Gymnasium Penzberg Kollegstufenjahrgang 2006/20008

Facharbeit

aus dem Fach
Biologie

Thema: **Entwicklung eines Antikörper-produzierenden Zellklons**

Verfasserin: Manuela Steiner
Leistungskurs: 3B1
Kursleiter: Hr. Michael Schefcsik OStR
Abgabetermin: 25.01.2008

Erzielte Note: ……... in Worten: ……

Erzielte Punkte: …… in Worten: ……
(Einfache Wertung)

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am …….

……
(Unterschrift des Kursleiters/ der Kursleiterin)

Index

1. Einleitung

1.1 Antikörper als Impfstoffe S. 3
1.2 Entdeckung des Antikörpers S. 3

2. Hauptteil:

2.1 allg. Antikörper, IgG-Antikörper S. 4
2.2 Monoklonale Antikörper S. 5
2.3 Rekombinante Antikörper S. 5
2.4 Anwendung von Antikörpern als biochemische Hilfsmittel S. 6
2.4.1 Der ELISA-Test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) in der Theorie S. 7
2.4.2 Nachweis von Antikörper produzierenden Zellen mittels ELISA-Test, durchgeführt bei Roche Diagnostics in Penzberg S. 8
2.4.3 Die Automatisierung eines ELISA mit Hilfe einer Screening Anlage (uHTS) S. 14

3. Schluss

3.1 Mein Fazit S. 15
3.2 Danksagungen S. 15

4. Anhang S.16

5.Quellen S. 17

6. Erklärung

1.Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass seit 2003 weltweit ca. 313 Menschen an der Vogelgrippe erkrankt sind und 191 an ihr gestorben sind. Inzwischen befürchten Experten, dass sich das Virus bald so stark verändern könnte, dass es von Mensch zu Mensch übertragen werden kann. Wenn das passiert, könnte eine weltweite Epidemie drohen, die nur durch Impfstoffe verhindert werden kann. Wissenschaftler arbeiten fieberhaft an einem neuen Impfstoff, der auf menschlichen Antikörpern basiert und vom menschlichen Immunsystem angenommen wird.
Einem Internationalen Expertenteam ist es gelungen, mit Antikörpern von Menschen, die das Virus überlebt haben, Mäuse für kurze Zeit gegen das Virus zu immunisieren. In diesem Impfstoff befanden sich Antikörper von vier erwachsenen Menschen, die 2004 das Virus in Vietnam überlebt haben. Dieser Antikörper wurde im Labor isoliert und man stellte daraus monoklonale Antikörper her, die die Eiweiße in der Außenhülle des Virus angreifen und diesen damit zerstören. Von 60 Mäusen, die diese Antikörper bekamen, überlebten 58 die Infizierung mit dem normalerweise tödlichen Virus.

Mittlerweile laufen die Forschungen auf Hochtouren, damit dieser Impfstoff auch beim Menschen eine Infizierung verhindert und bereits Betroffenen schneller geholfen werden kann.

Diese Arbeit mit Antikörpern wäre ohne Jules Bordet nicht möglich gewesen. Jules Bordet wurde am 13. Juni 1870 in Soignies, Belgien, geboren und studierte dort Medizin. 1832 entdeckt er, in einem Pariser Labor, dass ein lebender Organismus spezifische Antikörper gegen fremde Antigene bilden kann.
Er bekam, unter Anderem, 1919 den Nobelpreis für Medizin für seine Entdeckungen auf dem Gebiet der Immunität.

Damit war der Grundstein für eine neuartige Behandlungsmethode geschaffen.

1975 entdeckten zwei weitere Wissenschaftler, Georges J.F. Köhler und César Milstein (Deutschland und Argentinien), die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die der Wissenschaft die Möglichkeit gab, gezielt Antikörper gegen Krankheiten herzustellen, an denen der Mensch sonst gestorben wäre.
1984 erhielten die beiden Wissenschaftler für die Entdeckung der monoklonalen Antikörper den Nobelpreis der Medizin.

Heute werden monoklonale Antikörper gegen verschiedene Krebszellen eingesetzt, da sie das Wachstum der Krebszellen verhindern und die Krebszellen damit keine Chance auf Ausbreitung im Körper haben. Diese Therapie wird inzwischen gegen verschiedene Krebsformen wie, z.B. Brustkrebs und Darmkrebs eingesetzt.

Ohne diese Entdeckungen wäre also die heutige medizinische Versorgung viel geringer und einige Krankheiten weiterhin tödlich.

Wie funktioniert aber ein Antikörper und warum erkennt ein Antikörper was körperfremd und was körpereigen ist? Wie stellt man fest, welche Zellen Antikörper produzieren und welche nicht?
Diese Fragen sollen im Folgenden geklärt werden.

2. Hauptteil

2.1 Funktion eines Antikörpers:

Antikörper (Immunglobuline) sind Proteine (Bluteiweiße), aus der Klasse der Globuline, die mit einem bestimmten Antigen reagieren können. Sie dienen zur Abwehr von Fremdstoffen, die in den Körper eingedrungen sind.
Beim Menschen unterscheidet man fünf Antikörperklassen, die häufigste nennt man: IgG (Immunglobulin G).
Ein IgG ist ein Glykoprotein, das von Plasmazellen produziert wird, nachdem diese Zelle mit einem Antigen in Verbindung gekommen ist. Immunglobuline der Klasse G wirken vor allem gegen Bakterien.
Ein IgG-Antikörper hat die Form eines Y mit einer Molekülmasse von etwa 150 000u und besteht aus vier Polypeptidketten, von denen jeweils zwei gleich sind.
Diese gleichen Ketten werden schwere und leichte Ketten genannt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

