

## 2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

### Antikörper-bibliotheken für die Pestizidanalytik

Dr. Karl Kramer, Prof. Dr. Bertold Hock

Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Department für Pflanzenwissenschaften, Alte Akademie 12, D-85350 Freising

Tel. 08161-713871

[kramer@weihenstephan.de](mailto:kramer@weihenstephan.de)

Registriernummer der Online-Anmeldung: 269

### Poster

---

Die Gewinnung von rekombinanten Antikörpern erfordert optimale Strategien zur Synthese von rekombinanten Antikörper-Bibliotheken. Grundsätzlich lassen sich zwei Stufen von Antikörper-Bibliotheken unterscheiden: Sogenannte "first generation"-Bibliotheken werden vorwiegend durch Klonierung eines Teils oder des gesamten Antikörper-Repertoires eines Spenderorganismus produziert. Dagegen werden „second generation“-Bibliotheken durch Sequenzvariation bereits klonierter Antikörpergene erstellt, um beispielsweise die Affinität einzelner Antikörper zu verbessern.

Die Synthese einer gruppenspezifischen Bibliothek wird als Beispiel für „first generation“-Bibliotheken erläutert. Die Bibliothek ist so konzipiert, daß sie einen erhöhten Anteil von Antikörpergenen gegen Herbizide der s-Triazin-Familie enthält. Als Genquelle dienten B-Lymphozyten aus der Milz von 21 unterschiedlichen Balb/c-Mäusen. Die Mäuse wurden mit einer Reihe von s-Triazinderivaten immunisiert, die sich vorwiegend in den Alkylresten unterscheiden. So waren Derivate mit *tert.* Buthyl-, Ethyl-, and Isopropyl-Gruppen als auch dealkylierte Triazinderivate vertreten. B-Lymphozyten, die triazinspezifische Antikörpergene enthielten, wurden durch eine immunomagnetische Zellseparation (IMS) von unspezifischen B-Lymphozyten getrennt. Die mRNA der separierten B-Lymphozyten wurde nachfolgend isoliert und die entsprechenden Antikörpergene der Antigen-bindenden variablen Domäne (V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub>) über Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) amplifiziert. Die V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> wurden dann über eine Linkersequenz zusammengefügt und auf der Oberfläche von filamentösen Phagen als Antikörperfragment funktionell exprimiert. Um geeignete Antikörperklone zu isolieren, wurde die resultierende Bibliothek über Immunaффinitätschromatographie mit Triazin-beschichteten Säulen selektiert. Im Anschluß an die Selektion wurden lösliche Antikörperfragmente der einzelnen Klone exprimiert und die Spezifität zu s-Triazinen im Immunoassay untersucht. Für jedes der Triazinderivate, das in der Phagenselektion verwendet wurde, ließen sich Antikörper mit Spezifitäten zu s-Triazinen identifizieren. Dabei variierten die Testmittelpunkte der Kalibrationskurven für die besten Antikörperfragmente zwischen 8,7 µg/l für Deethylatrazine und 17,7 µg/l für Atrazine.

Als Beispiel für "second generation"-Bibliotheken wurde ein Antikörperfragment als Ausgangsmaterial gewählt, das einen Testmittelpunkt von 17,7 µg/l für den Nachweis von Atrazin ermöglicht. Neben der moderaten Affinität zeigte die Untersuchung der Kreuzreaktivität für diesen Klon eine bevorzugte Bindung zu Sebuthylazin (78 % Kreuzreaktivität zu Atrazin, 100 % Kreuzreaktivität zu Sebuthylazin). Das Ziel bestand nun darin, eine Variante dieses Antikörpers zu erzeugen, die eine bevorzugte Affinität zu Atrazin bei gleichzeitig verbesserter Sensitivität besitzt. Durch sequenzielle Kombination des Antikörpers mit dem V<sub>H</sub>- and V<sub>L</sub>-Repertoire der oben angeführten, gruppenselektiven Bibliothek wurden Varianten generiert, die eine bevorzugte Bindung von Atrazin aufweisen (100 % Kreuzreaktivität). Mit einem Testmittelpunkt von 0,9 µg/l gestatten diese Varianten zudem einen um den Faktor 20 verbesserten Nachweis von Atrazin im Immunoassay.