(19) DANMARK

(11) **DK 173025 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(51) Int.Cl[6].: **C 07 K 14/00**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1993 00162**

(22) Indleveringsdag: **1993-02-12**

(24) Løbedag: **1987-04-30**

(41) Alm. tilgængelig: **1993-02-12**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-11-15**

(30) Prioritet: **1986-04-30 US 858354**

(73) Patenthaver: **Igen, Inc., 1530 East Jefferson Street, Rockville, MD 20852, USA**

(72) Opfinder: **Richard J. Massey, 5 Valerian Court, Rockville, MD 20852, USA**
Michael J. Powell, 5 War Admiral Court, Gaithersburg, MD 20878, USA
Paul A. Mied, 3713 Buffalo Road, New Windsor, MD 21776, USA
Peter Feng, 245 Rollins Avenue, Apt. 203, Rockville, MD 20852, USA
Leopoldo Della Ciana, 5511 Halpine Place, Rockville, MD 20851, USA
Walter J. Dressick, 12905 Crookston Lane, Rockville, MD 20851, USA
Mohindar S. Poonian, 224 High Timber Court, Gaithersburg, MD 20879, USA

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Ruthenium og osmium-komplekser til brug ved kvalitativ og kvantitativ elektrokemiluminiscerende analysering af multikomponentvæsker samt biologiske forbindelser indeholdende disse**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

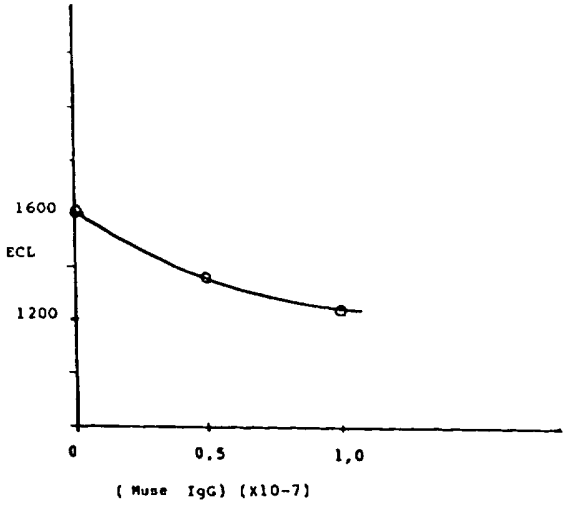
Hidtil ukendte organometalliske ruthenium- og osmium-komplekser kan anvendes som specifikke elektrokemiluminescerende kemiske grupper til mærkning af analytter af interesse i forbindelse med kvalitativ og kvantitativ analysering af multikomponentsvæsker.

Særligt interessante analytter er theophyllin-komplekser, der ligesom andre biologiske forbindelser kan mærkes med de omhandlede komplekser.

Analysemetoderne, ved hvilke komplekserne benyttes, finder især anvendelse indenfor fodervareindustrien og levnedsmiddelkontrol.

fortsættes

FIG. 1



Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte ruthenium- og osmium-komplekser til brug ved kvalitativ og kvantitativ elektrokemiluminescerende analysering af multikomponentvæsker samt biologiske forbindelser indeholdende disse komplekser.

Der et et stadigt stigende behov for hurtige og meget specifikke metoder til påvisning og kvantitativ bestemmelse af kemiske, biokemiske og biologiske substanser. Af særlig stor værdi er metoder til måling af små mængder af farmaceutiske midler, metaboliter, mikroorgamismer og andre materialer af diagnostisk værdi. Som eksempler på sådanne materialer kan anføres narkotika og giftstoffer, lægemidler indgivet med terapeutiske formål for øje, hormoner, patogene mikroorganismer og vira, antistoffer, metaboliter, enzymer og nucleinsyrer.

Tilstedeværelsen af disse materialer kan ofte bestemmes ved bindingsmetoder, hvor man udnytter den høje grad af specificitet, som kendetegner mange biokemiske og biologiske systemer. De hyppigt anvendte metoder er eksempelvis baseret på antigen-antistof-systemer, nucleinsyre-hybridiseringsteknikker og protein-ligand-systemer. Ved disse metoder påvises eksistensen af et kompleks af diagnostisk værdi typisk ved enten tilstedeværelse eller fravær af en observerbar "mærkning", som er knyttet til ét eller flere af de kompleksdannende materialer.

Den specifikke mærkningsmetode, som man vælger, vil ofte diktere anvendeligheden og alsidigheden af et bestemt system til påvisning af et materiale af interesse. En foretrukken mærkning bør være billig, sikker og i stand til at knytte sig effektivt til en lang række forskellige kemiske, biokemiske og biologiske materialer uden at ændre de vigtige bindingskarakteristika, som findes hos disse materialer. Mærkningen bør give et meget karakteri-

stisk signal, og der bør være tale om en mærkning, som sjældent (og fortrinsvis aldrig) findes i naturen. Mærkningen bør være stabil og detekterbar i vandige systemer i tidsperioder, der strækker sig over måneder. Detekteringen af mærkningen bør være hurtig, sensitiv og reproducerbar, uden at der stilles krav om kostbare specialiserede faciliteter eller særligt personale. Den kvantitative bestemmelse af mærkningen skal være relativt uafhængig af sådanne variable som temperaturen og sammensætningen af den blanding, der skal analyseres. De mest fordelagtige mærkninger er sådanne, som kan anvendes i homogene systemer, d.v.s. systemer, hvori det ikke er nødvendigt at foretage en separation af det kompleksbundne og det ikke kompleksbundne mærkede materiale. Dette er muligt, hvis mærkningens detekterbarhed moduleres, når det mærkede materiale indkorporeres i et specifikt kompleks.

Man har udviklet en lang række forskellige mærkninger, som hver især indebærer bestemte fordele og ulemper. For eksempel er radioaktive mærkninger meget alsidige, og de kan påvises i meget lave koncentrationer. Imidlertid er de både kostbare og farlige at anvende, og deres anvendelse kræver avanceret udstyr og specialtrænet personale. Desuden begrænses sensitiviteten af radioaktive mærkninger af det faktum, at den detekterbare hændelse i sin grundlæggende natur kun kan forekomme én gang for hvert af de radioaktive atomer i det mærkede materiale. Hertil kommer, at radioaktive mærkninger ikke kan anvendes i homogene metoder.

Der er således en udstrakt interesse for ikke-radioaktive mærkninger. Sådanne ikke-radioaktive mærkninger omfatter molekyler, som kan opserveres spektrofotometrisk og ved spinresonans- og luminescens- teknikker, såvel som enzymer, der producerer sådanne molekyler. Blandt de nyttige

ikke-radioaktive mærkningsmaterialer kan nævnet organometalliske forbindelser. På grund af den sjældenhed, hvor med visse metaller optræder i biologiske systemer, kan metoder, som specifikt analyserer metalkomponenten i de organometalliske forbindelser, udnyttes med gode resultater. For eksempel beskriver US patentskrift nr. 4 204 952 (1980) anvendelsen af immunokemisk aktive materialer, som er mærket med bestemte organometalliske forbindelser, til brug ved kvantitativ bestemmelse af specifikke antigener. Man kan anvende en hvilken som helst generel metode til påvisning af de udvalgte metaller sammen med disse mærkninger, herunder emission, absorptions- og fluoresensspectroscopy, atomabsorption og neutronaktivering. Disse metoder lider imidlertid ofte under en mangel på sensivitet, og de kan sjældent tilpasses til et homogent system, ligesom de undertiden medfører en destruktion af prøven, hvilket således er tilfældet med atomabsorption.

Af særlig interesse er mærkninger, som kan gøres selvlysende bed hjælp af fotokemike, kemiske og elektrokemiske midler. "Fotoluminescens" er betegnelsen for en proces, hvorved et materiale bliver selvlysende, når det absorberer elektromagnetisk stråling. Fluoresens og phosphoresens er typer af fotoluminescens. "Kemiluminescens-processer" indebærer, at den selvlysende specie dannes ved en kemisk energioverføring. "Elektrokemiluminescens" indebærer, at den lysenende specie dannes ad elektrokemisk vej.

Disse luminescens-systemer er af stadig større betydning. For eksempel beskriver US patentskrift nr. 4 372 745 (1983) en udnyttelse af kemiluminescens-mærkninger i forbindelse med immunokemiske anvendelser. I de beskrevne systemer anslås mærkningerne til en luminescerende tilstand ved hjælp af kemiske midler, eksempelvis ved at lade mærkningen reagere med H_2O_2 og et oxalat. I disse

systemer vil H_2O_2 oxidativt omdanne oxalatet til et højenergi-derivat, som derefter anslår mærkningen. Dette system vil i princippet virke sammen med et hvilket som helst luminiserende materiale, som er stabilt under analysens oxiderende betingelser, og som kan anslås af det højenergetiske oxalat-derivat. Uheldigvis giver selve denne alsidighed anledning til en væsentlig begrænsning af teknikken. Typiske biologiske væsker, som indeholder analysanden af interesse, indeholder nemlig også et stort antal potentielt luminescerende substanser, som kan bevirke høje baggrundsniveauer af luminescens.

Et andet eksempel på den immunokemiske anvendelse af kemilumenescens, som lider under de samme ulemper, er beskrevet i US patentskrift nr. 4 280 815 (1981), som beskriver den elektrokemiske dannelse in situ af et oxidationsmiddel (eksempelvis H_2O_2) i umiddelbar nærhed af en immunoreaktant mærket med en kemiluminescerende specie. Det elektrogenererede oxidationsmiddel diffunderer hen til den kemiluminescerende specie, som derved oxideres kemisk, hvilket resulterer i en nettooverføring af en eller flere elektroner til det elektrogenererede oxidationsmiddel. Efter oxidationen udsender den kemiluminescerende specie en foton. I modsætning hertil kræver den omhandlede opfindelse en direkte overføring af elektroner fra en kilde for elektrokemisk energi til en kemiluminescerende specie, som er i stand til gentagne gange at udsende fotoner.

Egnede mærkninger omfatter elektrokemiluminescerende forbindelser, herunder organiske forbindelser og organometalliske forbindelser. Elektrokemiluminescerende metoder til bestemmelse af tilstedeværelsen af mærkede materialer foretrækkes frem for andre metoder af mange årsager. Således er de særdeles diagnostiske med hensyn til tilstedeværelsen af en bestemt mærkning, og de er

sensitive, ufarlige og billige, ligesom de kan anvendes til en række forskellige formål. Organiske forbindelser, som er egnede elektrokemiske mærkninger, omfatter eksempelvis rubren og 9,10-diphenylantracen. Mange organometalliske forbindelser er velegnede elektrokemiske mærkninger, men Ru-holdige og Os-holdige forbindelser er af særlig interesse. Opfindelsen angår således en anvendelse af Ru-holdige og Os-holdige mærkninger, som kan påvises ved en række forskellige metoder. Disse mærkninger er fordelagtige af mange årsager, som vil blive uddybet nærmere i det følgende.

