



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **281 419 A5**5(51) C 12 Q 1/48
G 01 N 33/535

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 Q / 306 365 0

(22) 26.08.87

(44) 08.08.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Behrendt, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schmidt, Gerhard, Dr. rer. nat., DD

(73) siehe (71)

(54) **Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen durch markierte molekulare Sonden**

(55) Nachweis von Biomolekülen; molekulare Sonden; Markierung; Enzyme; Aminoglycosid-Phosphotransferase; feste Phasen; Phosphorylierung; Substrat; Cosubstrat; Aminoglycosid-Antibiotikum; Autoradiographie

(57) Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mittels durch Aminoglycosid-Phosphotransferasen markierter molekularer Sonden. Der Nachweis der Biomoleküle, die in Lösung, in Gelen oder an feste Phasen gebunden sein können, erfolgt durch Anlagerung der Aminoglycosid-Phosphotransferase an das Biomolekül, Entfernung überschüssiger markierter molekularer Sonde, durch Phosphorylierung des für das Enzym spezifischen Substrates, z. B. eines Aminoglycosid-Antibiotikums, in Lösung, in Gelen oder an einer festen Phase, durch Abtrennen nicht umgesetzten Cosubstrates und ggf. Substrates und durch einen Auswerteschritt, in dem das phosphorylierte Substrat an einer festen Phase gemessen oder autoradiographiert wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen durch markierte molekulare Sonden, **gekennzeichnet dadurch**, daß in Lösung befindliche oder in Gelen enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomoleküle von einer Aminoglucosid-Phosphotransferase-gekoppelten Sonde erkannt werden, die an die molekulare Sonde gekoppelte oder abgespaltete Aminoglucosid-Phosphotransferase mit dem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird und das phosphorylierte Substrat an einer festen Phase II oder III nachgewiesen wird, wobei das Verfahren in folgenden wesentlichen Schritten durchgeführt wird:
 - a) Erkennungsschritt, in dem die durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde an das in Lösung befindliche oder im Gel enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomolekül mit dafür spezifischer Affinität angelagert wird;
 - b) Waschschrift, in dem überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - c) Enzymreaktionsschritt, in dem die Phosphorylierung des Substrates durch Reaktion der Aminoglucosid-Phosphotransferase mit dem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates durchgeführt wird;
 - d) Trennschritt, in dem nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat ausgewaschen oder abgetrennt wird;
 - e) Auswertungsschritt, in dem das phosphorylierte Substrat an einer festen Phase II oder III gemessen oder durch spezielle Nachweisverfahren nachgewiesen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Erkennungsschritt a) Biomoleküle in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien aufgetrennt werden und die die Biomoleküle enthaltenden Gele oder Trenn- und Trägermaterialien mit einer die Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelte molekulare Sonde enthaltenden Lösung in Kontakt gebracht werden, wobei Biomolekül und markierte molekulare Sonde zu einem Komplex aus Biomolekül und enzymgekoppelter Sonde im Gel oder in den Trenn- und Trägermaterialien umgesetzt werden;
 - im Waschschrift b) die überschüssige markierte molekulare Sonde aus dem Gel oder Trenn- und Trägermaterial ausgewaschen wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) zur Phosphorylierung des Substrates das Gel oder Trenn- und Trägermaterial mit einem zweiten Gel oder Trenn- und Trägermaterial, das das Substrat und das Cosubstrat enthält, in Kontakt gebracht wird;
 - im Trennschritt d) das zweite Gel oder Trenn- und Trägermaterial mit dem phosphorylierten Substrat mit einer festen Phase III in Kontakt gebracht und das phosphorylierte Substrat selektiv an ihr gebunden wird und nach Waschschriften
 - im Auswertungsschritt e) das phosphorylierte Substrat auf der festen Phase III durch Messung der Radioaktivität oder durch Autoradiographie nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß nach den Schritten a und b das Gel oder Trenn- und Trägermaterial, das den Komplex aus Biomolekül und durch Aminoglucosid-Phosphotransferase markierter molekularer Sonde enthält, mit einer festen Phase II, an die ein Substrat gebunden ist, in Gegenwart eines Cosubstrates in Kontakt gebracht und das phosphorylierte Substrat auf der festen Phase II nachgewiesen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - sich im Erkennungsschritt a) Biomolekül und durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde in Lösung befinden und dort aneinander angelagert werden;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) die Aminoglucosid-Phosphotransferase des Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde in Lösung mit dem Substrat in Gegenwart des Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat abgetrennt wird;
 - im Auswertungsschritt e) die Aktivität des phosphorylierten Substrates gemessen wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Trennschritt d) die Abtrennung des phosphorylierten Substrates vom überschüssigen Cosubstrat durch eine das Substrat selektiv bindende feste Phase III durchgeführt wird und
 - im Auswerteschritt die Aktivität des phosphorylierten Substrates gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Biomoleküle vor dem Erkennungsschritt a) in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien aufgetrennt und danach der Erkennungsschritt a) in Lösung durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Erkennungsschritt a) die durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert wird;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) die Aminoglucosid-Phosphotransferase des an die feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit in Lösung befindlichem Substrat und Cosubstrat zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat abgetrennt und phosphoryliertes Substrat ggf. an eine feste Phase III gebunden wird;
 - im Auswertungsschritt e) die Aktivität des phosphorylierten Substrates in Lösung oder an einer festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase I mit daran gebundenem Biomolekül und an dieses angelagerter markierter molekularer Sonde nach den Schritten a) und b) im Enzymreaktionsschritt c) mit einem Gel oder anderem Trenn- und Trägermaterial, in dem sich das Substrat und das Cosubstrat befinden, überschichtet wird und anschließend im Trennschritt d) das phosphorylierte Substrat aus dem Gel oder anderem Trenn- und Trägermaterial auf eine feste Phase III übertragen und im Nachweisschritt e) dort nachgewiesen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Erkennungsschritt a) die durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert wird;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) die Aminoglucosid-Phosphotransferase des an die feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit einem an eine feste Phase II gebundenen Substrat in Gegenwart eines sich in Lösung befindlichen Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) überschüssiges Cosubstrat ausgewaschen oder abgetrennt wird; und
 - im Auswertungsschritt e) die Aktivität des phosphorylierten Substrates an der festen Phase II gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Erkennungsschritt a) das Biomolekül in einem oder mehreren Erkennungssystemen und in einer oder mehreren Reaktionsstufen zunächst von einem oder mehreren Molekülen mit spezifischer Affinität erkannt oder mit einem oder mehreren Molekülen umgesetzt wird und die mit einer Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelte molekulare Sonde mit mindestens einem dieser Moleküle zur Reaktion gebracht wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonde, die an eine Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelt ist, ein mono- oder polyklonaler Antikörper, ein Antiserum, ein Protein, ein Peptid, eine einsträngige, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder ein Fragment davon, ein Oligodesoxyribonucleotid, eine RNS oder ein Fragment davon, ein Oligoribonucleotid, ein Protein mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül, Streptavidin, Avidin, eine chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül oder Biotin eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Aminoglucosid-Phosphotransferase Neomycin-Phosphotransferase I oder II eingesetzt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1 und 7 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase I ein kovalent bindender, ionisch bindender oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger eingesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, geladenes Polyamid, Diazobenzylloxymethylcellulose, Diethylaminoethylcellulose, Cyanurchlorid-aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren oder chemisch aktiviertes Glas eingesetzt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13 und 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase I in Form eines Flächenmaterials eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase II ein negativ ionisch geladener Träger oder ein kovalent bindender Träger eingesetzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß als negativ ionisch geladener Träger Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 16 und 17, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase II in Form eines Flächenmaterials eingesetzt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 5, 7 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß als selektiv bindende feste Phase III ein negativ ionisch geladener Träger eingesetzt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß als negativ ionisch geladener Träger Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose eingesetzt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat ein Aminoglucosid-Antibiotikum eingesetzt wird.
22. Verfahren nach Anspruch 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat Kanamycin oder Neomycin eingesetzt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat Adenosintriphosphat (ATP) und/oder ³²P-gamma-ATP eingesetzt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 7 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Biomoleküle auf die feste Phase I durch Tüpfeln oder nach Auftrennung in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien durch Blotting-Verfahren aufgebracht werden.
25. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Enzymreaktionsschritt c) mit der an die molekulare Sonde gekoppelten Aminoglucosid-Phosphotransferase oder mit der abgespalteten Aminoglucosid-Phosphotransferase durchgeführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Aminoglucosid-Phosphotransferase-gekoppelte molekulare Sonde ein gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen durch eine Enzymreaktion, die vor allem in der Molekularbiologie, in der Medizin, Biologie, Genetik, Phytopathologie, Gentechnologie und in der Landwirtschaft angewendet werden kann.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Nachweisverfahren von Biomolekülen mit enzymgekoppelten molekularen Sonden sind bekannt. Dabei wurden sowohl immunreaktive Sonden (siehe z. B. Immunoenzymatic Techniques, Hrsg. S. Avrameas et al., Elsevier Science Publishers, 1983), Hybridisationssonden (siehe z. B. M. Renz, Chr. Kurz, Nucl. Acids Research [1984] 12, A. 3435–3444) als auch Sonden mit spezifischer Affinität zu anderen Biomolekülen an Enzyme gekoppelt. Als Kopplungsenzyme wurden vorwiegend alkalische Phosphatase, Galactosidase, Glucoamylase, Glucoseoxidase, Glucoronidase, Lactatdehydrogenase, Lactoperoxidase, Peroxidase, Ribonuclease und Tyrosinase mit üblichen Vernetzungsreagenzien an molekulare Sonden gekoppelt (S. Avrameas, T. Ternynck, J. L. Guesdon, Scand. J. Immunol. [1978], S. 7–23). Der prinzipielle Ablauf eines solchen Nachweisverfahrens wird z. B. von R. H. Yolken in Immunoenzymatic Techniques, loc. cit., S. 274, für die Bestimmung eines Antigens (immunologischer Nachweis) erläutert:

