



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 70728
UTLÄGGNINGSSKRIFT

- C (45) Patentti myönnetty**
Patent mottolat 03 10 1986
- (51) Kv.lk./Int.Cl. C 12 Q 1/28, G 01 N 33/58,**
21/76
- (21) Patentihakemus — Patentansökning 834024**
- (22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 02.11.83**
- (23) Alkuperä — Giltighetsdag 25.02.83**
- (41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 02.11.83**
- (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —**
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 26.06.86
- (86) Kv. hakemus — Int. ansökan PCT/GB83/00058**
- (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 03.03.82**
Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 8206263

- (71) National Research Development Corporation, 101 Newington Causeway,**
London SE1 6BU, Englanti-England(GB)
- (72) Timothy Joseph Nicholas Carter, Geneve, Sveitsi-Schweiz(CH)**
Carol Jacqueline Groucutt, Halesowen, West Midlands, Richard Andrew
Whitfield Stott, Walsall, West Midlands, Gary Harold Gregory Henry
Thorpe, Handsworth, Birmingham, Thomas Patterson Whitehead, Leamington
Spa, Warwickshire, Iso-Britannia-Storbritannien(GB)
- (74) Berggren Oy Ab**
- (54) Parannettu aineen luminesenssi- tai luminometrinen määrittäminen - Förbättrad**
luminescent eller luminometrisk bestämning av en substans

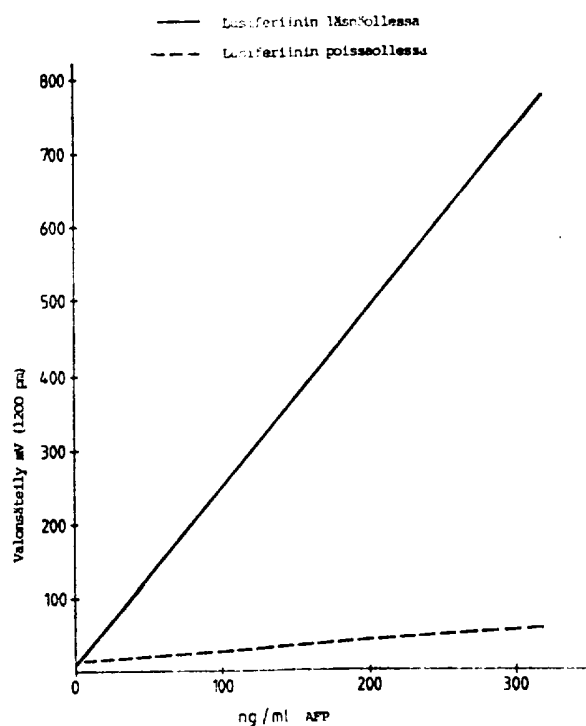
(57) Tiivistelmä

Vahvistettu luminesenssi- tai luminometrinen koe, etenkin immunokoe, johon sisältyy luminesenssireaktio peroksidaasi-entsyymien, hapettimen, 6-hydroksibentsotiatsolin ja kemiluminesoivan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin välillä. Mieluimmin käytetyt aineet ovat piparjuuri-peroksidaasi entsyyminä, vetyperoksidi hapettimena, 6-hydroksibentsotiatsoli, 2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli tai tulikärpäs-lusiferiini bentsotiatsolina ja joko luminoli tai isoluminoli ftalatsiinidionina. Erikoisen edullisessa sovellutusmuodossa piparjuuri-peroksidaasi on kytetty tutkittavan aineen vasta-aineeseen toimien täten kokeen merkkiaineena immunokokeessa.

(57) Sammandrag

Ett förstärkt luminescens- eller luminometriskt prov, särskilt immunprov, innefattar en luminescensreaktion mellan ett peroxidas-enzym, ett oxidationsmedel, en 6-hydroxibensotiazol och en kemiluminescerande 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion. Föredragna substanser är pepparrots-peroxidas som enzym, väteperoxid som oxidationsmedel, 6-hydroxibensotiazol, 2-cyano-6-bensotiazol eller eldfluga-luciferin som bensotiazol och antingen luminol eller isoluminol som ftalazindion. I en särskilt föredragen utföringsform är pepparrots-peroxidaset kopplat till en motkropp till den substans som skall undersökas och verkar därigenom provets märksubstans i ett immunprov.

Fig.2.



Parannettu aineen luminesenssi- tai luminometrinen määrittäminen
Förbättrad luminescent eller luminometrisk bestämning av en substans

Tämä keksintö kohdistuu parannettuun aineen luminesenssi- tai luminometriseen määrittämiseen, etenkin immunoanalyysiin, ja diagnostiseen välinesarjaan määrittämisen suorittamiseksi.

Immunokoe on eräs laajimmin käytettyjä analyysitekniikkoja kliinisessä laboratoriossa. Nykyään useimmissa immunokokeissa käytetään radioaktiivista isotooppia, etenkin jodi-125, merkkiaineena. Radioaktiivisilla isotoopeilla on kuitenkin useita huomattavia epäkohtia. Ensinnä, merkitsemismenetelmään sisältyy erittäin radioaktiivisten ja täten potentiaalisesti vaarallisten reagenssien käyttö. Toiseksi, radioaktiivisesti merkityn aineen elinikä on usein suhteellisen lyhyt, ei vain sen vuoksi, että radioaktiivinen isotooppi jo luonteensa takia jatkuvasti heikkenee, vaan myös koska radioaktiivisesti merkityt proteiinit usein ovat epästabiileja. Kolmanneksi, on usein vaikeata riittävästi merkitä proteiineja herkästi ja nopeasti havaittavan reagenssin saamiseksi. Neljänneksi, radioaktiivisesti merkittyjen aineiden hävittäminen on hankalaa.

Nämä epäkohdat ovat käynnistäneet tutkimukset radiomerkkiaineiden käyttökelpoisten vaihtoehtojen löytämiseksi. Ollakseen sopiva merkkiaineena aineen tulee täyttää ainakin seuraavat kolme vaatimusta:

- a. sen tulee olla havaittavissa sekä nopeasti ja erittäin pieninä määrinä ollessaan kiinnitettynä ligandiin, kuten anti-geeniin tai vasta-aineeseen;
- b. tulisi olla mahdollista kiinnittää se, vaikuttamatta sen määrittämiseen, ligandiin, kuten antigeeniin tai vasta-aineeseen, ja
- c. kerran kiinnitettynä se ei saisi merkittävästi muuttaa ligandin ominaisuuksia.

Eräitä lupaavimpia vaihtoehtoisia merkkiaineita ovat joko aineet, jotka itse pystyvät osallistumaan reaktioon, jonka

vaikutuksesta syntyy luminesoivan valon säteilyä, tai aineet, jotka sopivalla tavalla käsiteltyinä synnyttävät yhdisteitä, jotka kykenevät osallistumaan luminesenssireaktioon. Kemiluminesenssireaktio (kemiallinen reaktio, joka johtaa luminesoivan valon säteilyyn) on yleensä riittävän kestävä, jotta on mahdollista havaita ja mitata säteilevä valo ja täten mahdollistaa merkityn aineen määrän määrittäminen. Toisaalta luminesenssin mittaaminen on nopea prosessi ja se voidaan suorittaa muutamassa sekunnissa verrattuna radioaktiivisuuden mittaamiseen tarvittaviin useihin minuutteihin. Yhteenvedo tästä aiheesta on esitetty aikakausjulkaisussa T.P. Whitehead et al., Clinical Chemistry, vol. 25. ss. 1531-1546 (1979).

Luminesenssia on käytetty hyväksi kolmessa tärkeässä luminesenssi- eli luminometrisessä immunokoejärjestelmässä:

- a) Organoluminesenssi- eli organoluminometrisissä immunokokeissa, joissa on käytetty kemiluminesoivia tai bioluminesoivia yhdisteitä, jotka osallistuvat suoraan luminesenssireaktioihin (siis jotka muuttuvat viritettyyn olotilaan ja sitten palautuva virittämättömään olotilaan luovuttaen fotonin), ligandien, kuten proteiinien, hormonien, hapteenien, steroidien, nukleiinihappojen, metaboliittien, antigeenien ja/tai vasta-aineiden merkitsemiseen. Esimerkkejä sopivista kemiluminesoivista yhdisteistä ovat luminoli ja isoluminoli; ja esimerkkejä bioluminesoivista yhdisteistä ovat lusiferiinit ja lusiferaasit, ks. GB-patenttihakemusjulkaisut 2 008 247 A ja 2 026 690 A.
- b) Luminesenssikatalysaattori- eli kofaktori-immunokokeet, joissa on käytetty luminesenssireaktioiden katalysaattoreita eli kofaktoreita merkkiaineina. Esimerkki sopivasta katalysaattorista on peroksidaasientsyymi.
- c) Entsyymiin sidotut immunokokeet, joissa luminesenssireaktiota on käytetty entsyymimerkkiaineiden vaikutuksesta sopiviin substraatteihin syntyvien tuotteiden määritykseen. Esimerkkinä tämältyypisistä immunokokeista on vasta-aineeseen kytketyn glukooksioksidaasin määritys saattamalla entsyymi/vasta-aine-reagenssi reagoimaan glukooksin kanssa vetyperoksidin muodostamiseksi ja sitten mittaamalla syntyneen vetyperoksidin määrä lisäämällä luminolia säädetyissä olosuhteissa luminesenssireaktion aikaansaamiseksi.

Edellä esitettyjen immunokokeiden herkkyys määräytyy osaksi merkkiaineen tai merkkiainetuotteen määrittämisen alarajan mukaisesti.

Luminesenssi- tai luminometrinen immunokokeiden tapauksessa järjestelmän herkkyys on osaksi riippuvainen luminesenssireaktion säteilemästä valosta merkityn aineen yksikköä kohti. Tämän keksinnön eräänä tarkoituksena on saada aikaan luminesenssi- eli luminometrinen immunokoe, jolla on parannettu herkkyys, joka on saatu aikaan määrittämällä merkitty aine tai merkkiaineen tuote esillä olevan parannetun luminesenssireaktion välityksellä.

EP-patenttihakemusjulkaisusta 0 070 686 A tunnetaan määrittämenetelmä, jossa kemiluminesenssireaktiosta vapautuvaa energiaa käytetään fluoresoijan (nk. absorboija-säteilijä) virittämiseksi. Syntynyt fluoresoiva säteily mitataan. Julkaisun mukaan analyysin herkkyyttä parannetaan. Ajatus perustuu siihen, että ainoastaan kun fluoresoijaan sitoutunut ensimmäinen vasta-aine ja peroksidaasiin sitoutunut toinen vasta-aine sitoutuvat samaan antigeeniin niin voidaan havaita fluoresoivaa säteilyä. Toisin sanoen se tekijä, joka aikaansaa parannetun herkkyuden, on fluoresoijan (absorboija-säteilijä) ja kemiluminesenssireaktion reagenssin (peroksidi) saattaminen läheiseen kosketukseen toisensa kanssa. Kemiluminesoiva säteily suodatetaan pois, jotta fluoresoiva säteily voidaan mitata.

