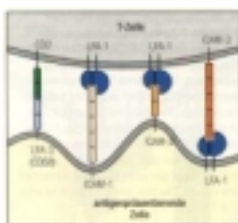
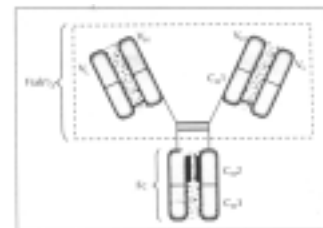
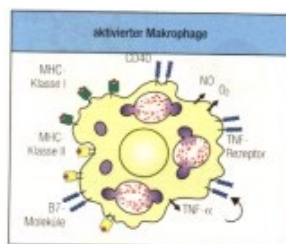


G-Block IMMUNOLOGIE

Protokollheft zu den Versuchen



Sven Enterlein
108 097 236 174
Bärbel Merkamp
108 097 235 377

Gliederung:

I	Zellkultur	2
II	Versuche	3
A	Allgemeine Anmerkungen	3
B	Versuch 1: Doppeldiffusion nach Ouchterlony	3
C	Versuch 7: Präzipitationskurve nach Heidelberger	4
D	Versuch 3: Einführung von TNP-Gruppen als Haptene	7
E	Versuch 13: ELISA - Bestimmung von Antikörpertitern in Kaninchenseren	10
F	Versuche 4 und 5: Herstellung und Anwendung von Immunadsorbentien	12
G	Versuch 23: SDS-PAGE und Western-Blot	13
H	Versuch 21: Cytokinnachweis mittels Zellproliferationstest	15
I	Durchflussscytometrie	16
J	Versuch 6: Quantitative Gelpräzipitationstechniken (Mancini)	18
K	Versuch 8: Phagozytose	20
L	RIDA Quick CIS: Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenkäse	22
M	Versuch 9: FTA-Absorptionstest	22
N	Versuch 10: Serologische Differenzierung von Bakterien	22
O	Versuch 11: Komplement-Bindungsreaktion	23
P	Versuch 12: Nachweis des Rheumafaktors (Latex-RF-Test)	23
Q	Versuch 14: Immunfluoreszenz auf Gewebedünnschnitten	23
R	Versuch 22: Aufbau eines heterogenen Avidin-Biotin-Sandwich-ELISA-Testsystems	25
S	Versuch 17: Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen anhand von Zellmarkern	27

I Zellkultur

1. Ziel des Versuchs

Die Einführung in die Zellkultur dient dazu, Zelllinien zu versorgen und den Umgang mit sterilem Arbeiten zu erlernen. In diesem Zusammenhang wurden wir auch mit der miniPERM® vertraut gemacht, in welcher wir Zellen der Zelllinie PAP X 5C10 kultiviert haben.

2. Materialien

2.1 Geräte

Im Zelllabor wurden die folgenden Geräte benutzt:

- Lamina (mit Brenner)
- Lichtmikroskop
- Zellkulturflaschen
- Greiner-Röhrchen
- sterile Pipetten (Pasteur-, Glas- und Eppendorf~)
- Neubauer-Zählkammer
- diverse Glasgefäße (für Abfall, Medienlösungen etc.)

2.2 Medien

Als Medien haben wir eingesetzt:

- DMEM für die Zellkulturen (Zusammensetzung s. Skript S. 18)
- DMEM + 10% HS (*horse serum*) in dem Produktionskompartiment der miniPERM
- DMEM + Supplement B in dem Versorgungskompartiment der miniPERM

3. Durchführung

3.1 Vorbereitungen

Jeder Praktikant erhielt eine Zellkulturflasche (ZK-Flasche), die mit Hybridomzellen verschiedener Zellklone befüllt waren. Die Zellen wurden vom Boden abgespült, und von der Suspension wurden 1-1.5 ml in eine andere Flasche pipettiert. Der Rest wurde in ein 12 ml Tube gefüllt und für Versuch 14 aufbewahrt. Danach wurden beide ZK-Flaschen mit neuem Medium (6 ml) versorgt.

Für steriles Arbeiten ist es wichtig, dass sämtliche Arbeitsgeräte unter der Lamina verbleiben, solange sie in Benutzung sind. Um Verunreinigungen zu vermeiden, müssen vor Arbeiten, die in der Sterilbank durchgeführt werden, die Hände gewaschen und mit 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Ebenso wird der Alkohol zur Desinfizierung von zu verwendenden Gefäßen und des Arbeitsplatzes selbst benutzt. Die Öffnungen und Verschlüsse sämtlicher Gefäße werden nach dem Öffnen und vor dem Schließen am Brenner abgeflammt, um Kontaminationen vorzubeugen. Beim Pipettieren ist zu beachten, dass die Pipetten keinen Kontakt mit den Gefäßrändern (v.a. von Zellkultur- und Abfallflasche) haben.

3.2 Regelmäßige Arbeiten

Da die Zellen durch ihren Stoffwechsel das Medium ansäuern, muss in regelmäßigen Abständen das Medium gewechselt werden. Angezeigt wird dies durch den Farbumschlag des Indikators (Phenolrot) von rot zu gelb. Der Mediumwechsel wurde alle zwei Tage (montags, mittwochs, freitags) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen vom Boden der ZK-Flasche mit einer Pasteurpipette abgespült und bis auf einen kleinen Rest verworfen. In die ZK-Flaschen wurden ca. 6 ml (über das Wochenende 7 ml) neues Medium eingefüllt und die Flaschen in den Brutschrank zurück gestellt. Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

Bei der miniPERM wurden regelmäßig ca. 0.5 ml aus beiden Kompartimenten zur Blutgasanalyse (pO₂, pCO₂, pH-Bestimmung) und Zellzählung entnommen. Wenn der pH-Wert zu niedrig lag (unter 6.7), wurde in dem Kompartiment das Medium gewechselt. Die zugehörigen Daten sind im Anhang I zu finden.

3.3 Sonstige Arbeiten

Zur Vorbereitung des Versuches 14 wurde aus je einer ZK-Flasche jedes Praktikanten eine *limiting dilution* hergestellt, so dass die Zellzahl 1 bis 5 Zellen pro ml betrug. Davon wurden 200 µl in jedes

Depot einer Mikrotiterplatte gefüllt, um eine Zellzahl von 0.2 bis 1 Zelle pro Depot zu erreichen. Dadurch können einzelne Klone erhalten werden.

4. Beobachtungen und Ergebnisse

Die Originalausdrucke der Blutgasanalysen der miniPERM sind als Anhang I angeheftet.

II Versuche

A Allgemeine Anmerkungen

In diesem Protokollheft wird auf die Beschreibung der Durchführung verzichtet, sofern sie sich nicht von der Vorschrift im Skript unterscheidet. Sind Änderungen vorgenommen worden, oder Versuche nicht aufgeführt, so wird dies extra aufgeführt. Dies gilt auch, wenn andere Lösungen oder Materialien benutzt wurden.

B Versuch 1: Doppeldiffusion nach Ouchterlony

1. Ziel des Versuchs

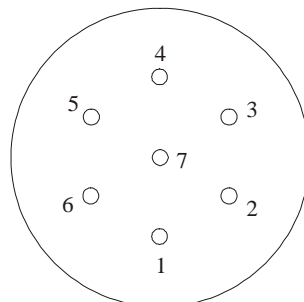
Der Versuch dient zur Bestimmung des Antikörpertiters eines Kaninchenserums und zur Untersuchung des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen Antigenen verschiedener Spezies.

2. Durchführung

2.1 Änderungen zum Skript

Der verwendete 1%ige Agar wurde mit 0.1% Natriumazid (NaN_3) versetzt, um Pilz- und Bakterienwachstum zu verhindern. Auf die Amidoschwarz-Färbung wurde verzichtet.

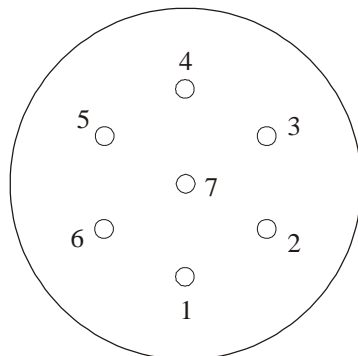
2.2 Auftragungsschema



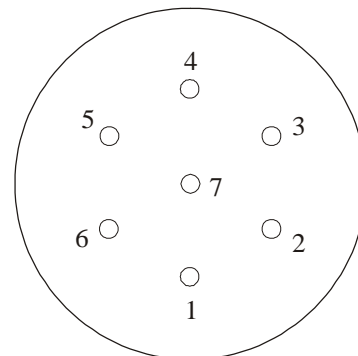
Konzentrationsbestimmung					
Platte I			Platte II		
Depot	Protein	c /mg·ml ⁻¹	Depot	Protein	c /mg·ml ⁻¹
1	HSA	0.001	1	HSA	0.06
2	HSA	0.002	2	HSA	0.125
3	HSA	0.004	3	HSA	0.25
4	HSA	0.008	4	HSA	0.5
5	HSA	0.015	5	HSA	1.0
6	HSA	0.030	6	HSA	2.0
7	anti-HSA	unbekannt	7	anti-HSA	unbekannt

Verwandtschaftsbestimmung					
Platte III			Platte IV		
Depot	Protein	c /mg·ml ⁻¹	Depot	Protein	c /mg·ml ⁻¹
1	Hund NS	1.0	1	Enten NS	1.0
2	Cerco NS	1.0	2	Puten NS	1.0
3	Schwein NS	1.0	3	Huhn NS	1.0
4	Mensch IgG	1.0	4	Mensch NS	1.0
5	Katzen NS	1.0	5	Tauben NS	1.0
6	Ratten NS	1.0	6	Maus NS	1.0
7	Rabbit-anti-Hund	1.0	7	Rabbit-anti-Huhn	1.0

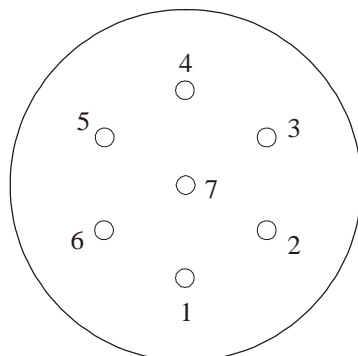
3. Beobachtungen und Ergebnisse



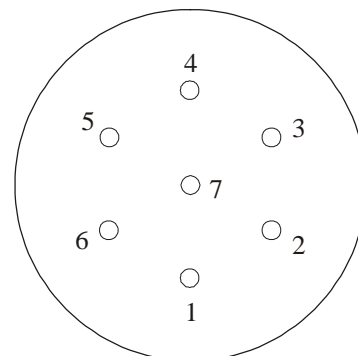
Platte I



Platte II



Platte III



Platte IV

4. Auswertung und Diskussion

Aus den oben skizzierten Präzipitationslinien der Platten I und II kann die Konzentration des anti-HSA ermittelt werden. Es gibt zwei Auswertungsmöglichkeiten:

1. Diejenige Antigenkonzentration, bei der gerade noch ein Präzipitat sichtbar ist, wird als der Titer des Antiserums definiert.
Nach dieser Definition ist der Antiserumtiter **0.06 mg·ml⁻¹**.
2. Diejenige Antigenkonzentration, bei der die Präzipitationslinie genau in der Mitte zwischen den beiden Depots liegt, wird als der Titer des Antiserums definiert.
In diesem Fall ist der Antiserumtiter **0.5 mg·ml⁻¹**.

Man erkennt deutlich, dass je nach Auswertungsmethode Unterschiede von einer Größenordnung auftreten.

Bei Platte III ist zu erkennen, dass das Hunde-Antiserum fast ausschließlich mit seinem Normalse- rum präzipitiert. Die zwei Linien deuten auf das Vorhandensein zweier Antigene hin, die von den Antikörpern erkannt werden. Außerdem ist eine schwache Linie zwischen menschlichem IgG und dem anti-Hund-Serum sichtbar, die auf eine geringe Verwandtschaft der IgGs schließen lässt.

Platte IV weist viele Präzipitationslinien auf, die eine Verwandtschaft zwischen den Vögeln anzei- gen. Dahingegen besteht kein Verwandtschaftsverhältnis zwischen Maus bzw. Mensch und Huhn.

C Versuch 7: Präzipitationskurve nach Heidelberger

1. Ziel des Versuchs

Mit dieser Methode kann die in einem Präzipitat enthaltene Antikörpermenge über die Trübungs- stärke ermittelt werden.