Ru-holdige og Os-holdige organometalliske forbindelser er omtalt i litteraturen. Således fremgår det af US patentskrift nr. 4 205 952, at et hvilket som helst metallisk grundstof eller en hvilken som helst kombination af sådanne metalliske grundstoffer, herunder ædelmetaller fra gruppe VIII så som Ru, vil egne sig som komponent eller komponenter i organometalliske mærkninger, som kan påvises ved atomabsorptionsmetoder (se patentskriftets spalte 11, linie 20). I det nævnte US patentskrift er ruthenium imidlertid ikke et foretrukket metal, og osmium er ikke specifikt nævnt. Der er heller ikke angivet nogen data med hensyn til effektiviteten ved anvendelse af Ru eller Os i nogen af de omtalte metoder, og den ifølge skriftet foretrukne detekteringsmetode, nemlig atomabsorption, medfører en destruktion af prøven.

I US patentskrift nr. 4 293 310 (1981) beskrives anvendelsen af Ru-holdige og Os-holdige komplekser som elektrokemiske mærkninger for analysander i immunoanalyser. De omtalte komplekser er bundet til aminogrupper på analysanderne via en thiourinstof-binding. Skriftet foreslår også muligheden af at danne carboxylatestere imellem mærkningerne og hydroxygrupperne på andre analysander.

Ifølge US patentskrift nr. 4 293 310 kan tilstedeværelsen af de mærkede materialer bestemmes ved en metode og et apparatur, som omfatter en udslukningsanordning og en elektrokemisk flowcelle med lysmåling. Den fotoelektrokemisk aktive mærkning vil efter fotoexitation overføre en elektron til et udslukningsmolekyle. Det oxiderede molekyle bliver derefter reduceret med en elektron fra en af flowcellens elektroder, som holdes på et passende potential. Denne elektron måles som en fotostrøm. Mængden af fri mærket analysand i systemet bestemmes ud fra fotostrømmens signal. Det bemærkes, at denne metode er det omvendte af elektrokemiluminescerende bestemmelse af selvlysende materialer.

I efterfølgende rapporter har opfinderne, Weber et al. diskuteret de problemer, der er forbundet med at anvende denne metode til at påvise Ru-holdige mærkninger (1). I tabel 2 hos Weber et al. (1) er den extrapolerede detekteringsgrænse for tris(bipyridyl)ruthenium(II) af størrelsesordenen 1,1 x 10^{-10} mol/l under optimale betingelser. Idet man forudså, at den praktiske udnyttelse af disse mærkninger ville medføre målinger i nærværelse af kompleksblandinger, foretog Weber et al. en test for potentielle forstyrrelser i deres system. Tabel 3 hos Weber et al. anfører dimethylalkylaminer, EDTA, N-methylmorpholin, N,N'-dimethylpiperazin, hydroxid, oxalat, ascorbat, urinsyre og serum som forstyrrende substanser, som sandsynligvil vil hæve den praktiske detekteringsgrænse væsentligt over værdien 1,1 x 10^{-10} mol/l. Disse undersøgelser blev foretaget med en simpel Ru-holdig forbindelse. Der blev ikke rapporteret nogen undersøgelser vedrørende detekteringsgrænserne for komplexe substanser mærket med Ru-holdige mærkninger, og det blev heller ikke angivet, hvorvidt thiourinstof-bindingen imellem det mærkede materiale og mærkningen af stabil under de betingelser, hvorunder analysen gennemføres.

De bestemte mærkninger, som er elektrokemiluminescerende. De kan ofte anslås til en selvlysende tilstand uden at blive oxideret eller reduceret, hvilket kan gøres ved at exponere forbindelserne for elektromagnetisk stråling eller for en kemisk energikilde, såsom den, der frembringes af typiske oxalat-H_2O_2-systemer. Desuden kan disse forbindelsers luminescens induceres ved elektrokemiske metoder, som dog indebærer en oxidation og reduktion af forbindelserne.

Der er rappoteret et omfattende arbejde med hensyn til metoder til påvisning af Ru(2,2'-bipyridin)$_3^{2+}$ ved anvendelse af fotoluminescerende, kemiluminiserende og elektrokemiluminescerende midler (2,3). Dette arbejde viser, at en klar orange kemiluminescens kan baseres på den vandige reaktion imellem kemisk frembragt eller elektrogenereret Ru(bpy)$_3^{3+}$ (hvor "bpy" representerer en pibpyridyl-ligand) og stærke reduktionsmidler, som er opstået som mellemprodukter under oxidationen af oxalationer eller andre organiske syrer. Luminisensen kan også opnås i opløsninger i organiske opløsningsmidler og H_2O ved reaktion imellem elektrogenereret eller kemisk genereret Ru(bpy)$_3^{1+}$ og stærke oxidationsmidler, som er opstået under reduktionen af peroxydisulfat. En tredie mekanisme til produktion af elektrokemiluminescens ud fra Ru(bpy)$_3^{2+}$ involverer oscillation af et elektrodepotential imellem et potential, der er tilstrækkeligt negativt til at producere Ru)bpy)$_3^{1+}$, og et potential, der er tilstrækkeligt positive til at producere Ru(bpy)$_3^{3+}$. Disse tre metoder benævnes hhv. "oxidativ reduktion", "reduktiv oxidation" og "det Ru(bpy)$_3^{3+/+}$ regenerative system".

Den oxidative reduktionsmetode kan gennemføres i vand, og den frembringer en intens, effektiv og stabil luminescens, som er relativt ufølsom overfor tilstedeværende

oxygen eller urenheder. Denne luminescens fra $Ru(bpy)_3^{2+}$ afhænger af tilstedeværelsen af oxalat eller salte af andre organiske syrer, så som pyruvat, lactat, malonat, tartrat og citrat, samt af de anvendte midler til oxidativ frembringelse af $Ru(bpy)_3^{3+}$-specier. Denne oxidation kan gennemføres kemisk ved hjælp af stærke oxidationsmidler, såsom PbO_2 eller et Ce(IV)-salt. Processen kan gennemføres elektrokemisk ved hjælp af et tilstrækkeligt positivt potential, som enten påtrykkes kontinuerligt eller periodevist. Som egnede elektroder til den elektrokemiske oxidation af $Ru(bpy)_{32}^{+}$ kan eksempelvis nævnes platin, pyrolytisk grafit og glasagtigt carbon. Selv om oxalatet eller et tilsvarende salt af en anden organisk syre forbruges under kemiluminescensen, kan man opnå en kraftig konstant kemiluminescens, som varer i mange timer, ved at sikre tilstedeværelse af et overskud af det forbrugte materiale eller ved kontinuerligt at supplere det forbrugte materiale i reaktionskammeret.

Den reduktive oxidationsmetode kan foretages i delvist vandige opløsninger, som indeholder et supplerende organisk opløsningsmiddel, f.eks. acetonitril. Denne luminescens afhænger af tilstedeværelsen af peroxydisulfat og af et middel, som reduktivt kan producere $Ru(bpy)_3^{1+}$-specier. Reduktionen kan gennemføres kemisk ved hjælp af stærke reduktionsmidler, så som magnesium eller andre metaller. Den kan også foretages elektrokemisk ved enten kontinuerligt eller periodevist at påtrykke et tilstrækkeligt negativt potential. En egnet elektrode til den elektrokemiske reduktion af $Ru(bpy)_3^{2+}$ er eksempelvis en poleret elektrode af glasagtigt carbon. Ligesom ved den oxidative reduktionsmetode kan man opnå en kontinuerig ingens luminescens, som varer i mange timer, ved at indføre et overskud af reagenser eller ved kontinuerligt at erstatte de forbrugte reagenser i reaktionsblandingen.

Det $Ru(bpy)_3^{3+/+}$ regenerative system kan udøves i organiske opløsningsmidler, såsom acetonitril, eller i delvist vandige systemer ved hjælp af et pulserende elektrodepotential, som svinger imellem et potential, der er tilstrækkeligt negativt til at reducere $Ru(bpy)_3^{2+}$, og et potential, der er tilstrækkeligt positivt til at oxidere $Ru(bpy)_3^{2+}$. En egnet elektrode til et sådant regenerativt system er eksempelvis en platinelektrode. Dette system forbruger ikke kemiske reagenser, og det kan i princippet forløbe i ubegrænsende tidsperioder.

Disse tre metoder til at frembringe luminescerende Ru-holdige forbindelser har den gentagne oxidation/reduktion eller rektion/oxidation af den Ru-holdige forbindelse til fælles. Luminescensen af opløsninger, der indeholder disse forbindelser, afhænger derfor i høj grad af det elektriske potential af den påtrykte energikilde, og luminescensen er derfor særdeles diagnostiserende med hensyn til tilstedeværelsen af den Ru-holdige forbindelse.

I US patentskrift nr. 4 372 745 citeres Curtis et al. (4) som en mulig mærkning til anvendelse i forbindelse med kemiluminescens. Curtis et al. rapporterer kun ikke-publiserede observationer gående ud på, at Ru-komplekser kan induceres til at udesende lys, når de anslås kemisk af et oxalat/H_2O_2-system (Curtis et al., side 350).

Hverken i US patentskrift nr. 4 372 745 eller hos Curtis har man erkendt den exceptionelle anvendelighed af ruthenium- og osmium-komplekser til anvendelse i forbindelse med kemiluminescens, og man har heller ikke erkendt nytten af elektrokemiluminescerende systemer. Sprintschnik, G. et al. (5) har beskrevet komplexer af tris-(2,2'-bipyridin)ruthenium(II) esterificeret med octadecanol eller dehydrocholesterol, og de har tilvejebragt film bestående af monolag af disse overfladeaktive komplekser. Komplek-

serne viste sig at være fotoluminescerende. Men når filmene blev udsat for indvirkning af vand og derefter eksponeret for lys, udviste Ru-komplekserne ikke fotoluminescens. Dette fænomen blev tilskrevet en fotohydrolyse af estergrupperne i nærværelse af lys.

Det har vist sig, at en lang række analysander af interesse og kemiske grupper, som binder sig til analysander af interesse, bekvemt kan knyttes til Ru-holdige eller Os-holdige mærkninger via amid- eller aminbindinger. De mærkede materialer kan derefter bestemmes ved hjælp af en lang række forskellige midler, men de mest effektive, pålidelige og sensitive midler er fotoluminescerende, kemiluminescerende og elektrokemiluminescerende midler. Det fremgår af opfindelsen, at elektrokemiluminescerende mærkninger, herunder Ru-holdige og Os-holdige mærkninger og organiske molekyler, såsom rubren og 9,10-diphenylanthracen, i særlig høj grad er alsidige og fordelagtige. De store fordele ved at anvende disse hidtil ukendte mærkede materialer, og de store fordele, der er knyttet til påvisningen af materialerne, er beskrevet i nærmere detaljer i det følgende.

