

## Die Reindarstellung von Anti-BPO-Antikörpern mittels Affinitätschromatographie

Von

**H. Stemberger, G. Wiedermann, W. Frisch-Niggemeyer  
und M. M. Müller**

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin,  
Institut für Virologie und Institut für Medizinische Chemie,  
Universität Wien, Österreich

Mit 1 Abbildung

*(Eingegangen am 5. August 1976)*

### *The Purification of Anti-BPO Antibodies by Means of Affinity Chromatograph*

The purification of anti-BPO-antibodies and anti-BPO-IgG resp. by means of affinity chromatography is being described. The immunosorbent was prepared by direct covalent coupling of BPO groups to AH-Sepharose 4 B beads. The antibodies were linked to the immunosorbent in a batch and eluted by stepwise chromatography. The hapten density of the gel was very high ( $3.6 \times 10^{-5}$  mole BPO/1 g Sepharose 4 B) as could be demonstrated by application of  $^{14}\text{C}$ -penicillin-potassium. Good yields of highly purified anti-PBO-antibodies were obtained.

In einer früheren Arbeit<sup>8</sup> wurden quantitative Beziehungen zwischen der Haptendichte von Benzyl-Penicilloyl (BPO-)-beladenen Schaferythrozyten und ihrer komplementabhängigen Lysierbarkeit durch Anti-BPO-Antikörper hergestellt. Es zeigte sich, daß mit steigender Haptendichte an der Erythrozytenoberfläche die Lyse bei konstanter IgG-Konzentration zunahm. Auf Grund statistischer Überlegungen war dabei für das Zustandekommen der Lyse eine Bindung des IgG in bivalenter Form Voraussetzung. Ein direkter Hinweis auf die Richtigkeit dieser Überlegung wäre die Feststellung des molaren Verhältnisses zwischen verfügbaren Haptendeterminanten und spezifisch gebundenem IgG. Dazu ist die Verwendung von reinem Anti-BPO-IgG notwendig. Über die Methodik der Reindarstellung dieser Anti-BPO-IgG wird berichtet.

### Material und Methodik

Natrium-Penicillin-G (NaPG) wurde von der Fa. Hoechst-Austria, Rindergammaglobulin (BGG) von den Behringwerken, Marburg/Lahn, Benzyl [ $^{14}\text{C}$ ]penicillin potassium ( $^{14}\text{C}$ -K—PG) mit einer spezif. Aktivität von 28 mCi/mMol von Fa. Radiochemical Centre, Amersham, bezogen.

Kaninchenserumalbumin wurde nach der modifizierten Methode von *Schwert*<sup>5</sup> isoliert.

Benzylpenicilloyl<sub>40</sub>—BGG (BPO<sub>40</sub>—BGG) und Benzylpenicilloyl<sub>19</sub>—KSA (BPO<sub>19</sub>—KSA) wurden nach der Methode von *Locher et al.*<sup>4</sup> gekoppelt. Zur Gewinnung von Anti-BPO-Antisera wurden Kaninchen mit BPO<sub>40</sub>—BGG nach einem in einer früheren Arbeit angegebenen Schema<sup>7</sup> immunisiert. Reaginhältige Sera wurden 1 Woche nach Immunisierungsbeginn abgenommen; alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Sera wurden 2 Wochen nach Immunisierungsbeginn gewonnen.

Die passive Hämagglutination (PHA) zum Nachweis von Anti-BGG-Antikörpern wurde nach der Methode von *Boyd*<sup>1</sup>, zum Nachweis von Anti-BPO-Antikörpern nach der Methode von *Levine*<sup>3</sup> durchgeführt. Der Nachweis von BPO- bzw. BGG-spezifischen Reaginen erfolgte mittels der passiven kutanen homozytotropen Anaphylaxiereaktion (HCA), die in einer früheren Arbeit<sup>6</sup> ausführlich beschrieben wurde. Den Nachweis von Immunglobulinen im Eluat führten wir mittels der Agargeldoppel-diffusionsmethode nach *Ouchterlony* durch, wobei die folgenden Antisera verwendet wurden: Anti-Kaninchen-Serum von der Ziege der Fa. Hyland, Div. Travenol Laboratories Inc., Costa Mesa, Calif., Anti-Kaninchen-IgG und Anti-Kaninchen-IgA der Fa. Miles Laboratories Inc. Kanakakee, Illinois und Anti-Kaninchen-IgM der Fa. Biochemical Check Up, Milano.