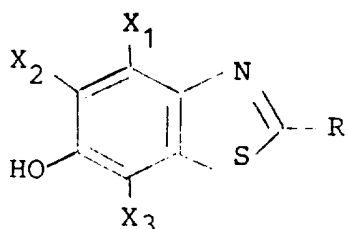
GB-patenttijulkaisusta 2 095 830 A tunnetaan samoin määrittämenetelmä, jossa kemiluminesenssireaktiosta vapautuvaa energiaa käytetään fluoresoivan yhdisteen virittämiseksi. Luminolilla merkitty vasta-aine saatetaan reagoimaan fluoreseiinilla merkityn antigeenin kanssa. Lisätään peroksidaasia ja vetyperoksidia. Mitataan valon säteily fluoreseiinin fluoresenssiaallonpituudella (joka on suurempi kuin luminolin kemiluminesenssiaallonpituus).

Esimerkkejä kokeista, jotka eivät ole immunokokeita, mutta joissa voidaan käyttää luminesenssireaktiota, ovat:

- a) Elastaasikoe, joka perustuu peroksidaasin vapautumiseen liukenemattomasta peroksidaasi-elastiini-valmisteesta,
- b) glukosikoe, joka perustuu koimmobilisoituun glukosioksiidaasiin ja peroksidaasiin, ja
- c) peroksidaasi-entsyymin, 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin, 6-hydrobentsotiatsolin tai hapettimen, kuten vetyperoksidin koe, jolloin nämä aineet eivät ole merkkiaineita eivätkä merkkiaineen tuotteita.

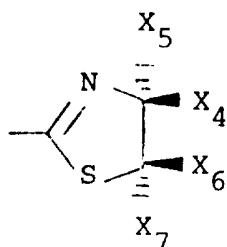
Artikkelissa D. Slawinska et al., Int. Symp. Anal. Appl. Biolumin. Chemilumin., toim. Schram ja Stanley (1979), ss. 239-257, josta on esitetty tiivistelmä julkaisussa Chemical Abstracts, vol. 93 (1980), 64280 u, on raportoitu kokeista, joissa on suoritettu luminesenssireaktioita käyttäen luminolia, erilaisia polyfenoleja tai tulikärpäs-lusiferiinia yhdessä vetyperoksidin ja peroksidaasin kanssa peroksidaasin määrittämiseksi. Tulikärpäs-lusiferiini synnyttää 10 mM H_2O_2 :n läsnäollessa voimakkaita kemiluminesenssihuippuja. Voimakkailla kemiluminesenssihuipuilla tarkoitetaan hyvin nopeata, lyhytikäistä ja nopeasti vaimentuvaa valon säteilyä, eli valon leimahduksia. Tällaiset leimahdukset ovat herkkiä reagenssien sekoitusnopeudelle ja vaativat, että reagenssit sekoitetaan detektorin edellä hyvin nopeasti, tehokkaasti ja tarkoin toisinnettavissa olevalla tavalla. Ne vaativat myöskin mittauksen täsmällisen ajoituksen tarkkojen tulosten saamiseksi. Tällaiset ehdot rajoittavat huomattavasti reaktioiden käyttökelpoisuutta analyysissä.

Esillä olevan keksinnön laajimman aspektin mukaan on täten saatu aikaan parannettu aineen luminesenssi- tai luminometrinen määrittäminen saattamalla peroksidaasi-entsyymi, hapetin ja kemiluminoiva 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni reagoimaan luminesenssireaktiossa aineen määrän toteamiseksi, havaitsemiseksi tai paikallistamiseksi, jolle määrittämiselle on tunnusomaista se, että luminesenssireaktion herkkyyttä parannetaan 6-hydroksibentsotiatsolin läsnäololla, jolla on yleinen kaava II



II

jossa X_1 , X_2 ja X_3 ovat jokainen H ja R on H, CN tai tiatsoli-substituentti, jolla on yleinen kaava III



III

jossa X_4 on COOH ja X_5 , X_6 ja X_7 ovat jokainen H, tai X_4 ja X_5 ovat yhdessä O ja X_6 ja X_7 ovat kumpikin H tai X_4 on COOH, X_5 ja X_6 edustavat kaksoissidosta ja X_7 on H.

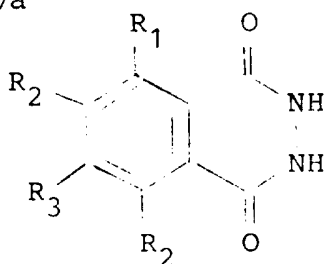
Määrittäminen on edullisesti immunoanalyysi, mutta keksintöä voidaan myös soveltaa edellä mainittuihin kokeisiin. Esillä oleva keksintö perustuu siihen yllättävään havaintoon, että tiettyjen 6-hydroksibentsotiatsolien lisääminen tunnettuun 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni/hapetin/peroksidaasi-järjestelmään merkittävästi parantaa aikaansaadun luminesenssireaktion herkkyyttä.

Tässä selityksessä termi "parannettu" tarkoittaa sitä, että esillä olevan luminesenssireaktion valon säteily ja/tai esillä olevan luminesenssireaktion signaalin suhde taustaan on suurempi kuin se, joka saadaan aikaan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni/hapetin/peroksidaasi-järjestelmällä 6-hydroksibentsotiatsolin poissaollessa. Vain ne kokeet, joihin sisältyy luminesenssireaktio, joka on tällä tavalla "parannettu", lankeavat esillä olevan keksinnön puitteisiin.

Esillä olevan järjestelmän erikoisena etuna on, että 6-hydroksibentsotiatsolia lisäämällä aikaansaatu parannus on spesifinen reaktioille, joissa käytetään peroksidaasi-entsyymiä.

Esillä olevan keksinnön mukainen kemiluminesoiva 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni (DPD) voi olla mikä tahansa DPD, joka on muutettu viritettyyn olotilaan kemiluminesenssireaktiolla ja joka sitten palautuu virittämättömään olotilaan valoa säteillen.

Edullisesti 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni on yhdiste, jolla on yleinen kaava



jossa R_1 on amino ja R_2 , R_3 ja R_4 ovat jokainen H tai R_2 on amino tai metyyllillä, etyyllillä tai 6-aminoheksyyllillä substituoitu amino ja R_1 , R_3 ja R_4 ovat jokainen H tai R_1 ja R_2 ovat yhdessä dimetyyliaminolla substituoitu bentsoryhmä ja R_3 ja R_4 ovat kumpikin H.

Muoto, jonka kemiluminesoiva DPD ottaa keksinnön mukaisessa luminesenssireaktiossa, on riippuvainen kyseessä olevasta koetyypistä. Sellaisten kokeiden, kuten organoluminesenssi- eli organoluminometrinen immunokokeiden ollessa kyseessä, joissa ftalatsiinidionia käytetään merkkiaineena, kemiluminesoiva DPD on 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin substituoitu aminojohdannainen, jossa aminoryhmä on kytketty ligandiin, kuten proteiiniin, hormoniin, hapteeniin, steroidiin, nukleiinihappoon, metaboliittiin, anti-geeniin tai vasta-aineeseen. Aminoryhmä voi olla kytketty ligandiin suoraan tai silloitusvarren välityksellä. Sopivat silloitusvarret ovat alan ammattimiehille hyvin tunnettuja, kuten käy ilmi niiden selostuksesta GB 2 008 247 A:ssa ja US 4 104 029:ssa. Sopiviin silloitusvarsiin kuuluvat hemisukkinaatti-, hemiglutaraatti-, hemimaleaatti-, karboksimeyyli-, glukoronidi-, merkaptosaatti- ja karboksimeyylijohdannaisista johdetut. Aminoryhmä voi olla kytketty ligandiin millä tahansa hyvin tunnetulla menetelmällä, joista muutamia on myös selostettu GB 2 008 247 A:ssa ja US 4 104 029:ssa. Mieluimmin käytetyt kytkentämenetelmät käsittävät seka-anhydridien, karbodiimidien ja/tai aktiivisten estereiden käytön.

Vaikkakin sellaisiin kokeisiin, joissa käytetään ftalatsiinidionia merkkiaineena, soveltuvat kemiluminesoivat DPD:t voi olla mikä

tahansa 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin substituoituaminojohdannainen, aminoryhmän ollessa kytketty ligandiin, mieluummin käytetyt aineet ovat 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni (luminoli) ja 6-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni (isoluminoli), jolloin kummassakin tapauksessa aminoryhmä on kytketty ligandiin, etenkin vasta-aineeseen.

Muissa kuin ftalatsiinidionia merkkiaineena käyttävissä kokeissa kemiluminesoiva DPD voi olla 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni, etenkin edellä esitettyä mieluummin käytettyä tyyppiä oleva, joka ei ole kytketty ligandiin. Tässä tapauksessa kemiluminesoiva DPD voi olla vapaana liuoksessa tai kantajalle immobilisoituna. Kaikkein mieluummin käytetyt aineet ovat luminoli ja isoluminoli.

Keksinnön mukaisessa luminesenssireaktiossa voidaan käyttää mitä tahansa peroksidaasi-entsyymiä /joka on International Union of Biochemistry'n määrittelemä donorina; vetyperoksidina; oksidoreduktaasina (EC No. 1.11.1.7)]7, joka katalysoi 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin luminesenssireaktiota, etenkin luminolia. Esimerkkinä mainittakoon kasviperoksidaasit. Entsyymi on mieluummin piparjuuri-peroksidaasi (EC No. 1.11.1.7).

Peroksidaasi-entsyymin keksinnön mukaisessa luminesenssireaktiossa ottama muoto on riippuvainen kyseessä olevasta koetyypistä. Kokeiden, etenkin immunokokeiden ollessa kyseessä, joissa peroksidaasia käytetään merkkiaineena, se kytketään ligandiin, kuten proteiiniin, hormoniin, hapteeniin, steroidiin, nukleiinihappoon, metaboliittiin, antigeeniin tai vasta-aineeseen. Yleensä peroksidaasi kytketään ligandiin silloitusvarren välityksellä. Sopivia silloitusvarsia ja kytkentämenetelmiä ovat edellä kemiluminesoivan DPD:n yhteydessä esitetyt.

Muiden kuin peroksidaasia merkkiaineena käyttävien kokeiden ollessa kyseessä, entsyymi on vapaassa muodossa, joko liuoksena tai kantajalle immobilisoituna, kytkemättä ligandiin.

Esillä olevassa luminesenssireaktiossa voidaan käyttää mitä tahansa hapetinta, joka reagoi 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin kanssa, etenkin luminolia tai isoluminolia, DPD:n virityksen aikaansaamiseksi niin, että se säteilee valoa luminesenssireaktiossa. Kaikkein mieluummin käytettyjä hapettimia ovat perboraatti-ioni ja vetyperoksidi.

Kokeissa, etenkin immunokokeissa, joissa käytetään 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionia tai peroksidaasi-entsyymiä ligandin merkkiaineena, lisätään reaktioseokseen tunnettu määrä hapetinta, yleensä omistajalähteestä. Joissakin toisissa kokeissa on kuitenkin hapettimen, tavallisesti vetyperoksidin läsnäoleva määrä tuntematon. Tässä toisentyyppisessä kokeessa merkkiaine on aine, usein entsyymi, kuten glukooksioksidaasi tai laktaattidehydrogenaasi, joka osallistuu substraatin muuttamiseen hapettimiksi. Täten tässä tapauksessa esillä olevaa luminesenssireaktiota käytetään merkityn ligandin määritykseen mittaamalla hapettimen konsentraatio luminesenssireaktioseoksessa.

