

8. Arbeitsvorschriften

8.1 Reagenzien, Lösungsmittel

Aceton, p.a., > 99 %; Merck 14

Aceton, wasserfrei: Aceton p.a. über Molekularsieb 0,4 nm trocknen

Acetonitril, techn., über Kaliumcarbonat destilliert, oder: für die HPLC, $\geq 99,9$ %; Aldrich 27,071-7

Affi-Prep® Hz hydrazide support; BioRad 156-0015

Aktivkohle, gepulvert, purum, ca. 5 % Asche; Fluka 05120

p-Aminobenzoesäure, BioChemika, > 99 %, rel. Molekülmasse 137,1; Fluka 06930

6-Aminopenicillansäure (6-APA), BioChemika, > 98 %, rel. Molekülmasse 216,3; Fluka 09070

Ammoniumperoxodisulfat, p.a., ≥ 98 %; Roth 9592

Ammoniumsulfat, für biochemische Zwecke, > 99,5 %; Merck 1211

Amoxicillin; Sigma A-8523

Ampicillin, Natriumsalz; Sigma A-9518

Benzylpenicillin, Kaliumsalz; Sigma Pen-K

³H-Benzylpenicillin (³H-Pen-G), 925 MBq, 250 μ l; Amersham TRK 779

Bovines Serumalbumin, Fraktion V, receptor grade; Serva 11924

4-Brommethyl-7-methoxycumarin, 97 %; Sigma B-6136

Bromphenolblau Natriumsalz; Merck 11746

2-Butanol, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 9630

Calciumchlorid, entwässert, grob gekörnt, rein, > 96 %; Merck 2385

Cephalexin, Monohydrat; Sigma C-4895

Cloxacillin, Natriumsalz; Sigma C-9393

cyanbromidaktivierte Sepharose 4B; Sigma C-9142

Cyclohexan, techn.

DC-Fertigfolien Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck 5735

Dialyseschlauch, MWCO 12000 - 19000; Serva 44114

Dichlormethan, techn., destilliert

Dicloxacillin, Natriumsalz; Sigma D-9016

Diethanolamin, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 16205

Diethylether, techn.

Dimethylformamid (DMF), zur Synthese, > 99 %; Merck 822275

Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a., > 99,5 %; Merck 2952

Essigsäure, p.a., > 96 %; Merck 62

Essigsäureethylester, techn.

Ethanol, techn.

Fractogel® EMD Azlacton; Merck 1.10087

Fractogel® TSK AF-CDI; Merck 16374

Glycerin, p.a., 86 - 88 %; Merck 4094

Glycin, ≥ 99 %; Sigma G-7126

Harnstoff, p.a., > 99,5 %, rel. Molekülmasse 60,1; Merck 8487

Hexan, p.a., ≥ 99 %; Merck 104367
Hyperfilm ^3H ; Amersham RPN 535
Iodlösung, 0,5 mol/l; Merck 9098
Kaliumbromid für die IR-Spektroskopie; Janssen 20.639.75
Kaliumchlorid, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 4936
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 4873
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a., ≥ 99 %; Merck 5099
Kaliumhydrogencarbonat, p.a., $> 99,5$ %, rel. Molekülmasse 100,1; Merck 4854
Kaliumhydroxid, p.a., > 85 %; Merck 5033
Kaliumiodid-Stärke-Papier; Riedel-de Haën 37120
Kaninchen-anti-Huhn-IgG konjugiert an alkalische Phosphatase (sek. AK); Sigma A-9171
Keyhole limpet hemocyanin (KLH); Pierce 77100
Kodak GBX Developer and Replenisher; Sigma P-7042
Kodak GBX Fixer and Replenisher; Sigma P-7167
Kronenether 18-Krone-6, p.a., 99 %; Merck 811684
Methanol, techn.
Molekularsieb, 0,3 nm; Merck 5704
Natriumacetat, wasserfrei, p.a., ≥ 99 %; Merck 6268
Natriumazid, reinst, > 99 %, MW 65,0; Merck 6688
Natriumchlorid, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 6404
Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat, p.a., ≥ 99 %; Merck 6346
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, p.a., ≥ 99 %; Merck 6579
Natriumdodecylsulfat (SDS), für die Elektrophorese, ultra pure, ≥ 99 %; Roth 2326
Natriumhydrogencarbonat, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 6329
Natriumhydroxid, purum p.a, > 97 %; Fluka 71692
Natriumnitrit, puriss. p.a., > 99 %, MW 69,0; Fluka 71759
Nitrocellulosemembran BA 85, 0,45 μm (NC); Schleicher & Schüll 401191
p-Nitrophenylphosphat (PNPP), Dinatriumsalz; Sigma 104-0
ortho-Phosphorsäure, p.a., > 85 %; Riedel-de Haën 30417
Ovalbumin (OVA), BioChemika, > 95 %, 5 x cryst.; Fluka 05440
Oxacillin, Natriumsalz; Sigma O-1002
Oxalylchlorid, zur Synthese, > 98 %, MW 126,9; d = 1,47; Merck 807066
Petrolether, techn., Siedeber. 40 - 60 °C
Phenoxymethylpenicillin, Kaliumsalz; Sigma P-1382
Phosphorpentoxid, reinst, ≥ 97 %; Merck 540
Polyethylenglycol 6000 (PEG), pract.; Fluka 81260
Polystyrol-Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten, U-Form; Greiner 650101
Pyridin, getrocknet, p.a., $> 99,5$ %; Merck 7463
Quecksilber(II)chlorid, p.a., $\geq 99,5$ %; Merck 4419
Rotiphorese Gel A, 30 % Acrylamid; Roth 3037
Rotiphorese Gel B, 2 % Bisacrylamid; Roth 3039
Salzsäure (HCl), konz., reinst, > 37 %; Merck 314

Schwefelsäure, konz., reinst, 95 - 98 %; Merck 713

Serva Blau R, reinst, ≥ 86 %; Serva 35051

Stärke, löslich, p.a.; Merck 1252

tert.-Butanol, p.a., $> 99,5$ %; Merck 9629

Tetrahydrofuran (THF), p.a., $> 99,5$ %; Merck 9731

TEMED = N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin, reinst, 99 %; Serva 35925

Toluol, p.a., $> 99,5$ %; Merck 8325

1,2,4-Triazol; Sigma T 7626

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), BioChemika, > 99 %; Fluka 93352

Trockenmagermilch; Frema Reform (aus dem Reformhaus)

TWEEN 20, pure; Serva 37470

unspezifisches Kaninchenserum; eigene Gewinnung vor der Immunisierung

Wasser, vollentsalzt und in einer Quarzapparatur bidestilliert (Bidest.)

