

LABORWELT

Sonderdruck aus Nr. 4 / 2005 - Vol. 6

Das BioTechnologie -Themenheft

Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden

Dr. Peter Rauch, Angela Zellmer, CANDOR Bioscience GmbH, Münster;

Dipl.-Chem. Nico Dankbar, Institut für Anorganische und
Analytische Chemie der Universität Münster;

Dr. Christoph Specht, PARA Bioscience GmbH, Gronau;

Dr. Detlef Sperling, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren

Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden

Dr. Peter Rauch, Angela Zellmer, CANDOR Bioscience GmbH, Münster;
Dipl.-Chem. Nico Dankbar, Institut für Anorganische und
Analytische Chemie der Universität Münster;
Dr. Christoph Specht, PARA Bioscience GmbH, Gronau;
Dr. Detlef Sperling, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren

Immunoassays sind analytische Labormethoden zum Nachweis unterschiedlicher Substanzen mit Hilfe von Antikörpern. Sie sind sehr weit verbreitet in bioanalytischen und biochemischen Laboratorien der Life Science-Branche. Zu ihnen gehören beispielsweise Labormethoden wie Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) und Enzyme immunoassays (EIA), Western Blots, Radio immunoassays (RIA), Protein-Biochips, Immunhistochemie oder auch die Immuno-Polymerase chain reaction (Immuno-PCR). Bei allen Arten von Immunoassays kann der Nachweis des Analyten durch Störeffekte beeinflusst werden. Sehr häufig treten Kreuzreaktivitäten, unspezifische Bindungen und Matrixeffekte auf. Störer können in mehr oder weniger großen Konzentrationen in Realproben vorkommen und direkt mit den Analyten oder mit den Fänger- beziehungsweise Detektorantikörpern interagieren. Durch Anwendung eines neuartigen Puffers (LowCross) können die meisten Störeffekte verhindert werden, indem die üblicherweise im Assay verwendeten Probenpuffer oder Antikörperverdünnungspuffer gegen LowCross-Puffer ausgetauscht werden. Hierdurch wird die Qualität der Assays und die Effizienz der Assayentwicklung verbessert.

Key Words: LowCross, Antikörper, Störfaktoren bei Immunoassays, ELISA, Western Blot, Proteinchips

Niels Kaj Jerne, der 1984 den Medizin-Nobelpreis für seine Arbeiten über den spezifischen Aufbau und die Steuerung des Immunsystems erhielt, erwähnte in seinem Vortrag zur Preisverleihung, daß jeder Antikörper multispezifisch sei. Er bezog diese Aussage vor allem auf die Antikörper, die während der frühen Phase einer Immunreaktion gebildet werden^{1,2}. Aber auch scheinbar gut charakterisierte Antikörper mit hoher Affinität zu dem Zielanalyten zeigen zuweilen überraschende Ergebnisse: Bei der immunologischen Detektion von Western Blot-Membranen werden unerwünschte Banden gefärbt, bei Proteinchips erhält man Fluoreszenzsignale an den falschen Positionen der Spots aus immobilisierten Fängerantikörpern sowie einen insgesamt erhöhten Hintergrund. Bei ELISAs erhält man einen hohen Background bei der Leerwertkontrolle oder falsch-positive beziehungsweise falsch-negative Meßsignale. Falschaussagen aufgrund der Störeffekte können zu Folgekosten und auch medizinischen Fehldiagnosen führen³.

Alle Immunoassays sind gekennzeichnet durch eine Bindungsreaktion zwischen Zielanalyt und Antikörper. Das große und bisher nur unzureichend gelöste Problem dieser Methoden ist das regelmäßige Auftreten von Störeffekten (engl.: „interference“),

die zu fehlerhaften Messungen führen. Typische Störeffekte sind unspezifische Bindungen, die zu einem hohen Hintergrund mit schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis führen, Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekte. Vereinfacht ausgedrückt, basieren die meisten dieser Effekte auf direkter Interaktion des Analyten, des Fängerantikörpers oder des Detektorantikörpers mit fremden Substanzen oder Oberflächen. Ein vereinfachtes Schema typischer Störeffekte ist in Abbildung 1 dargestellt. Bekannte Störer, die regelmäßig in der Fachliteratur beschrieben werden, sind beispielsweise heterophile Antikörper sowie HAMAs (human anti-mouse-antibody)² oder Rheumafaktoren, Albumine, Komplement, Lysozyme⁴ und andere.

Störungen durch Immunoassay-Label

Im allgemeinen ist es bei Immunoassays üblich, den Detektorantikörper – im Fall eines kompetitiven Assays: den Standard-Analyten – mit einem Label zu markieren. Die häufigsten Label sind Enzyme (sehr oft alkalische Phosphatase oder (Meerrettich)-Peroxidase), Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Isotope oder auch DNA (bei Immuno-PCR). Auch hierbei können unerwünschte Effekte auftreten.

Bei Fluoreszenzfarbstoffen als Label besteht die Gefahr, daß die oftmals hydrophoben Farbstoffe die Bindungseigenschaften des Detektorantikörpers verändern, weil die Farbstoffe selbst unerwünschte Bindungen eingehen und die Löslichkeit des markierten Proteins herabsetzen können. Zusätzlich kann die Antigen-Antikörperbindung geschwächt werden⁵. Diese Effekte können beispielsweise dazu führen, daß der gelabelte Antikörper verstärkt unspezifisch an die Oberflächen (Abb. 1 A und B), an Fremdproteine der Realprobe (Abb. 1 C) oder an den Fängerantikörper (Abb. 1 D) bindet. In diesen Fällen resultiert auch in Abwesenheit des Analyten ein falsch-positiver Meßwert, oder der gesamte Assay leidet unter einem hohen Hintergrund. Bei Proteinchips werden in diesem Fall erhöhte Hintergrundfluoreszenzen bei einzelnen Spots beobachtet, oder es verschlechtert sich insgesamt das Signal-Rausch-Verhältnis. Ebenfalls können Proteine oder Antikörper aus Serumproben an Fluoreszenzfarbstoffe binden und so die Fluoreszenz des Farbstoffs verringern oder sogar löschen. Deshalb wird bereits von manchem Forscher empfohlen, auf Fluoreszenzfarbstoffe bei Proteinchips zu verzichten beziehungsweise andere Label zu wählen⁶. Die Reaktionen bei Proteinchips sind sehr komplex, weil gleichzeitig eine Vielzahl verschiedener Fänger- und gelabelter Detektorantikörper in einem gemeinsamen Reaktionsvolumen verwendet wird. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen von Proteinen der Probe oder gelabelten Antikörpern an einzelne Spots sowie die Gefahr von Störeffekten von Bestandteilen der Probe mit den Antikörpern⁷.