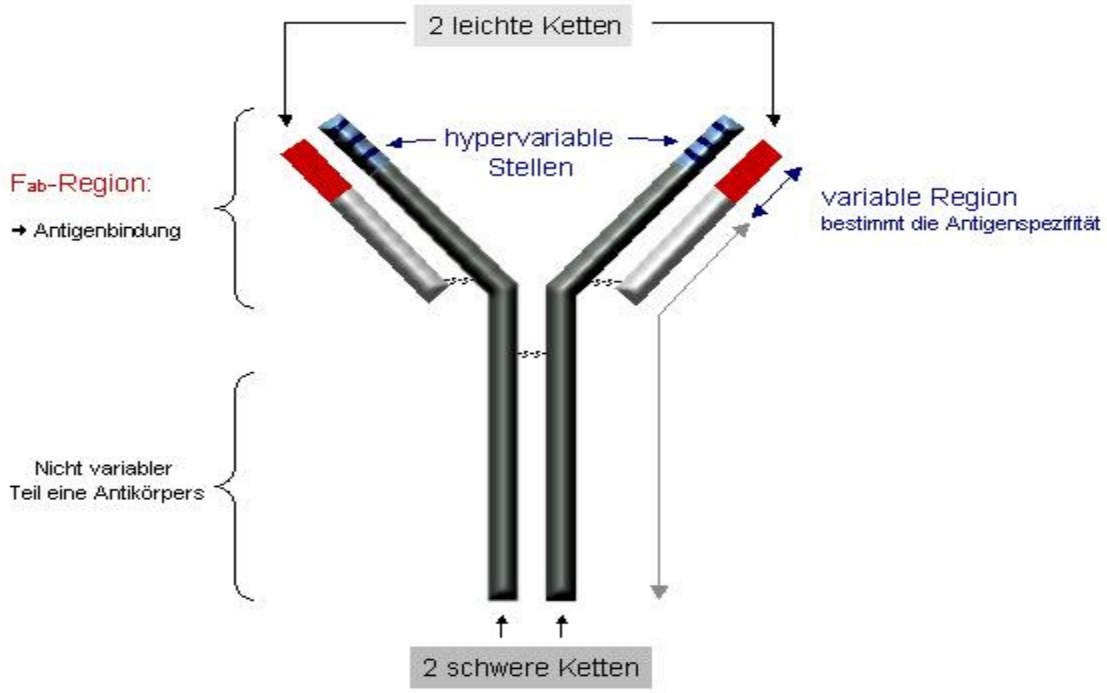


Abb.1 Schematische Darstellung eines Antikörpers

An den Enden der Ketten befinden sich sogenannte variable Bereiche (Epitope), die, je nach Antigen, eine andere Struktur haben. Der antigenbindende Anteil des IgG (Fab-Region) ist sehr variabel, es gibt ca. 10^6 bis 10^9 verschiedene Fab-Abschnitte.
Diese entsprechenden Genabschnitte mutieren während des ganzen Lebens, um immer die notwendigen Abschnitte zu bilden.
Jeder Antikörper erkennt dabei nur eine Substanz oder Substanzgruppe. Man sagt, er ist spezifisch für diese Substanz. Das gebundene Molekül wird als Antigen bezeichnet.
Wird eine Substanz als körperfremd erkannt, heften sich die passenden Antikörper auf diesen Fremdstoff. Dadurch erkennen die körpereigenen Fresszellen den Fremdstoff und können ihn vernichten. Somit hängt von den Antikörpern die menschliche Immunreaktion ab. Besitzt der Mensch keinen Antikörper für ein Virus oder ein Bakterium, wird er krank und der Körper muss erst lernen, Antikörper gegen diesen Fremdstoff herzustellen.

2.2 Monoklonale Antikörper:

Monoklonale Antikörper haben identische Aminosäuresequenzen und werden neben der therapeutischen Anwendung z.B. zur Gewinnung von hochreinen Medikamenten oder zum Aufspüren oder Markieren von bestimmten Zellen innerhalb eines Organismus benutzt.
Bei der Herstellung müssen Tiere immunisiert und anschließend deren Plasmazellen (aus der Milz oder den Lymphknoten) gewonnen werden. Da diese Zellen die Teilungsfähigkeit verloren haben, müssen sie mit Tumorzellen verschmolzen werden, die sich unendlich teilen können. Dadurch entstehen Zellhybriden (Hybridoma-Zellen). Durch mehrfaches Klonieren und Einzelzellablage wird ein Zellstamm erzeugt, der auf eine einzige Hybridoma-Zelle zurückgeht. Diese Zelllinien können nun unendlich lang vermehrt werden. Somit wird auch eine große Menge an Antikörpern produziert.

2.3 Rekombinante Antikörper:

Spezifische Antikörper werden mit der Phage-Display-Technologie aus einer Genbibliothek von vorhandenen variablen Antikörperbereichen selektioniert. Damit entsteht die Möglichkeit, monoklonale Antikörper in vitro, d.h. im Reagenzglas und ohne die Notwendigkeit zur Immunisierung, herzustellen.
Daraus entstehen vielfältige Möglichkeiten den Antikörper so anzupassen, wie er gebraucht wird, da die Erbsubstanz des Antikörpers bekannt ist.
So kann z.B. die Bindungsstärke und Stabilität verbessert und neue Medikamente entwickelt werden.

