

Arbeitsblatt 9: Praktikumsanleitung:

Nachweis von p53-Antikörpern in Patientenserien

- Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen ist einfacher -

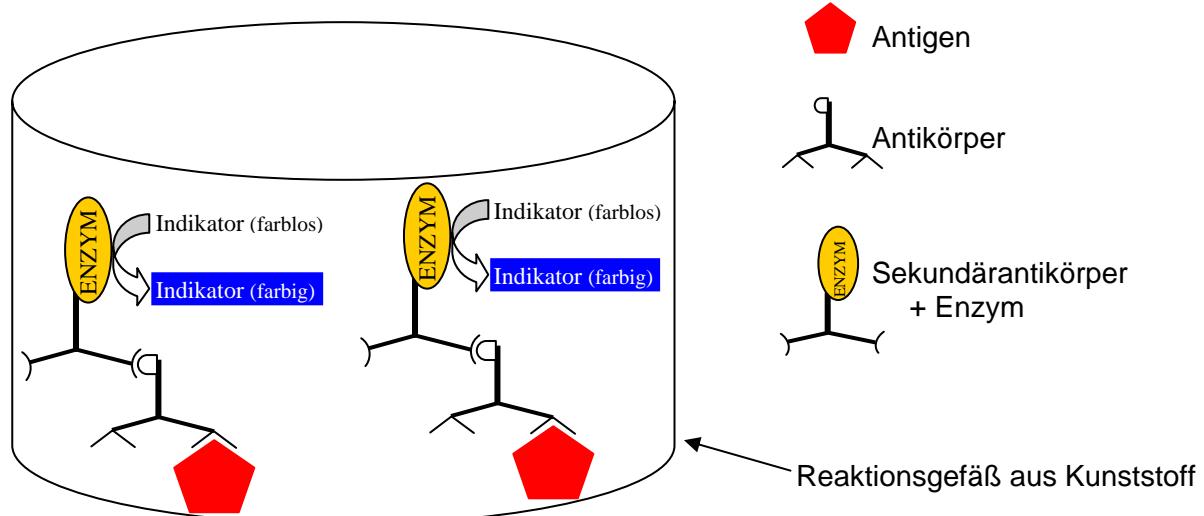
I. Theoretische Einführung:

Das Testverfahren

Immunologische Nachweisverfahren, also solche, die sich die Wechselwirkung von Antikörpern mit Antigenen zunutze machen, sind alltägliche Untersuchungsmethoden in klinischen Diagnoselaboren und der biomedizinischen Grundlagenforschung. Sie werden beispielsweise zur Identifizierung von Krankheitserregern wie Bakterien und Viren, bei der Überprüfung der Antikörperproduktion nach einer Impfung oder beim Nachweis bestimmter Hormone beim Schwangerschaftstest verwendet.

Ein Beispiel eines solchen Nachweisverfahrens ist der so genannte **"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"** oder kurz **ELISA** (deutsch: enzymgekoppelter Immunnachweis-test). Die Immunreaktion verläuft zwischen einem bestimmten Antigen, das auf einer Kunststoffoberfläche gebunden ist, und einem spezifischen Antikörper. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Antigene kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Bei der gängigen indirekten Methode wird der spezifisch gebundene Antikörper durch einen zweiten Antikörpertyp nachgewiesen. An diesem so genannten Sekundärantikörper ist seinerseits ein Enzym (z.B. Peroxidase) kovalent gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion (von farblos zu farbig); die Intensität der Färbung kann fotometrisch gemessen werden. Je nach Versuchsanordnung dient der ELISA zur quantitativen Bestimmung von Antigenen bzw. Antikörpern. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus und ist innerhalb kurzer Zeit durchführbar.

Schematische Darstellung: Funktionsprinzip eines ELISAs



ELISA und Krebs?

Seit seiner Entdeckung 1979 durch ARNOLD LEVINE und DAVID LANE ist das Tumorsuppressor-Protein p53 zum bestuntersuchten Protein geworden. Derzeit erscheinen zu p53 jährlich Tausende wissenschaftliche Veröffentlichungen; in der öffentlich zugänglichen Datenbank „PubMed“ der amerikanischen National Institutes of Health (NIH) sind allein fast 50.000 gesammelt. Wie ein „Wächter“ verhindert p53 bei Anhäufung von Mutationen den Eintritt in die Zellteilung und kann somit als „Schutzengel des Genoms“ bezeichnet werden. Wird p53 durch Mutationen selbst funktionsuntüchtig, können sich Zellen zu bösartigen Tumorzellen verwandeln. p53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumorzellen; 50% aller Tumore weisen veränderte p53-Proteine auf.

