

# Hintergrund bei Immunoassays

Hintergrund bei Immunoassays führt zu einer Verschlechterung der Qualität der Ergebnisse. Dies kostet den Anwender Zeit – und vor allem Geld, weil erneute oder häufigere Messungen notwendig werden. Wenig bekannt sind die verschiedenen Ursachen von erhöhtem Hintergrund und die Möglichkeiten hier gegenzusteuern. An Praxisbeispielen sollen Ursachen-spezifische und doch sehr einfache Lösungen des Problems erläutert werden.



Peter Rauch

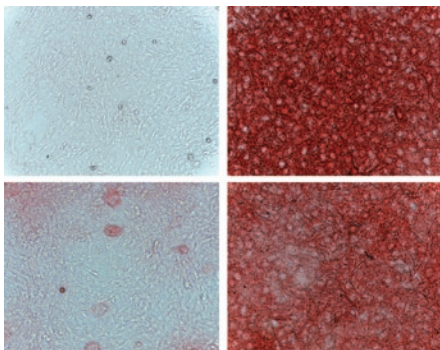


Abb. 1: Osteoblasten-Kultur mit Nachweis von Osteocalcin. Während die Verwendung einer BSA-Blockierung ein falsches Resultat liefert (oben rechts), konnte nach Austausch der Blocking Solution die erwartete Expression im Zeitverlauf (oben links und unten) dargestellt werden. (PD Dr. Wiesmann, Universität Münster)

Wer kennt die Probleme mit Hintergrund nicht? Der Western Blot ist fertig, man erkennt die Bande und ist sich sicher, dass man das gesuchte Protein nachgewiesen hat. Das Paper könnte fertig sein, aber der Blot hat einen derart schwarzen Hintergrund, dass man ihn nicht bei einem guten Journal einreichen möchte und kann. Das Wiederholen und Optimieren aller Arbeitsschritte und Inkubationszeiten beginnt von neuem. Ein anderes Beispiel: Die neuen Antikörper sollen für die Immunhistochemie eingesetzt werden. Doch angefärbt sind nicht nur die erwarteten Strukturen, auch andere Bereiche, in denen das Vorkommen des gesuchten Proteins nicht zu erwarten ist, sind flächig – wenn auch schwächer – angefärbt. Die Optimierung beginnt und kostet Wochen oder gar Monate.

Es gibt vielfältige Möglichkeiten, wieso Hintergrund bei Immunoassays die Interpretation von Laborergebnissen erschwert oder ganz unmöglich machen kann.

Die Ursachen für Hintergrund liegen in zwei ganz unterschiedlichen Bereichen. Zum einen gibt es adsorptive Ober-

flächeneffekte. Zum anderen gibt es aber auch eine ganze Reihe von verschiedenen mehr oder weniger spezifischen Effekten, die man als Matrixeffekte und Störeffekte zusammenfasst. Diese basieren nicht auf einfacher Adsorption, sondern auf nieder- und mittelaффinen Bindungen zwischen unterschiedlichen Bestandteilen der Probe, der Matrix, der Reagenzien und Antikörper.

## Adsorptive Oberflächeneffekte

Allgemein bekannt sind die adsorptiven Oberflächeneffekte. Blockierung ist die Abdeckung mit Substanzen, die in einem Überschuss angeboten werden, so dass sie die freie Bindungskapazität einer Oberfläche vollständig wie ein dichter Teppich bedecken. Wichtig ist, dass keine Lücken enthalten sind. Lücken führen dazu, dass eben doch noch Analyt, Antikörper oder auch andere Moleküle auf der Oberfläche binden, an die auch wieder Analyt oder Antikörper binden können. Hierdurch entsteht ein hoher Hintergrund, der die Auswertung des Ergebnisses erschwert oder gar verfälscht. Viele Standard-Rezepte basieren auf BSA als Blockreagenz. Aufgrund der Größe dieses Proteins handelt es sich hierbei jedoch um eine Blockierung mit Lücken. Für manche Assays genügt das. In vielen Fällen – vor allem bei kleinen Analyten – ist der Hintergrund jedoch vergleichsweise hoch. Ein weiteres Problem ist, dass die Antikörper für manche Assays durch Immunisierung mit BSA-gekoppelten Immunogenen gewonnen werden. Hier ist dann die Kreuzreaktivität mit BSA ein weiterer Grund für suboptimale Ergebnisse. Sofern möglich, sollte man also immer eine Blockierung wählen, die lückenlos ist und nicht zu Kreuzreaktivitäten mit den Antikörpern führt. Lückenlose Blockierung erreicht man mit einer statistischen Verteilung verschieden großer Moleküle wie es z.B. bei Casein-basierenden Lösungen der Fall ist. Die Herstellung ist im Normalfall

jedoch sehr umständlich und arbeitsintensiv. Mittlerweile gibt es Weiterentwicklungen dieser in der Literatur beschriebenen Rezepturen, die als fertige Lösung angeboten werden. Die „Blocking Solution“ von Candor Bioscience ist ein Beispiel für solch eine Lösung. Bei der Produktion wird eine chemische Modifikation am Casein durchgeführt. Man erhält dadurch ein weites Spektrum an Molekülen mit statistisch verteilter Größe und hierdurch wird eine sehr gute und reproduzierbare Blockierungseffizienz erreicht.

