

## **Kurs “Antikörper: Werkzeuge der Diagnostik“**

Veranstalter: Freie Universität Berlin  
Institut für Immunologie  
Veranstaltungsort: Robert-von-Ostertag-Str. 7-13  
14163 Berlin, R. 236  
Tel. 838 71 246  
E-Mail: b.sonnenburg@fu-berlin.de

Betreuer: Prof. Dr. Susanne Hartmann  
Lisa Käbisch  
Bettina Sonnenburg

**Ziel:** Qualitativer und Quantitativer Nachweis von Antigenen und Antikörpern

### **1.Kurstag**

SDS PAGE und qualitativer Antigennachweis:

**Teil A: Auftrennung von Nematodenantigenen über SDS-PAGE**

**Teil B: Transfer auf Nitrocellulosefolie**

**Teil C: Start des Western-Blots mit Maus-Serum**

### **2.Kurstag**

ELISA und quantitativer Antikörpernachweis:

**Teil A: ELISAs mit verschiedenen Nematodenantigenen und Serumverdünnungen**

**Teil B: Entwicklung des Western-Blots**

## 1. Kurstag

**Teil A: Auftrennung von Nematodenantigenen über SDS-PAGE**

**Teil B: Transfer auf Nitrocellulosemembran**

**Teil C: Western-Blot mit infizierten Seren**

### **Teil A: Auftrennung von Antigenen über SDS-PAGE**

#### **Ziel:**

Mit Hilfe der SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer des Antigens auf eine Trägerfolie nebst Western-Blot wollen wir die Quantität und Qualität der hergestellten Nematodenproteine überprüfen.

#### **Theoretischer Hintergrund:**

In der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese können die Proteine durch einen Elektrotransfer auf eine feste Trägerfolie (Nitrocellulose-Folie) gebracht werden und stehen dann für immunologische Nachweisverfahren zur Verfügung.

#### **Materialien:**

- 12%iges Polyacrylamid-Gel in Elektrophoresekammer
- Stromquelle für SDS-PAGE-Kammer und Transferkammer
- Thermoblock zum Erhitzen der Proben auf 95°C
- Hamilton-Spritze
- 1,5ml Reaktionsgefäße und Gefäßständer
- SemiDry-Transferkammer, Plastikwanne, Filterpapier,
- Nitrocellulosemembran
- verschiedene Nematodenantigene in PBS Puffer

#### **Arbeitsschritte:**

1. Die Geltaschen auf der Glasplatte markieren und den Kamm vorsichtig entfernen.
2. SDS- Laufpuffer in die Apparatur einfüllen, bis oberen Kammerrand, die Taschen müssen gut bedeckt sein.
3. Antigen mit 3x SDS-Probenpuffer wie im Layout angegeben mischen und 3 Min. bei 95°C erhitzen. Es empfiehlt sich, die Antigene, z.B. für Spur 2 und 7, in einem Eppi anzusetzen, dann mit doppelter oder besser mit dreifacher (3x 4µl + 3x 2µl) Menge, so daß ausreichend Probenmaterial zum Beladen vorhanden ist.
4. Proben und Marker kurz abzentrifugieren
5. Proben und Marker wie im Layout beschrieben mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen einfüllen.

### Layout für SDS-PAGE:

Spur	Probenvol. in $\mu$ l	Probenpuffer in $\mu$ l	Probe
1	8	-	prestained Protein-Marker
2	4	2	H.poly-AG 20 $\mu$ g
3	4	2	H.diminuta-AG 20 $\mu$ g
4	3	1,5	A.viteae-AG 20 $\mu$ g
5			
6	8	-	prestained Protein-Marker
7	4	2	H.poly-AG 20 $\mu$ g
8	4	2	H.diminuta-AG 20 $\mu$ g
9	3	1,5	A.viteae-AG 20 $\mu$ g
10			

8. Elektrophorese bei 140-160V, ca. 60mA für ca. 1h laufen lassen.

### Teil B + C: Transfer auf Nitrocellulosemembran und Western-Blot mit Maus-Serum

#### Ziel:

Mit Hilfe des Western-Blots können Antigene bzw. Proteine, die vorher über SDS-PAGE aufgetrennt wurden, über polyklonale Seren aus infizierten Spezies, spezifisch nachgewiesen werden.

