

Immunelektrophorese



1. Lieferumfang

Die folgende Auflistung ermöglicht Ihnen, die Vollständigkeit der erhaltenen Materialien zu überprüfen oder zu kontrollieren, ob die Materialien, die Sie schon besitzen, vollständig sind.

- Rinderserum;
- Rinderserum mit Krankheitserregern;
- Überstand (- IgG);
- Präzipitat (+ IgG);
- Rinderantiserum;
- Anti-IgG;
- Anti-Rinderserum-Albumin (Anti-BSA);

Achtung!

Alle diese Produkte müssen bei 4°C aufbewahrt werden.

- Bromphenolblau
- Barbitol-Natrium-Puffer
- 2 Filme zur Immunelektrophorese (bei Zimmertemperatur aufbewahren)
- 2 Plastikboxen
- 20 Mikropipetten (5 µl)
- 20 Mikropipetten (100 µl)
- 2 Pipettierhilfen (Peleusball) für Mikropipetten

Notwendiges Zubehör:

- Elektrophoresekammer (z.B. [201.3386](#))
- elektrische Stromversorgung für die Kammer
- destilliertes Wasser (oder stilles Mineralwasser)

- Chlorwasserstoff (HC1) oder Essig

weiteres Zubehör

- automatische Mikropipetten mit festem oder variablem Volumen
- Spitzen für Mikropipetten (dieses Zubehör wird anstelle der mitgelieferten kapillaren Mikropipetten vorgeschlagen)

2. Versuchsziel

Ziel des Versuchs ist

- der immunologische Nachweis zahlreicher Serumproteine
- die Darstellung der Spezifität und Sensibilität immunologischer Reaktionen

3. Versuchsprinzip

Die Immunreaktion von Antikörper (Ig, Immunglobuline) und Antigen (Ag) wird häufig zur Analyse komplexer Mischungen biologischer Makromolekülen verwendet. Immunreaktionen zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie in der Lage sind:

- einen bestimmten Bestandteil einer Mischung wieder zu erkennen (Spezifität)
- kleine Mengen (Picogramm !) eines gesuchten Antigens zu bestimmen (Sensibilität)

4. Methode

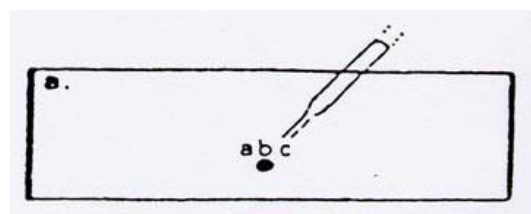
a) Allgemeine Betrachtungen

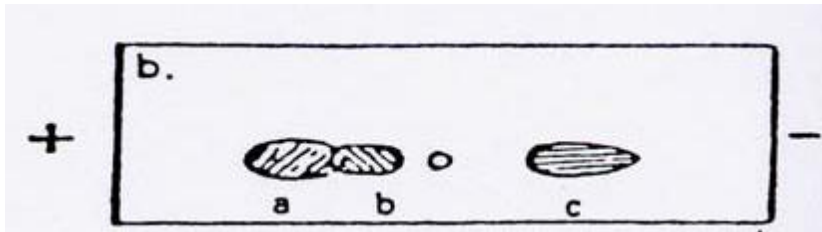
Bei Proteinen handelt es sich Makromoleküle aus verschiedenen Aminosäuren. Diese haben auf Grund ihres Zwitterion-Charakters unterschiedliche isoelektrische Punkte, die sich über die gesamte Breite der pH-Skala verteilen. In einem elektrischen Feld können diese Proteine nach der Dichte ihrer Ladung getrennt werden, wobei unterschiedliche Elektrophoresetypen zum Einsatz kommen – meist wird jedoch eine Trennung in Agarose vorgenommen. Eine weitere Trennung der bereits vorgetrennten Proteine (Ag) und des Antiserums (enthält Antikörper (Ig)), zeigt die unterschiedlichen Proteine eines Gemischs auf, indem sich durch die Ig-Ag-Paarung ringförmige Immunkomplex-Präzipitate bilden.

