

Biochemisches Grundpraktikum SS 25

Protokoll zu Versuch

Titel: ELISA: Anwendung des ELISA zum immunochemischen Nachweis eines Proteinantigens

Praktikant/in: Jannus Goecke Praktikumsnummer: 524

Versuchsdatum: 07.07.2025

Versuchsbetreuung: Furkan Demir

Kolloquium: Felix Veitl

Wir versichern, dass wir dieses Protokoll komplett eigenständig angefertigt haben.

Datum: 19. August 2025

Unterschrift(en): Jannus Goecke

Hinweise zu benutzter Software

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden folgende Programme für die genannten Zwecke verwendet:

- Overleaf – Erstellung des Dokuments
- R – für Arbeit mit Daten und Erstellung der Graphiken
- GitHub – Teilen von R-Skripten/Notebooks und Rohdaten
- Zotero – Literaturverwaltung
- Sketch – Bildbearbeitung
- LanguageTool – Rechtschreibungsverbesserung
- Sprachmodelle (gpt-4o, o3, claude-sonnet-4) – Erstellung von Latex-Code für große Tabellen, Einbindung von Grafiken oder Nachbereitung Sonderzeichen-reicher Textabschnitte; Unterstützung bei R-Code-Erstellung; Feedback zur wissenschaftlichen Formulierung; Brainstorming.

Bei Fragen zur Nutzung von Software stehen wir gerne zur Verfügung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Durchführung	7
3	Ergebnisse	9
3.1	Berechnung der Antikörperkonzentration	9
3.2	Visualisierung der ELISA-Daten	9
3.3	Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D	11
4	Diskussion	13

Abbildungsverzeichnis

1	Prinzip des indirekten ELISA	6
2	Schematischer Aufbau der 96-Well-Mikrotiterplatte.	8
3	Visualisierung der ELISA-Daten zu drei Zeitpunkten.	10
4	Nichtlineare Regression der korrigierten Absorptionsdaten	12

Tabellenverzeichnis

1	Mittelwerte der Absorption aus den Kontroll-Wells	11
---	---	----

1 Einleitung

Die spezifische Erkennung von Molekülen ist ein fundamentales Prinzip biologischer Systeme. Immunsysteme vieler Organismen haben mit der Produktion von Antikörpern (Immunglobulinen) einen effektiven Mechanismus zur Identifizierung und Neutralisierung fremder Substanzen, sogenannter Antigene (abgeleitet von engl. *antibody-generating*[5]), entwickelt. Jeder Antikörper besitzt eine einzigartige Antigenbindungsstelle (Paratop), die mit hoher Affinität an eine spezifische molekulare Struktur auf dem Antigen (Epitop) bindet. Die enorme Vielfalt dieser Bindungsstellen, die eine Erkennung von Millionen verschiedener Antigene ermöglicht, wird durch einen Prozess der somatischen V(D)J-Rekombination der Immunglobulin-Gene erzeugt [3].

Diese Spezifität der Antigen-Antikörper-Interaktion bildet die Grundlage für eine Vielzahl von analytischen Methoden, die als Immunoassays zusammengefasst werden. Durch den Einsatz von Antikörpern als molekulare Sonden ist es möglich, eine praktisch beliebige Substanz in komplexen Gemischen mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Anwendungsbereiche sind daher vielfältig und haben sowohl die medizinische Diagnostik als auch die biochemische Grundlagenforschung revolutioniert [10]. In der klinischen Diagnostik ermöglichen Immunoassays den Nachweis von Krankheitserregern (z.B. Viren wie HIV [8] oder SARS-CoV-2 [2]), die Bestimmung von Hormonkonzentrationen, wie beim Nachweis des humanen Choriongonadotropins (hCG) in Schwangerschaftstests [9], oder die Überwachung von Tumormarkern im Blutserum [14]. Darüber hinaus können diese Methoden sogar eine Rolle in der Lebensmittelsicherheit zur Detektion von Allergenen und Toxinen spielen [18].

Eine weit verbreitete und robusteste Techniken ist der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Sein Grundprinzip beruht darauf, die spezifische Bindung eines Antikörpers an sein Antigen an eine enzymkatalysierte Farbreaktion zu koppeln. Durch die Immobilisierung eines der Bindungspartner an eine feste Phase, typischerweise die Oberfläche einer Mikrotiterplatte, können ungebundene Komponenten durch einfache Waschschrte entfernt werden. Das an den Antikörper gekoppelte Reporterenzym setzt anschließend ein chromogenes Substrat um, dessen farbiges Produkt photometrisch quantifiziert wird. Die hohe katalytische Aktivität des Enzyms sorgt dabei für eine erhebliche Signalverstärkung, was dem Test eine hohe Empfindlichkeit verleiht.

Im Rahmen dieses Versuchs wird ein indirekter ELISA durchgeführt (Abbildung 1). Bei diesem Format bindet zunächst ein spezifischer, unmarkierter Primärantikörper an das immobilisierte Antigen. Anschließend wird ein zweiter, mit einem Enzym konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der spezifisch den Primärantikörper erkennt.