2. Durchführung

2.1 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Die ausgegebene 20%ige HSA-Stammlösung wurde auf $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ verdünnt und davon die wahre Konzentration über die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Von dieser Lösung ausgehend wurde die Verdünnungsreihe aufgestellt (c in $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$):

0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.5, 3.0

Es wurden jeweils 500 μl Antigen- mit 500 μl Antiserumlösung versetzt.

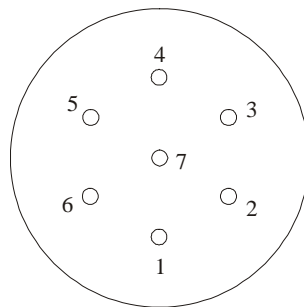
Die Messung der Trübung wurde im Photometer bei 540 nm durchgeführt (Abgleich gegen anti-HSA). Das Präzipitat wurde 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, die Überstände wurden für den Ouchterlony-Test aufbewahrt. Anschließend wurde das Pellet nur einmal mit 5 ml PBS gewaschen und in 1 ml 0.1 N NaOH gelöst.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Schon mit bloßem Auge ist eine Trübung erkennbar, die erst an Intensität zu- und dann wieder abnimmt. Die genauen Messwerte sind in der folgenden Tabelle abgedruckt:

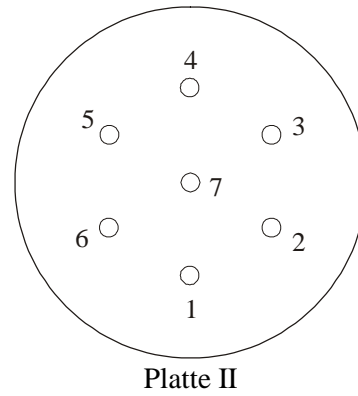
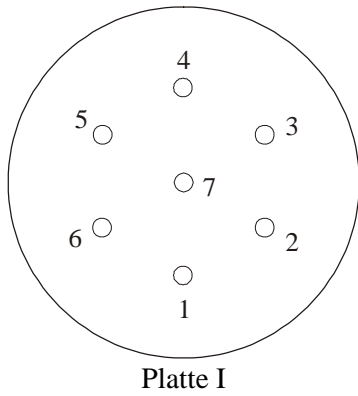
$c_{\text{HSA}}/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	E_{540}	E_{280}
0.005	0.000	0.000
0.010	0.178	0.133
0.050	0.973	0.679
0.100	1.285	1.115
0.300	1.474	1.660
0.500	1.725	1.735
1.500	0.208	0.224
3.000	0.107	0.140

Bis auf die beiden niedrigsten Konzentrationen wurde jeweils eine Probe der Überstände der Fraktionen auf einer Ouchterlony-Platte aufgetragen, weil diese die höchsten Extinktionen (bei 280 nm) aufwiesen:



Antigenüberschussbestimmung Platte I			Antikörperüberschussbestimmung Platte II		
Depot	Protein	$c / \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Depot	Protein	$c / \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
1	Überstand	0.050	1	Überstand	0.050
2	Überstand	0.100	2	Überstand	0.100
3	Überstand	0.300	3	Überstand	0.300
4	Überstand	0.500	4	Überstand	0.500
5	Überstand	1.500	5	Überstand	1.500
6	Überstand	3.000	6	Überstand	3.000
7	anti-HSA	1.000	7	HSA	1.000

Die inkubierten Platten sind auf der nächsten Seite skizziert.



4. Auswertung und Diskussion

Aus den Extinktionen bei 280 nm kann die Konzentration der Antikörper ermittelt werden. Dazu wird die Absorption des HSA berechnet über

$$E_{280} = \frac{c_{\text{HSA}}}{M_{\text{HSA}}} \times \epsilon_{\text{HSA}} \times 1 \text{ cm}$$

Diese wird von der gemessenen Gesamtabsorption abgezogen, um die reine Antikörper-Extinktion zu erhalten. Über das Lambert-Beersche Gesetz wird die Konzentration berechnet und das Verhältnis von Antikörper zu Antigen (HSA) bestimmt. Die Werte zwischen Null und der maximalen Extinktion (0,5, vgl. Diagramme) dafür benutzt. Aus der Auftragung des Verhältnisses $A_{\text{K}}:A_{\text{HSA}}$ gegen die HSA-Konzentration erhält man die IBR über den Achsenabschnitt; sie beträgt **5.7**.

$c_{\text{HSA}}/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	E_{540}	E_{280}	$E_{280}(\text{HSA})$	$n(\text{Ag})$	$E_{280}(\text{Ak})$	$c_{\text{AK}}/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Ak:HSA
0.005	0.000	0.000	0.0028	7.58E-08	-0.003	-1.82E-08	-0.240
0.010	0.178	0.133	0.0055	1.52E-07	0.127	8.39E-07	5.535
0.050	0.973	0.679	0.0277	7.58E-07	0.651	4.29E-06	5.656
0.100	1.285	1.115	0.0553	1.52E-06	1.060	6.97E-06	4.601
0.300	1.474	1.660	0.1659	4.55E-06	1.494	9.83E-06	2.163
0.500	1.725	1.735	0.2765	7.58E-06	1.458	9.60E-06	1.267
1.500	0.208	0.224		2.27E-05			
3.000	0.107	0.140		4.55E-05			

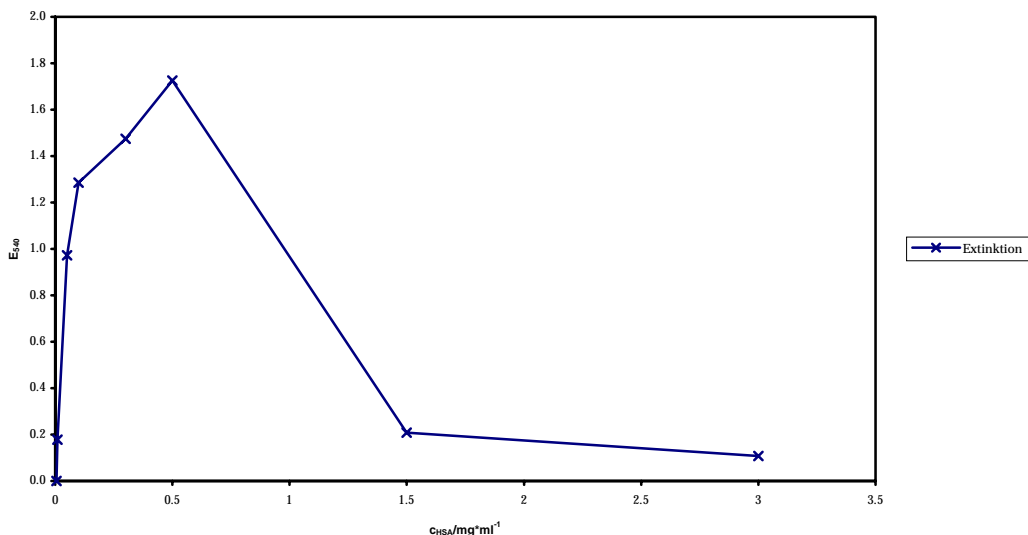
$$\epsilon(\text{AK}) = 152000 \text{ l}\cdot(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$$

$$\epsilon(\text{HSA}) = 36500 \text{ l}\cdot(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$$

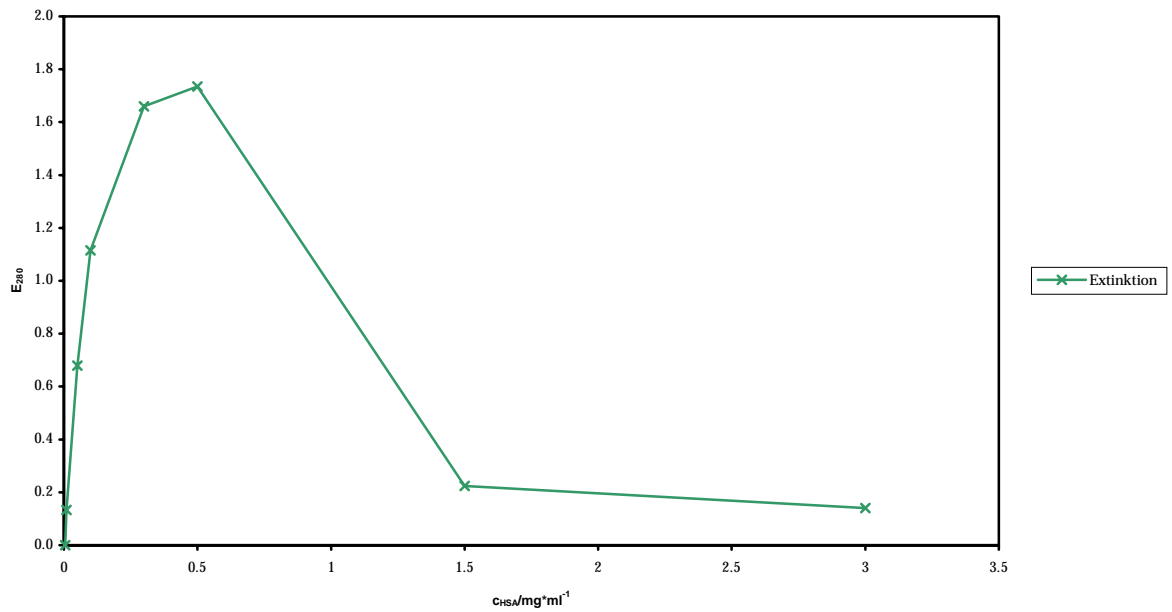
$$M_r(\text{HSA}) = 66000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Die grafische Auswertung stellen die folgenden drei Diagramme dar.

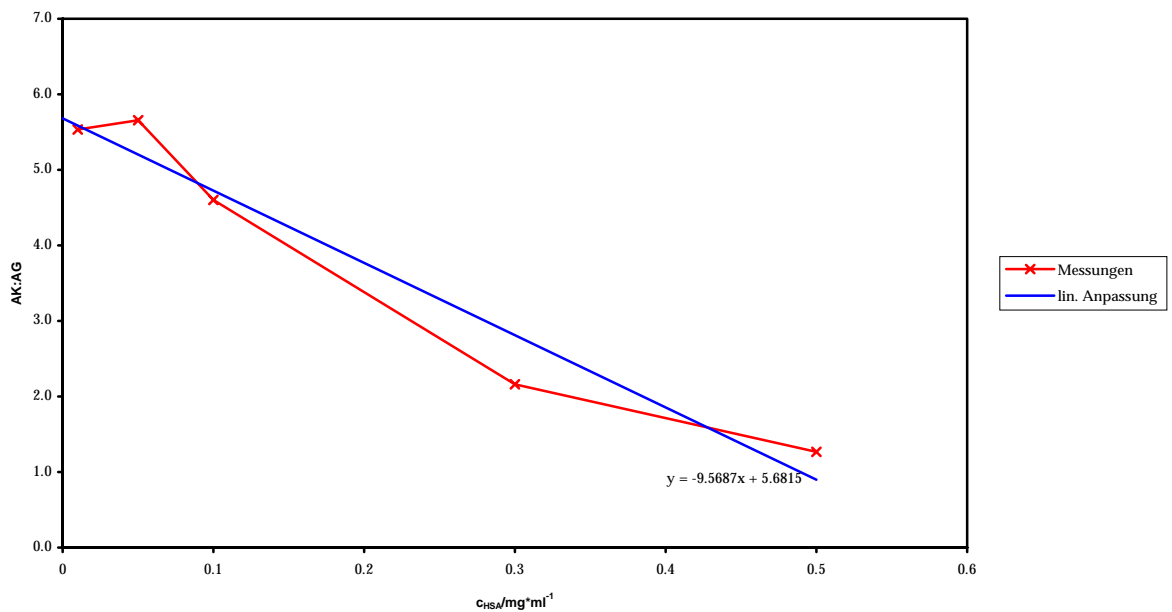
Messung der Präzipitation durch Streuung



Bestimmung der Proteinkonzentration



Verhältnis von Antikörpern zu Antigen



D Versuch 3: Einführung von TNP-Gruppen als Haptene

1. Ziel des Versuchs

Es soll der TNPlierungsgrad der freien Aminogruppen (α -Amino oder ϵ -Lysin) von BSA, HSA und OVA unter verschiedenen Bedingungen mit TNBS untersucht werden.

2. Durchführung

Folgende Ansätze wurden untersucht:

Gruppe	TNBS /mg	BSA /mg	HSA /mg	OVA /mg	Bedingungen
1	40	40			RT
2	10	40*			RT
3	1	40			RT
4	40			40	RT
5	40		40		RT
1	0.1	40			RT
2	40	40			pH 3
3	40	40			pH 10
4	40	40			4° C
5	40	40			50° C

* Wir haben fälschlicherweise 10 mg eingesetzt.

