

DER „RICHTIGE“ BLOCKIERER – EINE KURZE ÜBERSICHT



Warum muß man blockieren?

Für die Durchführung von Immunoassays müssen freie Oberflächen blockiert werden. Dies gilt unabhängig von der verwendeten Methode wie z.B. **ELISA**, **Protein Arrays**, **Immuno-PCR**, **Western Blot** oder **Immunhistochemie**.

Die Oberflächen von ELISA-Platten oder auch Western Blot Membranen sind dahingehend optimiert, daß eine möglichst gute Anbindung und hohe Belegungsdichte mit Proteinen bzw. Antikörpern erreicht wird. Dies ermöglicht optimale Assays durch eine hohe Belegungsdichte mit Fänger-Antikörpern bzw. Fänger-Molekülen.

Es ist aber auch unvermeidbare Folge dieser Optimierung, daß auch andere Proteine und Peptide sehr gut an diese Oberflächen binden können. Die Anbindung ist reversibel. Ohne Blockierung würden Assay-Antikörper, Tracer, Analyten oder auch andere Bestandteile der Probe an die Oberflächen anbinden. Dies kann zu falschen Ergebnisse oder einem hohen Hintergrundsignal führen. Die Anbindung von Detektor-Antikörpern direkt an ein ELISA-Well würde also auch dann zu einem Signal im Assay führen, wenn gar kein Analyt vorhanden wäre. Dies gilt es zu verhindern. Die Blockierung dient also der Absättigung freier Bindungsstelle auf den jeweiligen Oberflächen. Diese Absättigung erreicht man, indem alle freien Oberflächen mit einer möglichst lückenlosen Schicht von Molekülen belegt werden.

Wie blockiert man?

Nachdem die ELISA-Platte mit den Fänger-Antikörpern (bzw. dem Antigen) gecoatet (beschichtet) wurde, sind die noch freien Bereiche der Oberfläche zu blockieren. Eine Lösung zur Blockierung von Oberflächen enthält eine blockierende Substanz in hoher Konzentration. Man inkubiert diese Blockierungs-Lösung im Well. Dies führt dazu, dass sich an die noch freien Stellen der Oberfläche die blockierende Substanz adsorptiv anlagert. Im Idealfall bildet sich so eine vollkommen geschlossene und dichte Schicht. Die Inkubationszeit kann bei sehr guten Blockierern extrem kurz sein. Generell ist es jedoch empfehlenswert, die Arbeitsabläufe so zu gestalten, daß man eine längere Inkubationszeit zur Blockierung nutzen kann. Üblich sind Werte von 1–2 h bzw. auch die Inkubation über Nacht. Nach dem Blockieren kann man direkt den Assay durchführen.

Empfehlenswert ist aber auch eine anschließende Stabilisierung mit **Liquid Plate Sealer®**. Dies kann die Bindung der Fänger-Antikörper an den Analyten und damit die Ergebnisse des Assays verbessern und zusätzlich kann man die ELISA-Platte länger lagern, bevor man sie benutzt. Dieser Stabilisierer wird analog zur Blockierungslösung in den Wells der ELISA-Platte inkubiert. Liquid Plate Sealer® umschließt dabei die Fängerantikörper bzw. gecoateten Antigene mit einer Schutzschicht, die leicht wieder löslich ist. Diese Schicht hat zwei Wirkungen.

Erstens bewirkt sie direkt und unmittelbar eine Konformationsverbesserung bei vielen Fänger-Antikörpern bzw. Antigenen. Schon während der Inkubation und anschließenden Trocknung der ELISA-Platte im Inkubator geschieht diese Verbesserung der Konformation. Dies zeigt sich in einer höheren Bindekapazität der Fänger-Antikörper im Vergleich zu unbehandelten Fänger-Antikörpern. Die zweite Wirkung ist eine langfristige Stabilisierung der gecoateten Biomoleküle. ELISA-Platten lassen sich so über lange Zeiträume bei 4°C lagern. Dies erleichtert in vielen Fällen die Abläufe im Labor, da man Platten auf Vorrat beschichten und lagern kann. Die Stabilisierung kann man auch für die Verbesserung der Varianz von ELISA nutzen. Die positiven Effekte des Liquid Plate Sealer® sind – wie alle Phänomene in der Bioanalytik – stark abhängig von den jeweils verwendeten Biomaterialien, also den Antikörpern bzw. Antigenen. Daher lassen sich diese positiven Effekte nicht für alle Assays generell quantifizieren, sondern nur bezogen auf den jeweiligen Assay betrachten.

