

4. Charakterisierung, Gewinnung und Reinigung der Antikörper

4.1 Allgemeiner Ablauf der Antikörperisolierung

Bevor Antikörper aus Blutseren oder Eidotter isoliert wurden, mußte überprüft werden, ob die gewünschten Antikörper in genügend hohem Ausmaß gebildet wurden. Dazu wurden die Antiseren bzw. die Eidotter bezüglich der erhaltenen Antikörpertiter und der Kreuzreaktivitäten charakterisiert. Zur Charakterisierung der Antikörper in den Kaninchenseren wurde ein RIA eingesetzt, zur Charakterisierung der aviären Antikörper diente ein ELISA, da sich der RIA als ungeeignet herausstellte (Kap. 4.3.1.2).

Die von de Villiers [135], van de Water [134] und Pepper [133] vorgeschlagene Definition soll auch hier bei den Messungen im RIA verwendet werden (vergl. Kap. 1.7). Gemäß Odell et al. [136] wird die im Test vorliegende und nicht die zum Test zugegebene Verdünnung als Titer angegeben. Bei der Auswertung von ELISA-Messungen stellt die maximal gemessene Extinktion die Bezugsgröße dar. Für den Begriff „shared reactivity“ wird im Folgenden der Begriff „Kreuzreaktivität“ verwendet.

Die Kreuzreaktivität wurde im RIA berechnet aus dem Quotienten aus der 6-APA-Konzentration, bei der 50% der maximalen Radioaktivität gemessen wurde [IH₅₀] und der Konzentration des Kompetitors, bei der 50% der Radioaktivität gemessen wurde [IC₅₀]. Durch Multiplikation mit 100 erhielt man die Kreuzreaktivität in Prozent:

$$\% \text{ Kreuzreaktivität} = ([IH_{50}]/[IC_{50}]) * 100 \%$$

Im ELISA wurde die Kreuzreaktivität analog berechnet, hier wurde statt der Radioaktivität die Extinktion gemessen.

Zu beachten ist, daß -wie der Titer- auch die Spezifität keine Materialkonstante darstellt, sondern von vielen Faktoren wie Konzentration, Inkubationsmedium und pH-Wert abhängt.

Nach der Charakterisierung der Antikörper wurden diese aus den Seren und Dottern mit geeigneten Reagenzien präzipitiert und anschließend mit verschiedenen Methoden an verschiedene Trägermaterialien immobilisiert. Die Dotterantikörper wurden teilweise vor der Immobilisierung durch Affinitätschromatographie an einer Haptensäule gereinigt.

4.2 Antikörper aus Kaninchenserum

4.2.1 Charakterisierung der Kaninchenserum

4.2.1.1 Immunblot (Western-Blot)

Der Immunblot wurde als qualitativer Nachweis der anti-6-APA-Antikörper in Kaninchenserum durchgeführt.

Ein Immunblot wird in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt werden Proteine - entweder Antikörper oder Antigene - mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Membran transferiert. Damit ergibt sich eine gute Nachweisbarkeit der Proteine, da sie nun frei zugänglich auf der Membran und nicht mehr im Gel eingebettet vorliegen [185]. Außerdem ist eine Konzentrierung und eine teilweise Renaturierung der Proteine möglich, da das bei der Elektrophorese verwendete Dodecylsulfat nicht auf der Membran festgehalten wird und sich von den Proteinen ablöst. Nun wird die Membran mit markiertem Antigen oder Antikörper inkubiert, so daß die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden kann. Mit Hilfe geeigneter Detektionsverfahren kann die gesuchte Antikörper- bzw. Antigenbande im Gel identifiziert werden.

Zum Immunblot wurden *Elektrophoresegele mit 7,5 % Polyacrylamid im Trenngel* und 4,5 % im Sammelgel verwendet. Bei dieser Konzentration laufen die Immunglobuline mit ungefähr 150 kDa genügend weit in das Gel ein. Die Trennung wurde nach dem bewährten Verfahren von Laemmli [173] durchgeführt.

Der Proteintransfer erfolgte elektrophoretisch im *Tank-Blot-Verfahren*. Für das zeit- und puffer-sparende „semi-dry-Verfahren“ stand keine geeignete Apparatur zur Verfügung. Andere Verfahren, z.B. der Transfer mittels Diffusion oder Kapillar- und Vakuumblothing sind weniger leistungsfähig bezüglich Schnelligkeit und Transferausbeute [59, 185, 186].

Als Transfermembran wurde Nitrocellulose verwendet. Sie ist für Proteinblotting die „Standardmembran“, da sie leicht zu lagern und handzuhaben sowie relativ billig ist. Außerdem kann sie reversibel gefärbt werden.

In der Literatur werden zahlreiche *Transferpuffer* beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Elektrodenpuffer für die Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet, da dieser einen schonenden Transfer gewährleistet. Er wurde jedoch ohne SDS-Zusatz eingesetzt, da dieses Detergenz eine verringerte Bindefähigkeit bei Nitrocellulose verursachen kann [185]. Auf den oft empfohlenen Methanolzusatz wurde ebenfalls verzichtet, da dieses zwar die Bindefähigkeit von Nitrocellulose erhöht, jedoch auch die Effizienz des Transfers reduziert und die Transferzeit für große Proteine verlängern kann [186].

Nach dem Transfer müssen die *überschüssigen Bindungsstellen der Membran blockiert* werden. Die dazu verwendeten Reagenzien dürfen die folgende Ligandenreaktion nicht stören und die abschließende Färbung nicht beeinträchtigen. Üblicherweise werden Proteine in Pufferlösung verwendet: BSA, Fischgelatine, Gelatine, Casein, Magermilchpulver, Schweine- und Pferdeserum in Kombination mit nichtionischen Detergenzien zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen werden eingesetzt.

5 % Magermilchpulver mit TWEEN-20 ist kostengünstig, liefert gute Ergebnisse und einen sauberen Hintergrund [187] und wurde daher in dieser Arbeit verwendet.

Als spezifische *Nachweisreaktionen* bieten sich alle spezifischen Ligandenreaktionen wie Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und Antigen-Antikörperwechselwirkungen an. Da hier Antikörper nachgewiesen werden sollen, war letztere Methode die Methode der Wahl. Tritiummarkiertes Benzylpenicillin wurde mit der Membran inkubiert, anschließend abgewaschen und mit einem Röntgenfilm detektiert.

Die Nitrocellulosemembran kann vor der Nachweisreaktion zur Kontrolle des Transfers reversibel mit *Ponceau S* angefärbt werden. Die Färbung ist nicht sehr empfindlich, nicht dauerhaft und schlecht zu dokumentieren, ist aber für diesen Zweck die am besten geeignete Methode [59, 185].

Nach der spezifischen Detektion kann die Membran irreversibel gefärbt werden. Es stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, von denen die India-Ink-Färbung ausgewählt wurde. Das Verfahren ist relativ empfindlich und einfach durchzuführen [59, 185].

Abbildung 4-1 zeigt den Röntgenfilm des Immunblots von anti-6-APA-KLH-Serum und mittels Ammoniumsulfatfällung gewonnener Immunglobulinfraktion:

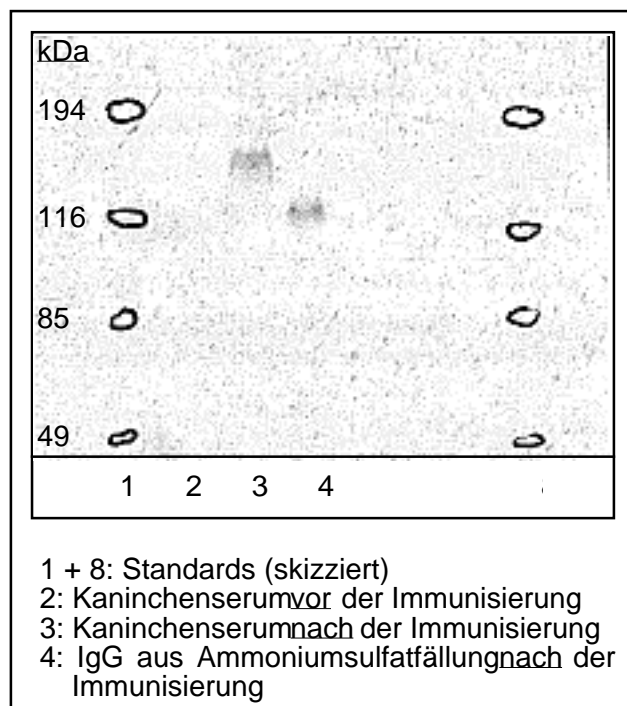


Abb. 4-1: Röntgenfilm des Immunblots von Kaninchenserum und -IgG vor und nach der Immunisierung mit dem 6-APA-KLH-Konjugat

Die Schwärzung in den Bahnen 3 und 4 belegt, daß im Serum penicillinspezifische Antikörper vorhanden sind. Es liegt keine unspezifische Bindung des tritiummarkierten Penicillins vor, da in der Spur, in der das Serum, das vor der Immunisierung von den Kaninchen gewonnen wurde, keine Schwärzung auftritt. Unerwartet waren die erheblich Unterschiedliche bei den Laufstrecken des

Kaninchenserums und der IgG-Fraktion, die durch Ammoniumsulfatfällung gewonnen wurde, Dieser ist dadurch zu erklären, daß die IgG-Fraktion vor dem Auftragen auf die Elektrophorese aus Zeitgründen nicht dialysiert wurde und demzufolge noch hohe Anteile an Ammoniumsulfat enthielt. Hohe Konzentrationen von Salzen beeinflussen jedoch das elektrophoretische Verhalten von Proteinen. Da es hier nur auf die qualitative Erkennung der spezifischen Antikörper ankam, wurde kein neuer Immunblot mit einer dialysierten Fraktion durchgeführt.

4.2.1.2 Radioimmunoassay (RIA)

4.2.1.2.1 Bestimmung des Titers

Die Seren vom 119. Tag (zwischen der 5. und 6. Boosterinjektion) wurden in einem RIA auf anti-6-APA-Antikörper getestet [79]. Dabei wurde tritiummarkiertes Benzylpenicillin mit den verdünnten Seren inkubiert. Die Trennung von ungebundenem und gebundenem Penicillin erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung. Das Ausmaß der Antikörper-Antigen-Reaktion konnte durch Messung der Radioaktivität im Präzipitat quantifiziert werden.