2.1 Änderungen zum Skript

Im ersten Ansatz haben wir 10 mg BSA in 1.8 ml 0.1 M NaHCO₃ gelöst und 0.2 ml 5%ige TNBS-Lösung hinzugefügt (also 10 mg). Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß Skript.

Für den zweiten Ansatz wurden 40 mg BSA in 1.2 ml 0.1 M NaHCO₃ gelöst und mit 0.8 ml 5%iger TNBS-Lösung versetzt (weitere Schritte s. Skript).

Die Fraktionen mit dem Protein-Peak wurden vereinigt (Pool farbig gekennzeichnet).

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Vom ersten Ansatz wurden 24 Fraktionen à 2 ml nach der Säulenchromatographie aufgefangen. Die folgende Tabelle enthält die gemessenen Extinktionen.

1. Ansatz	Messwerte		mit Verd.-Faktor		
Probe	E ₃₄₈	E ₂₈₀	E _{348k}	E _{280k}	C _{Protein}
1	0.012	0.000	0.012	0.000	-1.12E-07
2	0.008	0.000	0.008	0.000	-7.45E-08
3	0.214	0.064	2.140	0.640	-2.40E-06
4	0.395	0.155	3.950	1.550	5.67E-06
5	0.121	0.035	1.210	0.350	-1.68E-06
6	0.056	0.028	0.560	0.280	2.45E-06
7	0.068	0.112	0.680	1.120	2.44E-05
8	0.207	0.437	1.035	2.185	5.02E-05
9	0.327	0.220	3.270	2.200	2.98E-05
10	0.938	0.235	9.380	2.350	-2.30E-05
11	1.324	0.237	13.240	2.370	-5.84E-05
12	1.070	0.176	10.700	1.760	-5.15E-05
13	1.191	0.195	5.955	0.975	-2.88E-05
14	0.619	0.084	3.095	0.420	-1.73E-05
15	1.331	0.237	1.331	0.237	-5.91E-06
16	0.488	0.083	0.488	0.083	-2.27E-06
17	0.173	0.022	0.173	0.022	-1.01E-06
18	0.073	0.000	0.073	0.000	-6.80E-07
19	0.038	0.000	0.038	0.000	-3.54E-07
20	0.026	0.000	0.026	0.000	-2.42E-07
21	0.016	0.000	0.016	0.000	-1.49E-07
22	0.014	0.000	0.014	0.000	-1.30E-07
23	0.012	0.000	0.012	0.000	-1.12E-07
24	0.007	0.000	0.007	0.000	-6.52E-08
Pool*	0.227	0.068	2.270	0.680	-2.52E-06

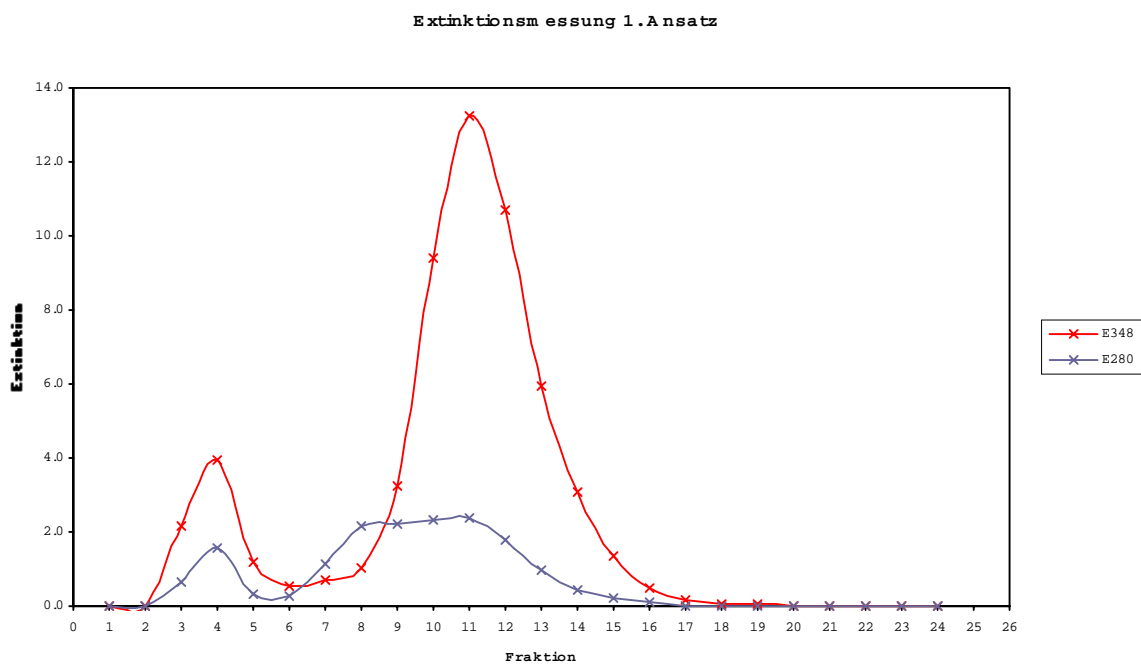
55.7

* siehe Diskussion

2. Ansatz Probe	Messwerte		mit Verd.-Faktor		
	E ₃₄₈	E ₂₈₀	E _{348k}	E _{280k}	C _{Protein}
25	0.000	0.022	0.000	0.022	6.03E-07
26	0.077	0.320	0.077	0.320	8.05E-06
27	0.270	0.855	0.270	0.855	2.09E-05
28	0.117	0.462	0.585	2.310	5.78E-05
29	0.254	0.891	2.540	8.910	2.20E-04
30	0.201	0.694	4.020	13.880	3.43E-04
31	0.270	0.735	5.400	14.700	3.52E-04
32	0.347	0.654	6.940	13.080	2.94E-04
33	0.794	0.959	7.940	9.590	1.89E-04
34	0.740	0.488	7.400	4.880	6.48E-05
35	0.658	0.330	6.580	3.300	2.91E-05
36	0.452	0.177	4.520	1.770	6.39E-06
37	0.628	0.260	3.140	1.300	6.37E-06
38	0.436	0.213	2.180	1.065	8.87E-06
39	0.458	0.271	2.290	1.355	1.58E-05
40	0.351	0.209	1.755	1.045	1.23E-05
41	0.313	0.195	1.565	0.975	1.21E-05
42	0.290	0.222	1.450	1.110	1.69E-05
43	1.142	0.734	1.142	0.734	9.47E-06
44	1.102	0.697	1.102	0.697	8.83E-06
45	0.963	0.598	0.963	0.598	7.41E-06
46	1.040	0.648	1.040	0.648	8.07E-06
47	1.019	0.614	1.019	0.614	7.33E-06
48	0.938	0.545	0.938	0.545	6.19E-06
Pool	0.300	0.740	6.000	14.800	3.50E-04

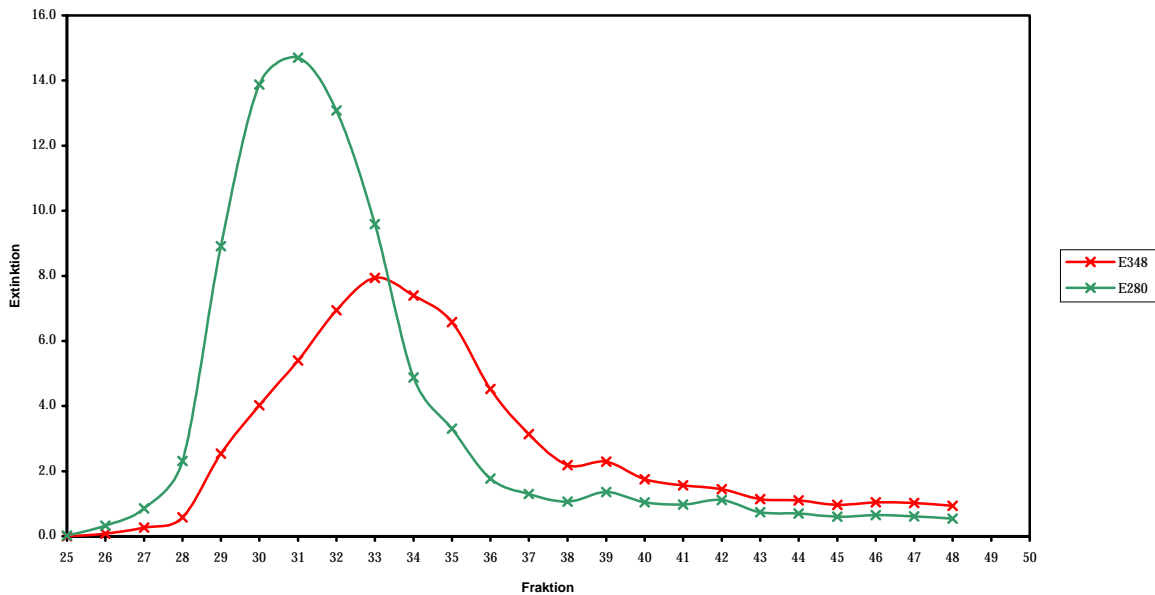
4. Auswertung und Diskussion

Die Poolfraktion des ersten Ansatzes wiesen (wie auch die meisten einzelnen Einzelfractionen) eine negative Proteinkonzentration auf. Dieses Phänomen ist auch bei anderen Gruppen aufgetreten. Aus diesem Grund wurden nicht die Werte der Poolfraktion ausgewertet, sondern die der in ihr enthaltenen Probe 4 (pos. Konzentration). Daraus ergibt sich der TNPlierungsgrad von **56**. Die folgenden Diagramme stellen die oben aufgeführten Messwerte dar.



In den Fraktionen des ersten Peaks sind Proteine (mit und ohne TNP) enthalten, in den Fraktionen des zweiten Peaks sind kleine Moleküle, u.a. auch freies TNBS, zu finden. Das beruht darauf, dass die kleinen Moleküle in die Sephadex-Kügelchen eindringen können und so einen längeren Weg zurücklegen müssen als größere; eine Trennung von TNPliertem und nicht TNPliertem Protein ist wegen der geringen Größenunterschiede jedoch nicht möglich.

Extinktionsmessung 2. Ansatz



Zusammengefasste Ergebnisse aller Gruppen:

Gruppe	TNBS /mg	40 mg von	Bedingungen	TNP-Grad
1	40	BSA	RT	~50
2	10	BSA (10 mg)	RT	56
3	1	BSA	RT	2
4	40	OVA	RT	28.3
5	40	HSA	RT	~50
1	0.1	BSA	RT	0.8
2	40	BSA	pH 3	1.4
3	40	BSA	pH 10	33
4	40	BSA	4° C	7.7
5	40	BSA	50° C	64

Der TNPlierungsgrad (also die Anzahl der pro Molekül gebundenen TNPs) berechnet sich über das Verhältnis von gemessenem TNP zur Proteinkonzentration.

Zu erwarten war, dass mit sinkendem pH-Wert (Protonierung der freien Aminogruppen), sinkender Temperatur (geringere Reaktionsgeschwindigkeit) und niedrigerer TNBS-Menge (weniger Substrat) der TNPlierungsgrad abnimmt. Außerdem besitzt OVA wegen seiner geringeren Größe weniger freie Aminogruppen (21), die für die Reaktion zur Verfügung stehen auf. HSA und BSA sollen aufgrund enger Verwandtschaft und ähnlicher Größe einen etwa gleichen TNPlierungsgrad (60 Aminogruppen) aufweisen. Unsere Ergebnissen stimmen, wie obige Tabelle zeigt, mit diesen Erwartungen überein. Durch Messungenauigkeiten liegt der TNPlierungsgrad von OVA über der Anzahl der freien NH₂-Gruppen.

E Versuch 13: ELISA - Bestimmung von Antikörpertitern in Kaninchenserum

1. Ziel des Versuchs

Mit der ELISA-Technik soll der Antikörpertiter von anti-HSA bestimmt werden.