Die Immunelektrophorese verläuft in zwei unterschiedlichen Schritten: einer ersten Elektrophorese des Proteingemischs (Ag), gefolgt von einer weiteren Trennung. Diese zweite Trennung erfolgt von einer in das Gel geschnittenen Rinne aus und wird parallel zur Wanderung der ersten Elektrophorese durchgeführt.

b) Schematische Darstellung der Immunelektrophorese (IEP)

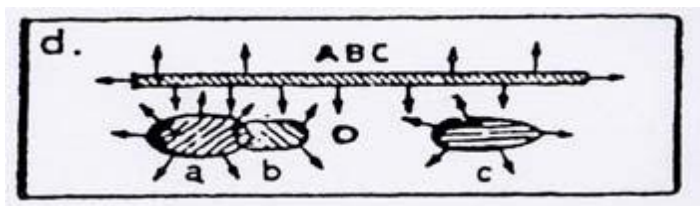
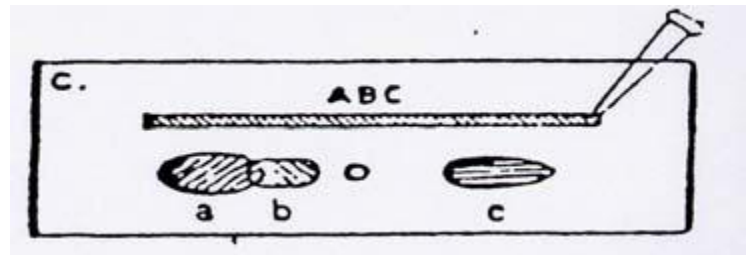
Die zu analysierende Flüssigkeit wird in eine Geltasche gegeben, wobei sich das Agarosegel in einer mit Pufferlsg. (pH 8,6 - 8,2) gefüllten Elektrophorese-kammer befindet.





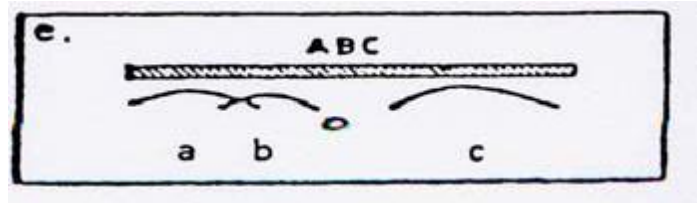
Die Komponenten werden durch den Einfluss eines elektrischen Felds entlang der Migrationsachse der Elektrophorese auseinander gezogen.

Nach dieser ersten Trennung erfolgt eine weitere Elektrophorese. Dazu wird das Antiserum in eine parallel zur Migrationsachse geschnittenen Furche gegeben.



Die zweite Trennung von Ag und Ig beginnt.

Präzipitationsbögen bilden sich dort aus, wo Ag auf Ig treffen, sofern ihre Konzentrationen denen im Äquivalenzereich entsprechen.



Position, Form, Intensität, Symmetrie eines Präzipitationsbogens sowie sein Verhältnis zu Nachbarringen sind charakteristisch und spezifisch für jedes Protein.

c) Anwendung

Die Immunelektrophorese ermöglicht eine qualitative Analyse eines Protein-Gemischs, z.B. in der klinischen Biologie (Serum, Urin, Cerebro-Spinal-Flüssigkeit) oder in der Forschung. Außerdem:

- Auffinden von Anomalien hinsichtlich des IgS-Niveaus im Serum mittels poly- und monoklonaler Antikörper verschiedenen Klassen (schwere / leichte Ketten)
- Ein Anti-Kaninchen-Antikörper gegen menschliches Serum ermöglicht es günstigenfalls 30 bis 40 verschiedene Proteine zu identifizieren.
- Bestimmung des Reinheitsgrades von Antigenen mit entsprechendem polyklonalem Anti-körper

- Monospezifität eines Antikörpers bestätigen
- Verteilung von Antikörpern in einem polyvalenten Antiserum während seiner Herstellung bestätigen

5. Versuchsprotokoll

Das Set beinhaltet zwei Immunelektrophoresefilme (und zwei Plastikboxen) um zu gewährleisten, dass zwei Elektrophoresen am gleichen Tag durchgeführt werden können. Alternativ kann eine erste Immunelektrophorese am Vorabend durchgeführt werden; so können die Endergebnisse für den folgenden Tag der Versuchsdurchführung sichergestellt und zu Vergleichszwecken präsentiert werden.

