 1,5 | 0,3085 | 0,3082 | 0,3082 | 0,3080 |
| 2,0 | 0,3792 | 0,3790 | 0,3788 | 0,3790 |
| 2,5 | 0,4251 | 0,4251 | 0,4258 | 0,4250 |

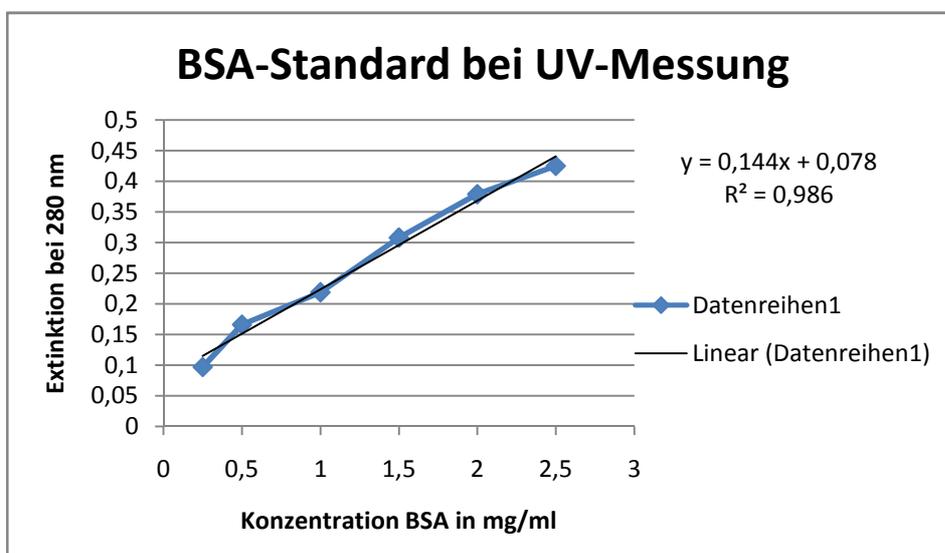


Abbildung 14: ermittelte BSA-Standardkurve

3.3 ELISA-Versuch 1: Vergleich verschieden gereinigter Antikörper

Bevor die Antikörpersäulen gebaut werden konnten, wurde zunächst ein Sandwich-ELISA durchgeführt mit selbst gereinigten Antikörpern und Antikörpern die als gereinigte gekauft wurden, die als primäre monoklonale speziesmultireaktive Antikörper dienen. Dies geschah um zu prüfen, inwieweit die Proteinkonzentration der selbst gereinigten Antikörper mit denen der gekauft gereinigten übereinstimmt. Bei beiden handelt es sich um den Typen Wi 11 3G9D5 von der Firma Biometec GmbH. In verschiedenen vorher durchgeführten Arbeiten wurde das passende Gegenstück zu dem oben genannten primären Antikörper gefunden. Somit bildet der Wi 11 3G9D5 zusammen mit dem Wi 11 1G3G11 ein gutes Antikörperpaar. Dieser sekundäre AK wurde bereits mit Meerrettichperoxidase gelabelt. Da die Fraktion 3 die höchste Proteinkonzentration aufweist, wird sie für alle Versuche herangezogen. Als Blockmittel wurde für diesen ersten Versuch eine 1%ige Milchpulverlösung verwendet. Für die erste Säule wird Rotbarsch als Fischprobe eingesetzt, daher wird für die ersten ELISA-Versuche ausschließlich Rotbarsch als Antigen in den entsprechenden Verdünnungen genutzt. Die Abbildung 15 zeigt die graphische Darstellung des Vergleichs der zwei Antikörper anhand der gemessenen Extinktionswerte bei 450 nm.

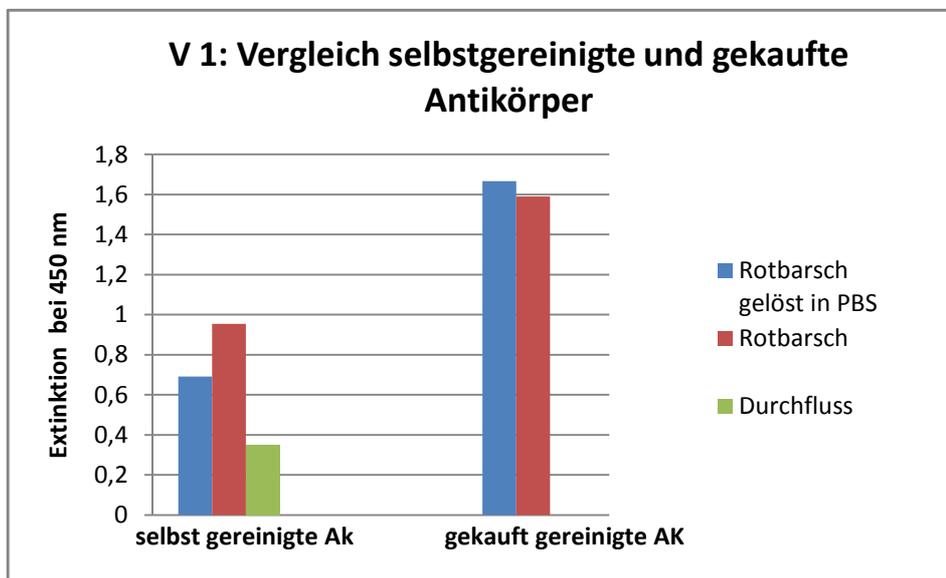


Abbildung 15: Vergleich selbstgereinigte und gekaufte AK's

Die dargestellten Ergebnisse in der Graphik machen deutlich, dass die Extinktionen der Wells mit gekauft gereinigten Antikörpern höher liegen als bei den selbst gereinigten Antikörpern. Die Differenz liegt bei ca. 0,7. Obwohl die gekauft gereinigten Antikörper besser wären, werden für die Entwicklung der Säulen selbst zu reinigende Antikörper verwendet und zwar aufgrund der Tatsache, dass diese schneller verfügbar sind.

Desweiteren wurde getestet ob ein Unterschied deutlich wird, wenn zum einen nur die reine Rotbarschprobe (Konz.: 3,56 mg/ml) oder der Rotbarsch verdünnt mit PBS im Verhältnis 1:2 auf die Platte gegeben wird. Aber anhand der Graphik lässt sich erkennen, dass es in Abhängigkeit von der Art der Reinigung der Antikörper zu unterschiedlichen Ergebnissen kommt.

Die getesteten Rotbarschproben dienen als Ausgangsprobe für die erste Säule. Um zu überprüfen ob der Rotbarsch an die Säule gebunden hat, wurde der eluierte Durchfluss als Antigen für den Sandwich-ELISA verwendet. Im Verhältnis zur Proteinkonzentration der Rotbarschprobe ist der Wert des Durchflusses geringer, wodurch darauf zu schließen ist, dass Parvalbumin an die erste Säule gebunden haben könnte.

3.4 ELISA-Versuch 2: Vergleich von Blockmitteln

Mit Hilfe des zweiten Versuches des Sandwich-ELISA wurde die Funktionalität zweier Blockmittel getestet, zum einen eine Milchpulver-Lösung und zum anderen eine BSA-Lösung. Als Antigene wurden dafür verschiedene Elutionen vom Rotbarsch der ersten entwickelten Säule vom 17.4.12 verwendet. Es werden auch hier die gleichen Antikörper genutzt wie im ersten Versuch. Der Vergleich der Blockmittel ist in Abbildung 16 dargestellt.

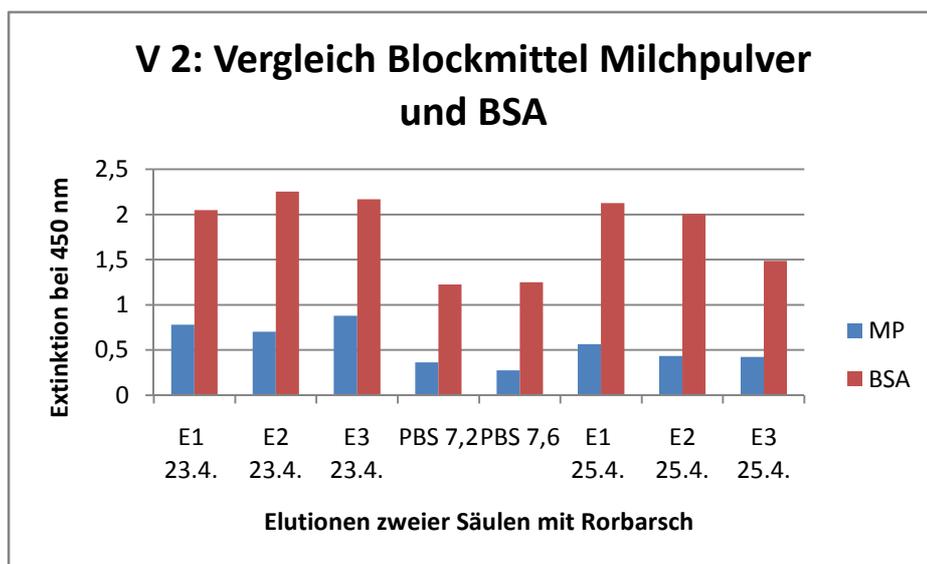


Abbildung 16: Vergleich Blockmittel Milchpulver und BSA

Anhand der Graphik wird deutlich, dass die Extinktionswerte bei den Elutionen, die mit der BSA-Lösung geblockt wurden, deutlich höher liegen (1,5 -2,2). Aufgrund der viel geringeren Werte bei dem Milchpulver (0,4-0,8) wird dies ausschließlich für den Blockschritt bei dem jeweiligen ELISA eingesetzt. Das gleiche gilt für die zwei PBS-Puffer die als Negativprobe eingesetzt wurden. Diese beiden Puffer unterscheiden sich minimal in ihrem pH-Wert von 7,2 und 7,6. Es wurden beide in diesem ELISA-Versuch getestet, da der PBS 7,6 für die ELISA-Versuche verwendet werden, während der PBS mit einem pH-Wert von 7,2 für die Probenaufgabe bei den Antikörpersäulen genutzt wird.

3.5 ELISA-Versuch 3: Verdünnungsreihe Rotbarsch

Die mit Hilfe von 0,25 M Essigsäure von der Säule gewonnenen Elutionen vom Rotbarsch werden alle auf ihre Proteinkonzentration mittels des Sandwich-ELISA überprüft. Um dafür einen Vergleichswert zu haben, wird zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt und gemessen. Dabei wird die Ausgangsprobe mit einer Konzentration von 3,56 mg/ml auf 1:10 und 1:100 mit PBS verdünnt. Die Ergebnisse dazu zeigt die Abbildung 17.