2. Durchführung

2.1 Materialien und Lösungen

- Falcon-ELISA-Platte (U-bottom)
- Beschichtungspuffer: 0.1 M NaHCO₃, pH 9.5
- Wasch-, Nachbeschichtungspuffer: 0.05% Tween in PBS
- Antigenlösung: 10 µg/ml HSA in Beschichtungspuffer
- Antiserum: anti-HSA
- Enzym-gekoppelter Zweitantikörper: Goat-anti-mouse
- Substratlösung: Wasserstoffperoxidase in Citratpuffer (Tablette) mit 5 mg OPD in 10 ml Lösung (kurz vor Gebrauch)

2.2 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Schritt 5: Die Inkubation wurde für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die ELISA-Platte wurde nach folgendem Schema beschichtet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank			AS 1:100			1:1 E6			...		
B	blank			1:300				
C	- Ag			1:1000				
D	- 1. Ak			1:3000				
E	- 2. Ak			1:10 000				
F	---			1:30 000				
G	---			1:100 000				
H	---			1:300 000				

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Der Originalausdruck der gemessenen Extinktionen ist als Anhang II angeheftet.

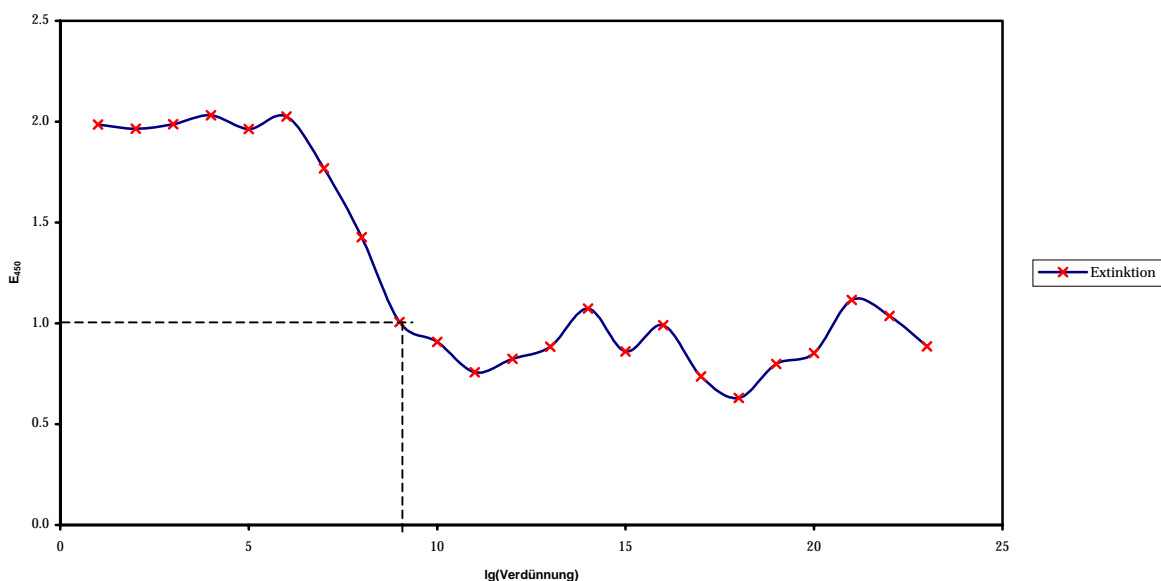
4. Auswertung und Diskussion

Aus den Messwerten wurden die Ausreißer eliminiert und vom Mittelwert die Extinktion des HSA (Spalten 1-3, Zeile C) abgezogen.

	Spalten			
	1-3	4-6	7-9	10-12
A	---	2.546	1.567	1.298
B	---	2.525	1.469	1.191
C	0.561	2.548	1.318	1.360
D	1.846	2.593	1.385	1.413
E	0.042	2.524	1.444	1.677
F	0.009	2.586	1.634	1.597
G	0.011	2.328	1.421	1.447
H	0.018	1.988	1.551	---

Im folgenden Diagramm wurde die korrigierte Extinktion gegen den (dekadischen) Logarithmus der reziproken Verdünnung aufgetragen.

ELISA - Verlauf der Extinktion



Die Verdünnung, an der die optische Dichte 1 ist, entspricht definitionsgemäß dem Antikörpertiter. Bei uns ergibt sich ein Wert von 1:1.000.000.

Im Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass das Hintergrundrauschen ziemlich stark ist. Die starken Verdünnungen sind daher nicht für eine Auswertung zu gebrauchen. Unser ermittelter Wert ist nicht unbedingt repräsentativ, da er sich am Ende des linearen Bereiches der sigmoiden Kurve befindet.

F Versuche 4 und 5: Herstellung und Anwendung von Immunadsorbentien

1. Ziel des Versuchs

Mit einer selbst gefertigten Immunadsorbenssäule sollen spezifische Antikörper aus einem Antiserum isoliert werden.

2. Durchführung

2.1 Änderungen zum Skript

Das BSA wurde zwei Stunden bei 37° C mit aktivierter Sepharose inkubiert. Um die freien Bindungsstellen der Sepharose abzusättigen, wurde das Adsorbens über Nacht in 20 ml 0.1 M Ethanolamin gerührt. Es wurden 4 ml anti-BSA auf die Säule aufgetragen.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Nach der Bindung der Sepharose an das BSA wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert; danach betrug die Extinktion des Überstandes nur noch 0.089, was als ausreichend geringe Proteinrestmenge angesehen werden konnte. Die Menge an gebundenem Protein wird berechnet aus der Differenz von eingesetztem und im Überstand verbliebenem BSA:

	E_{280}	$c(\text{BSA})/10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$V(\ddot{\text{U}}\text{S})/\text{ml}$	$m(\text{BSA})/\text{mg}$
Überstand 1	0.342	9.37	34	21.03
Überstand 2	0.089	2.44	35	5.63
Gesamt				26.66
eingesetzt				40
Differenz				13.34

Es wurden demnach 13.34 mg (33 %) BSA an die Säule gebunden.

Die Fraktionen, die während der Elution mit Propionsäure aufgefangen wurden, zeigten folgende Extinktionen:

Fraktion	E ₂₈₀	c _m (AK)	c(AK)
23	0.009	5.92E-08	0.01
24	0.019	1.25E-07	0.02
25	0.033	2.17E-07	0.03
26	0.098	6.45E-07	0.10
27	2.280	1.50E-05	2.40
28	2.200	1.45E-05	2.32
29	1.480	9.74E-06	1.56
30	0.784	5.16E-06	0.83
Pool	1.25	8.22E-06	1.32

Die vorigen Fraktionen zeigten keine signifikante Extinktion, wurden aber für die SDS-PAGE und Western-Blot aufbewahrt (s. nächster Versuch). Ab Fraktion 30 (nicht mehr aufgeführt) war der pH-Wert erniedrigt.

4. Auswertung und Diskussion

Die ausgewerteten Ergebnisse aller fünf Gruppen sind:

Gruppe	Adsorbens	Antiserum	mg Ak/ml Serum
1	BSA	α -HSA	0.681
2	BSA	α -BSA	4.3
3	TNP-BSA	α -TNP-HSA	0.131
4	TNP-BSA	α -TNP-BGG	0.086
5	BGG	Durchlauf Gr. 2	0.24

Man erkennt klar, dass die Konzentration der für das Adsorbens spezifischen Antikörper (Gruppe 2) weit über den anderen liegt. Die Bindung des Antikörpers an die Säule erfolgt also mit einer guten Spezifität.

Die Bindung des BSA an das aktivierte Säulenmaterial verlief zufriedenstellend. Aus den 4 ml Antiserum wurden **17.11 mg** anti-BSA-Antikörper im Pool isoliert. Daraus errechnet sich eine Antikörperkonzentration von **4.3 mg Ak pro ml Serum**. Dies ist eine recht hohe Ausbeute. Ob die gemessene Proteinmenge tatsächlich nur von spezifischen Antikörpern stammt, wird in der SDS-PAGE und im Western-Blot überprüft.

G Versuch 23: SDS-PAGE und Western-Blot

1. Ziel des Versuchs

Es soll die Reinheit der im vorigen Versuch isolierten Antikörper überprüft werden. Die im Durchlauf zurückgebliebenen sowie im Antiserum enthaltenen Proteine sollen anhand ihrer Größe identifiziert werden.

2. Durchführung

2.1 Material und Lösungen

SDS-PAGE:

- Elektrophoresekammer: Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad)
- Trenngel: 12%ig laut *instruction manual*, Seite 23
- Sammelgel: 4% ig laut *instruction manual*, Seite 24
- Lösungen A-D und F aus der *instruction manual*, Seite 21
- Laemmli-Puffer (mit Mercaptoethanol...)

Western-Blot:

- Kammer: Mini Trans-Blot (Bio-Rad)
- Whatman paper, Schwamm, Nitrocellulose
- Trenngel: 12%ig laut *instruction manual*, Seite 23

- Sammelgel: 4% ig laut *instruction manual*, Seite 24
- Blotting Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% MeOH (v/v), pH 8.3 (*instruction manual*, Seite 12 oben)
- Färbelösung: 0.5 mg/ml Diaminobenzidin in 0.05 M Tris; kurz vor Benutzung Zugabe von 1 µl H₂O₂ pro ml Substrat

2.2 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Zwei Gele wurden wie in der *instruction manual* (Seiten 11-12) gefertigt. Von unseren Proben (bzw. den Verdünnungen) wurden je 20 µl mit 20°µl Laemmli-Puffer wie folgt auf beide Gele aufgetragen:

Tasche	Lösung	Verdünnung
5	Durchlauf	1:10
6	gereinigte Antikörper	unverdünnt
7	anti-BSA	1:100
8	Marker:	unverdünnt
	<u>Größe / kD</u>	<u>Protein</u>
	116	Phosphorylase
	97	β-Galactosidase
	66	BSA
	45	OVA
	29	Carboanhydrase

Die Laufzeit betrug ca. eine Stunde bei 200 V. Ein Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt, das andere zum Blotten verwendet.

Der Western-Blot setzt sich aus mehreren Schichten zusammen:



Dabei ging man wie folgt vor: Das „Sandwich“ wurde mit Wasser gewaschen, mit Ponceau-Lösung angefärbt und erneut mit Wasser gewaschen. Die Nitrocellulose wurde 30 min mit 5% Magermilch in 0.05 M Tris abgesättigt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Es folgte eine einstündige Inkubation in 5 ml Lösung von GαR-POD, die 1:3000 verdünnt worden war. Anschließend wurde drei Mal je fünf Minuten mit 15 ml 0.1% Tween 20 in Tris pH 7.6 gewaschen. Die Anfärbung der Banden erfolgte durch kurze Inkubation (2-3 min) in 20 ml Färbelösung. Der Farbstoff wird durch die Reaktion wasserunlöslich und akkumuliert so an den Stellen, wo die Enzym-assoziierten Antikörper gebunden haben.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Kopien des Gels und der Nitrocellulosen befinden sich im Anhang III.

4. Auswertung und Diskussion

Leider ergaben sich Unstimmigkeiten bei der Zuordnung der einzelnen Gele und Western-Blots, so dass niemand mehr genau wusste, welches Gel zu welcher Gruppe gehört.

• SDS-PAGE:

Im Durchlauf (5) sollten sich sämtliche Proteine bis auf die spezifischen Antikörper befinden. Die starke Bande bei 66 kD rührt vom RSA her. Die schwächere Bande zwischen 66 und 45 kD stammt von der schweren Kette der Antikörper (ca. 50 kD), die schwache knapp unterhalb von 29 kD von der leichten Kette (ca. 25 kD). Zieht man den Western-Blot hinzu, sieht man, dass die im Durchlauf enthaltenen Antikörper teilweise die spezifischen gegen BSA sind. Die anderen Banden stammen von sonstigen Antiserumproteinen. Die Fraktion der gereinigten Antikörper (6) zeigt zwei Banden, die den eben diskutierten von 50 und 66 kD entsprechen. Die Bande der leichten Ketten ist nicht zu erkennen. Die große Intensität der RSA-Bande zeigt, dass die Trennung nicht sehr gut gelungen ist. Die starken und dicken Banden des Antiserums (7) deuten auf eine zu hohe Konzentration hin. Es sind viele Banden zu erkennen, u.a. auch die bereits angesprochenen. Die Banden des aufgetragenen Markers (8) sind gut zu erkennen.

- Western-Blot:

Die spezifische Färbung hat nicht vollständig funktioniert. Es sollten höchstens zwei Banden sichtbar sein (schwere und leichte Kette des Antikörpers). Bei der Auftragung des Durchlaufs (5) ist noch eine zusätzliche Bande bei etwa 100 kD zu erkennen, die durch möglicherweise nicht vollständig denaturierte Antikörper zustande gekommen ist (Dimer von zwei schweren Ketten). Das gleiche Muster, nur mit wesentlich höherer Intensität, liegt bei der Auftragung des Antiserums (7) vor. Wie auch bei der SDS-PAGE fehlt bei der Fraktion der gereinigten Antikörper die Bande der leichten Kette; es findet sich ebenfalls die Bande bei 100 kD.