Der Titer des Antiserums, das mit dem KLH-Immunogen gewonnen wurde, liegt höher als derjenige der Antiseren, die durch Injektion der Ovalbumin-Immunogene gewonnen wurden: Das KLH-Antiserum hat einen Titer von 180, das Ovalbumin-1-Antiserum hat einen Titer von 50 und das Ovalbumin-2-Antiserum liegt mit 70 etwas darüber (Abb. 4-2).

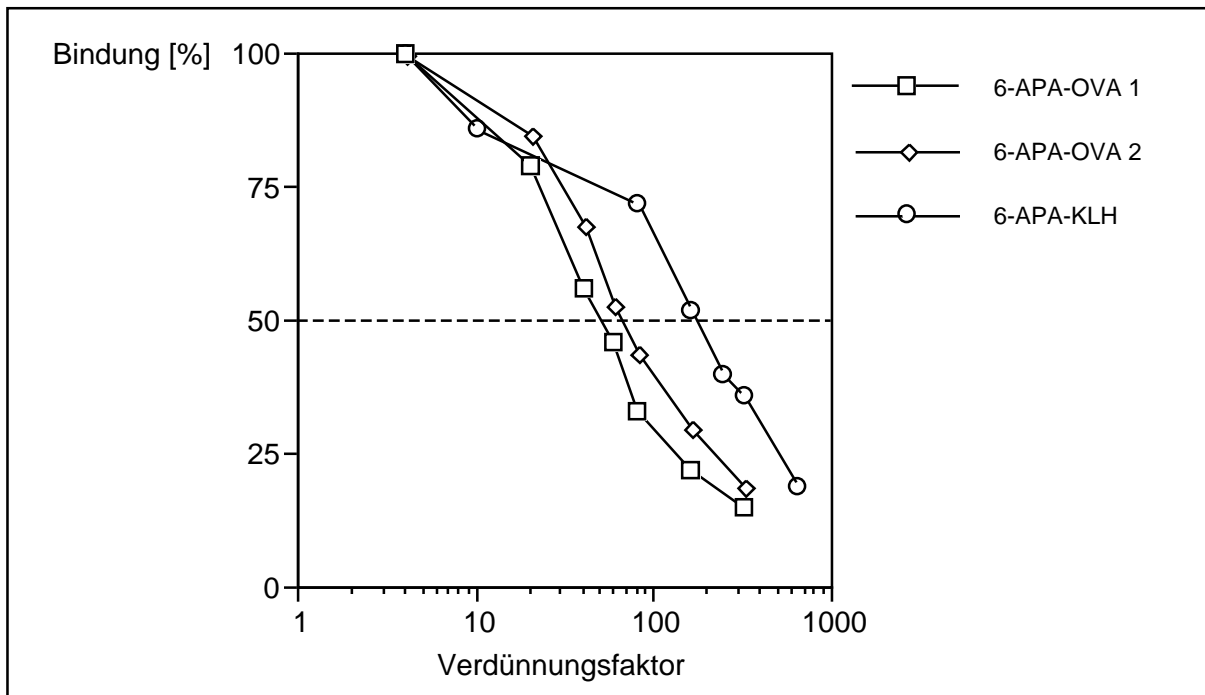


Abb. 4-2: Titer der Seren vom 119. Tag

Bei diesen Angaben ist zu berücksichtigen, daß die Messungen mit Benzylpenicillin durchgeführt wurden, die Antikörper jedoch gegen 6-Aminopenicillansäure hergestellt wurden. Es ist also eine Kreuzreaktivität bestimmt worden.

Wie bereits erwähnt (Kap. 3.2), wurde die Immunisierung zur Titererhöhung für 7 Wochen unterbrochen und anschließend wieder neu aufgenommen. Am 276. Tag (nach der Entblutung) hatten sich die Titer nur unwesentlich verändert (Abb. 4-3). Das mit dem Immunogen 6-APA-OVA 1 erzeugte Serum hatte einen Titer von 25, aus dem Immunogen 6-APA-OVA 2 resultierte ein Titer von 65, und mit dem 6-APA-KLH-Immunogen wurde ein Titer von 200 erzielt.

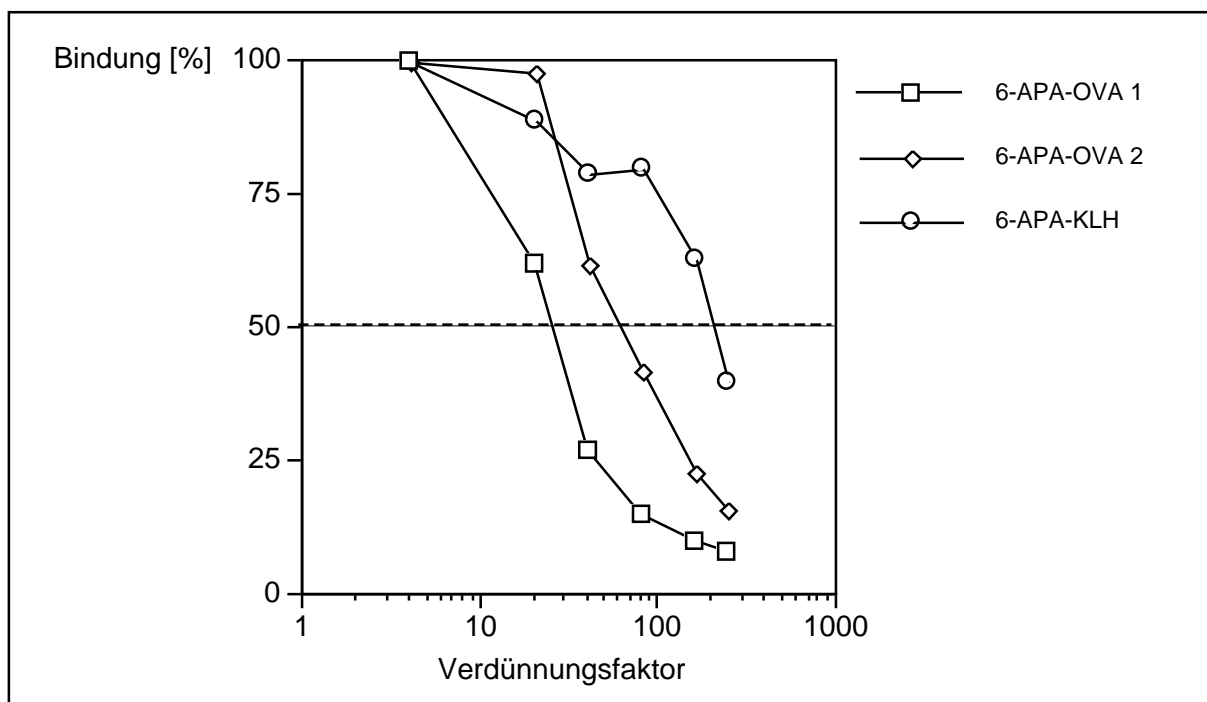


Abb. 4-3: Titer der Seren vom 276. Tag

4.2.1.2.2 Ermittlung der Spezifität

Es sollte gezeigt werden, ob die gewonnenen Antiseren auch für andere Penicilline und für Cephalexin als einem Vertreter aus der Gruppe der Cephalosporine spezifisch sind. Cephalexin ist bis auf den Ersatz des substituierten Thiazolidinringes durch einen substituierten Dihydrothiazinring strukturgleich mit Ampicillin.

Die Spezifität gegen möglichst viele Penicilline ist erwünscht, der Test mit Cephalexin sollte zeigen, in welchem Ausmaß die Antikörper den β -Lactamring erkennen bzw. ob der Thiazolidinring der Penicilline ein wichtiges Epitop ist.

Die mit dem 6-APA-KLH-Immunogen am 119. und 276. Tag gewonnenen Seren wurden auf

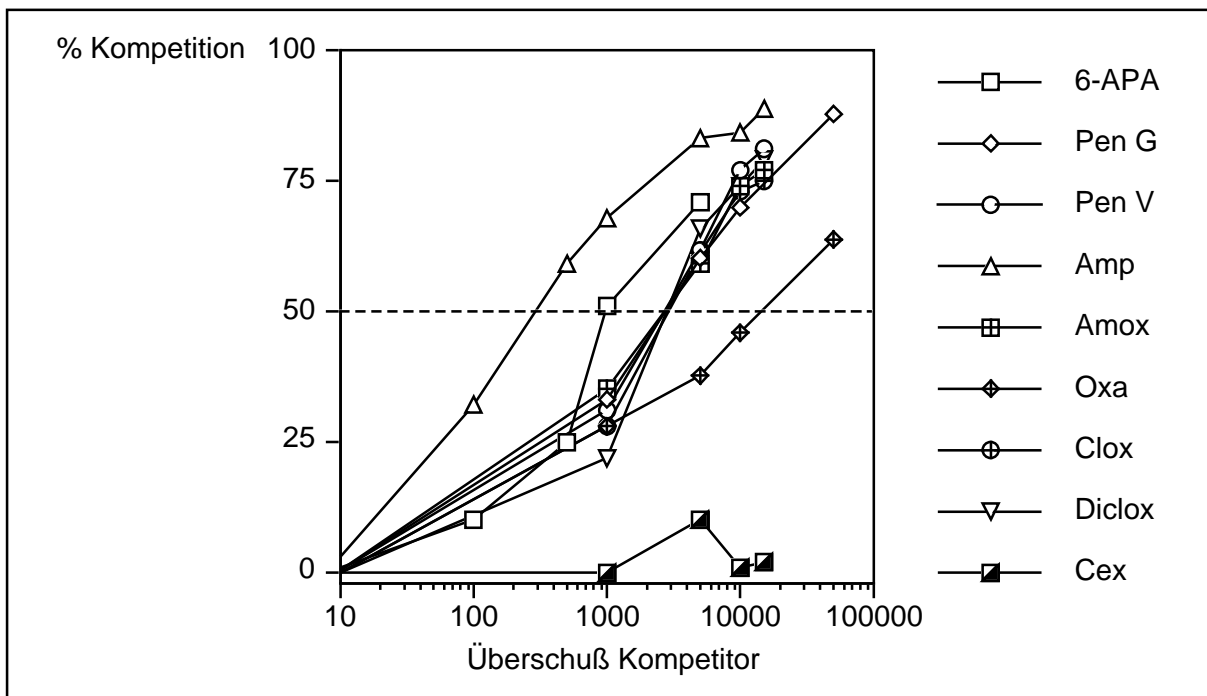


Abb. 4-4: Spezifität des anti-6-APA-KLH-Serums vom 119. Tag (Verdünnung 1:40)

Kreuzreaktivität gegen Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Cephalexin getestet.