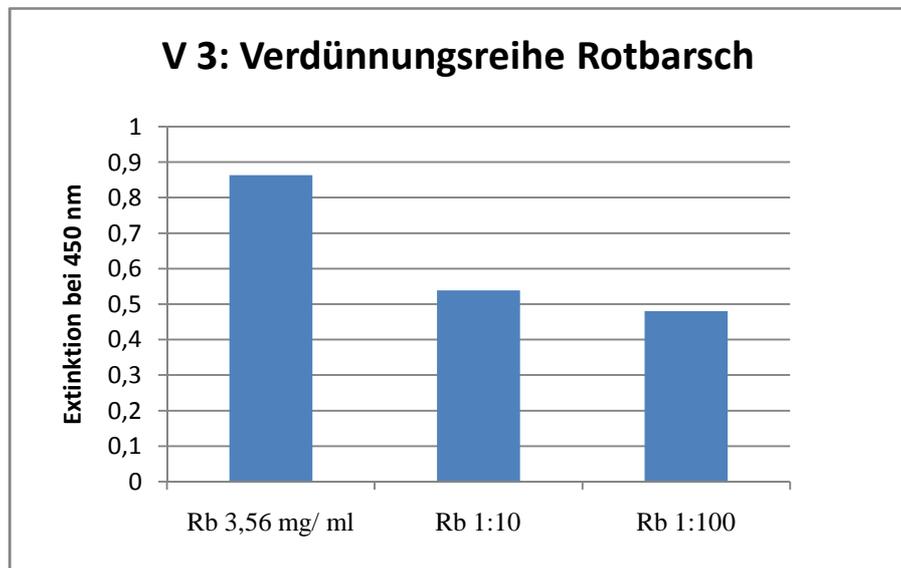


Abbildung 17: Verdünnungsreihe Rotbarsch

3.6 Versuch 4: Vergleich Rotbarsch- Elutionen zweier Säulen

Für diesen Versuch wurden die Elutionen der ersten zwei hergestellten Säulen benutzt. Während die Säule 2 vom 5.06.12 hier zum ersten Mal verwendet wurde, ist die erste Säule (17.4.12) bereits zum dritten Mal eingesetzt worden. Überprüft wird somit die Proteinkonzentrationen der Rotbarsch-Elutionen und der zwei Durchflüsse nach der Probenaufgabe auf die Säule. Der Rotbarsch wurde bei diesem Versuch für nur eine Stunde auf der jeweiligen Säulen inkubiert.

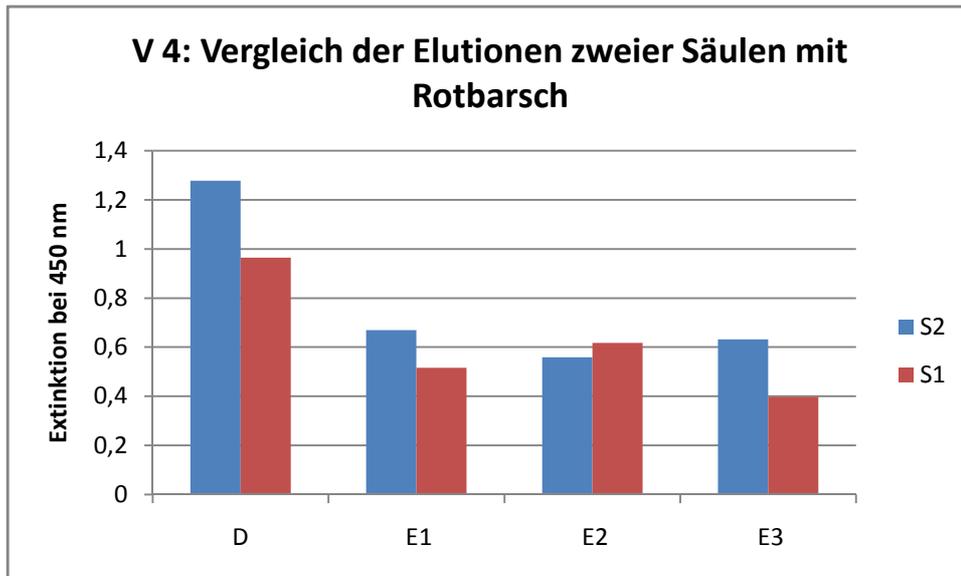


Abbildung 18: Vergleich Rotbarsch-Elutionen zweier Säulen

Die auf der Mikrotiterplatte mitgeführte Rotbarschprobe in einer Verdünnung von 1:10 in PBS brachte einen Extinktionswert von ca. 0,67 hervor. Anhand der Abbildung 18 lässt sich gut erkennen, dass die Werte für die zwei Durchflüsse deutlich höher liegen (0,9 und 1,3). Der höhere Wert von dem Durchfluss der Säule 2 lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die zwei zuvor durchgeführten Probenaufgaben zurück führen, wo demnach nicht das gesamte Fischparvalbumin eluiert wurde und Rückstände in der Säule zurück geblieben sind. Mit Ausnahme der Elution 2 liegen alle Extinktionen für die Säule 1 tiefer als bei der zweiten Säule. Generell lässt sich beobachten, dass die Elutionen eine geringere Proteinkonzentration aufweisen als die Durchflüsse. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich das Parvalbumin hauptsächlich in den Durchflüssen befinden. Diese Aussage wird später in einem SDS-Page überprüft (siehe Punkt 3.12).

3.7 Versuch 5: Antikörpersäule vom 5.6.12 mit Rotbarsch

Erneut wurde Rotbarsch verwendet um die Säule vom 5.6.12 zum zweiten Mal zu benutzen. Auch hier wurde eine 1:10 Verdünnung eingesetzt, die allerdings über Nacht auf der Säule durch Wippen inkubiert wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

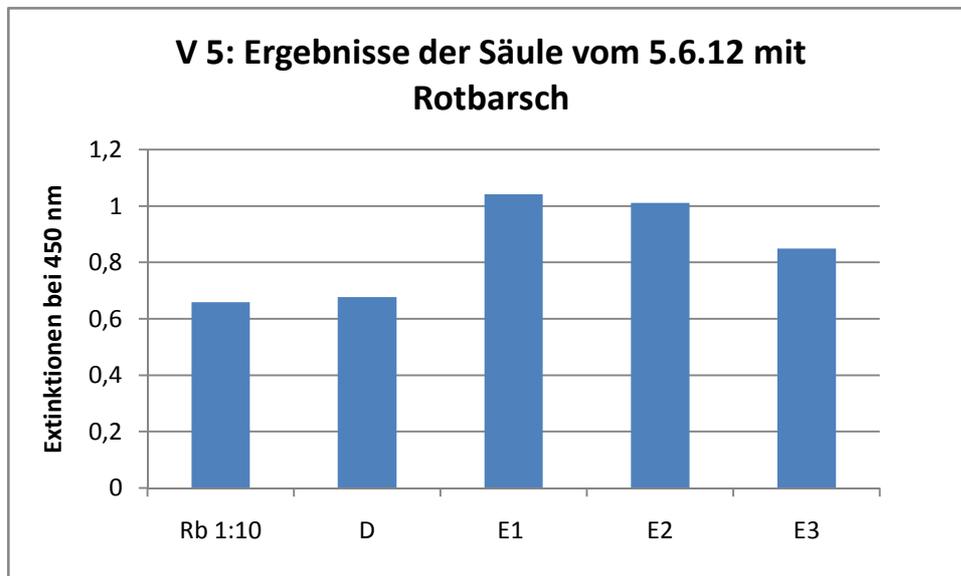


Abbildung 19: Ergebnisse Säule 2 mit Rotbarsch

Der Graphik ist zu entnehmen, dass die Extinktionen von der Ausgangsprobe vom Rotbarsch (1:10) und des Durchflusses nahezu gleich sind und bei ca. 0,7 liegen. Demnach dürfte an sich kein Parvalbumin an die Säule gebunden haben, aber dennoch sind höhere Werte für die Elutionen zu beobachten, welche der Reihe nach etwas geringer werden.

3.8 Versuch 6: Überprüfung von drei Säulen mit Rotbarsch und Alaska Seelachs

Für diesen Versuch wurden gleich zwei Mikrotiterplatten benetzt, um zum einen die Elutionen von drei verschiedenen Säulen zu testen und zum anderen eine Verdünnungsreihe von dem Alaska Seelachs zu messen. Dabei wurden die Säulen 3 (S2) und 4 (S1) vom 27.06.12 zum ersten Mal genutzt. Auch für diese beiden Säulen wurde Rotbarsch als Fischprobe verwendet und über Nacht auf der Säule gewippt. Die dritte Säule in diesem Versuch ist die als zweites hergestellte Säule vom 5.6., allerdings wurde hier Alaska Seelachs als Probe benutzt. Die Inkubationszeit war auch über Nacht. Die Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse graphisch dar.

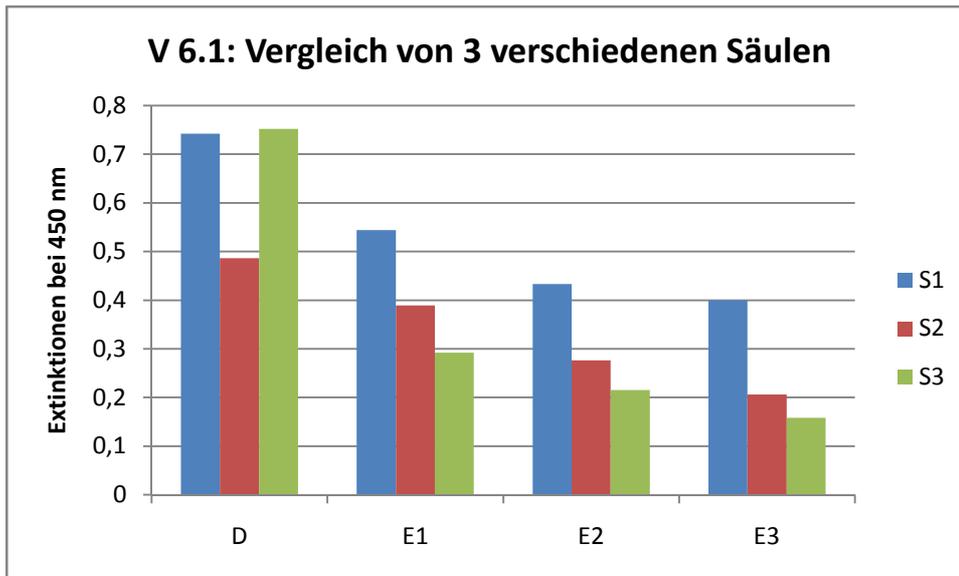


Abbildung 20: Vergleich von 3 verschiedenen Säulen

Es ist gut zu erkennen, dass die Werte der Durchflüsse höher liegen bei allen drei Säulen als die Werte der Elutionen. Darüberhinaus wird deutlich, dass die hier als S1 bezeichnete Säule die höchsten Extinktionen aufweist. Der Wert von ca. 0,54 bei Elution 1 dieser Säule entspricht im Vergleich zu der Verdünnungsreihe vom Rotbarsch (siehe Punkt 3.4) dem Wert der 1:10 Verdünnung. Um die Werte der Säule 3 (mit Alaska Seelachs als Probe) besser einordnen zu können wurden sie mit den Ergebnissen der Abbildung 21 verglichen.