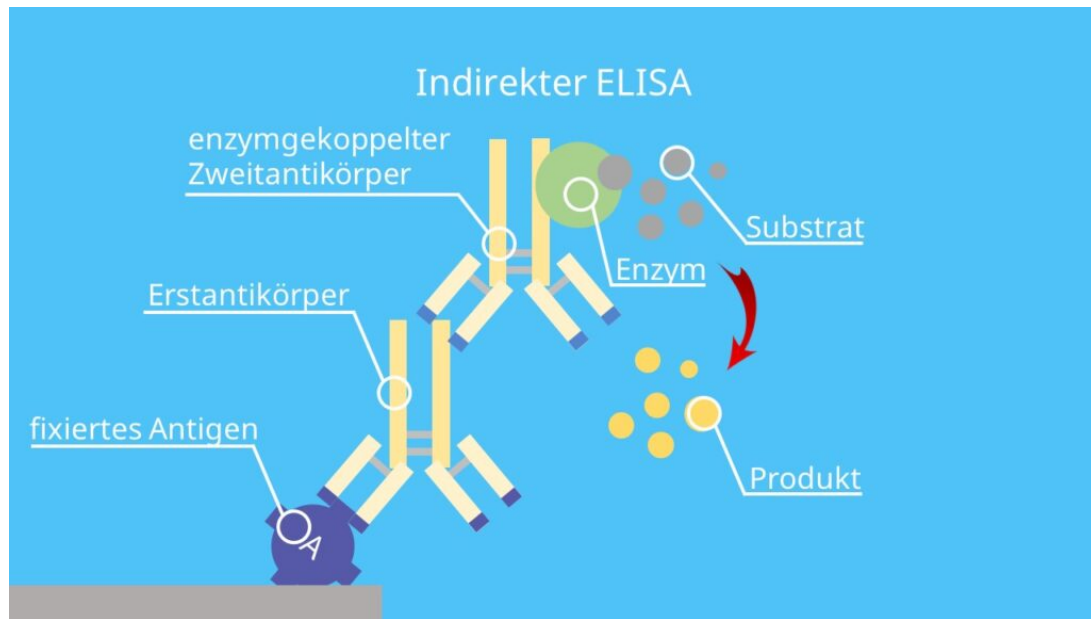


Abbildung 1: Schematische Darstellung des indirekten ELISA. Ein an die feste Phase gebundenes Antigen wird von einem spezifischen Primärantikörper erkannt. Dieser wird wiederum von einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Das Enzym katalysiert die Umsetzung eines Substrats in ein nachweisbares Produkt. (Bildquelle: Studyflix[6])

Ziel des nachfolgenden Versuchs ist es, das Prinzip des indirekten ELISA praktisch anzuwenden, um das Protein Rinder-Serumalbumin (BSA) als Modell-Antigen nachzuweisen. Um die hohe Spezifität der Antikörperbindung zu demonstrieren, wird das strukturverwandte humane Serumalbumin (HSA) als Negativkontrolle eingesetzt und auf mögliche Kreuzreaktivität untersucht. Darüber hinaus soll aus den Messdaten die apparente Dissoziationskonstante (K_D) des Antigen-Antikörper-Komplexes ermittelt werden, um die Bindungsaffinität quantitativ zu charakterisieren.

2 Durchführung

Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe 521-522 durchgeführt, da der Laborpartner an diesem Versuchstag abwesend war. Die in diesem Protokoll präsentierten Daten sind das Ergebnis der gemeinsamen Versuchsdurchführung. Ziel des Versuchs war die Durchführung eines indirekten ELISA zur Detektion von Rinder-Serumalbumin (BSA) und zur Abschätzung der Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes. Humanes Serumalbumin (HSA) diente als Kontrolle zur Untersuchung der Kreuzreaktivität.

Zu Beginn des Versuchs wurden die benötigten Protein-Stammlösungen hergestellt. Hierfür wurden je 100 mg BSA und HSA in separaten 15-ml-Kunststoffröhrchen abgewogen und in je 10 mL PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 10 mg mL^{-1} zu erhalten.

Zur Immobilisierung der Antigene wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit den entsprechenden Proteinlösungen beschichtet. Hierfür wurden je 50 μL einer 10 mg mL^{-1} BSA-Lösung in PBS in die Vertiefungen der Spalten 1–3 und 7–9 pipettiert. Analog wurden die Spalten 4–5 und 10–11 mit einer HSA-Lösung gleicher Konzentration versehen, um die Kreuzreaktivität des Antikörpers zu prüfen. Die Spalten 6 und 12, die ebenfalls mit BSA (in A–D) und HSA (in E–H) beschichtet wurden, dienten als Kontrollen für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers. Der genaue Aufbau der Platte ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Der Doppel-Aufbau ist darauf zurückzuführen, dass die Platte unter normalen Umständen von zwei Gruppen genutzt wird. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Proteinlösung durch Auskippen der Platte entfernt und verbleibende Flüssigkeitstropfen wurden durch heftiges Ausklopfen auf Papiertüchern beseitigt. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST-Puffer (1 x PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen und wieder möglichst gut ausgeklopft.