1. Der gegen ein zu bestimmendes Antigen gerichtete Antikörper 1 wird an der Wand einer Mikrotiterplatte fixiert;
2. Das Testmaterial wird zugegeben, vorhandenes Antigen wird durch den Antikörper gebunden;
3. Nach Waschschritten wird ein enzymgekoppelter Antikörper 2 zugegeben. Dieser reagiert mit dem an den Antikörper 1 gebundenen Antigen;
4. Nach Waschschritten wird ein Substrat zugesetzt. Das an die Wand der Mikrotiterplatte fixierte Enzym (AK 1 – Antigen – AK 2 – Enzym) wandelt das Substrat in eine sichtbare Form um. Die in der Lösung meßbare Farbtintensität ist proportional zur Menge des Antigens im Testmaterial.

Hierbei wird mit löslichen farbigen Reaktionsprodukten gearbeitet. Durch die Auswahl der bisher verwendeten Enzyme (vorwiegend Peroxidase und alkalische Phosphatase) mußten überwiegend Farbreaktionen zur Auswertung genutzt werden, die eine geringe Nachweisempfindlichkeit aufweisen.

Durch die Eigenschaften der verwendeten Enzyme bedingt, können an diese Sonden direkt gekoppelte Enzyme nicht unter Extrembedingungen eingesetzt werden (z. B. Hybridisationsbedingungen, bei hoher Temperatur oder in Gegenwart von Detergentien).

Bei Nachweisreaktionen von Biomolekülen, bei denen das Biomolekül auf einer festen Phase fixiert ist, wurde bisher der Nachweis immer auf der gleichen festen Phase durchgeführt, auf der sich das Zielmolekül befindet (z. B. Nachweis eines Antigens nach Blotting aus einem Polyacrylamid-Gel auf Nitrocellulose mittels eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers).

Bei diesem Nachweis wird das Antigen nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zunächst auf ein flächiges Trägermaterial übertragen und dort fixiert. Das Trägermaterial, auf dem sich das Antigen befindet, wird danach mit einem enzymgekoppelten Antikörper inkubiert, der sich dabei an das Antigen bindet. Nach Waschschritten, in denen überschüssiger enzymgekoppelter Antikörper ausgewaschen wird, wird ein lösliches Substrat, z. B. Diaminobenzidin oder 4-Chlornaphthol, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zugesetzt. Die Peroxidase wandelt die Substrate in wasserunlösliche, farbige Verbindungen (Diaminobenzidin: braun, 4-Chlornaphthol: violett) um, die an den Stellen, an denen sich der Antigen-Antikörper-Peroxidase-Komplex befindet, auf dem Träger ausfallen und dadurch die Position eines Antigens innerhalb eines aufgetrennten Proteingemisches auf dem Trägermaterial markieren. Hierbei wird das Antigen auf dem gleichen Trägermaterial, auf dem es fixiert ist, farbig markiert. Eine Wiederverwendung solcher Blots nach der enzymatischen Nachweisreaktion mittels Farbstoffen ist schwer möglich, da die gebundenen Farbstoffmoleküle meist Nebenreaktionen eingehen und damit zu Untergrundproblemen in Nachfolgeschritten führen.

Die Empfindlichkeit der Nachweisverfahren mittels Farbreaktionen ist stets geringer als die radioaktiver Nachweisverfahren. Prinzipiell ähnlich verläuft bisher der Nachweis von spezifischen Nucleinsäuresequenzen mittels enzymgekoppelter Hybridisationssonden. Speziell auf diesem Gebiet werden z. B. zum Nachweis einzelner Gene aus minimalen DNS-Mengen empfindlichere Methoden des Nachweises benötigt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Nachweisverfahren für Biomoleküle mit erhöhter Empfindlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mittels durch Enzyme markierter molekularer Sonden zur Verfügung zu stellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen durch markierte molekulare Sonden ist dadurch gekennzeichnet, daß in Lösung befindliche oder in Gelen enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomoleküle von einer Aminoglucosid-Phosphotransferase-gekoppelten molekularen Sonde erkannt werden, die an die molekulare Sonde gekoppelte oder abgespaltene Aminoglucosid-Phosphotransferase mit dem Substrat in Gegenwart eines Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird und das phosphorylierte Substrat an einer festen Phase II oder III nachgewiesen wird, wobei das Verfahren in folgenden wesentlichen Schritten durchgeführt wird:

- a) Erkennungsschritt, in dem die durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde an das in Lösung befindliche oder im Gel enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomolekül mit dafür spezifischer Affinität angelagert wird;
- b) Waschschriff, in dem überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
- c) Enzymreaktionsschritt, in dem die Phosphorylierung des Substrates durch Reaktion der Aminoglucosid-Phosphotransferase mit dem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates durchgeführt wird;
- d) Trennschritt, in dem nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat ausgewaschen oder abgetrennt wird;
- e) Auswertungsschritt, in dem das phosphorylierte Substrat an einer festen Phase II oder III gemessen oder durch spezielle Nachweisverfahren nachgewiesen wird.

Aminoglucosid-Phosphotransferasen sind Enzyme, die unter Abspaltung eines Phosphatrestes vom Adenosintriphosphat (ATP) diesen Phosphatrest auf ein phosphorylierbares Substrat übertragen. Das Substrat kann in Lösung vorliegen, in Trägern eingeschlossen sein oder an eine feste Phase gekoppelt sein. Das ATP wirkt bei dieser Reaktion als Cosubstrat.

Wenn an Stelle des ATP durch ^{32}P markiertes ATP (^{32}P -gamma-ATP) verwendet wird, wird durch die Aminoglucosid-Phosphotransferase ^{32}P -markiertes Phosphat auf das Substrat übertragen. Das an die molekulare Sonde gekoppelte Enzym führt diese Reaktion nicht nur einmal aus, sondern solange folgende drei Bedingungen erfüllt sind:

- Vorhandensein von Substrat,
- Vorhandensein von Cosubstrat (d. h. ATP bzw. ^{32}P -gamma-ATP),
- Sicherung der Bewegung des Enzyms an das Substrat.