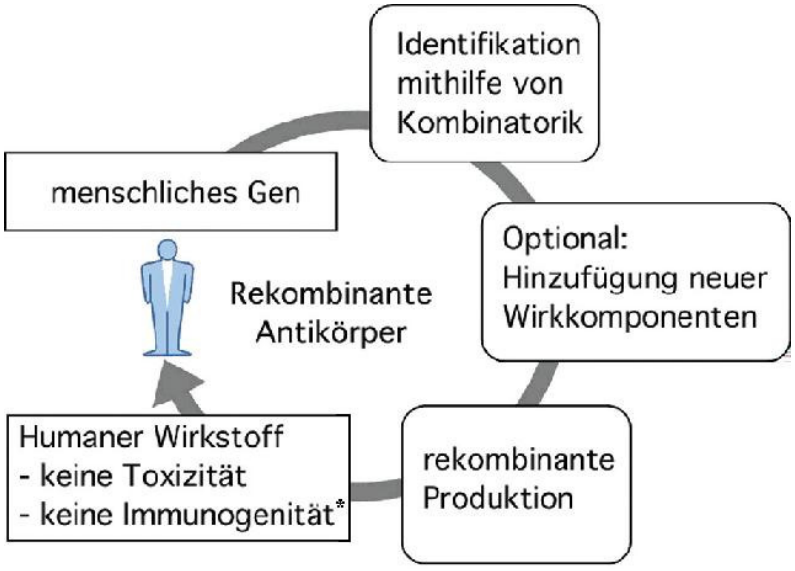


Abb. 2 Graphische Darstellung zu rekombinanten Antikörpern

- Immunogenität ist hier die Fähigkeit eines rekombinanten Antikörpers, eine Immunantwort selbst auszulösen.

2.4 Anwendung von Antikörpern als biochemische Hilfsmittel

Antikörper sind, wegen ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten, schon jahrzehntelang aus der Medizin und Grundlagenforschung als Hilfsmittel nicht mehr wegzudenken.
Sie werden oftmals zur Identifikation von Fremdstoffen im Körper verwendet. Auch in den verschiedensten Labors der Forschung werden Antikörper verwendet, um bestimmte Substanzen nachzuweisen. So kann mit einem Antikörper und bestimmten Techniken ein anderer Antikörper nachgewiesen werden.
Dabei funktioniert der Antikörper als biochemisches Hilfsmittel.
Im Folgenden wird ein Verfahren erklärt und beschrieben, das genau diese Eigenschaften der Antikörper benutzt, um Antikörper- produzierende Zellklone nachzuweisen.

2.4.1 Der ELISA-Test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) in der Theorie

Der ELISA-Test ist ein inzwischen weit verbreitetes Verfahren, mit dem man einzelne Proteine nachweisen kann. Dabei nutzt man die Mechanismen des Immunsystems. Wird eine Substanz vom Immunsystem als körperfremd erkannt, bildet es Antikörper, die an das fremde Protein andocken und es damit markieren.

Diese Reaktion nennt man Antikörper-Antigen-Reaktion.
Diese Reaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Soll ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper bekannt und hergestellt worden sein.
Ist dann in einer Probe das gesuchte Protein vorhanden, wird es von den Antikörpern erkannt und markiert.

Der Test wird in einer sogenannten Mikrotiterplatte durchgeführt, deren Boden mit einer bestimmten Substanz (z.B. Streptavidin) beschichtet ist, an welche sich die Antikörper kovalent binden und somit beim Auswaschen nicht ausgespült werden. Diese Platte (Plate, Abkürzung für Microtiterplate (engl.)) besitzt 384 Vertiefungen, die sogenannten Wells, in welche später die Proben pipettiert werden.

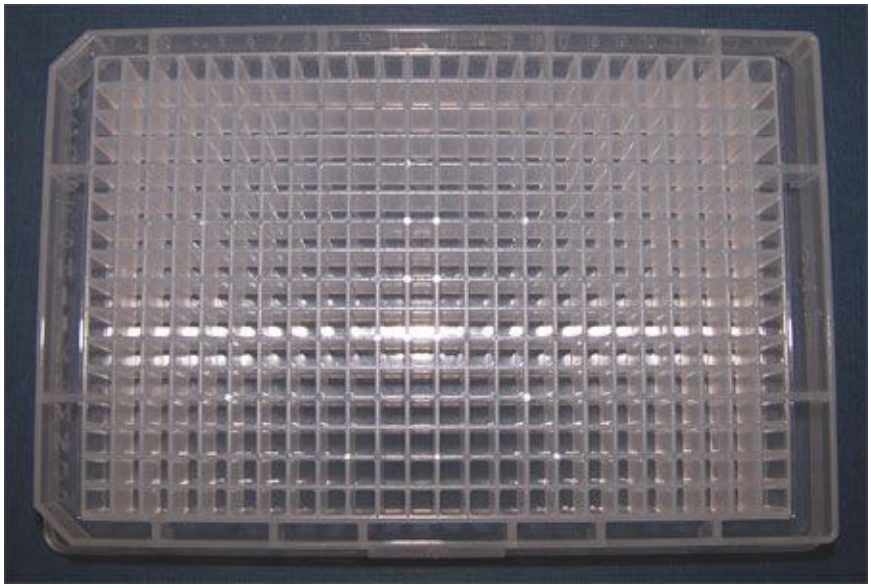


Abb.3 Bild einer Mikrotiterplatte mit 384 Vertiefungen (Wells)

Meistens werden dazu zwei Arten von Antikörpern benutzt.
Ein Antikörper, welcher an den Wellboden der Mikrotiterplatte aufgrund von hydrophoben (wassermeidenden) Wechselwirkungen fixiert wird, dient als Fangantikörper für das nachzuweisende Antigen. Der zweite Antikörper dient als Detektionsantikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist und somit eine enzymatische Reaktion auslöst, die zu einem Farbniederschlag führt.

Damit wird das Vorhandensein eines gebundenen Antigenmoleküls sichtbar gemacht. Da das Antigenmolekül somit zwischen zwei Antikörpern gebunden vorliegt, wird diese Art von Test auch Sandwich-Elisa genannt.