Im nächsten Schritt wurde eine serielle Verdünnungsreihe des monoklonalen Anti-BSA-Antikörpers (Klon BSA-33, aus Maus, Sigma # B 2901) erstellt. Hierfür wurde zunächst eine 1:250-Verdünnung der Antikörper-Stammlösung hergestellt, indem 4 μL des Antikörpers mit 996 μL PBST 0,1 gemischt wurden. Die Konzentration des Antikörpers in der eingesetzten Stammlösung betrug ca. 8 mg mL^{-1} bei einer Molmasse von ca. 150 kDa [13]. Anschließend wurden in die Vertiefungen der Spalten 1–12 je 50 μL PBST 0,1 vorgelegt. In die Wells der Reihe A wurde je 50 μL dieser 1:250-Verdünnung zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt, was eine Startverdünnung von 1:500 ergab. Ausgehend von dieser ersten Verdünnung wurde eine serielle 1:2-Verdünnungsreihe erstellt, indem sukzessive 50 μL der gut durchgemischten Lösung in die darunterliegende Vertiefung derselben Spalte übertragen wurden. Dieser Vorgang wurde bis zur Reihe H wiederholt. Die entsprechenden Verdünnungen jeder Reihe sind ebenfalls in Abbildung 2 dargestellt. Aus der letzten Reihe wurden schließlich 50 μL entnommen, um in allen Vertiefungen ein einheitliches Volumen zu haben. Die Platte wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreifach mit PBST 0,1 gewaschen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 μL einer 1:10000-Verdünnung des Sekundärantikörpers. Verwendet wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Anti-Maus-IgG (Fc-spezifisch, aus Ziege, Sigma # A 1418). Nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Verdünnung
A	■	■	■	▲	▲	□	■	■	■	▲	▲	□	1:500
B	■	■	■	▲	▲	□	■	■	■	▲	▲	□	1:1000
C	■	■	■	▲	▲	□	■	■	■	▲	▲	□	1:2000
D	■	■	■	▲	▲	□	■	■	■	▲	▲	□	1:4000
E	■	■	■	▲	▲	△	■	■	■	▲	▲	△	1:8000
F	■	■	■	▲	▲	△	■	■	■	▲	▲	△	1:16000
G	■	■	■	▲	▲	△	■	■	■	▲	▲	△	1:32000
H	■	■	■	▲	▲	△	■	■	■	▲	▲	△	1:64000

■: BSA + Primär-AK-Verdünnungsreihe
 ▲: HSA + Primär-AK-Verdünnungsreihe
 □: BSA-Kontrolle (nur Sekundär-AK)
 △: HSA-Kontrolle (nur Sekundär-AK)

Abbildung 2: Schematischer Aufbau der 96-Well-Mikrotiterplatte. Die Vertiefungen wurden mit BSA oder HSA als Antigen beschichtet. In den Spalten 1–5 und 7–11 wurde eine serielle Verdünnung des primären Anti-BSA-Antikörpers (Primär-AK) inkubiert. Die Spalten 6 und 12 dienten als Kontrollen für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers (Sekundär-AK), kein Primär-AK hinzugegeben.

Raumtemperatur wurde die Platte zur Entfernung ungebundener Antikörper je zweimal mit PBST 0,1 und zweimal mit PBS gewaschen.

Die enzymatische Farbreaktion wurde durch die Zugabe von je 50 μL einer frisch hergestellten Substratlösung ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer) in alle Vertiefungen gestartet. Die Kinetik der Produktbildung wurde in einem ELISA-Photometer (Model 450, Biorad) bei einer Wellenlänge von 415 nm verfolgt, wobei die Absorption nach 5, 12 und 17 Minuten aufgezeichnet wurde. Es sei anzumerken, dass die Messzeitpunkte leicht von den im Praktikumsskript [13] vorgegebenen 5, 10 und 15 Minuten abweichen.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die aus dem ELISA gewonnenen Daten dazu verwendet, um zunächst die molare Konzentration des eingesetzten primären Antikörpers für jede Verdünnungsstufe berechnet. Anschließend wurden die Rohdaten grafisch dargestellt und die Daten zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante (K_D) des BSA/Anti-BSA-Antikörper-Komplexes durch eine nichtlineare Regression ausgewertet. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, steht sowohl der R-Code als auch alle Rohdaten auf GitHub¹ zur Verfügung.

3.1 Berechnung der Antikörperkonzentration

Die Konzentration des monoklonalen Anti-BSA-Antikörpers wurde aus der vom Hersteller angegebenen Massenkonzentration der Stammlösung ($\rho \approx 8 \text{ mg mL}^{-1}$ [13]) und der Molmasse eines IgG-Antikörpers ($M \approx 150 \text{ kDa}$ [13]) berechnet.

