

Arbeitsprotokoll

Allergie

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Eine Allergie ist eine ernstzunehmende Störung des körpereigenen Abwehrsystems. Die Störung besteht in der unverhältnismäßig heftigen Reaktion des Immunsystems, auf an sich ungefährliche Stoffe, wie Blütenstaub, Hausstaubmilben, Katzenhaare, verschiedene Nahrungsmittel und ähnliches.

Das Immunsystem dient der Abwehr von Krankheiten. Es unterscheidet hierzu zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen und schützt den Körper vor Stoffen, die ihm schaden können, wie Bakterien oder Viren. Kommt der Körper mit Infektionserregern (Antigenen) in Berührung, merken sich sogenannte Gedächtniszellen den genauen Aufbau dieser Stoffe, passende Antikörper werden gebildet, um sie bei erneutem Kontakt erfolgreich abwehren zu können. Auf diese Art hält sich der Körper dann bestimmten Krankheiten gegenüber lebenslang immun.

Bei der Allergieentwicklung nennt man diesen Vorgang „Sensibilisierung“. Der Körper wird für einen bestimmten allergieauslösenden Stoff sensibilisiert, passende Antikörper werden produziert. Erst bei erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es dann zu einer allergischen Reaktion. Wodurch diese Störung hervorgerufen wird, lässt sich nicht eindeutig bestimmen und ist individuell verschieden.

Im Labor wird ein Proteinextrakt aus Birkenpollen hergestellt. Die in diesem Proteinextrakt enthaltenen verschiedenen Proteine werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Mit Hilfe verschiedener Antikörper soll mittels Western-Blotting eine Charakterisierung der einzelnen Birkenproteine durchgeführt werden. Weiters wurde den Schülern unter ärztlicher Aufsicht 20 ml Blut abgenommen, und das Serum daraus gewonnen. Inkubation der Birkenpollen mit diesem Serum soll zur Identifizierung etwaiger allergischer Reaktionen der Schüler auf Birkenallergene (z.B. Betv I) führen. Eine allergische Reaktion würde durch die Bindung von IgE Antikörpern aus dem Serum angezeigt werden. Keine allergische Reaktion stellt die Bindung von IgG Antikörpern an verschiedene Proteine des Birkenpollenextraktes dar. Diese Bindung kann bei allen Menschen nachgewiesen werden. Weiters soll durch die

Verwendung eines Betv 1 spezifischen monoklonalen Antikörpers das Hauptallergen der Birke nachgewiesen. zugänglich gemacht.

Homologe Proteine des Hauptallergens der Birke (Betv I) sollen schließlich auch in anderen Pflanzen (verschiedene Obst und Gemüsesorten) nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt dabei direkt an der Membran wo zuvor dünne Gewebeschnitte aufgedrückt wurden.

2 Experimentelle Vorgangsweise

Material für Gelguss und Gellauf:

Glasplatten, Spacer, Dichtungsgummi, Kämme
 Reagenz C (500 ml): 150g Acrylamid, 4g Bisacrylamid
Lower Puffer (500 ml): 90.85g Tris, 20ml 10% SDS
 pH 8.8 mit HCl
Upper Puffer (500ml): 30.28g Tris, 20ml 10% SDS
 pH 6.8 mit HCl
 APS, TEMED
 Isobutanol, Aqua bidest
 Probenpuffer 4x: 1.51g Tris, 4g SDS, 20ml Glycerin,
 10ml Mercaptoethanol, 2mg Bromphenolblau
 Laufpuffer 10x: 30.3g Tris, 146.1g Glycin, 10g SDS
 add 1l A.dest, pH 8.3 mit HCl