#### *Ionenaustauschchromatographie*

Die Isolierung von reinem Kaninchen-IgG erfolgte auf DEAE-Sephadex: 10 ml Anti-BPO-Kaninchenserum, welches 2 Wochen nach Immunisierungsbeginn gewonnen worden war, wurde 3 Tage gegen den Startpuffer (0,02M-Trispuffer, pH 6,5) dialysiert und auf eine Säule (Pharmacia K 26/40), welche mit äquilibriertem DEAE-Sephadex A 50 gefüllt war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Kochsalzgradienten, welcher mittels Ultragrad Gradientenmischer der Fa. LKB hergestellt wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/cm<sup>2</sup>/Stde. Die Fraktionen des ersten Eiweißgipfels, welcher reines IgG enthielt, wurden gesammelt, mit 0,1N-NaOH auf pH 8,0 eingestellt und auf 10 ml mittels Diaflo (Fa. Amicon, Lexington, Mass. USA) auf PM-10-Membranen eingeengt. Diese IgG-Präparation wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

#### *Affinitätschromatographie*

Herstellung des BPO-spezifischen Immunosorbens (BPO—AH-Sepharose): 1 g AH-Sepharose 4 B (Fa. Pharmacia, Uppsala), wurde in 50 ml 0,5M-NaCl suspendiert. Nach dem Absetzen des Gels wurde der Überstand dekantiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschvorgangs erfolgte noch zweimaliges Nachwaschen mit Aqua dest. pH 4,5. Zur Beladung wurde das Gel in 50 ml Trimethylamin-Puffer pH 10,0, 0,14M- (TMA-Puffer), in welchem 1,500 mg NaPG gelöst waren, suspendiert und unter ständigem Rühren 50 Min. bei Zimmertemp. inkubiert.

Danach wurde das Gel bei 3000 g abzentrifugiert und 5mal mit je 50 ml 0,05M-Tris-Puffer pH 8,0, welcher noch 0,02M- an  $\text{CaCl}_2$  war, gewaschen.

Bestimmung der Beladungsintensität der BPO—AH-Sepharose:

1 g AH-Sepharose 4 B wurde in der oben beschriebenen Weise gewaschen. Die Beladung erfolgte ebenfalls in 50 ml TMA-Puffer, in welchem 1,500 mg NaPG gelöst waren, nur wurde dieser Lösung noch zusätzlich  $^{14}\text{C}$ -K—PG entsprechend einer Menge von 50  $\mu\text{Ci}$  zugesetzt. Als Negativkontrolle diente ein entsprechender Ansatz ohne  $^{14}\text{C}$ -K—PG. Beide Ansätze wurden, wie beschrieben, 50 Min. bei Zimmertemp. inkubiert. Im Anschluß daran wurden Doppelproben von je 1 ml entnommen. Diese Proben enthielten somit je  $76,72 \times 10^{-6}$  Mol NaPG. Die Messung der Radioaktivität in der Probe des Versuchsansatzes im Liquid Scintillation Counter (Typ Isocap 300 Nuclear, Chicago) mit externem Standard betrug 1 323 650 DPM, die des Leerwertes 71 DPM. Nachdem das Gel, wie oben beschrieben, gewaschen worden war, wurde es neuerlich mit Tris-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und wieder Proben zu je 1 ml zur Messung der Radioaktivität entnommen. Nach Abzug der Radioaktivität des Leerwertes wurden in der Probe 12 518 DPM gemessen, was einem BPO-Gehalt von  $0,72 \times 10^{-6}$  Mol entspricht. Umgekehrt auf 1 g Sepharose 4 B fanden sich also  $3,6 \times 10^{-5}$  Mol BPO gekoppelt.

Durchführung der Affinitätschromatographie:

10 ml Anti-BPO-Serum bzw. 10 ml IgG-Fraktion (siehe Ionenaustauschchromatographie) wurden mit 0,5 (= 4 ml) BPO—AH-Sepharose im Schüttelwasserbad 30 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend in eine Chromatographiesäule (Pharmacia K 9/15) gefüllt. Zunächst wurde mit 100 ml Tris-Puffer gespült, dann mit 50 ml Tris-Puffer, in welchem 0,4 Mol/l NaCl enthalten war, und anschließend wurde mit 50 ml Tris-Puffer ohne NaCl äquilibriert. Die Elution der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte dann mit 0,1M-Essigsäure. Es wurden jeweils 10 ml-Fraktionen gesammelt. Zur Untersuchung in der PHA und HCA wurden die in Abb. 1a mit O bezeichneten Fraktionen mittels Centriflo<sup>R</sup> (Fa. Amicon, Lexington, Mass., USA) auf 1 ml eingengt. Die Fraktionen des Essigsäureeluates wurden vorher mit 1N-NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Die in der Agargeldoppeldiffusion untersuchten Fraktionen wurden auf 50 : 1 eingengt.

