

## Anhang A

### Quantitative Bestimmung von Antikörpern mit der Sequentiellen-Injektions-Analyse

#### A.1 Einführung

Am Beispiel der Extraktion und Bestimmung von Antikörpern mit Hilfe der Jet-Ring-Zelle wurde alternativ die Technik der Sequentiellen-Injektions-Analyse angewendet. Durch die qualitative und quantitative Analyse von Antikörpern können folgende Aussagen getroffen werden:

- Identifikation einer infektiösen Erkrankung,
- Art der infektiösen Erkrankung, aktuell oder chronisch,
- Erkennung, wie weit eine infektiösen Erkrankung fortgeschritten ist,
- Effekt von Medikamenten.

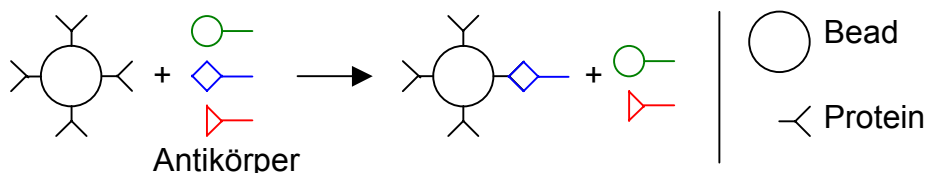
#### A.2 Bekannte Analysen-Methode

Eine Technik zur Bestimmung von Antikörpern besteht darin, daß sich diese oder Antigene an festen Oberflächen absorbieren lassen, die aus Kunststoffen bestehen [102 bis 104]. Für diesen Zweck sind Mikrotiterplatten kommerziell erhältlich. Auf diesen können nun z.B. bestimmte Antigene absorbiert werden, an die sich wiederum spezifische Antikörper koppeln lassen. Die sich hieraus ergebene Vielfalt der Kopplungsmöglichkeiten bewirkt eine Vielzahl an Bestimmungsmethoden, wie z. B. die ELISA-Technik. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch speziell gestaltete Multikanal-Spektrophotometer.

Eine neue Möglichkeit, Antikörper zu bestimmen, ist die Sequentielle-Injektions-Analyse (SIA), die mit einer Jet-Ring-Zelle (J-R-Zelle) durchgeführt wird.

#### A.3 Prinzip der Antikörper-Bestimmung mit der Sequentiellen-Injektions-Analyse

An Beads, an denen sich bestimmte Proteine befinden, werden selektiv Antikörper gebunden:

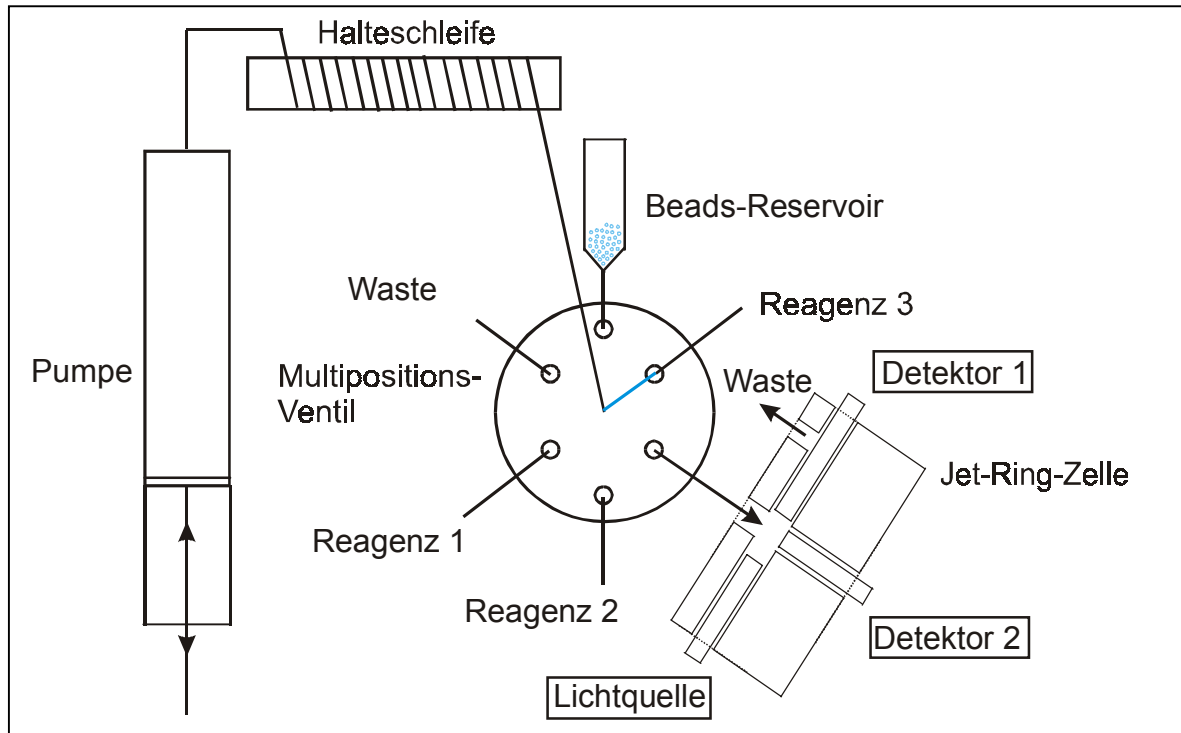


Während dieser Anreicherung der Antikörper an den Beads wird die Absorptions- bzw. die Fluoreszenzänderung der Beads gemessen.

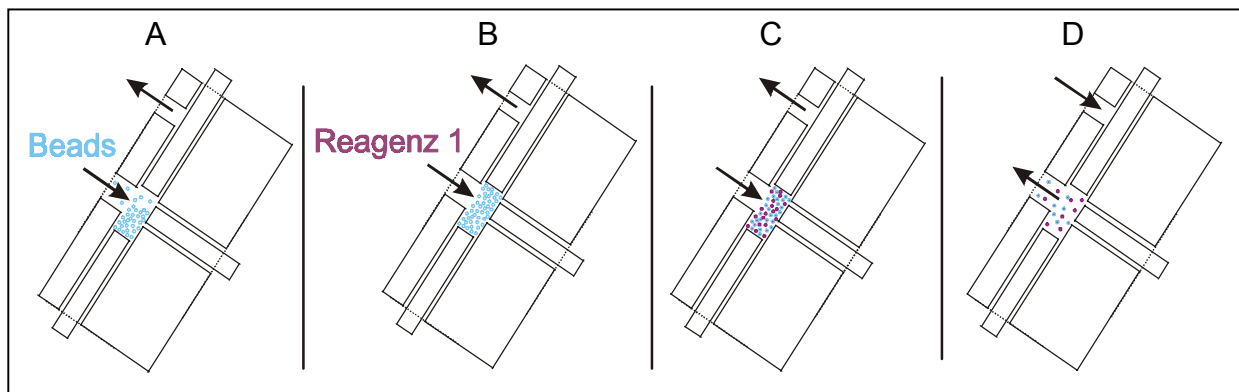
Anmerkung: Beads sind poröse Kügelchen, die aus unterschiedlichsten Polymer-Materialien bestehen können und einen Durchmesser von 45 µm bis 350 µm haben.

## A.4 Versuchsdurchführung

Der Aufbau für die Bestimmung von Antikörpern ist in Abb. A-1 und Abb. A-2 dargestellt.



**Abb. A-1.** Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung von Antikörpern mit der Sequentiellen-Injektions-Analyse und der Jet-Ring-Zelle.



**Abb. A-2.** Details der schematischen Darstellung zur Bestimmung der Antikörper.

Beschreibung des Versuchsablaufes anhand Abb. A-1 und Abb. A-2:

A: J-R-Zelle wird mit den Beads gefüllt, indem die Beads erst in die Halteschleife gesaugt und anschließend in die J-R-Zelle gepumpt werden.

B: Lösung mit den Antikörpern (Reagenz 1) wird durch die J-R-Zelle gepumpt.

C: Antikörper werden an den Beads gebunden.

D: Mit Antikörpern beladene Beads werden aus der J-R-Zelle in die Halteschleife gesaugt, und im Anschluß aus dem System entfernt.

Es wurden Sepharose Protein G-Beads verwendet. Dabei besitzt das Protein G an den Beads eine große Affinität zu dem benutzten Antikörper (Ziege Anti Maus IgG).

Da Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) an den Antikörpern gebunden ist, konnte man neben der Absorption auch die Fluoreszenz messen.

### A.5 Ergebnis und Auswertung

Drei unterschiedliche Messungen wurden durchgeführt:

a) Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 262 nm (Antikörper absorbieren Licht dieser Wellenlänge)