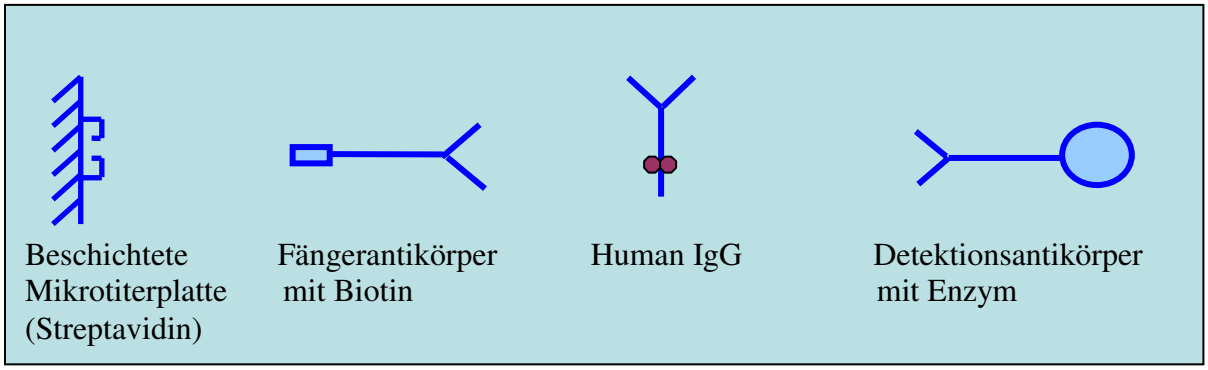


Abb. 4 schematische Darstellung des Sandwich- ELISA

Die Intensität dieses Farbniederschlages kann mit Hilfe eines Readers z.B. dem EnVision von Perkin Elmer gemessen und anschließend ausgewertet werden.
Dabei findet eine sogenannte Absorptionsmessung statt, die ca. 1 Minute für eine Mikrotiterplatte (384 Wells) benötigt.
Dabei geht Licht einer bestimmten Wellenlänge durch alle 384 Wells und das Gerät kann errechnen, welche Wellenlänge des Lichtes absorbiert wurde.
Anhand der Zahlenwerte kann festgestellt werden, wie viele Antigen- Moleküle sich mit den Antikörpern verbunden haben.

2.4.2 Nachweis von Antikörper- produzierenden Zellen mittels ELISA-Test, durchgeführt bei Roche Diagnostics in Penzberg

Im Team BB2, Biologie-Biochemie, wird der ELISA-Test dazu genutzt, Zellklone ausfindig zu machen, welche eine hohe Menge an bestimmten Antikörpern herstellen. Diese identifizierten Kandidaten werden dann, nach weiteren rekombinanten Klonierungsschritten auch in der Zellfermentation bearbeitet, um geeignete Produktionsklone zu erhalten, welche über 2 g/l Antikörper herstellen.
Dazu wird ein so genannter One-Step-Sandwich-ELISA durchgeführt, bei dem alle Arbeitsschritte direkt hintereinander ausgeführt werden, anstatt mit verschiedenen Inkubations- und Waschschritten zwischen den einzelnen Assaykomponenten. Dies erspart Zeit und Material.

Beschreibung der Test-Durchführung:

Am Vortag des eigentlichen Tests muss zunächst bestimmt werden, in welchen Konzentrationen die zu untersuchenden Zellkulturüberstände im ELISA getestet werden, da es innerhalb der zu untersuchenden Überstände starke Unterschiede in der von ihnen produzierten Antikörpermenge gibt. Diese kann zwischen 1µg/ml und 500µg/ml an Antikörper variieren. Damit innerhalb eines Tests möglichst viele Überstände erfasst werden können, werden die Proben vorab in 10 Verdünnungsstufen von 1:60 bis 1:30000 getestet.

Die Referenzierung erfolgt über einen internen Standard, welcher eine bekannte Konzentration des gesuchten Antikörpers enthält.

Dazu wird eine serielle Verdünnung aus 12 Verdünnungsstufen im Verhältnis 1:2 angefertigt.
Hierzu werden 12 Reaktionsgefäße, sogenannte Tubes, vorbereitet. In Tube 1 werden 200µL eines Puffers vorgelegt und eine definierte Menge aus der unverdünnten Lösung (Stocklösung) des Referenzantikörpers hinzugegeben. Dies ist die erste Verdünnungsstufe.
Als Puffer wird immer PBS verwendet (Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphat buffered saline*)).
In die Tubes 2-12 werden jeweils auch 100µL Puffer vorgelegt. Von Tube 1 werden 100µL entnommen und in Tube 2 pipettiert. Zwischen den einzelnen Übertragungen wird mit der Pipette durch mehrmaliges Aufziehen und Abstoßen die jeweilige Verdünnung gemischt. Aus Tube 2 werden dann wieder 100µL entnommen und in Tube 3 überführt. Dieses wieder gut mischen. Die restlichen Tubes auf die gleiche Weise bearbeiten.
Aus dem letzten Tube werden 100µL entnommen und verworfen.

Als nächstes werden die Proben vorbereitet. Die Vorbereitung erfolgt in der sogenannten Sample-Plate (Probenplatte)
Die Sample-Plate wird , wie graphisch dargestellt, mit Puffer belegt.

