

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern für die Optimierung eines Fluoroimmunoassays

I. Coille ^{1,2}, J. Hoebeke ¹, G. Gauglitz ²

¹- Universität Louis Pasteur

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR9021 du CNRS

15, rue Descartes

F-67084 Strasbourg

²- Universität Tübingen

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Auf der Morgenstelle 8

D-72076 Tübingen

Tel. 07071-2974667

ingrid.coille@ipc.uni-tuebingen.de <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/>

Registriernummer der Online-Anmeldung: 202

Poster

Drei polyklonale Antikörpern gegen Estron, Estradiol und Estrogene wurden auf die aktiven Konzentrationen und Affinitätskonstanten charakterisiert, um einen homogenen Immunoassay, basierend auf dem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, zu optimieren. Ein Biacore 2000, das auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) basiert, wurde als Hilfsmittel für alle Messungen der Charakterisierung benutzt.

Jeder Antikörper bindet ein bestimmtes Analytderivat, darüber hinaus sind Kreuzreaktivitäten vorhanden. Diese wurden getestet. Die aktive Konzentration jedes Antikörpers wurde mit jedem reaktiven Derivat ermittelt. Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante zwischen Antikörpern und dem auf der Oberfläche immobilisierten Derivat wurde bestimmt. Damit konnten die Affinitätskonstanten berechnet werden. Die Affinitätskonstanten jedes Antikörpers für die drei Analyte (Estron, Estradiol und Ethinylestradiol) wurden über Inhibitionskurven ermittelt.

Diese drei Typen von Messungen (aktive Konzentrationen, kinetische Ratenkonstanten und Affinitätskonstanten) wurden bei unmarkierten und bei mit Fluorophoren markierten Antikörpern gemacht. Die Markierung kann einen Einfluss auf die Antikörperaktivität zeigen: sie kann z.B. sehr stark die aktive Konzentration reduzieren. Dieser Effekt wirkt sich auf den FRET Assay aus. Da der FRET Assay kompetitiv ist, wurden der Testmittelpunkt und der Arbeitsbereich vom Verhältnis der

Affinitätskonstanten von IgG/Derivat und IgG/Analyte beeinflusst. Zusätzlich spielten die Absolutwerte der Affinitätskonstanten eine Rolle.

Für den FRET Assay sind assaybedingt 2 Fluorophore nötig: ein Donor-Fluorophor, der auf dem IgG gebunden ist und ein Akzeptor, der durch ein BSA (Bovine Serum Albumine) Moleküle am Derivat fixiert ist. Die Anregungsenergie des Donors wird strahlungslos auf den Akzeptor übertragen, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt und wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor innerhalb eines bestimmten Bereichs (zwischen 1 und 10 nm) liegt. Als Donor-Akzeptor-Paar wurden, wegen der geringen Hintergrundfluoreszenz im roten Wellenlängenbereich, die zwei kommerziell erhältlichen, langwellig anregbaren Fluorophore Cy5 und Cy5.5 ausgewählt.

Testmittelpunkt und Arbeitsbereich waren von den gefundenen Konstanten abhängig. Die FRET Ergebnisse werden mit Hilfe der SPR Messungen diskutiert. Eine Korrelation zwischen den aktiven Antikörper Konzentrationen und der Effektivität des FRET Assays wurde für die untersuchten Antigen/Antikörper Paare gefunden.