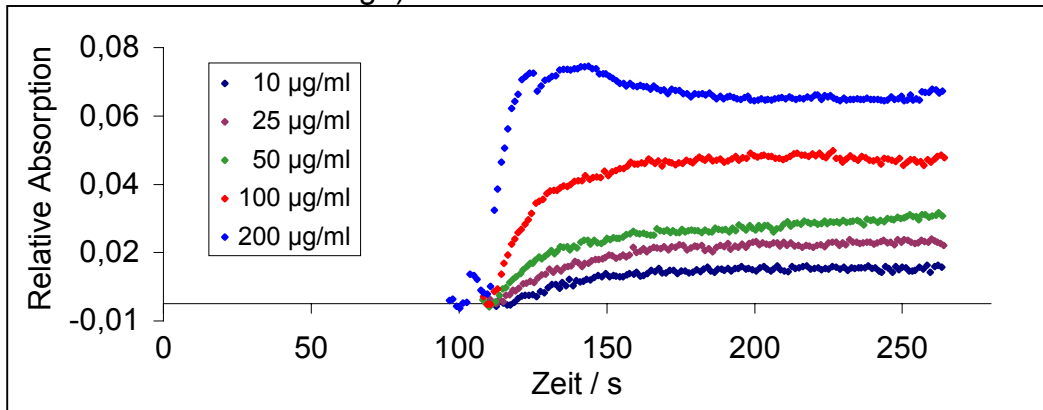


Abb. A-3. Absorptionsspektrum der Antikörper an den Beads.

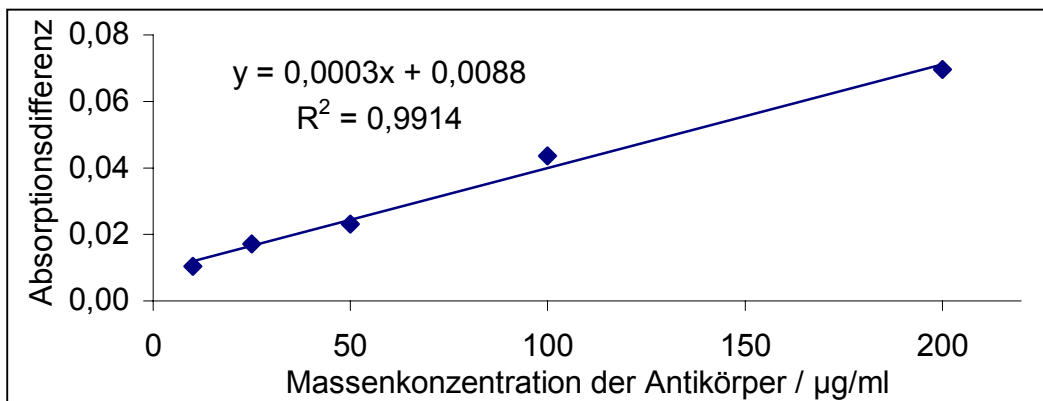


Abb. A-4. Kalibriergerade für die Bestimmung von Antikörpern durch Absorptionsmessungen.

b) Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 495 nm (FITC wird bei dieser Wellenlänge zur Emission angeregt)

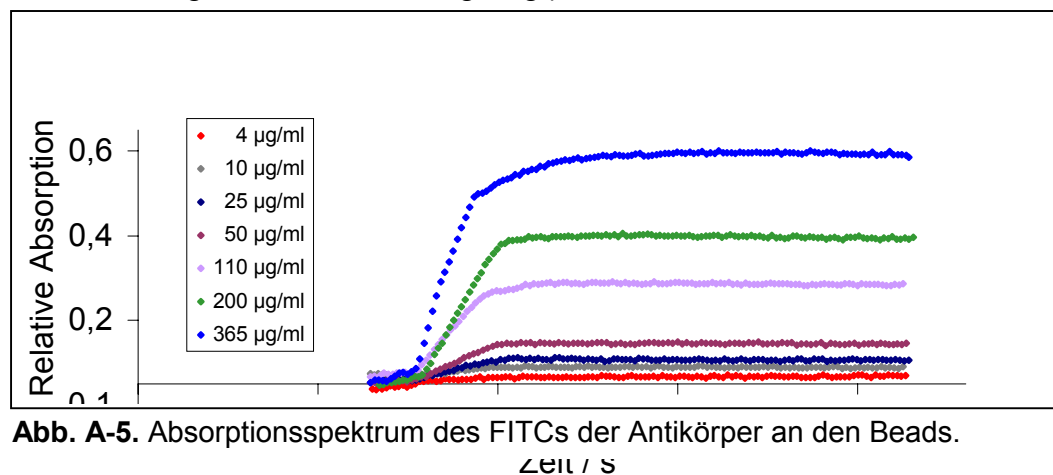
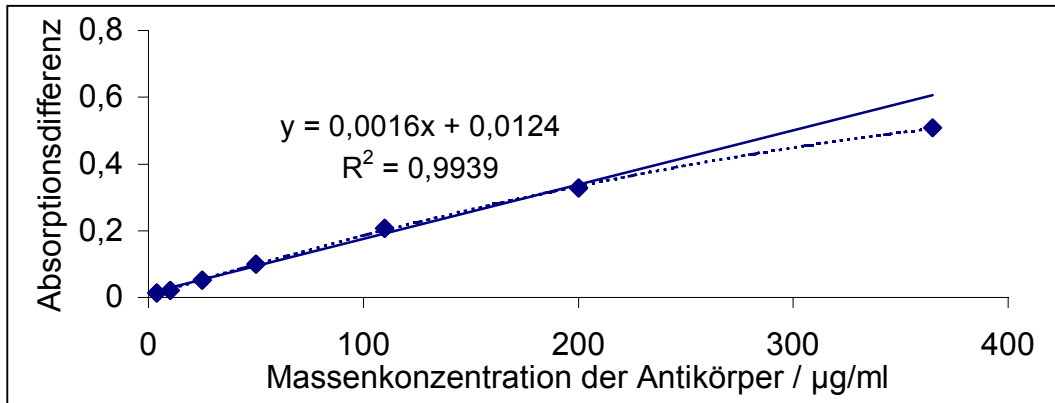


