

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Kinetische und thermodynamische Charakterisierung von einem monoklonalen Antikörper gegen Estradiol mit Oberflächenplasmonenresonanz

I. Coille^{1,3}, J. Hoebeke¹, C-Y. Cuilleron², G. Gauglitz³

¹- Université Louis Pasteur

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR9021 du CNRS

15, rue Descartes

F-67084 Strasbourg

²- INSERM U329

Hopital Debrousse

29, rue Soeur Bouvier

F-69322 Lyon Cedex 05

³- Universität Tübingen

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Auf der Morgenstelle 8

D-72076 Tübingen

Tel. 07071-2974667

ingrid.coille@ipc.uni-tuebingen.de

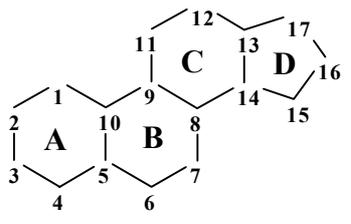
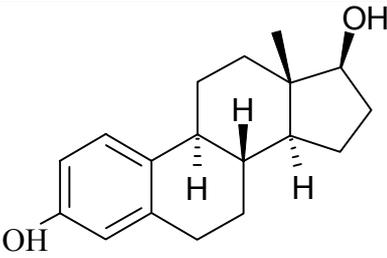
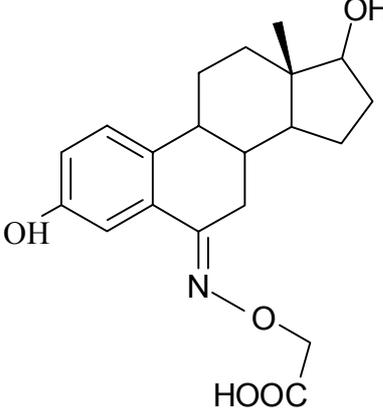
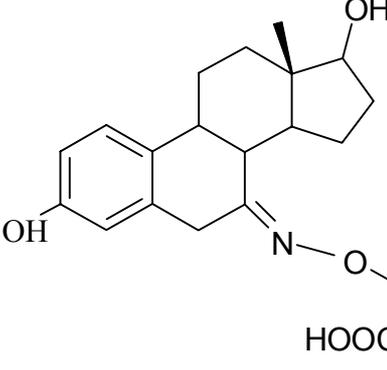
<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/>

Registriernummer der Online-Anmeldung: 202

Poster

Der monoklonale anti-Estradiol Antikörper 15H11 wurde charakterisiert, um sein Bindungsverhalten zu Estradiol und verwandten Analyten aufzuklären. Das Biacore 2000, das auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) basiert, wurde als Hilfsmittel für alle Messungen benutzt. Die Charakterisierung von Reaktivität und Kreuzreaktivität des Antikörpers sollte dazu verwendet werden, einen kompetitiven homogenen Fluoro-immunoassay zu optimieren.

Zwei verschiedene Derivate wurden auf dem Transducer immobilisiert, um das 15H11 IgG spezifisch zu binden. Diese immobilisierten Verbindungen waren Derivate von Estradiol, die eine Säuregruppe in Position 6 und 7 enthielten (siehe Tabelle). Das Derivat E2-7-CMO war das Immunogen, gegen das der Antikörper ursprünglich entwickelt wurde.

	
Nummerierung des Estrogengerüsts	Estradiol
	
Estradiol-6-CMO (E2-6-CMO)	Estradiol-7-CMO (E2-7-CMO)

Bei kinetisch kontrollierter Bindung der Antikörper auf der Oberfläche wurden die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten für E2-6-CMO bzw. E2-7-CMO mit 15H11 bestimmt. Damit konnten die Affinitätskonstanten zwischen Derivat und Antikörper bestimmt werden. Die Messungen wurden bei Temperaturen zwischen 10 und 30 °C durchgeführt, um die thermodynamische Größen, Enthalpie und Entropie zu ermitteln, die anzeigen, welcher Typ von Kräften für die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Antikörper entscheidend ist. Die Affinitätskonstante zwischen dem Immunogen E2-7-CMO und dem Antikörper war bei jeder Temperatur höher als die zwischen E2-6-CMO und dem Antikörper. Die Affinität war sehr stark Entropie kontrolliert, was typisch für hydrophobe Wechselwirkungen ist.

Unter Massentransport-kontrollierten Bedingungen wurden die aktive Konzentration von 15H11 sowie die Inhibitionskurven mit verschiedenen Analyten bestimmt. Die aktive Konzentration wurde für verschiedene eingesetzte Konzentrationen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten, daß das IgG mit zunehmender Verdünnung weniger aktiv war.

Es wurden noch Inhibitionskurven von IgG mit Estradiol, Ethinylestradiol, Estradiol-3-sulfat und Estradiol-17-glucuronid gemessen. Daraus konnte man die Affinitätskonstanten zwischen Analyt und 15H11 Antikörper berechnen. Der Antikörper zeigte die höchste Affinität zu Estradiol, eine niedrigere Affinität zu Ethinylestradiol und eine sehr schwache Affinität zu den beiden letzten Analyten.