Wasser, vollentsalzt, in einer Quarzapparatur bidestilliert und über Kaliumpermanganat destilliert (Tridest.), oder: für die HPLC; Aldrich 27,073-3

8.2 Lösungen und Puffer¹⁾

Iod-Azid-Lösung:	0,0025 mol/l Iodlösung/1 g/100 ml Natriumazid in Wasser
Kaliumhydrogencarbonatlösung:	60 mmol/l (1,8 g/45 ml)
Kaliumhydroxidlösung:	1 mol/l
Phosphorsäure:	10 g/100 g: 6 ml o-Phosphorsäure (85 %) auf 50 ml verdünnen
Stärke­lösung:	1 g/100 ml in Wasser
Phosphatpuffer (0,02 mol/l, pH 7,2):	(di-)Kaliumhydrogenphosphat, 0,02 mol/l (22,8 g/5 l) mit o-Phosphorsäure auf pH 7,2 einstellen
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):	Wie Phosphatpuffer, jedoch zusätzlich: Natriumchlorid, 150 mmol/l
ges. Ammoniumsulfatlösung:	Ammoniumsulfat, 125 g/200 ml
halbges. Ammoniumsulfatlösung:	Ammoniumsulfat, 63 g/200 ml
unspez. Kaninchenserum (verd.):	1 + 9 mit Wasser verdünnt
³ H-Pen G (für RIA):	2 µl der gelieferten Lösung mit Wasser auf 6 ml verdünnt
Trenngel-Puffer:	Tris, 1,5 mol/l (36,3 g/200 ml) SDS, 0,4 g/100 ml (0,8 g/200 ml) mit konz. HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammelgel-Puffer:	Tris, 0,5 mol/l (12,1 g/200 ml) SDS, 0,4 g/100 ml (0,8 g/200 ml) mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen
Ammoniumperoxodisulfatlösung:	10 g/100 ml (0,1 g/ml, frisch ansetzen)
2-Butanol, wassergesättigt	
Stamm­puffer:	Tris, 0,625 mol/l (6,1 g/80 ml) SDS, 0,5 g/100 ml (0,4 g/80 ml) mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen
Probenpuffer (doppelt konzentriert):	Stamm­puffer: 5,0 ml/20 ml (0,156 mol/l Tris = 0,078 mol/l) SDS: 0,8 g/20 ml (4 g/100 ml, = 2 g/100 ml) Glycerin: 5,0 g = 4 ml/20 ml (20 g/100 g = 10 g/100 ml)
Elektrophorese-Puffer (für UltraPhor-Apparatur zweimal ansetzen):	Tris, 0,025 mol/l (15,2 g/5 l) Glycin, 0,192 mol/l (72,0 g/5 l) SDS, 0,1 g/100ml (5,0 g/5 l) pH 8,3; nicht nachtitrieren!
Färbelösung:	Serva Blau R, 0,03 g/100 g Entfärbelösung
Entfärbelösung:	Methanol/Wasser/Essigsäure 45 + 45 + 10 (v/v/v)
Transferpuffer:	Glycin, 0,192 mol/l (72,0 g/5 l) Tris, 0,025 mol/l (15,2 g/5 l) pH 8,3, nicht nachtitrieren!

¹⁾ Einträge sortiert nach ihrem Erscheinen in den Arbeitsvorschriften

PBS-T:	(di-)Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, 80 mmol/l (29 g/l) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 20 mmol/l (2,8 g/l) Natriumchlorid, 100 mmol/l (5,8 g/l) TWEEN 20, 0,05 g/100g (0,5 g/l)
³ H-Pen-G (für Immunoblot):	8 µl der gelieferten Lösung auf 10 ml PBS-T
Färbelösung (für Immunoblot):	500 ml PBS-T 5 ml Essigsäure 500 µl Tinte Pelikan 4001, schwarz
Natriumhydroxidlösung:	Natriumhydroxid, 0,2 mol/l (8 g/l)
Entwickler:	Kodak GBX Developer nach Herstellerangaben ansetzen
Stoppbad:	Essigsäure, 4 ml/100 ml
Fixierer:	Kodak GBX Fixer nach Herstellerangaben ansetzen
Beschichtungspuffer:	Natriumhydrogencarbonat, 50 mmol/l (4,2 g/l) mit 1 mol/l NaOH auf pH 9,6 einstellen
TBST:	Tris, 25 mmol/l (3,0 g) Natriumchlorid, 8,0 g/l Kaliumchlorid 0,2 g/l Natriumazid, 0,02 g/100 g (0,2 g/l) TWEEN 20, 0,2 g/100 g (2,0 g/l) mit HCl auf pH 7,5 einstellen
TBS-PEG	wie TBST, jedoch ohne TWEEN, mit 5,25 g/100 g PEG
Substrat-Puffer:	Diethanolamin, 194,0 ml/2 l Natriumazid, 1,0 g/2 l mit konz. HCl auf pH 9,8 titrieren
Substrat-Lösung:	PNPP, 25,0 mg in 25 ml Substrat-Puffer lösen (reicht für eine Platte, immer frisch herstellen!)
Antigen-Lösung:	Antigen in TBST so verdünnen, daß 2 µg/Kavität verwendet werden
Block-Puffer:	BSA, 1 g/100 ml TBST
prim. AK-Verdünnung:	prim. Antikörper (aus Dotter) in TBST + 0,1 g/100 ml BSA 1 : 30 - 1 : 100000 (8-stufige Verdünnungsreihe)
sek. AK-Verdünnung:	sek. Antikörper (Kaninchen-anti-Huhn-IgG) in TBST + 0,1 g/100 ml BSA 1 : 10000
Phosphatpuffer pH 7,6:	(di-)Kaliumhydrogenphosphat, 0,1 mol/l (17,4 g/l) mit o-Phosphorsäure auf pH 7,6 einstellen
Salzsäure:	ca. 1 mmol/l (41 µl konz. HCl auf 100 ml Wasser)
Kopplungspuffer:	Natriumhydrogencarbonat, 0,1 mol/l (8,4 g/l) Natriumchlorid, 0,5 mol/l (29,2 g/l), mit 1 mol/l NaOH auf pH 8,3 titrieren
6-APA-Lösung:	1 mg/ml 6-APA in Kopplungspuffer
Glycinlösung:	0,1 mol/l Glycin in Kopplungspuffer, pH auf 8,0 einstellen