Die molare Konzentration c der Stammlösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{\rho}{M} \quad (1)$$

Als Beispielrechnung ergibt sich für die Stammlösung:

$$c_{\text{Stamm}} = \frac{8 \text{ g L}^{-1}}{150\,000 \text{ g mol}^{-1}} \approx 5,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

Ausgehend von diesem Wert wurden die finalen Konzentrationen in den Vertiefungen für jede Verdünnungsstufe berechnet. Für die erste Verdünnungsstufe (1:500 in Reihe A) ergibt sich:

$$c_{\text{final, A}} = \frac{c_{\text{Stamm}}}{500} = \frac{5,33 \cdot 10^{-5} \text{ M}}{500} \approx 1,07 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

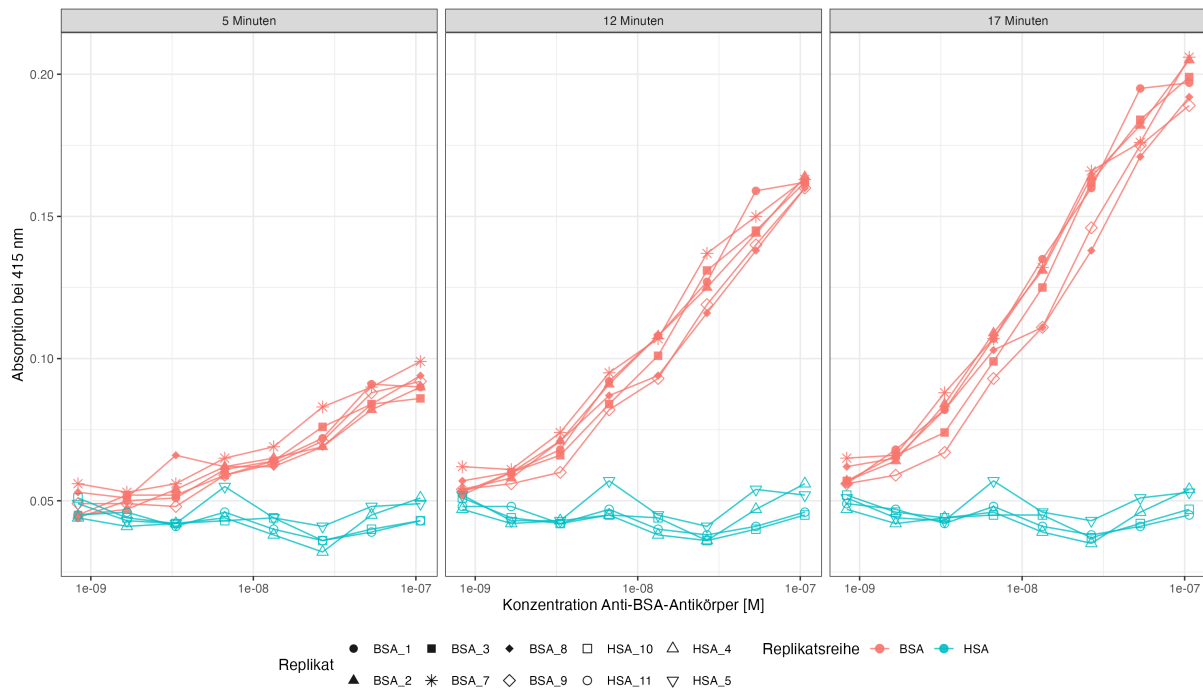
Die Konzentrationen für die weiteren Verdünnungsstufen wurden analog berechnet.