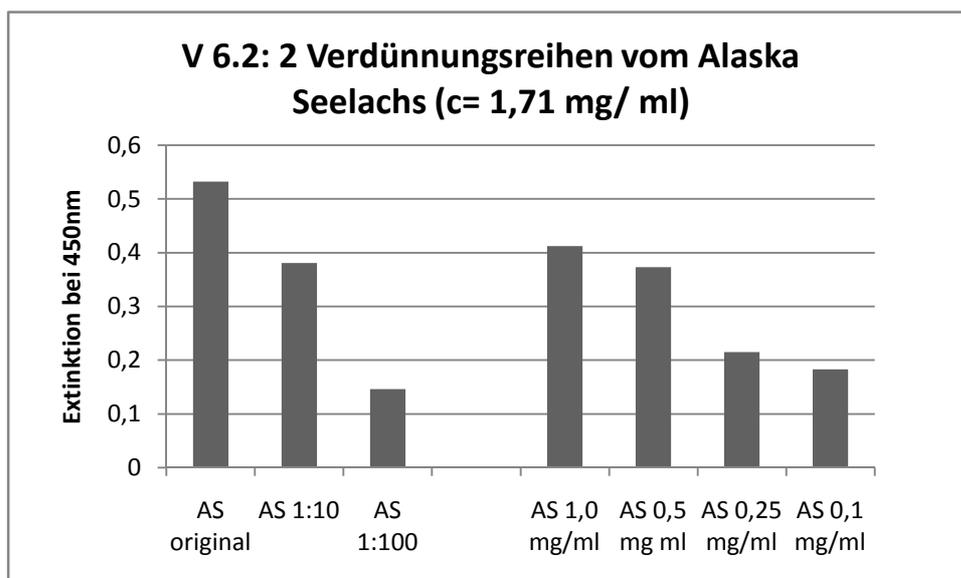


Abbildung 21: Verdünnungsreihe Alaska Seelachs

Der Durchfluss der Säule 3 ist mit einem Extinktionswert von über 0,7 höher als die gemessene Proteinkonzentration der Ausgangsprobe von dem Seelachs mit nur 0,52. Jedoch liegen die Werte für die drei Elutionen unterhalb des Wertes für die 1:10 Verdünnung, welche auch als Probe für die Säule genutzt wurde.

3.9 Versuch 7: Neue Säule mit Kabeljau

Diesem letzten Sandwich-ELISA ist die Herstellung der fünften Säule vom 16.7.12 vorausgegangen. Als Probe wurde dafür Kabeljau in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt, welche über Nacht auf der Säule inkubiert wurde. In der Abbildung 22 sind sowohl der Durchfluss und die drei Elutionen von der Säule mit Kabeljau dargestellt, als auch zwei Verdünnungsreihen zum Vergleich.

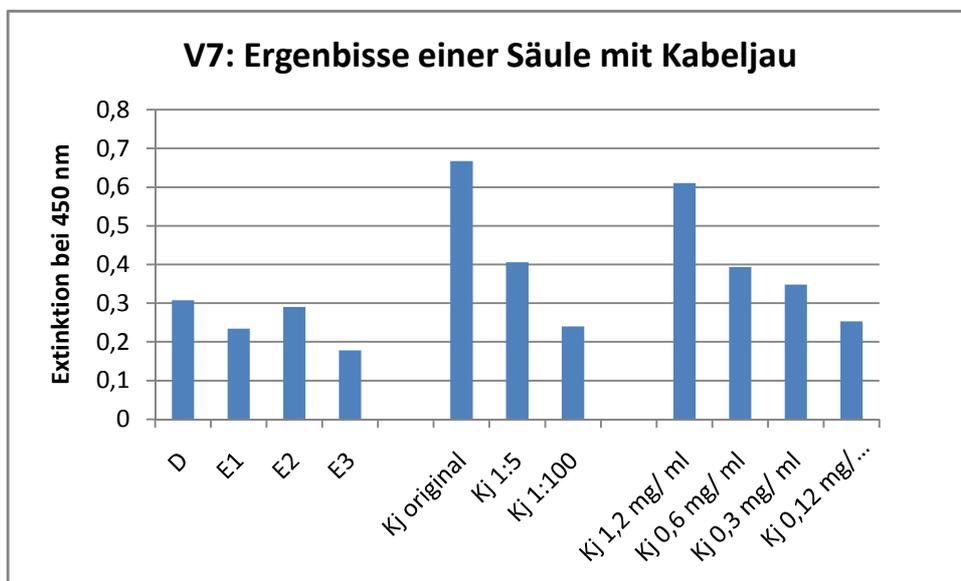


Abbildung 22: Säule mit Kabeljau als Fischprobe

Allgemein wird deutlich, dass für den Durchfluss und die Elutionen vom Kabeljau nur sehr geringe Werte gemessen wurden, welche maximal 0,3 betragen. Werden diese Ergebnisse im Verhältnis zu den Verdünnungsreihen betrachtet, entspricht das in etwa der 1:100 Verdünnung, wobei der Ausgangswert des Kabeljaus bei einer Proteinkonzentration von 2,05 mg/ml liegt.

3.10 Indirekter ELISA 1: Überprüfung verschiedener Durchflüsse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den vielen Sandwich-ELISA auch noch zwei Indirekte ELISA durchgeführt, um die Durchflüsse mit möglichen Antikörperrückständen zu testen. Dabei wird die Mikrotiterplatte mit einer Rotbarschlösung (Konzentration: 1 mg/ml) über Nacht benetzt. Als Antikörper werden die antikörperhaltigen Durchflüsse verschiedener Säulen verwendet. Damit es zu der späteren Substratreaktion kommen kann, muss ein mit Meerrettichperoxidase versetztes Enzym benutzt werden, in diesem Fall eine Maus IgG POD. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 23 dargestellt.

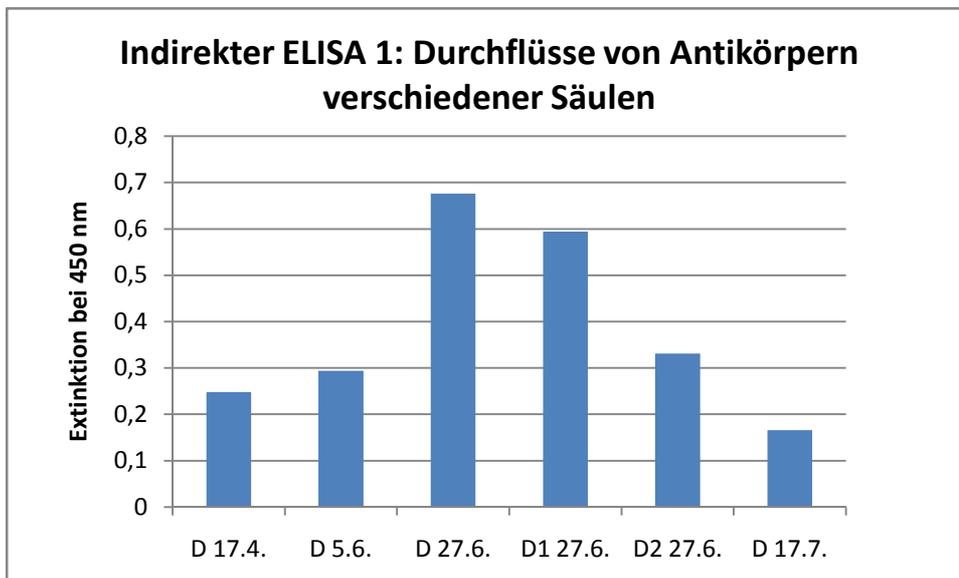


Abbildung 23: Indirekter ELISA 1-Test antikörperhaltige Durchflüsse

Anhand der Graphik ist zu erkennen, dass die Durchflüssen der Säulen vom 27.6. deutlich höhere Extinktionswerte aufweisen gegenüber den anderen Durchflüssen. Daher ist davon auszugehen, dass vermutlich alle Antikörper wieder beim Waschen entfernt worden sind und somit nicht gebunden haben. Allerdings könnten bei den Säulen vom 17.4. und 17.7. Antikörper an die Säule gebunden haben, da geringere Extinktionen gemessen wurden.

3.11 Indirekter ELISA 2: Rückgewinnung von Antikörpern von zwei Säulen

Da bei den Säulen vom 17.4. und 17.7. geringe Extinktionswerte ermittelt wurden (siehe Punkt 3.10), wurden diese ausgewählt um die eventuell gebunden Antikörper wieder von der Säule mit Hilfe von 0,25 M Essigsäure zu entfernen. Dazu wurde auch hier zunächst Rotbarsch als Antigen über Nacht an die Platte gebunden. Die gewonnenen antikörperhaltigen Fraktionen dienen als Antikörper, gefolgt von der Maus IgG POD. Die Ergebnisse dazu zeigt die Abbildung 24.

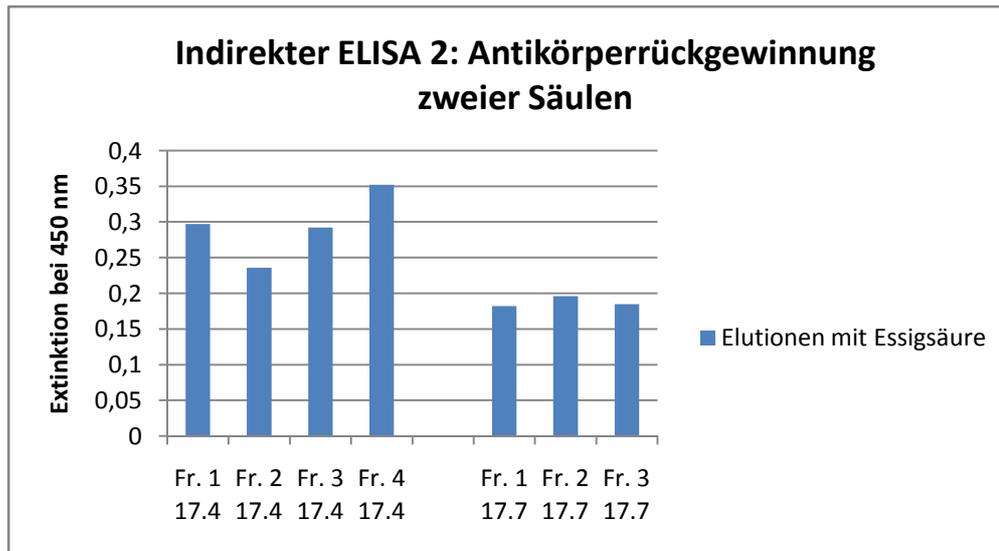


Abbildung 24: Indirekter ELISA 2- Rückgewinnung Antikörper

Generell wird anhand der Graphik deutlich, dass die Extinktionswerte aller Fraktionen gering sind, mit einem Maximalwert von 0,35. Es zeigt sich somit jedoch, dass vermutlich Antikörper mit Hilfe der Essigsäure von der Säule gelöst werden konnten.

3.12 SDS-Page

Im Folgenden wurden zwei SDS-Pages durchgeführt, um die von den Säulen erhaltenen Durchflüsse und Elutionen auf die Proteingrößen ihrer Bestandteile zu testen. In dem Sinne wird also das Vorhandensein von Fischparvalbumin (Größe:12 kDa) in den Proben überprüft. Zusätzlich zu den eben genannten Proben, werden auf der rechten und linken Seite der Gele teilweise verschiedene Marker mitgeführt. Diese dienen zur Orientierung und je nach Markertyp ist ein unterschiedliches Größenspektrum gegeben, von 200 bis 1,06 kDa die genaue Einteilung ist der Tabelle in Anhang 1 zu entnehmen. In der Abbildung 25 sind die zwei Gele des ersten Versuches dargestellt. Die Kammern der Gele sind nummeriert und anhand der unter den Abbildungen stehenden Legenden können die einzelnen Proben zugeordnet werden.