Trägt man den eingesetzten Überschuss des Kompetitors gegenüber der eingesetzten Menge an ^3H -Benzylpenicillin gegen das Ausmaß der Verdrängung in % in ein Diagramm ein, so erhält man die Grafik in Abb. 4-4. Vordergründig läge die Vermutung nahe, daß zumindest bei Benzylpenicillin als Kompetitor durch die gleiche Menge des unmarkierten Moleküls eine Verdrängung von 50 % erzielt wird. Es ist jedoch die 2800-fache Menge dazu nötig, wenn als Testverdünnung die Serumverdünnung gewählt wurde, die als Titer bestimmt wurde. Die Verringerung der gebundenen Radioaktivität um 50 % aber nur dann mit der gleichen Menge Kompetitor möglich, wenn die Gesamtmenge an Hapten, also die Summe aus markiertem und unmarkiertem Penicillin konstant gehalten wird. Das Konkurrenzexperiment ist jedoch so ausgelegt, daß die Menge an radioaktivem Penicillin konstant bleibt, der Kompetitor wird zusätzlich zugegeben. Dadurch werden bei entsprechender Formulierung des Massenwirkungsgesetzes alle Variablen geändert, so daß eine Veränderung der Gleichgewichtskonstante verursacht wird.

Der Überschuss an Kompetitor, der notwendig ist, um 50 % des maximal gebundenen markierten Benzylpenicillins zu verdrängen, wird in Tabelle 4-1 (a) zusammengefaßt. Die Kreuzreaktivitäten sind nach der oben angegebenen Formel berechnet und auf 6-APA bezogen.

Während Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Amoxicillin, Cloxacillin und Dicloxacillin die gleiche Affinität zum Antikörper aufweisen, fällt auf, daß Oxacillin eine geringere Affinität und Ampicillin eine wesentlich höhere Affinität zeigt. Cephalexin zeigt keine Kreuzreaktivität. Diese Unterschiede müssen in der Struktur der Seitenketten liegen. Die Tatsache, daß Cephalexin nicht mit

Tab. 4-1 (a): Kreuzreaktivitäten des Serums nach der Immunisierung mit 6-APA-KLH

Kompetitor	Überschuß 119. Tag	Kreuzreaktivität am 119. Tag	Kreuzreaktivität am 276. Tag
6-APA	1000	100 %	100 %
Pen G	2800	38 %	267 %
Pen V	2800	38 %	nicht bestimmt
Amp	290	345 %	< 0,08 %
Amox	2800	38 %	< 0,08 %
Oxa	15000	7 %	< 0,08 %
Clox	2900	34 %	0,08 %
Diclox	2800	38 %	nicht bestimmt
Cex	-	0 %	0 %

dem Antikörper reagiert, zeigt, daß zur Erkennung des Antigens der Thiazolidinring wichtig ist, da das ansonsten strukturgleiche Ampicillin die höchste Affinität aller untersuchten Penicilline zu den Antikörpern reagiert.

Das Ausmaß der Kreuzreaktivitäten bei polyklonalen Antiseren sind angesichts der komplexen Struktur der Antikörper und der Verschiedenheit der miteinander konkurrierenden Antikörper nur schwer vorauszusehen. Wahrscheinlich sind die oben festgestellten Unregelmäßigkeiten in der Beziehung zwischen Stärke der Kreuzreaktivität und der Struktur des Analyten darauf zurückzuführen, daß in polyklonalen Seren eine Vielzahl von Antikörpern verschiedener Spezifität und Affinität nebeneinander vorliegen.

Im Gegensatz zum Titer änderte sich die Spezifität zwischen dem 119. und 276. Tag wesentlich (Tab. 4-1 (a)). Die Spezifität für Phenoxymethylpenicillin und Dicloxacillin wurden für den 276. Tag nicht mehr bestimmt.

Tab. 4-1 (b): Kreuzreaktivitäten der Seren nach der Immunisierung mit 6-APA-OVA

Kompetitor	6-APA-OVA 1		6-APA-OVA 2	
	Kreuzreaktivität am 119. Tag	Kreuzreaktivität am 276. Tag	Kreuzreaktivität am 119. Tag	Kreuzreaktivität am 276. Tag
6-APA	100 %	100 %	100 %	100 %
Pen G	45 %	910 %	37 %	143 %
Pen V	28 %	nicht bestimmt	35 %	nicht bestimmt
Amp	330 %	< 0,4 %	285 %	< 0,1 %
Amox	38 %	< 0,4 %	30 %	< 0,1 %
Oxa	8 %	< 0,4 %	7 %	< 0,1 %
Clox	30 %	< 0,4 %	30 %	< 0,1 %
Diclox	37 %	nicht bestimmt	35 %	nicht bestimmt
Cex	0 %	nicht bestimmt	0 %	nicht bestimmt

In den mit den Ovalbumin-Immungen erhaltenen Seren wurden ähnliche Werte bestimmt (Tab.4-1 (b)).

Nach der Immunisierungspause wurden also spezifische Seren gegen Benzylpenicillin erzeugt. Die Antikörper reagieren mit 6-APA weniger gut als mit Benzylpenicillin.

4.2.2 Gewinnung der Antikörper aus Kaninchenserum

Die Immunglobuline wurden in dieser Arbeit mittels Ammoniumsulfatfällung aus den Kaninchenserum isoliert. Die Ammoniumsulfatfällung stellt ein unkompliziertes, kostengünstiges und schnelles Verfahren dar. Sie ist eine der meistverwendeten Methoden zur Isolierung von Proteinen. Es war vorgesehen, die Antikörper gerichtet an einen Träger zu immobilisieren, indem die Kohlenhydratreste im F_c-Teil mit Natriummetaperiodat oxidiert und so Aldehydfunktionen zur Kopplung erzeugt werden sollten. Die Aldehydgruppen reagieren mit den Hydrazidfunktionen des Trägermaterials zu einem stabilen Hydrazon (Abb. 1-8). Die Immobilisierung ist damit auf Glykoproteine beschränkt (s. Kap. 1.4.4.6). Da die Ammoniumsulfatfraktion in der SDS-Gelelektrophorese nur geringe Verunreinigungen im höhermolekularen Bereich zeigte, und damit der Hauptteil der Proteine bzw. Glykoproteine zur Immunglobulinfraktion gehörten, schienen eine Aufreinigung mit Protein A oder andere weitere Reinigungsschritte keine Vorteile zu haben. Jeder weitere Schritt ist mit Verlusten von Antikörpern verbunden. Von dem geeigneten Serum standen jedoch nur wenige Milliliter zur Verfügung, da sich die Spezifität der Antikörper nach der Immunisierungspause unerwartet verändert hatte und vorher nur geringe Mengen Serum zu Testzwecken gewonnen wurden, die teilweise bereits für Vortests verbraucht wurden. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Reinigung der Kaninchenantikörper verzichtet. Aus denselben Gründen konnte auch keine Affinitätschromatographie an einer Haptensäule durchgeführt werden.

4.2.3 Immobilisierung der Serumantikörper

4.2.3.1 Immobilisierungsverfahren und Materialien

Die Immobilisierung der Antikörper aus Kaninchenserum wurde an *Affi-Prep*® Hz vorgenommen. Dabei handelt es sich um ein makroporöses Polymermaterial, das über einen 10-atomigen Spacer mit Hydrazidgruppen aktiviert ist. Dieses Material ist im Gegensatz zum zweiten verwendeten Material druckstabil und kann daher direkt mit einer automatischen Fastphasenextraktion gekoppelt werden (Kap. 5.2). Laut Hersteller können mehr als 10 mg Antikörper pro ml Gel gebunden werden.

Die Oxidation der Polysaccharidketten erfolgte nach Turková et al. [95] mit Natriummetaperiodat, die Kopplung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Verwendet wurde das Serum vom 119. Tag, also das letzte Serum, das mit den gewünschten Kreuzreaktivitäten gewonnen wurde. Zur Vorreinigung wurde, wie schon erwähnt, die Globulinfraktion durch Ammoniumsulfatfällung isoliert.

Die Kopplungsrate ergab sich aus der Differenz der eingesetzten Proteinmenge und der nicht gekoppelten Proteinmenge im Überstand nach der Reaktion. Der nicht gekoppelte Proteinanteil wurde über die Extinktion bei 280 nm ermittelt. Die Kopplungsrate betrug 27 %, die erhaltene Säule enthielt 13,9 mg Immunglobulin/ml Säulenbett.

In einem weiteren Ansatz wurden die Antikörper unter Verwendung von *Polyacrylamid-Hydrazidoagarose* nach Herstellerangaben immobilisiert. Dieses Material auf Agarosebasis besitzt ebenfalls eine Hydrazidaktivierung. Der Hersteller gibt eine Aktivierungsdichte von 18 μmol Hydrazid/ml Gel an. 4 ml Gel wurden eingesetzt, es konnten also maximal 72 μmol bzw. 10,8 mg Immunglobulin (bei einem Molgewicht von 150 kDa) immobilisiert werden. Es wurden 15 mg der Ammoniumsulfatfraktion (Serum vom 119. Tag) eingesetzt, davon wurden 10,7 mg (1,7 mg/ml), also die maximale Menge gebunden (Bestimmungsverfahren wie oben).

4.2.3.2 Kapazität der IgG-Säulen

Die minimal notwendige Bindungskapazität der Immunaффinitätssäulen ergab sich aus den Eckdaten, die durch die Zielsetzung und die sich anschließende HPLC vorgegeben wurden: Mit der eingesetzten UV-Detektion können nicht weniger als 20 ng Penicillin quantitativ erfaßt werden.

Das maximal mögliche Affinitätssäulenvolumen liegt, bedingt durch die verwendete Leersäule, bei 0,6 ml. Es könnten zwar größere Leersäulen verwendet werden, jedoch haben größere Säulenvolumina auch größere erforderliche Elutionsvolumina zur Folge.