3.2 Visualisierung der ELISA-Daten

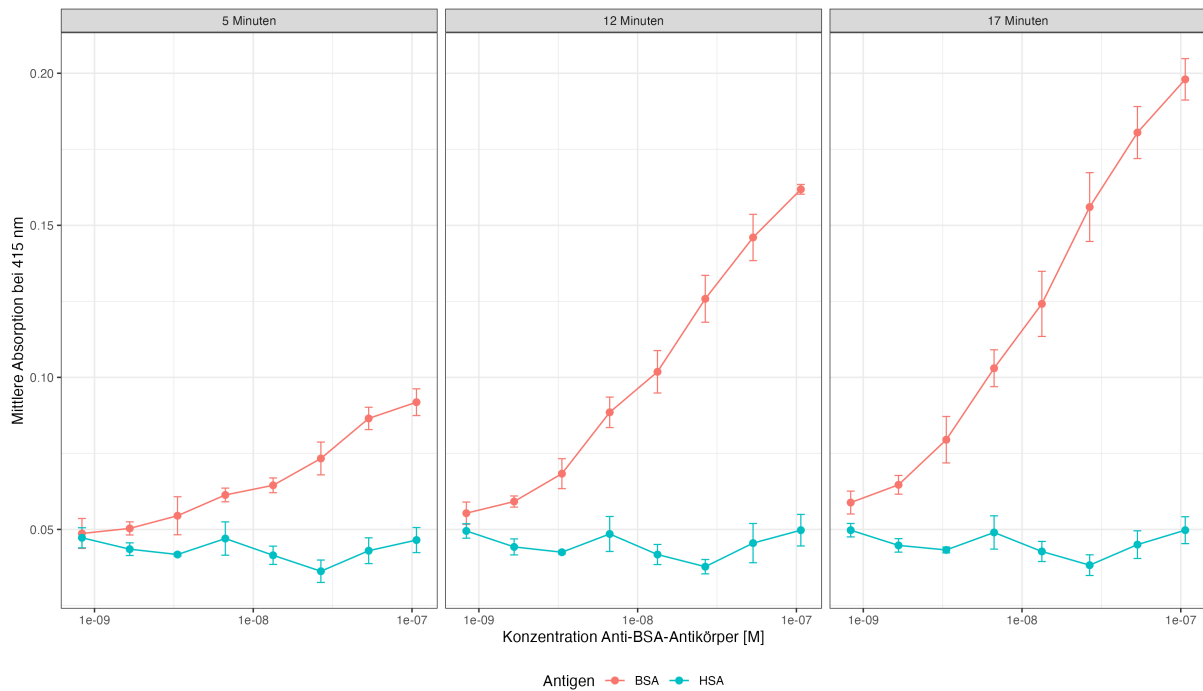
Die gemessenen Absorptionswerte bei 415 nm wurden für die Zeitpunkte 5, 12 und 17 Minuten gegen die Konzentration des primären Antikörpers aufgetragen. Abbildung 3 fasst die Ergebnisse zusammen. Abbildung 3a zeigt zunächst die Rohdaten aller 10 individuellen Verdünnungsreihen (6 für BSA, 4 für HSA), um die Konsistenz der Einzelmessungen darzustellen. Um den Trend klarer hervorzuheben, zeigt Abbildung 3b die Mittelwerte und Standardabweichungen über alle Replikate.

Die Diagramme zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Absorption für BSA, die sich mit fortschreitender Reaktionszeit verstärkt. Die Sättigungskurven für BSA sind

¹https://github.com/jannusgoe/Biochemiepraktium_ELISA



(a) Individuelle Replikate der Verdünnungsreihen.



(b) Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 3: Visualisierung der ELISA-Daten zu drei Zeitpunkten. Die Absorption bei 415 nm ist gegen die Konzentration des Anti-BSA-Antikörpers auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. (a) zeigt die einzelnen Replikatskurven, (b) die gemittelten Kurven mit der Standardabweichung.

deutlich erkennbar. Im Gegensatz dazu wurde für HSA über den gesamten Konzentrationsbereich nur ein sehr geringes Signal nahe der Nachweisgrenze gemessen. Dies deutet auf eine hohe Spezifität des Antikörpers für BSA und eine vernachlässigbare Kreuzreaktivität mit HSA hin. Die gute Übereinstimmung der Replikate wird durch die schmalen Standardabweichungen in Abbildung 3b bestätigt.

3.3 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D

Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante wurden die Absorptionswerte zunächst um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers korrigiert. Hierfür wurde der Mittelwert der Absorption aus den Kontroll-Wells (Spalten 6 und 12) für jedes Antigen und jeden Zeitpunkt berechnet (Tabelle 1) und von den Messwerten subtrahiert.

Tabelle 1: Mittelwerte der Absorption aus den Kontroll-Wells, die zur Korrektur der unspezifischen Bindung verwendet wurden.

Zeitpunkt [min]	Mittlere Kontroll-Absorption	
	BSA	HSA
5	0,0436	0,0453
12	0,0434	0,0458
17	0,0435	0,0470

An die korrigierten Daten einer repräsentativen BSA-Messreihe (Reihe 3, Zeitpunkt 17 min) wurde eine hyperbolische Sättigungsfunktion angepasst. Hier wird dafür die Gleichung nach [10] (Gleichung (2)) verwendet, die sich direkt aus der im Praktikumsskript [13] hergeleiteten Gleichung (3) ableiten lässt.

Der grundlegende physikalische Zusammenhang ist, dass die gemessene Absorption A direkt proportional zur Konzentration des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes $[P \times L]$ ist, da an jeden Komplex ein Enzym gekoppelt ist:

$$A \propto [P \times L] \quad \text{oder} \quad A = k \cdot [P \times L]$$

wobei k eine Proportionalitätskonstante ist. Die im Skript hergeleitete Gleichung (3) lautet:

$$[P \times L] = \frac{[L]_t \cdot [P]_t}{K_D + [P]_t}$$

Setzt man diese in die Proportionalitätsgleichung ein, erhält man für das gemessene Signal:

$$A = k \cdot \frac{[L]_t \cdot [P]_t}{K_D + [P]_t} = \frac{(k \cdot [L]_t) \cdot [P]_t}{K_D + [P]_t}$$