2.1 Gießen der SDS-Gele

- Die Glasplatten werden wie in Abb. 1 zu sehen zusammengebaut.
- Die Lösung für das Trenngel wird aus den einzelnen Komponenten hergestellt (Tab.1). Am Schluss werden TEMED und APS zugegeben, damit die Polymerisation starten kann.
- Das Trenngel wird bis 1 cm unter den Rand gegossen, und dann mit Isobutanol überschichtet. Die Polymerisationsdauer beträgt ca. 1 h. Dann hat sich ein schmaler Wasserfilm zwischen Isobutanol und Trenngel gebildet.
- Das Isobutanol und Wasser wird abgeleert, und das Trenngel mit dem Sammelgel (4.8 %) überschichtet. Zum Abschluss wird ein Kamm (Abb. 2) eingesteckt. Dieser sorgt für die

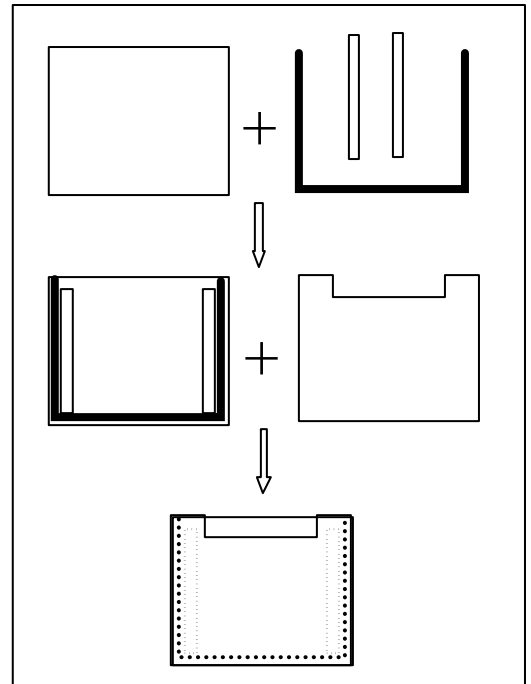


Abb.1 : Glasplatten

Besondere Vorsicht im Umgang mit Reagenz C walten lassen!
 Gesundheitsschädlich!

APS und TEMED sind Polymerisationshilfen.
 Isobutanol sorgt für Polymerisation unter Sauerstoffabschluss.

	15% Trenngel	Sammelgel I
Anzahl	1	1
Reagenz C	4 ml	0.35 ml
LP / UP	2 ml LP	0.55 ml UP
A.Dest	2 ml	1.3 ml
TEMED	4 µl	2.5 µl
10% APS	24 µl	15 µl

Tab. 1: Gelkomponenten

Ausnehmung zum späteren Laden der Proteine.
 Polymerisationsdauer ca. 15 Min.

2.2 Zusammenbau der Gelapparatur

- Pro Apparatur werden 2 Gele zusammengebaut. Man zieht die Kämme aus dem Gel. Die Glasplatten werden luftblasenfrei in den unteren Puffer eingesetzt, und mit Laufpuffer überschichtet. Am Schluss werden die Kämme vorsichtig entfernt (Abb. 3). Die Befestigung der Platten an der Apparatur erfolgt mit Klammern.

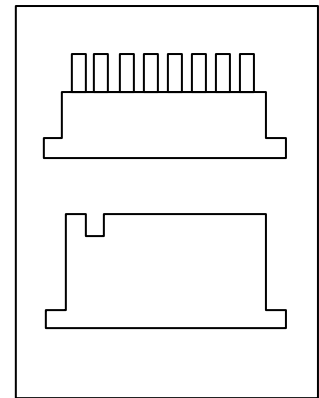
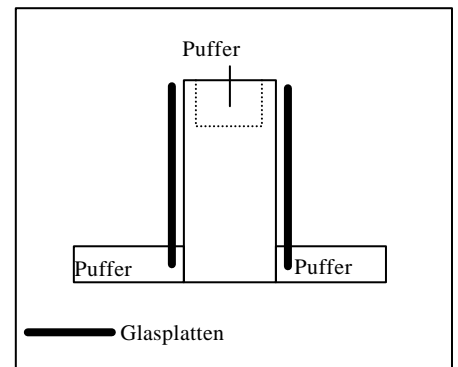