Das maximale Elutionsvolumen ist aber auf 5 ml begrenzt, da ansonsten das Durchbruchvolumen der Festphasenkartusche erreicht wird, auf der die Penicilline aus dem Eluat angereichert werden sollten. Die Affinitätssäule muß daher 20 ng/0,6 ml Säulenvolumen, entsprechend rund 35 ng/ml binden können. Berücksichtigt man, daß nach Anwendung von Kombinationspräparaten auch zwei Penicilline gleichzeitig in Lebensmitteln gefunden werden können, erhöht sich die erforderliche Kapazität auf 70 ng/ml. Mit einer „Sicherheitsreserve“, die auch einen möglichen Aktivitätsverlust der Antikörper im Laufe der Nutzungsdauer berücksichtigt, liegt die Mindestkapazität der Affinitätssäulen bei etwa 150 ng/ml.

Die Immunaффinitätssäulen wurden unter folgenden Bedingungen getestet:

- Lagerung, Probenaufgabe und Waschen und Äquilibrieren der Säule mit PBS, pH 7,2
- Elution mit Glycinpuffer, pH 2,5 + Acetonitril (9 + 1, v/v)
- Fließgeschwindigkeit: ca. 1 ml/min

Zur Bestimmung der Kapazität der Säule auf *Polyacrylamid-Hydrazidoagarose-Basis* wurde 1 μg Benzylpenicillin aufgegeben. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt, mit Kronenetherlösung versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die Elutionsfraktionen wurden vor der Extraktion mit Phosphatpuffer neutralisiert.

Die Extrakte wurden zur Trockene eingedampft und mit Brommethylmethoxycumarin nach Berger [43] derivatisiert und per HPLC analysiert.

Aus der Differenz zum nicht-gebundenen Penicillin wurde als Kapazität ca. 25 ng/ml Säulenbett bestimmt. Der Rest des Benzylpenicillins wurde in der Waschfraktion wiedergefunden. Die erreichte Säulenkapazität war für eine on-line-Kopplung zu niedrig.

Die Kapazität der Affinitätssäule auf *Affi-Prep*® Hz-Basis wurde mit Hilfe von tritiummarkiertem Benzylpenicillin ermittelt. Die Analyse konnte nicht mittels HPLC nach Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden, da die HPLC-Anlage zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Es ergab sich eine Säulenkapazität von weniger als 10 ng Benzylpenicillin/ml Säulenbett.

4.3 Antikörper aus Eidotter

4.3.1 Charakterisierung der Dotterantikörper

4.3.1.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

4.3.1.1.1 Titerentwicklung

Die Dotter und die Blutseren der Legehennen vom 84. Tag (vor der vierten Immunisierung, = 3. Boosterimmunisierung) wurden in einem enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht. Dabei wurde die Mikrotiterplatte mit dem Antigen beschichtet und mit den verdünnten Dottern bzw. Seren inkubiert. Nach dem Waschen folgte ein weiterer Inkubationsschritt, dazu wurde ein anti-IgY-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert war, verwendet. Die Quantifizierung der Antigen-Antikörperreaktion erfolgte photometrisch nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat als Substrat [188]. Es waren sowohl mit 6-APA-KLH als auch mit KLH und 6-APA-OVA als Antigene Antikörper nachzuweisen. Daraus folgt, daß sowohl anti-KLH als auch anti-6-APA-Antikörper entwickelt wurden. Die Konzentration an anti-KLH-Antikörpern ist erwartungsgemäß höher als die anti-6-APA-Antikörperkonzentration. Abbildung 4-5 zeigt die Ermittlung des Titers aus den Dottern mit 6-APA-OVA als Testantigen¹⁾. Die Antikörpertiter in den Hühnerseren lagen geringfügig höher als

Tab. 4-2: Antikörpertiter in den Eidottern und Blutseren vom 84. Tag

Tier	anti-KLH		anti-6-APA-KLH		anti-6-APA-OVA	
	Dotter	Serum	Dotter	Serum	Dotter	Serum
15	2000	3000	2000	2500	1200	1400
19	1000	2500	1000	800	300	300
57	800	2000	300	500	200	200
79	300	400	120	150	150	150
81	1000	2000	700	2000	600	800

¹⁾ Die nicht fortlaufende Numerierung der Legehennen resultiert daraus, daß die Immunisierung der Tiere aus organisatorischen Gründen in ein anderes, unabhängiges Experiment eingebunden war.

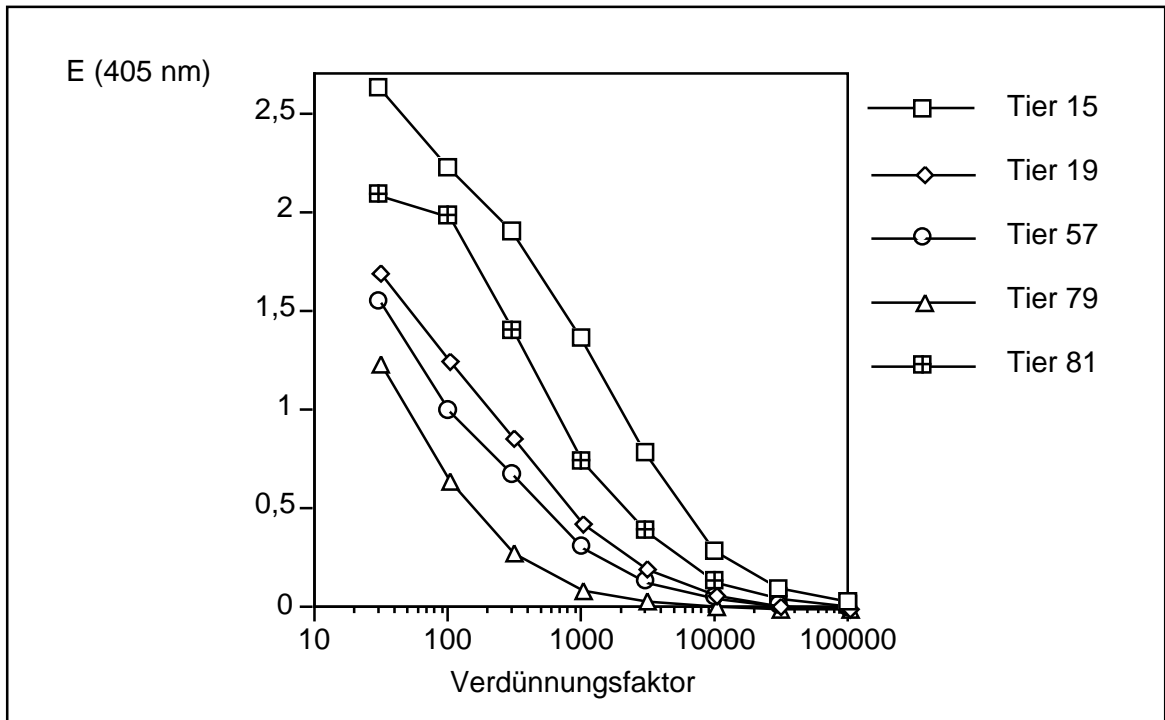


Abb. 4-5: Ermittlung des anti-6-APA-OVA-Antikörpertiters in den Eidottern vom 84. Tag

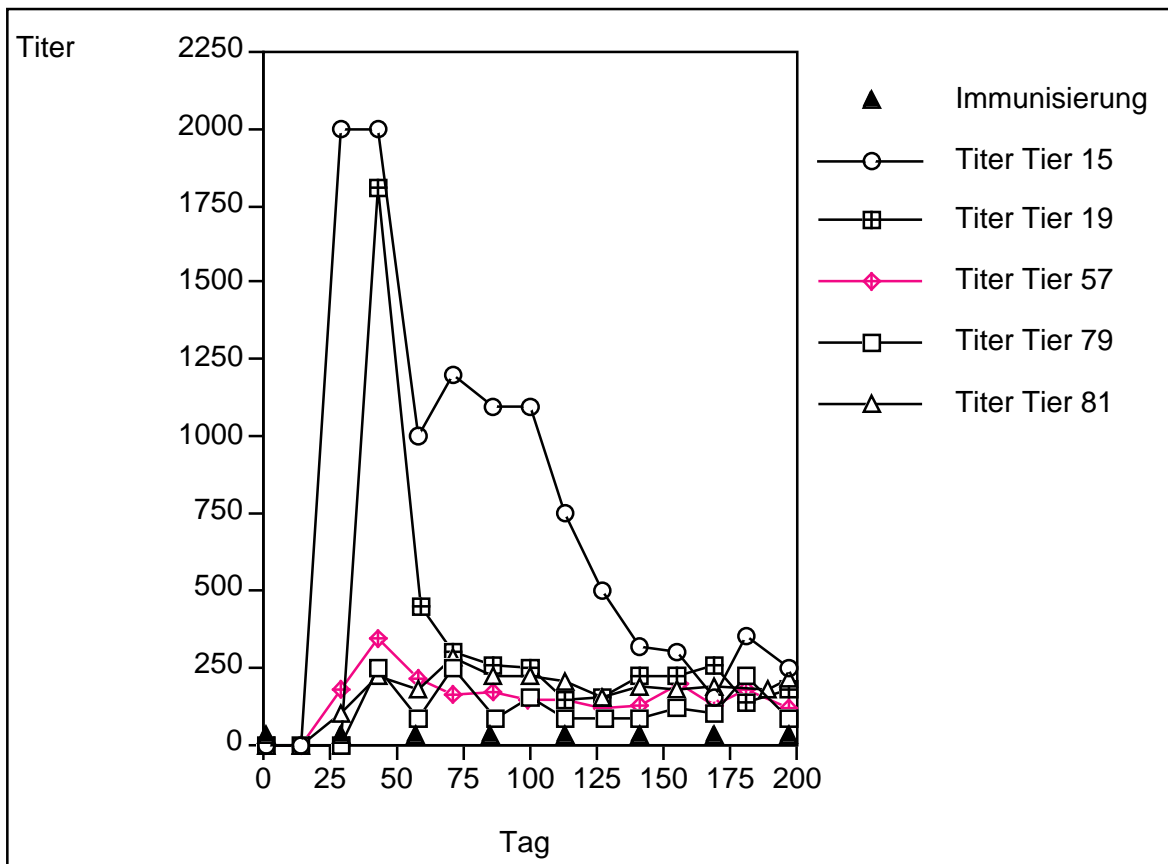


Abb. 4-6: Titerentwicklung in den Eidottern

in den Dottern (Tab. 4-2). Das Tier 15 hat am stärksten auf die Immunisierung reagiert, Tier 79 zeigt die schwächste Reaktion. Dieselbe Reihenfolge zeigte sich auch mit den anderen Antigenen (Tab. 4-2).