Störungen durch Kreuzreaktionen

Mit Kreuzreaktionen ist die Fähigkeit des Antikörpers gemeint, auch an andere Strukturen als die des eigentlichen Zielanalyten zu binden (Abb. 1, I-K). Oftmals handelt es sich um Strukturen, die eine große Ähnlichkeit zu dem Analyten haben. Beispiele hierfür sind Metabolite oder chemische Substanzen mit ähnlicher molekularer Struktur. Auch Proteine mit einer zufälligen Ähnlichkeit oder mit Homologien der Aminosäuresequenz können Kreuzreagieren. Kreuzreaktivitäten spielen besonders in kompetitiven Assayformaten, in denen nur ein Antikörper eingesetzt wird, eine größere Rolle^{3,4}. Bei diesen Assays ist es sehr oft Bestandteil der Validierung, mögliche kreuzreagierende Substanzen zu identifizieren und deren Kreuzreaktivität im Experiment zu quantifizieren⁸.

Doch auch bei der Detektion von Proteinen auf einem Western Blot oder bei immunhistochemischen Anwendungen können Kreuzreaktivitäten eine große Rolle spielen. Dies zeigt sich in einer Anfärbung

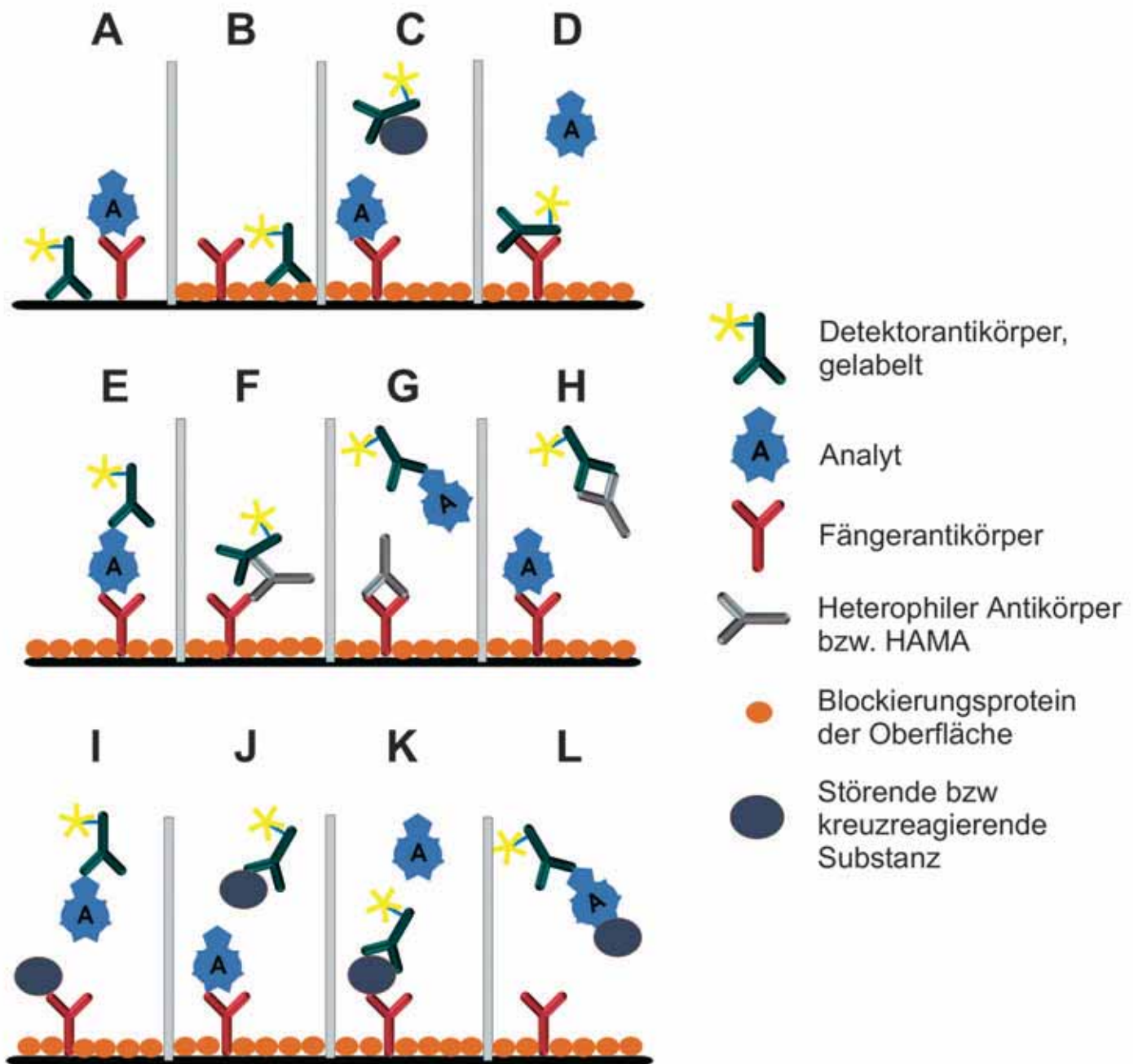


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Auswahl verschiedener Störeffekte, die bei Immunoassays auftreten können. A: unspezifische Bindung eines mit einem Label markierten Detektorantikörpers an eine nicht blockierte Oberfläche. Als Folge ergeben sich falsch-positive Meßsignale. B: unspezifische Bindung eines markierten Detektorantikörpers an eine blockierte Oberfläche. Trotz Blockierung der Oberfläche bindet der Antikörper an die Proteine der Blockierung. Als Folge ergeben sich falsch-positive Meßsignale. C: Ein störendes Protein bindet an den Fc-Anteil des Detektorantikörpers und behindert dadurch sterisch die Bindung an den Analyten. Als Folge hiervon ergeben sich falsch-negative Signale. D: Der Fängerantikörper bindet an den Fc-Anteil des Detektorantikörpers. Als Folge ergeben sich falsch-positive Meßsignale. Der Analyt kann nicht mehr an den Fängerantikörper binden. E: Unbeeinflusster Assay. Der Idealzustand. F: Eine „Brückenbindung“ durch heterophile Antikörper bzw. durch HAMAs. Hierdurch wird der Fängerantikörper mit dem Detektorantikörper verknüpft, so daß sich falsch-positive Signale ergeben. G: Ein HAMA mit anti-idiotypischen Bindungseigenschaften zu dem Fängerantikörper. Der störende Antikörper bindet im Bereich der hochvariablen Region des Fab-Bereichs und verhindert so die Bindung des Analyten. Als Folge hiervon treten falsch-negative Signale auf. H: Ein HAMA mit anti-idiotypischen Bindungseigenschaften zu dem Detektorantikörper. Der störende Antikörper bindet im Bereich der hochvariablen Region des Fab-Anteils und verhindert so die Bindung des Analyten. Als Folge hiervon