Abb. 2: Analytischer Kamm oben
 Präparativer Kamm unten

2.3 Laden der Proteine und Gellauf

- Pro Slot werden für das analytische Gel 10 µg Protein aufgetragen. Das entspricht 10 µl des Birkenpollenextraktes. Die Proteinsuspension wird mit 4 µl Loadingpuffer gemischt und bei 95°C für 5 Min. denaturiert. Unmittelbar danach wird die Probe aufgetragen.
- Zur Größenbestimmung wird ein Marker (Tab.2) aufgetragen. 1 µl Marker plus 4 µl Loadingpuffer wird in einen Slot aufgetragen.
- Der Gellauf erfolgt in 2 Etappen. 100 V im Sammelgel, und 150 V im Trenngel. Dauer der Elektrophorese ca. 2 h.

Denaturieren: Aufbrechen der
 Proteinfaltung



2.4 Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels

Material für Coomassie und Western-Blot:

Färbelösung: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250
 50% Methanol, 10% Eisessig, 40% A.dest
 Entfärber: 40% Methanol, 10% Eisessig, 50% A.dest
 Transferpuffer 5l: 15.13g Tris, 72.05 Glycerin,
 1l Methanol, ad 5l A.dest
 Membran und Whatman in der Größe der Gele
 Ponceaurot S: 0.1% Ponceaurot, 1% Essigsäure
 Blocking-Puffer 1l: 25mM TrisCl, 150mM NaCl,
 0.5% BSA, 0.05% NaN₃, 0.5% Tween20
 pH-Shift-Puffer: 100mM TrisCl (pH9.5),
 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

Abb. 3: Aufbau der Gelapparatur

Protein	MW(kD)	Farbe
Ovalbumin	46	gelb
Carbonic anhydrase	30	orange
Trypsin-Inhibitor	21	grün
Lysozym	14.3	magenta
Aprotinin	6.5	schwarz
Insulin β-Kette	3.4	blau
Insulin α-Kette	2.35	blau

Tab. 2: RPN 755 Marker **Amersham**

- Die Glasplatten werden aus der Gelapparatur genommen, und vorsichtig mit einem Spatel getrennt. Das analytische Gel wird in eine Wanne mit Coomassie-Färbung gelegt, und unter ständigem Schütteln für 1 h gefärbt.

Whatman: In der Molekularbiologie
 verwendetes Spezialpapier.

Die Membran nie mit den Fingern
 berühren.

- Nach der Färbung wird das Gel im Entfärber solange inkubiert, bis jener Farbstoff der nicht an Proteine gebunden hat ausgewaschen wurde. Am Ende wird das Gel noch 30 Min. in A.dest gequellt.
- Nach der Färbung wird das Gel auf eine Lichtbox gelegt und fotografiert.

2.5 Western Blot

- Vor dem Zusammenbau wird das präparative Gel einige Minuten in Transferpuffer equilibriert.
- Als Membran wird eine Immobilon-P (PVDF) Transfermembran (0.45µm Porengröße) verwendet. Diese wird für 30s in Methanol geschwenkt, und bis zur Verwendung in A.dest inkubiert.
- In Abb. 4 sind die einzelnen Schichten der Blotvorrichtung zu sehen. Zwischen den Lagen sollten keine Luftblasen vorhanden sein. Der Zusammenbau erfolgt in einer Wanne mit Transferpuffer.
- Geblotet wird bei 4°C für 1h bei 250mA, in der Blotting-Kammer. Zur besseren Wärmeverteilung wird ein Rührfisch in die Kammer gegeben.
- Nach dem Blotten wird die Membran auf einer Lage Whatman getrocknet.