Die Titerentwicklung bei allen fünf Tieren wurde ebenfalls mittels ELISA verfolgt. Wie Abbildung 4-6 zeigt, reagierten die Tiere unterschiedlich: Die Tiere 15 und 19 entwickelten zu Beginn der Immunisierungsphase einen hohen Titer von 2000 bzw. 1800, der bei Tier 15 langsam, bei Tier 19 schnell wieder auf Werte von ungefähr 200 abnahm. Die anderen drei Tiere zeigten einen konstant niedrigen Titer im Bereich von 100 - 250. Es ließ sich kein Einfluß der Immunisierungszeitpunkte auf die Titerentwicklung feststellen.

4.3.1.1.2 Spezifität der Antikörper

An den Tagen 29, 169 und 197 wurde die Spezifität der Antikörper von Tier 15 auf 6-Aminopenicillansäure, Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Cephalexin geprüft (Abb. 4-7 a) - c)). Dabei wurde festgestellt, daß sich zunächst spezifische Antikörper für 6-Aminopenicillansäure entwickelten, während die anderen getesteten Substanzen von den Immunglobulinen nur sehr schlecht erkannt wurden. Die Kreuzreaktivitäten lagen, bezogen auf 6-APA, zwischen 0 und 2,7 %. An Tag 169 war bereits eine Veränderung der Spezifität zu beobachten: Die anderen β -Lactame mit Ausnahme von Cephalexin reagierten mit einer Zunahme der Kreuzreaktivität bis 62 %. Cephalexin wurde auch zu diesem Zeitpunkt nur in geringem Ausmaß von den Antikörpern erkannt. An Tag 197 stiegen die Kreuzreaktivitäten auf 11 % (Oxacillin) bis 120 % (Phenoxymethylpenicillin) an. Auch jetzt wurde Cephalexin nur bei Vorliegen sehr hoher Mengen erkannt.

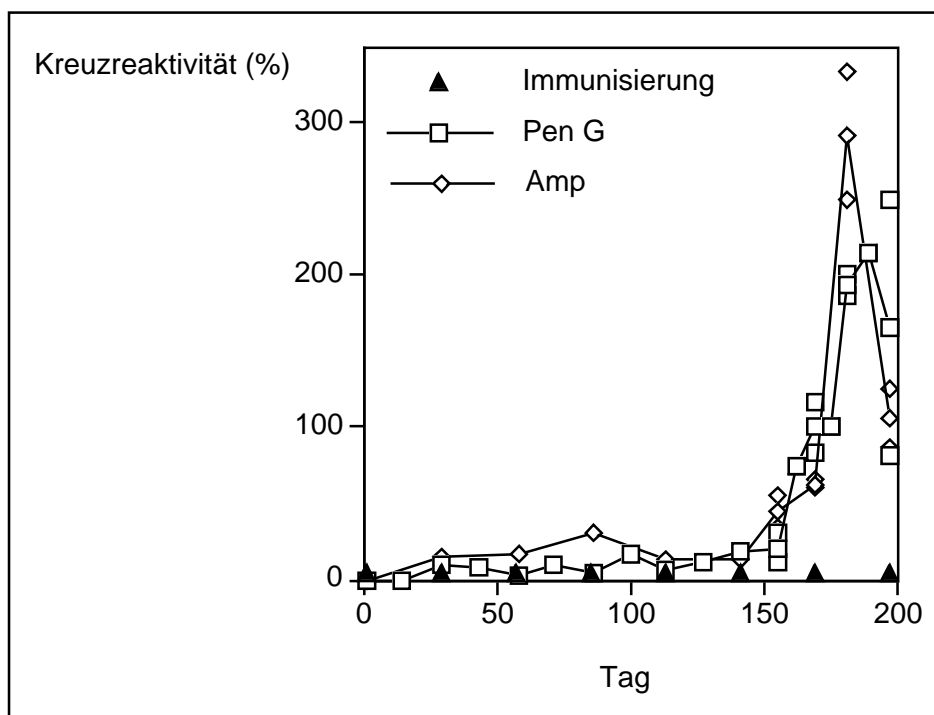


Abb. 4-8: Entwicklung der Kreuzreaktivität von Benzylpenicillin und Ampicillin bei Tier 15

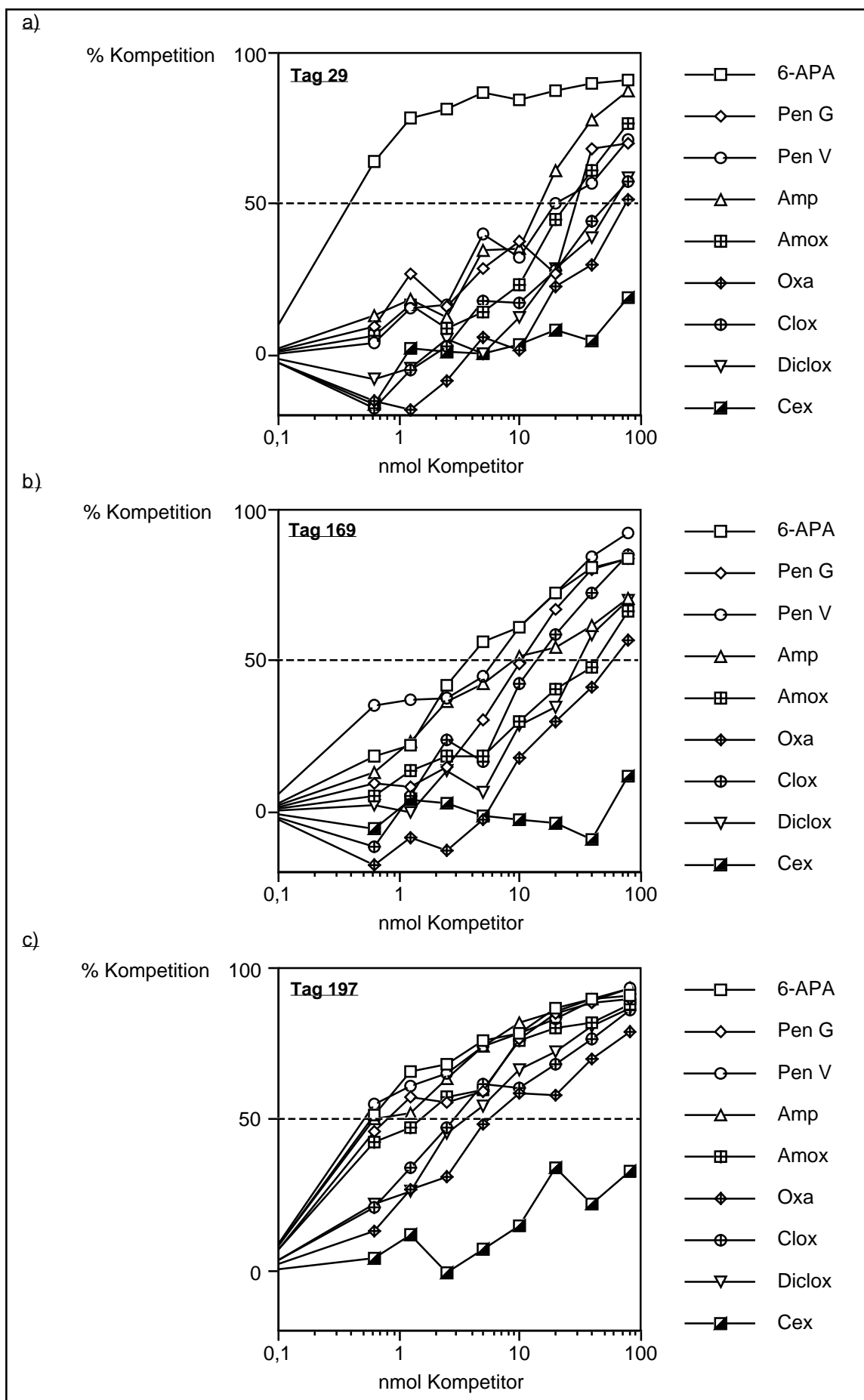


Abb.4-7: Entwicklung der Antikörperspezifität bei Tier 15: (a) Tag 29, (b) Tag 169, (c) Tag 197

Tab. 4-3: Veränderung der Spezifität der Dotterantikörper (– = nicht bestimmt)

Tag	29	30	43	44	58	59	113	114	196	197
Tier 15										
6-APA	100	–	–	–	–	–	100	–	–	100
Pen G	1	–	–	–	–	–	40	–	–	60
Amp	3	–	–	–	–	–	45	–	–	85
Tier 19										
6-APA	–	–	100	–	–	–	100	–	–	100
Pen G	–	–	40	–	–	–	65	–	–	15
Amp	–	–	170	–	–	–	280	–	–	75
Tier 57										
6-APA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Pen G	70	75	100	200	160	125	30	40	345	450
Amp	50	80	520	580	400	270	30	60	670	525
Tier 79										
6-APA	100	–	–	–	–	–	100	–	–	100
Pen G	10	–	–	–	–	–	10	–	–	10
Amp	40	–	–	–	–	–	40	–	–	40
Tier 81										
6-APA	100	–	–	–	–	–	100	–	–	100
Pen G	280	–	–	–	–	–	250	–	–	330
Amp	500	–	–	–	–	–	250	–	–	275

Tab. 4-4: Reproduzierbarkeit des ELISA

<i>Test am 27.09.1995</i>				
nmol 6-APA	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient	n
0	0,879	0,199	22,7 %	16
0,63	0,61	0,071	11,7 %	9
1,25	0,914	0,143	15,6 %	9
2,5	0,906	0,111	12,3 %	9
5	0,752	0,126	16,7 %	9
10	0,741	0,126	17,0 %	9
20	0,662	0,111	16,7 %	9
40	0,534	0,062	11,7 %	9
80	0,271	0,034	12,6 %	9
Mittelwert			15,2 %	
<i>Test am 28.09.1995</i>				
nmol 6-APA	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient	n
0	0,77	0,081	10,5 %	16
0,63	0,723	0,053	7,4 %	9
1,25	0,698	0,065	9,3 %	9
2,5	0,674	0,102	15,1 %	9
5	0,541	0,096	17,8 %	9
10	0,543	0,08	14,7 %	9
20	0,465	0,081	17,5 %	9
40	0,416	0,037	8,9 %	9
80	0,316	0,059	18,8 %	9
Mittelwert			13,3 %	

Um die Entwicklung der Spezifität genauer zu untersuchen, wurde bei Tier 15 exemplarisch für Benzylpenicillin und Ampicillin die Kreuzreaktivität über den gesamten Immunisierungszeitraum bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 4-8 gezeigt. Die Kreuzreaktivität der Antikörper entwickelte sich für beide Penicilline gleich: zunächst ist die Reaktivität nur gering, ab Tag 169 beginnen sie zu steigen. Am Tag 186 wird ein Maximum durchlaufen. Die Vielzahl der auch durch Mehrfachuntersuchungen bestätigten Datenpunkte bestätigt, daß hier kein analytischer Ausreißer vorliegt.