I mange år har fødevare industrien været opmærksom på tilstedeværelsen af biologiske og kemiske kontaminanter, såvel i råvarer som i forarbejdede levnedsmidler. Der har været gjort mange teknologiske fremskridt i retning af at reducere forekomsten af fødevarekontaminering og udbrud af sygdomme hidrørende fra kontaminerede fødevare, med der har hidtil kun været berskrevet beskedne fremskridt med henyn til udvikling af hurtige og sensitive metoder til påvisning og identifikation af fødevarekontaminanter. De eksisterende standardmetoder til påvisning af skadelige kontaminanter i fødevarer er generelt meget tidsforbrugende, arbejdskrævende og teknisk vanskelige. De analytiske metoder i sig selv er for størstedelens vedkom-

mende tilstrækkeligt sensitive, men de langvarige prøvefremstillingsprocedurer, som går forud for udøvelsen af selve detekteringsmetoden, resulterer ofte i et lavt udbytte af den pågældende kontaminant, således at man hyppigt møder falske negative måleresultater.

To eksempler, som tjener til at illustrere disse problemer, er de for øjeblikket anerkendte standardmetoder til påvisning af tilstedeværelsen af Salmonella- og stafylokok-enterotoxiner i fødevarer. Påvisningen af salmonella i fødevarer involverer flere berigelsestrin som følge af den kendsgerning, at disse bakterier, når de er tilstede i fødevarer, sædvanligvis findes i lave antal, ligesom de ofte er blevet subletalt skeadet. Påvisningsmetoderne med hensyn til salmonelle må derfor være sensitive og muliggøre genoplivning og vækst af de skadede celler.

Der findes to metoder til påvisning af salmonella, som for øjeblikket anbefales af the U.S. Food and Drug Administration. Disse metoder er beskrevet i The Bacteriological Analytical Manual for Foods (1984), 6. udgave, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. Den ene af disse metoder er en ren dyrkningsteknik, som involverer en forudgående berigelse, en selektiv berigelse og en selektiv udsåning, hvilken procedure kræver 4 dage, for at man kan opnå foreløbige resultater, og 5-7 dage, for at man kan opnå endelige resultater. Den anden metode involverer immunofluoresens efter selektiv berigelse. Denne metode er den hurtigste, men den kan resultere i en høj forekomst af falske positive resultater som følge af problemer i retning af, at de polyvalente antisera, som anvendes i denne test, kan være tværreaktive (6, 7).

Den procedure, som anbefales af The U.S. food and Drug Administration til påvisning af stafylokok-enterotoxiner i fødevarer, er også angivet i the Bacteriological Analytical Manual for Foods (1984), 6. udgave, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. Denne metode involverer en koncentrering af en ekstrakt af en stor fødevareprøve, eksempelvis omkring 100 g, til et lille volumen, eksempelvis omkring 0,2 ml, hvilket gøres ved hjælp af flere dialysekoncentrationstrin og en rensning af prøveekstrakten i en ionbytterkolonne med henblik på at fremstille en prøve til den såkadte dobbelte immunodiffusionstekmik med mikropræparatglas. Denne procedure kræver generelt mere end en uge at gennemføre.

Man har for nyligt udviklet testmetoder, som er hurtigere at gennemføre, til påvisning af en række kontaminanter, såsom bakterier toxiner, antibiotika og pesticidrester i føderester. I mange tilfælde viser det sig imidlertid, at prøvefremstillingen forud for gennemførelse af selve analysen er så langvarig, at den er både arbejdskrævende og tidsrøvende. Radioimmunoanalyser (RIA) og enzym-bundne immunosorbent-analyser (ELISA) har bevirket en forkortelse af håndteringstiden med hensyn til selve den analytiske metode, men disse metoder er stadig arbejdskrævende og langt fra simple at udøve. Endvidere er disse metoder sædvanligvis baseret på anvendelse af polyklonale antisera, som kan variere med hensyn til specificitet og sensitivitet, og som generelt kun er begrænset tilgængelige til brug ved analysering ved en given fødevarekontaminant. Man har udviklet ELISA-metoder til analysering af fødevareprøver, hvilke metoder gør brug af monoklonale antistoffer i stedet for polyklonale antisera. Anvendelsen af monoklonale antistoffer i et analysesystem til analysering for en given fødevarekontaminant sikrer en konstant tilførsel af et reagens, som bibringer selve testen uforandret specificitet og sensitivitet. Man har

anvendt monoklonale antistoffer i ELISA-systemer med henblik på at teste for fødevarekontaminanter, såsom enterotoxiner fra salmonella (8) og stafylokokkus (9). Kommercielt tilgængelige produkter til salmonella-påvisning, som anvender EIA-metodik (Bio-Enzabead Screen Kit, Litton Bionetics) og DNA-probe-teknologi (Gene-Trak, Integrated Genetics), er tidsrøvende og arbejdskrævende. Kommercielt tilgængelige testsystemer til påvisning af stafylokok-enterotoxiner i fødevarer, der gør brug af revers passiv latex-agglutination (SET-RPLA, Denka Seiken Co.) og EIA-metodik (SET-EIA, Dr. W. Bommeli Laboratories) lider under de samme begrænsninger.

I de sidste 100 år har bakterien escherichia coli og coliform-gruppen været hyppigt anvendt som indikatorer til overvågning af vandkvalitet og forekomst af spildevandskontaminering.

De for øjeblikket anvendte detekteringsmetoder til påvisning af E. coli og/eller bakterier hørende til coliformgruppen er baseret på egenskaberne med hensyn til syre- eller gasproduktion under fermenteringen af lactose. De mest udbredte metoder er en analyse baseret på det mest sandsynlige antal ("the Most Probable Number (MPN) assay") og den såkaldte menbranfiltreringstest (MF). Begge teknikker er godkendt af the Environmental Protection Agency (EPA) og the American Public Health Association (APHA) til mikrobiologisk undersøgelse af vand og spildevand (10), ligesom de er godkendt af the Food and Drug Administration (FDA) til bakteriologisk undersøgelse af mælk og fødevarer (11).

MPN-metoden består i praksis af tre (12) separate analyser (10). I den foreløbige test benyttes et ikke-selektivt medium, såsom laurylsulfat-tryptose (LST) væske eller lactosevæske til at overvåge gasproduktionen, der

hidrører fra fermenteringen af lactose. Gas-positive rør underdyrkes derefter i et mere selektivt medium, nærmere bestemt "Brillant Green Lactose Bile" (BGLB) væske for coliform-arter og E. coli (EC) væske for fækale coliform-arter, og der kontrolleres pány for gasproduktion (bekræftet test). Prøver fra positive bekræftende testninger skal testes yderligere ved udsåning på et selektivt differentielt medium, såsom Eosin-methylenblåt (EMB) agar eller Endos agar, efterfulgt af Gram-farvning og visse biokemiske testninger med henblik på korrekt at fastslå tilstedeværelsen af indikator-bakterierne (afsluttet test). Den samlede MPN-analyse kan kræve op til 5 dage til fuldstændig gennemførelse (5). Til rutinemæssige vandanalyser anvender de fleste laboratorier derfor kun den foreløbige og den bekræftede del af MPN-analysen, som i øvrigt stadig kræver mellem 48 og 72 timer at gennemføre til ende. Ud over at være tidsrøvende og økonomisk belastende med hensyn til materialer, har MPN-analyserne ofte udvist såvel forkerte positive som forkerte negative reaktioner (15, 16, 20).

MF-teknikken til bakteriologisk undersøgelse af vand blev introduceret i de tidlige 1950'ere (12). Til forskel fra MPN-analysen, som var langsommelig og tidsrøvende, kunne MF-analysen fuldendes i løbet af 234 timer, uden at der var behov for yderligere bekræftelse eller kontrol. Den grundlæggende MF-procedure er følgende: Et volumen af vandprøven, sædvanligvis 100 ml, filtreres igennem et filter med en porediameter på 0,45 µm, hvorefter vandprøven inkuberes på et sterilt underlag mættet med et selektivt medium. De to medier, som anvendes hyppigst, er Endo-væsken, som er selektiv over for coliform-arter ved 35 °C, og FC-væsken, som er selektiv for fækale coliform-arter ved 44,5 °C (10). Siden disse mediers introduktion har adskillige forskere rapporteret, at både Endo- og FC-væsken har en tendens til at underistimere de faktiske

antal af tilstedeværende indikatorbakterier, hvilket enten skyldes mediets selektivitet eller den høje temperatur (44,5 °C), der anvendes ved inkubationen (21, 22). Sådanne tilfælde af forkerte negative resultater har vist sig med særlig stor hyppighed, når organismerne i prøven forinden er blevet subletalt skadet af miljømæssige faktorer og/eller kemikalier (17, 18). I den senere tid har EPA foreslået modifikationer til opfølgning af MF-testen ved en bekræftende procedure, hvorved mindst 10 kolonier på hver filter skal kontrolleres for gasproduktion ved anvendelse af LST-væske efterfulgt af BGLB-væske ligesom i MPN-analysen (14). Sådanne modifikationer vil ganske vist reducere forekomsten af såvel forkerte negtive som forkerte positive reaktioner, men de vil også forøge materialeomkostningerne, ligesom de vil tredoble MF-analysetiden fra 24 timer til 72 timer.

I 1982 indtroducerede Feng og Hartman en fluorogenanalyse til bestemmelse af E. coli ved anvendelse af substratet 4-methylumbelliferon-glucuronid (MUG) (13). E. coli-celler producerede enzymet β-blucoronidase, som ville spalte substratet under frigivelse af det fluorogene 4-methylumbelliferon-radikal (19). Ved at indkorporere forbindelsen MUG i LST-mediet, der benyttes ved den foreløbige test, gav et enkelt rør med LST-MUG-medium både de foreløbige data (gasproduktion) og de bekræftede data fluoresens) for fækale coliform-arter inden for 24 timer. Selv om MUG-analysen var hurtig og simpel, var det kun 85-95 % af E. coli-cellerne (afhængigt af oprindelse), der producerede dette enzym, eftersom testen ikke var 100 % pålidelig. Endvidere kunne systemet ikke anvendes på coliformgruppen.

