

Werner Luttmann, Kai Bratke,
Michael Küpper, Daniel Myrtek

Der Experimentator: **Immunologie**



Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Inhaltsverzeichnis

Vorwort zur 2. Auflage	V
Vorwort	VI
Exkurse	XII
Abkürzungen	XIII
1 Antikörper	1
1.1 Des Antikörpers Eigenheiten	2
1.1.1 Molekülstruktur von Antikörpern	2
1.1.2 Die Antigen-Antikörper-Bindung	7
1.2 Herstellung von Antikörpern	7
1.2.1 Das Antigen	9
1.2.2 Die Wahl der Spezies	11
1.2.3 Antigenapplikation	12
1.2.4 Polyklonale Antikörper	15
1.2.5 Monoklonale Antikörper	18
1.2.6 Rekombinante Antikörper	22
1.3 Reinigung von Antikörpern	25
1.3.1 „Quick and dirty“ – Präzipitationsmethoden	26
1.3.2 Affinitätschromatographie	28
1.3.3 Klassische Methoden der Proteinreinigung	30
1.3.4 Aufreinigung von IgY aus Eigelb	33
1.3.5 Aufreinigung rekombinanter Antikörper	33
1.3.6 Wichtige analytische Techniken	35
1.4 Chemische Kopplung und Markierung von Antikörpern	37
1.4.1 Chemische Kopplung von Antikörpern an feste Phasen	38
1.4.2 Kopplung von Markerenzymen an Antikörper	41
1.4.3 Kopplung von Fluorochromen an Antikörper	42
1.4.4 Kopplung von Biotin	46
1.4.5 Markierung mit Gold	47
1.4.6 Markierung mit radioaktiven Isotopen	49
2 Zellseparation	53
2.1 Trennung nach Zellgröße und Zelldichte – Zentrifugationstechniken	53
2.1.1 Differenzialzentrifugation	54
2.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation	55
2.1.3 Separationsmedien	57
2.1.4 Gegenstromzentrifugation	67
2.2 Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen	68
2.2.1 Adhäsion an Kunststoffoberflächen	68
2.2.2 Adhäsion an Nylonwatte	70
2.2.3 Erythrocyten-Rosettierung	71
2.2.4 Immunmagnetische Separation	73
2.2.5 Lysierende Antikörper	76

3	Durchflusscytometrie	77
3.1	Wie funktioniert das eigentlich?	78
3.2	Fluoreszenzen	81
3.3	Probenvorbereitung	85
3.3.1	Zellmarkierung	85
3.4	Inbetriebnahme des Durchflusscytometers	90
3.5	Kompensation und Messung	92
3.5.1	Kompensation	93
3.5.2	Messung	96
3.6	Auswertung	99
3.6.1	Histogramm-Plot	99
3.6.2	Dot-Plot	99
3.6.3	Dichteplot	101
3.6.4	Konturplot	101
3.6.5	Isometrische Darstellung	101
3.7	Modelle und Ausstattungen	101
3.7.1	Autosampler	102
3.7.2	Zellsorter	102
4	Quantitative Immunoassays	105
4.1	Assaykonzepte	106
4.1.1	Der kompetitive Assay	107
4.1.2	Der Sandwich-Assay	108
4.1.3	Welches Assaykonzept für welche Anwendung?	109
4.2	Radioimmunoassay (RIA)	110
4.2.1	Historisches	110
4.2.2	Praktisches	111
4.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	113
4.3.1	Coaten, Blocken, Waschen	114
4.3.2	Enzyme und Substrate	116
4.3.3	ELISA in der Praxis	117
4.4	ELISPOT-Assay	121
4.4.1	Anwendung und Vergleich mit anderen Methoden	121
4.4.2	Prinzip und Praxis	122
4.5	Partikel-Immunoassay (PIA)	124
4.5.1	Prinzip der Mini-Kugeln	124
4.5.2	Trapping-Assay	126
4.5.3	Multiplex-Assay	126
4.5.4	Vergleich mit anderen Immunoassays	128
4.6	Verstärkersysteme	129
4.6.1	Erhöhung der Markerdichte	129
4.6.2	Multi-Enzym-Kaskaden	131
4.6.3	Immuno-PCR	133