## Matrixeffekte und Störeffekte

Verschiedene Ursachen und Effekte von Kreuzreaktivitäten, Störern und Matrixeffekten sind in der Literatur ausreichend beschrieben. All dies beruht in der Regel auf nieder- und mittelaффinen Bindungen. Der neuartige Proben- und Antikörper-Verdünnungspuffer LowCross-Buffer setzt genau bei diesen Ursachen an. Unabhängig von der biologischen Ursache der Bindung werden mit dessen Hilfe nahezu alle niedrig- und mittelaффinen Bindungen bei einer Detektion gelöst und verhindert. LowCross stellt quasi einen Filter dar, der nur hochaffine Bindungen zulässt. Damit wird die eigentliche Bindung zwischen Analyt und Antikörper nicht beeinflusst, es sei denn, es handelt sich um einen Antikörper mit schlechter Affinität. Der Puffer führt dazu, dass das gewünschte Signal nicht reduziert wird, gleichzeitig aber der Hintergrund, dessen Basis z.B. Störer waren, deutlich reduziert oder ganz eliminiert wird. In der Anwendung ist der bisherige Puffer, in dem die Probe bzw. der Antikörper verdünnt wurde, nur durch LowCross zu ersetzen.

## Praxisbeispiele

Bei einem Assay ist im Vorfeld schwer abzuschätzen, ob es Hintergrund-Probleme geben wird oder nicht. Daher ist

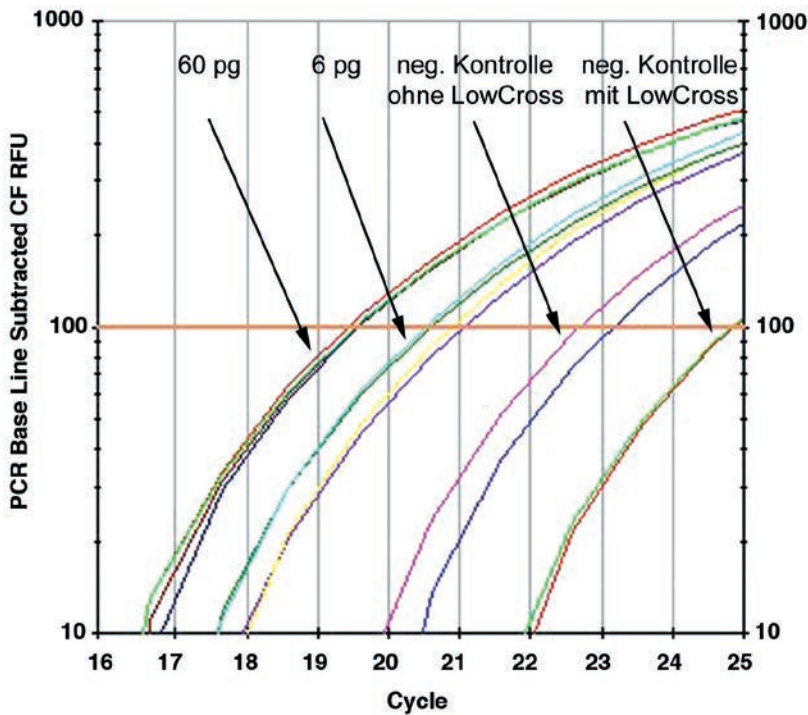


Abb. 2: Amplifikationsgraph einer real-time Immuno-PCR mit und ohne LowCross-Buffer. Durch LowCross kann der Threshold-Cycle (TC) der neg. Kontrolle um bis zu zwei PCR-Zyklen nach hinten verschoben werden (von 22,8 nach 24,8 Zyklen), ohne die positiven Proben signifikant zu beeinflussen. (Dipl.-Biol. Fischer, Universitätsklinikum Münster)

es immer sinnvoll, sowohl die Blockierung als auch den Probenpuffer an den Stand der Technik anzupassen. Häufig ist dies viel kostengünstiger, als die langwierige und Personal-intensive Optimierung zur Reduktion von Störeffekten und Hintergrund. An Beispielen sollen die Effekte der vorgestellten Lösungen dargestellt werden.

Zunächst ist eine nicht adäquate Blockierung in der Immunhistochemie gezeigt. Eine frische Osteoblasten-Kultur zeigt am ersten Tag keine oder nur eine sehr geringe Expression des extrazellulären Matrixproteins Osteocalcin. Unter Verwendung der Blocking Solution (Candor Bioscience) in Verbindung mit Anti-Osteocalcin (monoklonal, TaKaRa) wird diese Situation richtig dargestellt (Abb. 1, oben links). Ein falsch positives Ergebnis liefert hingegen die Standard-Blockierung mit BSA (Abb. 1, oben rechts). Mit zunehmender Kulturdauer baut sich die extrazelluläre Matrix auf und Osteocalcin wird synthetisiert. Die Zunahme kann bei Verwendung der Candor Blocking Solution gut erkannt werden, die Kulturen sind entsprechend intensiver gefärbt (Abb. 1, unten).

Die Immuno-PCR ist eine ultra-sensitiv Methode für den Nachweis geringster Spuren von Proteinen. Durch die extreme Signalverstärkung der PCR ist die

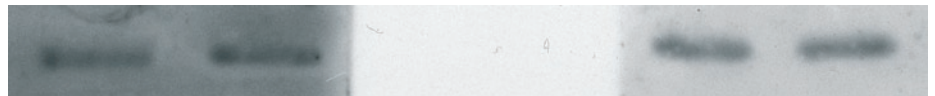


Abb. 3: Western-Blot, links vor und rechts nach Einsatz von Blocking Solution und LowCross. Nachweis von Myostatin in Mausmyoblasten mit anti-GDF-8 als Primärantikörper und rabbit anti-goat IgG-HRP auf einer Nitrocellulose-Membran NC45. (Dipl.-Biol. Siewert, Universität Ulm)

Methode besonders anfällig für falsch-positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindungen der Antikörper und der Detektor-DNA. Standardmäßiges Blocken mit 4,5% (w/v) Milchpulver o.ä. ist hierbei meist nicht ausreichend. Im vorliegenden Versuch wurden die Detektor-Antikörper in LowCross-Buffer auf 1 µg/ml verdünnt. Die Amplifikation einer real-time PCR von Versuchsansätzen mit und ohne LowCross-Buffer unterscheidet sich deutlich (Abb. 2). Es war so möglich 0,6 pg (ca. 0,8 amol/µl) des Antigens nachzuweisen.

Der klassische Fall des Western Blots mit starkem Hintergrund: Es wurde Myostatin (GDF-8; 12 kDa) in Mausmyoblasten (C2C12) mit anti-GDF-8 (Santa Cruz) auf Nitrocellulose NC45 (Serva) detektiert. Zur Blockierung wurde zunächst 2% Milchpulver und 1% BSA in TBS und als Antikörperverdünnungspuffer 0,3% BSA in TBS mit anschließender ECL-Detektion (Amersham) benutzt. Während

die Banden bei der konventionellen Methode fast im Hintergrund verschwinden, führt die Kombination von Blocking Solution und LowCross zur deutlichen Reduktion von unspezifischen Bindungen und Hintergrund (Abb. 3).

Beim vorliegenden ELISA wurde als Antigen Lysat aus humanem Nierenzell-Karzinom immobilisiert und eine serielle Verdünnung von zwei Immunsereen in Doppelbestimmung (1:50 bis 1:36450) A-G in den Spalten 1 bis 4 aufgetragen (Abb. 4). Die entsprechenden Präimmunsereen (1:50) wurden in Reihe H pipettiert. Das Ergebnis beim Standardpuffer im Vergleich zu LowCross ist eindeutig. Es ergibt sich eine bessere Sensitivität und der Level of Detection (LOD) wurde von 0,051 auf 0,022 und der Level of Quantification von 0,152 auf 0,065 gesenkt, bei gleichzeitig nach oben vergrößertem Messbereich. Die rein optische Begutachtung der Konzentrationsreihe mit bloßem Auge zeigt schon, dass LowCross die Qualität des Assays deutlich verbessert hat. Die beschriebene Verbesserung ist durch Eliminierung der falsch positiven Signale bei den Präimmunsereen und die Reduktion des Backgrounds zu erklären.

## Fazit

Erhöhter Hintergrund ist immer ein wesentliches Problem bei der Assay-Entwicklung. Beim Auftreten von Hintergrund hat der Anwender die Wahl zwischen meist aufwändiger und ergebnisoffener Optimierung der verschiedenen Arbeitsschritte, oder der Benutzung optimierter Puffer, die den aktuellen Stand der Technik darstellen. Moderne kommerzielle Fertigpuffer werden nach standardisierten Verfahren hergestellt und durchlaufen chargenweise Qualitätskontrollen, so dass der Anwender immer Produkte mit gleich bleibender Eignung erhält.

## Referenzen

- [1] Raem A. M. und Rauch P., eds: Immunoassays, Elsevier, Heidelberg, in press (2005)
- [2] Rauch P. *et al.*: Laborwelt 4, 33-39 (2005)
- [3] Miller J. J.: Clinical Laboratory International 28, 2, 14-17 (2004)

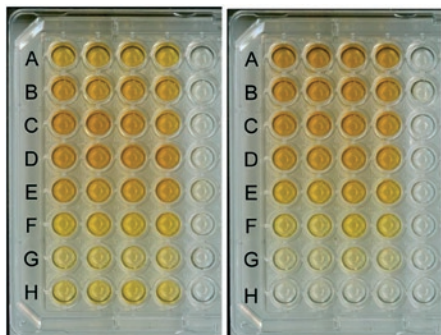


Abb. 4: ELISA mit Lysat aus humanem Nierenzell-Karzinom, links mit PBS/NaCl/Tween 20 und rechts mit LowCross. A-G: serielle Verdünnung von Immunsereen; entsprechende Präimmunsereen in H; Leerwert in Spalte 5. (Dr. Specht, Para BioScience, Gronau)

- [4] Kricka L. J.: Clinical Chemistry 45:7, 942-956 (1999)  
 [5] Kaplan I. V. und Levinson S.S.: Clinical Chemistry 45:5, 616-618 (1999)  
 [6] Wood W. G.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 205, 105-112 (1991)

**Dr. Peter Rauch**  
**Dr. Tobias Polifke**  
 Candor Bioscience GmbH, Münster

**PD Dr. Hans-Peter Wiesmann**  
 AG Tissue Engineering und Biomineralisation, Klinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie, Universität Münster

**Dipl. Biol. Andreas Fischer**  
 Institut für Med. Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster

**Dipl. Biol. Susanne Siewert**  
 Abteilung Allg. Zoologie und Endokrinologie, Universität Ulm

**Dr. Christoph Specht**  
 Para Bioscience GmbH, Gronau

**Korrespondenzadresse:**  
**Dr. Peter Rauch**  
 Candor Bioscience GmbH  
 Mendelstr. 7  
 48149 Münster  
 Tel.: 0251/980 28 79  
 Fax: 0891/488 299 616  
 p.rauch@candor-bioscience.de  
 www.candor-bioscience.de

# Immunoassays – Entwicklung und optimierte Puffer

ELISA, Western Blot, RIA, Immuno-PCR, Proteinchip und Immunhistochemie sind Immunoassays. Die häufig vernachlässigte Pufferauswahl ist hierbei wichtig für die analytische Zuverlässigkeit. Die Entwicklung guter ELISAs erfordert zudem die zielgerichtete Vorgehensweise eines erfahrenen Teams.

Candor ist sowohl mit seinen innovativen Produkten als auch mit kundenspezifischem Service klar fokussiert auf Immunoassays. Das ermöglicht optimale Qualität bei gutem Preis-Leistungsverhältnis – verbunden mit kompetenter Beratung.

## Produkte

Die Produkte sind in allen Anwendungen von Immunoassays nutzbar. Sie helfen sowohl die analytische Zuverlässigkeit als auch die Wirtschaftlichkeit zu erhöhen. Dies angefangen von der Universitätsforschung über die Pharma-Entwick-

lung bis hin zur Routine in diagnostischen Laboratorien. Der innovative Low-Cross-Buffer reduziert Kreuzreaktivitäten, Interferenzen und Matrix-Effekte, die insbesondere bei Blut-, Serum- und Gewebeproben auftreten können. Die Candor Bufferline gestaltet mit ihren ready-to-use Lösungen die Arbeit des Anwenders einfacher, sicherer und vor allem effizienter – also kostengünstiger.

## Dienstleistungen

Das Team von Candor besitzt langjährige Erfahrung in der Entwicklung, Optimierung und Validierung von ELISAs für die Pharmaforschung und die diagnostische Industrie. Der Kunde erhält neben dem systematisch optimierten Assay auch detaillierte Arbeitsanweisungen (SOP). Das Angebot in der Immunhistochemie um-



Das Gründerteam der Candor Bioscience

fasst neben Schnitten, histologischer Begutachtung und der 3-D Rekonstruktion auch Einfach- und Mehrfach-Färbungen zur Detektion verschiedener Analyte in einem Schnitt.

**Candor Bioscience GmbH**  
 Dr. Peter Rauch  
 Mendelstr. 7,  
 48149 Münster  
 Tel.: 0251/980 28 79  
 Fax: 0891/488 299 616  
 www.candor-bioscience.de  
**Biotechnica Halle 2, Stand F35**