

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A, Arbeitsplatz 5
Partner: Martin [REDACTED]

Versuch vom 08./09.05.2003

„ELISA“

(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Biochemisches Praktikum

Berufskolleg Kartäuserwall

Kartäuserwall 30, Köln

Versuchsleiter: Fr. Ulrike Helpenstein

Entwicklung eines ELISA zur Bestimmung des BSA-Gehalts einer unbekannt Probe

Theorie / Prinzip des Versuchs

- / -

Material

Untersuchungsmaterial: Probe mit unbekanntem Proteingehalt (BSA und andere Proteine)

Geräte: Glasgeräte
Waagen und Wägezubehör
Eis
Eppendorfpipetten bis 10 / 100 / 1000 µl
Mikrotiterplatte, 96 wells von
ELISA-Reader „ Benchmark Plus“ von BioRad

Chemikalien:

- BSA, Rinderserum Albumin Fraktion V für biochemische Zwecke von Merck
- 1. AK: Anti BSA IgG, whole antiserum, developed in rabbit von Sigma
- 2. AK: Anti-Rabbit IgG, whole molecule, alkalische Phosphatase konjugiert, developed in goat von Sigma
- Alkaline phosphatase yellow liquid, Substrate system for Elisa von Sigma
- Natriumhydroxid Plätzchen NaOH, reinst, M:40,0 g/mol, R35 von Merck
- Tween 20, C₅₈H₁₁₄O₂₆, M: 1227,72 g/mol von Roth
- Trishydroxymehtylaminomethan (TRIS) H₂NC(CH₂OH)₃, p.A., M:121,14 g/mol, R36/38 von Merck
- EDTA = Titriplex III, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ x 2 H₂O, M:372,24 g/mol von Merck
- Natriumchlorid NaCl, reinst, M:58,44 g/mol von Merck

Durchführung

1. Ansetzen der Lösungen

- TE-Puffer 10x (Stocklösung)
 - 500 ml Stock ansetzen
 - 50 mM TRIS
 - 2 mM EDTA
 - 150 mM NaCl
 - pH 7,5
- BSA – Stammlösung
 - 500 µg / 10 ml
- 1. AK
 - Verdünnung 1:50

- wir brauchen für unsere Platte 6500 µl AK-Lösung
- $6500\mu\text{l} / 50 = 130 \mu\text{l AK}$
- mit 6370 µl TE-Puffer auffüllen
- 2. AK
 - Verdünnung a) 1:15.000 und b) 1:20.000
 - a) 2 µl AK auf 30 ml TE-Puffer
 - b) 2 µl AK auf 40 ml TE-Puffer
- Blockierlösung
 - 100 ml Lösung angesetzt (für 2 Gruppen)
 - 0,05% Tween 20
 - 0,1% BSA
 - in TE-Puffer lösen
- Waschlösung
 - 1000 ml Lösung angesetzt (für alle)
 - 0,1 % Tween 20
 - in TE-Puffer lösen
- Stopplösung
 - 100 ml angesetzt (für alle)
 - 3M NaOH

2. Workflow

- von der BSA-Stammlösung = Standard wird eine 1:5-Verdünnungsreihe angesetzt
- *Probennummer und Konzentration:*

1	2	3	4	5	6	7
50 µg/ml	10 µg/ml	2 µg/ml	0,4 µg/ml	0,08 µg/ml	0,016 µg/ml	0,0032 µg/ml

- mit der unbekannt Probe verfahren wir genauso und setzten ebenfalls eine 1:5-Verdünnungsreihe an
- *Probennummer und Verdünnungsstufe:*

1	2	3	4	5	6	7
1:1	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15.625

- in Doppelbestimmung werden von der Probe und vom Standard jeweils 100 µl auf die Mikrotiterplatte pipettiert
- als Referenzwert verwenden wir 100 µl Entwicklerlösung

- negative Kontrollen haben wir folgende:
 - Ansatz ohne den 1. AK
 - Ansatz ohne den 2. AK
 - Ansatz ohne BSA
- die Negativkontrollen werden ebenfalls in Doppelbestimmung zu je 100 µl aufgetragen
- positive Kontrolle 10 µl des 2. AK mit 100 µl Entwicklerlösung
- der 2. AK darf hier nicht ausgewaschen werden, da er ja nicht an die Wells binden konnte; er bleibt im Well – die Entwicklerlösung wird hinzugegeben!
- auch hier wird wieder in Doppelbestimmung aufgetragen
- da wir unterschiedliche Konzentrationen der 2.AK-Lösung austesten wollen, tragen wir jede Probe (Standard, Probe, pos KO) jeweils mit jeder AK-Verdünnung in Doppelbestimmung auf!!!
- die Belegung unserer Platte sieht dann wie folgt aus:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	x	x	x	x
B	x	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	x	x	x	x
C	Ref	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	x	x	x	x
D	x	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	x	x	pos 1	pos 2
E	x	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	x	x	pos 1	pos 2
F	x	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	x	x	x	x
G	x	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	x	neg 1	neg 2	neg 3
H	x	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	x	neg 1	neg 2	neg 3











