

Ein Vergleich von vier Methoden zur Isolierung von IgG-Antikörpern aus Kaninchenserum

A. Haßl, Margarete Roitmaier, H. Aspöck

Einleitung

Durch die laufende Entwicklung neuer serologischer Verfahren und durch die Verbesserung und Verfeinerung bestehender Tests ergibt sich ein ständig steigender Bedarf an definierbaren Reaktionspartnern. Für einige Testsysteme, wie z. B. für Nachweise zirkulierender Antigene, benötigt man gereinigte, spezifische IgG-Antikörper, die üblicherweise aus Hyperimmunseren von Versuchstieren gewonnen werden. Zur Isolierung von Antikörpern aus Seren steht eine Reihe unterschiedlicher Verfahren zur Verfügung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die vier gebräuchlichsten Methoden vergleichend durchzuführen und die Vor- und die Nachteile kritisch zu beurteilen. Unser besonderes Interesse galt dabei jenen Methoden, die insbesondere auch eine routinemäßige Herstellung reiner IgG-Antikörperfraktionen gegen *Toxoplasma gondii* erlauben und bei Tests zum Nachweis von zirkulierenden Antigenen eingesetzt werden können.

Material und Methoden

Zwei konventionell gehaltene, ca. 2 kg schwere Kaninchen wurden zur Stimulation des Immunsystems mit je 10^5 Trophozoiten von *Toxoplasma gondii* intravenös infiziert und am 10. und 21. Tag p.i. geboostert. Am 35. Tag p.i. wurde den Tieren kardial je 20 ml Blut abgenommen, die Seren wurden gemischt und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die Isolierung der IgG-Antikörper aus je 3 ml Serum erfolgte durch folgende Methoden:

1. Fällung mit 50% Ammoniumsulfat-Lösung

Ein Teil Serum wurde mit einem Teil PBS (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2) gemischt und tropfenweise mit zwei Teilen gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ versetzt. Die präzipitierten Globuline wurden bei 200g 5 Minuten sedimentiert, in 60% Ammoniumsulfat-Lösung zweimal gewaschen und schließlich in einem Teil PBS resuspendiert.

2. Fällung mit 2,73% Octansäure (Caprylsäure)

Nach der Methode von STEINBUCH und AUDRAN (1969) wurden aus dem Kaninchenserum mittels Octansäure (Caprylsäure, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_8$) die meisten Proteine, ausgenommen die Immunglobuline, ausgefällt.

3. Affinitätschromatographie mit DEAE Affi-Gel Blue

Die Affinitätschromatographie mit DEAE AFFI-Gel Blue (Bio-Rad, Wien) wurde nach den Angaben des Herstellers (Bio-Rad Bulletin 1062) durchgeführt. Säulendimension: 20x 1 cm; Durchfluß der flüssigen Phase: 20 ml/h/cm²; Extinktionsmessung bei 280 nm.

4. Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose CL-4B

Die Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose (Pharmacia, Wien) wurde nach den Angaben des Herstellers

(Pharmacia Fine Chemicals, 1980) durchgeführt. Säulendimension: 10x0,7 cm; freier Pufferfluß; Extinktionsmessung bei 280 nm.

Nach den Trennungsschritten wurden die Antikörper enthaltenden Fraktionen mittels Polyäthylenglykol (MW 20000) auf ein Volumen von je 3 ml eingeengt und 48 Stunden gegen PBS (pH 7,2) dialysiert. Der Proteingehalt jeder Probe sowie jener des Kaninchenserums wurden bestimmt (protein assay, Bio-Rad, Wien). In einer radialen Immundiffusion in einem Antiserum-hältigen Gel wurden die Mengen an IgG-Antikörpern in den Proben und im Nativserum gemessen; die Immundiffusion wurde in einem 1,5% Agarosegel (Behring, Marburg, BRD) mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Schweineserum (Nordic, Tilburg, NL) durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 20°C wurden die Gele in PBS gewaschen, mit Coomassie-Blue (Serva, Heidelberg, BRD) gefärbt und getrocknet. Die Berechnung des Antikörpergehaltes erfolgte durch Ausmessen des Durchmessers der Präzipitatringe.

Ergebnisse

Der bei den vier angewandten Methoden (Ammoniumsulfat- und Caprylsäurefällung, Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose oder DEAE-Affi Gel Blue) auftretende Verlust an Antikörpern und der Grad der Reinheit des Isolats sind in Tab. 1 dargestellt.