Keksinnön mukaisen luminesenssireaktion säteilemä valo, vaikkakin se on riippuvainen ensisijaisesti peroksidaasin, hapettimen, 6-hydroksibentsotiatsolin ja kemiluminesoivan DPD:n valinnasta, määräytyy myös sekundäärisistä tekijöistä, kuten lämpötilasta, pH:sta, reagenssien konsentraatiosta, sekoitusnopeudesta ja valonmittausmenetelmästä. Esillä olevan järjestelmän herkkyyden maksimoimiseksi näitä sekundäärisiä tekijöitä tulee säätää siten, että saadaan aikaan maksimaalinen valon säteily reprodusoitavalla ja helposti mitattavalla tavalla, signaalin suhteen taustan ollessa mahdollisimman suuri.

Valitut olosuhteet ovat tavallisesti kompromissi peroksidaasin entsyymi- tai katalyyttiaktiivisuuden, reaktiokinetiikan, käytetyn laitteen, signaali/taustasuhteen ja tarvittavan herkkyyden välillä.

Keksijät ovat todenneet, että parhaiden tulosten saavuttamiseksi esillä oleva luminesenssireaktio tulisi suorittaa kohtalaisissa lämpötilaolosuhteissa alueella 10-50°C ja pH-alueella 6-10, useimmiten 7-9. Sopivia puskuriaineita keksinnön mukaisessa menetelmässä ovat fosfaatti, tris(hydroksimetyyli)-aminometaani, 2-amino-2-metyyli-1,3-propaanidioli, asetaatti, karbonaatti ja boraatti.

Yleensä luminesenssireaktioseoksen reagenssien konsentraatiot pidetään vakiona, lukuunottamatta määritettävän aineen konsentraatiota. Muuttuva tekijä voi esimerkiksi olla merkityn ligandin, merkkiaineen tuotteen, hapettimen tai sitomattoman peroksidaadin konsentraatio.

Seuraavat reagenssien konsentraatiot ovat erikoisen sopivia käytettäväksi esillä olevassa luminesenssireaktiossa:

peroksidaasi	0,1 μ g - 5000 mg/l
hapetin	10 μ mol - 300 mmol/l
6-hydroksibentsotiatsoli	0,01 mmol - 4 mmol/l
kemiluminesoiva DPD	0,5 μ mol - 200 mmol/l

Esillä olevaa luminesenssireaktiota suoritettaessa tietyt neljästä olennaisesta reagenssista (jättämällä ainakin yksi pois) pannaan koeputkeen. Luminesenssireaktio käynnistetään sitten lisäämällä koeputkeen puuttuva(t) reagenssi(t). Säteilevän valon määrä voidaan mitata standardimittauslaitteella, kuten fotomultiplikaattoriputkella, jonka signaali syötetään rekisteröintikojeeseen, oskilloskooppiin tai skalaariin ilmais- tavaksi tai rekisteröitäväksi. Valo voidaan joissakin tapauk- sissa myös todeta paljain silmin tai rekisteröidä valokuvaus- levyllä. Mieluimmin valon määrä kuitenkin mitataan luminomet- rillä, joka on GB-patenttihakemuksessa 2 025 609A kuvattua tyyppiä.

Keksinnön mukaista luminesenssireaktiota voidaan käyttää immuno- kokeen kolmessa päätyypissä, joiden tunnusomainen piirre on kulloinkin ligandiin kiinnitetyn merkkiaineen tyyppi. Merkki- aineet ovat

- 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin substituoitu aminojohdan- nainen, jossa aminoryhmä on kytketty ligandiin,
- peroksidaasi-entsyymi, ja
- muu aine kuin a- ja b-kohdissa esitetyt ja yleensä entsyymi, kuten glukosioksidaasi tai laktaattidehydrogenaasi, joka osal- listuu substraatin muuttamiseen aineeksi, joka voidaan määrit- tää esillä olevalla luminesenssireaktiolla (yleensä vety- peroksidi tai peroksidaasi).

Edellä esitetyissä immunokokeissa tutkittavan aineen tai sen vasta-aineen merkitseminen on mahdollista. Riippuen käytetyn merkkiaineen tyypistä koe voi olla joko heterogeeninen tai

homogeeninen. Ensin mainitussa tapauksessa voidaan analysoida moniainenesteitä kuten seerumia, mutta jälkimmäisessä tapauksessa saattaa kuitenkin alustava uutto- tai puhdistusvaihe olla tarpeellinen.

Seuraavassa esitetään tyypillisiä heterogeenisiä ja homogeenisiä luminesenssi- tai luminometrisiä immunokokeita:

1. Heterogeeninen luminesenssi- tai luminometrinen immunokoe

Tämän tyyppisessä immunokokeessa tutkittava aine saatetaan reagoimaan vasta-aineensa kanssa. Vapaa vasta-aine erotetaan sitten sidotusta vasta-aineesta. Reaktion kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan merkitsemällä joko vasta-aine, tutkittava aine tai muu molekyyli, joka kykenee reagoimaan vapaan tai sidotun aineen kanssa erottamisen jälkeen.

2. Kilpaileva heterogeeninen luminesenssi-immunokoe

Tässä tapauksessa sekoitetaan tutkittavan aineen tuntematon määrä saman merkkiaineeseen kytketyn aineen tunnetun määrän ja sen vasta-aineen tunnetun, mutta rajoitetun määrän kanssa. Tapahtuu merkityn ja merkitsemättömän aineen kilpaileva reaktio vasta-aineen kanssa. Vasta-aineen ja merkitsemättömän aineen kompleksi ja vasta-aineen ja merkityn aineen kompleksi erotetaan vapaasta merkitystä ja merkitsemättömästä aineesta.

Vasta-aineeseen sidotun merkityn aineen määrän suhde merkitsemättömän aineen määrään liuoksessa todetaan. Nämä määrät voidaan todeta joko mittaamalla vasta-aineeseen sidotun merkkiaineen määrä tai mittaamalla jäljelle jäävän merkityn aineen määrä. Esimerkkejä tämäntyyppisestä kokeesta, jossa peroksi-daasi on merkkiaineena ja vasta-aine on sidottu kiinteään faasiin lasisen koeputken seinien välityksellä, on esitetty GB-julkaisussa 2 044 927A.

3. "Kaksi-kohta" heterogeeninen luminesenssi-immunokoe

Tämäntyyppisessä immunokokeessa tutkittava aine sidotaan ensin merkitsemättömään vasta-aineeseensa, joka vuorostaan sidotaan

kiinteäfaasiseen kantajaan, kuten muoviin. Kompleksia (vasta-aineen ja aineen) käsitellään sitten merkityllä vasta-aineella.

Saadun kiinteään kompleksiin sisältyvän merkityn vasta-aineen analyysi voidaan sitten suorittaa erottamalla kiinteä kompleksi liuoksesta ja sen jälkeen määrittämällä joko erotettuun kiinteään kompleksiin sisältyvän merkkiaineen määrä tai liuokseen liuenneen jäljellä olevan merkityn vasta-aineen määrä.

Tämäntyyppisen immunokokeen vaihtoehtoisissa suoritustavoissa tutkittava aine voidaan joko sitoa peräkkäin merkittyyn vasta-aineeseen ja merkitsemättömään, kiinteään kantajaan sidottuun vasta-aineeseen tai sitoa sekä merkittyyn että merkitsemättömään vasta-aineeseen yhdessä sidontavaiheessa.

4. Homogeeninen luminesenssi- tai luminometrinen immunokoe

Tämä on sovellettavissa immunokokeisiin, joissa merkkiaine on 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin amino- tai substituoitu amino-johdannainen. Koe perustuu siihen, että kiinnostavan merkityn aineen (tai sen vasta-aineen) säteilemä valo eroaa voimakkuudeltaan tai aallonpituudeltaan kiinnostavan sidotun merkityn aineen (tai sen vasta-aineen) säteilemästä valosta.

Eräissä esimerkeissä todettiin, että (progesteroni-isoluminoli-johdannaisen) konjugaatin, hemokatalysaattorin ja vetyperoksidin reaktiosta säteilevän valon voimakkuus oli vähäisempi kuin samasta reaktiosta anti-progesteroni IgG:n läsnäollessa säteilevän valon.

Kokeessa inkuboitiin täten ensin tuntematon progesteroninäyte anti -progesteroni IgG:n tunnetun määrän kanssa. Kun tasapainotila oli saavutettu lisättiin tunnettu määrä (progesteroni-isoluminoli-deriv) konjugaattia ja sen jälkeen tunnettu määrä hemiä ja vetyperoksidia. Säteilevä valo mitattiin ja tällöin määritettiin tuntemattomaan näytteeseen sisältyvän progesteronin määrä standardikäyrästä. (Mitä enemmän progesteronia sisältyy tuntemattomaan näytteeseen, sitä vähemmän vapaata IgG:tä

jää tasapainotilassa ja sitä pienempi on luminesenssireaktion valon määrä.)

Tällä tavalla voidaan progesteronin määrittäminen saada aikaan tarvitsematta erotusvaihetta.

Kaikissa edellä esitetyissä immunokokeissa määrän toteamisvaiheena, havaitsemis- tai paikallistamisvaiheena voi olla keksinnön mukainen luminesenssireaktio.

Edellä esitetyissä immunokokeissa käytettyjä vasta-aineita voidaan ostaa tai valmistaa tunnetulla immunologiatekniikalla. Vasta-aineet voivat olla vasta-aineiden moniaineisina seoksina tai yhtenä tai useampana monokloonisena vasta-aineena. Tavallisesti tarvitaan vain pientä määrää vasta-ainetta ja sitä säilytetään sen aktiivisuuteen nähden sopivissa pH-, ioniväkevyys- ja lämpötilaolosuhteissa.

Seuraavien ei-tyhjentlysasti lueteltujen aineiden vasta-aineita voidaan edullisesti käyttää esillä olevaa luminesenssireaktiota hyväksi käyttävissä immunokokeissa: proteiinit, kuten insuliini, alfafetoproteiini ja ferritiini, hormonit, kuten kasvuhormoni, paratyroidihormoni, follikkelia stimuloiva hormoni, lutenisoiva hormoni, kilpirauhasta stimuloiva hormoni, adrenokortikotrooppihormoni, glukagoni, prolaktiini ja kalsitoniini, hapteenit/steroidit, kuten estrioli, progesteroni ja kortisoli, rohdokset, kuten digoksiini, antigeenit, kuten solun pinta-antigeenit ja kasvainalkionantigeeni ja vasta-aineet, kuten sikotautiviruksen vasta-aine, humaan-immunoglobuliini G (IgG) kani-IgG, lammas-IgG, marsu-IgG, aasi-IgG ja humaan-immunoglobuliinit E ja M.

Keksinnön mukaista luminesenssireaktiota voidaan myös käyttää muissa kokeissa kuin edellä esitetyissä immunokokeissa. Näihin kuuluu:

1. Elastaasikoe perustuen peroksidaasin vapautumiseen liu-
nemattomasta peroksidaasi-elastiinivalmisteesta

Tässä kokeessa kiinteä elastiini-peroksidaasikonjugaatti inkuboidaan eri määrillä elastaasi-entsyymiä. Ennalta määrätyn ajan kuluttua reagoimaton konjugaatti poistetaan linkoamalla ja supernatantti tutkitaan sitoutumattomaan peroksidaasiin nähden.