Zur Untersuchung der anderen Tiere wurde die Kreuzreaktivität von Benzylpenicillin und Ampicillin an verschiedenen Tagen gemessen (Tab. 4-3). Die Antikörper von Tier 15 zeigten die bereits erwähnten Spezifitätsänderungen. Die Tiere 79 und 81 entwickelten Antikörper mit konstanter Spezifität, wobei die Kreuzreaktivitäten bei Tier 79 auf niedrigem Niveau, bei Tier 81 dagegen auf hohem Niveau lagen. Bei den Tieren 19 und 57 fällt auf, daß die Kreuzreaktivitäten stark schwankten. Die Schwankungen wurden bei Tier 57 durch die Messung von benachbarten Tagen und Mehrfachbestimmung bestätigt. Wie Tabelle 4-4 zeigt, sind die Unterschiede nicht die Folge eines unreproduzierbaren ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse des kompetitiven ELISA mit 6-APA als Kompetitor an zwei verschiedenen Tagen. Die durchschnittlichen Variationskoeffizienten betragen 15,2 bzw. 13,3 % und liegen damit in einem befriedigenden Bereich.

4.3.1.2 Radioimmunoassay

Durch einen Radioimmunoassay gelang es unabhängig vom Zeitpunkt innerhalb des Immunisierungsschemas nicht, Antikörper in den Dottern der Eier nachzuweisen, die von den immunisierten Legehennen stammten. Es wurde zunächst versucht, die Hapten-Antikörperkomplexe wie bei den Kaninchenseren mit Ammoniumsulfat zu fällen. Die im Präzipitat gemessene Radioaktivität lag jedoch nur knapp oberhalb des Grundrauschens. Die Fällungsversuche mit Aceton brachten keine anderen Ergebnisse. Mit Polyethylenglykol als Fällungsreagenz ließen sich keine festen Präzipitate gewinnen. Es ist möglich, daß die Hapten-Antikörperkomplexe bei der Fällung wieder dissoziierten oder daß die Lipoproteine die Fällung störten.

4.3.2 Gewinnung von Immunglobulin Y aus den Eidottern

4.3.2.1 Isolierung der aviären Antikörper

In dieser Arbeit wurde das Verfahren nach Polson et al. [141] angewendet. Im Arbeitskreis von C. Kan und F. Schreurs, ID DLO Institute for Animal Science and Health, Department of Food Science, Beekbergen/NL, der die Immunisierungen vorgenommen hat, wurden mit diesem Verfahren sehr gute Erfahrungen gemacht. Zur Antikörpergewinnung wurden von Tier 15 die Dotter der Eier von Tag 188 - 192 (4 Dotter), von Tag 193 - 198 (5 Dotter) und von Tag 199 - 210 (10 Dotter) jeweils vereinigt und der Polyethylenglykolfällung unterworfen. Von Tier 81 wurden aus den Dottern der Tage 205 - 210 (5 Dotter) die Antikörper isoliert.

4.3.2.2 Affinitätsreinigung von Immunglobulin Y mittels einer Haptensäule

4.3.2.2.1 Herstellung des Haptensorbens

Für die affinitätschromatographische Reinigung von IgY mußte zuerst ein Haptensorbens hergestellt werden, mit dem die gewünschten Antikörper isoliert werden konnten. Als Trägermaterial wurde carbonyldiimidazolaktiviertes Fractogel TSK gewählt. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Polymer mit einer Korngröße von 32 - 63 µm, dessen aktive Gruppen mit primären Aminen reagieren. An das Material wurde 6-Aminopenicillansäure mit der Aminofunktion gekoppelt, so daß das Hapten die gleiche Orientierung besaß, wie im zur Immunisierung eingesetzten Immunogen (Abb. 4-9).

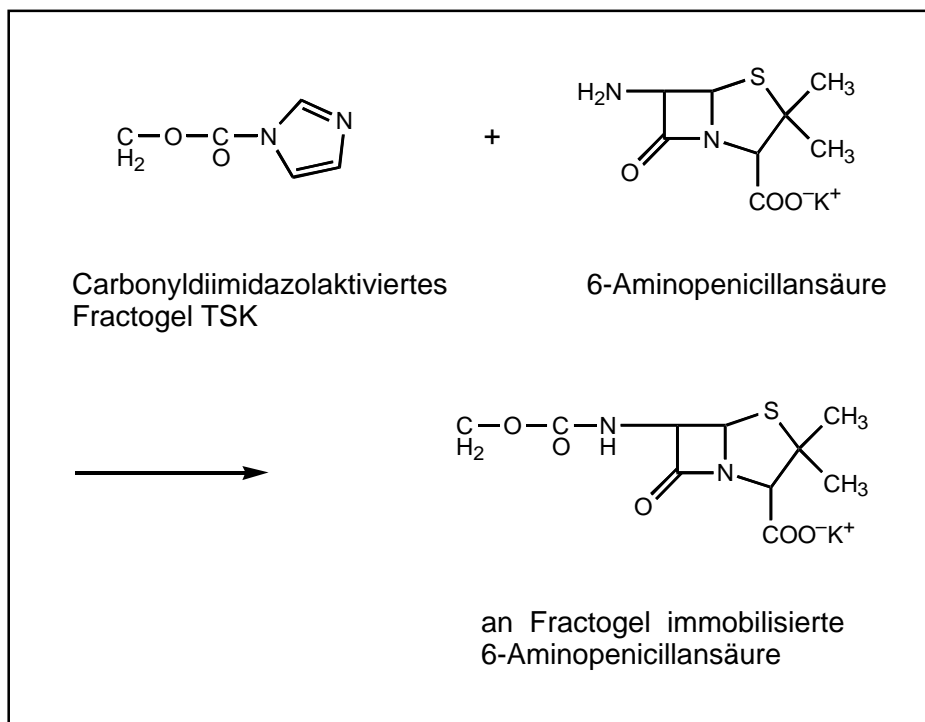


Abb. 4-9: Immobilisierung von 6-Aminopenicillansäure

Die Reaktion von Fractogel mit 6-Aminopenicillansäure wurde nach [79] in Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 8,3 durchgeführt. Das Haptensorbens wurde in eine Säule mit 10 cm Höhe und 1 cm Durchmesser (Pharmacia C 10/10) überführt, das Bettvolumen betrug 6 ml. Der Überstand sowie der zum Waschen der Säule verwendete Puffer wurden gesammelt und vereinigt und nach der Gefriertrocknung einer Penicillinbestimmung nach Boison et al. [35] unterworfen (Kap. 8.12 und Anhang I.2). Daraus läßt sich zurückrechnen, daß 3,5 mg 6-Aminopenicillansäure am Trägermaterial immobilisiert wurden. Das entspricht bei einer molaren Masse von 254,4 g/mol 13,8 µmol. Legt man für Immunglobulin Y eine molare Masse von 153.000 g/mol zugrunde, ergibt sich eine Säulenkapazität von 2,1 g IgY.

4.3.2.2 Immunaффinitätschromatographie am Haptensorbens

Die mittels Polyethylenglycolfällung isolierte Globulinfraktion wurde mit Phosphatpuffer pH 7,4 auf die Säule aufgegeben und solange mit diesem Puffer gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm wieder auf den ursprünglichen Wert abgesunken war. Nach dem Wechsel des Puffers (Glycinpuffer, pH 3,0) war die Elution der spezifischen anti-6-APA-Antikörper in zwei Fraktionen zu beobachten (Abb. 4-10). Aus 10 Dottern konnten so rund 40 mg anti-6-APA-IgY gewonnen werden.