DER „RICHTIGE“ BLOCKIERER – EINE KURZE ÜBERSICHT



Welches ist der ideale Blockierer?

Es gibt leider keinen idealen Blockierer, der in jedem Fall für alle Assays optimal ist. Ein Blockierer muß immer abgestimmt auf den jeweiligen Assay ausgewählt werden. Aufgrund der Optimierung von ELISA-Platten oder Western-Blot Membranen für die Protein- bzw. Peptid-Bindung sind generell Protein-basierende Blockierer effektiver als andere Blockierungslösungen. Besonders synthetische Blockierer sind den mit Proteinen oder Peptiden arbeitenden Lösungen meist stark unterlegen.

Der Klassiker: Blockierung mit BSA

BSA-Block ist ein klassischer Blockierer auf BSA-Basis. BSA war als eines der ersten Proteine in guter Reinheit und entsprechenden Mengen für Forschungszwecke verfügbar. Aus diesem Grunde wurde es schon früh auch für die Entwicklung von Immunoassays als Blockierungsreagenz genutzt. Das Produkt **BSA-Block** wird im zertifizierten Produktionsbetrieb aus gereinigtem BSA hergestellt. Die Chargen-Variabilität ist gering. Die Blockierungseffektivität ist nicht optimal, aber für viele Assays vollkommen ausreichend. Dennoch ist **BSA-Block** für einige Assay genau der optimale Blockierer. Es gibt Antikörper, die nur in Anwesenheit von BSA optimale Bindungseffizienz zeigen. Wenn solche Antikörper als Fänger gecoatet werden, zeigen sie die besten Ergebnisse nur, wenn sie anschließend mit BSA blockiert werden. **BSA-Block** wird also für spezielle Antikörper bessere Assay-Resultate als andere Blockierer erzielen, weil die Aktivität der Fänger-Antikörper positiv beeinflusst wird. Durch die Kombination mit nachfolgender Inkubation mit **Liquid Plate Sealer®** als Stabilisierer für die gecoateten Antikörper lässt sich der positive Effekt von BSA auf solche Antikörper meist noch deutlich verstärken. Die Blockierungseffektivität ist sehr gut im Vergleich zu synthetischen Blockierern, jedoch im Vergleich zu modernen Blockierungslösungen meist unterlegen.

Der effizienteste Blockierer

In vielen Assays ist hohe Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig optimaler Wirtschaftlichkeit das eigentliche Ziel. Für solche Assays wurde von CANDOR ein Peptid-basierter Blockierer entwickelt. **SmartBlock™** ist als Blockierungslösung extrem gut geeignet, um wiederkehrend und zuverlässig gute Ergebnisse zu erzielen. Die Chargen-Variabilität ist ähnlich niedrig, wie dies von rein synthetischen Blockierern her bekannt ist. Der entscheidende Unterschied ist jedoch, daß **Smart-Block™** als Peptid-basierter Blockierer auf Immunoassays und dort verwendete Oberflächen optimal abgestimmt ist. Auf einer Oberfläche, die Antikörper binden kann, wird auch **Smart-Block™** optimal binden, da er auf Peptiden basiert. Eine chemische Optimierung der Peptide begünstigt die Bindung an Protein-bindende Oberflächen zusätzlich. Damit ist die Wirksamkeit im Vergleich zu vielen anderen Blockierern erhöht. Dennoch ist es ein sehr wirtschaftliches Produkt, das auch in der Produktion von ELISA-Kits und beim Western Blotting Anwendung findet. **SmartBlock™** bietet sich für Forschungsassays in vielen Bereichen als der effizienteste Blockierer an.

Der effektivste Blockierer

Casein ist als sehr gut geeignetes Blockierungsprotein seit Jahren in der Literatur beschrieben. Die Wirksamkeit zur Blockierung ist häufig besser als beim BSA. Casein wird in vielen kommerziellen Blockierungslösungen angeboten. Dabei ist es üblich, dass Casein in Lösung gebracht wird und dann meist noch filtriert wird, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. CANDOR bietet mit dem Produkte **The Blocking Solution** ebenfalls einen Blockierer auf Casein-Basis an. Dieser ist jedoch nicht mit herkömmlichen Casein-Blockierern vergleichbar. In einem proprietären von CANDOR entwickelten Produktionsverfahren wird hoch-gereinigtes Casein zunächst chemisch modifiziert. Im Verlauf der Produktion wird dann dieses modifizierte Casein fragmentiert.