Supernatanttiin sisältyvä sitoutumattoman peroksidaasin määrä liittyy tutkitun näytteen elastaasiaktiivisuuteen.

2. Proteinaasikoe perustuen isoluminolin vapautumiseen synteet-
tisestä peptidisubstraattista

Tässä kokeessa käsitellään immobilisoitua synteettistä peptidisubstraattia, Affi-geeli 10-Ala-Ala-Ala-Phe-isoluminolia vaihtelevilla määrillä proteinaasia. Ennalta määrätyn ajan kuluttua poistetaan reagoimaton substraatti linkoamalla ja supernatantti tutkitaan isoluminoliin nähden. Supernatanttiin sisältyvä määrä isoluminolia liittyy tutkitun näytteen proteinaasiaktiivisuuteen.

3. Glukoosikoe perustuen koimmobilisoituun glukoosioksidaa-
siin ja peroksidaasiin

Tässä kokeessa glukoosioksidaasia ja peroksidaasia koimmonibilisoidaan kantajalle, esimerkiksi sefaroosille tai muoviputkille. Tähän lisätään luminolin ja 6-hydroksibentsotiatsolin liuos. Lopuksi lisätään glukoosin liuos ja valon säteily rekisteröidään. Valon säteily liittyy suoraan liuoksen sisältämän glukoosin määrään.

Esillä olevaa koetta ja luminesenssireaktiota käytetään ensisijaisesti kliinisisissä laboratorioissa ja lääkäriasemilla. On tavallista, että tällaiset laboratoriot ja/tai lääkäriasemat hankkivat tiettyyn kokeeseen käytettävät aineet koepakkauksena.

Esillä oleva keksintö koskee näin ollen myös määritysvälinesarjaa käytettäväksi keksinnön mukaisessa parannetussa luminesenssi- tai luminometrisessä määrityksessä, joka välinesarja käsittää:

- a. peroksidaasientsyymin
- b. 6-hydroksibentsotiatsolin, jolla on edellä esitetty yleinen kaava II, ja
- c. kemiluminesoivan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin.

Välinesarja voi myös sisältää hapettimen, mutta monessa tapauksessa tämä aine voidaan joko hankkia erikseen tai sen voi muodostaa tutkittava aine.

Peroksidaasi-entsyymi, hapetin, 6-hydroksibentsotiatsoli ja kemiluminesoiva DPD ovat mieluummin edellä kokeeseen käytettäväksi sopivimpina luetellut. Esillä olevan välinesarjan erikoisen edullisessa sovellutusmuodossa ainakin toinen peroksidaasi-entsyymistä ja kemiluminesoivasta DPD:sta on kytketty tutkittavan aineen vasta-aineeseen.

Välinesarja voi haluttaessa myös sisältää yhden tai useamman standardiliuoksen, joista jokainen sisältää tunnetun määrän tutkittavaa ainetta, ja/tai yhden tai useamman sopivimmin käytettävän puskuriliuoksen. Välinesarja voi edullisesti myös sisältää reaktioastian, joka sopii käytettäväksi koetta suoritettaessa säteilevän valon määrittämiseen käytetyn kojeen kanssa. Välinesarjaan voidaan myös sisällyttää sekoituslaite, jota voidaan käyttää varmistamaan, että reagenssit sekoittuvat tarkoituksen mukaisella tavalla.

Keksinnön mukainen koe, luminesenssireaktio ja välinesarja esitetään seuraavassa vain esimerkkimielessä viittaamalla piirustuksiin, joissa

kuva 1 esittää peroksidaasilla merkityn anti-AFP:n laimennuskäyrää,

kuva 2 esittää valon säteilyä kanin anti-humaani-AFP/HRP:sta, joka on immobilisoitu vasta-aineella päällystetyille helmille, tulikärpäs-lusiferiinin läsnäollessa tai poissaollessa,

kuva 3 esittää vertailua signaali/tausta-suhteen välillä AFP:n luminesenssi- ja kolorimetrisessä määrittäyksessä, ja

kuva 4 esittää vertailua valon säteilyn ja absorboinnin muutosten välillä suurenevalla T4-luminesenssi- ja kolorimetrisessä määrittäyksessä.

Aineet ja menetelmät

Reagenssit

Piparjuurioksidaasin $\bar{H}$ RP, puhtausluku (A403:n suhde A250:een, RZ) noin 1,07 toimitti Hughes and Hughes Ltd. Romford, Essex, UK, ja se puhdistettiin geelisuodatuksella käyttäen 2,6 x 40 cm Aca 34-kolonnia (LKB Instruments Ltd. South Croydon, Surrey, UK). Kolonni eluoitiin käyttäen 0,015 moolia/l fosfaattipuskuria, pH 7,2, joka sisälsi 0,15 mooli/l NaCl. Saadun puhdistetun peroksidaasin RZ oli noin 3,0.

Alfafetoproteiinin (AFP), kanin anti-humaani-AFP:n (koodi 100-008) ja kani- ja vasta-humaani-AFP/HRP-konjugaatin toimitti Dako Products, Mercia Brocades Ltd, Brocades House, Pyrford Road, West Buxton, Weybridge, Surrey.

Tyroksiinin (T4), kani-anti-T4:lla päällystetyt pullot ja T4/HRP-konjugaatin toimitti Boehringer Corporation, Lewes, Sussex, UK.

Rubella-viruksella (humaani) päällystetyt helmet ja anti-humaani-IgG (vuohi)/HRP-konjugaatin toimitti Abbott Laboratories Ltd, Diagnostic Division, Bright-Hill Parade, Basingstoke, Hampshire.

D-tulikärpäs-lusiferiinin (4,5-dihydro-2-(6-hydroksi-2-bentso-tiatsoli)-4-tiatsolikarboksyylihappo, tuote No. L5904, synteettinen, kiteinen), naudan seerumialbumiinin (BSA, tuote A4503) ja 2-amino-2-metyyli-1,3-propaanidiolin (AMP, tuote No. A9754) toimitti Sigma Chemical Co, Poole, Dorset, UK.

Luminolin (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) ja isoluminolin (6-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) toimitti Sigma Chemical Co, Fancy Road-Poole, Dorset, UK. Luminolin mono-

natriumsuola valmistettiin edellä esitetyllä tavalla (Ham et al., Anal.Lett. 1979, 12, 535).

7-dimetyyliaminonaftaleeni-1,2-dikarboksyylihappohydratsidin (kaava I, R_1 ja R_2 muodostavat yhdessä dimetyyliamino-substituoidun bentsoryhmän, $R_3 = R_4 = H$) toimitti Boehringer Mannheim.

N-(6-aminoheksyyli-N-etyyli)isoluminolin toimitti LKB, Suomi.

Tween-20 toimitti Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook, Bucks, UK.

2,2'-atsinodi-(3-etyylibentstiatsoliini-6-sulfonaatti) (ABTS) toimitti Boehringer Corporation, Lewes, Sussex, UK.

Elastiinin, elastaasin ja glukooksioksidaasin toimitti Sigma Chemical Co, Dorset. Syanogeenibromidin toimitti Aldrich Chemical Cl, Gillingham.

6-hydroksibentsotiatsoli saatiin lahjana Chemistry Dept:lta, University of Birmingham.

2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli ja dehydrolusiferiini valmistettiin Methods of Enzymology'ssa, Vol LVII "Bioluminescence and Chemiluminescence", M. DeLuca, Academic Press, Lontoo, 1978, s. 15-28 kuvatulla menetelmällä.

Oksilusiferiini valmistettiin Bitler et al:in, Arch.Biochem. Biophys., 1957, 72, 358, menetelmällä.

Kaikki muut reagenssit olivat mikäli mahdollista analyysipuhtaita ja ne toimitti BDH Ltd, Dorset, UK. Tuoreeltaan lasiin tislattu vesi puhdistettiin lisää syöttämällä 2,6x 40 cm Amberlite MB-1 sekaioninvaihtohartsikolonnin läpi (BDH Ltd, Poole, Dorset, UK).

Analyysikojeisto

Kemiluminesenssireaktiot suoritettiin 10 mm x 10 mm, tilavuus 4 ml, muovisissa kertakäyttökyveteissä (W. Sarstedt Ltd, Leicester, LE 3 1 UQ, UK). Säteilevän valon määrä todettiin aikaisemmin selostetulla luminometrillä (Carter et al, GB 2 025 609 A), joka oli modifioitu niin, että useita kyvettejä voitiin peräkkäin asettaa paikoilleen, tarkasti ja reproduoitavasti, fotomultiplikaattoriputken fotokatodin eteen. Tulokset rekisteröitiin nopeaan potentiometriseen korttirekisteröintikojeeseen (Tyyppi PM 8202, Philips, Eindhoven, Hollanti; täysiasteinen taittoaika alle 0,25 s).

Esimerkki 1 - Peroksidaasin luminesenssikoe

Alustavissa kokeissa 10 μ l tulikärpäs-lusiferiinia (0,01-1,0 g/l 0,1 mooli/l AMP-puskuria pH 8,9, sisältäen 1 mmooli/l $MgCl_2$), 10 μ l luminolia (0,0003-30 g/l vedessä), 10 μ l H_2O_2 (3-300 mmoolia/l vedessä) ja 10 μ l HRP (0,05-5000 mg/l 0,015 mooli/l fosfaattipuskurissa, pH 7,2, sisältäen 0,14 mooli/l NaCl, 2 g/l BSA ja 0,5 g/l Tween 20) sijoitettiin kukin 10 mm x 10 mm muovikyvetin eri nurkkiin antamatta niiden sekoittua. Luminesenssireaktio käynnistettiin sitten injektoimalla 1 ml puskuria (0,1 mooli/l glysiini-NaOH, pH 8,6-12,5; 0,1 mooli/l glysyglysiini-NaOH, pH 7,5-9,0; Tris-HCl, pH 7,2-8,5; tai 0,1 mooli/l AMP, pH 7,5-9,5) ja valopiikki mitattiin.

Kun tässä edellä esitettyä analyysimenetelmää käyttävässä kokeessa käytettyjen reagenssien konsentraatiot oli optimoitu, käytettiin yksinkertaistettua koemenetelmää alhaisten HRP-konsentraatioiden mittaamiseen. Natriumluminolia (50 mg) ja vetyperoksidia (62 μ l, 30 % p/t) lisättiin 200 ml:aan Tris-puskuria (0,01 mooli/l, pH 8,0), joka sisälsi kaliumkloridia (0,15 mooli/l). Liuos valmistettiin useita tunteja ennen käyttöä ja sitä käytettiin luminesenssireaktion käynnistämiseen. 10 μ l tulikärpäs-lusiferiinia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,01 mooli/l, pH 8,0) sijoitettiin kyvetin yhteen nurkkaan ja 10 μ l anti-AFP/HRP-konjugaattia sijoitettiin toiseen nurkkaan.

Reaktio käynnistettiin injektoimalla luminoli/ H_2O_2 -reagenssia (0,9 ml). Valon säteily 30 sekunnin kuluttua tai valopiikki mitattiin.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että 6-hydroksibentsotiatsoli DMSO:ssa korvasi tuli-kärpäs-lusiferiinin.

Esimerkki 3

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että 2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli DMSO:ssa korvasi tulikärpäs-lusiferiinin.

