Aufgaben mit Schwerpunkt Immunassays, Elektophoresen und Blottings

Folgende Aufgaben wurden in ähnlicher Form schon als Klassenarbeitsaufgaben gestellt! Auch Prüfungsaufgaben haben dieses Niveau.

1. Immunologische Nachweisverfahren und Immunassays

1.1 Alpha-Tubulin (α-Tub) ist ein wichtiges Protein des Zytoskeletts von Eukaryoten und besitzt mehrere verschiedene Epitope (Epitop1, Epitop 2 etc.), an die entsprechende Antikörper spezifisch binden können. Jedes Epitop ist dabei nur einmal vorhanden. In einem Zellextrakt soll das Protein mittels ELISA quantifiziert werden.

Folgende IgG-Antikörper finden sich in Ihrem Laborkühlschrank bzw. Tiefkühler:

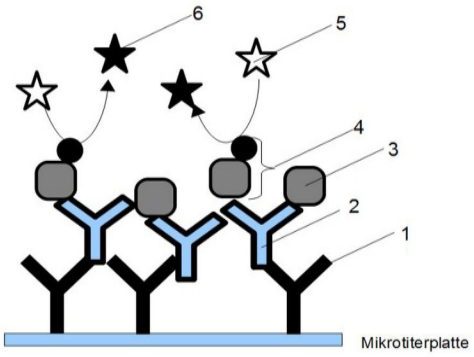
- Antikörper mit dem Etikett: *„goat anti-rabbit IgG (markiert mit HRP)“*
- Antikörper mit dem Etikett: *„mouse anti-human IgG (markiert mit HRP)“*
- murine, monoklonale AK gegen Epitop 2 des α-Tub *(mouse anti-α-Tub_2)*
- murine, polyklonale AK gegen α-Tub *(mouse anti-α-Tub)*
- monoklonale Kaninchen-Antikörper gegen Epitop 2 von α-Tub *(rabbit anti-α-Tub_2)*
- monoklonale Kaninchen-Antikörper gegen Epitop 1 von α-Tub *(rabbit anti-α-Tub_1)*

a) Benennen Sie die am sinnvollsten einzusetzende Kombination von drei Antikörpern aus dem oberen Angebot, um α-Tub zu quantifizieren und begründen Sie Ihre Auswahl. Wie wird das entsprechende ELISA-Verfahren genannt?

b) Es gibt auch mehrere Möglichkeit α-Tub mit 2 spezifischen AK mittels ELISA zu quantifizieren. Zeichnen Sie für eine Möglichkeit ein vollständig beschriftetes Schema des Komplex (Nachweiskomplex). Beschreiben Sie kurz 2 geeignete Antikörper Ihrer Wahl (nicht unbedingt aus oberer Liste) die dafür geeignet sind.

c) 35 µL eines Zellextraktes wurden auf 1000 µL verdünnt. 250 µL von der Verdünnung wurden in einem Kavität der ELISA-Platte pipettiert. Der Gehalt and α-Tub wurde durch den ELISA in dieser Kavität auf 55 ng bestimmt. Berechnen Sie den Gehalt an α-Tubulin im Zellextrakt in µg/L.

1.2 Das Hormon Testosteron ist für die Quantifizierung mittels Sandwich-ELISA ungeeignet. Es kann aber mit einer anderen ELISA-Methode bestimmt werden, deren Prinzip in folgender Skizze wiedergegeben ist.



a) Beschriften Sie 1 - 5 der Abbildung (nicht direkt auf Aufgabenblatt!)

b) Erklären Sie das Testprinzip (incl. Angabe der wichtigsten Arbeitsschritte).

c) Welche strukturelle Voraussetzung muss ein Analyt mitbringen, um mit einer Sandwich-Methode quantifiziert werden zu können? Begründen Sie, ob diese strukturelle Voraussetzung auch bei der hier vorliegenden ELISA-Methode benötigt wird.

d) Benennen Sie 2 Enzyme die regelmäßig zur Markierung in ELISA-Testkits eingesetzt werden.