- Reagenzlösung nach [40]: 2 mol/l 1,2,4-Triazol, die 0,001 mol/l Quecksilber(II)chlorid enthält:
a) 13,78 g 1,2,4-Triazol in einem 250 ml Becherglas einwiegen und in ca. 60 ml Wasser lösen
b) 10 ml 0,01 mol/l Quecksilber(II)chlorid-Lösung zugeben
c) mit 5 mol/l NaOH auf pH $9 \pm 0,5$ einstellen
d) in einen 100 ml Meßkolben überführen und mit Wasser auffüllen
- Glycinpuffer: 0,1 mol/l, mit konz. HCl auf pH 3,0 titrieren
- Phosphatpuffer (0,2 mol/l, pH 7,2):
(di-)Kaliumhydrogenphosphat, 0,2 mol/l (45,6 g/l)
mit o-Phosphorsäure auf pH 7,2 einstellen
- Kronenetherlösung: 1 mg/ml in Phosphatpuffer (0,2 mol/l, pH 7,2)
- Brommethyloxycumarin-Lösung (kühl und dunkel lagern):
10 mg/ml in wasserfreiem Aceton durch Schütteln lösen (kein Ultraschallbad!), diese Lösung mit trockenem Aceton um den Faktor 10 auf 1 mg/ml verdünnen.
- Stammlösung Isoxazolylpenicilline:
1 mg/ml Isoxazolylpenicillin in Wasser (berechnet als freie Säure): 11,3 mg Oxacillin-Natriumsalz bzw. 11,2 mg Cloxacillin-Natriumsalz oder 10,9 mg Dicloxacillin-Natriumsalz in 10 ml Wasser
- Arbeitslösung I Isoxazolylpenicilline:
10 µg/ml Isoxazolylpenicillin in Wasser (Stammlösung um den Faktor 10 verdünnt)
- Arbeitslösung II Isoxazolylpenicilline:
1 µg/ml Isoxazolylpenicillin in Wasser (Arbeitslösung I um den Faktor 10 verdünnt)
- Stammlösung Benzylpenicillin: 1 mg/ml Benzylpenicillin in Wasser (berechnet als freie Säure):
11,1 mg Benzylpenicillin-Kaliumsalz in 10 ml Wasser
- Arbeitslösung I Benzylpenicillin: 10 µg/ml Benzylpenicillin in Wasser (Stammlösung um den Faktor 10 verdünnt)
- Arbeitslösung II Benzylpenicillin: 1 µg/ml Benzylpenicillin in Wasser (Arbeitslösung I um den Faktor 10 verdünnt)
- 0,9 % Natriumchlorid: 9 g/l Natriumchlorid in Wasser
- Elutionspuffer: Glycinpuffer, 0,2 mol/l, pH 3,0 mit konz. HCl + Acetonitril (90 + 10 v/v)

8.3 Laborgeräte

8.3.1 Allgemeine Laborgeräte

Anmerkung: Zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten an Glasoberflächen müssen alle Kolben- Meß- und Vollpipetten und Reagenzgläser, die mit Pencillin-Lösungen oder penicillinhaltigen Proben in Berührung kommen, wie bei [46] deaktiviert werden.

Reagenzgläser, 10 ml, mit Schraubdeckel und PTFE-beschichteter Gummidichtung (Corning, Wiesbaden)

Reaktionsgefäße, konisch geschliffen, 1 ml (Supelco, Bad Homburg)

Einmal-Reaktionsgefäße, 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

Polystyrol-Leersäulen mit Fritten und Verschlusskappen (Pierce, Oud Beijerland/NL)

Leersäule, 10 cm x 1 cm i.D.; Pharmacia C 10/10, Nr. 19-5001-01 (Pharmacia, Freiburg)

Leersäule; Pharmacia HR 5/2, Nr. 18-0382-01 (Pharmacia, Freiburg)

Meßkolben 10 ml

Meßkolben 2000 ml

Meßkolben 5000 ml

Braunglasmeßkolben 10 ml

Glasfritte G4

Pasteurpipetten

Vollpipetten

Meßpipetten

Enzymtestpipetten

Meßzylinder

8.3.2 Technische Laborgeräte

Tischzentrifuge: Hermle Z 230 (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge, kühlbar: Centrikon H-401 B (Kontron, München)

Gefriertrocknungsanlage: Alpha (Christ, Osterode)

Vibrationsmischer: Vortex- Genie (Bender & Hobein, Zürich/CH)

Ultraschallbad: Sonorex RK 100 (Bandelin, Berlin)

Kolbenhubpipetten (Eppendorf, Hamburg)

Heizblock mit Einsatz für 12 Reaktionsgefäße: Multi-Blok Heater (Supelco, Bad Homburg)

Rotationsverdampfer: RE 111 (Büchi, Flawil/CH)

pH-Meter mit Glaselektrode: 646 (Knick, Berlin)

Quecksilber-Niederdrucklampe: Nr. 015376, 15 W (Heraeus, Karlsruhe)

Elektrophoresekammer: MiniGel (BioRad, München) oder UltraPhor (Colora, Lorch)

Blottingkammer: TransBlot (BioRad, München)

Mikrotiterplatten-Lesegerät: Modell 450 (BioRad, München)

Universalzerkleinerer: Moulinette 643 (Moulinex, Köln)

8.3.3 Geräte für die Spektroskopie und Chromatographie

UV-Betrachtungsgerät (Desaga, Heidelberg)

Selbstregistrierendes Spektralphotometer: UV 300 (Shimadzu, Duisburg)

Spektralphotometer: PU 8620 (Philips, Kassel)

Infrarotspektrometer: PU 9706 (Philips, Kassel)

Szintillationszähler: LS 1701 (Beckmann, München)

Chromatographische Ausrüstung:

LC-Controller L-5000 (Merck, Darmstadt)

Niederdruckgradientenpumpe 655 A-11 (Merck, Darmstadt)

isokratische Pumpe L-6000 A (Merck, Darmstadt)

On-line Sample Preparator OSP-2 (Merck, Darmstadt)

HPLC-Säulenofen 125 (ERC, Alteglofsheim)

photochemischer Reaktor BeamBoost™ mit Reaktionskapillare 25 m, Best.-Nr. IC88506 (ICT, Frankfurt/M.)

UV-Vis-Detektor SPD-6AV (Shimadzu, Duisburg)

Integrator D-2500 (Merck, Darmstadt)

elektronisches Niederdruckschaltventil: LMV 870 (Kontron Instruments, Neufahrn)

elektronisches 6-Wege-Schaltventil ELV 7000 (W. Kranich, Göttingen)

Probenschleifen-Set Nr. 18-5897-01 (Pharmacia, Freiburg)

Leersäule HR 5/2 (Pharmacia, Freiburg)

Dilutor 401 mit 10 ml Spritze (Abimed, Langenfeld)

Peristaltische Pumpe: Microperpex S (Pharmacia, Freiburg)

Peristaltische Pumpe: P 1 (Pharmacia, Freiburg)

Fraktionssammler: FRAC-100 (Pharmacia, Freiburg)

UV-Durchflußzelle: UV 1 (Pharmacia, Freiburg)

8.4 Synthese des 6-APA-Immunogens

8.4.1 Darstellung von p-Azidobenzoesäure [152 (mod.)]

1. 13,7 g (100 mmol) p-Aminobenzoesäure in 150 ml bidest. Wasser in einem mit Thermometer und Tropftrichter bestückten 2 l-Dreihalskolben suspendieren.
2. 20 ml konz. Schwefelsäure zugeben (entspr. 2,1 mol/l Reaktionsgemisch), mit einer Eis-Kochsalzmischung auf -2°C abkühlen.
3. 7,6 g (110 mmol) Natriumnitrit in 75 ml bidest. Wasser lösen, mittels Tropftrichter innerhalb von 20 min zutropfen lassen.