Esimerkki 4

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että N-(6-aminoheksyyli)-N-etyyli-isoluminoli korvasi luminolin.

Esimerkki 5

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että isoluminoli korvasi luminolin.

Esimerkki 6

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että luminoli korvattiin 7-dimetyyliamino-naftaleeni-1,2-dikarboksylihappohydratsidilla (9-dimetyyliamino-2,3-dihydro-bentso[f]ftalatsiini-1,4-dioni) ja ftalatsiinidioni/ H_2O_2 laimennettiin 1:10 ennen käyttöä.

Esimerkki 7

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu menettely toistettiin paitsi että vetyperoksidi korvattiin natriumperboraatilla.

Esimerkki 8 - anti-AFP/HRP-konjugaattikoe

Natriumluminolia (50 mg) ja vetyperoksidia (62 μl , 30 % p/t) lisättiin 200 ml:aan Tris-puskuria (0,01 mooli/l, pH 8,0), joka

sisälsi kaliumkloridia (0,15 mooli/l). Liuos valmistettiin useita tunteja ennen käyttöä ja sitä käytettiin luminesenssi-reaktion käynnistämiseen. 10 μ l tulikärpäs-lusiferiinia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,01 mooli/l, pH 8,0) sijoitettiin kyvetin yhteen nurkkaan ja 10 μ l anti-AFP/HRP-konjugaattia sijoitettiin toiseen nurkkaan. Reaktio käynnistettiin injektioimalla luminoli/H₂O₂-reagenssia (0,9 ml). Valon säteily 30 sekunnin kuluttua tai valopiikki mitattiin.

Kuvassa 1 esitetään peroksidaasilla merkityn anti-AFP:n laimennuskäyrä. Tämän reaktion signaali/taustasuhteet on esitetty taulukossa 1.

Esimerkki 9 (Vertailu)

Noudatettiin esimerkin 8 mukaista menettelyä paitsi ettei käytetty tulikärpäs-lusiferiinia. Tämän reaktion signaali/taustasuhteet on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Luminolin, vetyperoksidin, anti-AFP/HRP-reaktion pH-arvossa 8,0 signaali/taustasuhteen mittaaminen tulikärpäs-lusiferiinin läsnäollessa ja poissaollessa

		Luminoli/ H ₂ O ₂	Luminoli/H ₂ O ₂ / tulikärpäs ² / lusiferiini
Valon säteilyn piikki	Näyte	135	1420
	Vertailu	15	170
	Signaali/taustasuhte	9	8,4
Valon säteily 30 s kuluttua	Näyte	35	540
	Vertailu	15	20
	Signaali/taustasuhte	2,3	27

Huomautus 1: Valon säteily mitataan ulostulona (mV) fotomultiplikaattorin jännitteellä 1200 V. Käytetty näyte oli anti-AFP/HRP-konjugaatin 1:10 000 laimennus.

Huomautus 2: Valon säteilyn mittaaminen 30 sekunnin kuluttua mahdollisesti signaali/taustasuhteen suurenemisen kertoimella 3 verrattuna tulikärpäs-lusiferiinin poissaollessa saatuun valopiikin signaali/tausta-suhteeseen.

Esimerkki 10 - AFP-koe

a. (1) Laajakaulaiseen 500 ml lasipulloon lisättiin 125 ml glysiini/NaOH-puskuria (0,1 mooli/l, pH 8,8) ja 0,25 g BSA. Liuosta sekoitettiin sitten 2 tuntia pyörivässä sekoittimessa 20°C:ssa. Tämän ajan jälkeen pullo (ja sen kansi) huuhdeltiin glysiinipuskurilla (3 x 50 ml) sitoutumattoman albumiinin poistamiseksi ja annettiin sitten valua tyhjäksi.

(2) 1000 polystyreenihelmeä pestiin Lipsol'illa (tavaramerkki, 1 %, 500 ml) 30 minuuttia. Pesun jälkeen tislattulla vedellä helmet sijoitettiin Büchner-pulloon yhdessä 200 ml:n kanssa glysiinipuskuria ja vapautettiin kaasusta.

(3) Glysiinipuskuria (400 ml) siirrettiin esipääällystettyyn lasipulloon ja lisättiin kanin anti-humaani-AFP (1,5 ml). Liuosta sekoitettiin hyvin ja sitten lisättiin kaasusta vapautetut helmet. Sekoitettiin pyörivässä sekoittimessa 6 tuntia 20°C:ssa.

(4) 6 tunnin kuluttua glysiinipuskuri-vasta-aineliuos dekantoi-
tiin ja helmet pestiin kahdesti 400 ml:lla PBS (0,015 mooli/l fosfaattia, 0,15 mooli/l NaCl, pH 7,2). Toisen PBS-pesunesteen dekantoinnin jälkeen lisättiin BSA-liuos (0,5 %) PBS:ssa (400 ml). Sekoitettiin uudelleen pyörivässä sekoittimessa 20°C:ssa. 30 minuutin kuluttua PBS-albumiiniliuos poistettiin ja lisättiin asetaattipuskuria (0,1 mooli/l, pH 4,2, 400 ml), joka sisälsi Tween 20 (tavaramerkki, 0,01 %). Sekoitettiin 10 minuuttia ja sitten asetaattipuskuri korvattiin PBS-puskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween'iä (2 x 400 ml). Lopuksi PBS dekantoi-
tiin ja helmet kuivatettiin suodatinpaperilla 20°C:ssa 30 minuuttia. Helmet säilytettiin kierrekorkkipulloissa 4°C:ssa.

b. (1) Riittävä määrä vasta-aineella päällystettyjä helmiä (vaihe a. edellä) PBS:ssa vapautettiin kaasusta 15-30 minuuttia.

(2) 50 μ l AFP sisältävää standardia tai näytettä lisättiin kyvetiin yhdessä 0,95 ml:n kanssa PBS/BSA/Tween (fosfaatti 0,015 mooli/l, NaCl 0,15 mooli/l, BSA 0,2 %, Tween 20 0,05 %, pH 7,2). Liuos lämmitettiin 37°C:een ja inkuboitiin sitten helmillä tunnin ajan.

(3) Liuos dekantoiitiin sitten ja helmet pestiin PBS/Tween'illa (200 ml 15 s, sitten 200 ml 5 min).

(4) Helmet inkuboitiin sitten 0,9 ml:lla kanin anti-humaani-AFP/HRP-konjugaattia-laimennus 1:1000, tunnin ajan. (Konjugaatti oli laimennettu PBS/BSA/Tween'illa ja ennen lisäämistä helmiin lämmitetty 37°C:een).

c. (1) Liuos dekantoiitiin uudelleen ja helmet pestiin deionisoidulla, tislatusella vedellä 2 min. Veden dekantoinnin jälkeen helmet siirrettiin varovasti kyvetteihin (yksi kyvetiä kohti).

(2) Jokaisen kyvetin yhteen nurkkaan sijoitettiin myös 10 μ l tulikärpäs-lusiferiinia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,01 mooli/l, pH 8,0).

Luminesenssireaktio käynnistettiin injektoimalla 0,9 ml luminoli/ H_2O_2 -liuosta /natriumluminoli (50 mg), H_2O_2 , (62 μ l, 30 % p/t), Tris (0,01 mooli/l, pH 8,0, 200 ml), kaliumkloridi (0,15 mooli/l)7. Valon säteily 30 s kuluttua mitattiin ja se on esitetty kuvassa 2. Signaali/taustasuhteen vertailu suurenevalla AFP-konsentraatiolla on esitetty kuvassa 3.

Esimerkki 11 (Vertailu)

Esimerkin 10 mukainen menettely toistettiin paitsi ettei käytetty tulikärpäs-lusiferiinia luminesenssireaktiossa. Valon säteily 30 s kuluttua mitattiin ja se on esitetty kuvassa 2.

Esimerkki 12 (Vertailu)

Esimerkin 10 mukainen menettely toistettiin paitsi että peroksidaasilla merkitty anti-AFP määritettiin seuraavalla kolorimetrisellä menetelmällä.

ABTS (0,55 g) liuotettiin asetaattipuskuriin (500 ml, 0,1 mooli/l, pH 4,2), joka sisälsi 0,01 % Tween 20. Vetyperoksidia (2,83 ml, 30 % p/t) laimennettiin 100 ml:aan tislattulla vedellä. Nämä liuokset varastoitiin 4°C:ssa. Välittömästi ennen käyttöä 1 ml H_2O_2 -liuosta sekoitettiin ABTS-liuoksen kanssa ja 0,9 ml saatua seosta inkuboitiin kunkin helmen kanssa /esimerkin 10 vaiheesta c (1) 37°C:ssa 30 min hämmentäen. Tämän inkubointijakson jälkeen absorbointi 405 nm:ssa mitattiin näyte-entsyymisubstraattiliuosta vastaan. Signaali/taustasuhteen vertailu suurenevalla AFP-konsentraatiolla on esitetty kuvassa 3.

Esimerkki 13

Esimerkin 10 mukainen koe toistettiin paitsi että tulikärpäs-lusiferiini korvattiin 6-hydroksibentsotiatsolilla DMSO:ssa.

Esimerkki 14

Esimerkin 10 mukainen koe toistettiin paitsi että tulikärpäs-lusiferiini korvattiin 2-syano-6-hydroksibentsotiatsolilla DMSO:ssa.

Esimerkki 15 - T4-koe

T4 määritettiin käyttäen kilpailevaa entsyymikytkettyä immunoabsorbointikoetta. Merkitsemättömän T4:n (näyte tai standardi) ja T4/HRP-konjugaatin seos inkuboitiin rajoitetulla määrällä anti-T4 päällystettynä koeputkille.

Kun oli saavutettu tasapainotila, koeputket pestiin sitoutumattomien komponenttien poistamiseksi ja sitten lisättiin 10 μ l tulikärpäs-lusiferiinia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,01 mooli/l, pH 8,0) jokaiseen koeputkeen. Luminesenssireaktio käynnistettiin injektoimalla 0,9 ml luminoli/ H_2O_2 -liuosta /natriumluminoli (50 mg), H_2O_2 (62 μ l, 30 % p/t), Tris (0,01 mooli/l, pH 8,0,

200 ml), kaliumkloridi (0,15 mooli/l)⁷. Valon säteily 30 s kuluttua mitattiin. Valon säteilyn muuttuminen suurenevalla T4-konsentraatiolla on esitetty kuvassa 4.

Esimerkki 16 (Vertailu)

T4 määritettiin käyttäen kilpailevaa entsyymikytkettyä immunoabsorbointikoetta. T4:n (näyte tai standardi) ja T4/HRP-konjugatin seos inkuboitiin rajoitetulla määrällä kanin anti-T4 päällystettynä koeputkille.

Kun tasapainotila oli saavutettu ja ylimäärin olevat reagenssit poistettu, lisättiin 1,0 ml fosfaatti/sitraattipuskuria (pH 5,0), joka sisälsi 9,1 mmooli/l ABTS ja 1,47 mmooli/l natriumperboraattia, ja sitä käytettiin kussakin koeputkessa olevan vasta-aine-T4-HRP-kompleksin määrän määrittämiseksi inkuboimalla 60 min 25°C:ssa. Absorboinnin 420 nm:ssa muutoksen vertailu suurenevalla T4-konsentraatiolla on esitetty kuvassa 4.