	1 = ohne 1.AK		Standard mit 2.AK 1:15.000
	2 = ohne 2.AK		Standard mit 2.AK 1:20.000
	3 = ohne BSA		Probe mit 2.AK 1:15.000
	1 = mit 2:AK 1:15.000		Probe mit 2.AK 1:20.000
	2 = mit 2.AK 1:20.000		2.Ak + Substrat

Tabelle 1: Well - Belegung der Mikrotiterplatte

- die Probe und der Standard werden nun inkubiert: über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder 2h bei Raumtemperatur (RT)
- danach die Platte über dem Waschbecken ausschlagen und auf Zellstoff trocken klopfen
- mit 200 µl Blockierlösung blocken
- 5 min bei RT
- 2 x mit der Waschlösung waschen (je 100 µl)
- 1. AK zugeben (je 100 µl)

- 1-2 h bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- 3 x mit waschen (je 100 µl)
- 2. AK zugeben (je 100 µl)
- 1-2 h bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- 3 x waschen (je 100 µl)
- 200 µl Fertigsubstratlösung hinzugeben
- die Reaktionszeit beträgt etwa 20 min
- mit 50 µl Stoplösung die Reaktion beenden
- bei 405 nm im Elisareader messen

3. Messung am Elisareader

- das Programm auf dem PC am Elisareader öffnen
- ein neues „endpoint – protocol“ öffnen
- Wellenlänge der Messung eingeben
- mit dem mittleren Button oben im Fenster kann man sich die Mikrotiterplatte anzeigen lassen
- in diesem Fenster kann man nun die Belegung der Platte eingeben
- außerdem kann man die Konzentration der Standards und die Verdünnung der Proben eingeben
- das Programm kann daraus später unterschiedlichste Analysen durchführen

Ergebnisse

1. Rohdaten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,045	1,584	1,507	1,450	1,403	1,439	1,384	1,416	0,048	0,050	0,057	0,048
B	0,046	1,419	1,495	1,428	1,497	1,362	1,404	1,370	0,048	0,047	0,046	0,046
C	0,469	1,235	1,282	1,231	1,206	1,170	1,198	1,183	0,047	0,046	0,045	0,046
D	0,048	1,212	1,300	1,238	1,187	1,183	1,288	1,136	0,047	0,048	0,581	0,473
E	0,060	1,530	1,414	1,397	1,331	1,322	1,397	1,366	0,050	0,047	0,476	0,467
F	0,053	1,511	1,468	1,447	1,372	1,401	1,361	1,357	0,046	0,047	0,047	0,047
G	0,047	1,335	1,187	1,148	1,099	1,154	1,157	1,142	0,049	0,735	0,452	0,757
H	0,056	1,237	1,217	1,217	1,135	1,188	1,157	1,116	0,047	0,585	0,456	0,771

Tabelle 2: Rohdaten

2. Absorbance Report (gegen die Referenz gemessen)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1,115	1,038	0,981	0,934	0,970	0,915	0,947				
B		0,950	1,026	0,959	1,028	0,893	0,935	0,901				
C		0,766	0,813	0,762	0,737	0,701	0,729	0,714				
D		0,743	0,831	0,769	0,718	0,714	0,819	0,667			0,218	0,110
E		1,061	0,945	0,928	0,862	0,853	0,928	0,897			0,095	0,099
F		1,042	0,999	0,978	0,903	0,932	0,892	0,888				
G		0,866	0,718	0,679	0,630	0,685	0,688	0,673		0,266	-0,017	0,288
H		0,768	0,748	0,744	0,666	0,719	0,688	0,647		0,116	-0,013	0,302

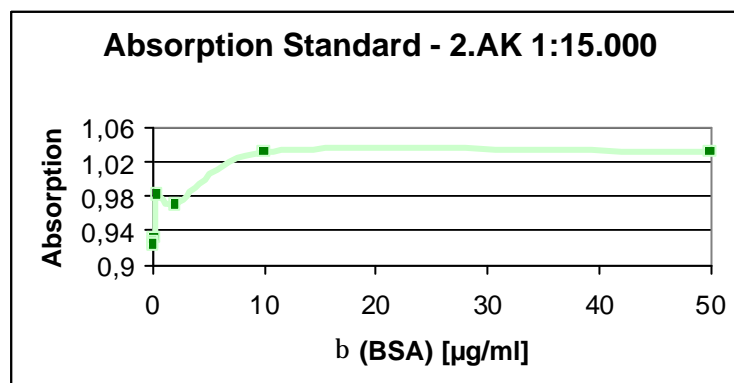
Tabelle 3: Absorption der einzelnen Wells, gegen die Referenz gemessen