For øjeblikket eksisterer der ikke nogen egnet analysemetode til påvisning og optælling af coliform-arter og fækale coliform-arter i en prøve. Udviklingen af en sim-

pel, hurtig og pålidelig detekteringsanalyse vil derfor ikke kun nedbringe omkostninger og arbejdstid, men også i høj grad forøge effektiviteten med hensyn til overvågning af vandets sundhedstilstand og med hensyn til fødevareforarbejdning og -håndtering.

Opfindelsen illustreres nærmere under henvisning til tegningen, hvor

figur 1 er en afbildning af elektrokemiluminescensmålinger foretaget for en homogen immunoanalyse med henblik påbestemmelse af koncentrationen af et antigen i opløsning,

figur 2 er en grafisk afbildning af resultaterne af en homogen ECL-theophyllin-anayse,

figur 3 er en grafisk afbildning af resultaterne af en homogen theophyllin-analyse i forskellige sera, idet der på figuren er anvendt følgende angivelser:

● = Normal sera
■ = Hæmolyserede sera
◆ = Lipæmiske sera
□ = Icteriske sera.

Figur 4 er en grafisk afbildning af resultaterne af en ECL-theophylin-analyse sammenlignet med resultaterne af en theophyllin-analyse ved fluoresens-polariseering, og figuren er opdelt som følger:

A. Normalt sera: n = 4; hældning = 0,986; r = 1,00
B. Hæmolyserede sera: n = 3; hældning = 0,878; r = 1,00

C. Lipæmiske sera: n = 5; hældning = 0,872; r = 0,99

D. Icteriske sera: n = 4; hældning = 2,14; r = 1,00.

Figur 5 er en grafisk afbildning af resultaterne af en ECL-theophylin-analyse sammenlignet med resultaterne af en højtryksvæskechromatografisk analyse.

n = 9; hældning = 1,197; r = 0,98.

Figur 6 er en grafisk afbildning af moduleringen af et ECL-signal frembragt i en ECL-digoxin-immunoanayse.

Figur 7 er en grafisk afbilding af resultaterne af en ECL-digoxin-immunoanalyse, idet der på figuren er anvendt følgende angivelser:

■ = Blindprøve

● = Digoxin.

Figur 8 er en grafisk afbildning af det ECL-signal, der frembringes af forskellige koncentrationer MBI 38-forbindelse I.

figur 9 viser resultaterne af en undersøgelse af hybridisering/sensitivitet udført på MBI 38-forbindelse I, idet

TAG = forbindelse I.

Endelig viser figur 10 resultaterne af en specifik undersøgelse af MBI 38-forbindelse I.

I nærværende bekrivelse betyder "molær" koncentrationen af en analysand i opløsning udtrykt i mol pr. liter eller den mængde partikelformigt materiale, som er tilstede i

en væskeprøve, udtrykt i partikler eller enheder pr. liter. For eksempel kan 1 x 10^{23} partikler pr. liter udtrykkes som 1 molær.

Den foreliggende opfindelse angår elektrokemiluminescerende komplekser, som er ejendommelige ved at være valgt blandt de krav 1 nævnte forbindelser. Eksempler på sådanne elektrokemiluminescerende kemiske grupper kan være bis[(4,4'-carbomethoxy)-2,2'-bipyridin] 2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)propyl]-1,3-dioxolan-ruthenium (II), bis (2,2'-bipyridin) [4-(butan-1-al)-4'-methyl-2,2'-bipyridin] ruthenium (II), ffbis (2,2'-bipyridin) [4-(4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-'yl) smørsyre] ruthenium (II), (2,2-bifpyridin)[cis-bis(1,2-diphenyl-phosphino)ethylen]{2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-propyl]-1,3-dioxolan}osmium (II), bis (2,2'-bipyridin) [4-(4'-methyl-2,2'bipyridin)-butylamin] ruthenium (II), bis(2,2'-bipyridin)[1-brom-4(4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butan] ruthenium (II) eller bis(2,2'-bipyridin)-maleimidohexansyre-4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-butylamid-ruthenium (II).

Reagenset, som bringes i kontakt med prøven, kan bestå af en elektrokemiluminescerende kemisk gruppe, konjugeret til en hel celle, en subcellulær partikel, et virus, en prion, et viroid, et lipid, en fedsyre, en nucleinsyre, et poysaccharid, et protein, et lipoprotein, et lipopolysaccharid, et glycoprotein, et peptid, en cellulær metabolit, et hormon, et farmakologisk middel, et beroligende middel et barbiturat, et alkaloid, et steroid, et vitamin, en aminosyre, en sukkerart, en ikke-biologisk polymer, et syntetisk organisk molekyle, et organometallisk molekyle, et uorganisk molekyle, biotin, avidin eller streptavidin. I en udførelsesform for opfindelsen er midlet en elektrokemiluminescerende gruppe konjugeret til et antistof, et antigen, en nucleinsyre, et hapen, en ligand

eller et enzym eller konjugeret til biotin, avidin eller streptavidin.

Prøven kan være udvundet fra et fast stof, en emulsion, en suspension, væske eller gas. Endvidere kan prøven være afledt af vand, fødevarer, blod, serum, urin, afføring, væv, spyt, olier, organiske opløsningsmidler eller luft. Endvidere kan prøven indeholde acetonitril, dimethylsulfoxid, dimethylformamid, n-methylpyrrolidinon eller tert-butanol. Prøven kan også omfatte et reducerende middel eller et oxiderende middel.

Komplekserne ifølge opfindelsen kan anvendes til i et på forhånd bestemt volumen af en multikomponentvæske at påvise en analysand af interesse, som er tilstede i prøven i en koncentration på under ca. 10^{-3}molær.

Reagenset til dette formål kan være selve analysanden af interesse, som er konjugeret til en elektrokemiluminescerende kemisk gruppe, eller en analog til anlysanden af interesse, som er konjugeret til en elektrokemiluminescerende gruppe. Endvidere kan analysanden af interesse være theophylin, digoxin eller hCG. Den elektrokemiluminescerende kemiske gruppe kan f.eks. være bis[(4,4'-carbomethoxy)-2,2'-bipyridin]2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)propyl]-1,3-dioxolan-ruthenium (II), bis(2,2'-bipyridin)[butan1-1al)-4'-methyl-2,2'-bipyridin] ruthenium (II), bis (2,2'-bipyridin) [4-(4-methyl]-2,2'-bipyridin-4'-yl)-smørsyre] ruthenium (II),(2,2'-bipyridin)[cis-bis(1,2-diphenylphosphino)ethylen]{2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)propyl]-1,3-dioxolan}osmimun (II), bis(2,2'-bipyridin) [4-(4'-methyl-2,2'-bipyridin)-butylamin] ruthenium (II), bis(2,2'-bipyridin)[1-brom-4(4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)butan] ruthenium (II) eller bis(2,2'-bipyridin)maleimidohexansyre-4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-butylamid-ruthenium (II).

Det komplimentære materiale kan være en hel celle, en subcellulær partikel, et virus, en prion, et viroid, et lipid, en fedtsyre, en nucleinsyre, et polysaccarid, et protein, et lipoprotein et lipopolysaccharid, et glycoprotein, et peptid, en cellulær metabolit, et hormon, et farmakologisk middel, et beroligende middel, et barbiturat, et steroid, et vitamin, en aminosyre, en sukkerart, en ikke-biologisk polymer, et syntetisk organisk molekyle, et organometallisk molekyle eller et uroganisk molekyle.

Det falder inden for opfindelsens rammer, at de omhandlede komplekser kan anvendes på en sådan måde, at man kvantitativt bestemmer en analysand af interesse.

En sådan metode kan gennemføres som en heterogen analyse eller som en homogen analyse. I en af de foretrukne udførelsesformer bliver ethvert reagens, som ikke kombineres med analysanden af interesse, separeret fra prøven, som har været i kontakt med en kendt mængde af reagenset, inden prøven udsættes for elektrokemisk energi fra en egnet energikilde, som på effektiv måde kan bringe reagenset til vedvarende at udsende stråling. Ifølge en anden udførelsesform behandler man prøven, inden man bringer den i kontakt med reagenset, således at man immobiliserer analysanden af interesse.

Analysanden af interesse kan være en hel celle, en subcellulær partikel, et virus, en prion, et viroid, et lipid, en fedtsyre, en nucleinsyre, et polysccharid, et protein, et lipoprotein, et lipopolysaccharid, et glycoprotein, et peptid, en cellulær metabolit, et hormon, et farmakologisk middel, et beroligende middel, et barbiturat, et alkaloid, et steroid, et vitamin, en aminoyre, en sukkerart, en ikke-biologisk polymer, et syntetisk or-

ganisk molekyle, et organmetallisk molekyle eller et uorganisk molekyle. I en udførelsesform for opfindelsen er analysanden af interesse theopyllin. Ifølge en anden udførelsesform er analysanden af interesse digoxin. Analysanden af interesse kan også være hCG.

Reagenset, hvormed prøven bringes i kontakt, kan være en elektrokemiluminescerende kemisk gruppe konjugeret til en hel celle, en subcellulær partikel, et virus, en prion, et viorid, et lipid, en fedtsyre, en nucleinsyre, et polysaccharid, et protein, et lipoprotein, et lopopolysaccharid, et glycoprotein, et peptid, en cellulær metabolit, et hormon, et farmakologisk middel, et beroligende middel, et barbiturat, et alkaloid, et steroid, et vitamin, en aminosyre, en sukkerart, en ikke-biologisk polymer, et syntetisk organisk molekyle, et organmetallisk molekyle eller et uorganisk molekyle.

Reagenset er en elektrokeminuminescerende kemisk gruppe konjugeret til et antistof, et antigen, en nucleinsyre, en ligand eller et enzym eller hapten, biotin, avidin eller streptvidin.

Den elektrokemiluminescerende gruppe er en metalholdig organisk forbindelse, hvori metallet er valgt blandt ruthenium og osmium. Eksempler på den elektrokemiluminescerende kemiske gruppe kan også være bis[(4,4'-carbomethoxy)-2,2'-bipyridin] 2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4-yl)propyl]-1,3-dioxolan-ruthenium (II), bis(2,2'-bipyridin)[4-(butan-1-al)-4'-methyl-2,2'-bipyridin]ruthenium (II), bis (2,2'-bipyridin) [4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-smørsyre] ruthenium (II), (2,2'-bipyridin)[cis-bis(1,2-diphenylphosphino) ethylen]{2-[3-(4-methyl-2,2'bipyridin-4'-yl)propyl]-1,3 dioxolan}osmium (II), bis(2,2'-bipyridin) [4-(4'-methyl-2,2'-bipyridin)-butylamin]- ruthenium (II), bis(2,2'-bipyridin)[1-brom-

4(4'-methyl-2,2'-fbipyridin-4-yl)butan] ruthenium (II) eller bis(2,2'-bipyridin)maleimidohexansyre, 4-methyll-2,2'-bipyridin-4'-butylamid-ruthenium (II).