DER „RICHTIGE“ BLOCKIERER – EINE KURZE ÜBERSICHT



Das Ergebnis ist eine Lösung mit einem weiten und gleichmäßigen Spektrum an unterschiedlich großen Spaltprodukten des modifizierten Caseins. Trotz des komplizierten Fragmentierungsprozesses ist die Chargenvariabilität extrem gering. Jede Charge von The Blocking Solution wird dieselben reproduzierbaren Ergebnisse in Assays erzielen. Dies begünstigt den Einsatz z.B. in GLP-Laboren oder in der Produktion von modernen Hochleistungs-Diagnostika mit niedrigen Nachweisgrenzen u.a. für moderne Biomarker. Das Ergebnis des modernen Herstellprozesses ist ein extrem wirksamer Blockierer. The Blocking Solution erreicht eine Blockierungs-Effektivität, die so gut ist, daß der Unterschied zwischen dieser Blockierung und alternativen Blockierungen, wie z.B. durch BSA, einfach über die Ermittlung von Variationskoeffizienten quantifizierbar ist. Die extrem hohe Wirksamkeit von The Blocking Solution ist nicht in jedem Assay erforderlich. Für Assays in kritischen Anwendungen, bei denen die genaue und immer wieder zuverlässige Quantifizierung des Analyten wichtig ist oder auch in Assay mit denen seltene und wertvolle Proben vermessen werden, ist die Anwendung von The Blocking Solution aber immer empfehlenswert.

Gibt es Blockierer, die man nicht einsetzen sollte?

Abzuraten ist von Blockierern, die in ihrer Zusammensetzung stark schwanken können bzw. verunreinigt sein können. Bei diesen Blockierern kann man mitunter deutlich wechselnde Ergebnisse bzw. unterschiedlichen Hintergrund beobachten, wenn man eine neue Charge des Blockierers einsetzt. In regulierten Bereichen, wie z.B. GLP-Laboratorien oder in der Produktion von Human-diagnostischen Kits ist der Einsatz von solchen Blockierern mit schwankender Zusammensetzung oder sich von Charge zu Charge verändernder Reinheit daher nicht zulässig bzw. erfordert eine sehr umfangreiche Validierung für jede neue Charge.

Zu diesen Blockierern mit möglicherweise starken Schwankungen gehören Blockierer auf Milchpulver-Basis genauso wie viele kommerziell erhältliche Blockierer, die z.B. auf verschiedenen Fischextrakten basieren. Insbesondere bei der Verwendung von Milchpulver als Blockierer sollte man sich darüber im Klaren sein, daß es sich nicht um eine Labor-Chemikalie, sondern um ein Lebensmittel handelt. Milchpulver ist daher zwar die billigste Möglichkeit zu blockieren, diese sollte aber nur dann eingesetzt werden, wenn schwankende oder unklare Ergebnisse aufgrund von Verunreinigungen völlig unkritisch sind. Ein sinnvoller Anwendungsbereich für Milchpulver als billiger Blockierer sind daher Assays im Ausbildungsbereich z.B. an Universitäten.

Sofern die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wesentlich ist, sollte man Milchpulver oder ungereinigte Blockierungsextrakte eher vermeiden. Blockierer auf Basis von Fischextrakten können theoretisch durchaus geeignet sein, wenn es sich um standardisierte Quellen des Materials und standardisierte Produktions- und Reinigungsmethoden handelt. Dergleichen ist jedoch schwer im Markt erhältlich. Das begründet letztlich die teilweise zu beobachtenden Schwankungen von Charge zu Charge.

Es lässt sich zusammenfassen, dass man für jeden Assay den jeweils optimalen Blockierer suchen und finden muß. Bevor man den geeigneten Blockierer auswählen kann, ist als erstes die Frage zu klären, wie wichtig die Qualität des resultierenden Assays bzw. der resultierenden Ergebnisse ist. Sofern die Proben sehr wertvoll sind oder die Ergebnisse (z.B. aufgrund von regulatorischen Anforderungen) immer richtig sein müssen, ist auf sehr hohe Effektivität der Blockierung zu achten. Je geringer die Anforderungen an die Qualität der Ergebnisse, desto eher kann auf ungereinigte oder einfache Blockierer zurückgegriffen werden. Assays, die nur zu Ausbildungszwecken z.B. an Universitäten oder Schulen durchgeführt werden, können daher zumeist selbst mit Milchpulver (einem wenig standardisierten und charakterisierten Lebensmittel) problemlos durchgeführt werden.