Auswertung

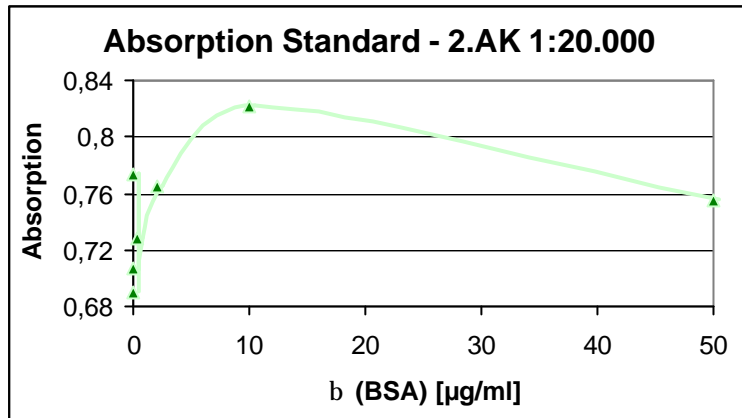
Die Mittelwerte der doppelt bestimmten Reihen ergeben folgendes Bild:

50	10	2	0,4	0,08	0,016	0,003	β [$\mu\text{g/ml}$]
1,033	1,032	0,97	0,981	0,932	0,925	0,924	Absorption
0,755	0,822	0,766	0,728	0,708	0,774	0,691	
1,052	0,972	0,953	0,883	0,893	0,91	0,893	
0,817	0,733	0,712	0,648	0,702	0,688	0,66	

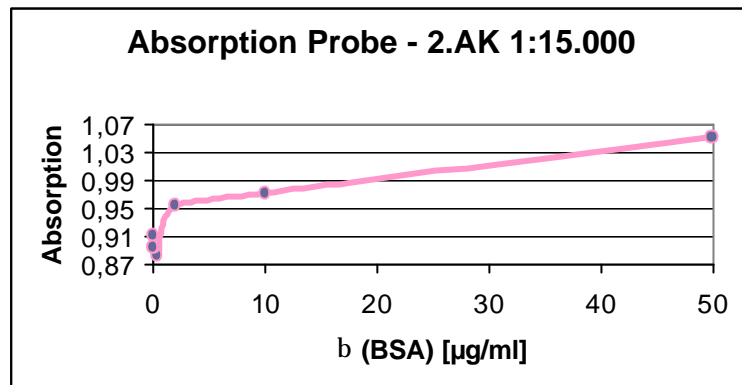
In Diagrammen sehen diese Daten dann wie folgt aus:



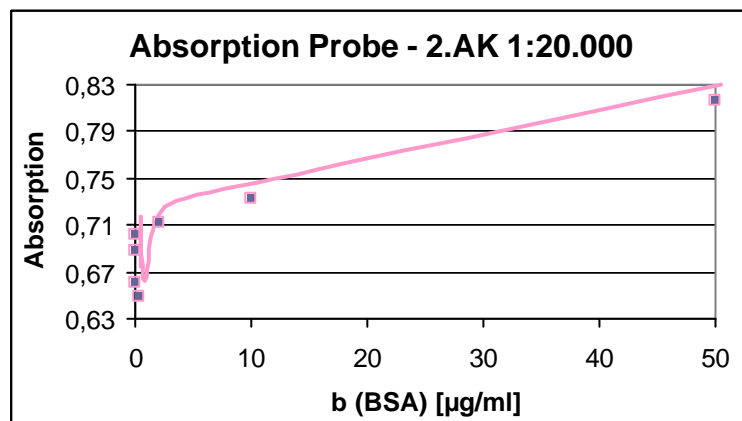
Graphik 1: Absorption des Standards bei einer Verdünnung des 2. AK von 1:15.000



Graphik 2: Absorption des Standards bei einer Verdünnung des 2. AK von 1:20.000



Graphik 3: Absorption der Probe bei einer Verdünnung des 2. AK von 1:15.000



Graphik 4: Absorption der Probe bei einer Verdünnung des 2. AK von 1:20.000

Eine wirkliche Auswertung ist mit diesen Daten nicht möglich. Die Graphen verlaufen nicht linear, wie es eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Stattdessen zeigen sie zwar einen linearen Bereich, aber keine vollständige Linearität – vor allem nicht im Bereich der geringen Stoffmengenkonzentrationen.

Fehlerdiskussion

Die Positivkontrolle hat nicht richtig funktioniert, da sie falsch aufgetragen wurde (nicht wie oben beschrieben!). Die Negativkontrolle neg1 zeigt, dass auch ohne den 1.AK Reaktionen mit dem Substrat stattgefunden haben. Es haben also im Vorfeld unspezifische Bindungen stattgefunden. Die neg2-Kontrolle ohne den 2.AK ist wirklich negativ ausgefallen. Es hat keine Reaktion stattgefunden! Die neg3-Kontrolle ohne die Inkubation des BSA über Nacht zeigt wiederum eine hohe Substrataktivität. Hier haben also wieder unspezifische Bindungen stattgefunden, die ja eigentlich vermieden werden sollten. Diese Wells hätte man besser mit einem anderen Enzym inkubiert, um die Bindungsstellen zu blockieren. Wir haben sie in der ersten Phase einfach leer gelassen.