Die Suspension wird im Verlauf der Reaktion klar und gelb.

4. Ende der Reaktion mit Kaliumiodid-Stärke-Papier kontrollieren: 5 min nach der letzten Zugabe von Natriumnitrit muß ein leichter Überschuß an salpetriger Säure nachweisbar sein. Ein eventuell großer Überschuß muß mit Harnstoff vorsichtig zerstört werden.
5. 20 min weiterrühren.

Alle weiteren Schritte sind im stark gedämpften Licht durchzuführen!

6. 13 g (200 mmol) Natriumazid in 60 ml Wasser lösen, mittels Tropftrichter innerhalb von 15 min zutropfen.
7. Nach Beendigung der Stickstoffentwicklung 20 min weiterrühren.
8. Produkt absaugen, mit Eiswasser nachwaschen.
9. In der minimalen Menge (ca. 400 ml) heißem Ethanol lösen, Filterpapierschnitzel und eine Spatelspitze gepulverte Aktivkohle zugeben.
10. Durch mit heißem Ethanol angefeuchteten, warmen Filter filtrieren.
11. Abkühlen lassen und über Nacht bei -20°C stehen lassen.
12. Produkt absaugen.
13. Filtrat am Rotationsverdampfer bei 50°C Wasserbadtemperatur eindampfen, bis Trübung eintritt (150 - 200 ml).
14. Abkühlen lassen und 2 Stunden bei -20°C stehen lassen.
15. Erneut ausgefallenes Produkt absaugen.
16. Gesamte Produktausbeute in minimaler Menge heißem Ethanol/Wasser (1 + 1, v/v) (500 - 600 ml) lösen,
17. Durch mit heißem Ethanol/Wasser angefeuchteten Filter filtrieren.
18. Abkühlen lassen, bei 0°C auskristalisieren lassen.
19. Produkt absaugen, zuerst mit der Mutterlauge, dann mit kaltem Ethanol/Wasser waschen.
20. Produkt über Phosphorpentoxid unter Vakuum bei Raumtemperatur trocknen.
21. Auseute: ca. 60 % = 9,8 g (16,3 g = 100 %); rel. Molekülmasse = 163,1

22. Analytik:

DC:

Kieselgel F, Petrolether/Diethylether/Eisessig (8 + 5 + 10, v/v/v), Det. UV 254 nm

Produkt und Edukt in THF lösen (1 mg/ml)

R _F -Werte:	p-Aminobenzoesäure:	0,75
	p-Azidobenzoesäure:	0,90

IR:

KBr, 1 mg/100 mg

keine Banden bei 3440 und 3340 cm⁻¹ von Aminen

N₃-Valenz bei 2100 cm⁻¹

Schmelzpunkt: 182 - 183 °C (Galaray et al.: 183 °C (Zers.), p-Aminobenzoesäure: 186 - 188 °C)

8.4.2 Synthese von p-Azidobenzoylchlorid [155, 156]

1. Technisches Acetonitril über Phosphorpentoxid destillieren (Sdp. 81 °C) und über Molekularsieb aufbewahren.
2. 6,0 g (37 mmol) p-Azidobenzoesäure in einem 100 ml Rundkolben in 15 ml Acetonitril suspendieren.
3. Unter Rühren 3,8 ml (5,6 g = 44 mmol) Oxalylchlorid zugeben.
4. 20 µl DMF zugeben, Kolben mit einem mit Calciumchlorid gefüllten Trockenrohr verschließen.
5. Reaktionsgemisch unter Rühren auf ca. 40 °C erwärmen.
6. 3 Stunden weitererrühren, die Lösung wird dabei gelblich und die Azidobenzoesäure geht dabei fast vollständig in Lösung.
7. Suspension mehrere Stunden auf - 20 °C abkühlen, es fallen gelbliche Kristalle aus.
8. Kristalle absaugen und verwerfen (nicht umgesetzte Säure, per DC identifiziert).
9. Acetonitril bei 150 mbar, 40 °C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer entfernen.
10. Rückstand unter leichtem Erwärmen auf max. 40 °C in etwa 15 ml Cyclohexan lösen, vom Unlöslichen abgießen, mit Cyclohexan nachwaschen.
11. Lösung bei 250 mbar, 40 °C auf etwa 15 ml einengen, bei - 20 °C kalt stellen.
12. Auskristallisiertes Säurechlorid absaugen, flüssige Phase auf 5 bis 10 ml einengen (250 mbar, 40 °C) und bei - 20 °C 2 Stunden kalt stellen.
13. Kristalle absaugen.
14. Das gelbliche Rohprodukt unter Erwärmen auf ca. 40 °C in etwa 15 ml Petrolether lösen, durch Abkühlen auf - 20 °C (2 Stunden) ausfällen und absaugen.
15. Einengschritt und Ausfällen wiederholen.
16. Im Stickstoffstrom vortrocknen, im Exsiccator unter Vakuum nachtrocknen.
17. Ausbeute: 50 % = 3,4 g (100 % = 6,7 g), lange weiße Nadeln, rel. Molekülmasse = 181,6

18. Analytik:

DC:

Kieselgel F, Toluol/Essigester (6 + 4, v/v), Det. UV 254 nm

Produkt und Edukt in Aceton lösen (1 mg/ml)

R_f-Werte: p-Azidobenzoesäure: 0,60
p-Azidobenzoylchlorid: 0,95

IR:

