

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien wurden für die Puffer der einzelnen Verfahren verwendet.

Citric Acid, 1M (citric acid – 19%, water balance)  
[LabChemInc; Pittsburgh, PA]

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) powder  
[Gibco™ Invitrogen Corporation; Grand Island, NY]

Instant Nonfat Dry Milk  
[Dist. By Stop&Shop Supermarket Company; Boston, MA]

Polyoxyethylene 20-Sorbitan Monolaurate (Tween®20)  
[Fisher Scientific Company; Fair Lawn, NY]

Sodium Carbonate – Anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )  
Sodium Bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )  
[Fisher Scientific Company; Fair Lawn, NY]

Sodium Hydroxid ( $\text{NaOH}$ ) Pellets (min. 98%)  
[Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO]

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)  
( $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ ) Electrophoresis Reagent  
[Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO]

Trizma® Base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) Reagent Grade  
[Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO]

Die weiteren Chemikalien werden bei den entsprechenden Methoden erwähnt.

### 2.2. Puffer

PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2):

150	mM	NaCl
3	mM	KCl
1	mM	$\text{Na}_2\text{HPO} \times 2 \text{H}_2\text{O}$
1	mM	$\text{NaH}_2\text{PO} \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Die weiteren Puffer werden bei den entsprechenden Methoden erwähnt.

## 2.3. Allgemeine proteinchemische Verfahren

### 2.3.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate 450ml [Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA].

Der Assay beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (1976), bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen führen. Das eingesetzte Coomassie-Brilliantblau G-250 hat in seiner an Protein gebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 595nm. Als Standard wurde Bovinalbumin (1mg/ml, Grade V, [Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO]) verwendet. Die Proteinbestimmung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und ermöglichte die Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich einer Bovinalbumin-Eichgerade von 1-20µg Protein/ml (Microassay) bzw. 0,2-1,4mg/ml (Standardassay).

### 2.3.2. Dialyse und Konzentration

Das Entsalzen von Proben, die eingengt oder umgepuffert werden sollen, ist oft im Anschluss an chromatographische Verfahren nötig.

Zur Dialyse von Proben mit Volumina ab ca. 2ml wurden Dialyseschläuche [Visking, Serva; Heidelberg] eingesetzt, während Proben mit kleineren Volumina mittels Zentrifugation in Centrikon-Röhrchen [Amikon; Denver, MA, USA] nach Vorschrift dialysiert wurden.

Zur Konzentrierung wurden die Proteinproben lyophilisiert oder mittels Zentrifugation in Centrikon-Röhrchen eingengt. Mit Centrikon-Röhrchen werden Dialyse und Einengen gleichzeitig erreicht.

## 2.4. Elektrophoretische Verfahren

### 2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### Puffer A (Protogel):

30,0% (w/v) Acrylamid  
0,8% (w/v) Bis

#### Puffer B (Trenngelpuffer):

1 M Tris-HCl (pH 8.8)

#### Puffer C (SDS):

10,0% (w/v) SDS

#### Puffer D (Sammelgelpuffer):

0,375 M Tris-HCl (pH 6.8)

#### APS:

10,0% (w/v) Ammoniumpersulfat

#### Probenpuffer (5x):

300 mM Tris-HCl (pH 6.8)  
0,015% (w/v) Bromphenolblau  
50,0% (w/v) Glycerin  
15,0% (w/v) SDS

#### Laufpuffer:

192 mM Glycerin  
25 mM Tris-HCl (pH 6.8)

<u>Gelansätze:</u>		<u>Trenngel (je 8,4 ml <math>\approx</math> 2 Minigele)</u>			<u>Sammelgel</u>
		<u>6%</u>	<u>7,5%</u>	<u>10%</u>	
Puffer A	(ml)	1,7	2,1	2,8	0,325
Puffer B	(ml)	3,1	3,1	3,1	-
Aqua bidest.	(ml)	3,3	2,6	2,1	1,6
Puffer C	( $\mu$ l)	83	83	83	31,25
Puffer D	(ml)	-	-	-	1,05
APS	( $\mu$ l)	208	208	217	156
TEMED	( $\mu$ l)	6	6	6	4

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) durchgeführt.