	Spalte1	**Spalte2**	**Spalte3**	**Spalten4 - 12**				**Spalten13 - 24**
				1 zu 60	**1 zu 120**	**bis**	**1 zu 30720**	
Probe 1	**leer**	**leer**	**38µL Puffer**	**20µL Puffer**				**leer**
Probe 2								
Probe 3								
Probe 4								
Probe 5								
Probe 6								
Probe 7								
Probe 8								
Probe 9								
Probe 10								
Probe 11								
Probe 12								
Probe 13								
Probe 14								
Probe 15								
Probe 16								

Abb. 5 graphische Darstellung der Sample-Plate

Die ersten beiden Spalten bleiben leer, da dies die Übertragung auf die Assay-Plate erleichtert.
In die 3. Spalte werden 2µL der 16 Proben pipettiert, welche aus dem Zellkultur-Labor für den Vortest geliefert wurden.
Die Pipettierung erfolgt mit einer Mehrkanalpipette der Firma Matrix. Diese Pipette kann ein großes Volumen aufnehmen und in mehreren Schritten in kleinen Volumina wieder abgeben.
Durch mehrfaches Aufnehmen und Abgeben werden die Proben mit dem Puffer gemischt.
Nach dem Mischen werden 20µl der 3. Spalte in die 4. Spalte überführt und wiederum gemischt.

Da bei diesem Prozess oft Luftblasen in den Wells der Sample-Plate entstehen, wird vor jedem Übertragungsschritt die Platte leicht aufgeklopft, damit die Bläschen an die Oberfläche steigen und dort durch kurzes Anföhnen mit einem herkömmlichen Föhn entfernt werden können.
Dann werden wieder 20µL aus der 4. Spalte entnommen und in die 5. Spalte überführt. Nach anschließendem Mischen und Föhnen wird dieser Vorgang bis zur 12. Spalte wiederholt. Zuletzt werden aus der 12. Spalte 20µL entnommen und verworfen.
Somit hat man die Proben auf der Sample-Plate verteilt und verdünnt.
Die Proben können nun auf die Assay-Plate überführt werden.
Vorher werden zunächst die beiden Fang- und Detektionsantikörper auf der Assay-Plate vorgelegt.

Diese beiden Antikörper werden als Mix angesetzt, der aus dem biotinylierten Antikörperfragment und einem POD-Antikörperfragment besteht. Das biotinylierte Antikörperfragment bindet sich an die Streptavidinbeschichtung der Assay-Plate und dient somit als Fänger-Antikörper für den Antikörper in dem Zellkulturüberstand, der vermessen werden soll. Das POD-Antikörperfragment bindet an den gesuchten Antikörper und dient dazu, dass später eine Farbreaktion stattfinden kann.

Schematische Darstellung des Antikörpermixes:

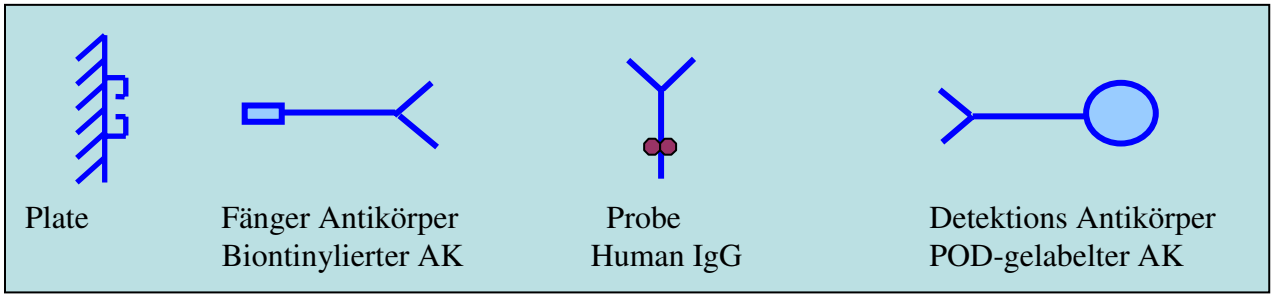


Abb. 6 Schema des Assayprinzips

Mit dem Antikörpermix aus Fänger- und Detektionsantikörper werden die Spalten 1-12 mit jeweils 20µL befüllt.
Anschließend werden mit einer Multipipette 10µL der Probe aus Spalte 3 der Sample-Plate entnommen und in Spalte 3 der Assay-Plate überführt. Mit den Spalten 4-12 wird genauso verfahren.
Es ist darauf zu achten, dass nach jedem Pipettierschritt die Pipettenspitzen (Tips) gewechselt werden, damit es nicht zu Verschleppungen oder Kreuzkontaminationen kommen kann.
Zuletzt werden 10µL der Standardkurve in die ersten beiden Spalten der Assay-Plate aus den 12 Tubes übertragen, wobei der Inhalt von Tube 1 (mit der höchsten Konzentration) auf Zeile L der Assay-Plate pipettiert wird.
Als Negativkontrolle werden die restlichen 4 Wells der ersten beiden Spalten mit Puffer aufgefüllt.

Graphische Darstellung der Assay-Plate:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Probennr.
A	Standard-werte		Proben										1
B													2
C													3
D													4
E													5
F													6
G													7
H													8
I													9
J													10
K													11
L													12
M	Negativ-Kontrolle												13
N													14
O													15
P													16

Abb. 7 Schematische Darstellung der Assay-Plate

Anschließend wird die Assay-Plate für eine Stunde inkubiert.
Hierzu wird die Assay-Plate auf einen Plattenschüttler gestellt, damit eine optimale Durchmischung der einzelnen Assaykomponenten erreicht wird.
Nach der Inkubationszeit wird die Plate vom Schüttler genommen und in einem Mikrotiterplatten- Washer gewaschen, damit die überschüssigen ungebundenen Antikörper ausgespült werden und das Ergebnis somit keine falschen positiven Signale geben kann.

Daraufhin wird per Matrixpipette in jede Spalte 40µL Abts (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsääure)) pipettiert, womit eine enzymatische Reaktion, die als grüner Farbumschlag sichtbar wird, ausgelöst wird. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wird die Plate mit dem EnVision vermessen. Dieser vermisst die Plate bei einer Wellenlänge von 405nm.