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes også en fremgangsmåde til at påvise og identificere tilstedeværelsen af et større antalanalysander af interesse i flydende fødevarer eller fødevarehomogenater. Analysanderne af interesse kan i dette tilfælde være mikroorganismer. Disse mikroorganismer kan være levedygtige eller ikke-levedygtige. Nærmere bestemt kan der være tale om bakterier. Som eksempler på bakterier, som kan påvises ved den omhandlede metode, kan nævnes salmonella, campylobacter, escherichia, yersinia, bacillus, vibrio, legionella, clo stridium, streptokok og stafylokok. Metoden er ikke begrænset til disse bakterier.

Analysanderne af interesse kan også være antigener. sådanne antigener omfatter (men er ikke begrænset til) enterotoxiner og aflatoxiner.

De immobiliserede reagenser og påvisningsreagenserne kan være polyclonale antistoffer, monoklonale antistoffer, blandinger af monoklonale antistoffer eller blandinger af polyclonale og monoklonale antistoffer.

Påvisningsreagenserne kan være mærket med en detekterbar markering. Ifølge en udførelsesform for opfindelsen er påvisningsreagenserne hver især mærket med den samme detekterbare markering. Sådanne markeringer er velkendte inden for fagområdet, og der kan være tale om et enzym, f.eks. alkalinsk phosphatase, pebberrodperoxidase, glucoseoxidase, β-galactosidase eller urease, en fluoriserende gruppe, f.eks. fluorescein-isothiocyanat, tetramethylrhodamin-isothiocyanat, dichlortriazinylamino-fluorescein eller "Texas Red", eller en kemiluminescerende gruppe

f.eks. luminol, isoluminol eller en acridiniumester. Desuden kan den detekterbare markering være en elektrokemiluminescerende kemisk gruppe, som kan induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling, når den eksponeres for elektrokemisk energi fra en egnet energikilde i mængder, som kan inducere strålingen. Denne elektrokemiluminescerende kemiske gruppe kan være ruthenium eller osmium.

De immobiliserede reagenser kan være immobiliseret til en nitrocellulosemembran, som er fastgjort til reagens-holderen. Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Elektrokemiluminescens i forskellige organiske opløsningsmidler.

Elektrokemiluminescensen af tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) clorid, hexahydrat blev målt i en 15 ml trehalset, rundbundet kolbe, der indeholdt 10 ml af en opsøsning fremstillet som beskrevet nedenfor, en magnetomrører med dimensionerne 1,5 x 10 mm, en kvasi-reference elektrode fremstillet af sølvtråd med en diameter på 1,0 mm, en kombineret modeleektrode fremstillet af 0,35 mm platintråd og en driftselektrode bestående af en 0,7 mm platintråd fastloddet til et kvardratisk stykke (1 x 1 cm) 0,1 mm tyk højglanspoleret platinfolie (drifselektroden af platinfolie var udformet som en halvcirkel med en diameter på 0,48 cm, som ækvidistant omgav modelektroden af 0,35 mm platintråd med en afstand på omkring 0,24 cm).

Sølvtråden blev forbundet til EG&G Model 178 elektrometersonden hørende til en EG&G Model 173 potentiostat/

galvanostat. Modelektroden af platintråd og driftselektroden af platinfolie blev forbundet med hhv. anoden og katoden på den anvendte EG&G Model 173 potentiostat. Anordningen blev jordforbundet.

Cyklisk voltammetri blev udført med EG&G Model 173 potentiostaten, hvortil der var forbundet en EG&G Model 175 universal programmeringsenhed. Programmeringsenheden blev indstillet til udsving på 100 mV/sek. imellem et anodepotential på +1,75 V og et katodepotential på -1,80 V. Elektrokemiluminescensen blev målt ved hjælp af et Hamamatsu R928 fotoforstærkerrør anbragt inden i et kabinet af mærket "Products for Research" Model PR1402RF til fotoforstærkerrør, som var forsynet med et Kodak nr. 23 A gelatine (rødt) filter. Fotoforstærkerrørets kabinet var forbundet til et Oriel Model 7070 fotoforstærkerdetekteringssystem. Det cykliske voltamogram blev optaget på et Houston Instruments Model 200 X-Y registreringsapparat.

Der frembragtes cykliske voltamogrammer for 1 mM tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat (Aldrich Chemical Company) og 0,1 M tetrabutylammonium-tetrafluorborat $TBABF_4$) (Aldrich Chemical Company) i opløsninger fremtillet med de følgende organiske opløsningsmidler: acetonitril, N, N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid og 1-methyl,-2-pyrrolidinon (Aldrich Chemical Company). Man benyttede også t-butanol og deioniseret destilleret vand (1:1 v/v) til at fremstille en opløsning indeholdende 2 mM tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat og 0,10 M $TBABF_4$. De resulterende voltamogrammer indicerede ikke nogen ændringer i redoxpotentialet af tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat ved variation af det organiske opløsningsmiddel.

Med henblik på en visuel bestemmelse af elektrokemiluminescensen fremstillede man opløsninger som følger: tilstrækkelige mængder af tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat og $TBABF_4$ blev opløst i de ovenfor beskrevne organiske opløsningsmidler af spektroskopisk kvalitet (Aldrich Chemical Company) til opnåelse af slutkoncentrationer på hhv. 1 mM og 0,1 M. Derefter satte man 10 ml af den resulterende opløsning til den trehalsede, rundbundede kolbe med volumen 15 ml. Elektroderne blev neddyppet i opløsningen, og driftselektroden blev påtrykt et pulserende potential på mellem +1,75 og -1,45 V for at frembringe elektrokemiluminescens. I hver af de ovenfor beskrevne opløsninger blev elektrokemiluminisensen observeret visuelt.

Til kvantitative bestemmelser af den indvirkning, som en ændring af opløsningsmidlet havde på elektrokemiluminescensen, fremstillede man opløsninger som følger: tilstækkelige mængder tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat og $TBABF_4$ blev sat til de ovenfor beskrevne orgniske opsøsningsmidler til opnåelse af slutkoncentrationer på hhv. 2 mM og 0,2 M. til en prøve af denne opløsning sattes et tilsvarende volumen deioniseret, destilleret vand, der indeholdt et stærkt oxiderende ammoniumpersulfat, til en koncentration på 36 mM. Der fremstilledes også kontroloplø sninger, som ikke indeholdt tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chlorid-hexahydrat. Derefter anbragtes 10 ml af den resulterende opløsning i den trehalsede, rundbundede kolbe med volumen 15 ml. Elektrokemiluminescensen blev frembragt ved at pulsere katodepotentialet i intervaller på 1 sek. imellem 0 og -2,0 V.

Elektrokemiluminescensmålingerne blev foretaget ved at integrere det resulterende signal fra fotoforstærkerrøret ved anvendelse af en integrator forbundet til et Micronta

Model 22191 digital multimeter. Signalet blev integreret i 10 sek. under pulseringen, og resultatet blev registreret i mV. Resultaterne er vist i den efterfølgende tabel I, og de antyder, at man ved at variere opløsningsmidlet påvirker ruthenium (II) choridets kvanteeffektivitet.

TABEL I

Organisk Opløsningsmiddel	Tris-RuBiPy (10^{-6}M)	Kontrol	Δ
Acetonitril	2540*	104	2436
Tert-butanol	1280	0	1280
N, N-dimethyl-formamid	2390	143	2247
Dimethylsulfoxid	2760	29	2731
1-methyl 1-2-pyrrolidinon	1630	0	1630

* alle målinger er i millivolt.

EKSEMPEL 2

Sensitivitet af detekteringen af elektrokemiluminescensen af ruthenium-mærket anti-museimmunoglobulin G (IgG) antistof fra kaniner.

Elektrokemiluminneensen af anti-muse-IgG-antistof fra kaniner mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket ka-

nin-anti-muse-IgG-antistof) blev målt i en 15 ml trehalset, rundbundet kolbe indeholdende 10 ml af en opløsning fremstillet som beskrevet nedenfor, et magnetisk omrørerlegeme med dimensionerne 1,5 x 10 mm, en kvasireferenceelektrode fremstillet af 1,0 mm sølvtråd, en kombineret modelektrode fremstillet af 0,35 mm platintråd og en driftselektrode bestående af 0,7 mm platintråd fastloddet til et kvadratisk (1 x 1 cm) stykke højglanspoleret platinfolie med en tykkelse på 0,1 mm (driftselektroden af platinfolie var formet som en halvcirkel med en diameter på omkring 0,48 cm, som ækvidistant omgav platintråden med diameter 0,35 mm i en afstand fra denne på ca. 0,24 cm).

Sølvtråden blev forbundet til EG&G Model 178 elektrometersonden hørende til en EG&G Model 173 potentiostat/galvanostat. Modelektroden af platintråd og driftselektroden af platin blev forbundet med hhv. anoden og katoden i en EG&G Model 173 potentiostat. Anordningen blev jordforbundet.

Elektrokemiluminescensen, som blev udsendt fra den ruthenium-mærkede opløsningen af kanin-anti-muse-IgG-antistof, blev målt ved hjælp af et Hamamatsu R928 fotoforstærkerrør anbragt inden i et kabinet af mærket "Products for Research" Model PR1402RF til fotoforstærkerrør, som var forsynet med et Kodak nr. 23 A gelatine (rødt) filter. Kabinettet til fotoforstærkerrøret var forbundet til et Oriel Model 7070 fotoforstærkerdetekteringssystem.

Elektrokemiluminescensen blev induceret ved at pulsere et katodepotential mellem 0 og -2,0 V i intervaller på 1 sek. Målingerne af elektrokemiluminescensen blev foretaget ved at integrere det resulterende signal fra fotoforstærkerrøret ved hjælp af en integrator forbundet til et Micronta Model 22191 digital multimeter. Elektrokemi-

luminescenssignalet blev integreret i 10 sek. under pulseringen, og resultatet blev registreret i millivolt.

Man fremstillede en stamopløsning af 1,25 x 10^{-7}M ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof fra kaniner ud fra en koncentreret opløsning (2 mg/ml, 7,5 Ru/antistof) af det mærkede antistof ved fortynding med fosfatpufferholdigt saltvand (PBS). En prøve af denne opløsning (80 mikroliter) blev sat til 10 ml af en blanding af dimethylsulfo sid (DMSO) og demineraliseret, destilleret vand (1:1), der indeholdt 0,1 M tetrabutylammoniumtetrafluorborat ($TBABF_4$) og 18 mM ammoniumpersulfat, i reaktionsbeholderen. Slutkoncentrtionen af ruthenium-mærket antistof var 1 x 10^{-9}M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet ovenfor.