#### Theoretischer Hintergrund:

Der Western-Blot kann, im Gegensatz zum ELISA, eine qualitative Aussage über den Nachweis einzelner Proteine aus einem Gemisch machen, da diese vorher über SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Hierfür werden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die auf die NC-Membran gebrachten Proteine können anschließend mit einem Antiserum, das z.B. gegen H. polygyrus gerichtet ist, detektiert werden. Die Antigen-Antikörperkomplexe können anschließend über einen sekundären Antikörper, gekoppelt (konjugiert) mit einem Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase), markiert werden.

Der Antigen-Antikörperkomplex kann jetzt mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Es entstehen dunkelblaue bis lila Farbreaktionen an den Stellen der Antigen-Antikörper Reaktion.

## **Teil B: Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose Folie über SemiDry-Methode**

1. Platten aus der Elektrophorese-Apparatur ausspannen und voneinander trennen.
2. Das Sammelgel von dem Trenngel entfernen und verwerfen.
3. Sandwich aufbauen: Hierzu werden Filterpapier und Nitrocellulose in einer kleinen Plastikwanne mit SemiDry-Transferpuffer getränkt. Auf die Blot-Apparatur wird jetzt erst eine Lage feuchtes Filterpapier gelegt, darauf die NC-Membran und ggf. Luftblasen durch vorsichtiges Ausstreichen mit abgebrochener Plastikpipette entfernt.
4. Das SDS-Gel wird auf die Nitrocellulose-Folie gegeben und mit feuchtem Filterpapier abgedeckt.
5. Vorsichtig den Deckel der Transferkammer auflegen und die Elektroden anlegen.
6. Der SemiDry-Transfer findet bei 80mA/ Gel für etwa 1 Stunde statt, kann aber auch über Nacht laufen, wenn man einen Tank-Blot durchführt, ebenfalls bei 80mA.
7. Die Transfer-Kammer wird nach dem Lauf vorsichtig geöffnet und, ebenfalls vorsichtig, die oberen Filterpapiere entfernt.
8. Die transferierten Proteine können nun auf der Nitrocellulose sofort über Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert werden (siehe unten).

## **Teil C: Western-Blot mit Maus-Serum**

1. Folien in 5% Milchpulver/TBS 30 Minuten bei RT schüttelnd blockieren
2. 1. Antikörper: Serum von Mäusen 1:200 in 5% Magermilch (MM) in TBS, 1-1,5h, RT, schwenken oder über Nacht bei 4°C
3. **3x ca. 3Minuten waschen** mit TBS-T (TBS+0,1% Tween), dabei schwenken
4. 2. Antikörper: Ziege anti Maus-AP, 1:2500 in 5% MM/TBS, 1-1,5h, RT, schwenken
5. **3x waschen** in TBS-T, **1x waschen** in TBS, schwenken
6. Substrat: 10ml alkalische Phosphatase-Puffer (pH 9) + 66µl NBT+33µl BCIP
7. Stopplösung: A. bidest.

## 2.Kurstag

**Teil A: Nachweis von Antikörpern gegen spezifische Nematodenantigene mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

**Teil B: Western Blot des SDS-Gel-Transfers vom Vortag entwickeln**

**Teil A: Nachweis von Antikörpern gegen Nematodenantigen mittels ELISA**

### **Ziel:**

Mit Hilfe des ELISA werden Nematodenantigene nachgewiesen und die Stärke der Antikörperantwort gegen Nematodenantigen im Serum infizierter Mäuse, mit dem Darmnematoden *Heligmosomoides polygyrus*, quantifiziert. Der Test erlaubt eine Aussage über Spezifität und Sensitivität der Antikörperantwort.