5 Western-Blot	135
5.1 Probenvorbereitung	135
5.2 Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese	137
5.2.1 Die diskontinuierliche SDS-PAGE	137
5.2.2 Native Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung	141
5.3 Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot)	143
5.3.1 Wet-Blot	144
5.3.2 Semi-Dry-Blot	145
5.3.3 Fehlerquellen	145
5.4 Proteindetektion	147
5.4.1 Blocking	147
5.4.2 Antikörpermarkierung	148
5.4.3 Visualisierung	150
5.4.4 Fehlerquellen und Kontrollen	151
5.5 Dot- und Slot-Blot	152
6 <i>in situ</i>-Immunlokalisation	153
6.1 Untersuchung von Zellsuspensionen	153
6.1.1 Zellsuspensionen	154
6.1.2 Cytospins	154
6.1.3 Zellausstriche	154
6.1.4 Einbettung von Zellen	155
6.1.5 Variationen und Details zur Behandlung von Zellsuspensionen	155
6.2 Untersuchung von Geweben	156
6.2.1 Vorbereitung	156
6.2.2 Fixierung	156
6.2.3 Paraffin-Einbettung	162
6.2.4 Schneiden	163
6.2.5 Nachbehandlung	164
6.2.6 Immundetektion	166
6.2.7 Eindeckung	179
6.3 Immunelektronenmikroskopische Untersuchung von Geweben	180
6.3.1 Fixierung	180
6.3.2 Einbettung	180
6.3.3 Mikrotomie	182
6.3.4 Immundetektion	182
7 Immunpräzipitation	185
7.1 Die Klassiker	187
7.1.1 Eindimensionale Immundiffusion	187
7.1.2 Zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony	189
7.1.3 Radiale Immundiffusion nach Mancini	190
7.1.4 Immunelektrophoresen	192
7.1.5 Limitierung und aktuelle Bedeutung	196

7.2	Immunpräzipitation „heute“	197
7.2.1	Die Präzipitationsmatrix	197
7.2.2	Reduktion unspezifisch präzipitierender Proteine	198
7.2.3	Analyse der Immunpräzipitate	199
8	Die Zelle: leben, fressen, sterben	201
8.1	Zellviabilitätsbestimmung	201
8.1.1	Farbstoff-Exklusion	201
8.1.2	Tetrazoliumsalm-Reduktion	202
8.1.3	ATP-Assay	204
8.2	Zellproliferation	204
8.2.1	DNA-Markierung mit [³ H]Thymidin	206
8.2.2	DNA-Markierung mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	206
8.3	Phagocytose-Assays	207
8.3.1	Die Testpartikel – Futter für die Phagocyten	209
8.3.2	Methoden der Partikelvisualisierung	210
8.4	Zellvermittelte Cytotoxizität	214
8.4.1	Chrom[⁵¹ Cr]-release-Assay	214
8.4.2	Lactat-Dehydrogenase(LDH)-release-Assay	216
8.5	Apoptose-Assays	218
8.5.1	Färbungen des Zellkerns	219
8.5.2	DNA-Leiter	221
8.5.3	Nucleosomen-Quantifizierungs-ELISA	221
8.5.4	TUNEL-Technik	223
8.5.5	Annexin V	224
8.5.6	Messung von Caspase-Aktivität	224
8.5.7	Sonstiges	226
9	Spezielle Immuno-Assays	227
9.1	Blutgruppenbestimmung	227
9.2	HLA-Typisierung	231
9.2.1	Lymphocytotoxizitätstest	232
9.3	Lymphoblastentransformation	234
10	Ein kurzer Ausflug in die ungeliebte Welt der Statistik	237
10.1	Deskriptive Statistik	239
10.1.1	Lokationsmaße	240
10.1.2	Streuungsmaße	241
10.1.3	Korrelationsmaße	244
10.2	Prüfstatistik	244
10.2.1	Skalen und ihre Daten	246
10.2.2	Skizze des Ablaufs einer wissenschaftlichen Untersuchung	246
10.2.3	Die Wahl eines geeigneten Signifikanztests	249

11 Naturwissenschaft vs. Übernatürliches	257
12 Die Lieferanten – unsere Partner?	259
12.1 Lieferantenverzeichnis (alphabetisch)	259
12.2 Lieferanten geordnet nach Schwerpunkten	262
Anhang 1: CD-Antigene	265
Anhang 2: Cytokine	281
Anhang 3: Chemokine	285
Glossar	289
Register	299