Der fremstilledes yderligere opløsninger, som repræsenterede forskellige fortyndinger af stamopløsningen af det ruthenium-mærkede anti-muse-IgG-anti-stof fra kaniner, og prøver (80 mikroliter) af disse opløsninger blev sat til den samme opløsning af ruthenium-mærket antistof i reaktionsbeholderen i trinvise stigninger, som resulterede i de følgende koncentrationer af mærket antistof: 5 x 10^{-9}M, 1 x 10^{-8}M og 5 x 10^{-8}M. For hver opløsning foretog man elektrokemiluminescensmlinger som tidligere beskrevet. Resultaterne af disse målinger er anført i tabel II medenfor. disse resultater visser sensitiviteten af elektrokemiluminescensmålinger af mærket antistof (1 x 10^{-9}M), ligsom de viser, hvorledes intensiteten af elektrokemiluminescensen afhænger af koncentrationen af det ruthenium-mærkede anti-muse-IgG-antistof.

TABEL II

Elektroluminescens (ECL) af ruthenium-mærket anti-museimmunoglobulin G (IgG) antistof fra kaniner

Koncentration af ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof	ECL (mV)
5×10^{-8}M	1610
1×10^{-8}M	892
5×10^{-9}M	418
1×10^{-9}M	72
0	0

EKSEMPEL 3

Immunologisk reaktivitet af ruthenium-mærket bovint serumalbumin (BSA) i en enzym-bundet immunosorbent-analyse (ELISA) i fast fase.

Hulrummene i en mikrotiterplade af polystyren blev belagt med en mættende koncentration af enten bovint serumalbumin mærket med 4,47-(dichormethyl)-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II), d.v.s. rutheium-mærket bovint serumalbumin (6 RU/BSA, 20 mikrogram/ml i PBS-puffer, 50 mikroliter/hulrum eller ikke-mærket BSA (20 mikrogram/ml i PBS-puffer, 50 mikroliter/hulrum) og inkuberet i en time ved stuetemperatur. Efter denne inkubationsperiode blev pladen vasket 3 gange med PBS, 5 minutter pr. udvaskning. En opløsning, der indeholdt 6 mg/ml kanin-anti-BSA-antistof, blev fortyndet hhv. 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000, 1:50.000 og 1:60.000 i PBS, og fortyndingerne blev in duplo sat til hulrummene, der var belagt med ruthenium-mærket BSA eller med ikke-mærket

BSA, hvorefter pladen blev inkuberet i 1 time ved stuetemperatur. Efter 3 udvaskninger med PBS som beskrevet ovenfor blev tilstedeværelsen af bundet kanin-anti-BSA-antistof bestemt ved, at man til hvert hulrum satte gede-anti-kanin-IgG-peroxidase-konjugat (1:1000 fortynding af en 0,5 mg/ml opløsning i PBS, 50 mikroliter/hulrum) og inkuberede pladen i 1 time ved stuetemperatur. Efter at have vasket pladen to gange med PBS, 1 gang med 0,5 % Tween-20 og 2 gange med PBS som ovenfor blandede man hydrogenperoxid (30 %) og 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzethiazolinsulfonat] (KPL, Gaithersburg, MD i lige store volumener, hvorpå man satte 200 mikroliter af blandingen til hvert af pladens hulrum. Efter 30 minutters inkubation ved stuetemperatur blev pladen aflæst spektrofotometrisk ved 414 mn. Den gennemsnitlige baggrundsabsorbans af kontrolprøverne blev trukket fra middelværdien af de dobbelte aflæsninger for hver fortynding af kanin-anti-BSA-antistoffet, som var sat til de hulrum, der var belagt med ruthenium-mærket BSA eller ikke-mærket BSA. Disse korrigerede absorbansværdier er anført i den efterfølgende tabel III.

Kurverne opnået for ikke-mærket BSA og ruthenium-mærket BSA var parallelle, og de korrigerede absorbansværdier i hvert punkt på de to kurver havde et konstant indbyrdes forhold på omkring 0,6. Man opnåede identiske resultater for to andre portioner ruthenium-mærket BSA, som var fremstillet ved anvendelse af det samme aktiverede ruthenium-kompleks som tidligere beskrevet, og som havde tilsvarende Ru/BSA-mærkningsforhold. disse resultater antyder, at det ruthenium-mærkede BSA er immunologisk reaktivt, og at det opretholder omkring 60 % af sin immunoreaktivitet, når det mærkes med ruthenium, i sammenligning med ikke-mærket BSA.

TABEL III

Absorbans ved 414 nm

Kanin-anti-BSA-antistof-fortynding	Ikke-mærket BSA	Ruthenium-mærket BSA	Relative immunoreaktivitet
20.000	1,06	0,66	62 %
30.000	0,83	0,50	60 %
40.000	0,67	0,40	60 %
50.000	0,56	0,33	59 %
60.000	0,47	0,28	60 %

EKSEMPEL 4

Immunologisk reaktivitet af ruthenium-mærket anti-muse-immunoglobulin (IgG) antistof fra kaniner ved en konkurrerende enzym-bundet immunosorbent-analyse (ELISA) i fast fase.

Anti-muse IgG-antistof fra kaniner, mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bid (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof), blev sammenlignet med ikke-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof med hensyn til sin evne til at konkurrere med enzym-mærket anti-muse-IgG-antistof om at binde sig til muse-IgG. Hulrummene i en mikrotiterplade af polystyren med 96 hulrum blev belagt med en opløsning af muse-IgG (5 mikrogram/ml i PBS-puffer), inkuberet i 60 minutter ved stuetemperatur og vasket 3 gange med PBS (5 minutter pr. vask). Der fremstilledes to opløsninger, hvoraf den ene indeholdt en blanding af konjugatet af kanin-anti-muse-IgG med alkalisk phosphortase og kanin-anti-muse-IgG (1

mg/ml), mens den anden indeholdt en blanding af konjugatet af kanin-anti-muse-IgG med alkalisk phosphortase og ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG (1 mg/ml, 7,5 Ru/antistof). Disse to opløsninger samt en tredie, som indeholdt konjugatet af kanin-anti-muse-IgG med alkalisk phosphortase, blev fortyndet 1:6000, 1:7000, 1:8000, 1:9000. 1:10.000, 1:12.000, 1:14.000. og 1:16.000 i PBS indeholdende 0,5% Tween-20 og sat (50 mikroliter/hulrum) til separate rækker af hulrum i pladen, som indeholdt bundet muse-IgG. Pladen blev inkuberet i 60 minutter ved stuetemperatur og vasket 2 gange med en blanding af PBS og Tween-20 og 2 gange med PBS, 5 minutter pr. vask. Enzymsubstratet p-nitrofenylfosfat (1,5 mg/ml i 10 % diethanolamin-puffer, pH 9,6) blev sat til hvert hulrum (200 mikroliter/hulrum). Pladen blev inkuberet i 30 minutter ved stuetemperatur og aflæst spektrofotometrisk ved 405 nm. Den gennemsnitlige baggrundsabsorbans af kontrolprøverne blev trukket fra middelværdien af de dobbelte aflæsninger for hver af de 3 opløsninger i hver af de angivne fortyndinger. Disse absorbansværdier er vist i tabel VI.

Der opnåedes 3 parallelle kurver, hvoraf topkurven repræsenterede den ikke-inhiberede binding af enzyn-konjugatet, mens de to underliggende kurver angav inhiberingen som følge af hhv. ruthenium-mærket anti-muse-IgG og ikke-mærket anti-muse-IgG. Ved sammenligning punkt for punkt finder man, at kurven svarende til ruthenium-mærket anti-muse-IgG ligger på tilnærmelsesvis 81 % i forhold til kurven svarende til ikke-mærket anti-muse IgG i forhold til enzym-konjugat kurven. Disse resultater angiver, at det ruthenium-mærkede anti-muse-IgG-antistof er immunologisk reaktivt over for sit antigen (muse-IgG), og at det har en effektivitet i forhold til ikke-mærket anti-muse-IgG-antistof på tilnærmelsesvis 81 % med hensyn til

at konkurrere med enzym-mærket anti-muse-IgG-antistof om binding til muse-IgG.

TABEL IV

Absorbans ved 405 nm

	A	B	C	
Fortynding	Anti-muse IgG, alkalinsk phosphortase (enzym-konjugat)	Enzym-konjugat+ ruthenium-mærket anti-muse-IgG	Enzym-konjugat+ ikke-mærket anti-muse-IgG	Sammenlignende grad af inhibering*
6000	1,48	0,94	0,79	77 %
7000	1,33	0,82	0,69	79 %
8000	1,21	0,72	0,62	82 %
9000	1,10	1.10	0,65	84 %
10000	1,01	0,60	0,51	82 %
12000	0,87	0,51	0,43	80 %
14000	0,77	0,45	0,37	81 %
16000	0,68	0,40	0,33	80 %

*(A-B/A-C) x 100 %

EKSEMPEL 5

Elektrokemiluminescens af ruthenium-merket bovint serumalbumin (BSA).

En opløsning indeholdende 7,8 x 10^{-6} M bovint serumalbomin (BSA) mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket bovint serumalbumin) fremstilledes ud fra en stamopløsning af ruthenium-mærket BSA (2,6 mg/ml, 6 Ru/BSA) ved fortynding i phosphatpufferholdigt saltvand. Man satte 26 mikroliter af denne opløsning til 10 ml DMSO/deioniseret,

destilleret vand (1:1) indeholdende 0,1 M $TBABF_4$ og 18 mM ammoniumpersulfat i reaktionsbeholderen. Slutkoncentrationen af ruthenium-mærket BSA var 2 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet ovenfor.

På analog måde fremstilledes en opløsning, der indeholdt 7,8 x 10^{-6} M ikke-mærket BSA, og denne opløsning blev anbragt i reaktionsbeholderen til opnåelse af en slutkoncentration af ikke-mærket BSA på 2 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen af denne opløsning og af en tilsvarende opløsning uden BSA blev derefter målt. Resultaterne af disse elektrokemiluminescensmålinger er vist i den efterfølgende tabel V for kovalent koblet rutenium-mærket BSA og for ikke-mærket BSA.

TABEL V

Elektrokemiluminescens (ECL) af ruthenium-mærket BSA

Opløsning	ECL (mV)
2 x 10^{-8}M ruthenium-mærket BSA	730
2 x 10^{-8} M BSA	100
DMSO: H_2O (1:1)	0

EKSEMPEL 6

Elektrokemiluminescens af ruthenium-mærket anti-muse-immunoglobulin (IgG) antistof fra kaniner.

