

# **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 10 11 61, 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

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



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

# 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 Immunoglobulinen zusammen, die gegen gegen die unterschiedlichsten Antigene gerichtet sind.

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

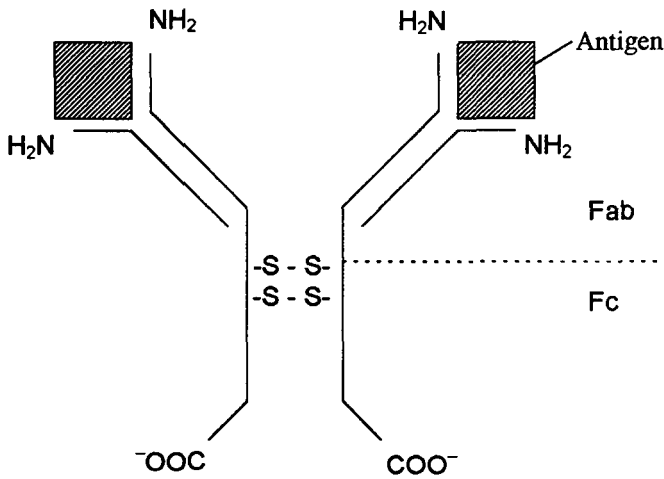


Abb.1: Struktur von Immunoglobulin G

Fab: variabler Teil

Fc: konstanter Teil

Das Molekül besitzt im wesentlichen eine Faltblattstruktur. Zwei L-Ketten sind jeweils durch einen variablen und einen konstanten Teil gekennzeichnet. Die Verknüpfung erfolgt über Disulfidbrücken bzw. Wasserstoffbrücken. Die konstanten Teile sind homolog, wenn auch nicht ganz identisch. Diese Tatsache ermöglicht die Isolierung der Gesamt-Immunoglobuline aus Plasma oder Serum durch z.B. Protein A (Substanz aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*), das in der Lage ist, den konstanten Teil der Antikörper zu binden. Die variablen Teile enthalten spezifische Strukturen, die mit dem Antigen reagieren. Dabei besitzt jedes Immunoglobulin 2 Bindungsstellen. Diese variablen Stellen, sogenannte Domänen, liegen in dem oberen Teil der Y-Konstruktion der Immunoglobuline. Sie sind gegen ganz spezifische Gruppen im Antigen gerichtet. Man nennt sie determinante Stellen. Die Determinanten können dabei völlig unterschiedlichen Charakter besitzen. Es kann eine bestimmte Sequenz von Aminosäuren sein, die jedoch nicht direkt aufeinander folgen müssen, sondern nur in Ihrer Tertiärstruktur benachbart sein können.