H Versuch 21: Cytokinnachweis mittels Zellproliferationstest

1. Ziel des Versuchs

Mit Hilfe der Verdünnungsreihe einer bekannten Cytokin (IL-2)-Konzentration soll aus Verdünnungen einer unbekannt Probe die IL-2-Konzentration bestimmt werden.

2. Durchführung

Die Durchführung entsprach komplett den Anweisungen des Skripts.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

In einigen der Depots der Mikrotiterplatte waren die ausgefallenen Formazankristalle sichtbar. Nach vorsichtigem Lösen der Kristalle ergab sich eine blaue Färbung. Der Ausdruck des Photometers ist im Anhang IV zu finden.

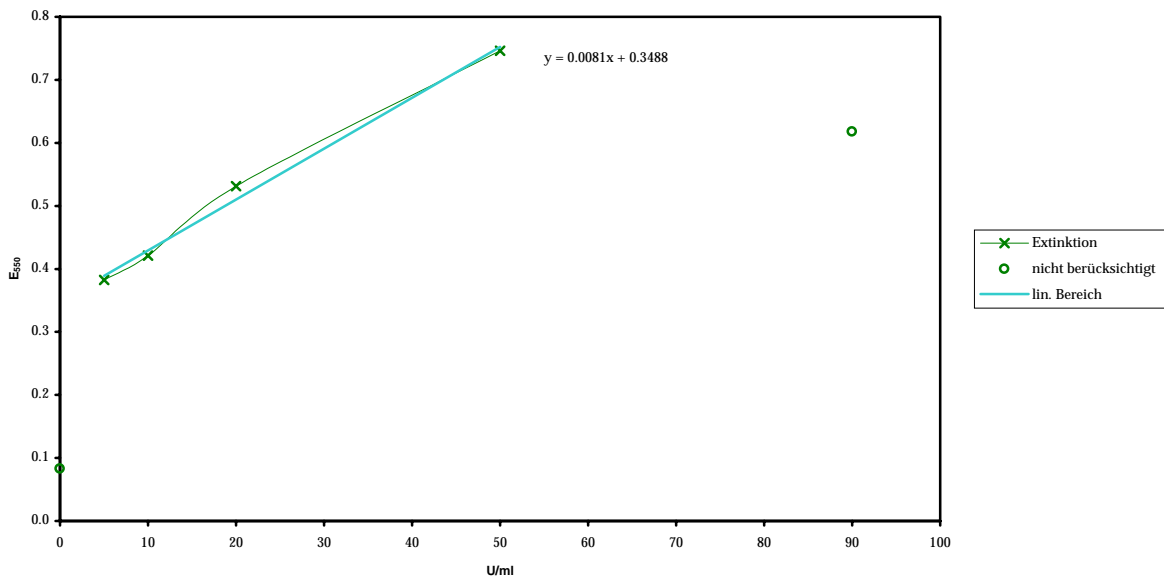
4. Auswertung und Diskussion

Für die Auswertung wurden alle Messwerte benutzt, da diesmal keine großen Ausreißer vorgekommen sind. Von dem Mittelwert der Messwerte wurde der Hintergrund (Spalte 11) abgezogen, (vgl. nachstehende Tabelle). Im Folgenden sind die Diagramme zu der Eichkurve und der unbekannt Probe abgebildet:

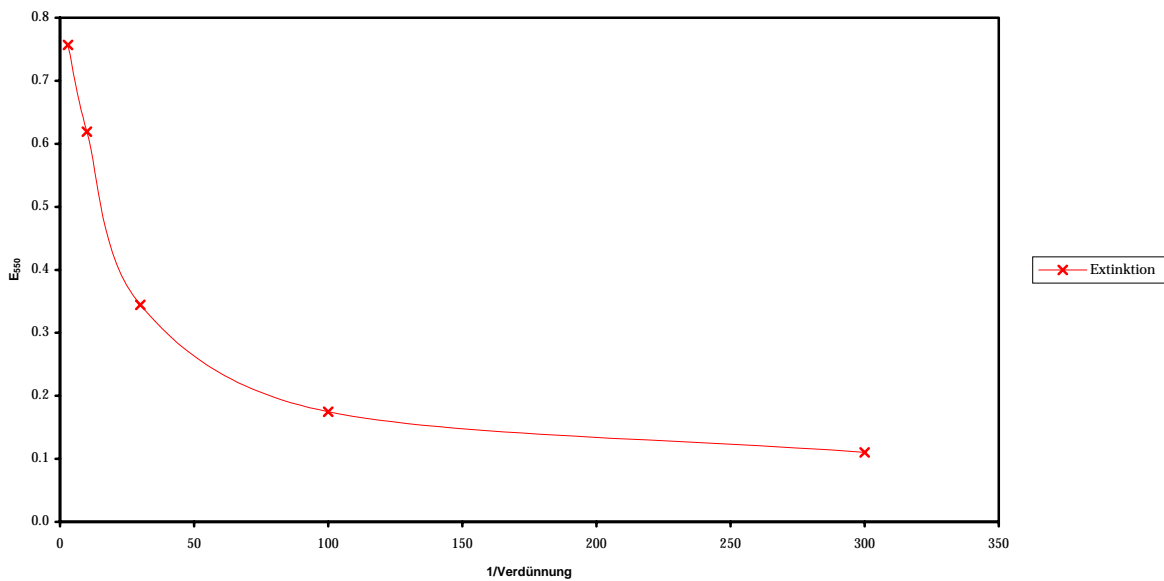
U/ml	IL2-Standard (Spalten 2-4)		unbek. Probe (Spalten 5-10)		
	Mittelwert	MW - blank	Verdünnung	Mittelwert	MW - blank
90	0.650	0.618	3	0.789	0.757
50	0.778	0.746	10	0.651	0.619
20	0.563	0.531	30	0.376	0.344
10	0.453	0.421	100	0.207	0.175
5	0.414	0.382	300	0.142	0.110
0	0.115	0.083	1000	0.116	0.084
			3000	0.119	0.087
			10000	0.119	0.087
			30000	0.115	0.083
			100000	0.115	0.083
			300000	0.107	0.075
			1.E+06	0.108	0.076

Die Geradengleichung des linearen Bereiches der Eichkurve lautet $y = 0.0081x + 0.3488$. Mit dem von uns gewählten Wert (grün) aus dem linearen Bereich der Messung unbekannt Probe ergibt sich daraus eine Cytokinkonzentration von **152 U/ml**. Der tatsächliche Wert ist 150 U/ml, was einer Abweichung von ca. 1% entspricht. Allerdings muss angemerkt werden, dass dieser Wert nicht mehr im linearen Bereich der Eichgerade liegt und nur bedingt aussagekräftig ist. Der nächste Wert (Verdünnung 1:10) liegt mit 335 U/ml schon um 100% über dem eigentlichen Wert. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die Eichgerade zu wenige auswertbare Punkte enthält.

Eichkurve mit bekannter IL-2-Aktivität



IL-2-Aktivität der Testsubstanz



I Durchflusscytometrie

1. Ziel des Versuchs

Aus einer Probe von bestrahlten Zellen soll der prozentuale Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen ermittelt werden.

2. Theoretischer Hintergrund

Die Unterscheidung nekrotischer von apoptotischen Zellen erfolgt über charakteristische Merkmale der Produkte beider Vorgänge. Bei der Apoptose wird der Zellinhalt (auch die DNA) in apoptotische Vesikel verpackt, wobei ein sonst nach innen gerichteter Membranbaustein (Phosphatidylserin) nach außen weist. An diesen lagert sich das Annexin V an. Nekrotische Zellen hingegen weisen eine zumindest teilweise zerstörte Membran auf, wodurch sowohl die DNA als auch das

Phosphatidylserin frei angreifbar sind. An die DNA bindet Propidiumiodid, weshalb nekrotische Zellen sowohl Propidiumiodid- als auch Annexin V-markiert sind. Die beiden Farbstoffe haben verschiedene Fluoreszenzwellenlängen und können somit in einem Durchflusscytometer unterschieden werden.

3. Durchführung

Dieser Versuch ist nicht im Skript abgedruckt. Deshalb wird hier der gesamte Versuchsablauf beschrieben.

3.1 Materialien und Lösungen

- FACScan (Becton&Dickinson) mit CellQuest® Software
- Röhrrchen für FACScan
- Zellsuspension der Zelllinie 38C13 (bestrahlt)
- Hepes-Puffer: 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2.4 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂
- Propidiumiodid
- Annexin V

3.2 Versuchsdurchführung

Als erstes wurde der Hepes-Puffer angesetzt. Währenddessen wurden die Zellen der ausgegebenen Suspension gezählt und auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro 400 µl eingestellt. Dafür wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 1000 rpm) und in 1.7 ml Hepes-Puffer resuspendiert. Es wurden zwei Fraktionen zu 200 µl in je ein FACS-Röhrrchen überführt. Die Gruppen haben verschiedene Ansätze aufgestellt:

Röhrrchen	Ansatz	Gruppe
1	Negativkontrolle	3, 1
2	10 µl Annexin V	4
3	10 µl Propidiumiodid	2
4	je 10 µl Propidiumiodid und Annexin V	alle

Die Röhrrchen wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Abdekantieren in 500 µl Hepes-Puffer resuspendiert und im FACScan ausgewertet.

Die folgenden Parameter wurden am FACScan eingestellt (Messparameter auf Einzelzellniveau):

Parameter	Messgröße
Vorwärtsstreulicht	Größe der Zelle
Seitwärtsstreulicht	Granularität, Struktur der Zelle
Anregungswellenlänge: 488 nm	
Fluoreszenz 1: 515-545 nm	FITC (Fluoreszein-isothiocyanat)
Fluoreszenz 2: 563-607 nm	PE (Phycoerythrin)
Fluoreszenz 3: 620-660 nm	PE-Cy5, PerCP etc.

Anmerkung: Das Propidiumiodid liegt mit seiner Fluoreszenz genau zwischen den detektierten Wellenlängen der Fluoreszenzen 2 und 3 und besitzt zudem eine andere Anregungswellenlänge, so dass es nicht optimal für diese Messung ist. Annexin V ist unter den gegebenen Bedingungen bei der 1. Fluoreszenz gut zu messen.

4. Beobachtungen und Ergebnisse

Die Ausdrücke der Messungen sind im Anhang V angefügt.

5. Auswertung und Diskussion

Die unten stehende Tabelle stellt einen Ausschnitt aus dem Ausdruck dar, der die wichtigsten Ergebnisse enthält.

Quadrant	% Gated		
	Alte Echte (.005)	Alte Echte (.006)	Neue Echte
UR	69.74	63.01	63.18
LR	30.26	36.85	36.16

Die Werte der im UR-Quadranten erfassten Zellen repräsentieren den Anteil an nekrotischen Zellen, die des LR-Quadranten den Anteil an apoptotischen Zellen. Der Anteil nekrotischer Zellen sollte mit zunehmendem Alter der Kultur ansteigen, da apoptotische Zellennicht stabil sind, wenn sie nicht von speziellen Zellen aufgenommen werden. Während diese Erwartung bei der ersten Probe alter Zellen (.005) erfüllt ist, zeigt die zweite Probe (.006) kaum Unterschiede zu den neuen Zellen. Da der Wert nekrotischer Zellen insgesamt sehr hoch ist, liegt der Fehler wahrscheinlich in der Probe der neuen Zellen begründet. Ursachen hierfür können mechanische Beschädigungen beim Resuspendieren sein.

J Versuch 6: Quantitative Gelpräzipitationstechniken (Mancini)

1. Ziel des Versuchs

Ähnlich dem Ouchterlony-Test soll hier die Konzentration eines Antigens in einem Serum ermittelt werden.

2. Durchführung

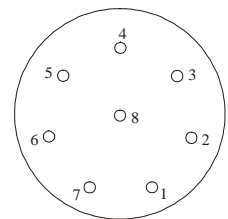
2.1 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Es wurde eine 1%ige Agarlösung hergestellt, die in Portionen zu 15 ml aufgeteilt wurde. Nach dem Temperieren auf 45° C wurden diese wie im Skript beschrieben in Petrischalen gegossen und weiterbehandelt. Unsere Gruppe erhielt zwei Antiseren als Zusatz für das Gel:

Platte I: 5% (v/v) Antiserum (α -HSA, α -BSA...)