1.3 Ein immunchromatographischer Test (lateral flow immunoassay) auf die Anwesenheit des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin in flüssigen Proben funktioniert mit 3 verschiedenen Antikörpern:

* polyclonal mouse anti-human hemoglobine IgG

* polyclonal rabbit anti-mouse IgG

* monoclonal mouse anti-human hemoglobine IgG gold conjugate

Wie auch andere immunchromatographische Tests, liegt er als Streifenform mit einer Auftrageregion, einer Testregion und einer Kontrollregion vor.

a) Geben Sie ein beschriftetes Schema/Zeichnung des Nachweiskomplexes in der Testregion an.

b) Geben Sie die jeweilige Region an, auf der zu Beginn jeder der drei Antikörper vorliegt.

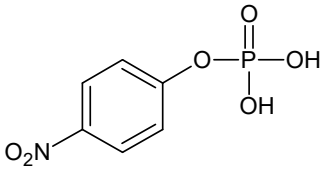
1.4 Immunassays

1.4 Wichtige Reagenzien vieler Immunologischen Assays sind die Wasserstoffperoxid-Lösung oder pNPP.

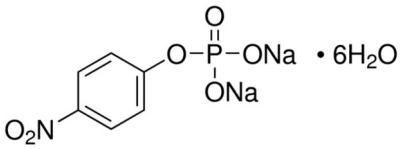
1.4.1 Welchen Zweck erfüllt die Wasserstoffperoxid-Lösung?

1.4.2 Welchen Zweck erfüllt pNPP (Strukturformel: siehe unten links)? Geben Sie die dazugehörige Reaktionsgleichung in Strukturformeln an.

1.4.3 Das pNPP wird häufig als Dinatriumsalz-Hexahydrat eingewogen.



pNPP



pNPP-Dinatriumhexahydrat

Welche Masse des Ausgangsstoff muss eingewogen werden, um 100 mL einer 0,05 molaren pNPP-Lösung zu erhalten?

2. Elektrophoresen und Blottings

2.1 Ein Gemisch aus 3 Proteinen wird mittels einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

- *Protein1*: Molekülmasse: 36000 Da, bestehend aus 327 Aminosäuren, IEP = 5,6
- *Protein2*: Molekülmasse: 22200 Da, bestehend aus 191 Aminsäuren, IEP = 7,7
- *Protein3*: Molekülmasse: 27900 Da, bestehend aus 240 Aminosäuren, IEP = 6,1

a) Begründen Sie jeweils kurz, welchen Einfluss es auf die Trennung bzw. auf die Lage der Banden hat, wenn die Acrylamidkonzentration (beide Komponenten) erhöht wird.Begründen Sie jeweils kurz, welchen Einfluss es auf die Trennung bzw. auf die Lage der Banden hat, wenn ein pH-Gradient im Gel vorliegt und kein SDS eingesetzt wird.

b) Zeichnen Sie zu 2.1.b) vollständig beschriftete Skizze des Gels nach der Auftrennung (incl. Angabe, wo der Pluspol und wo der Minuspol sich befindet)

c) Nach der Trennung liegt wegen der ähnlichen Größe der Verdacht nahe, bei *Protein2* könnte es sich um ein bestimmtes menschliches Wachstumshormon (*Somatotropin)* handeln. Beschreiben Sie, ausgehend vom aufgereinigten, isolierten Protein, die wesentlichen experimentellen Schritte um dies mit einem immunologischen Nachweisverfahren zu überprüfen. Beschränken Sie sich auf die Darstellung von nur einer Möglichkeit.

d) Zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge *(Protein1+Protein2+Protein3)* wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde mit BSA (bovines Serumalbumin) verschiedene Kalibrierlösungen hergestellt und die Absorbanz gemessen. Es ergab sich ein sehr guter linearer Zusammenhang, die entsprechende Kalibriergeradengleichung bei Auftragung der Absorbanz gegen die Proteinkonzentration

in g/L lautet: y = 0,561 * x + 0,00047. Die Absorbanz der Probelösung lag bei A = 0,954. Wie groß ist die in 250 mL Probelösung enthaltene Masse an Protein?

e) Begründen Sie kurz, warum es sich bei dem erhaltenen Ergebnis nur um einen ungefähren Wert handeln kann.

3. Weitere gemischte Aufgaben

3.1 Der Begriff „Marker“ wird sowohl bei Elektrophoresen als auch bei Immunoassays benutzt, hat aber jeweils eine unterschiedliche Bedeutung.

a) Beschreiben Sie kurz die Bedeutung des Wortes „Marker“ im Bereich der Elektrophoresen und im Bereich der Immunoassays?

b) In einem Immunoassay werden Antikörper mit der Bezeichnung rabbit *anti-mouse* benutzt. Wie werden solche Antikörper hergestellt und welchen Vorteil bietet ihre Verwendung im ELISA?

c) Neben ihrem Einsatz in der Bioanalytik werden monoklonale Antikörper auch therapeutisch eingesetzt. Erklären Sie den therapeutischen Nutzen an einem Beispiel.

d) Erklären Sie kurz den Unterschied zwischen „humanen“ und „humanisierten“ Antikörpern.

e) Für einen Immunoassay werden 500 mL eines Essigsäure/Calciumacetat-Puffers mit einer Gesamtacetatkonzentration von c(HAc+Ac) = 250 mmol/L benötigt. Der Puffer soll durch eine Essigsäurelösung mit c(HAc)=2 mol/L und Calciumhydroxid ($Ca(OH)_2$) unter Verwendung eines pH-Meters hergestellt werden. Berechnen Sie das benötigte Volumen an Essigsäurelösung und geben Sie alle wesentlichen Herstellungsschritte stichwortartig wieder.

3.2. Gegen ein proteinäres Antigen wurden in einem Immunisierungsversuch polyklonale Antikörper hergestellt und anschließend über eine Immunchromatographie (Affinitätschromatographie) aufgereinigt.

a) Welchen Zweck erfüllen *Adjuvanzien* und *Protein A* bei dem Verfahren?

Ein Proteingemisch, in dem das Antigen vermutet wird, soll über eine „diskontinuierliche PAGE“ in seine Bestandteile aufgetrennt werden.

b) Erläutern Sie kurz was mit Begriff „diskontinuierlich“ gemeint ist, und was durch diese Vorgehensweise erreicht werden soll.

c) Das Protein soll aus der Bande im Gel wieder herausgelöst werden, so dass es wieder frei in Lösung vorliegt. Beschreiben Sie eine Methode mit der das bewerkstelligt werden kann.

d) Für die Elektrophorese werden 100 mL einer Acrylamidlösung mit einem Gehalt von β(Acrylamid) = 300 g/L benötigt. Sie soll durch Mischen zweier Lösungen mit den Gehalten β(Acrylamid) = 400 g/L und β(Acrylamid) = 150 g/L hergestellt werden. Berechnen Sie, welche Volumina der beiden Lösungen gemischt werden müssen.

Lösungshinweise ohne Gewähr

1.1

a) Es handelt sich um ein Sandwich-Verfahren in der indirekten Variante (manchmal auch **double sandwich ELISA** genannt)

- Als Fänger-AK auf den Kavitätenböden werden benutzt: *murine, monoklonale AK gegen Epitop 2* des α-Tub *(mouse anti-α-Tub_2)*. *Begründung:* Hierzu nimmt man vorzugsweise keine polyklonalen AK, da diese teilweise auch an Epitop 1 binden. An dieses Epitop 1 soll aber frei bleiben, damit anschließend der zweite AK daran binden. Natürlich muss man damit leben, dass ein gewisser Teil der monoklonalen Antikörper falsch herum an die Platte bindet und als Fänger-AK damit ausfällt. Die Effekte werden durch die Kalibrierung allerdings mit berücksichtigt und beeinflussen die Genauigkeit des Verfahrens deshalb kaum..

  Würde man den *monoklonalen AK von Kaninchen gegen Epitop 1* als Fängerantikörper nutzen, so würde auch ohne α-Tubulin ein falsch positives Signal erhalten werden (= *„ hohe Hintergrundaktivität“*). Denn auch hier würde ein gewisser Anteil der AK falsch herum an die Platte binden. An die konstanten Regionen dieser falsch herum gebundenen Kaninchen-AK würde am Ende der markierte Sekundärantikörper (*goat **anti-rabbit** IgG (markiert mit HRP)* binden können, und ein Signal erzeugen (obwohl kein α-Tubulin enthalten ist).

- Als zweiter Antikörper wird nun ein AK benötigt, der an Epitop 1 bindet. Dieser zweite AK im Sandwich-ELISA wird auch Detektions-AK genannt. Hier handelt es sich um *monoklonale AK von Kaninchen gegen Epitop 1 von α-Tub (rabbit anti-α-Tub_1).* Prinzipiell wäre hier auch die Benutzung polyklonaler AK möglich, allerdings gibt es im zur Verfügung stehehenden Angebot keinen Sekundär-AK der daran binden könnte.

- Als Nachweis-AK wird jetzt noch ein enzymmarkierter Sekundär-AK benötigt. Er muss sich gegen den Kaninchen-AK richten. Deshalb kommt nur der Antikörper mit dem Etikett: *„goat anti-rabbit IgG (markiert mit HRP)“* in Frage.

b) Ein *Sandwich-ELISA (direkte Variante)* kann auch ohne Sekundär-AK durchgeführt werden. Dann muss der Detektion-AK markiert sein. Weiterhin kann ein *indirekter ELISA zum Ag-Nachwies* durchgeführt werden, bei dem die Platte mit dem Antigen gecoatet werden.

c) [Berücksichtigung der Aliquotierung]: Wenn in 250 µL der Verdünnung 55 ng enthalten sind, dann sind in 1000 µL der Verdünnung insgesamt 220 ng enthalten. Diese Masse ist ursprünglich auch in 35 µL des Zellextrakts.

[Berechnung der Konzentration]:

$$\beta \approx \frac{220\,ng}{35\,\mu L} \approx 6{,}2857\,\frac{ng}{\mu L} \approx 6{,}2857\,\frac{10^{-3}\,\mu g}{10^{-6}\,L} \approx 6286\,\frac{\mu g}{L}$$

1.2

a) 1: Sekundär-AK (gecoatet auf Platte). 2: Primär-AK gegen Testosteron (z.B. murines IgG anti-Tesoteron). 3: natives Antigen (hier: Testosteron). 4: enzymmarkiertes Antigen (enzymmarkiertes Testosteron). 5: Substrat 6: Produkt (z.B. Farbstoff)

b) Es handelt sich um einen kompetitiven ELISA. Natives Testosteron und enzymmarkiertes Testosteron konkurrieren um die Paratopregionen des Primär-AK.

Arbeitsschritte (stichwortartig): Coaten der Sekundär-AK., evtl. Waschschritte, Abblocken der noch freien Bindungsstellen (z.B. mit BSA), Inkubation mit Primär-AK; evtl. Waschschritte; Inkubation mit einer Lösung die neben dem Analyten (natives Testosteron) auch eine bestimmte Menge markiertes Testosteron enthält (die gleiche Menge

wie sie auch bei den Kalibrierlösungen benutzt wurde –siehe unten); evtl. Waschschritte, Inkubation mit Substrat; Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion abgestoppt und fotometrisch quantifiziert; Die Auswertung erfolgt mit einer Kalibrierkurve, die durch Messung von Kalibrierlösungen aufgenommen wurde, d.h. von Lösungen die neben der Portion an markiertem Testosteron auch einen bekannten Gehalt an nativem Testosteron besitzen.

c) Beim Sandwich-ELISA muss das Antigen mindestens 2 Epitope besitzen die von 2 Antikörpern gebunden werden können. Nur so kann ein Sandwich (AK-Ag-AK) entstehen. Beim kompetitiven ELISA ist das nicht nötig, weil an das Ag nur ein AK bindet. Diese Methode kann also auch bei kleineren Ag angewendet werden.

d) Meerrettichperoxidase und alkalischer Phosphatase

1.3 a) + b) gemeinsam beantwortet

a) Der markierte (*) AK* (hier: monoklonaler AK1* gegen Hämoglobin mit Gold-Markierung) liegt auf der Auftrageregion eingetrocknet vor. Kommt er mit der Probeflüssigkeit in Berührung, kann er sich mit dieser weiterbewegen und mit dem Hämoglobin (Hb) einen löslichen Immunkomplex bildet: **Hb-AK1***.

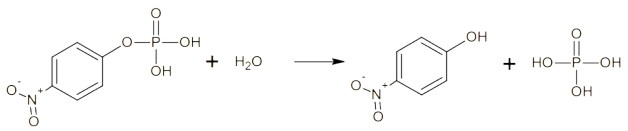
Auf der Testregion, also dort, wo im positiven Fall ein roter Strich erscheint, ist der andere AK gegen Hämoglobin (Hb) fest fixiert. Hier werden die Hb-AK* Immunkomplexe, die vorbei kommen eingefangen. Es liegt dann folgender Nachweiskomplex vor: **AK2-Hb-AK1*** . Der Betrachter kann das als roten Strich erkennen, weil der rote Goldfarbstoff hier aufkonzentriert wird. Der Test verläuft also *positiv* auf Hb. *Achtung:* AK2 ist kein Sekundär-AK, wie die *„2“* evtl. suggeriert, sondern auch ein Primär-AK!

Auf der Kontrollregion ist der *Sekundärantikörper* (also ein AK, der sich gegen andere AK richtet) fixiert, hier AK3 genannt. In diesem Fall sind es die polyklonalen Maus-AK3, die sich gegen menschliche AK1* richten, die Hb binden. Egal ob in der Probe Hb vorhanden war, hier wird AK*(-Überschüsse) in jedem Fall gebunden: **AK3-AK1***. Es erscheint also auf jeden Fall ein roter Strich, wenn der Weitertransport funktioniert und die biochemischen Reagenzien alle intakt waren.

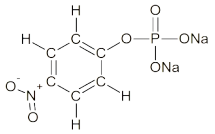
1.4

1.4.1*vgl. AB/Infotext zu den Markierungsarten bei Immunassays.* H_2O_2 ist ein Cosubstrat der Meerrettichperoxidase (HRP) und dient als Elektronenakzeptor zur Oxidation des chromogenen Substrats,

1.4.2 *vgl. AB/Infotext zu den Markierungsarten bei Immunassays.* pNPP ist das Substrat der alkalischen Phosphatase



Mit expliziten Atomsymbolen:



1.4.3 $M(Na_2C_6O_6H_4N_1P_1 \cdot 6H_2O) \approx 371$ g/mol

n(pNPP) = 0,1 L · 0,05 mol/L = 0,005 mol
Es werden also 0,005 mol $Na_2pNPP \cdot 6H_2O$ benötigt. Sie wiegen m ≈ 371 g/mol · 0,005 mol ≈ 1,86 g.

2.1

a) Erhöhung der Acrylamidkonzentration/Bisacrylamid-Konzentration lässt das Netz engmaschiger werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einem solchen Gel ist verlangsamt.

b) Es liegt nun eine isoelektrische Fokussierung vor. Die Proteine konzentrieren sich in dem Gelbereich auf, dessen pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht.

c) siehe Unterlagen

d) Blotting: Übertragen der Proteine auf eine Membran unter Zuhilfenahme des elektrischen Stroms. Abblocken der noch freien Bindungsstellen (z.B. mit BSA). einfachste Nachweismethode: Inkubation mit anti-Somatotropin AK die mit Enzym oder Radionuklid markiert wurden. Waschschritte. Anschließend Detektion (evtl. nach Substratzugabe).

ODER

Elektroelution des Proteins aus dem Gel oder chemische Auflösung des Gels. In beiden Fällen liegt dann Somatopropin wieder in Lösung vor. Damit charakteristisch gefaltete Stellen im Protein vorhanden sind, darf jedoch kein SDS zugegen sein. Anschließend: Somatotropin-Identifizierung mittels ELISA.

e)

$$0,954 = 0,561 \cdot x + 0,00047 \Rightarrow x = 1,694 \frac{g}{L}$$

Das heißt in 250 mL sind 0,424 g (424 mg) enthalten.

f) Die Kalibrierung erfolgt mit BSA, beim Analyten handelt es sich aber nicht um BSA.

3.1

a) Elektrophoresen: Referenzproteingemisch mit proteinären Komponenten bekannter Molekülmassen. Häufig „Proteinleiter“ oder „ladder“ genannt. Bei Immunassays ist hier die angekoppelte Struktur gemeint, die zur Identifizierung genutzt wird: ELISA: angekoppeltes Enzym. RIA: Radionuklid.

b) Indem man einem Kaninchen Maus-Serum spritzt (das Maus-AK enthält). Das Kaninchen bildet nun ein polyklonales AK-Gemisch gegen Maus-AK. Es handelt sich um Sekundär-AK. Die Detektion mit markierten Sekundär-AK im ELISA bietet große Vorteile. siehe U-Unterlagen.

c) Markierte monoklonale AK können sich gegen Rezeptoren richten, die in besonders großer Anzahl auf Krebszellen bestimmter Tumorarten vorkommen. Sie können z.B. mit Radionukliden versehen sein, die dann am Ort der Krebszellen diese mit ionisierender Strahlung bekämpfen. Gezielterer Angriffsort als bei der konventionellen Chemotherapie.

d) siehe Unterlagen

e) Wenn c(Ac) = 250 mmol/L Acetat, dann müssen in 500 mL 125 mmol Acetat vorliegen. D.h. es werden 125 mmol Essigsäuremoleküle vorgelegt, denn diese Portion enthält auch 125 mmol Ac (als HAc). Durch $Ca(OH)_2$ wird nun ein Teil des HAc in Ac^- überführt, die Gesamtmenge Ac^-+HAc bleibt jedoch erhalten. Da die Essigsäure 2-molar ist (2 mol HAc pro Liter), sind 125 mmol in 62,5 mL enthalten (mit Dreisatz nachrechnen). Dieses Essigsäurevolumen wird etwas mit Wasser verdünnt und dann so lange $Ca(OH)_2$ darin aufgelöst, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist (z.B. pH = 5). Anschließend füllt man mit Wasser unter Mischen auf 500 mL Gesamtvolumen auf!

3.2 hier um Teil nur stichwortartige Antworten

a) **Adjuvanzien:** Hilfsstoffe, die mit dem Antigen an ein Tier verabreicht werden, damit die Immunantwort stärker ausfällt. Häufig werden solche Hilfsstoffe auch Impfseren zugegeben, um den Antigengehalt des aktiven Impfstoffs gering halten zu können (z.B. Kostenargumente).

Protein A: Es handelt sich um ein Protein, das spezifisch an Antikörper an der konstanten Region bindet. Es wird im Biolabor genutzt um Antikörper aus einem Proteingemisch zu isolieren/antzureichern. Ursprünglich stammt es aus *Staphylococcus aureus*, der durch das umgekehrte binden der gegen ihn selbst gerichteten Antikörper, diese unschädlich machen kann.

b) Bei der diskontinuierlichen PAGE wird vor das Trenngel noch das Sammelgel geschaltet, damit die Proteine der Probe alle Zeitgleich in das Trenngeld wandern. Es werden dadurch schärfere Banden erhalten.

c) Auflösung des Gelmatrix mit bestimmen Chemikalien oder Elektroelution.

d) Berechnung mit Mischungsgleichung oder Mischungskreuz möglich.