treten falsch-negative Signale auf. I: Kreuzreaktivität eines Störers mit dem Fängerantikörper. Als Folge hiervon treten falsch-negative Signale auf. J: Kreuzreaktivität eines Störers mit dem Detektorantikörper. Als Folge hiervon treten falsch-negative Signale auf. K: Kreuzreaktivität sowohl mit dem Fänger- als auch mit dem Detektorantikörper. Ein solches Phänomen ist in der Praxis eher selten, doch bei Antikörpern mit schlechter Spezifität durchaus möglich. Bei Antikörpern, die gegen ein Target mit konservierten Aminosäuresequenzen eines Proteins gerichtet sind, dessen Sequenzmotive auch bei anderen Proteinen vorkommen, kann ein solches Störungsbild vorkommen. L: Maskierung des Analyten durch ein Protein der Probe, wodurch das Epitop für den Fängerantikörper blockiert wird, so daß die Bindung des Analyten entweder gar nicht oder – im Falle einer sterischen Behinderung – nur sehr schlecht erfolgen kann. Als Folge hiervon ergeben sich falsch-negative Signale.

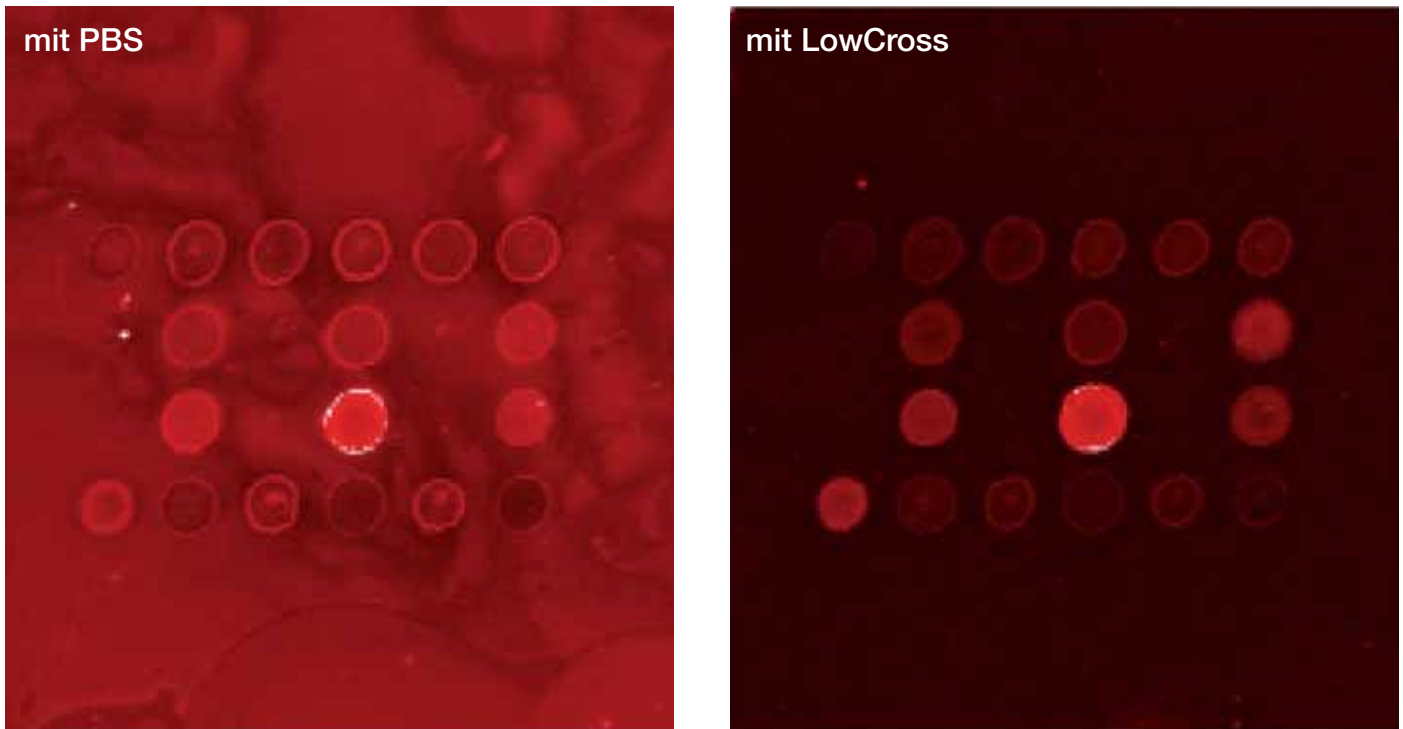


Abb. 2: Reduktion einer unspezifischen Wechselwirkung des Detektorantikörpers an die Oberfläche durch Verwendung von LowCross-Puffer, wodurch sich insgesamt das Signal/Rausch-Verhältnis von 3,4 auf 17,3 verbesserte (durchgeführt von N. Dankbar, Universität Münster).

weiterer Banden oder Zellstrukturen, ohne daß die genauen molekularen Ursachen für das Auftreten dieser unerwünschten Bindungen immer bekannt wären. Bei Western Blots handelt es sich in vielen Fällen schlicht um Fragmente des Zielproteins, die durch natürlichen Abbau oder im Rahmen der methodischen Durchführung entstanden sind. In manchen Fällen ist eine solche pauschale Aussage nicht ausreichend, und man muß das Auftreten von Kreuzreaktivitäten des Primärantikörpers oder des Sekundärantikörpers in Betracht ziehen.

Störungen durch unspezifische Bindungen

Nahe verwandt mit den Kreuzreaktivitäten sind die unspezifischen Bindungen. Die Ursachen auf molekularer Ebene sind andere als bei den Kreuzreaktivitäten. Der Unterschied wird in der täglichen Laborpraxis aber nicht immer deutlich. Von Kreuzreaktivitäten wird gesprochen, wenn der Kreuzreaktand bekannt ist und dessen kreuzreagierende Eigenschaft nachgewiesen werden kann, zum Beispiel über die Bestimmung der kompetierenden Konzentration des Kreuzreaktanden⁸. Bei einer unspezifischen Bindung erfolgt die Bindung an Substanzen, die entweder in weitaus höherer Konzentration als der Zielanalyt vorkommen (z. B. unspezifische Bindungen an Albumine oder Immunglobuline), an Gefäßoberflächen (z. B. bei ELISA-Wellen) oder bei Western Blot-Membranen) oder an Spots aus immobilisierten Antikörpern bei Proteinchips⁷.