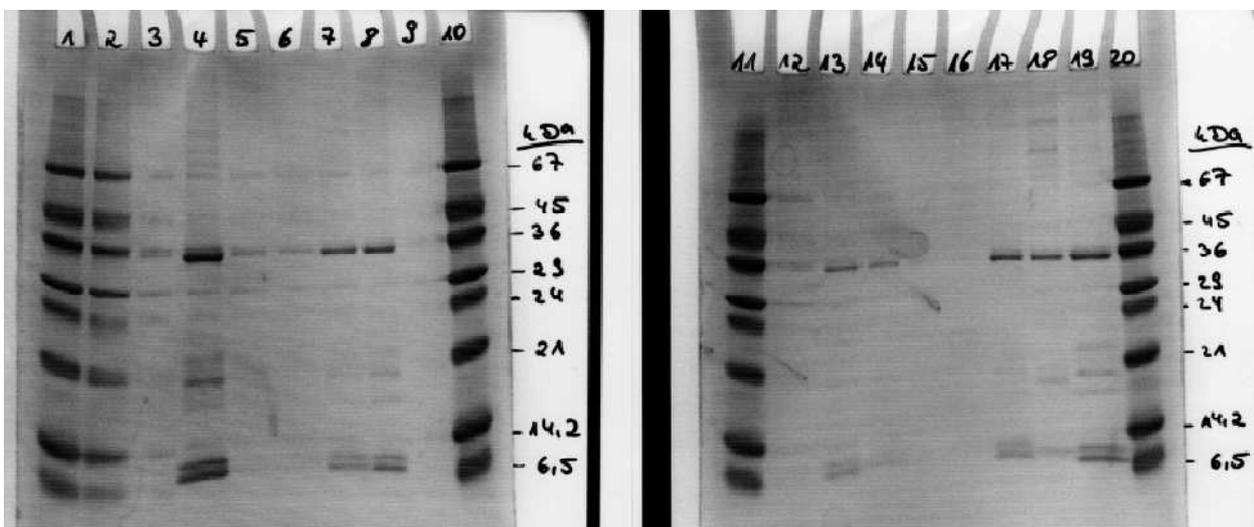


Abbildung 25: SDS-Page Versuch 1

| | | | | | |
|---|---------------------------|----|---------------------------|----|------------|
| 1 | Marker | 8 | Durchfluss Säule 2 (6.6.) | 15 | S2 E1 3.7. |
| 2 | Marker | 9 | Elution 1 11.6. | 16 | S3 E1 3.7. |
| 3 | Elution 1 (23.4) | 10 | Marker | 17 | D S1 3.7 |
| 4 | Durchfluss (25.4.) | 11 | Marker | 18 | D S3 3.7. |
| 5 | Elution 1 Säule 1 (6.6.) | 12 | E2 11.6. | 19 | RB 1:10 |
| 6 | Elution 1 Säule 2 (6.6.) | 13 | D 11.6. | 20 | Marker |
| 7 | Durchfluss Säule 1 (6.6.) | 14 | S1 E2 3.7. | | |

Angesichts dieser Abbildung wird deutlich, dass es farbliche Markierungen in dem Bereich zwischen 14,2 und 6,5 kDa gibt. Allerdings handelt sich bei diesen Proben nicht, wie gehofft, um die einzelnen Elutionen, sondern um die Durchflüsse (Kammern: 4, 7, 8, 13, 17, 18) und die in Kammer 19 enthaltene Rotbarschlösung (Verdünnung 1:10). Somit wurde nur hier das Parvalbumin nachgewiesen und nicht in den Elutionen.

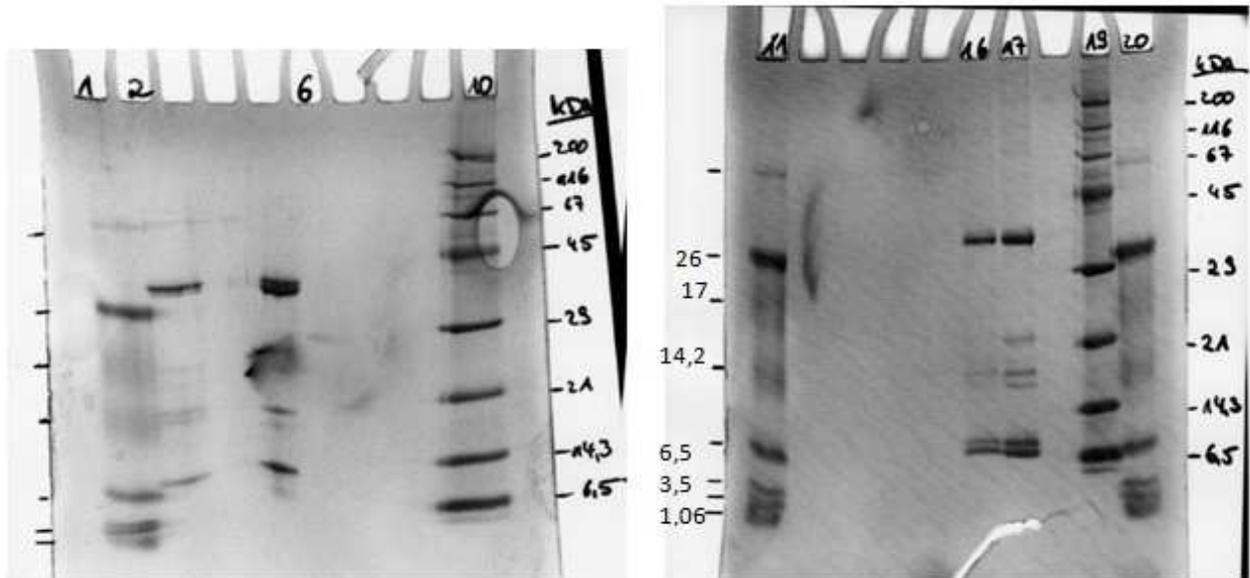


Abbildung 26: SDS-Page Versuch 2

| | | | | | |
|---|----------|----|------------|----|------------|
| 1 | Marker | 8 | S1 E2 6.6. | 15 | S3 E2 3.7. |
| 2 | D Kj | 9 | S2 E2 6.6. | 16 | S2 D 3.7. |
| 3 | E1 Kj | 10 | Marker | 17 | Rb 1:10 |
| 4 | E2 Kj | 11 | Marker | 18 | PBS 7,2 |
| 5 | E3 Kj | 12 | E3 11.6. | 19 | Marker |
| 6 | Kj 1:5 | 13 | S1 E1 3.7. | 20 | Marker |
| 7 | E2 23.4. | 14 | S2 E2 3.7. | | |

Für diesen zweiten SDS-Page wurden andere Proben verwendet, als für den ersten Versuch. Jedoch handelt es sich auch um verschiedene Durchflüsse, Elutionen und zwei Fischproben. Die Abbildung 26 bestätigt das im ersten Versuch erhaltene Ergebnis, denn auch hier tritt eine Färbung in dem gewünschten Bereich nur bei den Durchflüssen in den Kammern 2 und 16 auf, sowie bei der 1:5 Verdünnung vom Kabeljau (Kammer 6) und der 1:10 Verdünnung vom Rotbarsch (Kammer 17).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Masterthesis ist die Entwicklung von Antikörpersäulen zum Nachweis von Fischparvalbumin. Es ist hervorzuheben, dass es sich um Parvalbumin verschiedener Fischarten handelt, da dieses Protein auch in Fröschen, Reptilien und beim Menschen vorkommt [35].

Für die Herstellung der Säulen wird nur ein Antikörper benötigt. Es wurde dafür der Wi 11 3G9D5 verwendet. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen speziesmultireaktiven Antikörper, der laut Hersteller mit verschiedenen Fischarten, wie Rotbarsch, Kaeljau, Hering oder Alaska Seelachs, sehr gut reagiert. Zu der Durchführung der einzelnen Sandwich-ELISA wird nicht nur ein einziger Antikörper, sondern ein Antikörper-Paar gebraucht. Ein gutes Paar wurde bereits in Versuchen früherer Arbeiten gefunden. Somit werden auch für diese Arbeit der Wi 11 3G9D5 als primärer AK und der Wi 11 1G3G11 als POD-gelabelter sekundärer AK verwendet. Zu Beginn wird das gelieferte Antikörper-Rohmaterial über eine HiTrap Protein G Säule gereinigt. Solch eine Säule ist mehrmals verwendbar, je nach dem wie schnell diese „verstopft“. Da es sich jedoch um Rohmaterial der Antikörper handelt, sollte es über einen Filter auf die Säule gegeben werden. Insgesamt werden relativ viele Fraktionen pro Reinigungsdurchgang gewonnen, daher werden davon nur die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen verwendet. Um diese Konzentration zu bestimmen, werden die einzelnen Fraktionen mittels eines Photometers bei 280 nm gemessen. Es wird diese Wellenlänge für die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung gewählt, da hier die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin erfolgt [39]. Aufgrund der verschiedenen Aminosäurezusammensetzungen einzelner Antikörper kommen die variierenden Extinktionswerte zu Stande [40, 41]. Das UV-Photometer Specord S100 arbeitet zwischenzeitlich nicht sachgemäß, wodurch schwankende Werte auftraten. Daher wurde zum Vergleich ein 2-Kanal-Photometer mit Glasküvetten eingesetzt. Jedoch erwies sich dieses Photometer als ungünstig, da die Glasküvetten ein Volumen von 1 ml je Probe verlangen, was bei den geringen Mengen an Antikörper nicht gegeben ist. Somit wurde zur Erstellung der BSA-Standardkurve doch das erste UV-Photometer heran gezogen. Mit der aus der Kurve resultierenden Regressionsgeraden werden die Proteinkonzentrationen aus den Extinktionen der einzelnen Fraktionen berechnet. Es wurden lediglich die Antikörperfraktionen von dem Wi 11 3G9D5 photometrisch bestimmt, denn der Wi 11 1G3G11 wurde bereits in einer vorherigen Arbeit POD-gelabelt und gemessen. Bevor es zur der eigentlichen Herstellung der Antikörpersäulen kommt, wurde zunächst festgelegt welche Fischarten als Probe zur Gewinnung