## Ergebnisse

### *Haptengehalt der BPO-beladenen Sepharose*

Wurde die Beladung der AH-Sepharose unter Zusatz von  $^{14}\text{C}$ -K—PG vorgenommen und nach den Waschvorgängen die Radioaktivität gemessen, so ergab sich nach den in „Material und Methodik“ angeführten Berechnungen für 1 g beladene Sepharose ein BPO-Gehalt von  $3,6 \times 10^{-5}$  Mol, was  $2,16 \times 10^{19}$  Determinanten entspricht.

### *Affinitätschromatographie mit Anti-BPO—BGG-Vollserum und Anti-BPO—IgG*

Die Auftrennung von Vollserum wurde unternommen, um die Spezifität der Trennung zu überprüfen. Als Kriterium diente die Separierung

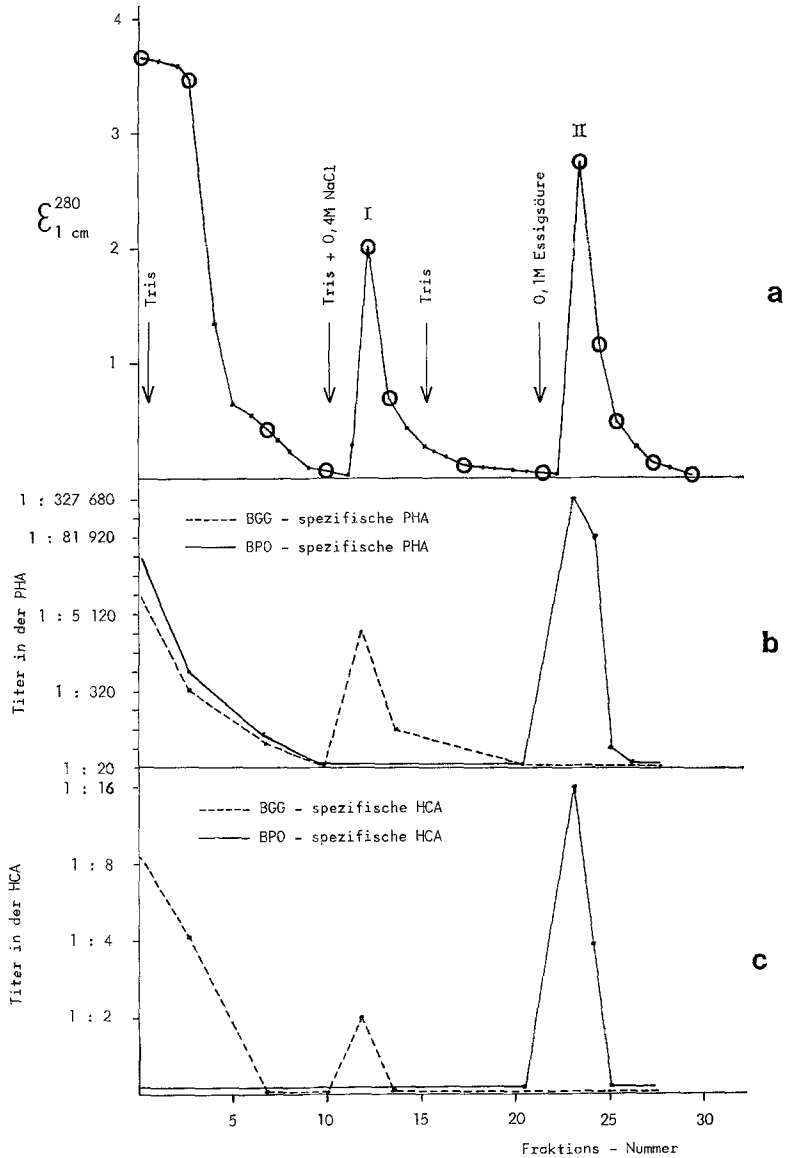


Abb. 1. a) Elutionsprofil der Affinitätschromatographie. 10 ml Anti-BPO—BGG-Kaninchenserum wurden mit 1 g BPO—AH-Sepharose 4 B inkubiert und stufenweise eluiert (siehe Pfeile). b) Titer ausgewählter Fraktionen in der PHA. Die in Abb. 1 a mit ○ bezeichneten Fraktionen wurden 10 : 1 eingengt. — Titer der BPO-spezifischen Antikörper. --- Titer der BGG-spezifischen Antikörper. c) Titer ausgewählter Fraktionen in der HCA. Die in Abb. 1 a mit ○ bezeichneten Fraktionen wurden 10 : 1 eingengt. — Titer der BPO-spezifischen Reagine. --- Titer der BGG-spezifischen Reagine