Unter Normalbedingungen liegt das Protein p53 in Zellen inaktiv und in sehr geringen Mengen im Zellkern vor, da es permanent aus dem Kern transportiert wird, um im Cytoplasma abgebaut zu werden. Ganz anders sieht die Situation bei verändertem p53 aus: es kommt zur intrazellulären Anhäufung großer Mengen von verändertem p53. Dies kann sogar zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Das Immunsystem reagiert auf das ihm unbekannte p53 wie z.B. auf einen Krankheitserreger und stellt Antikörper gegen p53 her. Neuere Erkenntnisse in der biomedizinischen Forschung haben ergeben, dass bei 40% der Patienten mit einem schlecht diagnostizierbaren, bösartigen Tumor (z.B. Lunge, Darm) zu einem frühen Stadium der Erkrankung p53-Antikörper im Blutserum nachgewiesen werden können.

II. Praktikumsanleitung:

Nachweis von p53-Antikörpern in Patientenserien

- Alarmstufe rot: Welches Serum ist verdächtig? -

Reagenzien:

- **Antigen-Lösung:** h-p53 = rekombinantes, menschliches Tumorsuppressor-Protein p53 in gereinigter Form
- **Block-Lösung:** 5% Milchpulver in Waschpuffer
- **Serum P (= Positiv-Kontrolle):** menschliches Serum mit p53-Antikörpern
- **6 Patientenserien A bis F:** für die zu bestimmen ist, ob p53-Antikörper nachweisbar sind
- **Verdünnungspuffer:** Casein 2 mg/ml in PBS-Tween
(PBS = Phosphat gepufferte physiologische Salzlösung pH 7,4, Tween20 = Detergenz)
- **Anti-HumanIgG-Pox:** Anti-Mensch-Immunglobulin-Antikörper mit Peroxidase gekoppelt, 1:10 000 verdünnt
- **Waschpuffer:** PBS-Tween
- **Substratlösung:** 100 µg/ml TMB, 0,1 µl/ml H₂O₂ in 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 6,0
(TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, H₂O₂ = Wasserstoffperoxid)
- **Stopplösung:** 1 M Salzsäure

Plastik und Geräte:

Reaktionsgefäß, Ständer für Reaktionsgefäß, Mikropipetten 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl, Papierhandtücher, Pipettenspitzen, Handschuhe, Schutzbrillen, Reagenzienchalen

Arbeitsschritt

Wichtige Hinweise

Arbeitsschritt 1: Bindung von Antigen p53

Pipettieren Sie jeweils **50 µl des Antigens p53** in die beschrifteten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens und lassen Sie die Proben 5 Minuten stehen.

Entleeren Sie danach die Platte und drücken Sie die Platte mit den Öffnungen nach unten auf einen Stapel Papiertücher; klopfen Sie die Platte vorsichtig aus.

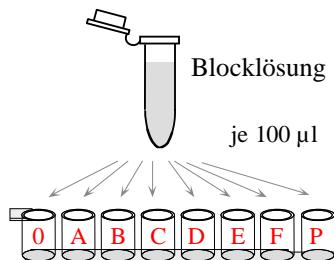
Die Proteine binden unspezifisch an die Kunststoffoberfläche.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.



Arbeitsschritt 2:

Pipettieren Sie **100 µl Blocklösung** in die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens.



Bei diesem Schritt werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Oberfläche des Mikrotiterstreifens blockiert.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Lassen Sie den Ansatz 5 Minuten stehen.
Entleeren Sie den Streifen (siehe oben).

Arbeitsschritt 3: Herstellung der Serum-Verdünnungen

50 µl des Standard-Serums „P“ (= Positiv-Kontrolle) bzw. der **Patientenserien „A-F“** sind in Reaktionsgefäß eingegeben. Hierzu jeweils 200 µl Verdünnungspuffer geben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (nicht schütteln) mischen.

Vorsicht: menschliche Blutseren können Krankheitserreger enthalten !!!!, Handschuhe tragen !!!

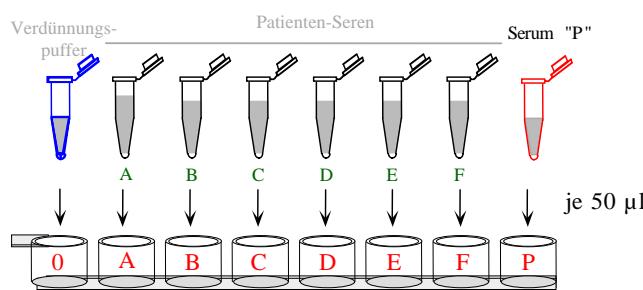
Bei diesem Arbeitsschritt die Pipettenspitze wechseln.

Arbeitsschritt 4:

Pipettieren Sie **50 µl des Serums „P“ (= Positiv-Kontrolle)** sowie je **50 µl der Patienten-Seren A-F** aus den Reaktionsgefäß en in die entsprechenden Vertiefungen des Mikrotiterstreifens. In die Vertiefung „0“ werden 50 µl Verdünnungspuffer pipettiert.

Bei diesem Schritt binden die Antikörper im Serum an das auf der Platte gebundene Antigen.

Bei diesem Arbeitsschritt die Pipettenspitze wechseln.

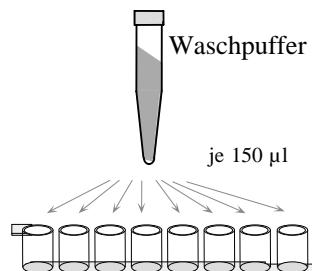


Lassen Sie den Ansatz 15 Minuten stehen.
Entleeren Sie die Streifen (siehe oben).

Zusatzaufgabe:
Während der Inkubationszeit Informationsblatt 7 zu p53 lesen!
(Der Rest ist Hausaufgabe!)

Arbeitsschritt 5: Waschen des Mikrotiterstreifens

Befüllen Sie die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen mit jeweils **150 µl Waschpuffer**. Entleeren Sie die Streifen erneut (siehe oben).



Wichtige Hinweise

Das Waschen entfernt alle unspezifischen Antikörper und anderen Serumproteine.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Wiederholen Sie den Waschvorgang noch 2 mal.

Arbeitsschritt 6: Bindung des Sekundär-Antikörpers

Pipettieren Sie **50 µl** des **Sekundär-Antikörpers** in die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens.



Bei diesem Schritt binden die Sekundär-Antikörper an die Antikörper aus dem Serum.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Warten Sie 5 Minuten.

Entleeren Sie den Streifen (siehe oben).

Arbeitsschritt 7: Waschen des Mikrotiterstreifens

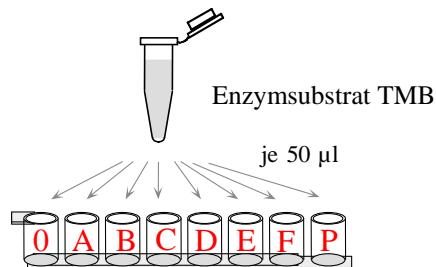
Waschen Sie den Streifen erneut wie in **Arbeitsschritt 5** beschrieben.

Das Waschen entfernt nicht- bzw. unspezifisch gebundene Sekundär-Antikörper.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Arbeitsschritt 8: Farbreaktion

Pipettieren Sie im Abstand von 15 Sekunden je **50 µl Enzymsubstrat TMB** in die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens. Beginnen Sie bei Vertiefungen „0“.



Die Umsetzung des Substrats durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase führt zur Bildung eines blauen Farbstoffes.

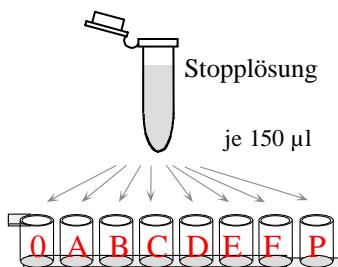
Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Warten Sie nach der letzten Zugabe des Enzymsubstrats genau 3 Minuten.

Wichtige Hinweise

Arbeitsschritt 9: Abstoppen der Reaktion

Pipettieren Sie in der gleichen Reihenfolge wie in Arbeitsschritt 9 im **Abstand von 15 Sekunden** je **150 µl Stopplösung** in die Vertiefungen des Mikrotiterstreichens. Beginnen Sie bei Vertiefung „0“.



Vorsicht: Salzsäure ist stark ätzend!!!!, Handschuhe und Schutzbrille tragen!!!

Die Verschiebung des pH-Wertes durch die Stopplösung beendet die Reaktion und führt zu einem Farbumschlag nach Gelb. Nach dem Abstoppen bleibt die Farbintensität stabil.

Die Pipettenspitze muss nicht gewechselt werden.

Quelle (verändert nach): Dr. Thomas Wendt, Dr. Rolf Lutz, Dr. Fred Engelbrecht: ExploHeidelberg / Lernlabor, Im Neuenheimer Feld 582, D-69120 Heidelberg, Tel.: 06221/421403, Fax: 06221/421410, eMail: lernlabor@explo-heidelberg.de