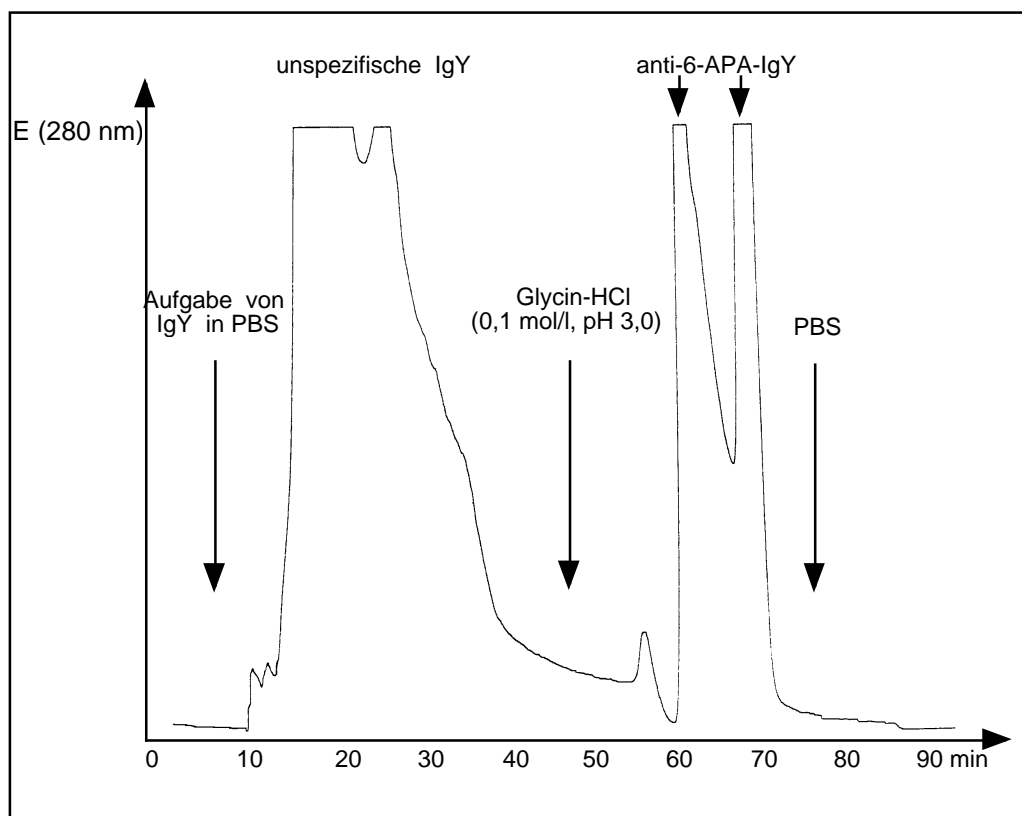


Abb. 4-10: Affinitätsreinigung von Immunglobulin Y an einer Haptensäule

4.3.2.3 Überprüfung der Wirksamkeit der Antikörperreinigung

Die Antikörpergewinnung und -reinigung umfaßte zwei Schritte: Die Polyethylenglycolfällung als unspezifische Vorreinigung und Anreicherung und die Affinitätschromatographie zur Gewinnung von anti-6-APA-Antikörpern. Es wurden zwei Fraktionen anti-6-APA-IgY gewonnen, deren unterschiedliche Charakteristika ermittelt werden sollten. Außerdem mußten Verluste und Veränderungen durch die Ultrafiltrationsschritte, die zur Abtrennung des Polyethylenglykols und zum Austausch des Elutionspuffers eingesetzt wurden, festgestellt werden.

Die Polyethylenglycolfällung wurde zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Dazu fand wie beim Blotting ein Gel mit 7,5 % Polyacrylamid Verwendung (Abb. 4-11). Die

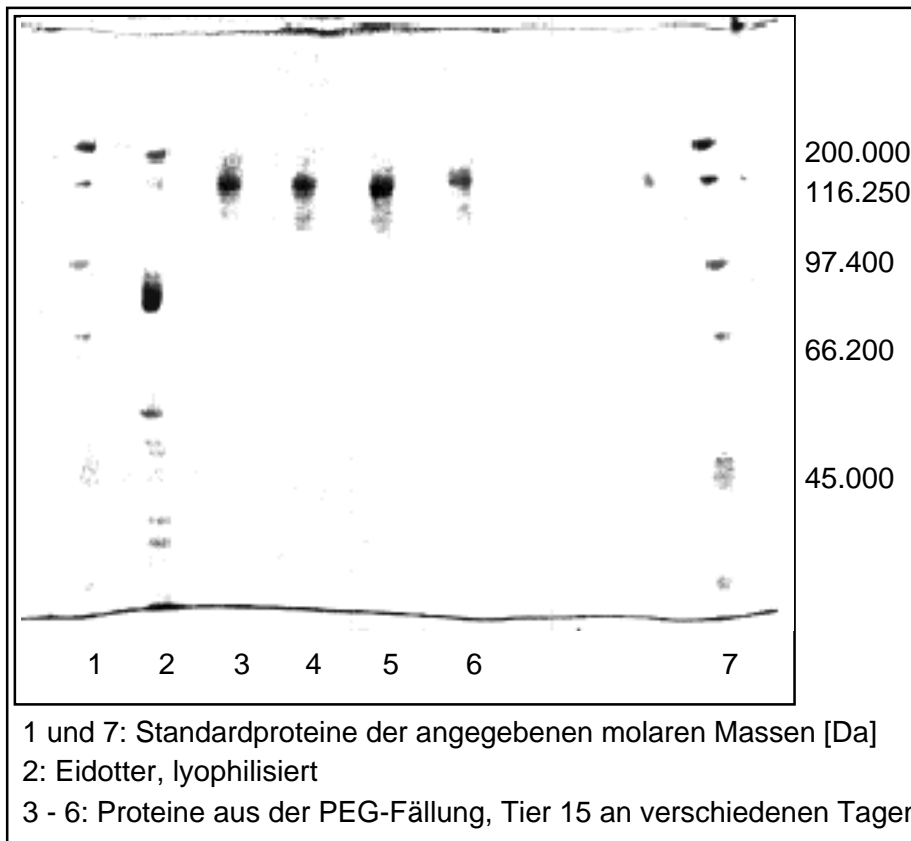


Abb. 4-11: Gelelektropherogramm der Globulinfraktion von Eidotter nach Anfärbung mit Serva Blau R

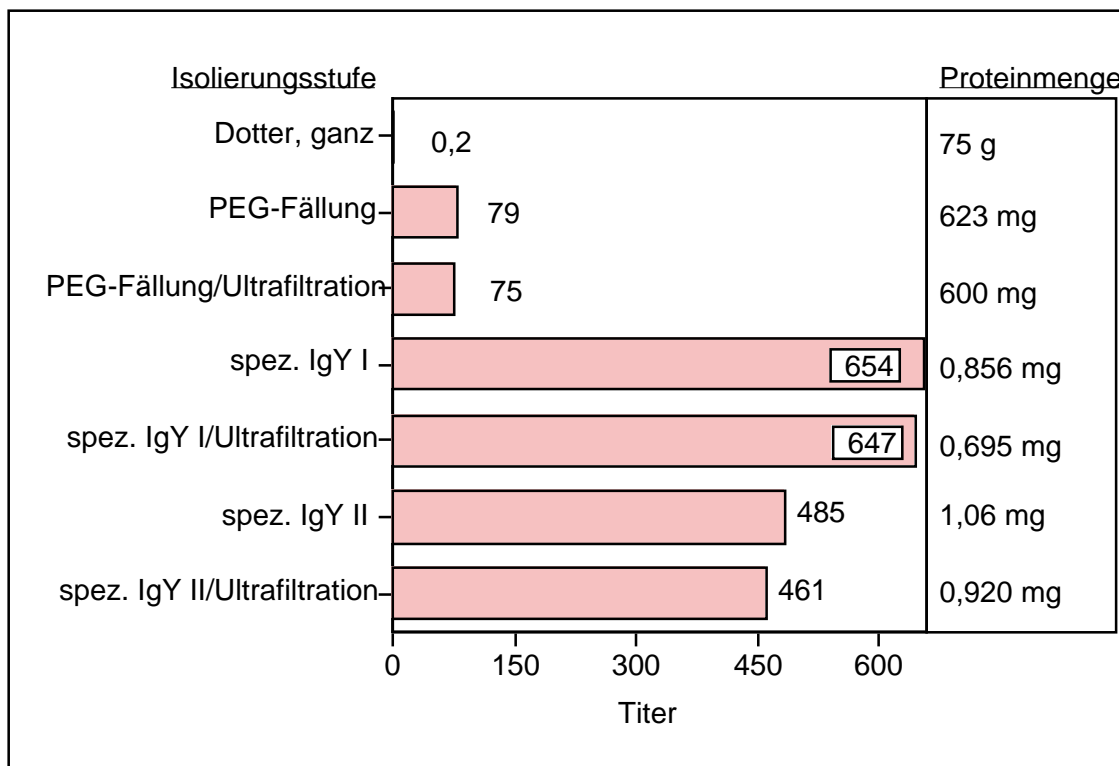


Abb. 4-12: Anstieg des Antikörpertiters bei der Isolierung von anti-6-APA-Antikörpern, die rechte Spalte gibt die absolute erhaltene Proteinmenge an

durch die Polyethylenglykolfällung isolierten Proteine haben eine apparente molare Masse von 153 kDa (ermittelt über eine lineare Regression, der Logarithmus der molaren Masse ist proportional zur Laufstrecke, s. Anhang I.1). Die tatsächliche Masse muß man jedoch in einem höheren Bereich erwarten, da Glykoproteine in der SDS-Gelelektrophorese oft ein zu geringes Molgewicht zeigen [185]. Das Elektropherogramm belegt, daß die isolierte Proteinfraction nur geringe Verunreinigungen enthält und daß eine Anreicherung stattgefunden hat.

Für den gesamten Isolierungsverlauf wurde von jedem Zwischenschritt der Antikörpertiter ermittelt und auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml normiert. Es ergab sich der Abb. 4-12 gezeigte Verlauf. Die Polyethylenglykolfällung ermöglicht eine Anreicherung der Antikörper um den Faktor 80, die Affinitätsreinigung um den Faktor von 3250 gegenüber dem Eidotter. Aktivitätsverluste durch die Ultrafiltration treten nicht auf. Die Spalte „Proteinmenge“ zeigt, daß nur ein Bruchteil der im Dotter vorhandenen Proteine zur Fraktion der spezifischen Antikörper gehört.

Die Fraktionen I und II zeigen hinsichtlich des Titers keine signifikanten Unterschiede. Sie unterscheiden sich aber hinsichtlich der Affinität, wie eine Untersuchung per ELISA zeigte (Abb. 4-13). Die Fraktion II besitzt gegenüber 6-APA und Benzylpenicillin eine etwa 20-fach schwächere Affinität als die Fraktion I. Aufgrund dieser Untersuchung wurde die Fraktion II nicht mit Fraktion I gemischt und auch nicht weiteruntersucht.