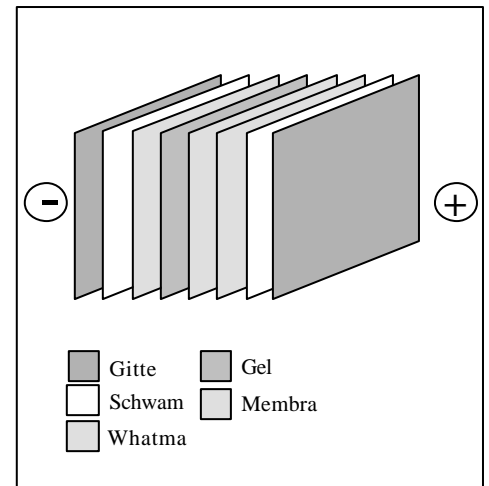


Abb. 4 Elektro-Blotting

Equilibrieren: in ein Gleichgewicht bringen

2.6 Ponceaurot-Färbung

- Die Membran wird für 30s in einer Petrischale mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend sofort mit A.dest entfärben.
- Dieser Schritt dient dem Sichtbarmachen der Proteine an der Membran. Die Färbung ist reversibel, und beeinträchtigt keine der weiteren Experimente.
- Die Seite der Membran ohne Protein wird mit einem Strich markiert. Dieser dient später auch zur Bestimmung der Proteingröße anhand des verwendeten Markers.

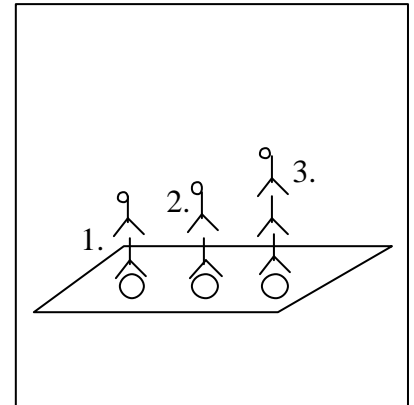
2.7 IgE - Blot

- Die Membran wird in kleine Streifen zerschnitten, und in einer speziellen Kammer der weiteren Verwendung zugeführt. Wichtig: der Marker und der Rest der Membran werden Coomassie gefärbt!

- Damit unsere Antikörper nicht unspezifisch an der Membran binden, müssen deren freie Bindungsstellen mit Blocking-Puffer abgesättigt werden. Dieser Schritt erfolgt mit 1ml Puffer, der nach 10 Min. gewechselt wird. Dann mit 1ml Blocking-Puffer erneut 10 Min. inkubieren. Dieser Schritt wird anschließend ein drittes Mal wiederholt.
- Das IgE-haltige Serum wird in Blocking-Puffer 1 : 3 auf ein Volumen von 700µl verdünnt. Damit werden die Membranen o / n bei 4°C inkubiert. (Alternativ dazu. 5 h inkubieren)
- Am nächsten Tag werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1ml Blocking-Puffer für jeweils 10 Min. entfernt.

Achtung: Serum ist potentiell gefährlich!

o/n: over night



2.8 IgE-Nachweis mit 2. Antikörper

- Der Nachweis erfolgt mit einem AP-mouse-anti-human-IgE-Antikörper. Dieser ist an eine alkalische Phosphatase gekoppelt, mit der eine Farbreaktion den IgE Antikörper indirekt nachweisen kann.
- Der 2. Antikörper wird 1 : 500 auf ein Volumen von 700µl verdünnt. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei RT. Nichtgebundene AK werden wieder durch waschen mit Blockingpuffer (3 x 10 Min., 1 ml) entfernt
- Zur besseren Übersicht der verwendeten Antikörper, insbesondere der Reihenfolge, siehe Abb. 5.

2.9 Farbreaktion

- Nach dem Waschen der Membranen werden diese mit 1 ml pH-Shift Puffer für 5 Min. equilibriert.
- 1 Tablette (NBT/BCIP) wird in 10ml A.dest aufgelöst. Die Membran wird mit 0.5 – 1.0 ml dieser Farblösung überschichtet, und ohne Schütteln im Dunkeln stehen gelassen. Der Farbverlauf wird dabei gelegentlich überprüft. Nach genügender Färbung wird mit A.dest gewaschen.
- Für die Dokumentation wird der Filter an der Luft getrocknet.