### **Theoretischer Hintergrund:**

Der ELISA ist eine quantitative Nachweismethode von spezifischen Antikörpern, die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind. Hierbei wird lösliches Antigen (z.B. Nematodenantigen) durch Inkubation an Plastik-Mikrotiterplatten gebunden. Dieses Antigen wird mit einem zu testendem Serum inkubiert. Die entstandenen Immunkomplexe werden mit enzymmarkierten Antikörpern („Konjugat“) nachgewiesen. Dazu werden z.B. anti Kaninchen-Antikörper mit Enzym, z.B. Peroxidase oder alkalischer Phosphatase gekoppelt. Diese Antikörper binden an den Immunkomplex. Es wird eine Reaktion durchgeführt, bei der ein Substrat durch das entsprechende Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt wird. Die abgestoppte Farbreaktion wird photometrisch gemessen.

Mit Hilfe des ELISA kann eine große Anzahl von Tests in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden und er bietet eine gute Quantifizierbarkeit der Reaktion, da die Stärke der Farbreaktion direkt proportional zur Konzentration der Serumantikörper ist.

### **Materialien:**

- mit Antigen beschichtete 96well Mikrotiterplatte + Deckel
- Lösungen/ Puffer:
  - Na-Carbonat-Puffer, pH 9,5, zum Beschichten des Antigens
  - PBS pH7,4
  - 3% BSA (Bovines Serum Albumin) in PBS
  - Tween 20, 0,05% in PBS
  - TMB-Substrat: 1 TMB-Tablette in 10,5 ml Phosphat-Citrat-Puffer pH5 + 5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - Stopplösung: 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 1. Antikörper: anti-H.polygyrus-Mausserum bzw. naives Mausserum
- 2. Antikörper bzw. Konjugat: Ziege-anti Maus-AK mit Peroxidase gekoppelt
- ELISA-Reader (Filter: 450nm, 630nm), ELISA-Washer

**Arbeitsschritte:**

Die Platten werden einen Abend vorher beschichtet, das Antigen hat eine Endkonzentration von  $50\text{ng}/50\mu\text{l} = 1\mu\text{g}/\text{ml}$ .

1. Platten 3x mit PBS/ 0,05% Tween waschen, nicht gebundenes Protein wird hierbei ausgewaschen.
2. Mit  $200\mu\text{l}$  3% BSA in PBS die unspezifischen Bindungsstellen abdecken. Inkubation: 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ .
3. Platten **3x mit PBS/0,05% Tween waschen.**
4. Testseren lt. Pipettierschema 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:10.000 in BSA/PBS verdünnen, Negativ-Kontrollserum 1:250 und 1:10.000 und  $50\mu\text{l}$ / Loch pipettieren. 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubieren.
5. Platten **3x mit PBS/0,05% Tween waschen.**
6. Konjugat in 3%BSA/PBS verdünnen: 1:20.000 und  $50\mu\text{l}$ /Loch pipettieren. 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubieren.
7. Substratlösung vorbereiten:  
 $10,5\text{ml}$  Phosphat-Citratpuffer, pH5 +  $5\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  + 1 TMB-Tablette, abdunkeln!  
**(Achtung: Kittel + Handschuhe! Das Reagenz ist krebserregend!)**
8. Platten **3x mit PBS/0,05% Tween waschen.**
9.  $50\mu\text{l}$ /Loch Substratlösung pipettieren und ca. 30 Minuten **abgedunkelt** bei RT entwickeln lassen.
10. Mit  $25\mu\text{l}$  1M Schwefelsäure **(Achtung ätzend! Kittel + Handschuhe!)** Reaktion abstoppen.

**Auswertung:**

Die Platten werden bei  $450\text{nm}$  (Referenzfilter  $630\text{nm}$ ) im ELISA-Reader gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Ansätze bestimmt.

## ELISA Plattenaufteilung

	H. poly			H. diminuta				A. viteae						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12
<b>A</b>	Blank	Blank	Blank	\	Blank	Blank	Blank	\	Blank	Blank	Blank	\		
<b>B</b>				\				\				\	1:250	H. Poly Infektionsserum
<b>C</b>				\				\				\	1:500	
<b>D</b>				\				\				\	1:1000	
<b>E</b>				\				\				\	1:2000	
<b>F</b>				\				\				\	1:10.000	
<b>G</b>				\				\				\	1:250	
<b>H</b>				\				\				\	1:10.000	

Blank: Antigen + sekundärer Antikörper