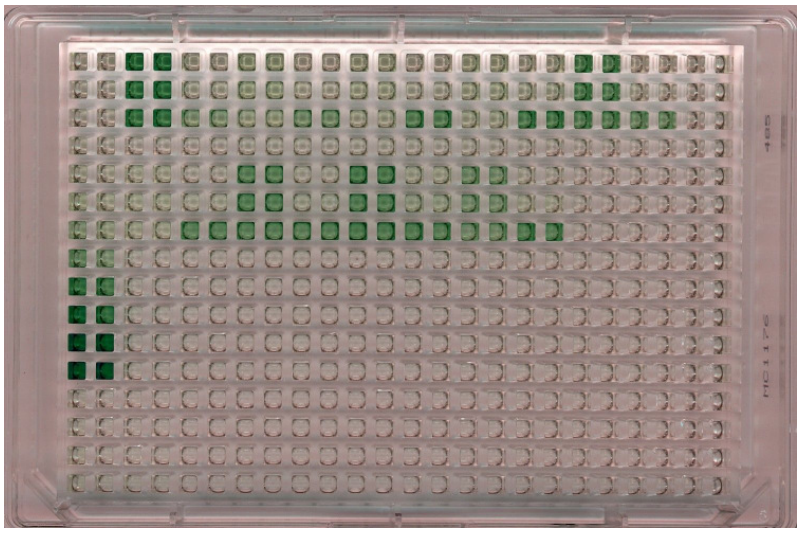


Abb.8 Plate mit Abts nach der Inkubationszeit

Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration von gebundenen Antikörpern.
Die Auswertung erfolgt über eine Computersoftware, die die Ergebnisse in einer Excel-Tabelle ausgibt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	3.143	0.18	1.403	1.311	1.387	1.165	1.108	1.015	1.033	3.875	3.719	3.697	3.682	3.636	3.622	3.536	3.578	0.61	3.596	3.584	3.624	3.251	3.236	0.1
B	3.223	3.322	1.929	1.616	1.614	1.611	1.468	1.387	1.812	1.131	1.039	3.903	3.765	3.654	0.7	3.579	3.704	0.7	3.665	3.648	3.706	3.238	3.243	3.102
C	3.283	3.274	1.96	1.811	1.865	1.619	1.578	1.482	1.384	1.251	1.208	3.957	3.813	3.722	3.848	3.653	3.904	3.918	3.815	3.837	3.867	3.322	3.317	3.199
D	3.491	3.456	2.178	1.87	1.986	2.011	1.775	1.672	1.682	1.547	1.457	3.973	3.667	3.632	3.704	3.554	1.039	3.909	3.848	3.873	3.795	3.302	3.306	3.097
E	3.788	3.752	2.114	2.013	2.062	1.975	1.893	1.82	1.867	1.753	1.578	3.817	3.538	3.505	3.643	3.416	3.927	3.941	3.858	3.925	3.787	3.381	3.379	3.139
F	1.292	1.236	2.197	2.078	2.107	2.102	1.961	1.929	1.939	1.752	1.868	3.592	3.432	3.386	3.456	3.355	3.788	3.719	3.743	3.796	3.634	3.391	3.375	3.101
G	1.651	1.643	2.152	2.018	2.085	2.041	2.018	1.914	1.937	1.761	1.781	3.427	3.321	3.273	3.342	0.27	3.562	3.698	3.629	3.699	3.512	3.446	3.432	3.095
H	1.895	1.834	2.075	1.954	2.021	2.05	1.946	1.891	2.025	1.828	1.814	0.32	3.251	3.201	3.229	3.194	3.389	3.446	3.452	3.499	3.362	3.454	3.436	3.096
I	1.886	1.858	1.949	1.858	1.85	1.934	1.799	1.813	2.027	1.807	1.831	3.225	3.184	3.156	3.177	3.157	3.319	3.346	3.321	3.451	3.267	3.474	3.475	3.094
J	1.996	1.945	1.692	1.58	1.517	1.675	1.661	1.737	1.988	1.841	1.926	3.166	0.14	3.128	3.146	3.133	3.229	3.241	3.223	3.283	3.187	3.301	3.283	3.093
K	1.995	1.946	1.119	1.203	1.044	1.159	1.307	1.363	1.798	1.715	1.708	3.136	3.123	3.111	3.125	3.121	0.17	3.186	3.168	3.226	3.163	3.193	3.194	3.093
L	2.084	2.073	3.798	3.705	3.686	0.75	3.949	0.98	1.409	1.213	1.473	0.12	3.115	3.104	3.108	0.11	3.139	3.139	3.132	3.162	3.121	3.156	3.151	3.096
M	3.136	3.147	3.454	0.53	3.403	3.493	3.619	3.592	0.96	3.851	1.065	3.113	3.109	3.103	3.105	3.103	3.118	3.116	3.117	3.125	3.109	3.137	3.146	3.103
N	3.137	0.12	0.29	3.344	3.259	3.312	0.34	3.384	3.678	3.493	3.669	3.109	3.108	3.102	0.1	3.101	3.111	3.104	3.108	3.112	3.102	3.124	3.118	3.099
O	3.134	3.128	3.187	3.209	3.173	3.196	3.195	3.214	0.36	3.296	3.381	3.108	3.108	3.104	3.101	3.103	3.105	3.106	3.101	3.105	3.099	3.111	3.111	0.11
P	3.152	3.133	3.157	3.167	0.14	3.154	0.15	3.173	3.186	3.188	3.222	3.112	3.111	3.106	3.108	3.109	3.107	3.104	3.102	3.113	3.147	3.109	3.109	3.112

Abb.9 Errechnete Werte des EnVision

Je röter ein Wert dargestellt ist, umso mehr Antikörper befinden sich in diesem Well. In den ersten beiden Spalten sieht man den Verlauf der Standardkurve.