En opløsning, der indeholdt 1,25 x 10^{-6} M kanin-anti-muse-IgG-antistof mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis-(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof), blev fremstillet ud fra en stamopløsning af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof (2 mg/ml, 7,5 Ru/antistof) ved fortynding i forsfatpufferholdigt saltholdigt saltvand. Man satte 80 mikroliter af denne opløsning til 10 ml DMSO/deioniseret destilleret vand (1:1), der indeholdt 0,1 M $TBABF_4$ og 18 mM ammoniumpersulfat, i reaktionsbeholderen. slutkoncentrationen af ruthenium-mærket antistof var 1 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet i eksempel 2.

På analog måde fremstillede man en opløsning indeholdende 1,25 x 10^{-6} M ikke-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof, og man satte denne opløsning til reaktionsbeholderen til opnåelse af en slutkoncentration af ikke-mærket antistof på 1 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen af denne opløsning og af opløsningen uden tilsat antistof blev ligeledes målt som beskrevet ovenfor. Resultaterne af elektrokemiluminescensmålingerne er vist i den efterfølgende tabel VIII for kovalent koblet ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof og ikke-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof.

TABEL VI

Elektrokemiluminescens (ECL) af ruthenium-mærket kanin-anti-museimmunoglobulin (IgG) antistof

Opløsning	ECL (mV)
1 x 10^{-8} M ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof	892
1 x 10^{-8} M kanin-anti-muse-IgG-antistof	0
DMSO: H_2O (1:1)	0

EKSEMPEL 7

Homogen elektrokemiluminiscens-immunoanalyse for antistoffer til bovint serumalbumin.

En opløsning indeholdende 7,8 x 10^{-6} M bovint serumalbumin (BSA) mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket bovint serumalbumin) blev fremstillet ud fra en stamopløsning af ruthenium-mærket BSA (2,5 mg/ml, 6 RU/BSA) ved fortynding i phosphatpufferholdigt saltvand (PBS). Man satte 26 mikroliter af denne opløsning til 10 ml af en 1:1 blanding af DMSO og deioniseret destilleret vand, der indeholdt 0,1 M $TBABF_4$ og 18 mM ammoniumpersulfat, i reaktionsbeholderen. Slutkoncentrationen af ruthenium-mærket BSA var 2 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet i eksempel 2.

På analog måde blev en opløsning, der indeholdt 7,8 x 10^{-6} M ikke-mærket BSA, fremstillet og sat til reaktionsbeholderen til opnåelse af en slutkoncentration af ikke-

mærket BSA på 5 x 10^{-8} M. Man målte elektrokemiluminescensen af denne opløsning og af en tilsvarende opløsning uden BSA.

En opløsning, der indeholdt 3,75 x 10^{-5} M kanin-anti-BSA-antistof, blev fremstillet ud fra en stamopløsning af kanin-anti-BSA-antistof (6,0 mg/ml) ved fortynding i PBS, og der sattes en prøve (26 mikroliter) til opløsningen af ruthenium-mærket BSA i reaktionsbeholderen til opnåelse af en slutkoncentration af kanin-anti-BSA-antistof på 1 x 10^{-7} M.

Elektrokemiluminescensen af den resulterende blanding af ruthenium-mærket BSA-antigen og antistof (kanin-anti-BSA) blev målt. Resultaterne angivet i den efterfølgende tabel VII viser en reduktion i elektrokemiluminescensen af det ruthenium-mærkede BSA efter tilsætning af kanin-anti-BSA-antistof, og resultaterne viser også, at man kan opnå en homogen elektrokemiluminescerende bestemmelse af antistof til BSA. På basis af disse resultater vil det være klart for fagmanden, at man kan udvikle en homogen elektrokemiluminescens-immunoanalyse til påvisning af andre analysander af interesse.

TABEL VIII

Reduktion af elektrokemiluminescensen (ECL) af ruthenium-mærket bovint serumalbumin efter binding til antistof

Ikke-mærket BSA (kontrol)	Ruthenium-mærket (BSA) (antigen)	Kanin-anti-BSA (antistof)	ECL(mV)
0	2 x 10^{-8} M	0	727
0	2 x 10^{-8} M	1 x 10^{-7} M	92
2 x 10^{-8} M	0	0	94

EKSEMPEL 8

Homogen elektrokemiluninescerende immunoanalyse for museimmunoglobulin G (IgG).

En opløsning indeholdende 6,25 x 10^{-6} M kanin-anti-muse-IgG-antistof mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) (ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof) blev fremstillet ud fra en stamopløsning af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof (2 mg/ml, 7,5 Ru/antistof) ved fortynding i phosphatpufferholdigt saltvand (PBS). Man satte 80 mikroliter af denne opløsning til 10 ml af en blanding (1:1) af DMSO og ioniseret destilleret vand, der indeholdt 0,1 M $TBABF_4$ og 18 mM ammoniumpersulfat, i reaktionskolben. Den endelige koncentration af ruthenium-mærket antistof var 5 x 10^{-8} M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet i eksempel 2.

På analog måde fremstillede man en opløsning indeholdende 6,25 x 10^{-6} M ikke-mærket anti-muse-IgG-antistof fra kaniner, og denne opløsning satte man til reaktionsbeholderen til opnåelse af en endelig koncentration af ikke-mærket antistof på 5 x 10^{-8} M. Man bestemte elektrokemiluminescensen af denne opløsning og af en tilsvarende opløsning uden antistof.

En opløsning indeholdende 2,5 x 10^{-5} M muse-igG fremstilledes ud fra en stamopløsning af muse-IgG (4,0 mg/ml) ved fortynding i PBS, og man satte forskellige prøver (20 mikroliter og 40 mikroliter) af denne opløsning til opløsningen af ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof i reaktionsbeholderen til opnåelse af slutkoncentrationer af muse-IgG på hhv. 5 x 10^{-8} M og 1 x 10^{-7} M.

Derefter målte man elektrokemiluminescensen af den resulterende blanding af ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof og antigenet (muse-IgG). resultaterne fremgår af den nedenstående tabel VIII. Elektrokemiluminescensmålingernes afhængighed af koncentrartionen af muse-IgG-antigen er vist på figur 1. Disse resultater viser, at der sker en reduktion i elektrokemiluminescensen af det rutheniummærkede antistof efter tilsætning af antigenet. På basis af disse resultater vil det være klart for fagmanden, at det er muligt at udvikle en homogen elektrokemiluminescens-immunoanayse til bestemmelse af koncentrationen af andre stoffer af interesse.

TABEL VIII

Reduktion af elektrokemiluminescensen (ECL) af rutheniummærket antistof efter binding til antigen

ikke-mærket anti-muse-IgG (kontrol)	Ruthenium-mærket-anti-IgG (antistof)	muse-IgG (antigen)	ECL (MV)
0	5×10^{-8} M	0	1610
0	5×10^{-8} M	5×10^{-8} M	1360
0	5×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1240
5×10^{-8} M	0	0	0

EKSEMPEL 9

Heterogen elektrokimiluminescerende immunoanalyse for legionella under anvendelse af et muse-anti-legionella-immunoglobulin G (IgG) antistof og ruthenium-mærket kanin-anti-museimmunoglobulin G (IgG) antistof

En formalinholdig suspension af bakterien Legionella medadei blev indstillet til en optisk densitet (ved 425

nm) på 1,00 ved fortynding med PBS puffer. Omkring 3 x 10^9 celler blev anbragt i et konisk mikrocentrifugeglas. Cellerne blev centrifugeret (10 minutter ved 10.000 omdr./min., subernatanten blev hældt fra, og cellerne blev resuspenderet i en 1:50 fortynding af et monoklonalt IgG-antistof fra mus (1,45 mg/ml), som var specifikt for Legionella midadei, i PBS (1 ml). Efter 1 times inkubation ved stuetemperatur blev cellerne centrifugeret, og supernatanten blev borthældt, hvorefter cellerne blev resuspenderet i PBS-puffer og centrifugeret påny. Efter dekantering af supernatanten blev cellerne resuspenderet i en 1:50 fortynding (i PBS) af kanin-anti-muse-IgG-antistof mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2'-bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II), d.v.s. ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof (2 mg/ml, 7,5 Ru/antistof). Efter inkubation ved stuetemperatur i 1 time blev cellerne centrifugeret, og subernatanten blev dekanteret fra, hvorefter cellerne blev resuspenderet i PBS og vasket 2 gange under centrifugering som beskrevet ovenfor. Efter den sidste udvaskning blev cellerne resuspenderet i 200 mikroliter PBS. Man satte 100 mikroliter af cellesuspensionen til reaktionskolben, som i forvejen indeholdt 10 ml DMSO/deioniseret destilleret vand (1:1) indeholdende 0,1 M $TBABF_4$ og 18 Mm annomiumpersulfat. Man målte elektrokemiluminescensen af cellesuspensionen. Derefter satte man yderligere 100 mikroliter af cellesuspensionen til reaktionskolben og målte elektrokemiluminescensen. Desuden målet man elektrokemiluminescensen for en opløsning uden celler. Desuden målte man elektrokemiluminescensen for en opløsning uden celler, som tjente som kontrol, ifølge metoden beskrevet i eksempel 2. Resultaterne vist i tabel 9 nedenfor viser, at man med gode resultater har gennemført en heterogen elektrokemilumeniscerende immunoanalyse for legionella under anvendelse af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof.

TABEL 9

Heterogen elektrokemiluminescerende (ECL) imminoanalyse for legionella micdadei

Prøve	ECL (mV)
Legionella micdadei cellesuspension, 1,9 x 10^9 celler i DMSO/H_2O (1:1)	160
Legionella micdadei cellesuspension, 9,3 x 10^8 celler i DMSO/H_2 (1:1)	90
DMSO: H_2O (1:1)	0

EKSEMPEL 10

Homogen elektrokemiluminescenerende immumoanalyse for legionella under anvendelse af et muse-anti-legionella-immuniglobulin G (IgG) antistof og ruthenium-mærket kanin-anti-muse-immunoglobulin G (IgG) antistof.

En suspension af bakterien Legionella micadei blev fremstillet og inkuberet med et muse-monoklonalt IgG-antistof, som er specifikt for legionella, som beskrevet i eksempel 9. Cellerne blev centrifugeret, vasket og resuspenderet i 0,2 ml PBS. En prøve (80 mokroliter) af anti-muse-IgG-antistof fra kaniner, mærket med 4,4'-dichlormethyl-2,2' bipyridyl-bis(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II), d.v.s. ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof (1,25 x 10^{-6} M) blev sat til cellesuspensionen, og blandingen blev inkuberet i 2 timer ved stuetemperatur. Som en kontrol blev en identisk fortynding af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof inkuberet på samme

måde i fravær af cellesuspensionen. Efter inkubationsperioden blev opløsningen af mærket antistof sat til 10 ml DMSO/deioniseret destilleret vand (1:1), der indeholdt 0,1 M $TABAF_4$ og 18 mM ammoniumpersulfat, i reaktionsblandingen, til opnåelse af en slutkoncentration af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof på 1 x 10^{-8}M. Elektrokemiluminescensen blev målt som beskrevet i eksempel 2. Man fulgte den samme procedure for cellesuspensionen med tilsat ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof. Resultaterne, som er vist i tabel X, viser en reduktion af den elektrokemiluminescerende stråling efter vekselvirkningen imellem det ruthenium-mærkede anti-muse-IgG-antistof og det muse-monoklonale antistof bundet til legionella, og resultaterne viser også, at man med gode resultater har gennemført en elektrokemiluminescerende immunoanalyse for legionella micdadei.