Abb. 5: Antikörperkaskaden

- 1.: human-IgE (Serum)
Mouse-anti-human-IgE
- 2.: Mouse-anti-Betv1
monoklonal
Rabbit-anti-mouse
- 3.: human-IgG (Serum)
Rabbit-anti-human-IgG
Goat-anti-rabbit

RT: Raumtemperatur

2.10 IgG - Blot

- Mit diesem Blot soll gezeigt werden, dass alle Menschen eine Immunreaktion auf Proteine der Birke zeigen. Dies ist keineswegs krankhaft!
- Das humane Serum wird auf ein Volumen von 700µl 1:50 verdünnt. Die Inkubation erfolgt o/n. Ungebundener Antikörper wird wie oben gewaschen.
- Als 2. Antikörper wird Rabbit-anti-human verwendet. Dieser wird 1 : 500 in einem Volumen von 700µl verdünnt. Inkubation für 1 h, und 3 x á 10 Min. waschen. Menge: 1ml Blocking-Puffer.
- Da der 2. Antikörper noch nicht mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, muss ein weiterer Antikörper verwendet werden. Dieser 3. Antikörper wird 1 : 2000 auf ein Volumen von 700µl verdünnt, und wie der 3. AK inkubiert. Auch die Waschungsschritte sind die selben. Anschließend kann die Farbreaktion durchgeführt werden.

Dieser Schritt wird zeitgleich mit dem IgE – Blot durchgeführt.

Das Volumen versteht sich pro Membranstreifen der inkubiert werden soll. Es muss mit der Anzahl der zu inkubierenden Streifen multipliziert werden.

2.11 Nachweis von Betvl

- Betvl ist das Hauptallergen der Birke. Mit einem Monoklonalen Antikörper soll dieses Protein an der Membran nachgewiesen werden. Hier sind, wie in Abb. 5 ersichtlich, 2 Antikörper nötig.
- Der 1. AK (Mouse-anti-Betvl) wird in einem Volumen von 700µl 1 : 20 verdünnt. Nach einer Inkubation von 1 h werden die oben bereits beschriebenen Waschungsschritte durchgeführt.
- Der 2. AK (Rabbit-anti-mouse) wird in einem Volumen von 700µl 1: 500 verdünnt. Inkubation und Waschungsschritte wiederum 1 h, bzw. 3 x 10 Min. mit 1ml Blocking-Puffer. Dieser Antikörper ist bereits mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt, und die Farbreaktion kann anschließend durchgeführt werden.

Auch dieser Schritt läuft parallel zu den beiden anderen Reaktionen ab. Mit der Farbreaktion wird erst begonnen, wenn alle Antikörper-inkubierungsschritte beendet sind

2.12 Analyse von Gewebeschnitte

- Um zu zeigen, dass Betv1 homologe Proteine auch in anderen Pflanzen zu finden sind, wird eine Analyse von verschiedenen Gewebeschnitten durchgeführt.
- Mit dem Skalpell werden feine Obst oder Gemüseschnitte hergestellt. In Frage kommen: Apfel, Sellerie, Karotten, Kartoffel, Banane, Tomate, Paprika, Birne, Gurke.
- Eine Nitrozellulosemembran wird in 0.2M CaCl_2 für 30 Min. equilibriert. Dann trocknen lassen.
- Auf diese Membran werden die Gewebeschnitte vorsichtig aufgedrückt.
- Zum Nachweis wird der monoklonale Antikörper Mouse-anti-Betv1 verwendet. Das Protokoll ist das Selbe wie oben. Die genauen Volumen richten sich nach der Membrangröße, und werden im Kurs bekannt gegeben.