Es ist ebenfalls möglich, zur Darstellung und Verdeutlichung der Präzipitatringe die Filme zu färben.

a) Vorbereitungen

Herstellung des Barbitol-Puffers

Die Gesamtmenge der Salze (Flasche BAR) werden in 450 ml destilliertem Wasser (oder stillem Mineralwasser) unter Schütteln vollständig gelöst und der pH-Wert mit Salzsäure (HCl) oder Essigsäure (CH₃COOH) auf 8,6 eingestellt (ca. 12 ml). Die Kontrolle erfolgt mit pH-Papier oder einem pH-Meter. Dann wird der Puffer auf ein Endvolumen von 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und nach Schütteln etwa 200 ml in jeden Bereich der Elektrophoresekammer gefüllt.

Anschließend sollte der Elektrophoresefilm ausgepackt werden und in die Halterung zwischen die beiden Kompartimente gelegt werden. Die Enden des Films sollen sich an den gepunkteten Linien der Pufferlösung befinden. Erst dann erfolgt der Anschluß der Kammer an die Stromzufuhr (120 V, 20 mA).

Achtung!

Achten Sie darauf, den Film in der Fließrichtung aufzustellen: (-) an der Kathodenseite und (+) an der Anodenseite. Bei Stromquellen ist die Anode rot, die Kathode schwarz gekennzeichnet.

Mikrokapillarpipetten (5 µl et 100 µl), Sauger sowie die Serum- und Antikörperflaschen sollten griffbereit stehen.

- Ag (2-3 µl) mit Mikropipetten in die runden Taschen 1 – 7 nach dem dargestellten Schema ein-bringen (nicht über den Rand hinaus!). Zwischen jeder Probe ist die Mikropipetten unbedingt zu wechseln; es ist auch ratsam, den Peleusball zu reinigen.
- Zugabe eines Mikrotropfens Bromphenol-Blau zu bestimmten Serumproben (z.B. Taschen 1 und 3): Die Blaufärbung ermöglicht es, die elektrophoretische Wanderung zu beobachten und zeitnah zu stoppen.
- Abdecken der Elektrophoresekammer, Strom so anbringen und einschalten, dass die man eine Wanderung der Blaufärbung in Richtung Anode beobachten kann.

- Dauer der Elektrophorese: ca. 1 Stunde. Sie wird gestoppt, wenn die Färbung (kleiner blauer Fleck) im Bereich der Albumine gegenüber der Markierung "32mm" (auf dem Film) ankommt.

c) Immundiffusion

- Strom abschalten
- Entnahme des Gel und Überführung in eine der leeren Plastikboxen
- Deckel mit einem mit destilliertem Wasser befeuchteten Papier-Rechteck feuchthalten
- Auffüllen der Tropfflaschen (A-F) mit 100 µl der unterschiedlichen Antikörper gemäß Schema
- Zwischen jedem Antigentyp ist die Mikropipette unbedingt zu wechseln; es ist auch ratsam, den Peleusball zwischen den Benutzungen zu reinigen.

Achtung!!!

Erfolgt beim Einpipettieren der Proben ein Fehler, so darf nicht versucht werden das Antiserum wieder aufzunehmen: Es ist bereits in das Gel eingedrungen. Interpretieren Sie die Ergebnisse entsprechend der (gewechselten) Reihenfolge.

- exaktes Schließen der Plastikbox, die als Diffusionskammer dient
- eine Nacht bei Zimmertemperatur auf ebener Oberfläche inkubieren lassen.
- Ergebnisse nach 18-24 Stunden sichtbar machen, eine seitliche Beleuchtung auf schwarzem Hintergrund wird empfohlen

Notwendige Produkte:

- Coomassie-Blau
- Methanol
- Essigsäure
- destilliertes Wasser

Um ein Elektrophoresegel färben zu können, muss das Gel zunächst 48 Stunden lang gewaschen werden. Dazu wird es zunächst in Kochsalzlösung und dann in destilliertes Wasser gewaschen um die Proteine, mit denen keine Reaktion stattgefunden haben sowie die Salze zu beseitigen.

Anmerkung:

Um das Gel zu waschen legt man es in eine Box und lässt die entsprechende Waschlösung vorsichtig seitlich in die Box einlaufen. Niemals die Waschlösung direkt auf das Gel geben. Auf diese Art „spült“ man das Gel 1-2 mal ab. In weiteren Waschschrritten erneuert man die Waschlösung jeweils nach 5 min Inkubation des Geles damit auf einem Wippschüttler (ganz geringe rpm-Zahl – ca. drei Waschschrritte). Die Lagerung bis zur Färbung erfolgt über Nacht in destilliertem Wasser.