Platte 2: 3% (v/v) Antiserum (Ziege-anti-Maus IgG)

In die Depots wurden folgende Standardreihen pipettiert (jeweils 7 μ l):



Standardreihe 1 (HSA, 1 mg/ml):		Standardreihe 2 (Maus IgG):	
Verdünnung / mg·ml ⁻¹	Depot	Verdünnung / mg·ml ⁻¹	Depot
0.2	1	0.4	1
0.4	2	0.8	2
0.8	3	1.2	3
1.0	4	1.6	4
1.2	5	2.0	5

Von der unbekannt Probe (HSA für Platte I, miniPerm-Überstand E10B8 für Platte II) wurden 7.0 μ l jeweils 1:2 und 1:5 verdünnt in die Depots 6 und 7, zudem unverdünnt in das mittlere Depot (8) pipettiert.

Die Auswertung erfolgte nach fünf Tagen Inkubation bei 4° C.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Die durch die Präzipitation entstandenen Ringe waren bei allen Proben deutlich sichtbar. Das Ausmessen wurde dadurch erschwert, dass nicht alle Ringe konzentrisch mit dem gestanzten Loch waren und so kein genauer Durchmesser (bzw. Radius) ermittelt werden konnte. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Standardreihe 1			Standardreihe 2			
c/mg*ml ⁻¹	Radius/cm	A/cm ²	Depot	c/mg*ml ⁻¹	Radius/cm	A/cm ²
0.2	0.30	0.28	1	0.4	0.30	0.28
0.4	0.35	0.38	2	0.8	0.35	0.38
0.6	0.45	0.64	3	1.2	0.40	0.50
0.8	0.50	0.79	4	1.6	0.50	0.79
1.0	0.55	0.95	5	2.0	0.60	1.13
1.2	0.60	1.13	6	0.8	0.35	0.38
0.5	0.40	0.50	7	0.6	0.30	0.28
2.2	0.80	2.01	8	1.0	0.40	0.50

4. Auswertung und Diskussion

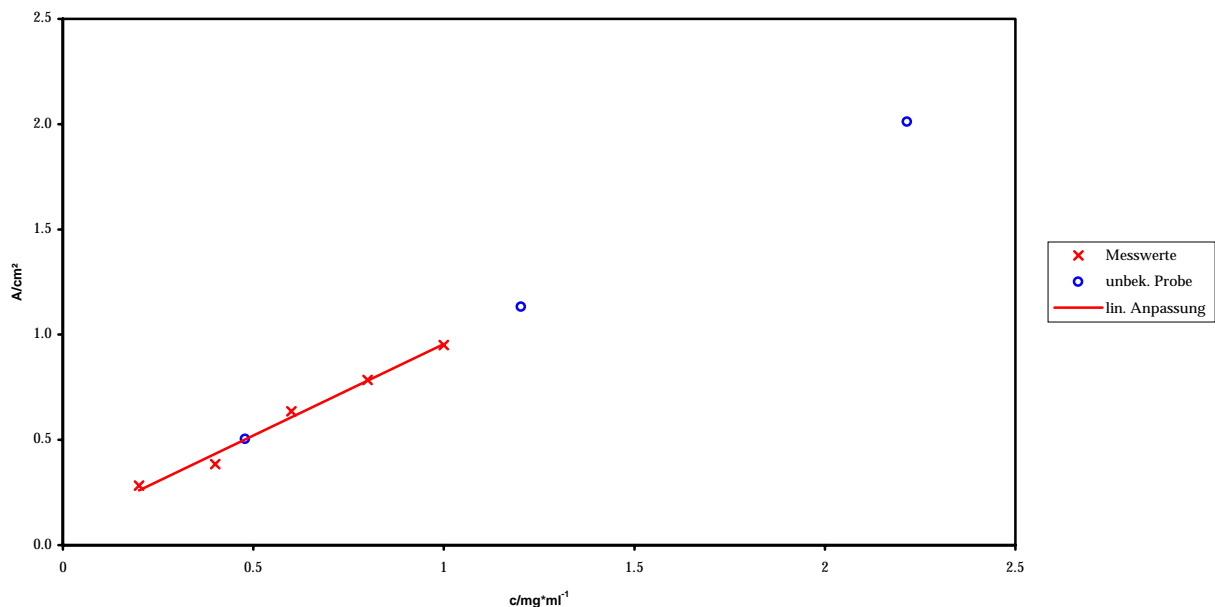
Die aus den Radien der unbekannt Probe ermittelten Werte werden in die Geradengleichung eingesetzt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert:

	1. Probe	2. Probe
Geradengleichung	$y = 0.868x + 0.087$	$y = 0.524x - 0.012$
Verd.-Faktor	$c/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
2	2.4	1.5
5	2.4	2.8
1	2.2	1.0
Mittelwert	2.3	1.8

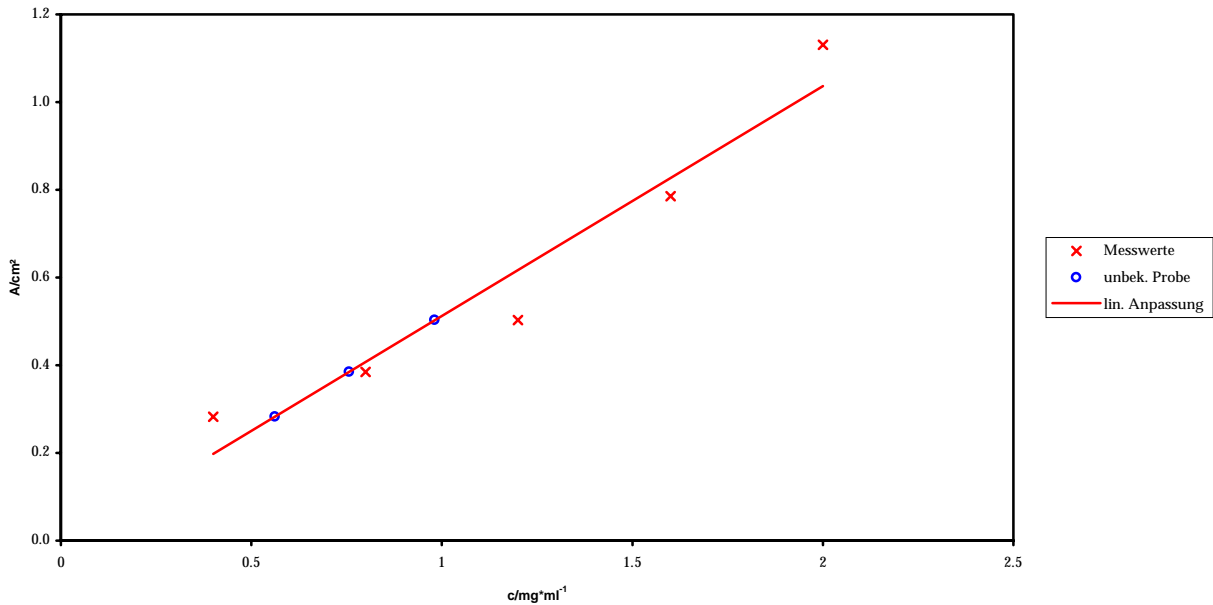
Die erste unbekannt Probe (HSA) hat eine Konzentration von **2.3 mg/ml** (Soll: 2.5 mg/ml \Rightarrow Abweichung von 8%), die zweite (mPÜ E10B8) 1.8 mg/ml. Bei letzterer streuen die einzelnen Werte jedoch so stark, dass der Mittelwert nicht brauchbar ist.

Die oben angesprochene Messunsicherheit schlägt sich also auch in den Ergebnissen nieder. So gleicht die zweite Standardreihe eher dem aufsteigenden Ast einer Parabel als einer Geraden.

Standardreihe 1



Standardreihe 2



K Versuch 8: Phagozytose

1. Ziel des Versuchs

Es soll die Phagozytoserate von Erythrozyten untersucht werden, die zum Einen nicht behandelt wurden, zum Anderen mit Ambozeptor oder Antikörpern opsoniert wurden.

2. Durchführung

2.1 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Die Erythrozyten für Ansatz 3 (s.u.) wurden wie unter A im Skript beschrieben sensibilisiert (Inkubation von 2, 4, ..., 22 min); die übrigen Zellsuspensionen wurden ausgegeben. Die restlichen Schritte wurden nach dem Skript durchgeführt.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

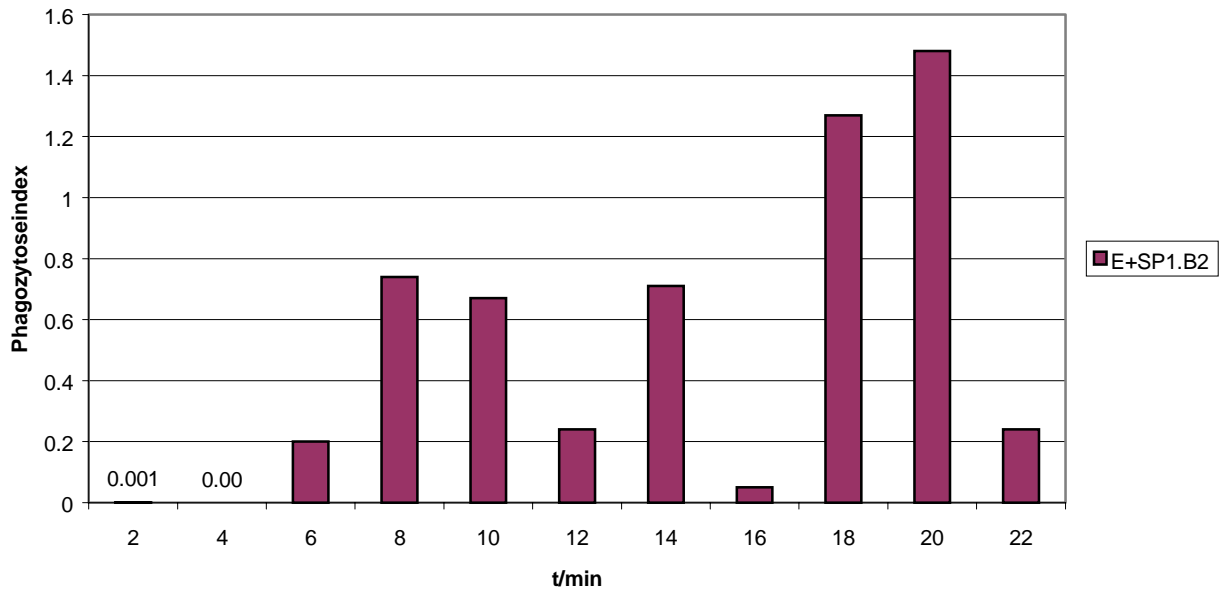
Die während der Messungen aufgenommenen Werte sind im Anhang VI angeheftet.

4. Auswertung und Diskussion

Als Auswertung sollte der Phagozytoseindex bestimmt werden. Er ist definiert als die Anzahl der aufgenommenen Zellen (hier: Erythrozyten) dividiert durch die Anzahl der untersuchten Makrophagen (hier: 100). Die Ergebnisse stellt folgende Tabelle dar:

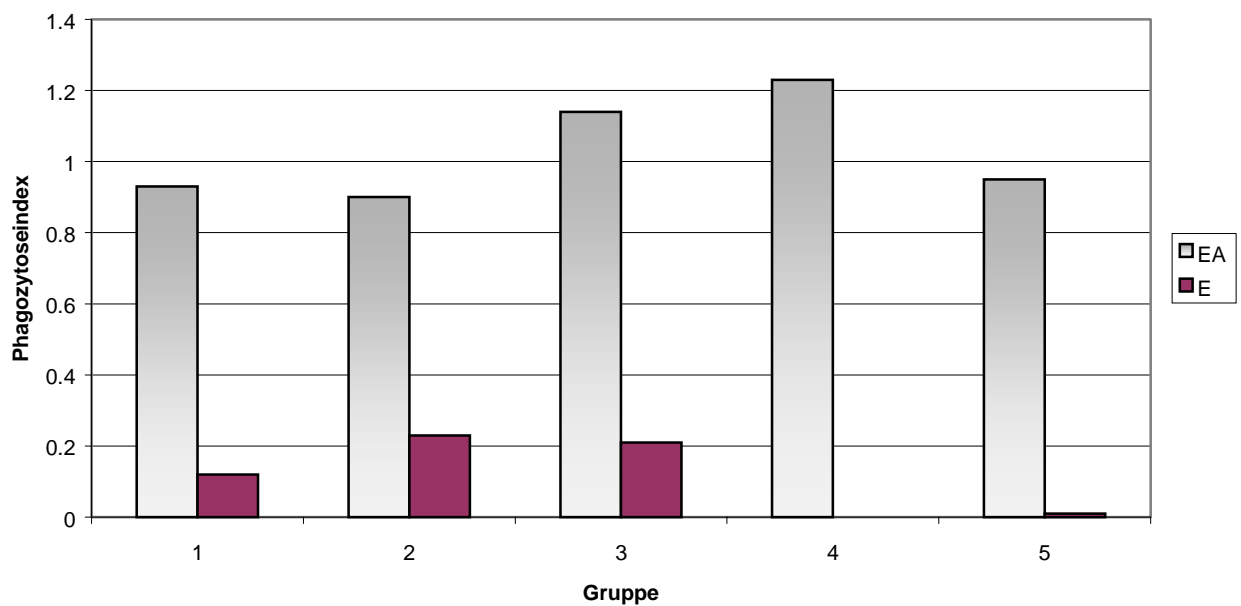
Gruppe	EA	E	t/min	E+SP1.B2
1	0.93	0.12	2	0.001
			4	0.00
2	0.9	0.23	6	0.20
			8	0.74
3	1.14	0.21	10	0.67
			12	0.24
4	1.23		14	0.71
			16	0.05
			18	1.27
5	0.95	0.01	20	1.48
			22	0.24
Mittelwert	1.03	0.143		