Esimerkki 17 - Anti-rubella IgG-koe

Anti-rubella IgG sisältävä koenäyte inkuboitiin rubella-viruksella (humaani) päällystetyillä helmillä Tris-puskurissa. Pesun jälkeen reagoimattomien komponenttien poistamiseksi helmet inkuboitiin anti-humaani IgG (vuohi)/HRP-konjugaatilla, tämäkin Tris-puskurissa.

Liuos dekantoiitiin ja helmet pestiin deionisoidulla tislatusella vedellä. Pestyjen helmien poistamisen jälkeen vedestä ne siirrettiin kyvetteihin (yksi kyvetteä kohti).

Jokaisen kyvetin nurkkaan sijoitettiin myös 10 µl tulikärpäs-lusiferiinia (1 mg/ml) fosfaattipuskurissa (0,1 mooli/l, pH 8,0). Luminesenssireaktio käynnistettiin injektoimalla 0,9 ml luminoli/H₂O₂-liuosta [natriumluminoli (50 mg), H₂O₂ (62 µl, 30 % p/t), Tris (0,01 mooli/l, pH 8,0, 200 ml), kaliumkloridi (0,15 mooli/l)⁷. Valon säteily 30 s kuluttua mitattiin ja se on esitetty taulukossa 2. Signaali/taustasuhteen vertailu suurenevilla vasta-rubella IgG-konsentraatioilla on esitetty taulukossa 3.

Esimerkki 18 (Vertailu)

Anti -rubella IgG sisältävä koenäyte inkuboitiin rubella-viruksella (humaani) päällystetyillä helmillä Tris-puskurilla. Pesun jälkeen reagoimattomien komponenttien poistamiseksi helmet inkuboitiin anti-humaani-IgG (vuohi)/HRP-konjugaatilla, tämäkin Tris-puskurissa.

Liuos dekantoitiin ja helmet pestiin deionisoidulla tislatusella vedellä. Pestyjen helmien poistamisen jälkeen vedestä ne siirrettiin kyvetteihin (yksi kyvetteä kohti).

Kuhunkin helmeen sidotun merkityn vasta-aineen määrä määritettiin lisäämällä kyvettein o-fenyleenidiamiini/H₂O₂ sitraattifosfaatti-puskurissa. Puolen tunnin kuluttua reaktio pysäytettiin lisäämällä kloorivetyhappoa ja absorbointi 492 nm:ssa mitattiin. Tulokset on esitetty taulukossa 2. Signaali/taustasuhteen vertailu suurenevalla anti-rubella-IgG-konsentraatiolla on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 2

Anti -rubella-IgG-näyte	Luminesenssi 30 s kuluttua säteilevä valo (mV, 1200 FM)	Kolorimetria Absorbointi 492 nm:ssa 30 min kuluttua
Negatiivinen vertailu	8	0,06
Alhainen positiivinen vertailu (HAI-tiitteri noin 10)	92	0,46
Korkea positiivinen vertailu (HAI-tiitteri noin 80)	455	1,51

Taulukko 3

Anti-rubella-IgG-näyte	Signaali/taustasuhte	
	Luminesenssi	Kolorimetria
Negatiivinen vertailu	1	1
Alhainen positiivinen vertailu (HAI tiitteri noin 10)	11,2	8,5
Korkea positiivinen vertailu (HAI tiitteri noin 80)	55	28

Esimerkki 19 - Elastaasikoe

Piparjuuri-peroksidaasia konjugoitiin jauhetun elastiinin kanssa G.C. Saunders et al:n menetelmällä, Analytical Biochemistry, 1982, 126, 122. 1 ml elastiini-peroksidaasi-suspensiota pestiin ja tasapainotettiin 2 ml:ssa 0,01 mooli/l Tris-puskuria (pH 9), joka sisälsi CaCl_2 (2 mmooli/l), puoli tuntia 37°C :ssa. Konjugaattiin lisättiin elastaasia (0-100 ng/ml) Tris- CaCl_2 -puskurissa ja inkuboitiin 37°C :ssa elastiini-HRP:lla.

60 minuutin kuluttua reagoimaton HRP-konjugaatti poistettiin linkoamalla ja supernatantin alikvootti siirrettiin ja lingotettiin uudelleen. 20 μl supernatanttia poistettiin ja sijoitettiin kyvetiin ja valon säteily käynnistettiin lisäämällä 0,9 ml luminoli/ H_2O_2 /6-hydroksibentsotiatsoliliuosta /natriumluminoli (50 mg), H_2O_2 (62 μl , 30 % p/t), 6-hydroksibentsotiatsoli (2 ml, 1 mg/ml DMSO:ssa) 200 ml:ssa Tris-puskuria (0,1 mooli/l, pH 8,0)7. Valon säteily 30 s kuluttua mitattiin.

Esimerkki 20

Esimerkin 19 mukainen koe toistettiin paitsi että 2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli korvasi 6-hydroksibentsotiatsolin.

Esimerkki 21

Esimerkin 19 mukainen koe toistettiin paitsi että tulikärpäs-lusiferiini korvasi 6-hydroksibentsotiatsolin.

Esimerkki 22 - Glukoosikoe perustuen immobilisoituun glukoosi-oksidaasiin ja peroksidaasiin

Glukoosioksidaasia (5 mg, Sigma) ja piparjuuri-peroksidaasia (5 mg, Sigma) koimmobilisoitiin syanogeenibromidilla aktivoidulle Sepharose'lle (Pharmacia, UK) Fordin ja DeLucan menetelmällä, Anal.Biochem., 1981, 110, 43. Immobilisoidut entsyymit suspendoitiin fosfaattipuskuriin (0,1 mooli/l, pH 7,0). Immobilisoitujen entsyymien suspensio (100 g/l, 50 µl) lisättiin kyvetissä olevaan 1 ml:aan luminolin vesiliuosta (25 mg/100 ml) ja 50 µl:aan 6-hydroksibentsotiatsolia (1 mg/ml DMSO:ssa). Sitten lisättiin glukoosia sisältävän vesiliuoksen 10 µl:n näyte, kyvetin sisältö sekoitettiin ja valon säteily rekisteröitiin. Valon säteilyn piikki oli lineaarinen välillä 50-500 nmoo-lia glukoosia. Vaihtoehtoisesti glukoosioksidaasi ja peroksidaasi voidaan immobilisoida muovikantajan pinnalle (esim. Leon et al, Clin.Chem., 1977, 23, 1556).

Esimerkki 23

Esimerkin 22 mukainen koe toistettiin paitsi että 2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli korvasi 6-hydroksibentsotiatsolin.

Esimerkki 25

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu koe toistettiin paitsi että tulikärpäs-lusiferiini korvattiin oksilusiferiinillä.

Esimerkki 26

Esimerkin 1 mukainen yksinkertaistettu koe toistettiin paitsi että tulikärpäs-lusiferiini korvattiin dehydrolusiferiinillä.

Koetuloksia

Vasta-AFP/HRP:ta (10 μ m, laimennus 1:1000 0,1 M Tris-puskurissa, pH 8,0) ja 6-hydroksibentsotiatsolijohdannaista (10 μ l 0,5 mg/ml liuosta DMSO:ssa) sijoitettiin kyvetin eri nurkkiin. Luminolia (50 μ l, 1,2 mM) ja vetyperoksidia (50 μ l, 40 mM) Tris-puskurissa (0,1 M, pH 8,0) sijoitettiin sitten kyvetin vapaisiin nurkkiin ja luminesenssireaktio käynnistettiin manuaalisesti lisäämällä Tris-puskuria (900 μ l, 0,1 M, pH 8,0). Valon säteily ajan suhteen rekisteröitiin 30 ja 60 sekunnin kuluttua.

Suoritettiin myöskin kotrollikoe, jossa 6-hydroksibentsotiatsolijohdannainen korvattiin DMSO:lla (10 μ l). Tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4

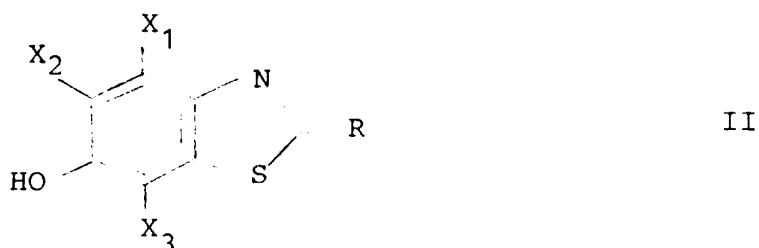
6-hydroksibentsotiatsolijohdannaisten vaikutus luminoli/vetyperoksidi/peroksidaasi-järjestelmän valon säteilyyn

<u>Vahvistava aine</u>	<u>Valon suhteellinen säteily (mV)</u>	
	<u>30 s</u>	<u>60 s</u>
Kontrolli (DMSO korvaa vahvistavan aineen)	16	11
6-hydroksibentsotiatsoli	5950	7340
2-syano-6-hydroksibentsotiatsoli	600	750
6-hydroksi-2-bentsotiatsolyyli-tiatsoleeni-4-karboksyylihappo (dehydrolusiferiini)	7240	6990
Tulikärpäs-lusiferiini	2840	2460

70728

Patenttivaatimukset

1. Parannettu aineen luminesenssi- tai luminometrinen määrittäminen saattamalla peroksidaasi-entsyymi, hapetin ja kemiluminoiva 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni reagoimaan luminesenssireaktiossa aineen määrän toteamiseksi, havaitsemiseksi tai paikallistamiseksi, t u n n e t t u siitä että luminesenssireaktion herkkyyttä parannetaan 6-hydroksibentsotiatsolin läsnäololla, jolla on yleinen kaava II



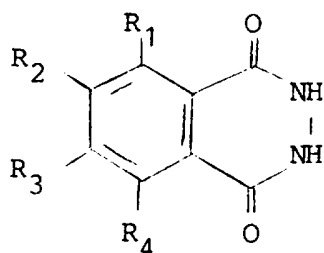
jossa X_1 , X_2 ja X_3 ovat jokainen H ja R on H, CN tai tiatsolysubstituentti, jolla on yleinen kaava III



jossa X_4 on COOH ja X_5 , X_6 ja X_7 ovat jokainen H, tai X_4 ja X_5 ovat yhdessä O ja X_6 ja X_7 ovat kumpikin H tai X_4 on COOH, X_5 ja X_6 edustavat kaksoissidosta ja X_7 on H.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen määrittäminen, t u n n e t t u siitä, että kemiluminoivalla 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionilla on yleinen kaava I

70728



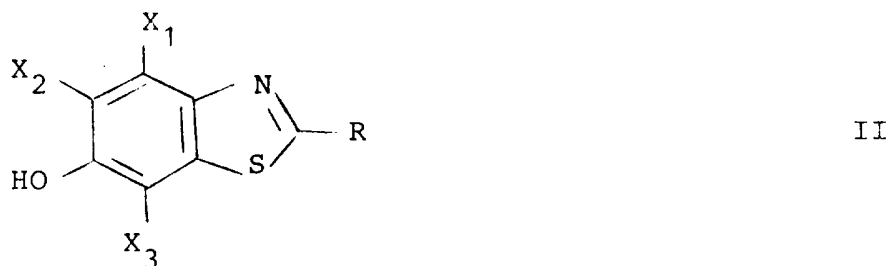
I

jossa R₁ on amino ja R₂, R₃ ja R₄ ovat jokainen H tai R₂ on amino tai metyyllillä, etyyllillä tai 6-aminoheksyyllillä substituoitu amino ja R₁, R₃ ja R₄ ovat jokainen H tai R₁ ja R₂ ovat yhdessä dimetyyliaminolla substituoitu bentsoryhmä ja R₃ ja R₄ ovat kumpikin H.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että peroksidaasi-entsyymi kasvi-peroksidaasi.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että peroksidaasi-entsyymi on piparjuuri-peroksidaasi.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että hapetin on perboraatti-ioni tai vetypeperoksidi.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että peroksidaasi-entsyymi on kytketty ligandiin.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että ligandi on vasta-aine.
8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen määrittely, tunnettu siitä, että ligandi on joko proteiini tai hormoni.
9. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen määrittely, tunnettu siitä, että se on immunoanalyysi.