Für das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch wesentlich, daß jedes Enzymmolekül mehrere Phosphatreste auf mehrere Substratmoleküle überträgt, so daß sich ein Verstärkungsfaktor von mindestens 10 ergibt, der meistens jedoch wesentlich höher ist. Durch dieses Verfahren wird in der Phase, in der sich das Substrat befindet, ein verstärktes Abbild der molekularen Sonde produziert. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird folglich der Nachweis nicht in der Phase geführt, in der sich die molekulare Sonde befindet, sondern in der, in der sich das Substrat befindet. Indem bei einer molekularen Sonde mehrere Phasen mit Substrat in Gegenwart von Cosubstrat angeboten werden (beidseitig oder nacheinander), lassen sich von einem nachzuweisenden Biomolekül mehrere verstärkte Replikas herstellen. Vom ursprünglichen Biomolekül kann der Komplex aus Sonde und Enzym nach üblichen Verfahren wieder abgespalten werden und der Nachweis mit einer anderen, ggf. ebenfalls durch eine Aminoglycosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde wiederholt werden.

Unter den Transferasen nehmen die Aminoglycosid-Phosphotransferasen eine Sonderstellung ein, wie überraschend gezeigt werden konnte:

- sie besitzen eine hohe Thermostabilität; das Enzym behält seine Aktivität auch nach Erwärmen auf 100°C, so daß lange Inkubationszeiten bei erhöhter Temperatur möglich sind;
- sie weisen eine gute Detergenzien-Stabilität auf; das Enzym ist trotz Veränderung seiner Sekundärstruktur durch Detergenzien noch enzymatisch aktiv;
- ihre spezifische Aktivität ist sehr hoch;
- sie sind leicht zugänglich und lassen sich aus Zellysaten von Mikroorganismen relativ leicht gewinnen.

Die Aminoglycosid-Phosphotransferasen erfüllen damit auf hervorragende Weise die Anforderungen an ein Enzym, das an andere Biomoleküle gekoppelt werden soll, wie sie von S. Avrameas in Bull. Soc. Chim. Biol. (1968) 50, S. 1169 ff., genannt wurden. Sie können gentechnisch hergestellt werden, wie es z. B. B. Reiss, R. Sprengel, H. Will und H. Schaller in Gene (1984) 30, S. 211–218 beschrieben worden ist.

Auf Grund der vielfältigen Möglichkeiten, wie molekulare Sonden an die Aminoglycosid-Phosphotransferasen gekoppelt werden können, sind eine Reihe von Techniken zum Nachweis von Biomolekülen möglich. Zunächst einmal sind als molekulare Sonden, die zur Kopplung geeignet sind, immunreaktive Sonden, Nucleinsäuren, Proteine bzw. chemische Verbindungen mit Affinität zu einem Biomolekül einsetzbar.

Zu den immunreaktiven Sonden zählen monoklonale und polyklonale Antikörper, Antiseren, Proteine, insbesondere Protein A, natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Peptide. Als Nucleinsäuren können einsträngige, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder Fragmente davon, Oligodesoxyribonucleotide, RNS oder Fragmente davon oder Oligoribonucleotide verwendet werden. Proteine mit spezifischer Aktivität zu einem Biomolekül sind z. B. Avidin, Streptavidin, Protamin, Gelatine, Fetuin, Pepstatin und viele Enzyme. Schließlich sind chemische Verbindungen mit Affinität zu einem Biomolekül Biotin, m-Aminophenylborsäure und Cibacron Blue F3 GA.

Aminoglycosid-Phosphotransferasen sind vor allem die Aminoglycosid-Neomycin-Phosphotransferase I und II, die auch als Kanamycin-Phosphotransferasen oder APH 6 bzw. APH 3" bezeichnet werden. Substrate für die Aminoglycosid-Phosphotransferasen sind die Aminoglycosid-Antibiotika oder Aminocyclitol-Antibiotika (siehe dazu K. L. Rinehardt, J. Infect. Diseases [1966] 119, 345–350). Als solche können z. B. Neomycine, Kanamycine, Gentamycine und Tobramycin genannt werden. Bevorzugt wird als Substrat Kanamycin oder Neomycin.

Das Cosubstrat ist markiertes oder nicht markiertes Adenosintriphosphat (ATP). Für den Nachweis wird üblicherweise ³²P-gamma-ATP verwendet, das jedoch mit nicht markiertem ATP vermischt sein kann.

Erfindungsgemäß besteht das Verfahren zum Nachweis der Biomoleküle aus mehreren Verfahrensschritten, die unterschiedlich ausgeführt werden können. Dabei hängt die jeweilige Ausführungsform von der Art des Biomoleküls, von seiner Form, seiner Art der Bindung ggf. an einen Träger, von der Art der Bindung des Substrates usw., ab.

Die nachzuweisenden Biomoleküle können in Lösung, in Gelen vor oder nach Trennoperationen, auf festen Trägern, durch Tüpfelverfahren auf feste Träger übertragen, nach Trennverfahren aus Gelen auf Flächenträgern usw. vorliegen. Die Verfahren der Trennung, der Übertragung und der Fixierung von Biomolekülen auf Träger sind dem Fachmann gut bekannt und werden deshalb hier nicht weiter erläutert.

Nachdem die Biomoleküle in die nachzuweisende Form gebracht worden sind, werden folgende Schritte erfindungsgemäß durchgeführt:

- a) Erkennungsschritt, in dem die durch eine gekoppelte Aminoglycosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde an das Biomolekül mit dafür spezifischer Affinität angelagert wird;
- b) Waschschritt, in dem überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen oder abgetrennt wird;
- c) Enzymreaktionsschritt, in dem die an eine molekulare Sonde gekoppelte Aminoglycosid-Phosphotransferase mit dem Substrat unter Beteiligung eines Cosubstrates reagiert;
- d) Trennschritt, in dem nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat ausgewaschen bzw. abgetrennt wird;
- e) Auswertungsschritt, in dem das phosphorylierte Substrat gemessen oder durch spezielle Nachweisverfahren nachgewiesen wird.

Die Durchführung eines jeden Schrittes ist an bestimmte Parameter gebunden, die kombinierbar sind und daher eine Vielzahl von Verfahrensvarianten zulassen. Innerhalb jeder Variante sind unterschiedliche Bedingungen für jeden Schritt möglich, so daß spezielle Reaktionsbedingungen nicht allgemein, sondern nur für ein bestimmtes Beispiel angegeben werden können. Dazu sei auf die zur Erläuterung der Erfindung angeführten Beispiele verwiesen.

Der Nachweis des phosphorylierten Substrates kann z. B. in Szintillationszählern oder durch Autoradiographie erfolgen. Die Autoradiographie wird besonders bei Flächenträgern bevorzugt. Es sind jedoch auch andere Nachweisverfahren, z. B. Abtastverfahren oder Lumineszenzverfahren, möglich.

Die Kopplung der Aminoglycosid-Phosphotransferase an die molekulare Sonde kann durch Bildung kovalenter Bindungen, z. B. durch Umsetzung mit difunktionellen Reagenzien, durch Kondensation in Gegenwart von Kondensationsmitteln; durch ionische

Bindungen, z. B. durch Umsetzung mit Polyelektrolyten, Ampholyten oder Reagenzien, die mit beiden Molekülen ionische Bindungen ausbilden können; durch Bildung elektrostatischer Wechselwirkungen, z. B. durch Modifizierung eines von beiden Molekülen oder durch ihre Umsetzung mit Tensiden; oder durch Verwendung natürlich vorkommender, synthetisch hergestellter oder gentechnisch erzeugter Fusionsproteine aus einem Enzym und einem Protein als molekularer Sonde, erfolgen.

Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehen in Variationen in den einzelnen Schritten. Beispiele dazu werden in den folgenden Varianten beschrieben:

Ausführungsvariante 1

Biomoleküle werden in Gelen oder anderen Trenn- oder Trägermaterialien aufgetrennt.

- a) Erkennungsschritt: die die Biomoleküle enthaltenden Trennmaterialien werden mit einer Lösung, die eine molekulare Sonde, an die eine Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelt ist, in Kontakt gebracht, so daß Biomolekül und Sonde aneinander angelagert werden und so ein Komplex aus Biomolekül und enzymgekoppelter Sonde im Gel hergestellt wird;
- b) Waschschrirt: Auswaschen überschüssiger markierter molekularer Sonde aus dem Gel;
- c) Enzymreaktionsschritt: das Gel, das den Komplex aus Biomolekül und enzymgekoppelter Sonde enthält, wird mit einem zweiten Gel, das das Substrat und das Cosubstrat enthält, in Kontakt gebracht, so daß unter diesen Bedingungen das Substrat phosphoryliert wird;
- d) das zweite Gel, das das phosphorylierte Substrat enthält, wird mit einer festen Phase III in Kontakt gebracht, und das phosphorylierte Substrat wird selektiv daran gebunden;
- e) nach Waschschrirten zur Entfernung überschüssigen Substrates und/oder Cosubstrates wird das phosphorylierte Substrat auf der festen Phase III durch Messung der Radioaktivität oder durch Autoradiographie nachgewiesen.

In einer weiteren Variante der Ausführungsvariante 1 wird der Schritt c), der Enzymreaktionsschritt, so ausgeführt, daß das Gel, das den Komplex aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde enthält, mit einer festen Phase II, an die ein Substrat gebunden ist, in Gegenwart des Cosubstrates in Kontakt gebracht und das phosphorylierte Substrat auf der festen Phase II nachgewiesen wird.

Ausführungsvariante 2

In dieser Variante befinden sich das Biomolekül, ggf. in einem Gemisch mehrerer Biomoleküle, und die markierte molekulare Sonde in Lösung.

- a) Erkennungsschritt: eine molekulare Sonde, an die eine Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelt ist, und das nachzuweisende Biomolekül befinden sich in Lösung und werden in Lösung aneinander angelagert;
- b) Waschschrirt: überschüssige markierte molekulare Sonde wird abgetrennt;
- c) Enzymreaktionsschritt: die Aminoglucosid-Phosphotransferase, die an die molekulare Sonde gekoppelt und dieser Komplex an das Biomolekül angelagert ist, wird mit Substrat und Cosubstrat in Lösung umgesetzt;
- d) Trennschritt: nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat werden abgetrennt;
- e) Auswertungsschritt: die Aktivität des phosphorylierten Substrates wird gemessen.

Ausführungsvariante 3

Diese Variante stellt eine weitere Möglichkeit dar, wenn Biomolekül und markierte molekulare Sonde in Lösung vorliegen, jedoch an einer festen Phase nachgewiesen werden sollen.

- a) Erkennungsschritt: das nachzuweisende Biomolekül und die molekulare Sonde, an die eine Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelt ist, befinden sich in Lösung und werden dort miteinander umgesetzt;
- b) Waschschrirt: Abtrennung von überschüssiger markierter molekularer Sonde;
- c) Enzymreaktionsschritt: die Aminoglucosid-Phosphotransferase, die an die molekulare Sonde gekoppelt und dieser Komplex an das Biomolekül angelagert ist, wird in Lösung mit dem Substrat und dem Cosubstrat umgesetzt;
- d) Trennschritt: durch einen das Substrat selektiv bindenden Träger III erfolgt die Abtrennung des phosphorylierten Substrates vom überschüssigen Cosubstrat;
- e) Auswertungsschritt: die Aktivität des phosphorylierten Substrates wird gemessen oder autoradiographisch bestimmt.

Ausführungsvariante 4

Bei der Durchführung dieser erfindungsgemäßen Verfahrensvariante befindet sich das Biomolekül an eine feste Phase, z. B. einen Flächenträger oder eine Dispersion von Polymerteilchen, gebunden und reagiert nach der Anlagerung der markierten molekularen Sonde in Lösung mit Substrat und Cosubstrat.

- a) Erkennungsschritt: an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül wird die durch eine gekoppelte Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde angelagert;
- b) Waschschrirt: überschüssige markierte molekulare Sonde wird ausgewaschen oder abgetrennt;
- c) Enzymreaktionsschritt: Reaktion des an eine feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit in Lösung befindlichem Substrat und Cosubstrat;
- d) Trennschritt: nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat werden abgetrennt und phosphoryliertes Substrat ggf. an eine feste Phase III gebunden;

- e) Auswertungsschritt: die Aktivität des phosphorylierten Substrates wird in Lösung oder ggf. an einer festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt.

Diese Verfahrensvariante läßt sich durch Abänderung des Enzymreaktionsschrittes weiter verändern, indem dieser so durchgeführt wird, daß die feste Phase I mit daran gebundenem Biomolekül und an diesem angelagerter markierter molekularer Sonde mit einem Gel überschichtet wird, wobei sich im Gel Substrat und Cosubstrat befinden, so die Enzymreaktion durchgeführt und anschließend aus dem Gel das phosphorylierte Substrat auf eine feste Phase III übertragen wird. Im Gel sind Substrat und Cosubstrat zwar in Lösung, aber gleichsam in „eingeschlossenem“ Zustand (entrapped).

Verfahrensvariante 5

Diese Variante stellt ein neuartiges Sandwich-Verfahren dar, in dem sowohl Sonde als auch Substrat an eine feste Phase gebunden sind und sich nur das Cosubstrat in Lösung befindet. Diese Anordnung ist besonders vorteilhaft, da durch die Verwendung von zwei festen Phasen die Bindung der molekularen Sonde an das Biomolekül, die Bindung des Substrates und die Enzymreaktion unter ganz unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können, die feste Phase mit gebundenem Komplex aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde unverändert erhalten bleibt, deshalb mehrmals verwendet werden kann, oder die Sonde abgewaschen und ggf. durch andere ausgetauscht und so der Nachweis mit mehreren Sonden durchgeführt werden kann.

- Erkennungsschritt: an eine feste Phase I ist ein Biomolekül gebunden und an dieses wird eine durch eine Aminoglucosid-Phosphotransferase markierte molekulare Sonde angelagert;
- Waschschritt: überschüssige markierte molekulare Sonde wird ausgewaschen und/oder abgetrennt;
- Enzymreaktionsschritt: die Aminoglucosid-Phosphotransferase des an die feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde wird mit einem an eine feste Phase II gebundenen Substrat in Gegenwart eines sich in Lösung befindlichen Cosubstrates zur Reaktion gebracht;
- Trennschritt: überschüssiges Cosubstrat wird ausgewaschen oder abgetrennt;
- Auswertungsschritt: die Aktivität des phosphorylierten Substrates an der festen Phase II wird gemessen oder autoradiographisch bestimmt.

In allen Verfahrensvarianten ist es möglich, daß im Erkennungsschritt die Reaktion von Biomolekül und markierter molekularer Sonde nicht direkt, sondern über Zwischenstufen erfolgt. Das Biomolekül kann z. B. zunächst von einer Avidin- oder Streptavidin- bzw. Biotin-gekoppelten Sonde erkannt werden und diese danach mit einer Biotin- bzw. Avidin- oder Streptavidin-gekoppelten Aminoglucosid-Phosphotransferase umgesetzt werden. Dieses Prinzip läßt sich verallgemeinern, dahingehend, daß im Erkennungsschritt das Biomolekül in einem oder mehreren Erkennungssystemen und in einer oder mehreren Reaktionsstufen zunächst von einem oder mehreren Molekülen mit spezifischer Affinität erkannt oder mit einem oder mehreren Molekülen umgesetzt wird und die mit einer Aminoglucosid-Phosphotransferase gekoppelte molekulare Sonde mit mindestens einem dieser Moleküle reagiert. Damit wird eine weitere Verstärkung erreicht, zumal das Verfahren einmal oder mehrmals wiederholt werden kann.