Phagozytose der E+SP1.B2-Zellen



Eigentlich sollte mit zunehmender Inkubationszeit auch der Phagozytoseindex, also die Anzahl der durchschnittlich pro Makrophage aufgenommenen Erythrozyten, steigen. Besonders große Abweichungen zeigen die Proben mit Inkubationszeiten von 12, 16 und 22 Minuten. Schwierigkeiten bei der Auszählung bereiteten die vielen Zellen, die nicht richtig angefärbt waren. Man konnte so nicht genau entscheiden, ob es sich bei den Aussparungen um leere Vesikel oder bereits lysierte Erythrozyten handelte. Die sehr hohe Anzahl an Makrophagen, die keine Zellen aufgenommen haben, deutet auf eine Beschädigung hin, die bei den eben genannten Ansätzen besonders stark war.

Phagozytose von Erythrozyten



Die mit Ambozeptor versetzten Erythrozyten (EA-Zellen) zeigen einen deutlich höheren Phagozytoseindex als die nicht opsonierten Erythrozyten (E-Zellen). Dies bestätigt die Erwartung, dass opsonierte Zellen besser aufgenommen werden.

L RIDA Quick CIS: Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenkäse

1. Ziel des Versuchs

Um Verfälschung von Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse mit Kuhmilch (enthaltenes IgG) nachzuweisen, kann dieser Membranschnelltest herangezogen werden.

2. Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen der ausgeteilten Vorschrift. Wir erhielten als Probe ein Stückchen Schafskäse.

3. Ergebnisse und Auswertung

In unserer Probe war keine Kuhmilch zur Streckung eingesetzt worden, die mit diesem Test hätte nachgewiesen werden können (> 5%). Die Membran blieb farblos.

M Versuch 9: FTA-Absorptionstest

1. Ziel des Versuchs

In der Serologie werden mit diesem Test indirekt Treponema-Erreger sichtbar gemacht. Dabei werden gegen Treponema-spezifische Antikörper durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen.

2. Durchführung

Die Durchführung entsprach komplett dem Skript.

3. Beobachtungen und Auswertung

Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren die kleinen gewundenen Treponemen als weiße Linien im positiven Kontroll- und Patientenserum sichtbar, bei der Negativkontrolle war nur eine leichte Hintergrundfluoreszenz zu bemerken. Der Patient war also mit den Erregern infiziert.

N Versuch 10: Serologische Differenzierung von Bakterien

1. Ziel des Versuchs

Mit Hilfe des Kauffmann-White-Schemas soll die genaue Spezies einer Salmonellenkultur ermittelt werden.

2. Durchführung

Die Durchführung entsprach komplett dem Skript.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

In nachstehender Tabelle sind die eingesetzten Antiseren und deren Wirkung aufgeführt:

Antiserum	Agglutination sichtbar
omnivalent	+
NaCl	-
anti O-6, 7, 8	+
anti O-7	+
anti O-6	+
anti O-1, 2	-
anti H-29	+
anti H-r	-
anti H-enx	-
anti H-g, m	-
anti H-1, 2, 5	-

4. Auswertung und Diskussion

Wie zu erwarten war, bildet sich beim omnivalenten Antiserum ein sichtbarer Niederschlag. Durch die Untersuchung mit den anderen Antiseren kann aus dem Kauffmann-White-Schema eine Spezies zugeordnet werden:

Gruppe C1: *Salmonella tennessee*

O Versuch 11: Komplement-Bindungsreaktion

1. Ziel des Versuchs

Die Komplementbindungsreaktion lässt sich zum Nachweis von Antikörpern gegen eine Vielzahl von bakteriellen und viralen Antigenen heranziehen. In diesem Versuch soll der Anti-Cardiolipintiter eines Patientenserums ermittelt werden.

2. Durchführung

2.1 Änderungen zum Skript

Die Durchführung entspricht dem Skript. Nur die Dekomplementierung des Patientenserums war von der Assistentin bereits durchgeführt worden.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Alle der angesetzten Verdünnungen im Testsystem zeigten komplette Hämolyse. Auf Anweisung des Betreuers wurde die Verdünnung einer anderen Gruppe für den Hauptversuch verwendet. Die letzte Verdünnung, die zur vollständigen Hämolyse führte, war 1:70; somit wurde für den Hauptversuch (2 Komplementeinheiten) die Verdünnung **1:35** genommen.

Im Hauptversuch konnten unterschiedliche Hämolysegrade beobachtet werden:

Verdünnung	Hämolyse
Serum-Kontrolle	vollständig
Antigen-Kontrolle	vollständig
1: 5	keine
1:10	keine
1:20	keine
1:40	vollständig
1:80	vollständig

4. Auswertung und Diskussion

Das Misslingen der Testreihe ist auch bei anderen Gruppen aufgetreten. Die Gründe dafür sind eigentlich nicht nachvollziehbar, da alle Ansätze gleich behandelt wurden.

Da keine Abstufung bei der Trübung erkennbar ist, gibt man die erste Verdünnung mit vollständiger Hämolyse als Ergebnis an; hier ist es demnach **1:40**.

P Versuch 12: Nachweis des Rheumafaktors (Latex-RF-Test)

1. Ziel des Versuchs

Über die sichtbare Agglutination soll das Vorhandensein des Rheumafaktors in einem Serum nachgewiesen werden (nach Singer und Plotz).

2. Durchführung

Es wurde je ein Tropfen positives und negatives Serum mit je einem Tropfen Latex-RF-Suspension vermischt und geschwenkt.

3. Beobachtungen und Auswertung

Beim negativen Kontrollserum sind kleine weiße Punkte zu erkennen, die aber nicht von einer Agglutination der an Latex gebundenen IgGs mit Rheumafaktor herrührt, sondern von Staub oder sonstigen Verunreinigungen. Dahingegen ist nach kurzem Schwenken des positiven Ansatzes eine weiße Ausflockung sichtbar, die sich am Rand des Tropfens ansammelt.

Q Versuch 14: Immunfluoreszenz auf Gewebedünnschnitten

1. Ziel des Versuchs

In manchen Untersuchungen ist es interessant, nicht nur zu wissen, ob sich ein Antigen nachweisen lässt, sondern wo. Dieses kann durch Anfärbung von Gewebedünnschnitten mit spezifischen markierten Antikörpern erfolgen. Für diesen Versuch soll über die Lokalisierung der Fluoreszenz die Spezifität (Art) der im Überstand der „*limiting dilution*“ befindlichen Antikörper untersucht werden.

2. Durchführung

Im Skript ist nur Grundsätzliches zur Durchführung angegeben. Deshalb wird hier der Versuchsaufbau detailliert aufgeführt.

Jede Gruppe erhielt mehrere Dünnschnitte (wir sieben) einer Rattenniere von 10 µm Dicke. Diese wurden für fünf Minuten in Aceton gestellt und anschließend getrocknet. Dann wurden die Überstände der Mikrotiterplatten aufgetragen:

	Schnitt Nummer						
	1	2	3	4	5	6	7
Depot	C5	E2	D9	G10	B8	E5	E9
von	Sven	Sven	Sven	Bärbel	Sven	Bärbel	Sven

Kriterium für die Auswahl der Überstände war, dass sich nur eine Kolonie eines Klons in dem Depot befindet. Lediglich eine Probe sollte den Überstand von mehreren Klonen enthalten (hier Nr. 7).

Die präparierten Schnitte wurden 30 min im Brutschrank bei 37° C inkubiert und danach zwei Mal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurde 1:60 verdünnt und drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden je 25 µl auf die Schnitte gegeben und erneut 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop betrachtet.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Fast alle der aufgetragenen Überstände enthielten für die Rattenniere spezifische Antikörper (Ausnahme: Depot E5; vgl. Anhang VII). Die folgenden Skizzen sollen die beobachteten Fluoreszenzmuster wiedergeben.

4. Auswertung und Diskussion

Bei den Schnitten 1 und 2 wurde die Papille angefärbt. Es handelt sich um den Antikörper PAP X 5C10. Die Schnitte 3, 4 und 5 wurden mit dem Antikörper PM II 25E1 inkubiert, der die Papille nicht anfärbt, sondern spezifisch ist für kleine Tubuli unter der Rinde und im Cortex.

Auf keinem unserer Schnitte konnten die Antikörper PAP XIV 1C11 (spezifisch für Henlesche Schleife) oder PM II 42F9 (spezifisch für Tubuli oberhalb der Medula, die pyramidenartig übereinander liegen).

R Versuch 22: Aufbau eines heterogenen Avidin-Biotin-Sandwich-ELISA-Testsystems

1. Ziel des Versuchs

Dieser Versuch gliedert sich in zwei Teilversuche: Im ersten soll die IL-2-Konzentration ermittelt werden, die man für die Eichreihe einer unbekanntem IL-2-Konzentration im zweiten Teil benötigt. Die Bestimmung ist notwendig, um die Antigenmenge dem Biotinylierungsgrad des Indikators anzupassen.

2. Durchführung

Die Schritte 1, 3 und 4 wurden nach den Anweisungen im Skript durchgeführt. Schritt 2 wurde nicht bearbeitet.

2.1 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Die Fraktionen, die aus der DEAE-Säule eluiert wurden und eine höhere E_{280} aufwiesen, wurden in einem Mancini-Test auf die gesuchten Antikörper hin untersucht. Es wurden die Fraktionen 12 bis 15 vereinigt und die Antikörperkonzentration über die optische Dichte bei 280 nm bestimmt (vgl. Ergebnisse).

Im fünften Schritt wurde der Antikörper mit Na_2CO_3 auf pH 8.5 umgepuffert und mit 50 μg NHS-X-Biotin pro mg Antikörper versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die ELISA-Platte wurde folgendermaßen beschichtet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				IL-2 /ng·ml ⁻¹			IL-2 /ng·ml ⁻¹			IL-2 /ng·ml ⁻¹		
A	blank			300			300			300		
B	blank			100			100			100		
C	- Catcher			30			30			30		
D	- Nachbesch.puffer			10			10			10		
E	- IL-2			3			3			3		
F	- Indikator			1			1			1		
G	- POD/Str.			0.3			0.3			0.3		
H	---			0.1			0.1			0.1		
	E10B8-Biotin			10 $\mu\text{g}/\text{ml}$			3 $\mu\text{g}/\text{ml}$			1 $\mu\text{g}/\text{ml}$		

Als Beschichtungspuffer wurde solange 0.05 M Na_2CO_3 in 0.05 M NaHCO_3 gegeben., bis der pH-Wert 9.5 betrug.

Ablauf des ELISA:

Der Catcher (75 μl) wurde in 10 ml Beschichtungspuffer gelöst, davon jeweils 100 μl in jedes Depot (außer A-C 1-3) pipettiert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 100 μl Waschpuffer wurden je 200 μl Nachbeschichtungspuffer in die Depots gegeben und 30 min bei 37° C inkubiert. Es wurde erneut drei Mal mit je 100 μl Waschpuffer gewaschen und dann die Depots mit IL-2 befüllt (C, D, F, G 1-3 mit je 300 ng/ml). Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde wie vorher gewaschen und jeweils 100 μl Indikator (E10B8-Biotin) aufgegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Brutschrank. Es wurde wiederum gewaschen, das POD-Streptavidin (100 μl) zugegeben und eine Stunde inkubiert (37° C). Nachdem ein letztes Mal gewaschen wurde, wurden je 100 μl des Substrats OPD-Ureat hinzu pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 450 nm bestimmt.