Es wurden ausschließlich kleine Gele (9x8cm bei 0,75mm Dicke, Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell [Bio-Rad Laboratories GmbH; Germany]) verwendet.

Die Lösungen für das Trenngel (etwa 4ml pro Minigel) wurden bei Raumtemperatur gemischt, bis etwa 2cm unter den Rand der zusammengebauten Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Butanol mit Aqua bidest. entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Durch die Benutzung eines Kammes konnten im Sammelgel Auftragsaschen (in der Regel zehn) für die Proben geformt werden.

Die Proben wurden mit dem (nicht-reduzierenden) Probenpuffer versetzt und unerhitzt in die Taschen des polymerisierten Sammelgels gefüllt (etwa 20-30 $\mu$ l Ansatz pro Tasche). Jeweils eine Bahn pro Gel wurde mit einem vorgefärbten Proteinmarker beschickt.

Die Gele wurden in die mit Laufpuffer auf eine Höhe von etwa 3cm gefüllte Elektrophoresekammer eingebaut, und die innere Kammer wurde vorsichtig mit Laufpuffer gefüllt, bis die Oberkante der Gele überschichtet waren. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 200V gefahren (Power PAC 3000, Power PAC 200 [Bio-Rad Laboratories GmbH; Germany]), bis die Bromphenolblaukante das untere Ende des Polyacrylamidgels erreicht hatte (in der Regel etwa 40min).

#### **2.4.2. Western-Blotting**

Der Transfer von elektrophoretisch-aufgetrennten Proteinen auf Blotmatrizen wurden mittels Trans-Blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell [Bio-Rad Laboratories GmbH; Germany] durchgeführt.

##### Transferpuffer:

25 mM Tris  
114 mM Glycin  
10,0% (v/v) Methanol

Nach Start der SDS-PAGE wurde die Nitrocellulose-Membran [Schleicher und Schüll; Düsseldorf] in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot-Sandwich wurde nach Beendigung der Elektrophorese luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Nitrocellulose zur Anode (bei Trans-Blot® SD unten) und das Gel zur Kathode (bei Trans-Blot® SD oben) gerichtet war. Der Transfer erfolgte bei einem Gel mit konstanter Spannung von 18V für 18min bzw. bei zwei Gelen mit 24V für 24min.

## 2.5. Färbemethoden

### 2.5.1. Färbung von PAGE-Gelen mit Coomassie-Blau G-250

#### Färbelösung:

40,0% (v/v) Methanol  
 10,0% (v/v) Essigsäure  
 0,1% (w/v) Serva Blue G-250

#### Entfärbelösung:

40,0% (v/v) Methanol  
 10,0% (v/v) Essigsäure

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel für 30min bei Raumtemperatur in Färbelösung langsam geschüttelt. Das gefärbte Gel wurde anschließend in Entfärbelösung ca. 3h geschüttelt, wobei die Entfärbelösung zweimal gewechselt wurde.

### 2.5.2. Färbung von Blotmatrizen mit Ponceau-Rot

Die Färbung wurde, wie von Salinovich und Montelaro (1986) beschrieben, durchgeführt.

#### Färbelösung:

0,1% (w/v) Ponceau-Rot  
 1,5% (w/v) Trichloressigsäure  
 1,5% (w/v) Sulfosalicylsäure

#### Entfärbelösung:

5,0% (v/v) Essigsäure

Nach Beendigung des Blots wurde die Nitrocellulose 5min in Ponceau-Rot-Färbelösung (1:10 mit Aqua bidest. verdünnt) gefärbt und anschließend mit Entfärber entwickelt. Der Erfolg des Proteintransfers kann so überprüft werden. Anschließend wurde die Membran mit PBS vollständig entfärbt.