Störungen durch Matrixeffekte

Matrixeffekte sind die Summe der Störeffekte aller Komponenten, die in einer Probe vorkommen und die Messung des Zielanalyten beeinflussen⁹. Wenn die genaue molekulare Ursache einer Störung nicht bekannt ist, aber mit der Zusammensetzung der zu messenden Probe in Verbindung gebracht werden kann, spricht man im allgemeinen von einem Matrixeffekt. Auch hier sind die Übergänge zu den einzelnen Störeffekten fließend. Für Matrixeffekte können „Anti-Animal-Antibodies“, heterophile Antikörper, endogene Störer oder Einflüsse der Viskosität, des pH-Werts oder der Salzkonzentration verantwortlich sein.

Störungen durch „Anti-Animal-Antibodies“

Humane „Anti-Animal-Antibodies“ (HAAA) können vom IgG-, IgA-, IgM- oder IgE-Typ sein und werden als Immunantwort auf den Kontakt mit Immunglobulinen tierischen Ursprungs gebildet. HAAs sind als wichtige Störer bei vielen diagnostischen Immunoassays bekannt, und bis zu 80% aller Patientenproben können – je nach veröffentlichter Studie – HAAs enthalten, die zudem Konzentrationen bis in den Bereich von einigen Milligramm pro Milliliter erreichen können¹⁰.

Human-Anti-Mouse Antibodies (HAMA) sind sicherlich die bekanntesten störenden Antikörper in Immunoassays. HAMAs sind humane Antikörper, die relativ spezifisch

und mit merklicher Affinität Maus-Antikörper binden. Hintergrund ist hier besonders die Gabe von therapeutischen Antikörpern, die oft als Medikamente für Krebstherapien eingesetzt werden. Nach Verabreichung reagiert das menschliche Immunsystem auf diese fremden Antikörper und bildet nach und nach Antikörper gegen die Maus-Antikörper. HAMAs stören deshalb immunologische Methoden, die mit Maus-Antikörpern arbeiten. Bei Sandwichformaten aus monoklonalen Maus-Antikörpern werden durch Brückenbildung Fänger- mit Detektorantikörper verknüpft (Abb. 1 F), wodurch ein falsch-positives Meßsignal entsteht. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den Antikörpern verschiedener Spezies sind HAMA-haltige Seren eventuell auch in der Lage, Assays zu stören, in denen Antikörper aus anderen Spezies verwendet werden.

Doch nicht nur Antikörper-Medikamente sind für die Entstehung von HAMAs verantwortlich. Der langjährige Umgang mit Haustieren fördert ebenfalls die Entstehung von Antikörpern, die entweder nur an Antikörper bestimmter Spezies (z. B. Kaninchen, Maus, Hund, Hamster) binden oder artenübergreifend verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten erkennen und so Assays stören können. Manche Störantikörper binden nicht nur an den Fc-Abschnitt, sondern auch direkt an die Fab-Bereiche der verwendeten Assayantikörper. Hierdurch kann die Bindung des Analyten reduziert oder sogar verhindert werden, und die Folge ist eine falsch-negative Bestim-

mung (Abb. 1 G und H). Wenn HAAAs an den Fc-Abschnitt eines Antikörpers binden, spricht man von Anti-isotypischen-Störern, binden sie direkt an die hochvariable Region des Fab-Abschnitts, spricht man von Antidiotypischen Störern¹⁰.

Störungen durch heterophile Antikörper

Taber's Medical Dictionary definiert heterophile Antikörper als „Antikörper, die andere Antigene als das spezifische Antigen binden“¹¹. Auch heterophile Antikörper können vom IgG-, IgA-, IgM- oder IgE-Typ sein. Besonders der IgM-Typ spielt eine besondere Rolle bei Seren von rheumatischen Patienten. Diese Seren enthalten sogenannte Rheumafaktoren in hoher Konzentration. Rheumafaktoren sind IgM-Antikörper, die an Fc-Abschnitte humaner Antikörper binden und somit auch artenübergreifend an Fc-Abschnitte der im Assay verwendeten Antikörper binden können. Daher verknüpfen rheumatische Seren Fänger- mit Detektorantikörpern mit der Folge von falsch-positiven Signalen. Dieses ist zugleich der generelle Störmechanismus der heterophilen Antikörper. Die Wirkung der rheumatischen Seren ähnelt der Wirkung der HAAAs. Der Unterschied zu den HAAAs liegt in der Entstehung der heterophilen Antikörper: Diese werden nicht durch den Kontakt mit tierischen Immunglobulinen gebildet, sondern sind multispezifische Antikörper der frühen Immunantwort oder störende Antikörper mit unbekannter immunologischer Entstehungsgeschichte².

Störungen durch HAAAs oder durch heterophile Antikörper sind schon seit mehr als 30 Jahren bekannt. Die störenden Antikörper sind im allgemeinen schwach bindende Antikörper² und stören vorwiegend Assays, die aufgrund der niedrigen Konzentration des Analyten mit geringen Verdünnungen der humanen Serum- oder Plasmaprobe auskommen müssen¹². Zusätze von blockierenden Substanzen zu dem Probenpuffer – im allgemeinen unspezifische Seren, Antikörper-Fragmente oder hohe Konzentrationen von tierischen Immunglobulinen – können durch Konkurrenz die Störeffekte der HAAAs oder heterophilen Antikörper reduzieren, aber nicht immer verhindern¹⁰.

