

# ELISA Verfahren für die Messung von Diphtherie Antitoxin Antikörpern (IgG)

WOLF D. KUHLMANN

*Radioonkologie, Klinische Kooperationseinheit Strahlentherapie DKFZ Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg*

---

## Reagenzien

1. Puffer für die Beschichtung  
0,06 M Carbonatpuffer pH 9,6  
1,6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
2,9 g NaHCO<sub>3</sub>  
0,9 g NaN<sub>3</sub>  
lösen in A. dest. ad 1.000 ml
2. Lösung für die Antigenbeschichtung  
Diphtherie-Toxoid (Behringwerke, Marburg),  
2.900 Lf/ml, 1.730 Lf/mg N (Lf = Lime flocculating units of diphtheria toxoid),  
10,5 g Eiweiß/1 (Kons.-Mittel: 0,05 mg/ml Natriumtimmerfonat),  
Gebrauchslösung: Diphtherie-Toxoid 1:6.400 in Carbonatpuffer
3. Blockierungslösung  
1% BSA/PBS pH 7,4
4. Waschpuffer, Verdünnungspuffer  
0,05% Tween 20 in PBS pH 7,4 (v/v)  
PBS pH 7,4  
8,0 g NaCl  
2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,2 g KCl  
lösen in A. dest. ad 1.000 ml
5. Standard, Kalibrierung
  - a) Standard: Poolserum von verschiedenen Patienten mit hohem Antitoxin-Titer, kalibriert mit Diphtherie-Standard-Serum vom Pferd (9 IE/ml, Behringwerke) im indirekten Hämagglutinationstest.

- b) Alternativ: Kalibrierung des Poolserums im Tierversuch oder im **Vero-Zelltest**; ggf. auch Verwendung eines im Tierversuch kalibrierten Beriglobins (z.B. Beriglobin Charge 072021, enthält 10 IE/ml Diphtherie-Antitoxin).
6. Probenverdünnung
- Standards, Positiv-Kontrolle und Patientenproben werden in 1% BSA/PBS verdünnt
  - Routineverdünnung für Patientenproben 1:100
  - Leerwert (blank): 1% BSA/PBS
7. Sandwich Antikörper (Enzym markiert)
- Alkalische Phosphatase markierte Antikörper (z.B. Ziege Anti-Human IgG (H+L), absorbiert mit Rind-, Pferd-, Maus-Serumproteine; z.B. Dianova 109-055-088),  
Gebrauchsverdünnung 1:5.000 in 1% BSA/PBS.
8. Enzymsubstrat und Stopplösung
- p-Nitrophenylphosphat (PNP, z.B. Merck 14001); 1 Substratablette lösen in 10 ml Diethanolamin-HCl Puffer (z.B. Merck 14000); Substrat vollständig in Lösung bringen und vor Gebrauch ca. 5 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen,
  - Stopplösung 1 M NaOH.

## **Testdurchführung**

1. Beschichtung
- 100 µl Lösung für die Antigenbeschichtung in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (z.B. Nunc Immuno Platte I F, Kat. Nr. 439454) einfüllen und mit Folie abdecken
  - 4 Std. bei Raumtemperatur stehen lassen (nicht schütteln).
2. Blockierung
- Antigenlösung aus den Kavitäten entleeren,
  - 150 µl Blockierlösung pro Kavität einfüllen und abdecken,
  - 4 Std. bei Raumtemperatur inkubieren (Schüttler), anschließend über Nacht bei 4°C lagern.
3. Waschen
- Platte entleeren (ausschütten und ausklopfen),
  - 3 mal waschen mit Waschpuffer, jeweils 200 µl pro Kavität ohne definierte Waschzeit,
  - nach jedem Waschschrift ausschütten und ausklopfen; alternativ: Waschgerät verwenden.
4. Probenmaterial (Standards S<sub>0</sub> bis S<sub>6</sub>, Patientenserum, Leerwert, pos. Kontrollserum)
- Waschpuffer entleeren (ausschütten und ausklopfen),

- 100 µl Probenmaterial pro Kavität einfüllen und abdecken,
- 60 Min. im Wasserbad bei 37°C inkubieren.

Standards: kalibriertes Beriglobin (Charge 072021, 10 IE/ml = 10.000 mIE/ml), aus Beriglobin zunächst eine Vorverdünnung von **1:10** in 1% BSA/PBS herstellen (stabil für 2 Tage bei 4°C).

Der vorverdünnte Standard entspricht demnach **1000 mIE/ml Diphtherie-Antitoxin**, aus dieser Vorverdünnung dann durch weitere Verdünnungen (gemäß Tabelle) die Standards S<sub>1</sub> bis S<sub>7</sub> herstellen.

**Standardkurve:**

Standard	Verdünnung	Wert (mIE/ml)
S <sub>1</sub>	1:12800	0,078
S <sub>2</sub>	1:6400	0,156
S <sub>3</sub>	1:3200	0,312
S <sub>4</sub>	1:1600	0,625
S <sub>5</sub>	1:800	1,250
S <sub>6</sub>	1:400	2,500
S <sub>7</sub>	1:200	5,000

**Hinweis:** die Verdünnung der Patientenserum von 1:100 wird bei der Konzentrationsberechnung (mittels Auswerte-Software) unmittelbar berücksichtigt.

Beispiel: **0,31 mIE/ml** gemäß Standardkurve entsprechen im Patientenserum **0,31 mIE/ml x 100 = 31 mIE/ml** oder **0,031 IE/ml**.

- b) Patientenserum: 1:100 routinemäßig verdünnen,
  - c) Leerwert (Blank): 1% BSA/PBS,
  - d) pos. Kontrolle (Poolserum): wie Patientenserum verdünnen.
5. Waschen  
wie Schritt 3.
  6. Detektionsantikörper
    - Waschpuffer entleeren (ausschütten und ausklopfen),
    - 100 µl verd. Sandwich-Antikörper einfüllen und abdecken,
    - 40 Min. im Wasserbad bei 37°C inkubieren.
  7. Waschen  
wie Schritt 3.
  8. Enzymsubstrat und Auswertung
    - Waschpuffer entleeren (ausschütten und ausklopfen),
    - 100 µl frisch angesetzte Substratlösung pro Kavität einfüllen und ca. 20 Min. im Wasserbad bei 37°C inkubieren,

- 50 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren,
- Messung im Mikrotiterplatten-Photometer (405 nm), Auswertung mit integrierter Software (Verdünnungsfaktor der Proben wird automatisch berücksichtigt),
- bei anderen Auswerteverfahren muß Faktor 100 (Serumverdünnung der Patienten Probe) berücksichtigt werden, s.o. (4. Probenmaterial).