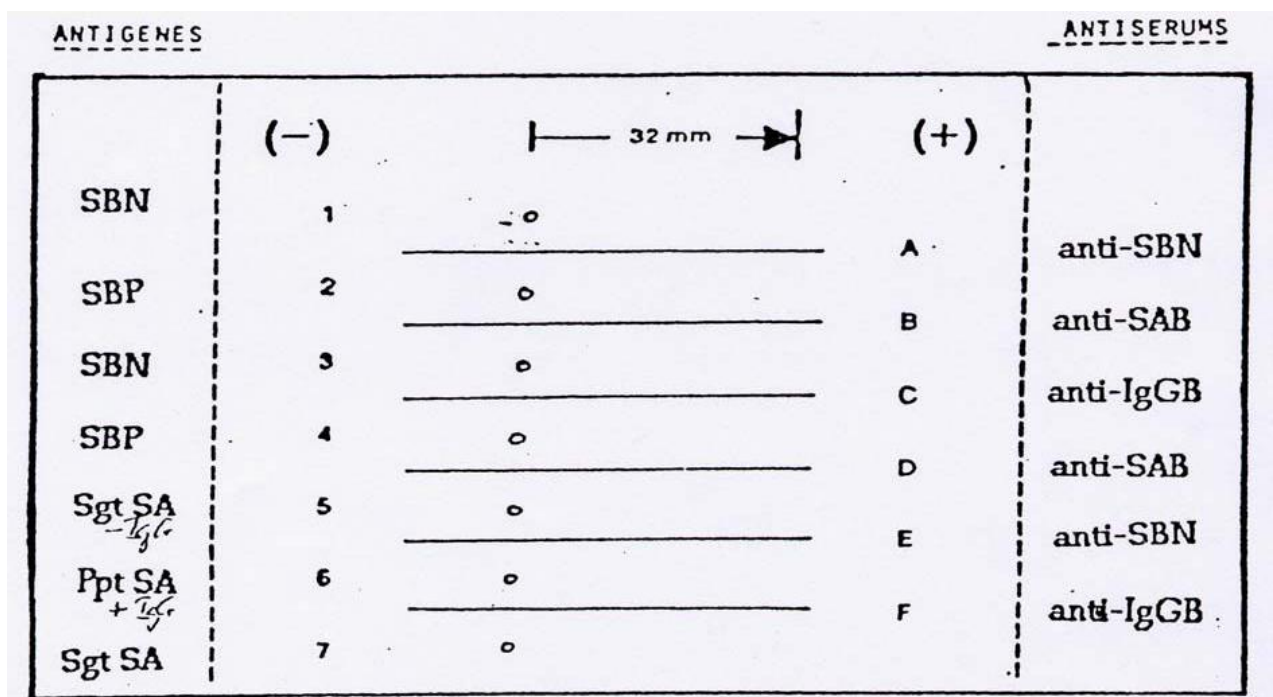
Danach kann das Gel mit einer Coomassie-Blau-Lösung (0,025 % in einem Gemisch aus Methanol: Essigsäure: Wasser (5:1:4)) eingefärbt werden. Vor Gebrauch sollte die Lösung auf Whatman-Papier filtriert werden.