KBr, 1 mg/100 mg

C=O-Valenz von Säurechloriden bei 1720 und 1755 cm⁻¹

keine C=O-Valenz von aromatischen Carbonsäuren bei 1660 cm⁻¹

N₃-Valenz bei 2100 cm⁻¹

Schmelzpunkt: 39 °C

8.4.3 Darstellung von p-Azidobenzoylpenicillin [161]

1. 1,5 g (7,0 mmol) 6-APA in 45 ml 60 mmol/l Kaliumhydrogencarbonatlösung und 40 ml Aceton lösen.
2. Unter Rühren und Eisbadkühlung eine Lösung von 1 g (5,5 mmol) p-Azidobenzoylchlorid in 20 ml Aceton innerhalb von 30 min zutropfen.
3. Eiskühlung entfernen und 60 min weiterrühren.
4. Aceton am Rotationsverdampfer entfernen (40 mbar, 40 °C)
5. Wäßrige Phase mit 3 x 50 ml Diethylether zur Entfernung nicht umgesetzter Ausgangsprodukte extrahieren, Etherphasen (obere Phasen) verwerfen.
6. 50 ml Diethylether zugeben, auf 5 °C abkühlen, mit Phosphorsäure vorsichtig auf pH 2,5 ansäuern, kurz schütteln und nach Phasentrennung Etherphase abtrennen.
7. Nochmals mit 50 ml kaltem Diethylether extrahieren.
8. Vereinigte Etherphasen mit 35 ml kaltem Wasser waschen.
9. 150 ml kaltes Wasser zugeben, mit 1 mol/l Kaliumhydroxidlösung im Eisbad auf pH 7,2 titrieren.
10. Wäßrige Phase abtrennen, Extraktionsvorgang zweimal wiederholen.
11. Vereinigte wäßrige Phasen einfrieren und lyophilisieren.
12. Ausbeute: 70 % (1,99 g = 100 %), weißes Pulver; rel. Molekülmasse = 361,4
13. Analytik:

DC:

Kieselgel F, tert. Butanol/Wasser (1 + 19, v/v) (mod. nach [162])

Det.ektion [163, 164]:

- a) NaN₃/Iodlösung
- b) Stärkelösung

nacheinander in beide Lösungen tauchen oder sprühen

4-Azidobenzoylpenicillansäure-6-amid sowie 6-APA erscheinen weiß auf blauem Grund.

c) UV 254 nm

p-Azidobenzoesäure und das 4-Azidobenzoylpenicillin sind im UV sichtbar.

Produkt und Edukte in DMSO lösen.

R _f -Werte:	p-Azidobenzoylchlorid:	0,84
	6-APA:	0,07
	4-Azidobenzoylpenicillin:	0,28

IR:

KBr, 1 mg/100 mg

keine C=O-Valenz von Säurechloriden bei 1720 und 1755 cm⁻¹

N₃-Valenz bei 2100 cm⁻¹

Schmelzpunkt: 38 °C (Zers.)

¹HNMR:

Amid in DMSO-d₆

δ = 1,5 ppm	Dublett	6 H
3,9	Singulett	1 H
5,4	Dublett	2 H
7,2	Dublett	2 H
8,0	Dublett	2 H
9,1	Dublett	1 H

6-APA in D₂O

δ = 1,5 ppm	Dublett	6 H
4,1	Singulett	1 H
4,5	Dublett	1 H
5,4	Dublett	1 H

Das Aminoproton sollte bei 6,0 ppm erscheinen, wird jedoch in D₂O vollständig ausgetauscht.

8.4.4 Photochemische Kopplung

1. 20 mg des p-Azidobenzoylpenicillins (entspr. 12 mg 6-APA) in 10 ml Phosphatpuffer (0,02 mol/l, pH 7,2) lösen.
2. 100 mg OVA oder KLH in 10 ml Phosphatpuffer (0,02 mol/l, pH 7,2) lösen, das 6-APA-Derivat in 1-ml-Schritten zugeben und mit einer Quecksilbergasentladung-Lampe bei Eiskühlung bestrahlen. Vor jeder erneuten Zugabe sollen mindestens 50 % des vorher zugegebenen Azids abgebaut sein (Extinktion 267 nm).
3. Lösung 2 Tage gegen Wasser dialysieren.
4. Dialysat einfrieren und lyophilisieren.
5. Ausbeute: 60 - 80 %

8.5 Radioimmunoassay zur Titer- und Spezifitätsbestimmung [79]

1. 10 1,5 ml-Reaktionsgefäße bereitstellen.
2. Serum in Gefäß 1 1 + 9 mit PBS verdünnen.
3. 300 µl PBS in die Gefäße 2 - 10 vorlegen.
4. 300 µl verdünntes Serum aus Gefäß 1 in Gefäß 2 geben, mischen.
5. 300 µl aus Gefäß 2 in Gefäß 3 geben, mischen.
6. usw. bis Gefäß 10.

In den Reaktionsgefäßen 1 - 10 befinden sich die Serumverdünnungen 10×2^0 bis 10×2^9 .

7. In 10 weitere Reaktionsgefäße 100 µl Wasser vorlegen.
8. 100 µl ^3H -Pen G-Lösung zupipettieren (=553 pg/100 µl).
9. 100 µl unspezifisches Kaninchenserum (verd.) zugeben.
10. 100 µl der jeweiligen Serumverdünnung zugeben.
11. Mischen, mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
12. 400 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 100 µl Schritten zugeben.
13. Zentrifugieren (5 min, $10000\text{min}^{-1} = 12000 \times g$), Überstand verwerfen.
14. Pellet in 400 µl halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung suspendieren.
15. Zentrifugieren, Überstand verwerfen.
16. Pellet in 400 µl Wasser lösen, Lösung in Zählröhrchen überführen.
17. Reaktionsgefäß mit 2 x 200 µl Wasser nachspülen.
18. 4,5 ml Szintillatorflüssigkeit zugeben, mischen.
19. Röhrchen im Szintillationszähler 5 min oder bis Fehler $< 2\%$ messen.

Zur Bestimmung der Spezifität wird die Serumverdünnung verwendet, die dem Titer entspricht. die Schritte 1 - 6 entfallen. In Schritt 7 wird nicht Wasser, sondern jeweils 100 µl einer Lösung des Kompetitors in Wasser mit verschiedenen Konzentrationen verwendet.

8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [173]

I. Gießen des Gels

(Die Montagehinweise gelten für die Ultra-Phor-Apparatur. Sie müssen bei der Verwendung anderer Apparaturen entsprechend abgewandelt werden.)

1. Glasplatten und Geltaschenkamm mit Spülwasser waschen, Glasplatten mit Aceton nachspülen, mit dest. Wasser nachspülen.
2. Elektrophorese-Apparatur komplett zusammenbauen. Vor dem Festschrauben des unteren Einsatzes Deckel aufschrauben. Frontplatte noch nicht montieren.
3. Trenn-Gele (für 2 Gele, 2 mm, 7,5 % Polyacrylamid)

Rotiphorese Gel A:	21,8 ml
Rotiphorese Gel B:	10,1 ml
Trenngel-Puffer:	24,0 ml
Wasser:	34,0 ml
zusammengeben und entgasen	
Ammoniumperoxodisulfatlösung:	680 µl
TEMED:	63 µl

Gel mischen und mit Einwegspritze in die Gelkammer einfüllen.

4. Gel mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichten und mind. 2 Stunden polymerisieren lassen.
5. Sammelgel 4,5 % Polyacrylamid

Rotiphorese Gel A:	3,00 ml
Rotiphorese Gel B:	1,22 ml
Sammelgel-Puffer:	5,00 ml
Wasser:	11,86 ml
zusammengeben und entgasen	
Ammoniumperoxodisulfatlösung:	200 µl
TEMED:	20 µl

Butanol vom Trenngel mit Filterpapier absaugen und Sammelgel überschichten. Mit Kamm abschließen.