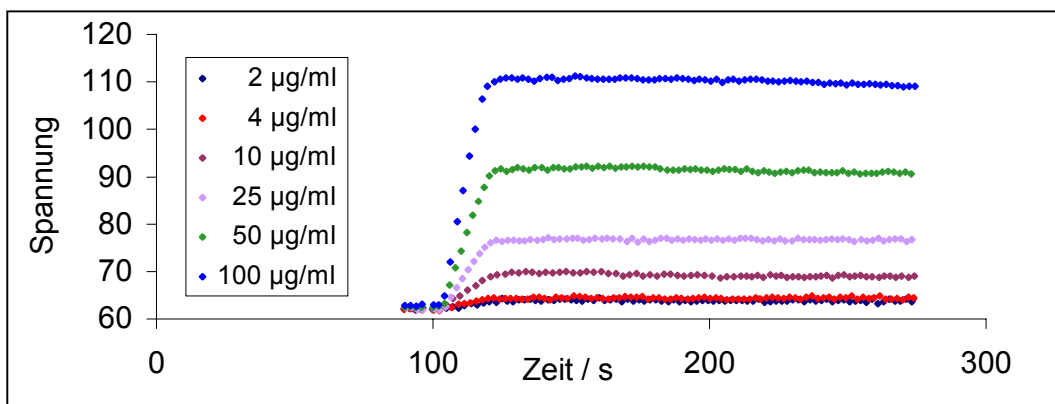
Abb. A-5. Absorptionsspektrum des FITCs der Antikörper an den Beads.

Zeit / s

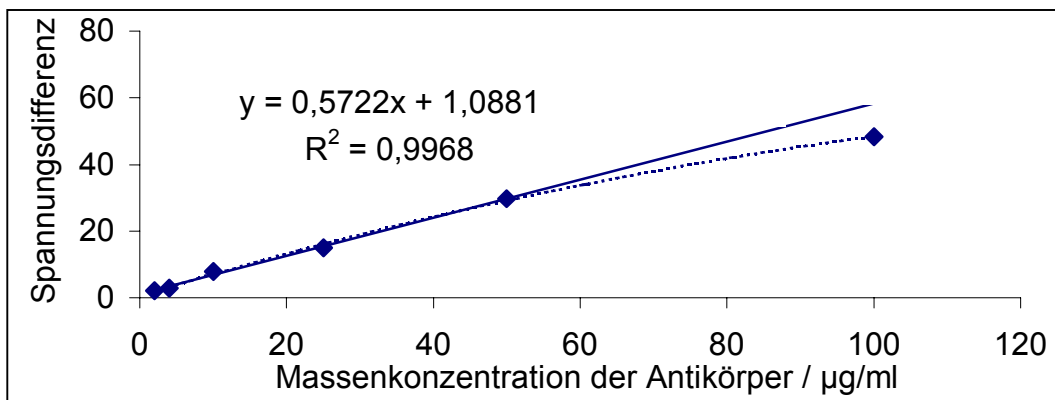


**Abb. A-6.** Kalibriergerade für die Bestimmung der Antikörper durch Absorptionsmessungen.

c) Fluoreszenzmessung bei einer Wellenlänge von 525 nm (angeregtes FITC emittiert Licht dieser Wellenlänge)



**Abb. A-7.** Fluoreszenzspektrum des FITCs der Antikörper an den Beads.



**Abb. A-8.** Kalibriergerade für die Bestimmung der Antikörper durch Fluoreszenzmessungen.

## A.6 Schlußfolgerung

Die hier beschriebenen Untersuchungen stehen noch am Anfang der Entwicklung. Es ist lediglich bewiesen worden, daß die Bestimmung von Antikörpern mit diesem System möglich ist. Vorteile dieses Verfahrens sind die Automatisierbarkeit sowie ein geringes Probevolumen von etwa 25 µl.