Der Term $(k \cdot [L]_t)$ fasst alle konstanten Größen zusammen: die Gesamtkonzentration des immobilisierten Antigens $[L]_t$ und den Faktor k . Dieser Term entspricht der maximalen

Absorption A_{\max} , die erreicht wird, wenn annähernd alle Antigenmoleküle gesättigt sind [11]. Ersetzt man zudem die Gesamtkonzentration des Antikörpers $[P]_t$ durch die Variable $[AK]$, erhält man die für die Regression verwendete Form:

$$A([AK]) = \frac{A_{\max} \cdot [AK]}{K_D + [AK]} \quad (2)$$

Hierbei ist $A([AK])$ die korrigierte Absorption bei einer gegebenen Antikörperkonzentration $[AK]$, A_{\max} die maximale Absorption und K_D die apparente Dissoziationskonstante.

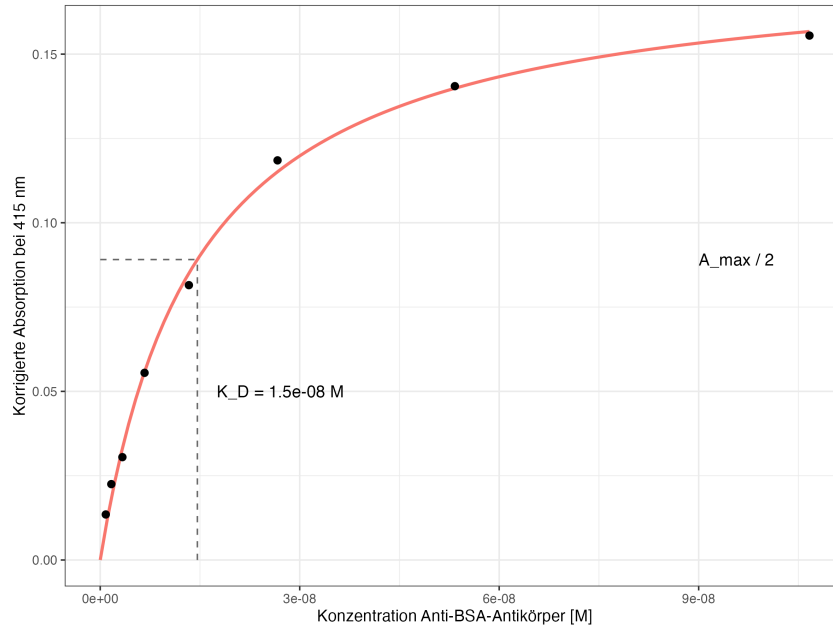


Abbildung 4: Nichtlineare Regression der korrigierten Absorptionsdaten (Replikat BSA aus Spalte 3 zum Messzeitpunkt 17 min). Die schwarzen Punkte stellen die Messwerte dar, die rote Linie den Fit gemäß Gleichung (2). Die gestrichelten Linien zeigen die grafische Bestimmung des K_D -Wertes bei der halben maximalen Absorption ($A_{\max}/2$).

Die Anpassung der Kurve an die Messpunkte ist in Abbildung 4 dargestellt. Aus der nichtlinearen Regression ergaben sich die folgenden Parameter mit sehr hoher Signifikanz ($p < 0.001$). Der Wert für die maximale Absorption ergab $A_{\max} = (0,178 \pm 0,004)$. Für die apparente Dissoziationskonstante des BSA/Anti-BSA-Antikörper-Komplexes ergab sich ein Wert von:

$$K_D = (1.46 \pm 0.10) \times 10^{-8} \text{ M}$$

4 Diskussion

Ziel des Versuches war die Durchführung eines indirekten ELISA zum Nachweis von Rinder-Serumalbumin (BSA) sowie die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung zwischen dem Anti-BSA-Antikörper (Klon BSA-33, aus Maus, Sigma # B 2901) und seinem Antigen BSA. Humanes Serumalbumin (HSA) diente im Versuch als Negativkontrolle zur Überprüfung möglicher Kreuzreaktionen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der verwendete monoklonale Antikörper spezifisch an das auf der Mikrotiterplatte immobilisierte BSA bindet. Dies wird durch die konzentrationsabhängige Zunahme des Absorptionssignals in den Verdünnungsreihen mit BSA als Antigen deutlich (Abbildung 3). Die resultierenden Sättigungskurven folgen der erwarteten charakteristischen hyperbolischen Kinetik. Wobei zu erwähnen sei, dass diese Kinetik nur für das BSA-Replikat aus Spalte 3 zum Messzeitpunkt 17 min berechnet wurde. Abbildung 3a zeigt jedoch, dass alle BSA Replikate eine ähnliche Kinetik aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde bei den Vertiefungen, die mit HSA beschichtet waren, über den gesamten Konzentrationsbereich des primären Antikörpers nur ein Signal im Größenbereich der unspezifischen Bindung gemessen. Dieses Ergebnis belegt eine hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers für BSA.