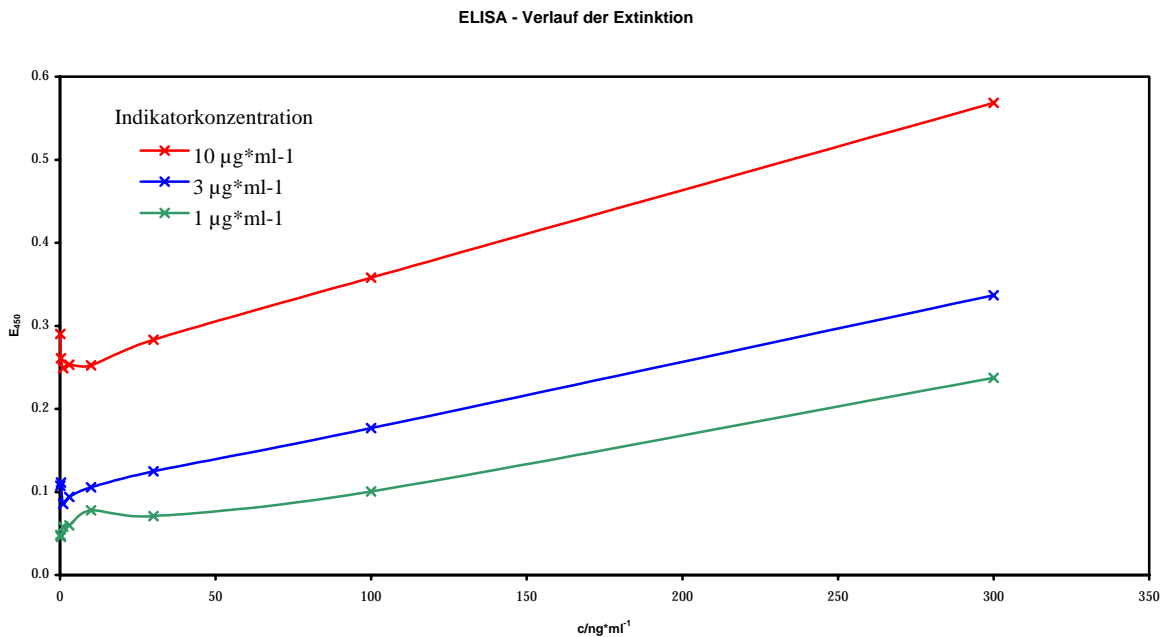
Der ELISA zur Bestimmung der unbekanntes IL-2-Konzentration wurde entsprechend durchgeführt. Allerdings wurden 65 µl Catcher eingesetzt, und es wurde mit je 200 µl gewaschen. Außerdem wurde ein Indikator zur Verfügung gestellt, da der im ersten ELISA verwendete keine brauchbaren Ergebnisse lieferte. Die Auftragung erfolgte nach dem Schema im Anhang X.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

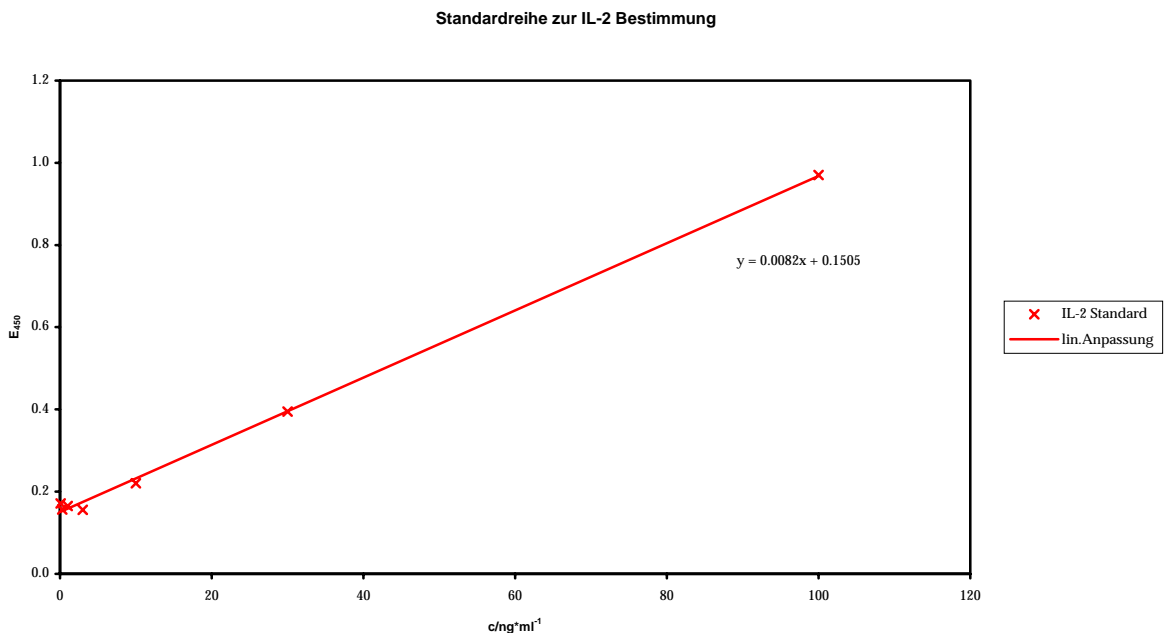
Die Elutionsdiagramme der FPLC und die Ausdrücke der Extinktionswerte beider ELISAs sind als Anhang (VIII und IX) angeheftet. Die nicht für die Mittelwertbildung verwendeten Werte sind markiert.

4. Auswertung und Diskussion

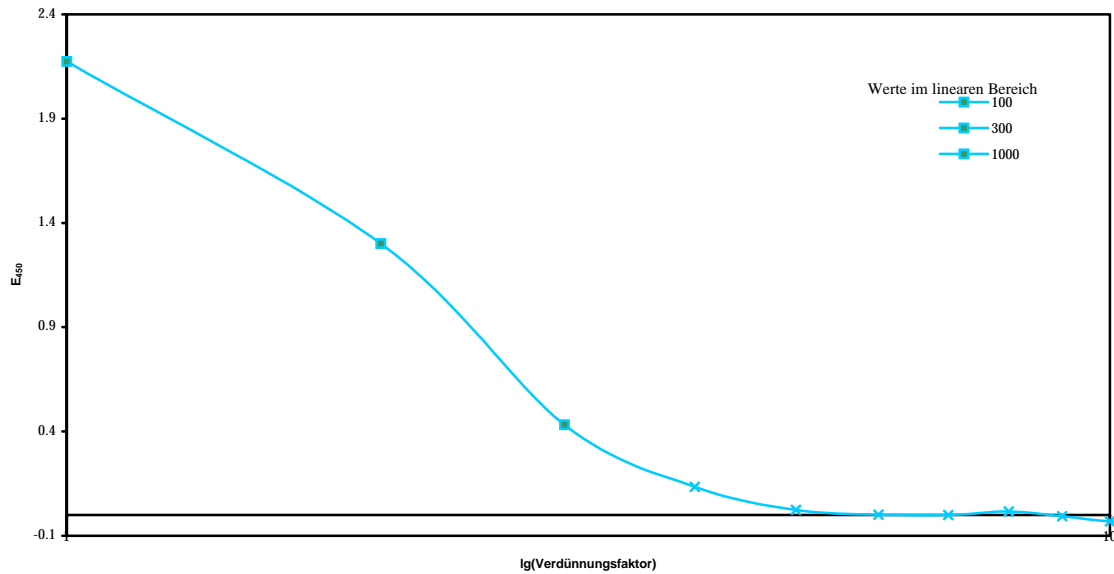
Für die Auswertung wurde vom Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Extinktion der Probe ohne IL-2 (Depots E1-3) abgezogen. Die Diagramme geben die Ergebnisse grafisch wieder.



Die Extinktionen verlaufen gleichmäßig, sind aber insgesamt zu niedrig. Für eine Auswertung sollte der E₂₈₀-Wert bei etwa 1 liegen. Deshalb haben wir einen biotinylierten Antikörper von den Assistenten für die unbekanntes IL-2-Probe zur Verfügung gestellt bekommen.



Bestimmung der IL-2-Konzentration



Die im obigen Diagramm markierten Werte wurden für die Konzentrationsbestimmung der unbekannt IL-2-Probe verwendet. Daraus wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Verd.	$c/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
1:100	25
1:300	42
1:1000	35
Mittelwert:	34

Der so gemittelte Wert der IL-2-Konzentration von $34\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt recht nahe am Sollwert ($30\mu\text{g}/\text{ml}$; Abweichung: 13%).

S Versuch 17: Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen anhand von Zellmarkern

1. Ziel des Versuchs

Es soll der Anteil an B- und T-Lymphozyten bzw. an CD4- und CD8-Zellen in verschiedenen Geweben (Milz, Thymus und Lymphknoten) bei unterschiedlich alten Mäusen untersucht werden.

2. Durchführung

2.1 Änderungen und Ergänzungen zum Skript

Jeweils eine junge (4 Wochen alt), eine mittelalte (11 Wochen) und eine adulte Maus (16 Wochen) wurden mit Diethylether getötet. Diesen Mäusen wurden der Thymus, die Milz und die Lymphknoten (außer bei der jungen Maus) entfernt und in PBS zerdrückt, um die Zellen zu suspendieren. Aufgrund eines Defekts im Mikroskop musste die Zellzahl abgeschätzt werden.

Die TRITC-markierten Antikörper (gegen T-Zellen) wurden 1:20, 1:50 und 1:100 auf ein Gesamtvolumen von $100\mu\text{l}$ Zellsuspension (der Milz und des Thymus) verdünnt. Die anderen Gruppen erhielten andere Antikörper: FITC-markierte gegen B-, CD4- und CD8-Zellen. Die Ansätze wurden 20 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit $500\mu\text{l}$ lysing solution versetzt. Bis alle Gruppen fertig waren, wurden die Röhrchen im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung erfolgte am FACScan mit folgenden Parametern:

Parameter	Messgröße
Anregungswellenlänge: 488 nm	
Fluoreszenz 1: 515-545 nm	FITC (Fluoreszein-isothiocyanat)
Fluoreszenz 2: 563-607 nm	TRITC
Fluoreszenz 3: 620-660 nm	PE-Cy5, PerCP etc.

Bei der TRITC-Markierung treten die gleichen Probleme auf wie unter I 3.2 auf Seite 17. Zudem bindet das der Fluoreszenzfarbstoff nur schlecht an den Antikörper.

3. Beobachtungen und Ergebnisse

Die Ausdrücke der Messungen sind im Anhang XI angefügt. Von unseren Ansätzen sind keine gemacht worden, da die Markierung nicht funktioniert hatte. Warum die Proben mit den Zellen der Lymphknoten nicht gemessen wurden, ist unklar.

4. Auswertung und Diskussion

Mit der Negativkontrolle der ersten Gruppe (Milz, adulte Maus) wurde der Nicht-Fluoreszenzbereich eingestellt.

Die folgende Tabelle gibt die Auswertung wieder:

16 Wochen	Milz		Thymus	
	CD4-FITC	CD8-FITC	CD4-FITC	CD8-FITC
M1	37.69	20.72	10.24	83.33
11 Wochen	Milz		Thymus	
	B-Zellen-FITC	CD8-FITC	B-Zellen-FITC	CD8-FITC
M1	57.45	9.38	18.57	57.38
M2		23.11		21.73

In der Milz der 16 Wochen alten Maus sind ca. 60% der untersuchten Zellen T-Zellen, die entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren; das grobe Verhältnis von CD4:CD8 ist 2:1. Aus dem Thymus untersuchte Zellen sind zu über 90% T-Zellen, wobei die CD8-Population mehr als 8 mal so groß ist wie die CD4-Population. Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen.

Bei der 11 Wochen alten Maus zeigt sich eine Aufspaltung der CD8-Population in zwei Gruppen M1 und M2. M1 sind die CD8-T-Zellen, M2 die natürlichen Killerzellen (NK), die ebenfalls CD8 exprimieren. Der Anteil der NK-Zellen liegt sowohl in der Milz als auch im Thymus mit über 20% recht hoch. In der Milz ist der Anteil der NK-Zellen sogar doppelt so hoch wie der der CD8-T-Zellen (im Thymus hingegen nur knapp ein Drittel). Mögliche Ursache ist eine Infektion der Maus. Der Anteil der B-Zellen in der Milz liegt mit 57% erwartungsgemäß deutlich höher als im Thymus mit ca. 19%.