30 Minuten lang einfärben (Wippschüttler wenn vorhanden !)

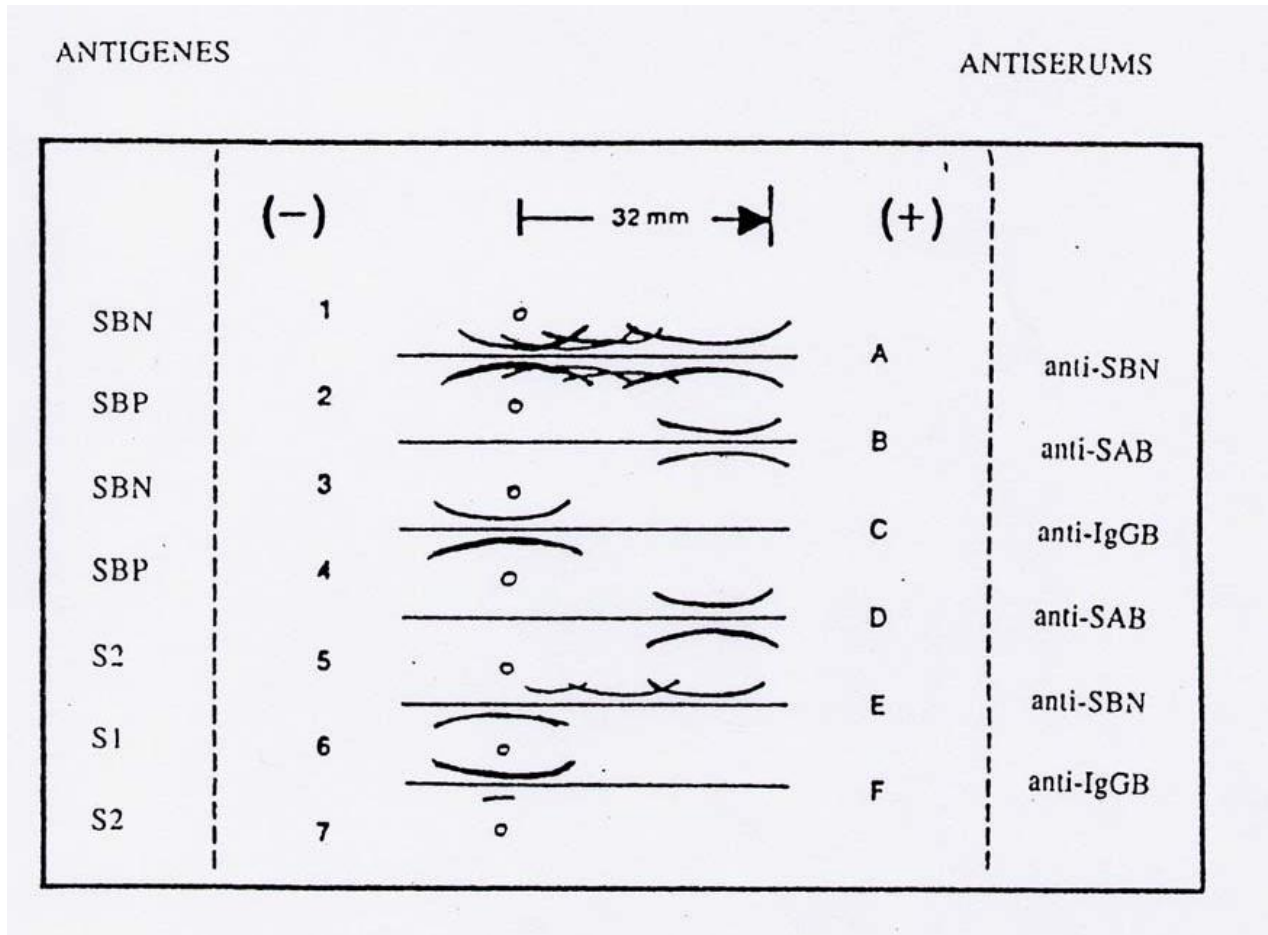
Entfärben in mehrfach erneuerten Lösungen des Gemischs Methanol: Essigsäure: Wasser (5:1:4) (siehe waschen)

Der getrocknete Film schrumpft zusammen. Er wird auf ein Blatt Papier oder einen weißen Pappkarton geklebt, um ihn lange Zeit aufbewahren zu können.

Schema der Dotplots (Punktauftragung) auf dem Immunelektrophorese-Film



Beispielschema eines Ergebnisses einer Immunelektrophorese



Antigene, die in die Taschen gefüllt werden:

- * SBN Rinderserum (alle Serumproteine)
- * SBP Rinderserum mit Krankheitserregern (alle Proteine mit vielen Antikörpern)
- * S1 Immunglobulinpräzipitat, das man durch Fragmentisierung mittels Ammoniumsulfat erhält (viele Ig)
- * S2 Überstand nach der gleichen Fragmentisierung des Serums (wenig Ig)

Antikörper, die in die Taschen gefüllt werden

- * anti-SBN = Rinderantiserum (macht die Rinderproteine sichtbar)
- * anti-SAB = Anti-Rinderserum-Albumin (macht die Rinderalbumine sichtbar)
- * anti-IgGB = Anti-Rinder-Immunglobuline (macht die Rinderantikörper sichtbar)