## 2.6. Immunologische Verfahren

### 2.6.1. Antikörper

Folgende bereits charakterisierte Antikörper, die Inter- $\alpha$ -Inhibitor erkennen, wurden in dieser Arbeit verwendet: der monoklonale Antikörper 69.26 (Mouse-Anti-I $\alpha$ I-IgG) und das polyklonale Antiserum R16 (Rabbit-Anti-I $\alpha$ I-Polyklonal). Beide Antikörper stammen von Dr. Yow-Pin Lim (Dept. of Medical Oncology, RI Hospital, Providence, RI, USA).

Außerdem wurden Goat-Anti-Mouse Ig's HRP-Conjugate (1mg/ml [Biosource International; Camarillo, CA]) und ELISA Grade Streptavidin HRP-Conjugate (1mg/ml [Biosource International; Camarillo, CA]) verwendet.

### 2.6.2. Biotinylierung

Der gereinigte PAb R-16 wurde konzentriert (50µg in 325µl) und anschließend mit 50µl Biotin-Ester [Sigma-Aldrich; St. Louis, MO] nach Herstellerangaben biotinyliert.

Um einen zu starken Hintergrund zu vermeiden, wurde die biotinylierte PAb R-16-Lösung über eine Gelfiltration (Superose 6 [Amersham Biosciences]) von ungebundenem Biotin gereinigt.

### 2.6.3. Immunblot

Nach dem Transfer aus Polyacrylamid-Gelen auf Blotmatrizen (s. 2.3.2.) sind die elektrophoretisch-aufgetrennten Proteine immunologischen Nachweisen durch Verwendung von spezifischen Primärantikörpern zugänglich. Die Primärantikörper, die an die auf der Nitrocellulose immobilisierten Antigene binden, werden dann in einem zweiten Schritt durch speziesspezifische Sekundärantikörper erkannt, an die ein Enzym (z.B. Peroxidase) kovalent gekoppelt ist. Durch Inkubation mit einem geeigneten Substrat kann dieses Enzym und damit der gesamte Immunkomplex visualisiert werden (Immunblot). Ein sehr empfindliches Substrat ist das Luminolreagenz, das bei katalytischer Umsetzung durch die Peroxidase chemoluminiszierende Lichtblitze ausstrahlt, deren Energie dazu ausreicht, Röntgenfilme anzuschwärzen.

#### Waschpuffer:

0,1% (v/v) Tween 20  
in PBS (pH 7.2)

#### Blockierungspuffer:

5,0% (w/v) Instant Nonfat Dry Milk  
in PBS (pH 7.2)

Entweder direkt nach dem Proteintransfer oder nach Entfärbung der Ponceau-Färbung wurde die Nitrocellulose mit Blockierungspuffer bei Raumtemperatur für 60min geschüttelt, danach gründlich mit dem Waschpuffer gereinigt und anschließend für 60min bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert. Der monoklonale Antikörper (MAb 69.26) wurde 1:2000 in Waschpuffer verdünnt bzw. MAb-Zellkulturüberstand unverdünnt eingesetzt. Im Anschluss wurde viermal 5min mit Waschpuffer gereinigt und danach für 60min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Goat-Anti-Mouse Ig's HRP-Conjugate; 1mg/ml; [Biosource International; Camarillo, CA]) 1:10.000 in Waschpuffer verdünnt inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen (viermal 5min in Waschpuffer) wurde die Nitrocellulose entweder für 1min mit Pierce DAB-Kit (4,5ml 1x + 0,5ml 10x; [Pierce; Rockford, IL]) inkubiert, wobei es direkt auf der Nitrocellulose zu einer Darstellung der Proteinbanden kam, oder es wurde für 5min mit Pierce Chemiluminescence (1,5ml A + 1,5ml B + 1,0ml dH<sub>2</sub>O; [Pierce; Rockford, IL]) inkubiert, anschließend wurde die Nitrocellulose luftblasenfrei in eine Plastikhülle gepackt und in der Dunkelkammer zügig und ohne zu verwackeln auf einen Kodak XR-5 Film aufgelegt. Üblicherweise wurden mehrere Expositionszeiten (5s, 10s, 15s und 10min) durchgeführt, um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu erreichen. Mit der 10min-Exposition wurde versucht, möglicherweise sehr stark verdünnte Proteinproben im Rahmen der Proteinreinigung mittels chromatographischer Verfahren (HPLC) zur Darstellung zu bringen. Der Film wurde anschließend durch übliche Röntgenfilmentwickler maschinell entwickelt.