Schließlich ist es ebenfalls möglich, den Enzymreaktionsschritt nach dem Erkennungs- und Waschschritt so durchzuführen, daß der Komplex aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde an der Kopplungsstelle aus Aminoglucosid-Phosphotransferase und molekularer Sonde wieder gespalten wird, d. h. daß die Kopplung mit Reagenzien erfolgt, die entweder selbst spaltbar sind oder daß die Kopplung an mindestens einem der beiden Reaktionspartner reversibel ist. Das Enzym kann dann in Lösung oder nach Bindung an eine andere feste Phase in Gegenwart des Cosubstrates das in Lösung befindliche oder an eine feste Phase gebundene Substrat phosphorylieren.

Die zur Bindung der Biomoleküle, Sonden oder Substrate verwendeten Träger können in verschiedener Form vorliegen, z. B. als Pulver, Granulate, Gele, Kugeln, Fasern und als Dispersion, Emulsion, Latex, Film, Säulenfüllung, Matrix, Vlies oder allgemein als Flächenträger ausgebildet sein. Das Material können natürliche oder künstliche Polymere oder deren Gemische sein. Die Bindung erfolgt über kovalente Bindung, wenn die feste Phase durch entsprechende chemische Verbindungen, z. B. Cyanurchlorid oder Bromcyan, aktiviert wurde. Eine Bindung ist auch über ionische Bindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen möglich.

Als feste Phase I sind deshalb Trägermaterialien geeignet, die nach allen drei Bindungsprinzipien zu binden vermögen. Beispiele für feste Phasen, die über elektrostatische, d. h. z. B. über hydrophobe, Dipol-Dipol- oder van der Waals'sche Kräfte, Wechselwirkungen binden, sind u. a. Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid. Beispiele für feste Phasen, die über ionische Kräfte binden sind z. B. modifizierte, ionisch geladene Polyamide, insbesondere Nylonmembranen, durch ionische Gruppen substituierte Cellulose wie Diethylaminoethylcellulose und sulfoniertes Polystyren. Beispiele für kovalent bindende feste Phasen sind Diazobenzoyloxymethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, durch Bromcyan aktivierte Cellulose oder aktiviertes Polystyren oder Glas. Verwendbar ist weiterhin chemisch aktiviertes Glas, das über ionische und/oder kovalente Bindungen zu binden vermag. Besonders bevorzugt zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Flächenträger aus den oben beschriebenen Materialien.

Die feste Phase II ist vor allem ein ionisch bindender Träger mit negativen Ladungen oder ein kovalent bindender Träger. Als negativ ionisch geladene Träger werden vor allem Cellulosederivate bevorzugt, z. B. Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose, durch Cyanurchlorid modifizierte Cellulose, die anschließend mit einer Verbindung, die mindestens eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe im Molekül aufweist, umgesetzt wird, wie es in der DD-WP 237.844 beschrieben ist. Als kovalent bindende Träger sind die gleichen, wie sie für die feste Phase I benannt wurden, geeignet. Besonders bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren wird die feste Phase II in Form von Flächenmaterialien.

Die selektiv bindende feste Phase III ist ein negativ ionisch geladener Träger. Hier sind wiederum Cellulosederivate oder sulfonierte Polystyrene oder durch Acrylate mit Carbonsäuregruppen beschichtete Materialien geeignet. Bevorzugt werden Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder Cellulosederivate nach DD-WP 237.844, die aus Cellulose durch Aktivierung mit Cyanurchlorid und anschließender Umsetzung mit einer Verbindung, die mindestens eine Aminogruppe und mindestens eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe im Molekül enthält, hergestellt werden.

Eine bevorzugte Variante zur Kopplung des Substrates an feste Phasen wird in der WP 254012 beschrieben.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, Biomoleküle durch molekulare Sonden mit höherer Empfindlichkeit, als bisher bekannt, nachzuweisen. Darüber hinaus kann der Nachweis der Biomoleküle an einer zweiten, getrennten festen Phase durchgeführt werden, wodurch das Biomolekül nicht geschädigt wird und damit wiederverwendbar bleibt. Ein solches indirektes Nachweisverfahren bei Nachweisen in der Genetik, beim Nachweis genetisch bedingter Krankheiten beim Menschen und von Virusspaltprodukten hat große Bedeutung, da der Nachweis mit mehreren Sonden geführt werden kann, die biologischen Moleküle durch schonende Inkubationen nicht geschädigt werden und schließlich ein Verstärkungsfaktor von mindestens 10 erreicht wird, der im allgemeinen aber wesentlich größer ist. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein neues Prinzip zum Nachweis von Biomolekülen dar.

Verwendete Pufferlösungen:

PBS: 8g NaCl, 0,2g KH_2PO_4 , 2,9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2g KCl werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt, pH = 7,4

TBS: 0,15M NaCl, 50mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH = 7,4

GET: 2,5mM Tris/HCl, pH = 8,0, 5 mM Glucose, 1mM Ethylendiamintetraessigsäure, Tetranatriumsalz (EDTA)

Lysepuffer: 125mM Tris/HCl, pH = 6,8, 2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 20mM Tris/HCl, pH = 7,4, 10mM Dithiothreitol, 0,1% SDS

Lösepuffer: in 100ml 20mM Tris/HCl, pH = 8,8, werden 48g Harnstoff gelöst und dazu 1% Nonidet NP40 und 10% β -Mercaptoethanol gegeben.

Enzympuffer: 20mM Tris/HCl pH 7,2, 125mM NH_4Cl , 20mM MgCl_2 , 10mM Dithiothreitol

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Kopplung von polyklonalem Antikörper an Kanamycin-Phosphotransferase

1 ml Anti-Humanserumalbumin-Antiserum (Kaninchen) mit 0,9% NaCl wird mit 10mg Benzochinon in 0,3ml Ethanol 1 Stunde bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht. Danach wird überschüssiges Benzochinon mittels einer Sephadex G 25-Säule abgetrennt und der Komplex Benzochinon-Antikörper fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden in einem Immunttest gegen Humanserumalbumin (HSA) geprüft. Die gesuchte Fraktion wird mit 1 mg Kanamycin-Phosphotransferase in 1 ml 1 M Bicarbonat-Puffer (pH-Wert = 9) über Nacht bei Zimmertemperatur im Dunkeln umgesetzt.

Das Reaktionsprodukt wird anschließend über Nacht gegen 0,9% NaCl-Lösung dialysiert und so verwendet. Es kann nach der Dialyse auch in Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert werden.

Beispiel 2

Immunologischer Nachweis von HSA durch einen Kanamycin-Phosphotransferase gekoppelten Antikörper mit Nachweis des umgesetzten Substrates auf einer festen Phase III

Ein Gemisch aus verschiedenen Markerproteinen und HSA wurde in einem Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter durch Elektrotransfer übertragen (Blot). Dieser Blot wird mit einem Kanamycin-Phosphotransferasegekoppelten Antikörper nach Beispiel 1 in TBS (ddurch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan gepufferte Kochsalzlösung von 0,9%) und 1% Gelatine 4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert (Verdünnung 1:500). Danach wird der Blot mit dem angelagerten, an Enzym gekoppelten Antikörper 4mal 15 Minuten in TBS gewaschen und mit einem 1% Agarosegel (im Reaktionspuffer hergestellt) mit 20mMol Tris/HCl, pH = 7,2; 125mMol NH_4Cl , 1mMol Dithioerythrol, 20mMol MgCl_2 , 2mMol Adenosintriphosphat (ATP), das 1 μCi gamma- ^{32}P -ATP/ml und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin enthält, 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Das Agarosegel wird anschließend auf Phosphorcellulose-Flächenträger aufgelegt und das Kanamycin auf die Phosphorcellulose übertragen (0,5kg/3 Stunden/Zimmertemperatur). Der Nachweis des mit ^{32}P markierten Kanamycins erfolgt durch Autoradiographie des Phosphorcellulose-Flächenträgers (2 Stunden, Zimmertemperatur).

