

# ELISA Verfahren für die Messung von Tetanus 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  
Tetanus-Toxoid (z.B. Behringwerke, Marburg, Ch.-B. 390121),  
3.700 Lf/ml, 1.445 Lf/mg N (Lf = Lime flocculating units of tetanus toxoid),  
16,03 g Eiweiß/l (Kons.-Mittel: 0,05 mg/ml Natriumtimerfonat),  
Gebrauchslösung: Tetanus-Toxoid 1:25.000 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 Tetanus-Standard-Serum (International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Third International Standard Preparation; WHO International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut Copenhagen, Denmark; 1 Ampulle enthält 120 IU Tetanus Antitoxin.

- b) Alternativ: Kalibrierung des Poolserums im Tierversuch oder Verwendung von Tetagam (Tetagam N 250 IE/ml, Behringwerke) kalibriert im Tierversuch.

Ergebnis aus dem Tierversuch: Tetagam N (Ch.-B. 040031) enthält 220 IE/ml.

#### 6. Probenverdünnung

- Standards, Positiv-Kontrolle und Patientenproben werden in 1% BSA/PBS verdünnt
- Routineverdünnung für Patientenproben 1:1000
- 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, 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,
- 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>1</sub> bis S<sub>7</sub>, Patientenserum, Leerwert, pos. Kontrollserum)

- Waschpuffer entleeren (ausschütten und ausklopfen),

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

Standards: kalibriertes Tetagam N (Charge 040031, 220 IE/ml = 220.000 mIE/ml), aus Tetagam N zunächst eine Vorverdünnung von **1:100** in 1% BSA/PBS herstellen (stabil für 2 Tage bei 4°C).

Der vorverdünnte Standard entspricht demnach **2200 mIE/ml Tetanus-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)
S1	1:12.400	0,17
S2	1:6.400	0,34
S3	1:3.200	0,69
S4	1:2.400	0,92
S5	1:1.600	1,37
S6	1:800	2,75
S7	1:400	5,50

**Hinweis:** die Verdünnung der Patientenseren von 1:1000 wird bei der Berechnung der Konzentrationen (mittels Auswerte-Software) unmittelbar berücksichtigt.

Beispiel: **0,69 mIE/ml** gemäß Standardkurve entsprechen im Patientenserum **0,69 mIE/ml x 1000 = 690 mIE/ml** oder **0,69 IE/ml**.

- b) Patientenserum: 1:1000 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,
- 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 1000 (Serumverdünnung der Patienten Probe) berücksichtigt werden, s.o. (4. Probenmaterial).