des enthaltenen Parvalbumins eingesetzt werden. die Entscheidung fiel auf Rotbarsch als erste Probe. Daher wurde davon eine Standardverdünnungsreihe angefertigt und mittels eines Sandwich-ELISA gemessen. Diese Proteinkonzentrationen dienen zum Vergleich mit den Werten der Elutionen, die nach der Elution des Parvalbumins mit Glycin-HCl gewonnen wurden. Gleichzeitig wurde dabei getestet ob Milchpulver wirklich besser geeignet ist als Rinderserumalbumin (BSA) zum Blocken der freien Bindungsstellen in den Wells. Anhand der Abbildung 16 (siehe Punkt 3.4) wird deutlich, dass eine 1 %ige Milchpulverlösung bessere Ergebnisse liefert für das Blocken in Verbindung mit diesen Antikörpern und der Fischprobe. Während sich in früheren Arbeiten BSA, z.B. bei Schimmelpilzen, als geeigneter erwiesen hat [20]. Die Antigene sollen sich bei einem Sandwich-ELISA nur an die spezifischen Bindungsstellen koppeln und somit eine Komplexbildung eingehen, dies wird durch das Blocken bewirkt. Darüberhinaus kann so vermieden werden, dass es zu einer Bindung von Störsubstanzen an die Oberfläche kommt [42].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Säulen hergestellt. Die Säule 1, 2 und 5 sind von Thermo Scientific gekaufte Säulen, die mit Agarosebeads versetzt sind. Nach dem die Antikörper an die Säule gebunden wurden, wurde auf die erste Säule eine Rotbarsch-PBS-Lösung im Verhältnis 1:2 gegeben. Dabei handelt sich um eine recht hohe Konzentration, da der Ausgangswert der Rotbarschprobe bei 3,56 mg/ml liegt. Somit bestand die Gefahr, dass die Säule gleich zu Beginn mit dieser Probe überladen ist. Daher wurden die nachfolgenden Probenaufgaben in einer geringeren Verdünnung von 1:10 durchgeführt. Bereits mit diesem ersten Versuch könnte auf eine erfolgreiche Bindung des Parvalbumins aus der Rotbarschlösung an die Säule geschlossen werden. Denn der gemessene Extinktionswert für den Durchfluss (0,378) ist deutlich niedriger als der der Ausgangsprobe mit 0,691. Dennoch hat somit nur ein Teil des Fischparvalbumins gebunden, was aber auf die Menge an Antikörpern in der Säule zurückzuführen sein kann. Da die stationäre Phase eventuell nicht ausreichend dicht mit den Antikörpern besetzt war, wie es eigentlich sein sollte [43]. Die erfolgreiche Bindung und spätere Elution des Fischproteins konnte jedoch nicht mittels eines später durchgeführten SDS-Page nachgewiesen werden, da es zuvor zu einer Kontamination und somit zum Schimmelpilzbefall in der Probe kam. Bei der wiederholten Probenaufgabe der ersten Säule fällt auf, dass die im Sandwich-ELISA ermittelten Werte oft höher sind als die des Durchflusses. Darüberhinaus sind selbst die Werte für den Durchfluss höher als die Werte der Fischausgangsprobe. Eine mögliche Schlussfolgerung dafür ist, dass bei der vorausgegangen Elution nicht das gesamte Protein eluiert wurde und erst jetzt die Säule mit verlässt. Somit würde die Elutionsrate über 100% liegen bei wiederholter Probenaufgabe. Für die Elution wurde bei dieser Arbeit 0,2M Glycine-HCl

(pH= 2,9) benutzt, laut einem Artikel von Jane Chuang erreicht man mit einer 0,05 M Glycine gerademal eine Elutionsrate von ca. 30%. Bei der Verwendung von 70%igem Ethanol hingegen als Elutionsmittel lassen sich 85 bis 102% des Proteins zurückgewinnen [44]. Bei der zweiten entwickelten Säule (vom 5.06.) wurde getestet wie sich eine längere Inkubationszeit der Fischprobe in der Säule auf die Extinktionen auswirken. Zunächst wurde die Probe nur eine Stunde in der Säule geschüttelt, dabei wurden im Sandwich-ELISA Werte um 0,5 gemessen. Bei dem zweiten Versuch über Nacht wurden deutlich höhere Werte von ca. 0,95 erlangt, somit wurden bei alle weiteren Versuchen die Fischproben jeweils über Nacht über Kopf geschüttelt. Für die fünfte Säule wurde Kabeljau als Fischprobe eingesetzt, dabei war zu beobachten, dass sowohl der Wert für den Durchfluss als auch für die Elutionen unterhalb des Wertes der Ausgangsprobe liegt. Dies ist zwar positiv, dennoch sind diese Werte deutlich niedriger als für sämtliche Elutionen der Rotbarschproben. Daraus lässt sich schließen, dass der benutzte Antikörper Wi 11 3G9D5 doch besser mit Rotbarsch reagiert als mit Kabeljau. Um die Säulen drei und vier herzustellen wurden leere Säulen auf unterschiedliche Weise mit NHS-aktivierter Sepharose gefüllt. Bei der 3. Säule wurde nach der Anleitung von GE Health Care gearbeitet, die besagt, dass die Sepharose zunächst separat gewaschen und mit den Antikörpern in einem Glasgefäß gekoppelt wird. Erst nach einer Inkubation über Nacht soll das Gemisch auf die Säule über eine Pumpe gegeben werden. Jedoch wurde aufgrund der geringen Menge an Antikörper-Sepharose-Lösung, das Gemisch direkt in die Säule gegeben und über Nacht über Kopf geschüttelt. Für die 4. Säule erfolgte hingegen die Kopplung der Sepharose und des Antikörpers direkt in der Säule. Anhand der durch einen Sandwich-ELISA ermittelten Werte für die Proteinkonzentrationen der Elutionen beider Säulen lässt sich erkennen, dass für die Säule 4 höhere Werte vorliegen. Ausgehend von dieser Tatsache könnte geschlussfolgert werden, dass das Prozedere der Säule 4 besser geeignet ist. Doch auf der anderen Seite ist die Differenz zwischen dem Ausgangswert der Fischprobe und dem Durchfluss größer bei der Säule 3, was auf eine möglich höhere Bindung des Parvalbumins an die Antikörper schließen könnte. Desweiteren muss bei der NHS-aktivierten Sepharose in Betracht gezogen werden, dass diese eventuell doch zu alt gewesen ist und so etwas an Wirkung verloren haben könnte. Denn die Sepharose stammt aus dem Jahr 2007, war aber noch komplett verschlossen bis zum jetzigen Gebrauch. Auch die Größe der verwendeten leeren Säule könnte zu den nicht zufriedenstellenden Ergebnissen beigetragen haben. Denn für die Säulen 3 und 4 wurden leere Säule der Firma GE Health Care verwendet, die ein Volumen von 10 ml besitzen. Bei einer ähnlichen Anleitung von Thermo Scientific im Bezug auf NHS-aktivierte Agarose werden auf Spin-Säulen mit einem Volumen von 2 ml verwiesen [45]. Allgemein ist kein großer

Unterschied zwischen den Werten der Säulen von Thermo Fischer und der mit NHS-aktivierten Sepharose zu erkennen. Dennoch und zwar aufgrund der besseren Unterschiede zwischen der Fischausgangprobe und den Durchflüssen, wie bei der Säule 1 und 5, scheinen die aus dem AminoLink Plus Immobilisierung-Kit stammenden Säulen etwas besser geeignet zu sein zur Entwicklung von Antikörpersäulen.

Um die Wirksamkeit der hergestellten Säulen weiter zu überprüfen, wurden neben 2 SDS-Pages, auch Indirekte ELISA durchgeführt. Mittels eines indirekten ELISA wurde die Bindung der Antikörper an die Säule getestet, in dem die zurückbehaltenen Durchflüsse mit möglichen Antikörperrückständen verwendet wurden. Aufgrund der relativ hohen Extinktionswerte kann davon ausgegangen werden, dass die Antikörper an sich schon kaum an die Säule gebunden haben. Grund dafür könnten Verunreinigungen sein, die trotz der vorher durchgeführten Antikörperreinigung aufgetreten sind. Denn Proteine sind empfindlich gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen [43], daher muss auf eine hohe Reinheit der Bindungspartner geachtet werden. Jedoch wurde bei zwei Säulen versucht die eventuell geringe Menge an gebundenen Antikörpern wieder von der Säule mit 0,25M Essigsäure zu lösen. Trotz der so im letzten ELISA-Versuch ermittelten geringen Werte, wird somit deutlich, dass zumindest geringe Mengen an Antikörpern an die Säule gebunden haben, die nun eluiert wurden.

Mit Hilfe der SDS-Pages wird geprüft ob wirklich Parvalbumin in den gewonnenen Elutionen der einzelnen Proben enthalten ist. Darüberhinaus werden auch die Durchflüsse und reine Fischproben getestet. Anhand der Abbildungen im Punkt 3.12 ist ganz deutlich zu erkennen, dass das Fischparvalbumin mit einer Größe von ca. 12 kDa nur in den Durchflüssen und Fischproben enthalten ist. Dies ist gut zu beobachten, obwohl es während der Probenwanderung im Gel bei dem zweiten Versuch zu einer Verschiebung der Banden kam. Somit ist eindeutig bestätigt, dass das Fischprotein nicht an die Säule gebunden hat und es somit nicht gelungen ist eine funktionsfähige Antikörpersäule für die Gewinnung von reinen Parvalbumin zu entwickeln.

Um dennoch dieses Ziel zu erreichen sollten weitere Möglichkeiten zur Immobilisierung der Antikörper in Betracht gezogen werden. Neben weiteren Agarose- und Sepharoseverbindungen, könnten auch Aptamere, Molecularly imprinted Polymers (MIP) oder Magnetbeads genutzt werden.

Aptamere sind kurze einzelsträngige DNS- und RNS- Oligonukleotide, die ähnlich stark wie Antikörper an die Zielmoleküle binden können. Dabei weisen sie eine starke Spezifität und Affinität, sowie chemische Stabilität aufgrund ihrer einzigartigen Tertiärstruktur auf. Seit 1990 wird schon mit Aptameren gearbeitet um unterschiedliche Zielstrukturen, wie Proteine oder kleine organische Moleküle, zu erkennen [46, 47, 48].

Bei den Molekular geprägten Polymeren (MIP) handelt es sich um Polymere, die durch das sogenannte Molecular Imprinting so verändert werden, dass sie als Antikörperersatz angesehen werden können. Diese Polymere besitzen eine hohe Stabilität gegen mechanischen Stress, hohe Drücke und Temperaturen, desweiteren sind sie relativ tolerant gegen eine Behandlung mit Säuren und Basen. Allerdings ist die Kapazität und Affinität von einigen MIP's geringer als bei vergleichbaren Antikörpersäulen [49, 50].

Magnetbeads oder Magnetische Beads werden zum Teil speziell entwickelt um verschieden Biomoleküle kovalent zu binden. Zu diesen Molekülen gehören unter anderem Proteine, Peptide oder niedermolekulare Liganden. Vorteilhaft ist dabei eine große effektive Oberfläche, die eine maximale Bindungskapazität ermöglicht. Darüberhinaus sollte eine magnetische Trennung schnell erfolgen (Dauer ca. 1 Minute). Desweiteren sind auch sie mechanisch stabil, wie die MIP's [51].

Eine weitere Möglichkeit um die Antikörper zu Immobilisieren wäre die Verwendung von Biosilon beads, wie sie in einigen früheren Arbeiten genutzt wurden. Jedoch ist dieses Produkt nicht mehr kommerziell erhältlich.

5. Zusammenfassung

Für die Entwicklung des Prinzips der Verteilungschromatographie erhielten Martin und Syngé 1952 den Nobelpreis. Darauf aufbauend wurde die Affinitätschromatographie entwickelt, die auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Probenproteinen und der stationären Phase beruhen.

Diese Masterthesis befasst sich mit der Entwicklung einer Antikörpersäule zum Nachweis bzw. zur Gewinnung des reinen Parvalbumins. Das so gewonnene und vorangereicherte Fischprotein kann dann im späteren Verlauf für weiterführende Untersuchungen mit der Matrix gestützten Laserdesorptions- Ionisations- Flugzeit- Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) genutzt werden.