6. Slots und Sammel-/Trenngelgrenze mit einem Folienschreiber markieren, Frontplatte aufschrauben und Elektrophoresepuffer einfüllen. Unterkante von Luftblasen befreien.
7. Auf 4 - 8 °C temperieren und Gel über Nacht polymerisieren lassen.

II. Elektrophorese

1. Kamm entfernen, Geltaschen mit Elektrophoresepuffer füllen. Der Puffer darf jedoch nicht über der Oberkante des Gels stehen!
2. Leerstellen mit Probenpuffer, der etwas Bromphenolblau enthält, füllen.
3. Proben in Wasser aufnehmen (1 mg/ml) und 1 + 1 mit Probenpuffer verdünnen, 10 min auf 95 °C erhitzen, im Eisbad kühlen und aufgeben. Bei Antikörpern, die geblottet werden sollen, darf keine Erhitzung erfolgen.
4. Elektrophorese mit 40 mA/Gel beginnen, sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, Strom auf max. 60 mA/Gel erhöhen.

III. Färben und Trocknen

Wenn geblottet werden soll, darf das Gel vorher nicht gefärbt werden.

1. Puffer aus der Apparatur ablassen, Apparatur demontieren, Gel mit Glasplatten entfernen.
2. Färbelösung in die Färbewanne geben, Gel vorsichtig hineinlegen, unter Schütteln über Nacht färben.
3. Färbelösung abgießen, Gel mit Entfärbelösung waschen. So lange unter Schütteln und häufigem Wechseln der Entfärbelösung entfärben, bis der Gelhintergrund klar ist.
4. Zum letzten Entfärber 5 % Glycerin geben.
5. Gel aus der Lösung nehmen, auf ein mit der letzten Entfärberlösung getränktes Stück Einmachcellophan legen, Gel mit Cellophan abdecken und unter Vakuum bei 60 °C trocknen.

8.7 Immunblot [185, 187]

1. Gel kurz mit Transferpuffer spülen.
2. Watte aus der Blotting-Kammer mit Transferpuffer tränken und auf das Gitter legen.
3. Filterpapier mit Transferpuffer tränken und auf die Watte legen.
4. Gel auf das Filterpapier legen.
5. Nitrocellulose-Membran mit Transferpuffer tränken und auf das Gel legen.
6. Filterpapier mit Transferpuffer tränken und auf die Membran legen.
7. Watte mit Transferpuffer tränken und auf das Filterpapier legen.
8. Gitter darüberklappen und das gesamte Paket in die Blotting-Kammer einsetzen. Nitrocellulose-Membran muß zum (+)-Pol zeigen!
9. 3 Stunden bei 30 V, 200 mA (ca. 3,75 V/cm) transferieren.
10. Filter und Gele der Apparatur entnehmen.
11. Gele in Coomassie R 250 färben.
12. Filter über Nacht in PBS-T bei 4 °C lagern.
13. Blocken der unbesetzten Bindungsstellen mit PBS-T + 5 g/100 ml Trockenmagermilch.
14. Spülen der Nitrocellulose-Membran mit PBS-T.
15. 1 Stunde bei Raumtemperatur mit ³H-Pen G-Lösung inkubieren.
16. ³H-Pen G-Lösung abpipettieren, 4 x mit PBS-T waschen.
17. Nitrocellulose-Membran bei Raumtemperatur trocknen (ca. 2 Stunden).
18. Hyperfilm ³H 10 - 14 Tage exponieren, Lage der Nitrocellulose bei Rotlicht mit schwarzem Folienschreiber markieren.
19. Film entwickeln, stoppen, fixieren und trocknen.
20. Nitrocellulose-Membran 5 min in Natriumhydroxidlösung baden.
21. 4 x 10 min mit PBS-T waschen.
22. 2 h bis über Nacht in Färbelösung färben.
23. 2 x 2 min mit Wasser waschen.
24. An der Luft bei Raumtemperatur trocknen.

8.8 ELISA (Indirect Antigen Coated Plate (IACP) ELISA) [188]

Präparation der Eidotter:

1. Volumen des Dotters bestimmen.
2. 2-faches Volumen TBS-PEG zugeben
3. 30 min bei 4 °C rühren.
4. Bei 2500 * g, 4 °C 30 min zentrifugieren, Überstand (bereits 3-fach verdünnt!) verwenden.

Durchführung des ELISA:

1. Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 37 °C mit Antigen beschichten.
Antigenkonzentration: 20µg/ml, 100 µl/Kavität = 2 µg/Kavität
2. Zweimal mit Wasser waschen.
3. Über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 37 °C mit Block-Puffer blockieren.
4. Zweimal mit Wasser waschen.
5. 2 h bei 4 °C oder 1 h bei 37 °C mit 100 µl prim. AK in geeigneter Verdünnung inkubieren.
6. Zweimal mit Wasser waschen.
7. 2 h bei 4 °C oder 1 h bei 37 °C mit 100 µl sek. AK inkubieren.
8. Viermal mit Wasser waschen.
9. 250 µl Substrat-Lösung zugeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Extinktion bei 405 nm messen.

Zur Bestimmung des Antikörpertiters wird in Schritt 5. eine Verdünnungsreihe, beispielsweise von Faktor 10 - 30.000 in 8 Stufen eingesetzt.

Zur Bestimmung der Spezifität wird in Schritt 5. die Verdünnung des primären Antikörpers gewählt, mit der 50 % der maximalen Extinktion erzielt wird. Vor der Antikörperzugabe werden 10 - 100 µl des zu testenden Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen zupipettiert.

8.9 Isolierung von Immunglobulin G [59]

1. Volumen des Serums bestimmen.

Alle nachfolgenden Schritte müssen in einem im Kühlschrank stehenden Eisbad ablaufen!

2. Innerhalb 1/2 Stunde unter Rühren gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 28 % Sättigung zugeben.
Zugabe an ml ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = (\% \text{ Sättigung} \times \text{Anfangsvolumen}) / (100 - \% \text{ Sättigung})$
3. 1 Stunde weiterrühren.
4. 10 - 15 min bei 4000 * g, 4 °C, zentrifugieren.
5. Überstand in ein weiteres Zentrifugenglas überführen, Präzipitat verwerfen.
6. Innerhalb 1/2 Stunde unter Rühren gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 50% Sättigung zugeben.
7. 1 Stunde weiterrühren.
8. Niederschlag abzentrifugieren (wie oben), Überstand verwerfen.
9. Präzipitat im Ausgangsvolumen PBS lösen.
10. Innerhalb einer Stunde unter Rühren das gleiche Volumen gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugeben.
11. 1 Stunde weiterrühren.
12. IgG abzentrifugieren (wie oben).
13. IgG in PBS lösen und gegen PBS dialysieren, lyophilisieren.