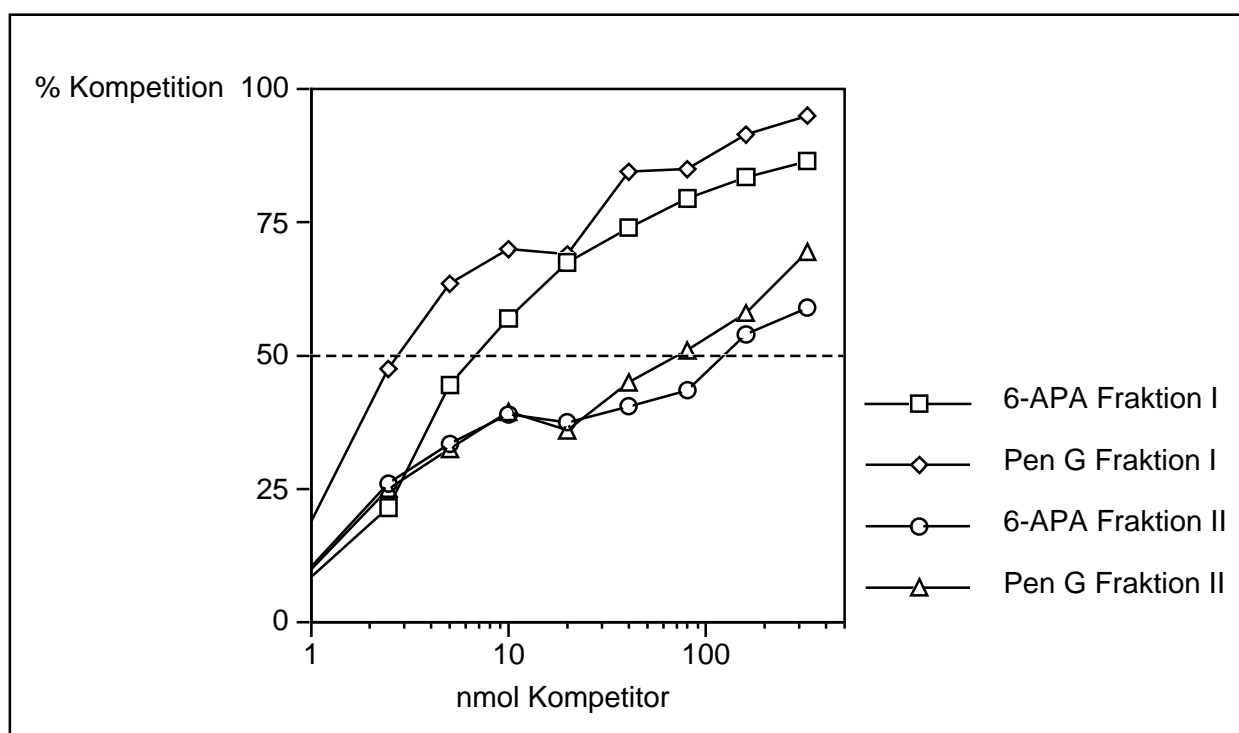


Abb. 4-13: Vergleich der spezifischen Fraktionen I und II mittels ELISA

Im Ausgangsprodukt sowie bei der Fraktion I wurde die Reaktivität gegen 9 β -Lactame sowie gegen Ovalbumin, Benzoesäure und ein Penicillinderivat mit geöffnetem β -Lactamring (Benzylpenicilloyl- ϵ -aminocarpoat, BPO-AC) getestet (Tab. 4-5). Der Test gegen Ovalbumin erfolgte, da dieses Protein ein Bestandteil des ELISA ist: Die Mikrotiterplatten wurden mit einem 6-APA-Ovalbumin-Konjugat beschichtet. Benzoesäure wurde getestet, da diese im als Immunogen verwendeten 6-APA-KLH-Konjugat und im 6-APA-Ovalbumin-Konjugat als Spacer dient. Die Bildung von Antikörpern gegen Benzoesäure würde die Notwendigkeit und Zweckmäßigkeit eines Spacers zwischen Hapten und Trägerprotein in Frage stellen. Die Untersuchung zeigt, daß Benzoesäure gar nicht mit den Antikörpern reagiert. Die Reaktivität der Immunglobuline für Ovalbumin liegt erstaunlicherweise höher als für Cephalexin, obwohl ein Huhn in der Regel keine Antikörper gegen das körpereigene Ovalbumin bildet. Hier könnte auch eine unspezifische Bindung vorliegen. Der Test gegen das Penicilloyl-Derivat wurde durchgeführt, um eine eventuelle Öffnung des β -Lactamringes bei der Immunogensynthese oder nach der Immunisierung im Organismus nachzuweisen. Die Isolierung der spezifischen Antikörper hat zwar Veränderungen bei den Kreuzreaktivitäten verursacht, jedoch ließen die Antikörper sowohl vor als auch nach der Isolierung aufgrund der Spezifität eine gute Eignung für eine immunaffinitätschromatographische Isolierung von Penicillinrückständen aus Lebensmitteln erwarten.

Tab. 4-5: Vergleich der Antikörper vor und nach der Isolierung

Kompetitor	Kreuzreaktivität im Dotter	Kreuzreaktivität in Fraktion I
6-APA	100 %	100 %
Pen G	286 %	778 %
Pen V	286 %	280 %
Amp	286 %	467 %
Amox	222 %	350 %
Oxa	100 %	100 %
Clox	133 %	233 %
Diclox	100 %	117 %
Cex	2,5 %	7,6 %
Ovalbumin	5,0 %	23 %
Benzoesäure	0 %	0 %
BPO-AC	0 %	0 %

4.3.3 Immobilisierung der aviären Antikörper

4.3.3.1 Immobilisierungsverfahren und Materialien

Die Immobilisierung der Antikörper aus Eidotter wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Dabei sollten die verwendeten Materialien miteinander verglichen werden.

Folgende Materialien wurden verwendet:

Fractogel[®]EMDAzlactonisteinCopolymerausEthylenglykoldimethylacrylatundGlycidylmethacrylat,

das mit Diethylenglykol modifiziert wurde, um die Korngröße zu steuern. Diese liegt zwischen 20 und 40 μm . Die aktiven Azlactongruppen sind über lange aliphatische Ketten (Spacer) an den Träger gebunden. Dadurch ergibt sich eine Verringerung der sterischen Hinderung der antigenbindenden Fragmente durch den Träger. Der Kopplungsmechanismus ist ungerichtet. Die Kopplung der Proteine erfolgte nach Herstellerangaben.

Auch an *cyanbromidaktivierte Sepharose* wird ungerichtet gekoppelt. Das Material ist im Gegensatz zu Fractogel® EMD Azlacton nicht druckstabil.

Die Antikörper wurden nach der Vorschrift von [72] an dieses Material gekoppelt.

Tabelle 4-6 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Affinitätsmaterialien. Die angegebenen Kopplungsraten wurden aus der Differenz zwischen eingesetzter Proteinmenge und nicht gekoppelter Proteinmenge im Überstand nach der Reaktion errechnet. Die Proteinbestimmung erfolgte über die Extinktion bei 280 nm.

Durch die Inkubation der Antikörper mit Phenoxymethylpenicillin wurde eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper erzwungen, da die Antigenbindungsstellen nicht mehr für die Reaktion mit dem Trägermaterial zur Verfügung standen. Dazu wurden, bevor die Immunglobulinlösung mit dem Gel zusammengegeben wurde, die Antikörper 30 Minuten mit 1 mg Phenoxymethylpenicillin inkubiert.

Tab. 4-6: Durch Immobilisierung von IgY erhaltene Affinitätsmaterialien

Material	Antikörper	Kopplungsrate	Belegungsdichte
Fractogel® EMD Azlacton	188. - 192. Tag, Tier 15 nach Affinitätschromatographie	36 %	4,3 mg/ml
Fractogel® EMD Azlacton	205. - 210. Tag, Tier 81 nach Affinitätschromatographie	20 %	2,5 mg/ml
cyanbromidaktivierte Sephrose	205. - 210. Tag, Tier 81 nach Affinitätschromatographie	44 %	1,9 mg/ml
cyanbromidaktivierte Sephrose	Antikörper-Penicillin-Komplex 205. - 210. Tag, Tier 81 nach Affinitätschromatographie	56 %	2,5 mg/ml
cyanbromidaktivierte Sephrose	Antikörper-Penicillin-Komplex 188. - 192. Tag, Tier 15 nach Fällung mit PEG	60 %	3,3 mg/ml

4.3.3.2 Kapazität der IgY-Säulen

Für die minimal notwendige Bindungskapazität der Affinitätssäulen gilt das in Kapitel 4.2.3.2 Gesagte. die mindestens erforderliche Kapazität liegt bei 150 ng/ml Säulenvolumen.

Die IgY-Säulen wurden unter den gleichen Bedingungen geprüft, wie die IgG-Säulen.

Auf die in Anwesenheit von Phenoxymethylpenicillin hergestellten IgY-Säulen wurde 1 µg Benzylpenicillin in 5 ml PBS auf die Säule gegeben. Es wurden der Aufgabepuffer, eine Waschfraktion und drei Elutionsfraktionen gesammelt. Da inzwischen eine HPLC-Anlage mit automatischer Festphasenextraktion zur Verfügung stand, wurden die Fraktionen damit angereichert und per HPLC und UV-Detektion bei 230 nm analysiert. Auf die Extraktions- und Derivatisierungsschritte, die zur Kapazitätsbestimmung der IgG-Säulen notwendig waren, konnte daher verzichtet werden.

	affinitätsgereinigte Antikörper:	Polyethylenglykol-Fraktion:
Aufgabepuffer + Waschfraktion I:	160ng	895 ng
Waschfraktion II:	-	10 ng
Waschfraktion III:	-	-
Elutionsfraktion I:	870 ng	26 ng
Elutionsfraktion II:	-	8 ng
Elutionsfraktion III:	-	-
Summe:	1,03 µg	0,939 µg

Die Säule mit den affinitätsgereinigten Antikörpern konnte 870 ng Benzylpenicillin bei einem Bettvolumen von 430 µl binden, die Säule mit der Polyethylenglykolfraktion hatte bei gleichem Volumen aufgrund der mitimmobilisierten nicht 6-APA-spezifischen Antikörper eine Kapazität von nur 34 ng.

Auf die Säulen, die in Abwesenheit von Phenoxymethylpenicillin hergestellt wurden, wurden 200 ng Benzylpenicillin gegeben, welches komplett in der Waschfraktion wiedergefunden wurde (Analyse per HPLC nach Anreicherung auf einer C-18-Kartusche, s.o.). Alle auf diese Weise hergestellten Säulen hatten also kein Bindungsvermögen für Benzylpenicillin.

4.3.3.3 Lebensdauer der IgY-Säulen

Die IgY-Säule mit den affinitätsgereinigten Antikörpern war bereits nach wenigen Zyklen unbrauchbar, so daß lediglich die Bindungskapazität bestimmt werden konnte. Die Verwendung der Säule für Lebensmitteluntersuchungen war leider nicht mehr möglich. Dies lag aber nicht daran, daß die Elutionsbedingungen nicht schonend genug waren, sondern an der allgemeinen Labilität der aviären Immunglobuline: Die verwendete Säule enthielt nur ungefähr die Hälfte des präparierten Geles. Die andere Hälfte, die nach der Immobilisierung unbenutzt bei 4 °C gelagert wurde, hatte ebenfalls kein Bindungsvermögen mehr für Benzylpenicillin und Cloxacillin.