## 2.6.4. ELISA

### Kopplungspuffer:

50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.1)

### Blockierungspuffer:

3,0% (w/v) Instant Nonfat Dry Milk  
in PBS (pH 7.2)

### Verdünnungspuffer:

PBS (pH 7.2)

### Waschpuffer (PBS-T):

0,05% (v/v) Tween 20  
in PBS (pH 7.2)

### Substrat:

1-Step™ ABTS (2,2-azino-di(3-ethylbenzthiazoline) sulfonic acid) [Pierce; Rockford, IL]

### Platten:

Microtiter® Polystyrene Base Immunoassay Plates [Dynex Technologies; Helsinki, Finland]

### Inkubator:

Model 1000 [Robbins Scientific® Co.; Sunnyvale, CA]

### Vortexer:

Fisher Vortex Genie 2™ Model G 560 [Scientific Industries; Bohemia, NY]

### Shaker:

MS1 Minishaker [IKA® Works; Wilmington, NC]

### Spektrometer:

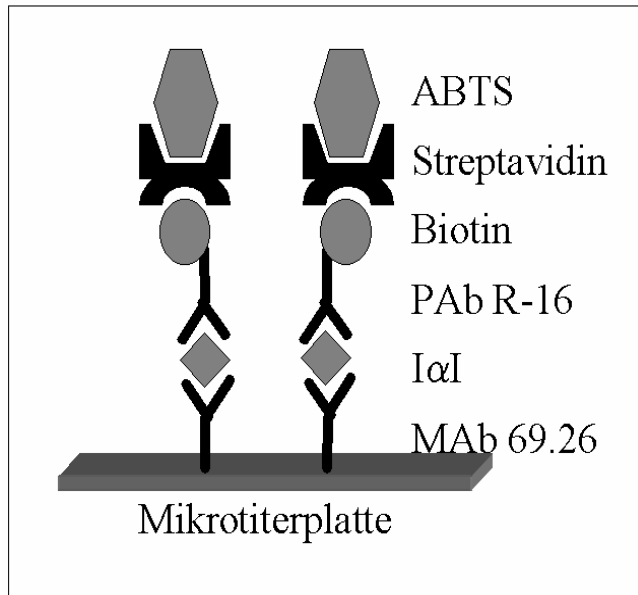
Bio-Kinetics Reader, Microplate, EL 312 [BioTek Instruments; Winooski, VT]

### 2.6.4.1. Kompetitions-ELISA

Inter- $\alpha$ -Inhibitormoleküle in einer Konzentration von 4 $\mu$ g/ml wurden in Kopplungspuffer (100 $\mu$ l/Well) über Nacht bei Raumtemperatur an den Boden einer 96-Well Mikrotiterplatte (Microtiter® Polystyrene Base Immunoassay Plates [Dynex Technologies; Helsinki, Finland]) gekoppelt. Am Morgen wurde die Platte dreimal für 3min mit 200 $\mu$ l PBS-T/Well gewaschen. Nicht-besetzte Bindungsstellen in der Polyesterplatte wurden mit jeweils 100 $\mu$ l/Well Blockierungspuffer abgesättigt (1h bei 37°C) und die Platte dann viermal für 6min mit 200 $\mu$ l PBS-T/Well gewaschen. Anschließend wurden die Löcher (=Wells) der Mikrotiterplatte für 1h bei 37°C mit jeweils 50 $\mu$ l des zu untersuchenden Serums (1:100 vorverdünnt) bzw. des gereinigten Inter- $\alpha$ -Inhibitor (10 $\mu$ g/ml) in Verdünnungsreihen von 1:20 bis 1:1280 zusammen mit 50 $\mu$ l primärem Antikörper (MAb 69.26, 1:50 in PBS verdünnt) inkubiert. Nach neunmaligem Waschen für je 3min mit Waschpuffer wurde der ELISA für 1h bei 37°C mit 100 $\mu$ l/Well sekundärem Antikörper (Goat-Anti-Mouse Ig's HRP-Conjugate [Biosource International; Camarillo, CA]; 1:1000 in PBS verdünnt) inkubiert, erneut neunmal für je 3min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit je 100 $\mu$ l/Well 1-Step™ ABTS [Pierce; Rockford, IL] entwickelt. Die Extinktion der Färbung wurde nach kurzem Warten im ELISA-Reader (Bio-Kinetics Reader, Microplate, EL 312 [BioTek Instruments; Winooski, VT]) bei 405nm gemessen.