8.10 Isolierung von IgY [141]

1. Volumen des Dotters bestimmen.
2. 4-faches Volumen Phosphatpuffer pH 7,6 zugeben
3. Unter Rühren 3,5 g Polyethylenglykol (PEG)/100 ml Dotterlösung zugeben, 30 min rühren.
4. Bei 2500 * g, 4 °C 20 min zentrifugieren.
5. Überstand durch Glaswolle in einen Meßzylinder filtrieren.
6. 8,5 g PEG/100 ml Lösung unter Rühren zugeben (Endkonz. PEG = 12 g/100 ml), 30 min rühren.
7. Zentrifugieren wie oben.
8. Überstand verwerfen.

Entfernung des Polyethylenglykols mittels Ammoniumsulfatfällung und Dialyse:

9. Präzipitat zu 15 ml in Phosphatpuffer pH 7,6 lösen.
10. 15 ml ges. Ammoniumsulfatlösung langsam unter Rühren und Kühlung zugeben.
11. 10 min stehenlassen, wie oben zentrifugieren.
12. Es entsteht ein Dreiphasensystem: Die obere Phase enthält Protein und PEG, die mittlere Puffer und die untere Protein.
Obere Phase abtrennen, in 10 ml ges. Ammoniumsulfatlösung suspendieren, zentrifugieren.
13. Mittlere Phasen aus beiden Zentrifugationen und obere Phase aus der zweiten Zentrifugation verwerfen, untere Phasen (Präzipitate) in Ammoniumsulfat suspendieren, zentrifugieren.
14. Präzipitate in Phosphatpuffer pH 7,6 lösen und vereinigen.
15. Gegen 2 x 1,5 l PBS dialysieren, anschließend lyophilisieren oder zur Affinitätsreinigung verwenden.

Alternativ kann zur Entfernung des Polyethylenglykols die Ultrafiltration eingesetzt werden. Dieses Verfahren eignet sich nur für kleinere Mengen:

9. Präzipitat zu 200 ml/Dotter in PBS lösen.
10. Lösung einer Ultrafiltration unterwerfen (MWCO 30.000)
11. Erfolgt die Ultrafiltration aufgrund der hohen Viskosität von Polyethylenglycol zu langsam, kann weiter verdünnt werden.
12. Das Ultrafiltrat kann lyophilisiert oder zur Affinitätsreinigung weiterverwendet werden.

8.11 Präparation des Haptensorbens [79]

1. 1,5 g Fractogel® TSK AF-CDI 1 Stunde in HCl (1 mmol/l) quellen lassen, abdekantieren.
2. Kopplungspuffer zugeben, suspendieren, absitzenlassen, abdekantieren.
3. Schritt 2 wiederholen.
4. Puffer über G4-Fritte absaugen und Fractogel mit Kopplungspuffer waschen.
5. Fractogel mit einem Plastikspatel in einen 50 ml Rundkolben überführen.
6. 15 ml 6-APA-Lösung zugeben.
7. Über Nacht am Rotationsverdampfer langsam drehend bei Raumtemperatur reagieren lassen.
8. Fractogel-6-APA-Konjugat in eine Säule überführen, mit 2 Säulenvolumina Kopplungspuffer spülen (erzieltes Säulenvolumen: 6 ml). Eluat zur Bestimmung der Kopplungsrate sammeln.
9. Säule zum Blockieren der underivatisierten aktiven Gruppen mit 100 ml Glycin-Lösung spülen.
10. Säule mit PBS equilibrieren.

Kopplungsrate indirekt über nicht gebundene 6-APA nach Boison et al. [35] bestimmen.

8.12 Bestimmung von 6-Aminopenicillansäure [35]

Standardlösungen

5 Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 20 mg/10 ml 6-APA in 0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 8,3 herstellen.

Erstellung der Eichreihe

1. Je 500 µl der Standardlösungen in verschließbare Reagenzgläser pipettieren, 500 µl Wasser zugeben.
2. 1 ml Reagenzlösung nach Boison et al. zugeben, mischen.
3. 30 min im Wasserbad bei 65 °C inkubieren.
4. Abkühlen der Reagenzgläser durch Einstellen in kaltes Wasser.
5. Extinktion gegen Blindlösung bei 325 nm messen.

Bestimmung von 6-APA im Kopplungspuffer

Mit 500 µl des lyophilisierten Eluates von der Präparation der Haptensäule analog verfahren.

Oberhalb von 2,0 Extinktionseinheiten ist die Detektion nicht mehr linear. Die besten Ergebnisse sind im Konzentrationsbereich von 7 µg/500 µl bis 85 µg/500µl (0,18 - 2,0 Extinktionseinheiten) zu erwarten.

8.13 Affinitätsreinigung von Immunglobulin Y

1. 3 ml einer Lösung von IgY aus der PEG-Fällung (5 - 10 mg/ml) in PBS auf die Haptensäule aufgeben.
2. Mit PBS spülen, bis keine Extinktion bei 280 nm mehr vorhanden ist.
3. Elution mit Glycinpuffer.
Die Elution erfolgt in zwei Fraktionen. Die erste Fraktion wird gesammelt, die zweite verworfen.
4. Glycinpuffer im Eluat per Ultrafiltration (MWCO 30.000) gegen PBS austauschen.
5. Säule mit PBS equilibrieren.

8.14 Immobilisierung von Antikörpern an Cyanbromid-Sepharose

1. 0,5 g der Sepharose (entspr. 1,75 ml Gel) mit eiskalter HCl (1 mmol/l) quellen lassen und in einer Glasfritte G4 waschen.
2. Sepharose mit Kopplungspuffer waschen und trocken saugen.
3. Sepharose schnell in 4 ml der Immunglobulin-Lösung geben (2 - 2,5 mg/ml Kopplungspuffer) ca. 5 mg /ml Gel).
4. 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter Rotation am Rotationsverdampfer reagieren lassen.
5. Gel in Glycinlösung überführen.
6. 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter Rotation am Rotationsverdampfer reagieren lassen.
7. Gel in eine Säule überführen, mit ca. 50 ml Kopplungspuffer waschen.
8. Säule mit ca. 50 ml Elutionspuffer waschen.
9. Säule mit ca. 50 ml Kopplungspuffer waschen.
10. Säule mit PBS equilibrieren.

Erzieltes Bettvolumen: 1,6 ml.

Kopplungsrate indirekt über nichtgebundenes Protein durch Messung von E(280 nm) bestimmen.