Störungen durch endogene Bestandteile der Probe

Auch natürlich vorkommende Proteine der Realprobe können Immunoassays stören. Bekannte Störer in humanen Seren sind beispielsweise Albumine, Komplement, Lysozyme und Fibrinogen⁴. Niedermolekulare Analyte können an Albumin binden. Dies erschwert die Zugänglichkeit des Antikörpers zu dem Analyten. Zahlreiche Hormone

liegen an Transportproteine gebunden vor, was je nach verwendeten Antikörpern zu Schwierigkeiten führen kann. Zudem haben viele natürlich vorkommende Proteine die Fähigkeit andere Substanzen und Proteine zu binden. Oft ist diese Bindefähigkeit wesentlicher Teil der Funktion des jeweiligen Proteins. Albumin, Komplement und C-reaktives Protein (CRP) sind für viele Substanzen natürliche Rezeptoren. Daher sind hier – ähnlich wie bei den Antikörpern – unspezifische Bindungen oder sogar Kreuzreaktionen denkbar, die die Erkennung bestimmter Analyte in einem Assay erschweren. Endogene Proteine können als Störer an die Assayantikörper binden (Abb. 1 C, I-K) oder den Zielanalyten für die Assayantikörper maskieren (Abb. 1 L). Lysozyme beispielsweise binden unspezifisch an Proteine mit einem niedrigen isoelektrischen Punkt. Daher können auch Antikörper, die einen isoelektrischen Punkt von etwa 5 haben, gebunden werden und beispielsweise Brückenbildung zwischen Fänger- und Detektorantikörper auslösen⁴.

Ein wichtiger Aspekt, der in diesem Zusammenhang noch erwähnt werden sollte, sind Störungen durch stark lipidhaltige

sind und die Antikörper-Analyt-Bindung durch Lipide gestört werden kann.

Der Hook-Effekt

Der Hook-Effekt führt zu falsch-negativen Bestimmungen, die aber im Gegensatz zu den anderen Störeffekten nicht durch Interaktionen mit Störfaktoren entstehen.

Ein Hook-Effekt kann bei Assays auftreten, bei denen die Probe direkt mit den Assayantikörpern gemischt wird und der Analyt in sehr hohen Konzentrationen auftritt. In diesem Fall können hohe Konzentrationen des Analyten, die die Konzentrationen der Assayantikörper übersteigen, die Fänger- und Detektorantikörper sättigen. Damit simulieren hohe Konzentrationen eine weitaus niedrigere Konzentration im Assay, und hieraus folgt eine deutliche Unterbestimmung der wahren Konzentration⁴. In der Praxis läßt sich ein Hook-Effekt dadurch vermeiden, daß eine höhere Konzentration der Assayantikörper verwendet oder mit einer höheren Verdünnung der Probe gearbeitet wird. Alternativ muß durch systematische Verdünnung der Probe sichergestellt sein,

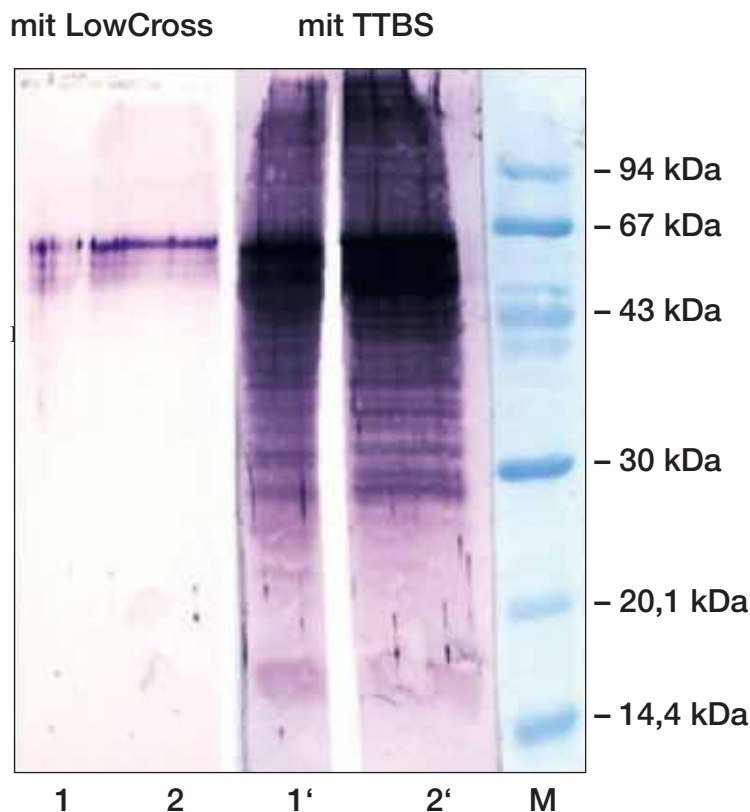


Abb. 3: Immunologische Detektion eines Western Blots (durchgeführt von Dr. D. Sperling, MACHEREY-NAGEL, Düren) zum Nachweis der Cytokeratine 4, 5 und 6. Darstellung der immunologischen Detektion unter Verwendung von LowCross-Puffer im Vergleich zu TTBS. LowCross-Puffer konnte die unerwünschten Bindungen vollständig verhindern. Die Cytokeratine 4, 5 und 6 zwischen 56 und 60 kDa werden mit LowCross-Puffer deutlich detektiert. Spur 1 und 1': Detektion aus HeLa-Zellen, Spur 2 und 2': Detektion aus Leberzellen. M: Molekulargewichtsmarker, gefärbt mit Amido Black. Als Blotting-Membran wurde die Nitrocellulose-Membran porablot NCP (MACHEREY-NAGEL, Düren) verwendet.

daß der gemessene Wert nicht einem Hook-Effekt unterliegt. Bekannte klinische Parameter, die einem Hook-Effekt unterliegen können, sind beispielsweise CRP, AFP, CA 125, PSA, Ferritin, Prolactin und TSH⁴.

Vermeidung der Störeffekte durch LowCross-Puffer

Ursache der meisten beschriebenen Störeffekte sind unerwünschte niederaffine bis mittelaaffine Interaktionen der störenden Faktoren mit den Antikörpern oder den Analyten, nieder- bis mittelaaffine Bindungen von gelabelten Antikörpern zu anderen Proteinen oder Oberflächen sowie schwache bis mittlere Kreuzreaktivitäten der Antikörper zu strukturverwandten Substanzen. Daher unterliegen diese Störeffekte einer Gemeinsamkeit, die der neuentwickelte LowCross-Puffer ausnutzt: die störende Bindung ist schwächer als die spezifische Bindung zum eigentlichen Zielanalyten. Hierbei gibt es natürlich auch Ausnahmen, weil auch in seltenen Fällen sehr hochaffine Kreuzreaktivitäten vorkommen können, die gleiche Qualitäten wie die eigentlichen spezifischen Bindungen erreichen können. In solchen Fällen muß man dann von einer spezifischen Bindung sprechen und man hat im Prinzip einen Antikörper, der gegen zwei verschiedene Substanzen gerichtet ist. Der LowCross-Puffer wurde gezielt entwickelt, um generell schwache und mittlere Bindungen zu verhindern und möglichst nur hochaffine Bindungen mit hoher Spezifität

zu zulassen. Die Abbildungen 2 bis 5 zeigen verschiedene Beispiele von typischen Störeffekten bei Immunoassays, die durch Verwendung von LowCross-Puffer verhindert werden konnten.