Beispiel 3

Immunologischer Nachweis von HSA mittels eines Kanamycin-Phosphotransferase-markierten Antikörpers auf eine feste Phase II

Humanserum wird in einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird mit einem an Kanamycin-Phosphotransferase gekoppelten Antikörper 1 Stunde bei Zimmertemperatur mit TBS mit 2% Rinderserumalbumin (BSA) (Verdünnung 1:500) inkubiert und danach 1 Stunde mit TBS gewaschen.

Das Gel wird zunächst in einem Reaktionspuffer wie in Beispiel 2, bestehend aus 20mMol Tris/HCl, pH-Wert = 7,2, 125mMol NH_4Cl , 1mMol Dithioerythrol, 20mMol MgCl_2 und 2mMol ATP, das 1 μCi ^{32}P -gamma-ATP enthält, eine halbe Stunde inkubiert und danach mit einem Träger nach WP 254012, der aus Cellulose, die mit Cyanurchlorid und anschließend mit Sulfanilsäure umgesetzt wurde, besteht und wo an diesem Produkt ionisch Kanamycin gebunden wurde, in Kontakt gebracht und 30 Minuten bei 37°C umgesetzt. Nach Waschung (30 Minuten in Wasser) des Trägers II mit dem Substrat und dem phosphorylierten Substrat wird dieser 1 Stunde bei Zimmertemperatur autoradiographisch und so das ^{32}P -markierte Kanamycin auf dem Träger II nachgewiesen, wodurch das Vorhandensein von HSA im Trenngel bewiesen wird.

Beispiel 4

Immunologischer Nachweis von Humanserumalbumin nach Protein-Blot auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockbedingungen (Verwendung eines Protein A-NPT II-Fusionsproteins)

a) Konstruktion eines Protein A=NPT II-Fusionsproteinvektors, Expression und Gewinnung des Fusionsproteins
In den Multi-cloning-site eines Protein A-Fusionsprotein Vektors pRIT 2 (B. Nielsen, L. Abrahamsen, M. Uhlen, EMBO-Journal 4 [4] [1985], S. 1075–1080) wird das NPT II-Gen (Tn 5) (S. Brenner, Nature 329 [1987], S. 21) aus E. coli im offenen Leseraster eingesetzt. Die Transformation von E. coli (NF 1) und die Selektionierung des entsprechenden Klones über die Ampicillinresistenz erfolgten nach üblichen Methoden.

Die Anzucht des Protein A-NPT II-Fusionsprotein-Klones erfolgt im Flüssigmedium NB 1 (Immunpräparate Berlin, DDR) nach über Nacht durchgeführter Vorkultur 6 Stunden bei 30°C. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C wird das Fusionsprotein exprimiert (Promoter PR des Phagen λ). Nach 2 Stunden werden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit GET-Puffer gewaschen, in GET resuspendiert und in Portionen zu je 10^{10} Zellen in Eppendorf-Röhrchen abzentrifugiert. Zur Gewinnung des Fusionsproteins werden einmal 10^{10} Zellen im Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 6,8, bei 0°C resuspendiert und 5mal kurz von außen beschallt. Nach Abkühlung in Eis wird erneut 3mal kurz beschallt. Die Zellreste werden bei 4°C abzentrifugiert (5 Minuten). Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und in ein zweites Eppendorf-Röhrchen überführt.

b) Immunologischer Nachweis

Eine Verdünnungsreihe aus Proteinen mit Humanserumalbumin (HSA) im Nanogramm-Picogramm-Bereich wurde im SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elektrottransfers auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran (Blot) 30 Minuten an der Luft getrocknet und danach in TBS mit 1 Vol.-% Tween 20 eine Stunde bei 37°C geblockt. Eine weitere Blockierung erfolgt anschließend in TBS mit 0,2 Vol.-% Tween 20 innerhalb von 30 Minuten (Block I).

Die Inkubation mit dem Antiserum Anti-HSA-Immunglobulin (Kaninchen) erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 eine Stunde bei Zimmertemperatur. Danach wurde eine Stunde mit TBS mit 0,1 Vol.-% Tween 20 bei Zimmertemperatur gewaschen (6 Wechsel). Nach erneuter Blockung mit TBS und 0,2 Vol.-% Tween 20 (30 Minuten bei Zimmertemperatur) (Block II) wurden 50 µl des oben hergestellten Lysates mit dem Fusionsprotein aus Protein A und NPT II in ein Volumen von 10 ml gegeben und eine Stunde bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Nitrocellulose-Membranen (Hybond C, Amersham International) eine Stunde mit TBS gewaschen (6 Wechsel).

Ein nach DD-WP 254.012 aus mit Cyanurchlorid aktivierter Cellulose und Sulfanilsäure hergestellter und mit Kanamycin beladener Träger wird auf eine Glasplatte gelegt und mit dem Enzympuffer, der ^{32}P -γ-ATP mit einer Konzentration von 2 Mio cpm/ml (spezifische Aktivität 150 TBq/mMol) enthält, getränkt. Die oben erhaltenen Blots auf Nitrocellulose werden mit der beim Elektrottransfer gelseitigen Seite auf den feuchten, das Kanamycin tragenden Träger gelegt. Anschließend wird die Nitrocellulose-Membran nochmals von oben mit dem ^{32}P -γ-ATP enthaltenden Enzympuffer getränkt und schließlich mit einer Glasplatte gleicher Größe abgedeckt. Dieses System wird allseitig mit PE-Folie verschlossen und zunächst eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei während dieser Zeit die Glasplatten mittels eines Gewichtes leicht zusammengedrückt werden. Nach der Inkubation wird aus dem System der Kanamycin tragende Träger entnommen und eine Stunde mit bidest. Wasser gewaschen. Die Nitrocellulose-Membran wird sofort erneut auf einen Kanamycin enthaltenden Träger aufgelegt, mit ^{32}P -γ-ATP enthaltendem Enzympuffer befeuchtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit bidest. Wasser gewaschen. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der im Kontakt verwendeten, mit Kanamycin beladenen Träger. Die Nitrocellulose-Membranen werden nach Waschung mit bidest. Wasser (frei von ^{32}P -γ-ATP) zur Kontrolle mit autoradiographiert.

Durch die Autoradiogramme der im Kontakt verwendeten Träger wird die Lage der HSA-Banden bis in den Picogramm-Bereich als geschwärzte Banden auf dem Röntgenfilm dargestellt (Exposition: 30 Minuten bei Zimmertemperatur, Röntgenfilm HS 11, VEB ORWO Wolfen).

Da proteinfreie Blockbedingungen verwendet wurden, kann das Protein auf der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S angefärbt werden (Färbung: 2 Minuten, Entfärbung mit Wasser: 5 Minuten). Zur Auswertung wird die Autoradiographie des im Kontakt verwendeten Trägers über die angefärbten Nitrocellulose-Blots gelegt, so daß die Banden genau zugeordnet werden können.

Beispiel 5

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose unter Protein-Blockierungs-Bedingungen

Es wird ebenso wie in Beispiel 4 verfahren, jedoch wird als Block I TBS mit 0,5 Gew.-% Gelatine (1 Stunde) und TBS mit 0,25 Gew.-% Gelatine (30 Minuten) sowie als Block II TBS mit 0,25 Gew.-% Gelatine (30 Minuten) verwendet.

Die Auswertung erfolgt wie in Beispiel 4 durch Autoradiographie der im Kontakt verwendeten Träger.

Beispiel 6

Immunologischer Nachweis von α-Fetoprotein im Tüpfeltest auf Nitrocellulose

Eine Verdünnungsreihe von α-Fetoprotein (AFP) wird auf einen Streifen Nitrocellulose-Membran (Hybond C, Amersham Int.) aufgetüpfelt und bei Zimmertemperatur 30 Minuten trocknen gelassen. Die Blockierung erfolgt im Block I mit TBS und 1% Tween 20 1 Stunde bei 37°C und danach in TBS mit 0,2% Tween 20 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Zunächst wird mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) gegen HSA (Verdünnung 1:1000) inkubiert, danach mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen, erneut mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt und mit einem zweiten Antikörper (Kaninchen-Anti-Maus) 1 Stunde inkubiert (Verdünnung 1:500). Nach Waschung mit TBS + 0,1% Tween 20 eine Stunde bei Zimmertemperatur wird erneut mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt.

Danach werden 35 µl E. coli-Lysat, das nach Beispiel 4a hergestellt worden ist und das das Fusionsprotein aus Protein A und NPT II enthält, zugegeben und 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS (eine Stunde bei Zimmertemperatur) wird die Nitrocellulose-Membran mit dem Kanamycin-beladenen Träger (hergestellt nach DD-WP 254.012) in Kontakt gebracht und der Nachweis, wie in Beispiel 4 beschrieben, durchgeführt. Die Nachweisgrenze liegt im Picogramm-Bereich.

Beispiel 7

Nachweis von Kartoffel-Virus nach Tüpfeln von Pflanzensäften auf Nitrocellulose mittels NPTII-gekoppelten Antikörpern (Nachweis auf Trägern nach DD-WP 254.029)

a) Kopplung von Neomycin-Phosphotransferase II an Anti-Kartoffelvirus-Immunglobuline mittels Glutaraldehyd

400 µg nach Beispiel 4 a hergestellte und gereinigte NPTII werden zusammen mit 1 mg Anti-Kartoffelvirus-Immunglobulinen in einem Dialyseschlauch gegen PBS (16 Stunden, 4°C, 800 ml, 2 Wechsel) bei einem Schlauchvolumen von 1 ml dialysiert. Nach Umfüllen der dialysierten Probe in ein Glasröhrchen werden 5 µl Glutaraldehyd (25%ige Lösung, Serva) zugegeben und 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Zimmertemperatur umgesetzt. Anschließend wird der Koppelungsansatz in den Dialyseschlauch zurückgefüllt und zunächst gegen PBS (4°C, über Nacht) und danach gegen TBS (4°C, 800 ml, 2 Wechsel, 16 Stunden) dialysiert. Das Reaktionsprodukt wird in Glasröhrchen abgefüllt.

b) Durchführung des Nachweises

Eine Verdünnungsreihe Kartoffelblatt-Preßsaft wird auf einen Streifen Nitrocellulose-Membran aufgetüpfelt und 30 Minuten eintrocknen lassen. Die so behandelte Membran wird 1 Stunde bei 37°C in TBS + 1 % Tween 20 und anschließend 30 Minuten bei Zimmertemperatur in TBS + 0,2 % Tween 20 geblockt. Danach wird das oben hergestellte Kopplungsprodukt in einer Verdünnung von 1:200 zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS erfolgt der radioaktive Nachweis auf der mit Kanamycin beladenen Trägerschicht nach dem Kontaktverfahren analog Beispiel 4. Die Nachweisgrenze liegt im Picogramm-Bereich.

Beispiel 8

Nachweis von Kartoffelvirus aus Pflanzensäften nach Tüpfeln auf Nitrocellulose mittels Protein A-NPTII-Fusionsprotein (Kontaktträger P81)

Es wird eine Verdünnungsreihe mit Kartoffelblatt-Preßsaft wie in Beispiel 7 hergestellt. Nach der Blockierung wird jedoch eine Stunde mit Anti-Kartoffelvirus-Immunglobulinen (Kaninchen) (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Nach Waschen mit TBS + 0,1 % Tween 20 wird erneut mit TBS + 0,2 % Tween 20 geblockt und danach 50 µl Lysat nach Beispiel 4 a zugegeben und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS wird das Kontaktverfahren analog zu Beispiel 4 b zum Nachweis durchgeführt.

Als Kanamycin-beladener Träger wird jedoch Phosphorcellulose (P81, Whatman, England) eingesetzt. Im Enzympuffer wird eine spezifische Aktivität des ³²P-γ-ATP von 10 Mio cpm/ml verwendet.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose-Träger nach Waschung mit Wasser (1 Stunde). Die Empfindlichkeit liegt wiederum im Picogramm-Bereich.

Beispiel 9

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf Nylon-Membranen mittels Protein A-NPTII-Fusionsprotein (Kontaktträger: Kanamycinbeladene Phosphorcellulose)

Eine Verdünnungsreihe HSA wird auf einen Streifen Nylon-Membran (Hybond N, Amersham Int.) aufgetüpfelt und 30 Minuten trocknen gelassen. Die Blockierung erfolgt 2 Stunden in TBS mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA) und danach 30 Minuten in TBS mit 1 % BSA. Die Blockierung II erfolgt 30 Minuten in TBS mit 1 % BSA. Das Gesamtverfahren erfolgt ebenso, wie in Beispiel 4 beschrieben. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose (P81)-Träger.

Beispiel 10

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose-Membranen unter proteinfreien Blockierungsbedingungen

Die Durchführung des Verfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Jedoch wird als Kanamycin-beladener Träger Phosphorcellulose (P81, Whatman) eingesetzt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose mittels Röntgenfilm (Exposition: 15 Minuten, Zimmertemperatur).

Beispiel 11

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blockierung auf Nitrocellulose-Membranen unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Kontaktverfahren mit Neomycin-beladener Phosphorcellulose)

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Es wird jedoch als mit Antibiotikum-beladener Träger mit Neomycin beladene Phosphorcellulose (Inkubation der Phosphorcellulose 30 Minuten mit einer Lösung aus 400 mg Neomycin in 60 ml Wasser und Waschen mit Wasser 30 Minuten) eingesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose mittels Röntgenfilm (Exposition: 15 Minuten, Zimmertemperatur).

Beispiel 12

Immunologischer Nachweis von HSA nach Blotting von Proteinen auf Nitrocellulose

unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Kontakt mit Phosphorcellulose, Kanamycin im Enzymreaktions-Puffer)

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt wie im Beispiel 4. Als Kontaktträger wird jedoch Phosphorcellulose (P81, Whatman) ohne vorherige Beladung mit Antibiotika verwendet.

Dem Enzympuffer wird Kanamycin mit einer Konzentration von 4 mg/ml zugesetzt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose.

Beispiel 13

Wiederverwendung von Protein-Blots

Die Protein-Blots auf Nitrocellulose (Hybond C) werden nach der Durchführung des Gesamtverfahrens, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist (Runde 1), bei 70°C 2mal 15 Minuten mit dem Elutionspuffer 3 % SDS, 0,1 M β-Mercaptoethanol in TBS gewaschen und damit der 1. Antikörper einschließlich der enzymmarkierten Sonde eluiert. Nach der Waschung wird mit TBS + 0,1 % Tween 20 erneut geblockt und das Verfahren, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist, wiederholt. Die Kontaktträger der 1. und der 2. Runde werden gemeinsam autoradiographiert. Es wird kein Intensitätsverlust nach der Wiederverwendung der Blots festgestellt.

Beispiel 14

Immunologischer Nachweis von HSA nach Proteinblotting auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Kontaktträger: mit Kanamycin beladene Carboxymethyl-Cellulose)
Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Als Kontaktträger wird mit Kanamycin beladene Carboxymethyl-cellulose (CM-Membranen, Renner GmbH) verwendet. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der CM-Membranen.