8.15 Ermittlung der Säulenkapazitäten [43]

Die Immunaффinitätssäulen wurden unter folgenden Bedingungen betrieben:

- Lagerung, Probenaufgabe und Waschen und Equilibrieren der Säule mit PBS, pH 7,2
- Elution mit Glycinpuffer, pH 3,0 + Acetonitril (9 + 1)
- Fließgeschwindigkeit: ca. 1 ml/min

Zur Bestimmung der Kapazität mittels HPLC:

1. 1 ml einer Lösung von 1 µg/ml Benzylpenicillin in PBS aufgeben.
2. Mit 9 ml PBS nachwaschen.
3. 2 Waschfraktionen mit je 5 ml sammeln.
4. Mit 10 ml Elutionspuffer eluieren.
5. 2 Elutionsfraktionen mit je 5 ml sammeln.
6. Die Elutionsfraktionen mit je 2 ml Phosphatpuffer neutralisieren.
7. Alle Fraktionen mit 1 ml Kronenetherlösung (18-cr-6, 1 mg/ml in Phosphatpuffer, 0,2 mol/l, pH 7,2) versetzen.
8. Mit 2 x 2 ml Dichlormethan extrahieren.
9. Die Extrakte durch Aufblasen von Stickstoff bei 37 °C zur Trockene eindampfen.
10. 100 µl Brommethylemethoxycumarinlösung zugeben und 1 Stunde bei 60 °C derivatisieren.
11. Per HPLC analysieren (RP-18-Säule temperiert auf 35 °C, Natriumacetatpuffer, 0,05 mol/l, pH 4,5/Acetonitril (53 + 47, v/v), Detektion: Fluoreszenz, Anregung: 300 nm, Emission: 400 nm)

8.16 Dotieren der Matrices

8.16.1 Dotieren von Milch

Das Dotieren der Milch mit 30 µg/kg Isoxazolympenicillin erfolgte nach folgendem Schema:

1. Zu 5 ml Milch 15 µl Arbeitslösung I (10 µg/ml) geben.
2. 10 Sekunden auf dem Vibrationsmischer mischen.
3. Mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Das Dotieren der Milch mit 4 µg/kg Benzylpenicillin erfolgte nach folgendem Schema:

1. Zu 5 ml Milch 20 µl Arbeitslösung II (1 µg/ml) geben.
2. 10 Sekunden auf dem Vibrationsmischer mischen.
3. Mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

8.16.2 Dotieren von Rindermuskel und Rinderleber

Rindermuskel und -leber wurde mit 300 µg/kg Isoxazolympenicillin nach dem folgenden Schema dotiert:

1. Rindermuskel/-leber in einem Universalzerkleinerer homogenisieren.
2. 5 g des Homogenats abwiegen und mit 15 µl der Arbeitslösung I (10 µg/ml) versetzen.
3. Pencilline mit einem Glasstab in die Matrix einarbeiten.
4. Mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Die Dotierung von Rindermuskel und -leber mit 30 µg/kg Benzylpenicillin erfolgte sinngemäß:

1. Rindermuskel/-leber in einem Universalzerkleinerer homogenisieren.
2. 5 g des Homogenats abwiegen und mit 15 µl der Arbeitslösung II (1 µg/ml) versetzen.
3. Pencilline mit einem Glasstab in die Matrix einarbeiten.
4. Mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

8.17 Extraktion der Penicilline aus Lebensmitteln

8.17.1 Extraktion der Penicilline aus Milch

1. 10 ml Milch durch Zentrifugation bei 2000 * g, 4 °C entfetten.
2. 5 ml der entfetteten Milch unter der Fettphase abpipettieren.
3. Entfettete Milch durch Ultrafiltration (MWCO 30.000) deproteinieren.
4. 1 ml des klaren Filtrates mit Natriumchloridlösung auf 10 ml verdünnen.
5. Verdünntes Filtrat zur Immunaффinitätsaufreinigung einsetzen.

8.17.2 Extraktion der Penicilline aus Rindermuskel

1. Rindermuskel in einem Universalzerkleinerer homogenisieren.
2. 5 g des Homogenats abwiegen.
3. 5 ml Extraktionslösung (Acetonitril/Natriumchloridlösung 1 + 1) zupipettieren.
4. 2 ml Hexan zugeben.
5. 30 s auf dem Vibrationsmischer mischen.
6. 5 min im Ultraschallbad extrahieren.
7. 20 min bei 2000 * g, 4°C zentrifugieren.
8. Wäßrige Phase unter der Hexanphase abpipettieren, Hexan- und Fettphase verwerfen.
9. Schritte 3. - 8. wiederholen.
10. Wäßrige Phasen vereinigen, mit Natriumchloridlösung auf 10 ml auffüllen.
11. 2 min bei 2500 * g zentrifugieren.
12. 250 µl des klaren Extraktes mit Natriumchloridlösung auf 10 ml verdünnen.
13. Verdünnten Extrakt zur Immunaффinitätsaufreinigung einsetzen.

Anmerkung: Soll dotiertes Muskelfleisch extrahiert werden, entfallen die Schritte 1. und 2.

8.17.3 Extraktion der Penicilline aus Rinderleber

1. Rinderleber in einem Universalzerkleinerer homogenisieren.
2. 5 g des Homogenats abwiegen.
3. 5 ml Extraktionslösung (Acetonitril/Natriumchloridlösung 1 + 1) zupipettieren.
4. 30 s auf dem Vibrationsmischer mischen.
5. 5 min im Ultraschallbad extrahieren.
6. 20 min bei 2000 * g, 4°C zentrifugieren.
7. Wäßrige Phase abdekantieren.
8. Schritte 3. - 7. wiederholen.
9. Wäßrige Phasen vereinigen, mit Natriumchloridlösung auf 10 ml auffüllen.
10. 2 min bei 2500 * g zentrifugieren.
11. 500 µl des klaren Extraktes mit Natriumchloridlösung auf 10 ml verdünnen.
12. Verdünnten Extrakt zur Immunaффinitätsaufreinigung einsetzen.

Anmerkung: Soll dotierte Leber extrahiert werden, entfallen die Schritte 1. und 2.

8.18 Immunaффinitätschromatographie von Lebensmittelextrakten

Die Immunaффinitätschromatographie wurde on-line mit der HPLC gekoppelt. Die Verbindung der Komponenten ist in Anhang I skizziert.

Die Aufgabesämlicher Puffer und Probenextrakte erfolgen mit Hilfe des Dilutors, dessen Programmierung ebenfalls in Anhang I zu finden ist.

1. Equilibrieren der Immunaффinitätssäule mit 5 ml PBS.
2. Aufgabe von 2 * 5 ml Probenextrakt.
3. Waschen der Säule mit 5 ml PBS.
4. Elution mit 5 ml Elutionspuffer. Das Eluat wird in einer 5 ml-Probenschleife gesammelt und der HPLC zugeführt.
5. Regenerieren der Säule mit 5 ml PBS.