Zu Beginn der Arbeit wird der hier eingesetzte primäre monoklonale speziessmultireaktive Antikörper über eine HiTrap Protein G-Säule gereinigt. Mit Hilfe einer erstellten BSA-Standardkurve werden nun die Konzentrationen der einzelnen Antikörperfraktionen in mg/ ml bestimmt. Zunächst werden Standardverdünnungsreihen für drei Fischproben (Rotbarsch, Alaska Seelachs und Kabeljau) hergestellt und deren Proteinkonzentration über Sandwich-ELISA ermittelt. Diese dienen zum späteren Vergleich mit den gewonnenen Elutionen der entwickelten Säulen. Gleichzeitig wird mit dem ersten Sandwich-ELISA geprüft, ob sich eine BSA- oder eine Milchpulverlösung besser eignet für den Blockschritt. Für die folgenden ELISA-Versuche wird nur Milchpulver verwendet zum Block, da es sich als wirkungsvoller erwiesen hat. Im Rahmen dieser Masterarbeit werden 5 Säulen hergestellt. Drei Säulen davon sind gekaufte Säulen von Thermo Scientific und werden nach deren Protokoll behandelt in Bezug auf die Immobilisierung der Antikörper und der Aufgabe der Fischproben. Für die anderen zwei verbleibenden Säulen werden leere Säule genutzt, die mit NHS-aktivierter Sepharose versetzt werden um die Antikörper zu binden. Dabei ist zu beachten, dass bei der einen Säule die Sepharose direkt in die Säule gegeben wird und anschließend die Antikörper, während bei der anderen Säule die NHS-aktivierte Sepharose und die Antikörper separat verbunden werden, wie bei einem Batch-Verfahren. Grundsätzlich wird Rotbarsch in unterschiedlichen Verdünnungen als Probe für die Säulen eingesetzt, und zwar bei vier der fünf Säulen. Für die fünfte Säule wird Kabeljau als Fischprobe genutzt. Die somit erhaltenen vermeintlich proteinfreien Durchflüsse und Parvalbuminhaltigen Elutionen werden mit einem Sandwich-ELISA überprüft. Desweiteren werden die bei der Immobilisierung der Antikörper zurückgehaltenen Durchflüsse mit möglichen Antikörperrückständen durch einen Indirekten ELISA getestet. Zusätzlich wird versucht die gebundenen Antikörper wieder von einzelnen Säulen zu entfernen, dies wird auch mittels eines

Indirekten ELISA's gemessen. Abschließend erfolgen zwei SDS-Pages um die Durchflüsse, Elutionen und auch Fischproben auf die Molekülgröße ihrer Bestandteile, insbesondere Parvalbumin (12 kDa), zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist eine durchweg funktionsfähige Antikörpersäule zum Nachweis von Fischparvalbumin zu entwickeln. Daher sollten für die Immobilisierung der Antikörper andere Substanzen in Betracht gezogen werden, wie Magnetbeads, Aptamere oder Molekular geprägte Polymere (MIP).

6. Verzeichnisse

6.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| Abbildung 1: Prinzip Affinitätschromatographie (15) | - 7 - |
| Abbildung 2: Struktur von Agarose (16) | - 7 - |
| Abbildung 3: Struktur NHS-aktivierter Sepharose (19) | - 8 - |
| Abbildung 4: Aufbau eines Sandwich-ELISA (23)..... | - 9 - |
| Abbildung 5: Antigen-beschichtete Platte/ Indirekter ELISA (22) | - 10 - |
| Abbildung 6: Struktur Sodium Dodecyl Sulfate (29)..... | - 11 - |
| Abbildung 7: Struktur Parvalbumin (37)..... | - 13 - |
| Abbildung 8: Säule nach Thermo Scientific..... | - 18 - |
| Abbildung 9: Säule mit NHS-aktivierter Sepharose und eine Pumpe | - 19 - |
| Abbildung 10: HiTrap Protein G HP-Säule zur Antikörperreinigung..... | - 23 - |
| Abbildung 11: BSA-Standardkurve vom 19.01.2011 | - 24 - |
| Abbildung 12: Testprinzip für Sandwich-ELISA (38) | - 24 - |
| Abbildung 13: SDS-Page Aufbau..... | - 29 - |
| Abbildung 14: ermittelte BSA-Standardkurve | - 32 - |
| Abbildung 15: Vergleich selbstgereinigte und gekaufte AK's | - 33 - |
| Abbildung 16: Vergleich Blockmittel Milchpulver und BSA | - 34 - |
| Abbildung 17: Verdünnungsreihe Rotbarsch | - 35 - |
| Abbildung 18: Vergleich Rotbarsch-Elutionen zweier Säulen | - 36 - |
| Abbildung 19: Ergebnisse Säule 2 mit Rotbarsch..... | - 37 - |
| Abbildung 20: Vergleich von 3 verschiedenen Säulen | - 38 - |
| Abbildung 21: Verdünnungsreihe Alaska Seelachs | - 38 - |
| Abbildung 22: Säule mit Kabeljau als Fischprobe..... | - 39 - |
| Abbildung 23: Indirekter ELISA 1-Test antikörperhaltige Durchflüsse..... | - 40 - |
| Abbildung 24: Indirekter ELISA 2- Rückgewinnung Antikörper..... | - 41 - |
| Abbildung 25: SDS-Page Versuch 1 | - 42 - |
| Abbildung 26: SDS-Page Versuch 2 | - 43 - |

6.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Tabelle 1: Berechnung für BSA-Verdünnung..... | - 23 - |
| Tabelle 2: Schema eines ELISA-Plans..... | - 25 - |
| Tabelle 3: Signalwerte eines ELISA-Versuchs | - 27 - |
| Tabelle 4: Entwickelte Antikörpersäulen | - 30 - |
| Tabelle 5: Verwendung der einzelnen Säulen..... | - 31 - |
| Tabelle 6: durchgeführte Antikörperreinigungen | - 32 - |
| Tabelle 7: Daten zur Erstellung der BSA-Standardkurve | - 32 - |

7. Literaturverzeichnis

1. Immuno-Affinitätschromatographie - Antikörper in der Molekularbiologie. Schweiz : s.n., 2006.
2. **Applichem**. Broschüre Agarose-Gel-Elektrophorese. [Online] 2009. [Zitat vom: 05. 09 2012.] http://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/Agarose_deutsch_Broschuere_final_100208.pdf.
3. **Aldrich, Sigma**. Datenblatt NHS-aktivierte Sepharose. [Online] 2012. [Zitat vom: 05. 09 2012.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h8280?lang=de®ion=DE>.
4. **Mack, Elisabeth**. *Entwicklung und Optimierung eines Sandwich-ELISA's zum Nachweis von Penicillium Spezies*. HS Neubrandenburg. s.l. : Nicht Veröffentlicht, 2011.
5. **Cell Signaling Technology, Inc**. http://www.callsignal.com/ddt/elisa_line.html. [Online] 2011. [Zitat vom: 12. 01 2011.]
6. **Kemeny, D.M**. *ELISA - Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor*. Stuttgart : Gustav Fischer, 1994.
7. **Holtzhauer, M**. *Methoden in der Proteinanalytik*. Heidelberg : Springer, 1996.
8. **MIT**. OpenLabWare- Massachusetts Institute of Technology . [Online] 2007. [Zitat vom: 05. 09 2012.] http://www.google.de/imgres?start=15&num=10&um=1&hl=de&client=firefox-a&rls=org.mozilla:de:official&biw=1280&bih=707&addh=36&tbm=isch&tbnid=qLBkFWKAGuS1wM:&imgrefurl=http://olw.mit.edu/glossary.olw%3F1&imgurl=http://olw.mit.edu/media/glossary/sodium_dodec.
9. **Arif, S**. A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *BioEssays*. Vol. 31, 20009.
10. **Baltes**. *Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen*. [Hrsg.] W. Baltes. 2. Aufl. Hamburg : Behr's, 1995.
11. **Lottspeicher, F., Zorbach, H. (Hrsg.)**. *Bioanalytik*. Berlin : Spektrum, 1998.
12. **Schütt, Ch., Bröker, B**. *Grundwissen Immunologie*. 2. Aufl. Heidelberg : Spektrum, 2009.
13. **Kling, J**. Luminescence Developments Help Scientists See The Light. *The Scientist*. 12. 05 1997, S. 16.
14. **Clausen, J**. *Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules*. 5. Aufl. Amsterdam : North-Holland, 1974.
15. **Clark, D. P., Pazdernik, N. J**. *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Heidelberg : Spektrum, 2009.
16. **Avondet, M., Hofmann, W., Landolt, S**. www.labor-spiez.ch/de/dok/po/pdf/ELISA_aw_int.pdf. [Online] 2011. [Zitat vom: 09. 02 2011.]
17. **Geckeler, K. E., Eckstein, H**. *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*. [Hrsg.] K. E. Geckeler und H. Eckstein. Braunschweig : Vieweg, 1998.

18. **Günzler, H., [Hrsg.]**. *Analytiker-Taschenbuch*. Berlin : Springer, 1998. Bd. 18.
19. **Schwedt, G.** *Analytische Chemie - Grundlagen, Methoden und Praxis*. Stuttgart : Georg Thieme, 1995.
20. **University of Konstanz, Department of Chemistry**. Analytische Chemie 1, Trennmethoden. Konstanz : Universität Konstanz, WS 07/08.
21. **C. Hartmann, B. Dälken**. Reinigung rekombinant hergestellter Proteine. Frankfurt : s.n., 2009.
22. **W. Thiemann, M. Palladino**. *Biotechnologie*. München : Pearson Studium, 2007.
23. **Kaltenböck, K.** *Chromatographie für Einsteiger*. Weinheim : Wiley-VCH, 2008.
24. **A. Pingoud, C. Urbanke**. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin : Walter de Gruyter & Co. , 1997.
25. **E. Ruckenstein, V. Lesins**. Biotechnology Report, Protein Separation by Potential Barrier Chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. XXVIII, 1986, S. 432-451.
26. **Matissek, Steiner, Fischer**. *Lebensmittelanalytik*. 4. Aufl. Heidelberg : springer, 2010.
27. **Wien, Uni**. SDS-Page-Elektrophorese-Arbeitsunterlagen zum Beispiel. Wien : Universität für Bodenkunde Wien, 2006.
28. Praktikum Biochemie/Molekularbiologie_ Proteinchemie I. Hamburg : Universität Hamburg, 2012.
29. **Stephanie, BTA-OH**. SDS-Page-Biochemisches Praktikum. Köln : s.n., 2003. www.die-leys.de/downloads/BCO%2005%20SDS-PAGE.pdf.
30. **EmausBot**. Wikipedia. [Online] 14. 09 2011. [Zitat vom: 05. 09 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/N-Hydroxysuccinimid>.
31. **Mabschaaf**. Wikipedia. [Online] 27. 08 2012. [Zitat vom: 05. 09 2012.] <http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose>.
32. **I. Reese, A. Constien, Ch. Schäfer**. *Richtig Einkaufen bei Nahrungsmittelallergien* . stuttgart : TRIAS, 2007.
33. **Ch. Wittmann, B. Albrecht, St. Hartwich, Z. Wen**. Versteckte Proteine- Fischallergennachweis in Lebensmitteln mit impedimetrischen Biosensoren. *Labor & More*. 2010, 3.
34. **Wittmann, Ch**. Skript Instrumentelle Analytik. Neubrandenburg : s.n., WS 11/12.
35. —. Skript Lebensmittelchemie. Neubrandenburg : s.n., WS 09/10.
36. **S. Schmidt, J. Linnemann**. Allum- Allergie, Umwelt und Gesundheit. [Online] 16. 08 2012. [Zitat vom: 05. 09 2012.] <http://www.allum.de/krankheiten/nahrungsmittelallergie/haeufigkeit>.
37. **Onmeda-Redaktion**. Onmeda- Für meine Gesundheit. *Lebensmittelallergie (Nahrungsmittelallergie): Definition*. [Online] 15. 01 2012. [Zitat vom: 06. 09 2012.] <http://www.onmeda.de/krankheiten/lebensmittelallergie-definition-6071-2.html>.
38. DEBInet. *Deutsches Ernährungsberatungs- und -informationsnetz* . [Online] [Zitat vom: 05. 09 2012.] <http://www.ernaehrung.de/tipps/nahrungsmittelallergien/allergie10.php>.