Abbildung 2 zeigt eine Proteinchip-Anwendung, bei der LowCross-Puffer einen starken Hintergrund reduziert und so das Signal-Rausch-Verhältnis von 3,4 auf 17,3 verbesserte. In dem Versuch wurden verschiedene polyklonale anti-EPIL-Antikörper (EPIL = early placenta insulin like growth factor) auf ihre Eignung untersucht. Hierzu wurden auf Aminosilan-funktionalisierten Microarray-Slides die gereinigten Antikörper mittels eines Spotters (GMS 417) mit einer Konzentration von 500 µg/ml und einem Volumen von 1,8 nl/Spot immobilisiert. Anschließend wurde 2 ml Medium einer EPIL-überexprimierenden Zelllinie (SKBR3) mit Oyster650P (Denovo Biolabels GmbH, Münster) versetzt und alle darin befindlichen Proteine in einem Ansatz gelabelt. Die Inkubation auf dem Slide erfolgte in Verdünnung des Mediums mit LowCross-Puffer im Vergleich zu PBS in einem Verhältnis von 1: 20 (Medium/Puffer). Nach dem Waschen der Microarray-Slides wurden diese mit einem Fluoreszenzscanner (GMS 418) ausgelesen und die Daten mit ImaGene (Biodiscovery Inc.) ausgewertet. Hierbei konnte durch die Verwendung von LowCross-Puffer eine deutliche Reduzierung des Hintergrundsignals erreicht werden, die eine Unterscheidung der einzelnen Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung für die Bindung von EPIL möglich machte.

Abbildung 3 zeigt die immunologische Detektion eines Western Blots der Cytokeratine 4, 5 und 6 aus Leberzellen und aus HeLa-Zellen, bei dem durch Kreuzreaktivitäten in Kombination mit unspezifischen Bindungen weitere Banden als die eigentlichen Zielbanden detektiert wurden. Hierbei wurden die Proteinproben in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Zum Nachweis von Cytokeratinen in den Proteinproben wurde eine Immunoblot-Detektion nach einem modifizierten Standardprotokoll¹³ sowie mit LowCross-Puffer durchgeführt. Gebundene anti-Cytokeratin-Antikörper (Polyclonal Rabbit anti-Cytokeratin, Biomedica, Foster City, CA, USA) – verdünnt 1:2500 in LowCross-Puffer oder in TTBS (Tween-Tris-buffered-saline) – wurden mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper (Goat anti-rabbit IgG, abcam, Cambridge, UK) verdünnt (1:1250 in LowCross bzw. in TTBS), detektiert und mittels BCIP/NBT visualisiert.

Eine genaue molekulare Zuordnung der Ursache der unerwünschten Bindungen der immunologischen Detektion ist nur schwer zu treffen. Möglicherweise sind hier Kreuzreaktivitäten mit weiteren Cytokeratinen und deren Abbauprodukte zu sehen, oder es handelt sich um unspezifische Bindungen an unterschiedliche Proteine aus dem Zellaufschluß der Leber- beziehungsweise der HeLa-Zellen. Durch einfachen Austausch des TTBS-Puffers, mit dem der Primär- und

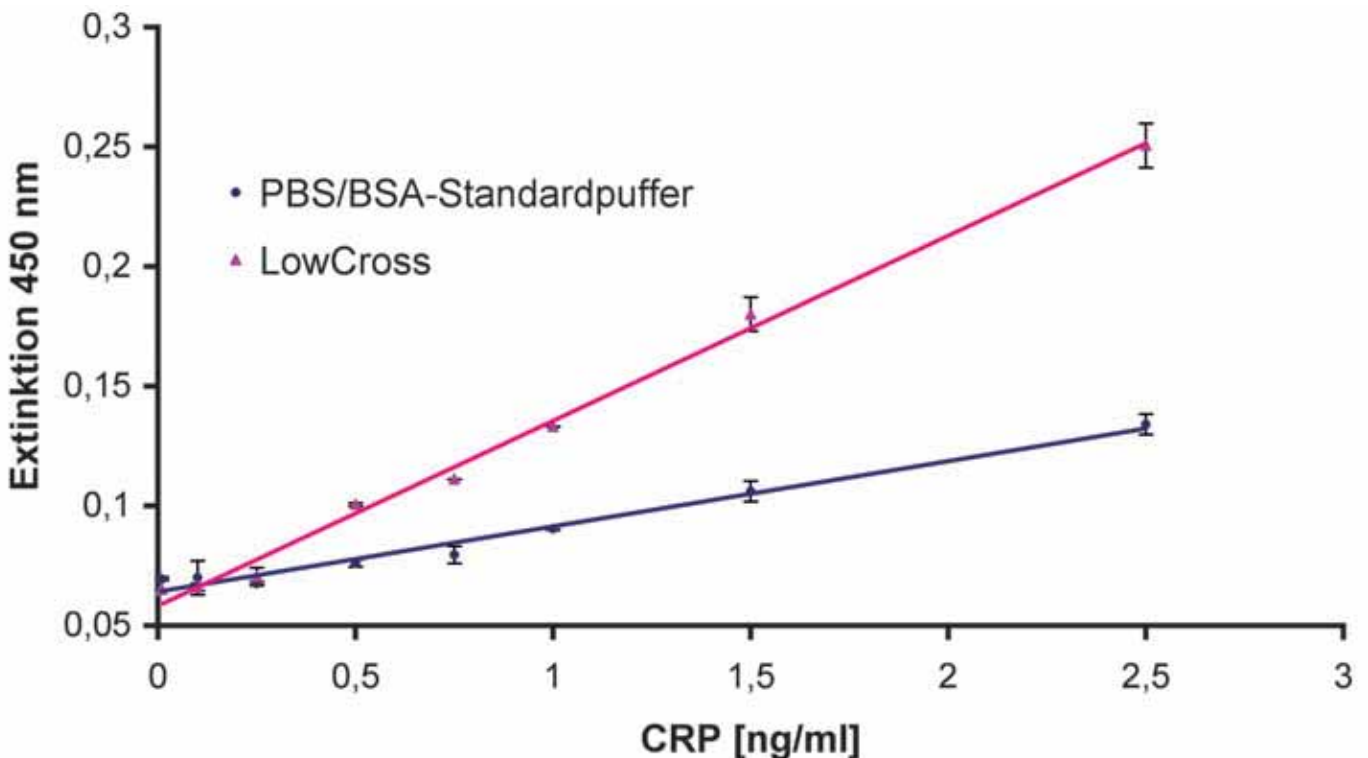


Abb. 4: ELISA von CRP in Kaninchenserum (durchgeführt von A. Zellmer, CANDOR Bioscience, Münster). LowCross-Buffer verbessert die Sensitivität durch eine Aufhebung eines Matrixeffekts.