10. Määrittäsvälinesarja käytettäväksi patenttivaatimuksen 1 mukaisessa luminesenssi- tai luminometrisessä määrittäksessä, tunnettu siitä, että se käsittää

- (a) peroksidaasi-entsyymin,
 (b) 6-hydroksibentsotiatsolin, jolla on yleinen kaava II

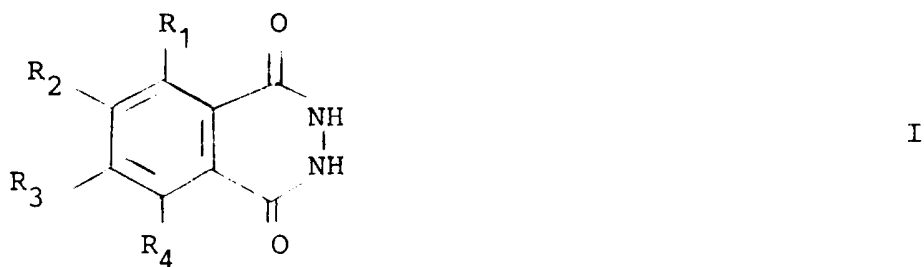


jossa X_1 , X_2 ja X_3 ovat jokainen H ja R on H, CN tai tiatsoli-substituentti, jolla on yleinen kaava III



jossa X_4 on COOH ja X_5 , X_6 ja X_7 ovat jokainen H, tai X_4 ja X_5 ovat yhdessä O ja X_6 ja X_7 ovat kumpikin H tai X_4 on COOH, X_5 ja X_6 edustavat kaksoissidosta ja X_7 on H, ja
 (c) kemiluminoivan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen määrittäsvälinesarja, tunnettu siitä, että kemiluminoivalla 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionilla on yleinen kaava I



jossa R_1 on amino, ja R_2 , R_3 ja R_4 ovat jokainen H tai R_2 on amino tai metyyllillä, etyyllillä tai 6-aminoheksyyllillä substituoitu amino ja R_1 , R_3 ja R_4 ovat jokainen H tai R_1 ja R_2 ovat yhdessä dimetyyliaminolla substituoitu bentsoryhmä ja R_3 ja R_4 ovat kumpikin H.

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasi-entsyymi on kasvi-peroksidaasi.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasientsyymi on piparjuuri-peroksidaasi.

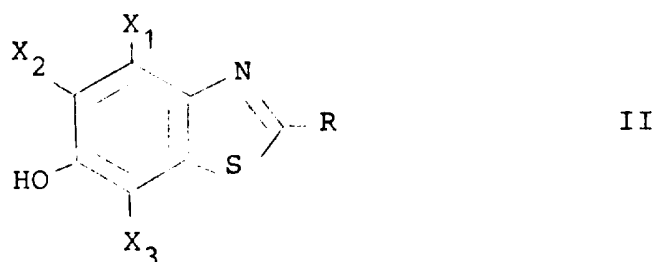
14. Jonkin patenttivaatimuksen 10-13 mukainen määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää hapettimen.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että hapetin on perboraatti-ioni tai vetyperoksidi.

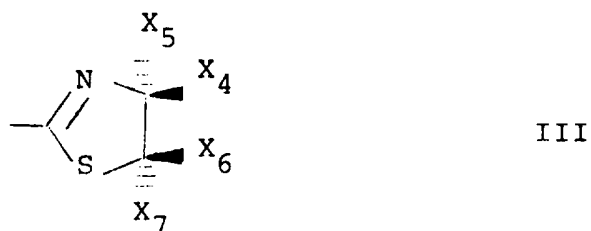
16. Jonkin patenttivaatimuksen 10-15 mukainen määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasientsyymi on kytetty määritettävän aineen vasta-aineeseen.

Patentkrav

1. Förbättrad luminescent eller luminometrisk bestämning av en substans, genom att bringa ett peroxidasenzym, ett oxidationsmedel och en kemiluminescent 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion att reagera i en luminescent reaktion för att kvantifiera, detektera eller lokalisera substansen, k ä n n e t e c k n a d av att den luminescenta reaktionens sensibilitet förbättras genom närvaron av en 6-hydroxibensotiazol med den allmänna formeln II

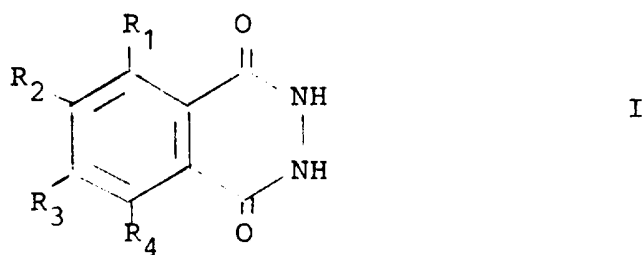


i vilken X_1 , X_2 och X_3 är envar H och en tiazolsubstituent med den allmänna formeln III



i vilken X_4 är COOH och X_5 , X_6 och X_7 är envar H eller X_4 och H_5 tagna tillsammans är 0 och X_6 och X_7 är vardera H eller X_4 är COOH, X_5 och X_6 representerar en dubbelbindning och X_7 är H.

2. Bestämning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att den kemiluminescenta 2,3-dihydro-1,4-ftalazindionen har den allmänna formeln I



i vilken R_1 är amino och R_2 , R_3 och R_4 är envar H eller R_2 är amino eller amino substituerad med metyl, etyl eller 6-aminohexyl och R_1 , R_3 och R_4 är envar H, eller R_1 och R_2 tagna tillsammans är en dimetylaminosubstituerad bensogrupp, och R_3 och R_4 är vardera H.

3. Bestämning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e -
t e c k n a d av att peroxidasenzymet är ett växtperoxidas.

4. Bestämning enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a d
av att peroxidasenzymet är pepparrots-peroxidas.

5. Bestämning enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e -
t e c k n a d av att oxidationsmedlet är en perboratjon eller
väteperoxid.

6. Bestämning enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e -
t e c k n a d av att peroxidasenzymet är kopplat till en ligand.

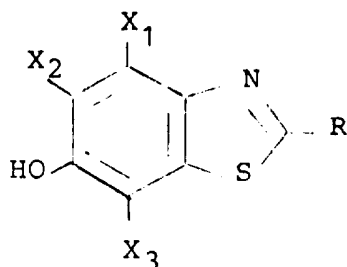
7. Bestämning enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a d
av att liganden är en antikropp.

8. Bestämning enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a d
av att liganden är antingen ett protein eller ett hormon.

9. Bestämning enligt något av de föregående patentkraven,
k ä n n e t e c k n a d av att den är en immunoanalys.

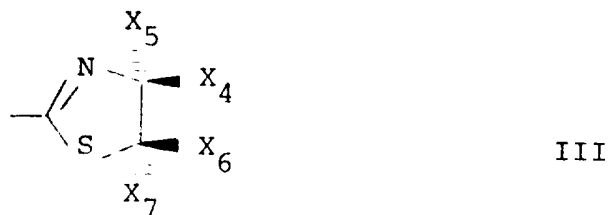
10. Provningsats till användning vid en luminescent eller
luminometrisk bestämning enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a d av att den innehåller

- (a) ett peroxidasenzym,
 - (b) en 6-hydroxibensotiazol
- med den allmänna formeln II



II

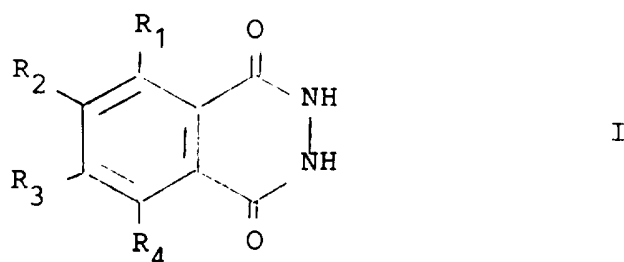
i vilken X_1 , X_2 och X_3 är envar H och R är H, CN eller en tiazolsubstituent med den allmänna formeln III



i vilken X_4 är COOH och X_5 , X_6 och X_7 är envar H, eller X_4 och X_5 tagna tillsammans är O och X_6 och X_7 är vardera H eller X_4 är COOH, X_5 och X_6 representerar en dubbelbindning och X_7 är H, och

(c) en kemiluminescent 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion.

11. Provningssats enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k - n a d av att den kemiluminescenta 2,3-dihydro-1,4-ftalazindionen har den allmänna formeln I



i vilken R_1 är amino och R_2 , R_3 och R_4 är envar H, eller R_2 är amino eller amino substituerad med metyl, etyl eller 6-aminohexyl- och R_1 , R_3 och R_4 är envar H, eller R_1 och R_2 tagna tillsammans är en dimetylamino substituerad bensogrupp och R_3 och R_4 är vardera H.

12. Provningssats enligt patentkravet 10 eller 11, k ä n n e - t e c k n a d av att peroxidasenzymet är ett växtperoxidas.

13. Provningssats enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a d av att peroxidasenzymet är pepparrots-peroxidas.

14. Provningssats enligt något av patentkraven 10-13, k ä n n e - t e c k n a d av att den dessutom innehåller ett oxidationsmedel.

15. Provningssats enligt patentkravet 14, k ä n n e t e c k -
n a d av att oxidationsmedlet är en perboratjon och väteperoxid.

16. Provningssats enligt något av patentkraven 10-15, k ä n -
n e t e c k n a d av att peroxidasenzymet är kopplat till en
antikropp till den substans som skall bestämmas.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Iso-Britannia-Storbritannien(GB)
2 008 247 (G 01 N 21/24), 2 026 690 (G 01 N 33/58), 2 070 768 (G 01 N 31/22).
Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Chemical Abstracts, vol. 93 (1980),
64280u, Int. Symp. Anal. Appl. Biolumin. Chemilumin. 1978, p. 239-57. Clinical
Chemistry, vol 25, nro 9, syyskuu 1979, T.P. Whitehead et al., "Analytical
Luminescence: Its Potential in the Clinical Laboratory", p. 1531-1546.