Diese Daten werden mit einem Excel-Programm ausgewertet, hierbei erfolgt die Quantifizierung anhand der mitgeführten Standardkurve. Von dieser Kurve wird zur endgültigen Auswertung allerdings nur der lineare Bereich gewählt, da dieser die exaktesten Werte liefert.
Dieser lineare Bereich sollte mindestens 5 Werte enthalten und der definierte Standardwert r^2 sollte so nah wie möglich bei 1 liegen. Durch Auswahl der Werte kann dieser r^2-Wert erreicht werden.

Area 4	Plate 2 X-Values Given	(1:7680) Y-Values	
	Conc. [ng/ml]	Absorbance	Calculated Conc.
Std1	0.049	0.013	-1.212900456
Std2	0.098	0.006	-1.328611573
Std3	0.195	0.008	-1.295551254
Std4	0.391	0.025	[illegible]
Std5	0.781	0.086	[illegible]00619881
Std6	1.563	0.180	1.547636187
Std7	3.125	0.317	3.812268045
Std8	6.250	0.493	6.721576124
Std9	12.500	0.821	12.14346845
Std10	25.000	1.067	16.2098877
Std11	50.000	1.212	18.60676084
Std12	100.000	1.339	16.70277928

Zugelassene Zahlenwerte

Abb. 10 Zugelassene Werte

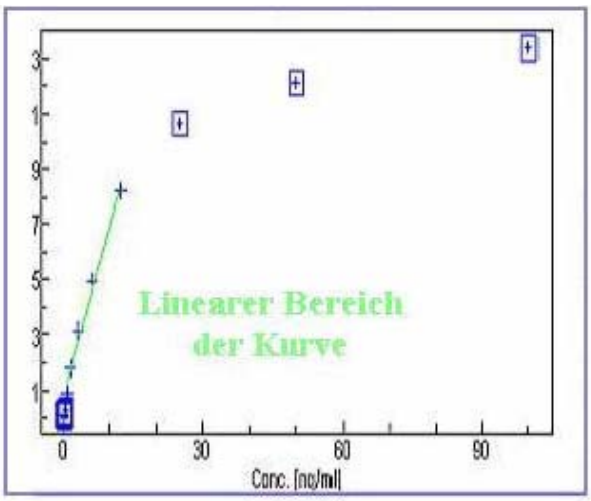


Abb.11 Linearer Bereich der Kurve

Model	100	Y= ((A*x)+B)
Parameter:		
(Slope) A=	0.060495484	
(Offset) B=	0.085875	
R^2	0.994369	
Limits of linear range		Conc. [ug/ml]
Abs. Min	0.100	1.793192
Abs. Max	0.800	90.65933
Z' Factor	#DIV/0!	
S/N Ratio	#DIV/0!	

r^2 sollte so nah wie möglich bei 1 liegen

Abb. 12 r^2 Wert

Je größer der lineare Bereich der Referenzkurve ist, desto breiter ist das Spektrum der Werte, die zur Auswertung zugelassen werden und somit eine Ausgabe eines Konzentrationswertes an IgG ergeben.

Die errechneten Konzentrationen erscheinen in einer Tabelle im Excel-Programm, in welcher alle passenden Werte zur Übersicht gelb unterlegt werden.

Calculated Concentration in ug/ml

	1	2	60	120	240	480	960	1920	3840	7680	15360	30720
A	-0.004		#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	**#>Max**	#>Max	**171.198**	198.242	186.480
B	-0.004		#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	**35.903**	38.734	**35.942**	10.188	#<Min
C	-0.001		#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	**#>Max**	66.319	**69.459**	50.528	3.766
D	-0.003		#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	**41.465**	50.599	**48.400**	21.459	#<Min
E	-0.001		0.153	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
F	0.002		#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	#>Max	**36.422**	42.887	**39.205**	9.595	#<Min
G	0.007		1.229	1.336	1.160	0.374	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
H	0.014		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
I	0.024		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
J	0.034		#>Max	#>Max	4.488	4.527	3.937	**0.532**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
K	0.040		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
L	0.041		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
M	-0.004		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
N	-0.004		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
O	-0.004		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min
P	-0.004		#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	#<Min	**#<Min**	#<Min	**#<Min**	#<Min	#<Min

Abb.13 Tabelle zur Auswertung

Anhand der Tabelle erfolgt die Entscheidung, in welchen zwei Verdünnungsstufen der Test am nächsten Tag durchgeführt wird.

2.4.3 Die Automatisierung eines ELISA mit Hilfe einer Screening Anlage (uHTS)

Die Beschreibung dieses ELISA-Vortests bezieht sich auf einen Durchgang mit einer 384 Well-Plate. Bei mehreren Plates wird der ELISA-Test mithilfe einer vollautomatischen Screeninganlage der Firma Zeiss/ Evotec (genannt uHTS, ultra high througput screening) durchgeführt. Dieses System besteht aus 4 Modulen. Jedes der Module beinhaltet verschiedene Komponenten wie Pipettierer (CyBi-Well), Dispensiergeräte, Washer, Inkubatoren und einen Reader und kann die Arbeitschritte, die für den Test notwendig sind, mit mehreren Assay Plates gleichzeitig durchführen. Durch z.B. drei integrierte Pipettierer kann die Zugabe der einzelnen Assaykomponenten (Antikörper-Mix, Referenzkurve und Proben) verschachtelt erfolgen, d.h. während Pipettierer 1 in die 1. Assay-Plate schon die Proben überträgt, kann Pipettierer 2 in eine andere Assay Plate gleichzeitig den Antikörpermix übertragen. Diese 3 Pipettierer können also die Arbeit übernehmen, die 3 Personen verrichten müssten. Dadurch wird eine beträchtliche Zeitersparnis erreicht. Allerdings muss die uHTS vor dem Lauf vorbereitet werden. Aufgabe des Anlagenbetreuers ist es, die Anlage mit allen Reagenzien wie dem Antikörpermix, dem Referenzstandard sowie den Proben, den Assay-Plates und Sample-Plates sowie dem ABTS zu versorgen. Mittels eines Softwareprogramms läuft die Anlage vollautomatisch und führt alle Assayschritte selbstständig durch. Dadurch wird eine gleichmäßige Testdurchführung gewährleistet und gleichzeitig personelle Arbeitskraft eingespart.