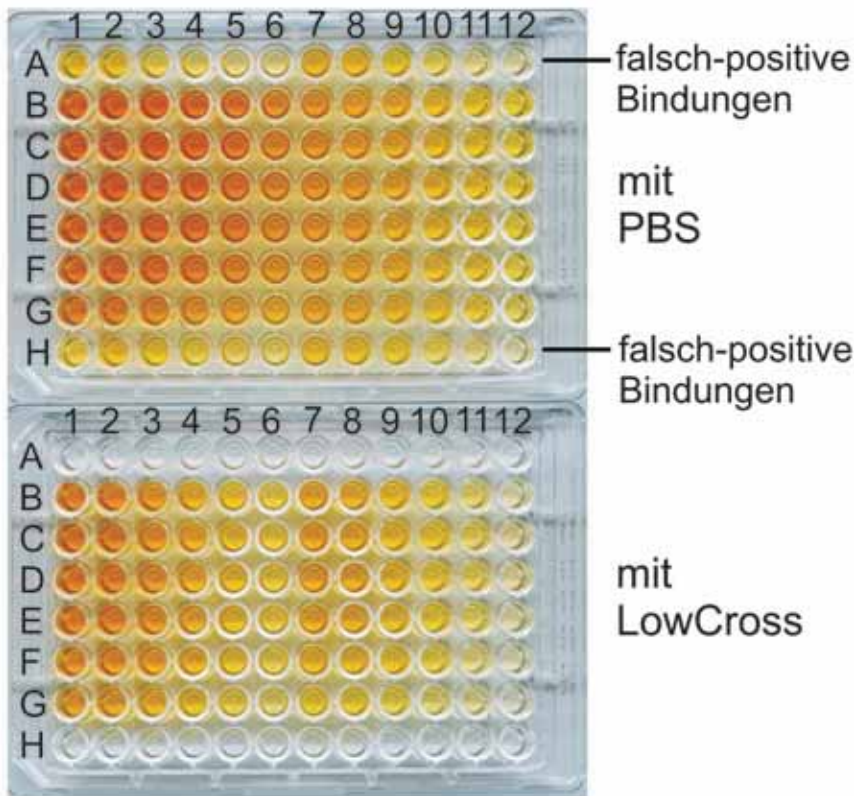


Abb. 5: Verhindern falsch-positiver Bindungen (Spezifitätskontrolle Reihe A1-12 bzw. Leerwertkontrolle H1-12) durch LowCross-Puffer bei einem ELISA gegen Meerschweinchen-IgG (durchgeführt von Dr. C. Specht, PARA Bioscience, Gronau).

Sekundärantikörper verdünnt wurde, mit LowCross-Puffer, konnten die unerwünschten Bindungen derart reduziert werden, daß ausschließlich die erwünschten Cytokeratine im Molekulargewichtsbereich von 56 bis 60 kDa gefärbt wurden.

Ein Beispiel, wie sich ein Matrixeffekt bei einem ELISA auswirken kann, ist in Abbildung 4 gezeigt. Mit diesem Modellsay (entwickelt von CANDOR Bioscience, Münster) wurde gezielt ein Matrixeffekt induziert. Hierzu wurde Kaninchenserum als Matrix verwendet, das mit humanem C-reaktiven Protein (CRP, Biotrend, Köln) in definierten Konzentrationen versetzt wurde. Als Fängerantikörper wurde Clone C2 (Biotrend, 1 µg/ml Coating-Konzentration in PBS), als Detektor biotinylierter Clone C6 (Biotrend, Arbeitskonzentration 2 µg/ml) verwendet. Die gespiketen Serum-Proben wurden entweder mit einem PBS-BSA-Puffer oder mit LowCross-Puffer 1:2 verdünnt und für den ELISA eingesetzt. Die Detektion erfolgte über NeutrAvidin™-Horseradish peroxidase conjugated (Pierce, Arbeitskonzentration 0,05 µg/ml in PBS-BSA-Puffer) mit ImmunoPure®TMB-Substrat (Pierce).

Ein Matrixeffekt, dessen genaue molekulare Ursache nicht bekannt ist, führt zu einer Kalibrationsgeraden mit schlechter Sensitivität. CRP ist aufgrund seiner physiologischen Funktion in der Lage, an sehr viele Proteine und Substanzen (Scavenger

Funktion des CRP) zu binden, wodurch wahrscheinlich in diesem Falle die Erreichbarkeit der Epitope für die Antikörper erschwert wird. Vermutlich liegt ein Störeffekt vor, wie er in Abbildung 1 (L) schematisch dargestellt ist, obwohl Störeffekte, wie in Abb. 1 (I-K) dargestellt sind, nicht ausgeschlossen werden können. LowCross-Puffer wiederum verhindert die Bindung des CRPs an endogene Substanzen des Kaninchensera und verbesserte so die Sensitivität der Kalibrationsgeraden um den Faktor 3.

Abbildung 5 ist ein Beispiel eines ELISAs gegen Immunglobulin aus Meerschweinchen (entwickelt von PARA Bioscience, Gronau), der für immuntoxikologische Studien mit Meerschweinchen eingesetzt wird, bei dem falsch-positive Bindungen in der Spezifitätskontrolle (Reihe A1-A12) sowie beim Leerwert (H1-H12) die Interpretation und Auswertung vereitelten. Die Verwendung von LowCross-Puffer verhinderte die falsch-positiven Bindungen und ermöglichte zudem den Nachweis der Konzentrationsabhängigkeit in den Reihen B bis G 1-6 bzw. B bis G 7-12.

Als Fänger wurde Goat-anti-guinea-pig-IgG F(ab')₂ und als Detektor Goat-anti-guinea-pig-IgG (Fc_γ), biotinyliert (beide von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Konzentrationsbereiche je 0,31 bis 10 µg/ml in PBS) verwendet. Das Meerschweinchen-IgG wurde entweder in LowCross-Puffer

oder in PBS verdünnt (Bereich 1-6 50 ng/ml, Bereich 7-12 10 ng/ml). Als Blockierungspuffer wurde PBS-BSA-Puffer verwendet. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-Peroxidase (Sigma) und ortho-Phenylendiamin (Sigma).