Die Spezifität eines Antikörpers ist ein entscheidendes Kriterium für die Zuverlässigkeit eines Immunoassays. Der Begriff der Kreuzreaktivität beschreibt die Fähigkeit eines Antikörpers, neben seinem Zielantigen auch an andere Moleküle zu binden. Im vorliegenden Fall ist HSA ein geeignetes Protein zur Prüfung der Kreuzreaktivität, da es eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu BSA aufweist [7, 15, 16]. Das Ausbleiben einer signifikanten Reaktion mit HSA zeigt, dass der monoklonale Antikörper ein Epitop auf BSA erkennt, das auf HSA entweder nicht vorhanden oder nicht zugänglich ist. Monoklonale Antikörper, die von einem einzigen B-Zell-Klon stammen, erkennen in der Regel nur ein einziges Epitop und weisen daher oft eine geringere Kreuzreaktivität auf als polyklonale Antikörper, die ein Gemisch aus Antikörpern gegen verschiedene Epitope darstellen [11].

Durch die Anpassung der Messdaten an eine hyperbolische Sättigungsfunktion (Gleichung (2)) wurde eine apparente Dissoziationskonstante von $K_D = (1.46 \pm 0.10) \times 10^{-8}$ M ermittelt. Dieser Wert liegt im nanomolaren Bereich, was typisch für die hohe Affinität von monoklonalen Antikörpern zu ihren Antigenen ist [3]. Zur Einordnung sei erwähnt, dass in [4] für einen Anti-BSA-mAb ein Assoziationskonstante von $K_A = (3.5 \pm 0.6) \times 10^7$ M⁻¹ berichtet wurde, was einem $K_D \approx 2.9 \times 10^{-8}$ M entspricht. Der Zusammenhang ergibt sich aus $K_D = 1/K_A$. Mathematisch bedeutet dies: $1/(3.5 \times 10^7) = (1/3.5) \times 10^{-7} \approx 0.286 \times 10^{-7} = 2.86 \times 10^{-8}$. Die hier bestimmte apparente Dissoziationskonstante stimmt damit in der Größenordnung gut mit publizierten Werten überein.

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung; ein niedriger K_D -Wert entspricht einer hohen Affinität. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich um eine apparente Konstante handelt. Da das Antigen an eine feste Phase gebunden ist, können sterische Effekte und Konformationsänderungen die Bindungseigenschaften im Vergleich zu einer Messung in Lösung beeinflussen [10]. Dennoch liefert der ermittelte Wert eine

gute quantitative Beschreibung der Interaktion unter den gegebenen Versuchsbedingungen, was durch die hohe Qualität des Fits in Abbildung 4 gestützt wird.

Ein weiteres wichtiges Merkmal eines ELISA ist die Nachweisempfindlichkeit. Diese gibt die geringste Konzentration eines zu analysierenden Moleküls an, die zuverlässig vom Hintergrundsignal unterschieden werden kann. Die Empfindlichkeit wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Eine hohe Affinität des Antikörpers ist das Fundament, da sie eine stabile Komplexbildung auch bei niedrigen Antigenkonzentrationen ermöglicht. Ebenso entscheidend ist die Effizienz des Reporterenzym. Die hier verwendete Alkalische Phosphatase (AP) besitzt eine hohe katalytische Aktivität, die zu einer starken Signalverstärkung führt, da ein einziges Enzymmolekül viele Substratmoleküle umsetzen kann [10]. Ein dritter Faktor ist das Signal-Rausch-Verhältnis. Unspezifische Bindungen des primären oder sekundären Antikörpers an die Plattenoberfläche erzeugen ein Hintergrundsignal, welches die Nachweisgrenze heraufsetzt [10]. Im durchgeführten Versuch wurde dieses Hintergrundsignal durch die Kontroll-Wells ohne primären Antikörper quantifiziert (Tabelle 1). Regelmäßige Waschschrte und der Einsatz von Detergenzien wie Tween 20 sind entscheidend, um diese unspezifischen Interaktionen zu minimieren [13].

Neben der Alkalischen Phosphatase wird häufig die Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) als Reporterenzym eingesetzt. Die HRP katalysiert die Oxidation eines Substrats durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [17]. Ein weit verbreitetes chromogenes Substrat für HRP ist TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). TMB ist in seiner reduzierten Form farblos, wird aber durch die katalytische Wirkung der HRP in Gegenwart von H_2O_2 zu einem blauen Produkt oxidiert. Die Reaktion wird üblicherweise durch Zugabe einer Säure, z.B. Schwefelsäure, gestoppt. Dies führt zu einem Farbumschlag nach gelb, dessen Absorption photometrisch bei 450 nm gemessen wird [1]. HRP ist ein kleineres Enzym als AP und zeichnet sich ebenfalls durch eine sehr hohe Wechselzahl aus [12]. Die Wahl des Enzyms hängt oft von der spezifischen Anwendung, den Kosten und der gewünschten Art der Detektion (kolorimetrisch, fluorimetrisch oder chemilumineszent) ab.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieses Versuchs erfolgreich ein indirekter ELISA etabliert werden, um BSA spezifisch nachzuweisen und die Affinität des verwendeten Antikörpers zu quantifizieren. Die Ergebnisse unterstreichen die hohe Spezifität und Affinität des monoklonalen Antikörpers (Klon BSA-33, aus Maus, Sigma # B 2901).

Literatur

- [1] 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine TMB membrane substrate, chromogenic, liquid / Sigma-Aldrich. de. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/t0565?srsltid=AfmB0ooLDR9SI1M71kvtHQ5PZ74g0u3sHp5l03JbFAaRsNECcm8yYy30> (besucht am 19.08.2025).
- [2] Navilla Apú u. a. „Development of an instrument-free and low-cost ELISA dot-blot test to detect antibodies against SARS-CoV-2“. eng. In: *Open Life Sciences* 18.1 (2023), S. 20220577. ISSN: 2391-5412. DOI: 10.1515/biol-2022-0577.
- [3] Jeremy M. Berg u. a. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum, 2018. ISBN: 978-3-662-54619-2.
- [4] N. H. Chiem und D. J. Harrison. „Monoclonal antibody binding affinity determined by microchip-based capillary electrophoresis“. eng. In: *Electrophoresis* 19.16-17 (Nov. 1998), S. 3040–3044. ISSN: 0173-0835. DOI: 10.1002/elps.1150191641.
- [5] Peter J. Delves. *Roitt's Essential Immunology*. eng. 1st ed. New York Academy of Sciences Series v.20. Newark: John Wiley & Sons, Incorporated, 2011. ISBN: 978-1-118-29385-0.
- [6] *ELISA-Test • einfach erklärt und Methode*. de. URL: <https://studyflix.de/biologie/elisa-test-3089> (besucht am 19.08.2025).
- [7] Sombat Kettrat, Deanpen Japrun und Prapasiri Pongprayoon. „Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin“. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 98 (Juli 2020), S. 107601. ISSN: 1093-3263. DOI: 10.1016/j.jmgm.2020.107601. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326319308927> (besucht am 19.08.2025).
- [8] Nancy Klimas, Anne O'Brien Koneru und Mary Ann Fletcher. „Overview of HIV“. eng. In: *Psychosomatic Medicine* 70.5 (Juni 2008), S. 523–530. ISSN: 1534-7796. DOI: 10.1097/PSY.0b013e31817ae69f.
- [9] Katarzyna M. Koczula und Andrea Gallotta. „Lateral flow assays“. In: *Essays in Biochemistry* 60.1 (Juni 2016). Hrsg. von Pedro Estrela, S. 111–120. ISSN: 0071-1365. DOI: 10.1042/EBC20150012. URL: <https://doi.org/10.1042/EBC20150012> (besucht am 19.08.2025).
- [10] Friedrich Lottspeich und Joachim W. Engels, Hrsg. *Bioanalytik*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2006. ISBN: 978-3-8274-1520-2.
- [11] David L. Nelson und Michael M. Cox. *Lehninger Biochemie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übers. der 5. amerikan. Aufl., korr. Nachdr. Springer-Lehrbuch. Berlin [u.a.]: Springer, 2011. ISBN: 978-3-540-68637-8.
- [12] SCBT. *Horseradish Peroxidase Antikörper / SCBT - Santa Cruz Biotechnology*. de. URL: https://www.scbt.com/de/browse/horseradish-peroxidase-antibodies?srsltid=AfmB0ooii49AQUH5FW7qhlV9ZLPITAepyudH5nnj3bLH8LuVpF_4PprR (besucht am 19.08.2025).
- [13] Arne Skerra. „Biochemisches Grundpraktikum“. Publisher: Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München. 2025.

- [14] Catharine M. Sturgeon u. a. „National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers“. eng. In: *Clinical Chemistry* 54.12 (Dez. 2008), e11–79. ISSN: 1530-8561. DOI: 10.1373/clinchem.2008.105601.
- [15] *UniProt – P02768 – ALBU_HUMAN*. en. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02768/entry>.
- [16] *UniProt – P02769 – ALBU_BOVIN*. en. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry>.
- [17] Nigel C. Veitch. „Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme“. In: *Phytochemistry* 65.3 (Feb. 2004), S. 249–259. ISSN: 0031-9422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942203006551> (besucht am 19.08.2025).
- [18] Enning Zhou u. a. „Characterization of physicochemical and immunogenic properties of allergenic proteins altered by food processing: a review“. en. In: *Food Science and Human Wellness* 13.3 (Mai 2024). Publisher: S. 1135–1151. ISSN: 2097-0765. DOI: 10.26599/FSHW.2022.9250095. URL: <https://www.sciopen.com/article/10.26599/FSHW.2022.9250095> (besucht am 19.08.2025).