Abb. 14 Zeiss/ EvoTec uHTS System, zur vollautomatischen Durchführung eines ELISA-Tests

Die uHTS benötigt für 30000 Proben ca. 6 Stunden. Diese Probenanzahl ist ohne Robotik, d.h. nur mit Mehrkanalpipetten in keinem vertretbaren Zeitrahmen durchführbar. Ein Mensch bräuchte dafür mehrere Tage. Mit der uHTS ist es somit sehr viel leichter und weniger zeitintensiv, diesen Test durchzuführen.

3. Schluss

3.1 Mein Fazit

Bei meinem Praktikum, das ich in den vergangenen Pfingstferien bei Roche Diagnostics durchgeführt habe, konnte ich viele Techniken und Methoden kennenlernen, die ansonsten im Unterricht wohl nur kurz besprochen werden. Dieses Praktikum gab mir die Möglichkeit, selbst diesen Test durchzuführen. Dadurch erlangte ich ein viel tieferes Wissen über Antikörper und ihre Verwendungsmöglichkeiten in der heutigen Forschung und Medizin.
Der Arbeitsablauf hat mich sehr fasziniert und ich möchte diese beiden Wochen Praktikum nicht missen, da ich dadurch sehen konnte, dass ein Arbeitstag bei Roche Diagnostics nicht nur am Schreibtisch stattfindet, sondern auch mit praktischen Elementen versehen ist.
Mir haben diese Erfahrungen geholfen, um mir ein konkreteres Bild von den Berufen in der Forschung zu machen. Auch wenn die zwei Wochen Praktikum anstrengend waren, möchte ich doch jedem, der eine solche Arbeitsstelle anstrebt, raten, auch ein solches Praktikum zu machen, denn oftmals ist der Traum doch ein ganzes Stück von der Realität entfernt.

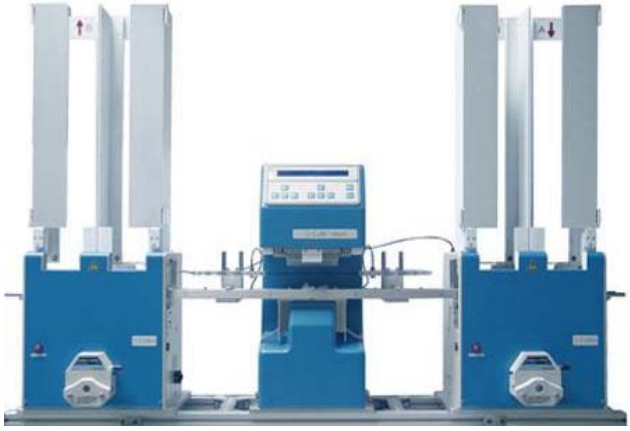
3.2 Danksagungen

Abschließend möchte ich mich bei Hr. Schefcsik bedanken, der mich während der ganzen Zeit bestmöglich unterstützt hat und stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Fr. Paul von der Firma Roche Diagnostics, die mich in die Geheimnisse des ELISA-Tests eingeführt hat und mir stets hilfreich zur Seite stand wenn ich Fragen oder Probleme hatte.
Vielen Dank für die vielen Informationen, Bilder und den Kaffee.

4. Anhang

Multipipetten der Firma Matrix



384- Kanal Simultanpipettierer der Firma Cybio

EnVision Reader der Firma Perkin Elmer

5. Quellen

Information zu Antikörpern	http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/281.htm&check=0 http://www.bioc.unizh.ch/nanowelt/Nanomaschinen/Antikoerper/Antikoerper.html http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/konzepte/konzepte_wirtparasitinteraktion_effektor.htm http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/non_hodgkin_lymphome/59.htm&check=0 http://de.wikipedia.org/wiki/IgG
Abkürzungen	http://www.diss.fu-berlin.de/2004/25/Abkuerzung.pdf
Information zur Einleitung	http://www.die-forschenden-pharma-unternehmen.de/wissenswertes/aktuelles/aktuelles_vogelgrippe_0707/
Jules Bordet	http://www.belgium.be/eportal/application?languageParameter=de&pageid=contentPage&docId=5118
Information zu monoklonalen Antikörper	http://www.interpharma.ch/biotechlerncenter/de/4591.asp http://www.interpharma.ch/biotechlerncenter/de/4476.asp
Information zum ELISA Test	http://www.biosicherheit.de/de/lexikon/33.elisa.html http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2004/486/pdf/monoklonare.pdf
Information zu rekombinanten Antikörpern	http://de.wikipedia.org/wiki/Antik%C3%B6rper#Monoklonale_Antik.C3.B6rper
Lexikon	http://flexikon.doccheck.com/Immunogenit%C3%A4t
Bilder	http://www.hal-allergie.de/allergieinfos/anti.htm http://dontomme.do.ohost.de/rekombinante%20antik%f6rper.jpg

Die restlichen Bilder stammen von Roche Diagnostics in Penzberg.

6. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Penzberg,	den ……..	…….
Ort	Datum	Unterschrift der Schülerin