TABELLE 1:

Ergebnisse von vier Methoden zur Isolierung und Reinigung von IgG-Antikörpern

Methode	Gehalt an Serumproteinen in%	Verlust an IgG in%
Nativserum	100	0
Ammoniumsulfatfällung	23	37,4
Octansäurefällung	18	25,5
DEAE-Affi Gel Blue Chrom.	7	27,9
Protein A-Sepharose Chrom.	15	19,1

Diskussion

Aus den Ergebnissen unserer Studie läßt sich klar erkennen, daß keiner der untersuchten IgG-Isolierungsverfahren eindeutig und uneingeschränkt der Vorzug gegeben werden kann. Jede dieser vier Methoden hat bei bestimmten Fragestellungen Vorteile gegenüber den anderen, sodaß die Indikation für eine bestimmte Methode individuell gestellt werden muß. Die Reinigung von IgG-Antikörpern durch Präzipitation von Proteinen (Ammoniumsulfat- und Octansäurefällung) bedarf nur sehr geringer technischer Ausrüstung, eines geringen Materialaufwands und stellt keine hohen Ansprüche an die handwerklichen Fähigkeiten des Bearbeiters. Allerdings ist auch der Wirkungsgrad dieser Verfahren nicht besonders gut, da nicht nur ein relativ hoher Verlust an Antikörpern, sondern zudem ein großer Gehalt an Restproteinen hingenommen werden muß. Diese Methoden eignen sich vor allem als Vorreinigungsverfahren zu aufwendigen Trennschritten, als effiziente Methoden zur Trennung von Proteinen und Nichtproteinen, wie z. B. Ampholyten, und als „Feldmethoden“ bei einfacher technischer Ausrüstung des Laboratoriums.

Durch die Verwendung einer Affinitätschromatographie an Stelle eines Fällungsverfahrens lassen sich reinere IgG-Fractionen herstellen, da die Trennleistung dieser Methoden, gemessen am Gehalt an verbliebenen Serumproteinen, besser ist. Die Chromatographie mit DEAE Affi-Gel Blue weist zwar das beste Verhältnis zwischen der Menge an isolierten IgG-Antikörpern und der Menge an Serumproteinen auf, ihr gravierender Nachteil besteht allerdings in ihrer Störanfälligkeit. Der vom Hersteller empfohlenen Referenzmethode muß genau gefolgt werden, um ein optimales Trennergebnis zu erzielen. In der Routinearbeit treten jedoch unvermeidbare, arbeitstechnisch bedingte Schwankungen der Versuchsbedingungen auf, die die Leistungsfähigkeit dieser Methode erheblich herabsetzen

können. Weniger empfindlich gegenüber Störungen, flexibler nutzbar, und etwas weniger aufwendig ist eine Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose. Diese Methode führt zudem zum geringsten Verlust an IgG-Antikörpern. Sie scheint uns daher für die routinemäßige Präparation von Antikörpern aus Seren von Versuchstieren am besten geeignet zu sein.

Da jede der untersuchten Methoden ihren individuellen Anwendungsbereich besitzt, muß an Hand der Umstände und der Fragestellung für jeden Einzelfall einer Antikörperreinigung das zweckmäßigste Verfahren ausgewählt werden.

Zusammenfassung

Vier Verfahren zur Isolierung von IgG-Antikörpern aus Seren wurden in Hinsicht auf ihre Eignung als Routine-methode zur Aufarbeitung von Kaninchenserum miteinander verglichen. Von jedem Verfahren wurden die Ausbeuten an Antikörpern und die Mengen an Verunreinigungen bestimmt und verglichen, die arbeitstechnischen Vor- und Nachteile der untersuchten Methoden wurden abgewogen. Während Präzipitationsmethoden (Ammoniumsulfat- und Octansäurefällung) besonders einfach und wenig aufwendig durchzuführen sind, ist der Wirkungsgrad von Affinitätschromatographie-Verfahren (Chromatographie mit Protein A-Sepharose und DEAE Affi-Gel Blue) wesentlich besser. Die Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose erscheint uns als Routineverfahren in den meisten Fällen auf Grund des günstigen Verhältnisses von Arbeitsaufwand und Qualität der Isolierung von allen untersuchten Methoden am besten geeignet.

Summary

A comparative study of four methods for IgG-preparation

Four methods for isolation of IgG antibodies from rabbit serum were compared particularly with respect to their suitability for routine IgG preparation. The regain of IgG antibodies and the quantity of contamination of each method were determined and compared with the expenditure of work. Whereas precipitation methods (precipitation with ammonium sulfate or caprylic acid) are easily practicable, lower quantities of contamination and a low loss of antibodies could be achieved by affinity chromatography methods (affinity chromatography with DEAE Affi-Gel Blue or Protein A-Sepharose CL-4 B). For routine IgG-isolation in most cases the method of choice seems to be Protein A-affinity chromatography as it combines easy handling with good yield.

Literatur

BIO-RAD: DEAE Affi-Gel Blue purifies IgG. Bulletin 1062

PHARMACIA FINE CHEMICALS: Affinity Chromatography. Uppsala, 1980.

STEINBUCH, M., AUDRAN, R. (1980): The isolation of IgG from mammalian Sera with the aid of caprylic acid. Arch. Biochem. Biophysics 134, 279-284.

KORRESPONDENZADRESSE

Dr. A. Haßl

Hygiene-Institut der Universität Wien

Abteilung für Medizinische Parasitologie

Kinderspitalgasse 15

A-1095 Wien