### 2.6.4.2. Sandwich-ELISA

#### Aufbau:



#### **Schema 1: Darstellung des Sandwich-ELISA.**

Der MAb 69.26 wird an den Boden der Mikrotiterplatte gekoppelt. Das in der Messprobe enthaltene I $\alpha$ I bindet spezifisch an den MAb 69.26. Der biotinylierte PAb R-16 geht dann eine spezifische Bindung mit dem bereits über MAb 69.26 an die Platte gebundenen I $\alpha$ I ein. HRP-gekoppeltes Streptavidin bindet an das an PAb R-16 gekoppelte Biotin. Das nachfolgend hinzugegebene Substrat (1-Step™ ABTS) wird je nach Konzentration der Peroxidase mehr oder weniger zu einem Farbstoff umgesetzt. Die Färbung kann dann durch eine Extinktionsmessung quantifiziert werden.

Der MAb 69.26 (50 $\mu$ l/Well, 1:100 in Kopplungspuffer verdünnt) adsorbierte über Nacht bei Raumtemperatur an den Boden einer 96-Well Mikrotiterplatte (Microtiter® Polystyrene Base Immunoassay Plates [Dynex Technologies; Helsinki, Finland]). Am Morgen wurde die Platte viermal für 3min mit 200 $\mu$ l PBS-T/Well gewaschen. Nicht-besetzte Bindungsstellen in der Polyesterplatte wurden mit jeweils 100 $\mu$ l/Well Blockierungspuffer abgesättigt (1h bei 37°C), und die Platte wurde dann viermal für 3min mit 200 $\mu$ l PBS-T/Well gewaschen. Anschließend wurden die Löcher der Mikrotiterplatte für 1h bei 37°C mit jeweils 50 $\mu$ l des zu untersuchenden Serums (1:500 in PBS verdünnt) inkubiert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von 0,4-2,8 $\mu$ g/ml gereinigtem Inter- $\alpha$ -Inhibitor verwendet. Nach sechsmaligem Waschen für je 3min mit Waschpuffer wurde der ELISA für 1h bei 37°C mit 50 $\mu$ l/Well biotinylierten PAb R-16 (1:750 in PBS verdünnt) inkubiert, erneut sechsmal für je 3min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit je 50 $\mu$ l ELISA Grade Streptavidin HRP-Conjugate [Biosource International; Camarillo, CA] für 1h bei 37°C inkubiert. Nach achtmaligem Waschen (je 3min) mit PBS-T wurde mit je 100 $\mu$ l/Well 1-Step™ ABTS [Pierce; Rockford, IL] entwickelt. Die Extinktion des Farbstoffes wurde nach einer Inkubationszeit von 45min im ELISA-Reader (Bio-Kinetics Reader, Microplate, EL 312 [BioTek Instruments; Winooski, VT]) bei 405nm gemessen.

## 2.7. Chromatographische Verfahren (HPLC)

Die HPLC-Anlage (Bio Logic Controller, Bio Logic Workstation) wurden von der Firma Bio-Rad [Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA] bezogen. Die HPLC-Säulen wurden entweder fertiggepackt bezogen oder im eigenen Labor gefüllt. Alle Chromatographieschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.7.1. Ionenaustausch (DEAE)

Die Anionenaustausch-Chromatographie mittels DEAE wurde in dieser Arbeit als erster Schritt der Inter- $\alpha$ -Inhibitor-Reinigung durchgeführt.