39. **GmbH, DocCheck Medical Services.** DocCheck Flexikon. [Online] 2012. [Zitat vom: 10. 09 2012.] <http://flexikon.doccheck.com/de/Aptamer>.
40. **GmbH, iozym Scientific.** Biozym. [Online] 2012. [Zitat vom: 10. 09 2012.] <http://www.biozym.com/DesktopModules/WebShop/shopdisplaycategories.aspx?tabID=0&id=1300&page=2&Lang=de-DE>.
41. **O. Farokhzad, R. Langer.** Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 103; Nr 16, 2006.
42. **G. Mayer, M. Famulok.** Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche. *Pharmazie in unserer Zeit*. 36, 2007.
43. **O. Ramström, K. Skudar, J. Haines, P. Patel, O. Brüggemann.** Food Analysis Using Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, Bde. vol. 49, nr. 5.
44. **Weller, M.** Immunochromatographic techniques- critical review. *Journal of Analytical Chemistry*. 366, 2000.
45. **J. Chuang, J. Emon, R. Jones, J. Durnford, R. Lordo.** Development and application of immunoaffinity column chromatography for atrazine in complex sample media. *Analytica Chimica acta*. 583, 2007.
46. **Bende, H.** Affinitäts-Chromatographie. *Chemie in unserer Zeit*. 1, 1974.
47. **Scientific, Thermo.** Instructions Pierce NHS-Activated Agarose Slurry. 2012.
48. **I. Swoboda, A. Bugajska-Schretter, R. Valenta, S. Spitzauer.** Recombinant fish parvalbumins: candidates for diagnosis and treatment of fish allergy. *Allergy*. Vol. 57, 2002.
49. **Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P.** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Aufl. Berlin : Springer, 2008. S. 17.
50. **Eckert, W.A., Kartenbeck, J.** *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. Berlin : Springer, 1997.
51. **Pingoud, A., Urbanke, C.** *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin : Walter de Gruyter, 1997.
52. **Buchart, K.** *Nahrungsmittelallergie-Ein Leitfaden für Betroffene*. Innsbruck : Studienverlag Ges.m.b.H., 2003.
53. **L. Nollet, A. Hengel.** *Food Allergens-Analysis Instrumentation and Methods*. Boca Raton : Taylor & Francis Group, 2011.
54. **A. Kuehn, T. Scheuermann, C. Hilger, F. Hentges.** Important Variations in Parvalbumin Content in Common Fish Species; A factor possibly contributing to variable allergenicity. *Allergy and Immunology*. 153, 2010.
55. **M. Rosmilah, M. Shahnaz, A. Masita, A. Noormalin, M. Jamaludin.** Identification of major allergens of two species of local snappers: *Lutjanus argentimaculatus* (merah/red snapper) and *Lutjanus johnii* (jenahak/ golden snapper). *Tropical Biomedicine*. 22, 2005.

56. **D. Kreft, R. BAuer, R. Goerlich.** *Nahrungsmittelallergen - Charakteristika und Wirkungsweise.* Berlin : Walter de Gruyter, 1995.

57. **S. Arif, A. Hasnain.** A major cross-reactive fish allergen with exceptional stability: Parvalbumin. *African Journal of Food Science.* Vol. 4, 2010.

8. Anhang

Anhang 1: Vergleich der verwendeten Marker

| Größe (kDa) | SDS-Page Proteinmarker Marker (6,5- 200 kDa) | Sigmamarker Marker (6,5- 66 kDa) | Color Marker Marker (1,06- 26,6 kDa) |
|-------------|---|--|---|
| 200 | Myosin, Rindermuskel | x | x |
| 116 | β -Galaktosidase, E. coli, rekombinant | x | x |
| 67 | BSA | BSA | x |
| 45 | Ovalbumin, Hühnereiweiß | Ovalbumin, Hühnereiweiß | x |
| 36 | x | Glyceraldehyde-3- phosphate Dehydrogenase (Hasenmuskel) | x |
| 29 | Carboanhydrase, Erythrozyten, Rind | Carboanhydrase, Erythrozyten, Rind | x |
| 26,6 | x | x | Triosephosphate Isomerase, Hasenmuskel |
| 24 | x | Trypsinogen, Rinderpankreas | x |
| 21 | Trypsin-Inhibitor, Sojabohne | Trypsin-Inhibitor, Sojabohne | x |
| 17 | x | x | Myoglobin, Pferdeherz |
| 14,3 | Lysozym, Hühnerei | x | x |
| 14,2 | x | α -Lactalbumin, Rindermilch | α -Lactalbumin, Rindermilch |
| 6,5 | Aprotitnin, Rinderlunge | Aprotitnin, Rinderlunge | Aprotitnin, Rinderlunge |
| 3,5 | x | x | Insulin Kette B, oxidiert, Rind |
| 1,06 | x | x | Bradykinin |

Anhang 2: Extinktionswerte und Konzentrationen der gereinigten Antikörperfraktionen bei 280 nm

| Datum | Bezeichnung | 1. Wert | 2. Wert | 3. Wert | Mittelwert | berechnete Konzentration |
|----------|--------------|---------|---------|---------|------------|--------------------------|
| 22.03.12 | Fr. 1 | 0,2459 | 0,2498 | 0,2499 | 0,2485 | 1,1840 |
| | Fr. 2 | 0,0577 | 0,0585 | 0,0593 | 0,0585 | -0,1354 |
| 02.04.12 | Fr. 1 | 0,1262 | 0,1267 | 0,1266 | 0,1265 | 0,3368 |
| | Fr. 2 | 0,0116 | 0,0115 | 0,0116 | 0,0116 | -0,4611 |
| 21.05.12 | Fr. 1 | 0,0655 | 0,0775 | 0,0774 | 0,0735 | -0,0315 |
| | Fr. 2 | 0,0294 | 0,0303 | 0,0301 | 0,0299 | -0,3338 |
| | Fr. 3 | 0,0110 | 0,0117 | 0,0112 | 0,0113 | -0,4632 |
| | Fr. 4 | 0,0142 | 0,0156 | 0,0156 | 0,0151 | -0,4366 |
| | Fr. 5 | 0,1694 | 0,1699 | 0,1703 | 0,1699 | 0,6380 |
| | Fr. 6 | 0,1384 | 0,1392 | 0,1393 | 0,1390 | 0,4234 |
| | Fr. 7 | 0,0040 | 0,0043 | 0,0047 | 0,0043 | -0,5116 |
| | Fr. 8 | 0,0231 | 0,0236 | 0,0237 | 0,0235 | -0,3787 |
| 12.07.12 | Fr.1 | 0,0538 | 0,0534 | 0,0541 | 0,0538 | -0,1683 |
| | Fr. 2 | 0,1339 | 0,1343 | 0,1339 | 0,1340 | 0,3891 |
| | Fr. 3 | 0,0903 | 0,0903 | 0,0907 | 0,0904 | 0,0863 |
| | Fr. 4 | 0,0148 | 0,0148 | 0,0148 | 0,0148 | -0,4389 |
| | Fr. 5 | 0,0531 | 0,0538 | 0,0531 | 0,0533 | -0,1713 |
| | Fr. 6 | 0,0153 | 0,0157 | 0,0157 | 0,0156 | -0,4336 |
| | Fr. 7 | 0,1326 | 0,1321 | 0,1312 | 0,1320 | 0,3748 |
| | Fr. 8 | 0,0752 | 0,0744 | 0,0741 | 0,0746 | -0,0238 |
| | Fr. 9 | 0,0765 | 0,0769 | 0,0765 | 0,0766 | -0,0095 |
| | Fr. 10 | 0,0625 | 0,0632 | 0,0617 | 0,0625 | -0,1079 |

Anhang 3: AmminoLink Plus Immobilization Kit

Wichtig:

- vorher die Kit Komponenten auf Raumtemperatur bringen
- vorher Proteine mittels Spektrophotometer bestimmen

Materialien:

-Coupling Puffer:

- pH 10: BupH Pack Inhalt in 500 ml Reinstwasser lösen
- zur Lagerung bei 4°C überschüssigen Puffer entfernen und z.B. 0,05% Natrium Acetat hinzufügen

- Protein Probe:

- 1-20 mg Protein in 2-3 ml Coupling Puffer lösen zum Immobilisieren
- bei Proteinen in Lösung: Probe mit 4-fachem des Coupling Puffers verdünnen, alternativ entsalzen oder dialysieren

→ The protein sample should be 1-20mg of protein in 2-3 ml of coupling buffer so the concentration will range between 0.33 mg/ml (1 mg protein in 3 ml buffer) to 10 mg/ml (20 mg protein in 2 ml buffer).

-Lagerpuffer:

- PBS mit 0,05 % Natriumazid (NaN_3)

Prozedere mit pH 10-Puffer:

A. Protein Immobilisierung:

Notiz: alle Säulenzentrifugationen bei 1000 x g für 1 min unter Verwendung eines 15 ml Tubes

Die Säulen dürfen nicht austrocknen!!!

1.- suspendiere das AminoLink Plus Resin bei End-über-End Mischen

- um Luft in der Säule zu vermeiden erst die obere Kappe entfernen dann die untere!!!
- Zentrifugieren der Säule um Lagerpuffer zu entfernen

2. - 2 ml pH 10 Coupling Puffer ergänzen und zentrifugieren

- wiederholen mit zusätzlichen 2 ml pH 10 Puffer

3. - untere Kappe wieder ansetzen

- 2-3 ml Proteinprobe (gelöst in pH 10 Coupling Puffer) auf die Säule geben
- 0,1 ml der Probe zurück behalten für anschließende Bestimmung der Kopplungseffizienz

4. - obere Kappe drauf setzen

- mischen der Säule durch Wippen oder End-über-End Mischen bei Raumtemperatur für 4h oder über Nacht

5. - Entfernen der beiden Kappen, in einen neuen Tube legen und zentrifugieren um nicht gebundene Proteine zu sammeln

6. - den Durchfluss zurückbehalten und die Effizienz bestimmen während man mit Blockschritten fortfährt

- bestimmen der Bindungseffizienz durch Vergleich der Proteinkonzentrationen der nicht gebundenen Proteine und der Startprobe (3.)