Beispiel 15

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Verwendung eines Kopplungsproduktes aus Protein A und NPTII mit einem Toluylendiisocyanat-2,4-Präpolymeren)

A) Herstellung der enzymmarkierten Sonde

a) Elektrophoretische Reinigung von NPTII aus E.coli-Lysaten

Das Zellpellet von 10 ml E. coli (NPTII überexprimierend) Zellkultur (pRK89) wird in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und beschallt. Zellreste werden bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellysate wird auf ein präparatives PAA/SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird nach Waschen mit Wasser in eine kalte Lösung von 0,25 M KCl gelegt, die sichtbar gewordene NPTII-Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und zerkleinert. Das Protein wird mittels Elutionspuffer innerhalb von 3 Stunden bei Raumtemperatur eluiert. Die durch Elution erhaltenen Lösungen werden zentrifugiert und der Überstand mit dem Vierfachen des volumenkalt Acetons versetzt und 3 Stunden bei -20°C stehengelassen. Danach wird bei 0°C zentrifugiert. Nach Waschen wird das Pellet in 200 µl Lösepuffer gelöst und gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer über Nacht dialysiert (4°C). Im Endvolumen von etwa 200 µl befinden sich ungefähr 200 µg NPTII.

b) Kopplung

Zur Kopplung wird ein Präpolymeres aus 17,4 g frisch destillierten Toluylendiisocyanat-2,4 und 30 g Polyethylenglykol 600 bei 50–60°C hergestellt. 100 mg dieses Präpolymeren werden in 500 mg Aceton gelöst; nach vollständiger Lösung werden 300 mg dieser Lösung in 700 mg Wasser emulgiert.

800 µl des unter a) erhaltenen Lysates werden mit 150 µg Protein A in 150 µl Wasser in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt. Zu dieser Lösung werden 200 µl der oben hergestellten Emulsion zugegeben und 1 Stunde unter Schütteln umgesetzt. Nach einer Stunde werden erneut 100 µl frisch hergestellte Emulsion zugesetzt und noch eine Stunde umgesetzt. Danach wird mit einer Lösung von 200 µg Lysin in 150 µl Wasser 30 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt.

c) Nachweis

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt wie in Beispiel 4. Jedoch wird an Stelle des gentechnisch hergestellten Protein A-NPTII-Fusionsproteins 50 µl des oben hergestellten Kopplungsproduktes als enzymmarkierte Sonde verwendet. Der Nachweis erfolgt wieder durch Autoradiographie.

Beispiel 16

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf CCA-Papier (Kontaktträger nach DD-WP 254.012)

Eine Verdünnungsreihe von HSA wird auf CCA-Papier (hergestellt nach EP 0134.025) aufgetüpfelt und 30 Minuten an der Luft trocknen gelassen. Danach wird der Träger in eine Lösung aus 10% Sulfanilsäure und 10% Triethanolamin (pH = 7,5) eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Block I erfolgt in TBS mit 0,5% Gelatine und 30 Minuten in TBS mit 0,25% Gelatine. Danach wird das Verfahren wie in Beispiel 5 durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontaktträgers nach DD-WP 254.012 und des CCA-Papiers. Auf beiden Trägern läßt sich durch ³²P-γ-ATP markiertes Kanamycin nachweisen.

Beispiel 17

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf ein negativiertes Papier (Kontaktträger Phosphorcellulose)

Ein negativer Träger wird aus CCA-Papier und Sulfanilsäure nach DD-WP 237.841 hergestellt. Auf diesen Träger wird eine Verdünnungsreihe von HSA aufgetüpfelt und als Blockierungsmittel (Block I und II) eine Lösung von 10% Sulfanilsäure und 10% Triethanolamin vom pH = 7,5 verwendet. Als mit Kanamycin beladener Träger wird mit Kanamycin beladene Phosphorcellulose (P81, Whatman) verwendet. Der Nachweis erfolgt dann wie in Beispiel 4. Der Nachweis des HSA erfolgt durch Autoradiographie an beiden Trägern.

Beispiel 18

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf einen hydrophoben Träger (Kontaktträger nach DD-WP 254.012)

Ein hydrophober Träger wird nach DD-WP durch Umsetzung des CCA-Papiers (nach EP 0134.025) mit äquimolekularen Mengen Di-n-octylamin und Sulfanilsäure als Natriumsalz hergestellt. Auf diesen Träger wird eine HSA-Verdünnungsreihe aufgetragen. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur sind die Tropfen auf dem Träger eingetrocknet, man läßt noch weitere 15 Minuten nachtrocknen. Die Blockierung erfolgt im Block I und II mit TBS plus Gelatine, wie es in Beispiel 5 beschrieben worden ist. Die Durchführung des Verfahrens erfolgt ansonsten, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist.

Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie auf beiden Trägern.

Beispiel 19

Immunologischer Nachweis von HSA nach Proteinblotting auf Nitrocellulose (Kontaktträger Phosphorcellulose) und Verstärkung der Nachweisreaktion

Eine Verdünnungsreihe wird auf Nitrocellulose (Hybond C, Amersham) geblottet und anschließend geblockt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wird zunächst mit TBHS + 0,1% Tween 20 1 Stunde gewaschen, danach wieder geblockt (TBS mit 0,2% Tween 20) und mit 10 µg Protein A in 10 ml Lösung leicht geschüttelt. Daran anschließend wird erneut mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und erneut geblockt.

100 µl des vorgebildeten Komplexes aus HSA-Antihumanserumalbumin-Protein-A NPTII-Fusionsprotein (hergestellt aus 50 µl Lysat nach Beispiel 4, 5 µg HSA und 50 µl Anti-HSA-Immunglobulin (Kaninchen), Inkubation bei 4°C über Nacht) werden dann zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Anschließend wird mit TBS gewaschen und das Kontaktverfahren nach Beispiel 4 mit einem mit Kanamycin beladenen Träger nach DD-WP 254.012 durchgeführt. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontakt-Trägers (30 Minuten bei Zimmertemperatur).

Beispiel 20

Immunologischer Nachweis von α-Fetoprotein nach Tüpfeln auf Nitrocellulose (Kontaktträger nach DD-WP 254.012) – Verstärkung durch mit Antikörper vernetztes Protein A-NPTII-Fusionsprotein

Die ersten Schritte des Verfahrens erfolgen, wie es im Beispiel 6 beschrieben worden ist. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper (monoklonal) wird mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt. Danach werden 50 µl biologisch vernetztes Protein A-NPTII-Fusionsprotein zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS (1 Stunde) wird weiter wie in Beispiel 6 verfahren. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontaktträgers in 20 Minuten bei Zimmertemperatur.

Herstellung des biologisch vernetzten Protein A-NPTII-Fusionsproteins

50 µl eines nach Beispiel 4 hergestellten Zellysates mit Protein A-NPTII-Fusionsprotein werden mit 5 µl Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum vermischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der sich bildende Komplex aus Protein A-NPTII-Fusionsprotein und Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper wird als 2. Antikörper nach dem Nachweis eines Antigens mit dem ersten Antikörper (Maus) verwendet.

Beispiel 21

Immunologischer Nachweis von HSA (Enzym-Reaktion in Lösung)

Eine Verdünnungsreihe von HSA wird auf einzelne Rundfilter aus Nitrocellulose (Hybond C, Amersham Int.) aufgetüpfelt (Durchmesser 0,5 cm²) und zunächst wie in Beispiel 4 weiter bearbeitet. Nach dem Inkubieren mit Protein A-NPTII-Fusionsprotein werden die Filter 1 Stunde in TBS gewaschen und danach einzeln in Plastebehälter überführt. Es werden jeweils 0,5 ml Enzympuffer, 1 mg Kanamycin und ³²P-γ-ATP (10 Mio cpm/ml, spezifische Aktivität 5000 C/mM) zugesetzt und 1 Stunde bei 37°C umgesetzt. Die Nitrocellulose-Membranen werden entnommen, ein Rundfilter aus Phosphorcellulose (P81, 1 cm²) zugesetzt und 30 Minuten geschüttelt. Die Phosphorcellulose-Filter werden entnommen, 1 Stunde mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Szintillationszähler gemessen. Die Auswertung erfolgt direkt über den Meßwert der Radioaktivität (als Kontrolle wird ein Nitrocellulose-Filter ohne HSA mitgeführt).