Säulenmaterial: CIM (Convective Interaction Media®) DEAE Disk Monolithic Column, 2disks [BIA Separations d.o.o.; Ljubljana, Slovenia]

Laufpuffer:

20 mM Tris (pH 7.2)

Elutionspuffer:

20 mM Tris (pH 7.2)  
500 mM NaCl

Die Probe (100 $\mu$ l humanes Serum mit destilliertem Wasser auf 1ml verdünnt) wurde nach Äquilibration der Säule mit dem Laufpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 2ml/min aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden in einem vierstufigen Gradienten mit 75mM, 150mM, 225mM und 500mM NaCl eluiert. Zur Kontrolle der Elutionsfraktionen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Für den anschließenden chromatographischen Reinigungsschritt wurden die Eluate, in denen Inter- $\alpha$ -Inhibitor nachgewiesen wurde, vereinigt und mittels Zentrifugation in Centrikon-Röhrchen [Amicon; Denver, MA, USA] entsalzt und eingengt.

### 2.7.2. Hydroxylapatit (HAC)

Die Hydroxylapatit-Chromatographie wurde als zweiter Reinigungsschritt durchgeführt.

Säulenmaterial: CHT Ceramic Hydroxyapatite, Type II, 25ml [Bio-Rad Laboratories GmbH; Germany]

Laufpuffer:

10 mM Phosphatpuffer (pH 6.8)

Elutionspuffer:

500 mM Phosphatpuffer (pH 6.8)

Die Probe (entsalzte und konzentrierte Eluate aus der DEAE-Chromatographie mit destilliertem Wasser verdünnt auf 5ml) wurde nach Äquilibration der Säule mit dem Laufpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 10mM bis 500mM Phosphatpuffer eluiert. Zur Kontrolle wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Für den anschließenden chromatographischen Reinigungsschritt wurden die Eluate, in denen Inter- $\alpha$ -Inhibitor nachgewiesen wurde, vereinigt, lyophilisiert und mittels Gelfiltration entsalzt.





#### 2.7.4.2. CNBr-Sepharose

Säulenmaterial: CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, 2ml [Amersham Biosciences; USA]

Aktivierungspuffer:  
1 mM HCl

Stoppuffer:  
0,2 M Tris (pH 8.0)

Laufpuffer:  
PBS

Elutionspuffer:  
0,1 M Zitronensäure (pH 2.4)

0,5g CNBr-aktivierte Sepharose wurde zweimal mit 1mM HCl-Lösung über eine Vakuumflasche aktiviert, wobei etwa 2ml Gel entstanden. Die aktivierte Sepharose wurde mit 11ml (320 $\mu$ g) MAb 69.26-Lösung auf einem Rotationsrad bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Suspension wurde für 3min bei 2000rpm zentrifugiert, sodass Überstand und Sepharose getrennt wurden. Im Anschluss wurde die Antikörperkonzentration mittels Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Protein-Assay (s. 2.1.3.) gemessen. Es konnte eine Kopplungsrate des MAb 69.26 an die Sepharose von 78% erreicht werden. Um weitere Bindungen an die Sepharose zu verhindern, wurde die Sepharose für 2h bei Raumtemperatur mit 4ml Stoppuffer geblockt. Die MAb 69.26-gekoppelte Sepharose wurde in eine Säule gepackt und durch den Elutionspuffer von nicht-kovalent gebundenen Proteine gereinigt.

Diese MAb 69.26-Sepharose-Säule wurde als letzter Schritt der Inter- $\alpha$ -Inhibitor-Reinigung eingesetzt.

Die Probe (entsalzte und konzentrierte Eluate aus der HAC-Chromatographie mit destilliertem Wasser verdünnt auf 1ml) wurde nach Äquilibration der Säule mit dem Laufpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min aufgetragen. Nach Spülen der Säule mit PBS wurden die gebundenen Proteine mit 0,1M Zitronensäure eluiert und das gesammelte Eluat direkt im Anschluss mit 1M Natronlauge (NaOH) auf einen pH von 7.4 gebracht, um eine Denaturierung des Inter- $\alpha$ -Inhibitors zu verhindern. Zur Messung der Antikörperkonzentration erfolgte die Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Protein-Assay (s. 2.1.3.).