Keskimääräinen valonsäteily 30 s kuluttua (mV, AT 1200 V)

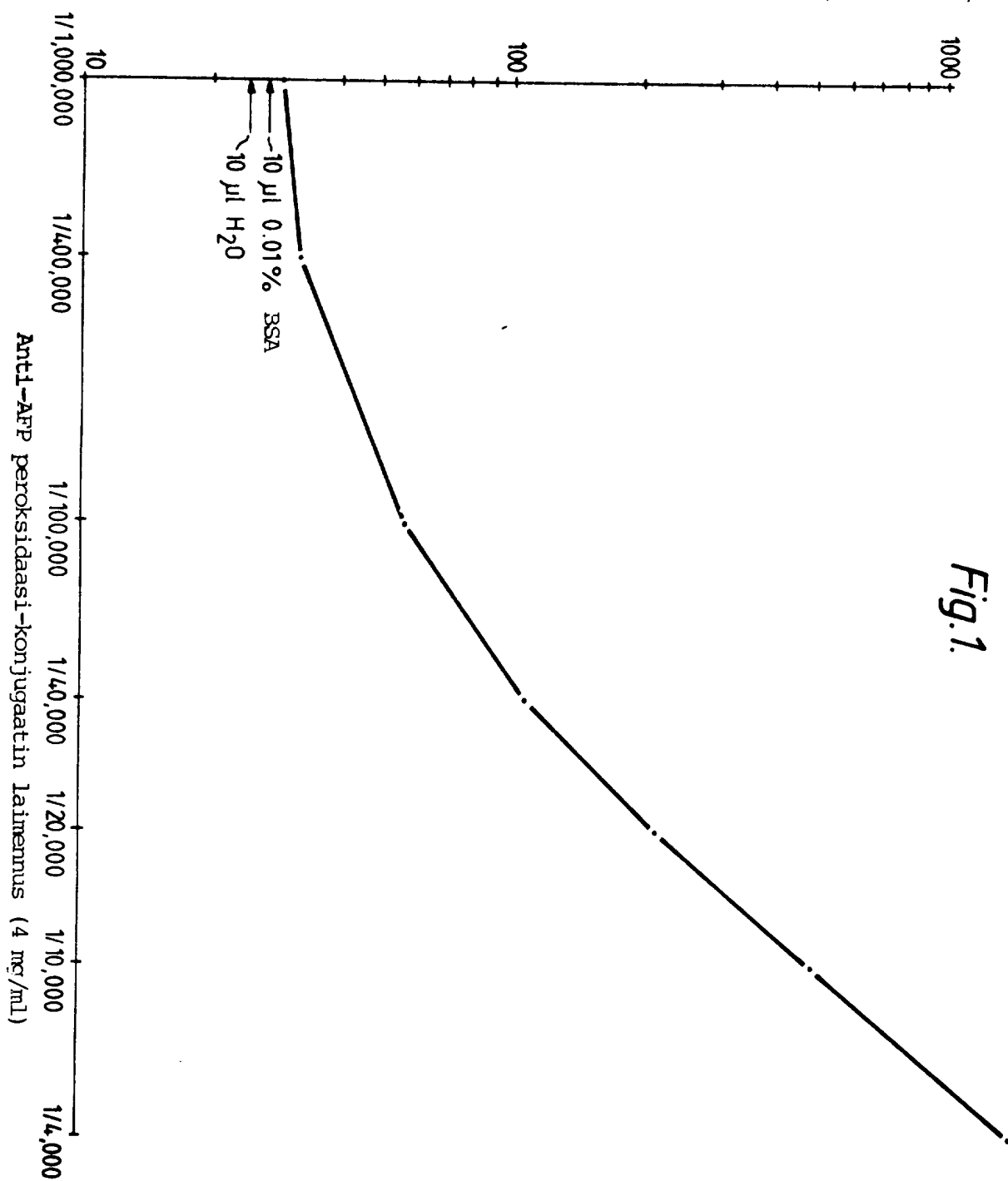


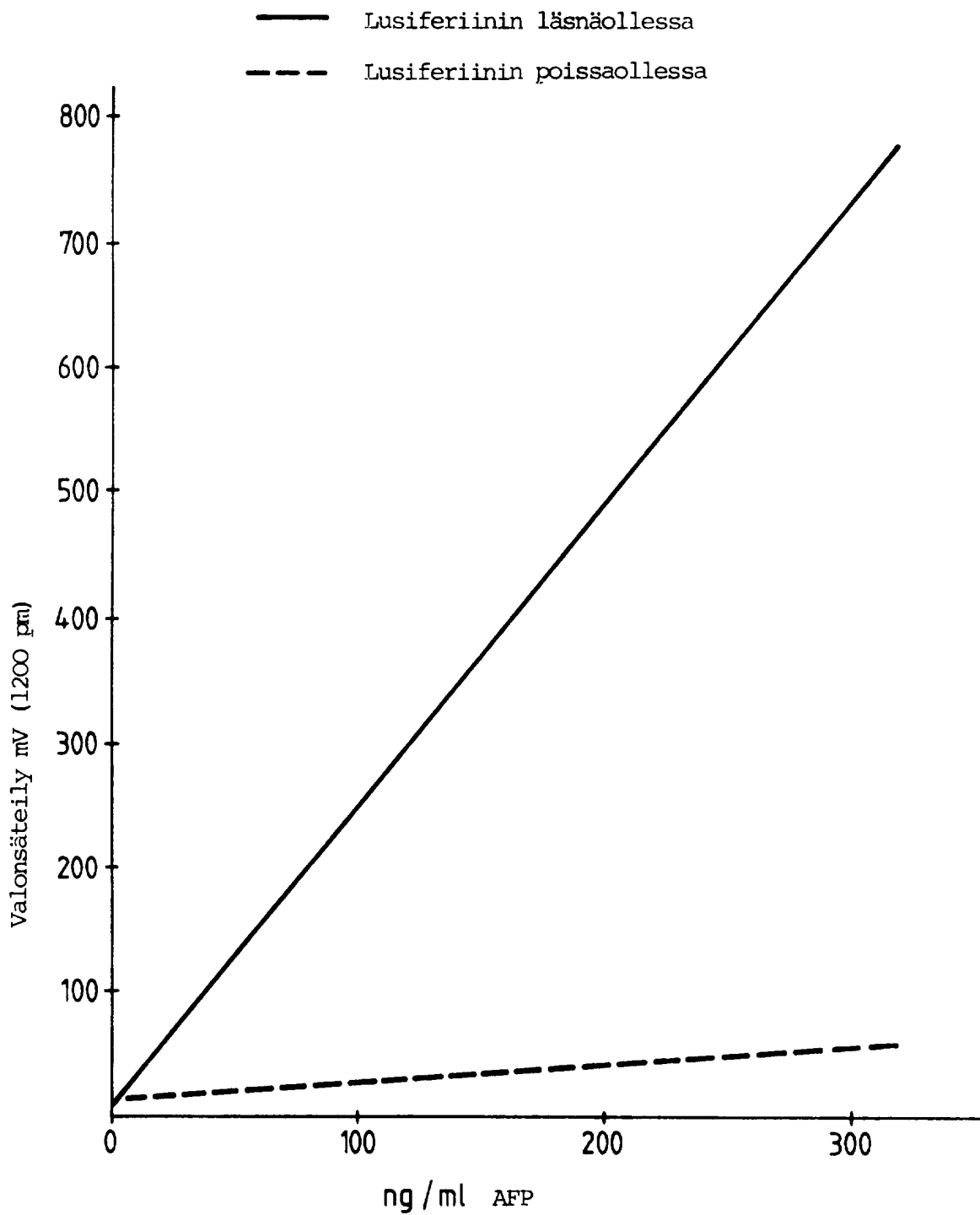
Fig.2.

Fig.3.

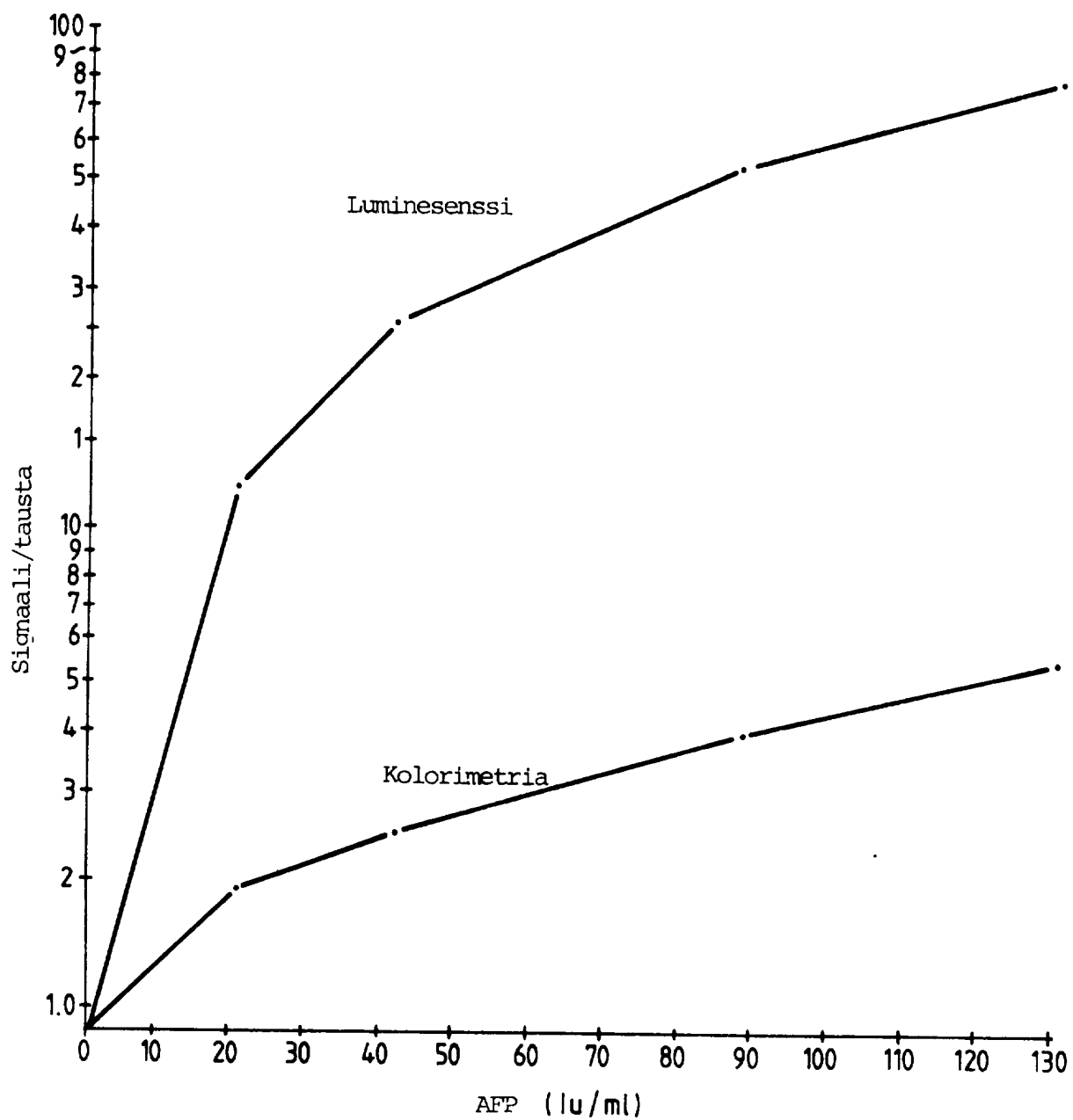


Fig.4.