von Träger- (BGG-) und Hapten (BPO-)spezifischen Antikörpern, die mit Hilfe der PHA und der HCA nachgewiesen wurden. Wie aus den Abb. 1 b und 1 c hervorgeht, war die in der PHA und HCA feststellbare BPO-spezifische Aktivität ausschließlich im Essigsäureeluat (Peak II, Abb. 1 a) enthalten. Die trägerproteinspezifische Aktivität wurde mit der ersten (reiner Tris-Puffer) sowie mit der zweiten (Tris-NaCl) Waschung der Säule eluiert. Mit Essigsäure ließen sich keine Trägerprotein-spezifischen Antikörper eluieren. In der Agargeldoppeldiffusion wurde die Anwesenheit von IgM, IgG und IgA in Peak II überprüft. Lediglich Immunglobuline vom Typ IgG und IgM konnten nachgewiesen werden. Zur Darstellung von reinem Anti-BPO—IgG erwies es sich daher als notwendig, diese in 2 Schritten vorzunehmen: Zunächst wurde eine reine IgG-Fraktion eines Anti-BPO-Hyperimmunserums mit Hilfe von DEAE-Sephadex isoliert. Im Anschluß daran erfolgte die Abtrennung der BPO-spezifischen IgG auf dem Weg der Affinitätschromatographie. Auch in diesem Fall ergab sich durch die schrittweise Elution ein vergleichbares Elutionsmuster. Die spezifische Aktivität fand sich ebenfalls im Essigsäureeluat.

### Diskussion

Wie sich aus den Beladungsversuchen mit  $^{14}\text{C}$ -K—PG ergibt, lassen sich BPO-Gruppen in hoher Konzentration ( $2,16 \times 10^9$  Determinanten pro 1 g Sepharose 4 B) kovalent an die AH-Sepharose binden. Die außerordentliche Dichte dieser Beladung wird dadurch unterstrichen, daß unter der Annahme einer bivalenten Fixierung und Ausnützung aller zur Verfügung stehenden Determinanten pro 1 g Sepharose 4 B nahezu 3 g Anti-BPO-spezifisches IgG gebunden werden könnten. Tatsächlich kann aber nur ein Bruchteil dieser Kapazität ausgenutzt werden, wie der Chromatographieversuch (Abb. 1) zeigt.

Bei dieser Art von Immunosorbens muß beachtet werden, daß auch ein beträchtliches Maß an unspezifischen, adsorptiven Bindungen von Serumproteinen zustandekommt, was im Hinblick auf eine hohe Reinheit des Essigsäureeluates eine besonders sorgfältige Waschung der Säule mit Tris-Puffer bzw. Tris-Puffer-NaCl erforderlich macht. Dies dürfte auch der Grund sein, warum dieses Immunosorbens zur quantitativen Bestimmung von Anti-BPO-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz wegen seiner hohen „background“-Fluoreszenz ungeeignet ist<sup>2</sup>.

Wie die Abb. 1 b und 1 c zeigen, war eine hohe Trennspezifität gegeben. Diese erwies sich nicht nur in der exakten Separierung von hapten- und trägerproteinspezifischen Antikörpern. Auch nach Chromatographie einer Mischung gleicher Teile von Anti-BPO—BGG-Serum und Anti-Ovalbumin-Serum fanden sich im Essigsäureeluat keinerlei in der passiven Hämagglutination nachweisbaren Anti-Ovalbumin-Aktivitäten.

### Literatur

- <sup>1</sup> *S. V. Boyden*, J. Exper. Med. **93**, 107 (1951).
- <sup>2</sup> *W. Knapp*, Persönliche Mitteilung.
- <sup>3</sup> *B. B. Levine*, *M. J. Fellner* und *V. Levytska*, J. Immunol. **96**, 707 (1966).
- <sup>4</sup> *G. W. Locher*, *C. H. Schneider* und *A. L. de Weck*, Z. Imm.-Forsch. **141**, 265 (1971).
- <sup>5</sup> *C. Steffen*, Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie. Stuttgart: Thieme. 1968.
- <sup>6</sup> *H.-P. Werner*, *H. Stemberger*, *G. Wiedermann* und *D. Kraft*, Wr. Klin. Wschr. **84**, 663 (1972).
- <sup>7</sup> *G. Wiedermann*, *H. Stemberger*, *H.-P. Werner* und *D. Kraft*, Z. Imm.-Forsch. **143**, 483 (1972).
- <sup>8</sup> *G. Wiedermann*, *M. M. Müller*, *O. Förster* und *H. Stemberger*, Internat. Arch. Allergy Appl. Immunol. **49**, 843 (1975).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

*Dr. H. Stemberger*  
*Institut für spezifische*  
*Prophylaxe und Tropenmedizin*  
*Universität Wien*  
*Kinderspitalgasse 15*  
*A-1095 Wien*  
*Österreich*