7. - waschen der Säule mit 2 ml Bindungspuffer pH 7,2 und zentrifugieren
- einmal wiederholen
8. - untere Kappe wieder ansetzen
- unterm Abzug 2 ml Bindungspuffer pH 7,2 zu 40 µl NaCNBH₃ ergänzen
- erhaltene Lösung auf Säule geben
9. - obere Kappe drauf setzen und für 4h bei Raumtemperatur mischen oder über Nacht bei 4 °C

B. Block Remaining Active Sites

1. - vorsichtig die obere Kappe entfernen: → Gas könnte sich gebildet haben
2. - untere Kappe entfernen, Säule in neuen Tube legen und zentrifugieren um Bindungspuffer zu Entfernen
3. - waschen der Säule mit 2 ml Quenching Puffer und zentrifugieren
- diesen Schritt einmal wiederholen
4. - untere Kappe anlegen
- unterm Abzug 2 ml Quenching Puffer zu 40 µl NaCNBH₃ ergänzen
- erhaltene Lösung auf Säule geben (Ergebnis 50 mM NaCNBH₃)
5. obere Kappe drauf setzen und vorsichtig für 30 min bei End-über-End Mischen mischen

C. Waschen der Säule

1. - vorsichtig die obere Kappe entfernen: → Gas könnte sich gebildet haben
2. - untere Kappe entfernen, Säule in neuen Tube legen und zentrifugieren um Quenching Puffer zu Entfernen
- 3.- entfernen der Reagenzien und nicht gebunden Proteinen durch waschen mit 2 ml Wash Lösung und Zentrifugieren
- diesen Schritt 4 mal wiederholen

→ Notiz:

Überwachen des Waschens auf die Anwesenheit von Proteinen; normalerweise reichen 10 ml Wash Lösung um nicht gebunden Proteine zu entfernen, aber Proteine welche bei einer hohen Konz. gebunden wurden oder bei pH 10 können umfangreicheres Waschen benötigen

4. - Säule vorbereiten für Lagerung: 2 ml Lagerungspuffer zufügen und zentrifugieren
- diesen Schritt 2 mal wiederholen
5. - untere Kappe aufdrehen und 2 ml Lagerungspuffer auf die Säule geben
6. - obere Kappe drauf setzen und bei 4 °C lagern oder
mit dem Generellen Protokoll für Affinitätsreinigung fortfahren (Schritt 3)

Generelles Protokoll für Affinitätsreinigung

Materialien benötigt:

- Bindungs-/ Waschpuffer: PBS, Tris-buffered saline (TBS)
- Probe: gelöst
- Elutionspuffer: IgG Elutionspuffer oder 0,1-0,2 M Glycine HCl pH 2,5-3,0
- Neutralisationspuffer: 1 ml von 1M Natriumphosphat oder 1 M Tris HCl mit pH 8,5-9,0

Schritte:

1. - vorbereitete Säule auf Raumtemperatur bringen
2. - beide Kappen entfernen und zentrifugieren um Lagerlösung zu entfernen
 - 6 ml des Bindungs-/ Waschpuffers auf die Säule geben
3. - ≤ 2 ml Probe gelöst in geeignetem Bindungspuffer auf die Säule geben
 - der Probe ermöglichen an die Säule zu binden und die untere Kappen drauf setzen
 - 0,2 ml Bindungs-/ Waschpuffer zugeben und die obere Kappe anlegen
 - die Säule für 15- 60 min wippen/mischen bei Raumtemperatur um die Bindung zu ermöglichen
4. - beide Kappen entfernen und die Säule zentrifugieren
 - ohne den Tube zu wechseln, 1 ml Bindungs-/ Waschpuffer zufügen und wieder zentrifugieren
 - den Durchfluss zurückbehalten und die Effizienz bestimmen
5. - Waschen der Säule und 2 ml Bindungs-/ Waschpuffer zugeben und zentrifugieren
 - diesen Schritt 2 - 4 mal wiederholen
6. - Protein mit 2ml Elutionspuffer eluieren
 - Lösung sammeln in Zentrifugentube, in welchem 100 μ l Neutralisationspuffer vorgelegt sind und Zentrifugieren
 - eluierte, neutralisierte Probe sammeln und den Schritt 2-3 Mal wiederholen
7. - Proteinbestimmung direkt mittels SDS-Page oder Protein Assay

Notiz:

- Säule schnell nach dem benutzen äquilibrieren um Schäden zu vermeiden
- eine Säule kann bis zu 10 Mal benutzt werden abhängig von der Stabilität der immobilisierten Proteine

8. - 4 ml Bindungs-/ Waschpuffer durch die Säule laufen lassen

9. - untere Kappe anlegen und 4 ml Bindungs-/ Waschpuffer mit einer Endkonzentration von 0,05 % NaN_3 zur Lagerung
 - obere Kappe drauf setzen und bei 4 °C lagern
 - NICHT EINFRIEREN!!!

Anhang 4: NHS-aktivierte Sepharose nach GE Health Care

- Herstellen der Puffer:

Natriumhydrogencarbonat-Puffer, pH=8,3

1 mM HCl

0,1 M Tris-HCl

Acetatpuffer

- Vorbereiten der Probenlösung:

0,5 ml AK + 1,5 ml NaHCO₃ -Puffer

- Waschen der Sepharose in Glasschale mit 1mM HCl

mit 10-15 fachen des Mediumvolumens

- Zusammenfügen Proben (AK) mit Sepharose in Glasgefäß über Nacht bei 4 °C

- Blocken für 2 Stunden bei Raumtemperatur

mit 1 M Tris-HCL

- Waschen mit 2 Puffern

3 x 1 Mediumvolumen 1M Tris HCl

3 x 1 Mediumvolumen 1M Acetatpuffer

- einzelne Puffer entfernen durch Pipettieren

- statt Pumpe zu verwenden wird gesamte Lösung in eine Säule gegeben

über Nacht und bei Raumtemperatur „Kopf über schütteln“

- Lösung in Säule mit PBS waschen und Zentrifugieren

- Lagerung mit PBS + 0,05% NaN₃ bei 4 °C bis Weiterverwendung

Anhang 5: NHS-aktivierte Sepharose abgeleitet nach Thermo Fisher

- Säule: leere Säule von GE Health Care, 10 ml
- Bindungspuffer: NaHCO_3 + 0,5 M NaCl, pH= 8,3
- Waschpuffer: PBS 7,2
- Quenchingspuffer: zum Blocken
Tris HCl pH= 8,85

- 5 ml aktivierte Sepharose in Säule geben

- 5 ml Reinstwasser hinzufügen und zentrifugieren

- 5 ml NaHCO_3 zugeben, zentrifugieren und Durchfluss verwerfen

- untere Kappe ansetzen und ca. 2 ml Probe hinzugeben
Obere Kappe anlegen und Säule „Kopf über schüttel“ für 1 h

- beide Kappen entfernen und zentrifugieren, den Durchfluss zurückbehalten

- Waschen der Säule mit 1 ml PBS, zentrifugieren und Durchfluss behalten

- untere Kappe anlegen und 2 ml Tris HCl zu geben zum Blocken

- obere Kappe drauf und für 15-20 min bei Raumtemperatur über Kopf schüttel/ Wippen

- Kappen entfernen und zentrifugieren

- Waschen der Säule mit mindestens 6 ml PBS

- zur Lagerung 6 ml PBS + 0,05% NaN_3 durch Säule laufen lassen

- untere Kappe anlegen, wenn 1 ml der Lösung noch in der Säule drin ist

- obere Kappe anlegen und bei 4 °C lagern

Anhang 6: Durchführung eines Sandwich-ELISA

1. Coating mit Primären monoklonalen speziesmultireaktiven Antikörpern (pmAK):
 - Verdünnung 1:1000 herstellen
 - 150 µl/ well auftragen
 - ELISA-Platte mit Alufolie abdecken
 - über Nacht bei 4 °C inkubieren lassen
2. Waschen: - Waschprogramm: 4:EIA 3x (3 Waschdurchgänge)
 - alle Waschschritte laufen nach gleichem Programm ab
3. Blocken: - 1 %ige Milchpulverlösung in PBS (1g/ 100 ml) ansetzen → Gefahr: Schäumen
 - Blocken freier Bindungsstellen in den Wells durch Zugabe von 200 µl/well
 - 1 h inkubieren bei Raumtemperatur
4. Waschen: - s. o.
5. Auftragen von Antigenen:
 - jeweilige Fischprobe verdünnen, 1:10 o. 1:5 mit PBS
 - 150 µl dieser Lösung/ well auftragen entsprechend dem ELISA-Plan
6. Waschen: - s. o.
7. Auftragen von POD- konjugierten Sekundären monoklonalen Antikörpern (smAK):
 - Verdünnung 1:1000 herstellen der entsprechenden POD Fraktion in PBS
 - entsprechend ELISA-Plan 150 µl/ well auftragen
 - 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
8. Waschen: - s. o.
9. Aufbringen von Substratlösung:
 - Herstellen der Substratlösung aus TMB, H₂O₂ und Natriumacetatpuffer (erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen)
 - 200 µl/well der Lösung aufgeben
 - 10-30 Minuten inkubieren bei Raumtemperatur → bis Blaufärbung eintritt
 - in gleicher Reihenfolge 50 µl/ well 2M H₂SO₄ geben → dient als Stopplösung (Gelbfärbung durch 2M H₂SO₄ bei hoher Aktivität)
10. Auswertung:
 - erfolgt mit ELISA-Reader "Wallac 1420 Manager"
 - Messung bei 450 nm

Anhang 7: Durchführung Indirekter ELISA

1. Platte mit Antigen beschichten, in dem Fall Fischprobe über Nacht bei 4 °C
- 150 µl pro well
2. Waschen mit Waschprogramm 4:EIA 3x
3. Aufgeben der Durchflussproben, welchen Antikörper enthalten für 1 h
- 150 µl pro well
4. Waschen mit Waschprogramm 4:EIA 3x
5. Aufgeben IgG Maus POD in 1:1000 Verdünnung für 1 h
- 150 µl pro well
6. Waschen 4:EIA 3x
7. Substratlösung aufbringen
- 200 µl pro well
- 10-30 min Inkubationszeit
- in gleicher Reihenfolge 50 µl/ well 2M H₂SO₄ geben → dient als Stopplösung
(Gelbfärbung durch 2M H₂SO₄ bei hoher Aktivität)
8. Auswertung:
- erfolgt mit ELISA-Reader "Wallac 1420 Manager"
- Messung bei 450 nm

Anhang 8: Durchführung SDS-Page

- Herstellen der nötigen Puffer: Substanzlösungspuffer, Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) und Probenlösung
- nach der Anleitung von Anamed Elektrophorese GmbH:
- öffnen der Geltüte und die Gelkassette entnehmen
- Verpackungspuffer verwerfen und mit dest. Wasser spülen
- Klebeband am unteren Ende der Kassette entfernen um den Geldurchtrittsspalt frei zu legen
- Kamm entfernen um die 10 Kammern (Probentaschen) für die Proben freizulegen
- 2 vorbereitete Gele in die Elektrophoresezelle setzen

- 44 µl der jeweiligen Probe mit 51 µl der Probenlösung mischen
- die Probentaschen mit Hilfe von Pipetten mit Laufpuffer auffüllen
- Befüllen der gesamten Elektrophoresezelle mit Laufpuffer
- 20 µl in dafür vorgesehene Kammer pipettieren
- auch 20 µl des unverdünnten Markers in die entsprechende Kammern geben

- Gelhalterung an Stromquelle anschließen:
→ 23 mA; 125 V; ca. 2,5 h Laufdauer

- Herstellen 10 % Trichloressigsäurelösung
- Gele vorsichtig aus den Platten entfernen und für 30 min in die Lösung legen

- Herstellen der Färbelösung
- Dauer des Anfärbens: 12- 15 h unter Schütteln

- Herstellen der Entfärbelösung
- Dauer des Entfärbens: 1h unter Schütteln

- Auswerten der sichtbaren Banden auf den Gelen

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift