

Polyklonale Antikörper

Eine Einführung in die Theorie
und Praxis der Antikörperherstellung

von Elvira Schecklies



Weinheim · New York
Basel · Cambridge · Tokyo

This Page Intentionally Left Blank

Elvira Schecklies

Polyklonale Antikörper



© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), 1996

Vertrieb:

VCH, Postfach 101161, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland)

Schweiz: VCH, Postfach, CH-4020 Basel (Schweiz)

Großbritannien und Irland: VCH (UK) Ltd., 8 Wellington Court,
Cambridge CB1 1HZ (England)

USA und Canada: VCH, 220 East 23rd Street, New York, NY 10010-4606 (USA)

Japan: VCH, Eikow Building, 10-9 Hongo 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

ISBN 3-527-30078-3

Polyklonale Antikörper

Eine Einführung in die Theorie
und Praxis der Antikörperherstellung

von Elvira Schecklies



Weinheim · New York
Basel · Cambridge · Tokyo

Elvira Schecklies
Inhaberin von pab productions
Bürgermeister-Herzog-Str. 5
D-85241 Hebertshausen

Das vorliegende Werk wurde sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autor und Verlag für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler keine Haftung.

Lektorat: Dr. Hans-Joachim Kraus, Karin Dembowsky
Herstellerische Betreuung: Dipl.-Wirt.-Ing. (FH) Hans-Jochen Schmitt

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Schecklies, Elvira:

Polyklonale Antikörper : eine Einführung in die Theorie und Praxis der Antikörperherstellung / von Elvira Schecklies. – Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge ; Tokyo : VCH, 1996
ISBN 3-527-30078-3

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), 1996

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, daß diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this book may be reproduced in any form – by photoprinting, microfilm, or any other means – nor transmitted or translated into a machine language without written permission from the publishers. Registered names, trademarks, etc. used in this book, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Druck: betz-druck, D-64291 Darmstadt

Bindung: Großbuchbinderei J. Schäffer, D-67269 Grünstadt

Printed in the Federal Republic of Germany

Inhalt

VORWORT	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 <i>Was ist ein Antikörper?</i>	3
2.2 <i>Wie entsteht ein Antikörper?</i>	5
3 ZIELSETZUNG	9
3.1 <i>Qualität und Quantität</i>	9
3.1.1 Antigen.....	9
3.1.2 Antikörper.....	11
3.2 <i>Zeitplanung</i>	13
3.2.1 Beginn der Antikörperproduktion.....	14
3.2.2 Dauer der Antikörperproduktion.....	14
3.3 <i>Antikörperanwendung</i>	16
3.3.1 Immunoblotting.....	17
3.3.2 Affinitätschromatographie.....	18
3.3.3 Enzymimmunoassays.....	19
4 WAHL DES ANTIKÖRPERS	25
4.1 <i>Polyklonale Antikörper</i>	25
4.1.1 Vorteile.....	25
4.1.2 Nachteile.....	27
4.2 <i>Monoklonale Antikörper</i>	28
4.2.1 Vorteile.....	31
4.2.2 Nachteile.....	31

VI

5 WAHL DES TIERES	33
5.1 Ziege	33
5.1.1 Alter	33
5.1.2 Größe	34
5.1.3 Antikörper	34
5.1.4 Tierhaltung	36
5.2 Huhn	40
5.2.1 Alter	41
5.2.2 Größe	42
5.2.3 Antikörper	42
5.2.4 Tierhaltung	45
5.3 Kaninchen	48
5.3.1 Alter	49
5.3.2 Größe	50
5.3.3 Antikörper	50
5.3.4 Tierhaltung	52
6 ANTIGENE	57
6.1 Niedermolekulare Haptene	57
6.1.1 Wahl der Kopplungsgruppe	58
6.1.2 Wahl des Trägermoleküls	63
6.2 Peptide	69
6.2.1 Molekulargewicht unter 1500	70
6.2.2 Molekulargewicht über 1500	71
6.3 Proteine	72
6.4 Zellen	73
6.5 Polysaccharide	75
7 IMMUNISIERUNGSVORBEREITUNG	77
7.1 Puffer	77
7.2 Adjuvanzien	79
7.3 Antigenkonzentration	80
7.3.1 Hohe Immunogenität des Antigens	81
7.3.2 Niedrige Immunogenität des Antigens	90

8	APPLIKATION	99
	8.1 Ziege	100
	8.1.1 Vorimmunisierung	100
	8.1.2 Boostinjektionen	101
	8.2 Huhn	102
	8.2.1 Vorimmunisierung	102
	8.2.2 Boostinjektionen	102
	8.3 Kaninchen	103
	8.3.1 Vorimmunisierung	103
	8.3.2 Boostinjektionen	104
9	NEBENWIRKUNGEN DER IMMUNISIERUNG	105
	9.1 Ziege	105
	9.2 Huhn	107
	9.3 Kaninchen	108
10	BLUTENTNAHME	109
	10.1 Vene	109
	10.2 Arterie	110
	10.2.1 Kaninchen	110
	10.2.2 Ziege	111
	10.3 Entbluten	111
11	ANTIKÖRPERGEWINNUNG	113
	11.1 Serumgewinnung	113
	11.2 Antikörperisolierung	113
	11.2.1 Serum	114
	11.2.2 Dotter	115
	LITERATUR	117
	SACHWORTREGISTER	119

VORWORT

Die Immunologie hat sich in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Forschungszweige entwickelt. Antikörper sind daher aus der modernen Forschung und Analytik nicht mehr wegzudenken, und ihre Anwendung wurde in den letzten zwei Jahrzehnten geradezu perfektioniert. Verschiedene analytische Methoden – seien es Immunoblotting, Affinitätschromatographie oder unterschiedliche Formen des Enzymimmunoassays – entwickelten sich in rasantem Tempo.

Dementsprechend erweiterte sich auch die Angebotspalette käuflich erwerbbarer Antikörper. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Fällen, in denen sie nicht auf dem freien Markt verfügbar sind. Antikörper müssen dann für jeden Einzelfall möglichst optimal hergestellt werden.

Die Anwendungen der Immunglobuline haben sich zwar sehr spezialisiert entwickelt, oft bleibt jedoch die Frage offen, was genau im Vorfeld bei der Planung zu tun ist, um einen für den jeweiligen Bedarf perfekten Antikörper zu erhalten.

Seit mehr als einem Jahrzehnt habe ich mich mit dieser Problematik und Fragestellung befaßt und dabei erkannt, wie eminent wichtig die einzelnen Schritte sind, die zur Produktion eines geeigneten Antikörpers führen. Bei genauer Beachtung der Voraussetzungen zur erfolgreichen Antikörperherstellung läßt sich beinahe für jeden beabsichtigten Zweck das richtige Immunglobulin produzieren.

Dieses Buch soll aufzeigen, welche Aspekte und Bedingungen berücksichtigt werden sollten, um dieses Ziel zu erreichen.

Bei alledem sollten wir eines nicht vergessen: Antikörper sind nicht synthetisch herstellbar. Wir verwenden dabei die unterschiedlichsten Tiere. Wir sollten sie aber nicht als Mittel zum Zweck betrachten, sondern sie als Lebewesen behandeln.

München, im Februar 1996

Elvira Schecklies

1 Einleitung

Seit dem Beginn der experimentellen Immunologie Ende des 19. Jahrhunderts setzt man die Spezifität von Antikörpern zur Erkennung und Analytik der unterschiedlichsten Moleküle ein. Heute sind sie aus vielen Forschungszweigen wie Humanmedizin, klinische Chemie, Biologie, Pharmazie, analytische Chemie oder Genetik nicht mehr wegzudenken. So unterschiedlich jedoch die Anwendungsbereiche sind, so verschieden sind auch die Anforderungen an den jeweiligen Antikörper.

So ist bei der Herstellungsplanung von großer Bedeutung, um welches Antigen es sich überhaupt handelt – ein an ein Trägerprotein gebundener Arzneistoff z.B. besitzt andere Kriterien als eine Zellsuspension. Ebenso hat die Wahl des Tieres entscheidenden Einfluß auf die Beschaffenheit des späteren Antikörpers. Dies ist insbesondere deshalb im Vorfeld zu berücksichtigen, da wir es mit Lebewesen zu tun haben, deren Reaktion auf die Immunisierung nicht vorhergesehen werden kann. Deshalb sollten die Rahmenbedingungen genau durchdacht werden.

Wichtig ist es vor allen Dingen, sich darüber im klaren zu sein, ob das Immunogen toxisch sein könnte oder irgendwelche Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Tieres hat. Derartige Effekte könnten die ganze Immunisierung gefährden. Durch geeignete Aufbereitung der Antigene und bedarfsgerechte Applikation lassen sich jedoch negative Begleiterscheinungen vermeiden.

Um die Qualität des produzierten Antikörpers zu gewährleisten, sollte man zunächst Fragen klären wie die nach der benötigten Menge, nach dem Zeitraum für die Herstellung, nach der erforderlichen Spezifität sowie dem Anwendungsgebiet.

Besondere Beachtung sollte man der Tierhaltung schenken. Allein Ställe mit genormten Maßen genügen nicht, um die Tiere optimal d.h. vor allem streßfrei zu halten.



Die Erfahrung zeigt hier ganz eindeutig, daß zufriedene und gesunde Tiere bessere Antiseren produzieren.

This Page Intentionally Left Blank

2 Immunologische Grundlagen

Die Funktion des Immunsystems hat jeder von uns schon am eigenen Leib erfahren, nämlich im Zusammenhang mit bestimmten Infektionskrankheiten, die nur einmal im Leben ausbrechen (z.B. Masern, Windpocken), oder bei der Impfung gegen Krankheiten (z.B. Kinderlähmung, Pocken). In beiden Fällen bildet der Körper eine Immunität gegen die entsprechenden Krankheitserreger aus. Die Moleküle, die uns vor einem erneuten Ausbruch der Krankheit schützen, nennt man Antikörper.

2.1 Was ist ein Antikörper?

Die Voraussetzung für die Produktion eines Antikörpers ist das Vorhandensein eines bestimmten Antigens. Ein Antigen ist dabei ein körperfremder Stoff, der in den Organismus gelangt ist. Dies können Fremdproteine, Glykoproteine, Viren, Bakterien und anderes mehr sein.

Chemisch betrachtet sind Antikörper Proteine des Blutplasmas. Sie befinden sich in der Globulinfraktion und werden deshalb auch *Immunglobuline* genannt. Die Globulinfraktion setzt sich aus einer großen Vielfalt von Immunglobulinen zusammen, die gegen gegen die unterschiedlichsten Antigene gerichtet sind.

Man kennt 5 Klassen von Immunglobulinen, von denen das Immunglobulin G (IgG) (Abb. 1) den größten Anteil stellt.