Fazit

Das Phänomen der Störeffekte bei Immunoassays ist so alt wie die methodische Verwendung von Antikörpern für bioanalytische und diagnostische Zwecke. Im Laufe der vergangenen 30 Jahre wurden zahlreiche molekulare Ursachen gefunden und deren Störungsmechanismen untersucht, was wiederum die Entwicklung von Vermeidungsstrategien förderte. Mit dem heutigen Stand der Technik lassen sich viele Störeffekte minimieren, und hierzu leistet der LowCross-Puffer einen wesentlichen Beitrag. Neuartig ist, daß nun verschiedene Störeffekte mit unterschiedlichen molekularen Ursachen minimiert werden können und LowCross-Puffer bei unterschiedlichen Immunoassays anwendbar ist. Die hier gezeigten Ergebnisse sind ein Ausschnitt aus unterschiedlichen Störeffekten bei unterschiedlichen Methoden, die mit LowCross-Puffer minimiert oder vermieden werden konnten. Ebenfalls konnten Störeffekte durch HAMAs und Rheumafaktoren, unspezifische Bindungen bei immunhistochemischen Anwendungen sowie falsch-positive Bindungen bei Immuno-PCR, durch LowCross-Puffer verhindert werden. Insgesamt können nun zeit- und kostenaufwendige Optimierungsstrategien verkürzt und vereinfacht werden, wobei gleichzeitig eine Verbesserung der Ergebniszuverlässigkeit erreicht wird.

Literatur

- [1] Jerne, N.K., *Science* 229 (1985), 1057-1059
- [2] Kaplan, I.V., Levinson, S.S., *Clinical Chemistry* 45:5 (1999), 616-618
- [3] Miller, J.J., *Clinical Laboratory International* 28, 2 (2004), 14-17
- [4] Selby, C., *Ann Clin Biochem* 36 (1999), 704-721
- [5] Patton, W.F., *Electrophoresis* 21 (2000), 1123-1144
- [6] MacBeath, G., *Nat. Genet.* 32 (2002), 526-532
- [7] Kusnezow, W., Hoheisel, J.D., *J. Mol. Recognit.* 16 (2003), 165-176
- [8] Miller, J.J., Valdes, R.Jr., *J Clin Immunoassays* 15 (1992), 97-107
- [9] Wood, W.G., *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 205 (1991), 105-112
- [10] Kricka, L.J., *Clinical Chemistry* 45:7 (1999), 942-956
- [12] Span, P.N., Grebenchtchikov N., Geurts-Moespot, J., Sweep, C.G.J., *Clinical Chemistry* 49:10 (2003), 1708-1709
- [13] Gallagher, S., *Immunoblot Detection*, in: *Current Protocols in Protein Science*, John E. C. et al., eds., 1995, John Wiley & Sons

Korrespondenzadresse

Dr. Peter Rauch
 CANDOR Bioscience GmbH
 Mendelstr. 7
 48149 Münster
 Tel.: +49-(0)251-980 2879
 Fax.: +49-(0)891-488 299 616
 eMail: p.rauch@candor-bioscience.de
 www.candor-bioscience.de

Assayentwicklung

Immunoassays: Entwicklung und optimierte Puffer

Dr. Peter Rauch, Dr. Tobias Polifke, CANDOR Bioscience GmbH, Münster

Zu den Immunoassays gehören Western Blots, RIA, Immuno-PCR, Proteinchips und Immunhistochemie genauso wie der allseits bekannte ELISA. Die Pufferauswahl wird hierbei häufig vernachlässigt, ist aber ganz wesentlich für die analytische Zuverlässigkeit von Immunoassays. Die Entwicklung guter ELISAs erfordert zudem eine zielgerichtete Vorgehensweise und ein entsprechend erfahrenes Team.

Key Words: ELISA-Entwicklung, Pharmaforschung, Diagnostik

CANDOR Bioscience entwickelt ELISAs vor allem für Kunden aus der Pharmaforschung und der diagnostischen Industrie. Zunächst sammelte das Gründerteam über Jahre hinweg Erfahrungen in der Auftragsentwicklung an einem industrienahe Forschungsinstitut. Aufgrund der positiven Erfahrungen in der dortigen Arbeitsgruppe „Assay development“ gründete Dr. Rauch mit seinem Team die Firma CANDOR Bioscience. CANDOR ist sowohl mit seinen innovativen Produkten als auch mit kundenspezifischen Dienstleistungen klar fokussiert auf Immunoassays. Das ermöglicht optimale Qualität bei gutem Preis-Leistungs-Verhältnis, verbunden mit kompetenter Beratung zu allen Themen rund um Immunoassays.

Produkte

Die Produkte sind in allen Anwendungen von Immunoassays nutzbar. Sie helfen sowohl die analytische Zuverlässigkeit als auch die Wirtschaftlichkeit zu erhöhen. Dies angefangen von der Universitätsforschung über die Pharma-Entwicklung bis hin zur Routine in diagnostischen Laboratorien. Der innovative LowCross™-Buffer reduziert Kreuzreaktivitäten, Interferenzen und Matrix-Effekte, die bei allen Immunoassays insbesondere bei Blut-, Serum- und Gewebeprobe auftreten können. Die weiteren Produkte der CANDOR Bufferline gestalten als ready-to-use-Lösungen die Arbeit des



Das Gründerteam der CANDOR Bioscience: Dr. Tobias Polifke, Angela Zellmer, Dr. Peter Rauch (v.l.n.r.)

Anwenders einfacher, sicherer und vor allem effizienter – also kostengünstiger.

Dienstleistungen

Das Team von CANDOR besitzt langjährige Erfahrung in der Entwicklung, Optimierung und Validierung von ELISAs. Der Kunde erhält neben dem systematisch optimierten Assay, detaillierte Arbeitsanweisungen (SOP) und Beratung rund um Immunoassays. Im Bereich der Immunhistochemie bietet CANDOR neben Schnitten, histologischer Begutachtung und der 3-D-Rekonstruktion vor allem histologische und zytochemische Färbungen an – auch als Mehrfach-Färbungen zur Detektion verschiedener Analyte in einem Schnitt.

Ansprechpartner

Dr. Peter Rauch, Tel.: +49-(0)251-980 28 79
www.candor-bioscience.de