TABEL X

Homogen elektrokemiluminescerende (ECL) immunoanalyse for Legionella mecdadei

Prøve	ECL (mV)
1 x 10^{-8} M ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof	976
1 x 10^{-8} M ruthenium-mærket anti-muse-IgG-antistof + monoklonalt antistof bundet til Legionella mecdadei	803
DMSO: H_2O (1:1)	0

EKSEMPEL 11

Forøgelse af elektrokemiluminescensen efter frigivelse af et ruthenium-mærket antistof bundet til bakterier.

En suspension af bakterien Legionella micdadei i formalin blev indstillet til en optisk densitet (ved 425 nm) på1,00 ved fortynding med PBS-puffer, og 2 ml af denne suspension blev overført til et konisk mikrocentrifugeglas. Cellerne blev centrifugeret (10 minutter ved 10.000 omdr./min.), supernatanten blev dekanteret fra, og cellerne blev resuspenderet i en 1:10 fortynding i PBS (0,5 ml) af et muse-monoklonalt IgG-antistof (1,45 mg/ml) specefikt for Legionella micdadei. Efter inkubation ved stuetemperatur i 1 time blev cellerne centrifugeret som før, og supernatanten blev dekanteret fra, hvorefter cellerne blev resuspenderet i PBS-puffer og centrifugeret pâny. Efter dekantering af supernatanten blev cellerne resuspenderet i en 1:50 fortynding (i PBS) af ruthenium-mærket kanin-anti-muse-IgG-antistof (1 ml, 7,5 Ru/antistof). Efter inkubation ved stuetemperatur i 1 time blev cellerne centrifugeret som tidligere, og supernatanten blev dekanteret fra, hvorefter cellerne blev resuspenderet i PBS og vasket 2 gange med mellemliggende centrifugering som tidligere beskrevet. Efter den sidste udvaskning blev cellerne resuspenderet i 100 mikroliter af enten PBS eller 1,0 M eddikesyre i 0,9 % NaCl-opløsning (normalt saltvand) og inkuberet ved stuetemperatur i 40 minutter. Efter centrifugering blev 100 mikroliter af supernatantvæsken overført til reaktionskolben sammen med 10 ml af en blanding (1:1) af DMSO og deioniseret destilleret vand indeholdende 0,1 M $TBABF_4$ og 18 mM ammoniompersulfat. Elektrokemiuminescensen af cellesupernatantvæsken (eddikesyre/normalt saltvand) og af supernatantvæsken fra de PBS-vaskede celler blev målt i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksempel 2. Resultaterne af elektrokemiluminescensmålingerne er vist i den nedenstående tabel XI, og de viser, at den eluering af det ruthenium-mærkede kanin-anti-muse-IgG fra de med monoklonalt antistof belagte legionella-bakterier, som opnås ved at behandle cellerne med 1,0 M eddikesyre/nor-

malt saltvand (reference 23), resulterer i en forøgelse af den elektrokemiluminescens, som frembringes af det ikke-bundne ruthenium-mærkede antistof. Disse resultater viser også, at det ruthenium-mærkede antistof er bundet til de med monoklonalt antistof belagte legionella-bakterier, og at udvaskningen med PBS ikke resulterede i en forøgelse i ECL sammenlignet med baggrundssignalet.

TABEL XI

Elektrokemiluminescens (ECL) af supernatantvæsker fra celler belagt med ruthenium-mærket anti-muse-immunoglobulin (IgG)

Opløsning	ECL (mV)
Baggrundskontrol: 100 mikroliter 1,0 M eddikesyre/normalt saltvand	134
100 mikroliter PBS-cellevaske-supernatantvæske	121
100 mikroliter 1,0 M eddikesyre/normalt saltvand sammen med cellevaske-supernatantvæske	214

EKSEMPEL 12

Homogen konkurrerende immunoanalyse for pregnandiol-3-glucuronid (PD3G) i urin.

Pregnandiol-3-glucoronid (PD3G) kan påvises og bestemmes kvantitativt i urin ved at bringe en urinprøve i kontakt med en kendt mængde PD3G mærket med en elektrokemilumine-

scerende gruppe og en kendt mængde af en anti-PD3G-antistof under sådanne betingeler, at PD3G, som er tilstede i prøven, og den PD3G-elektrokemiluminescerende gruppe konkurrerer med hinanden om at besætte bindingsstederne på antistoffet. Efter et passende tidsrum kan den resulterende prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde. Den udsendte stråling kan bestemmes kvantitativt, og herudfra kan man betemme den mængde PD3G, som er tilstede i prøven.

EKSEMPEL 13

Mærkning af nucleinsyrer med en tris-ruthenium-bipyridyl-N-hydroxysuccinimidester.

Nucleinsyreprøver (5-25 mikrogram) i 10 mM tris-HCL (pH 8,0)/1 mM EDTA kan varmedenatureres, afkøles og modificeres ved bisulfit-katalyseret transaminering af cytosinrester med ethylendiamin i 3 timer ved 42 °C. Efter dialyse natten over imod 5 mM natriumfosfatpuffer, PH 8,5, kan prøverne koncentreres ti 100 mikroliter ved ultrafiltrering. Disse modificerede nucleinsyrer (1-10 mikrogram) kan fortyndes til 100 mikroliter med 0,1 M natriumfosfatpuffer, pH 8,5.

Man kan fremstille et tris-ruthenium-bipyridyl-N-hydroxysuccinimidester-derivat som en 0,2 M stamopløsning i N,N-dimethylformamid (DMF) ved i sig selv kendte metoder. Man kan sætte 5 mikroliter af denne esteropløsning til den modificerede nucleinsyreopløsning i 0,1 M natriumfosfatpuffer, pH 8,5, og inkubere blandingen ved stuetemperatur i 1 time. Mærkede nucleinsyreprober kan renses ved dialyse imod 150 mM natriumclorid/10 mM natriumfosfatpuffer (pH 7,0), der udskiftes mindst 3 gange. De opbevares ved 4 °C indtil anvendelsen.

EKSEMPEL 14

Nucleinsyrehybridiseringsanalyse for humant T-celleleukemi III virus (HTLV-III) i blod.

HTLV-III virus kan påvises i helt blod ved behandling af blodet til frigivelse af RNA fra viruspartikler. En prøve, der indeholder HTLV-III RNA, bringes i kontakt med en enkeltstrenget oligonucleotid-probe, som er komplementær til HTLV-III RNA'et, og mærkes med en elektrokemiluminescerende gruppe. Efter en passende tid, kan den resulterende prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er effektiv til dette formål. Den udsendte stråling kan bestemmes kvantitativt, og på grundlag heraf kan man bestemme den mængde HTLV-III RNA, der er tilstede i prøven.

EKSEMPEL 15

Homogen nucleinsyrehybridiseringsanalyse for legionellabakterier i en klinisk prøve.

Legionella-bakterier kan påvises i en klinisk prøve, såsom spyt, ved at behandle spyttet til frigivelse af ribosomalt RNA fra bakterierne. Den resulterende prøve bringes i kontakt med en enkeltstrenget oligonucleotidprobe, som er komplementær til de sekvenser i det ribosomale RNA, som er specifikke for legionella, og mærkes med en elektrokemiluminescerende gruppe. Efter en passende tid kan den resulterende prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er effektiv til dette formål. Den udsendte stråling kan bestemmes kvantitativt, og mængden af legionella-bakte-

rier, som er tilstede i prøven, kan bestemmes på dette grundlag.

EKSEMPEL 16

Hybridiseringsanalyse til bestemmelse af cytomegalovirus-DNA integreret i gemonisk DNA ved strengforskydningsmetoden.

Cytomegalovirus (CMV) DNA kan påvises i humant genomisk DNA ved behandling af en vævsprøve, for eksempel lymfocytter, til frigørelse af DNA'et efterfulgt af en spaltning af DNA med restriktionsenzymer. Den resulterende prøve, som indeholder dobbeltstrengede fragmenter af CMV, bringes i kontakt med en enkeltstrenget oligonucleotidprobe, som er komplementær til CMV-DNA'et, mærket med en elektrokemiluminescerende gruppe og i stand til at forskyde en af strengene i DNA-duplex'et. Efter et passende tidsrum kan den resulterende prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde til dette formål. Den udsendte stråling kan bestemmes kvantitativt, og på grundlag heraf kan man bestemme den mængdecytomegalovirus-DNA, som er tilstede i prøven.

EKSEMPEL 17

Hybridiseringsnalyse til påvisning af ras-oncogenet i humane blærecarcinomaceller ved anvendelse af en heterogen metode.

Man kan bestemme ras-onkcogenet i humane blærecarcinomaceller ved at behandle en vævsprøve til frigørelse af DNA, som man spalter med restriktionsenzymer. Derefter nedbryder man DNA'et til enkeltstrenge og binder disse til nitrocellulosepapir som tidligere beskrevet af Mania-

tis, T. et al. (24). filterpapiret med bundet enkeltstrenget DNA bringes i kontakt med en oligonucleotid-probe, som er specifik for ras-oncogenet, og som er mærket med en elektrokemilumineceren de gruppe. Efter en passende reaktionstid kan den resulterende prøve induceres til vedvarende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er effektiv til dette formål. Den udsendte stråling kan påvises, og på grundlag heraf kan man bestemme tilstedeværelsen af ras-oncogen-RNA i prøven.

EKSEMPEL 18

Elektrokemiluminescerende polymer-baseret enzymanalyse.

Et makromolekylært enzym-substrat, f.eks. stivelse, dextran eller en syntetisk fremstillet makromolekylær polymer, kan mærkes med en elektrokemiluminescerende gruppe. Det mærkede substrat kan benyttes til påvisning og kvantitativ bestemmelse af tilstedeværelsen af et enzym, som forekommer i et multikomponentsystem. det mærkede substrat kan også benyttes til kvantitativt at bestemme en mængde enzym, som er bundet til et antistof, en DNA-probe, en RNA-probe, streptavidin, avidin eller biotin. Det mærkede substrat kan spaltes selektivt til mindre fragmenter ved hjælp af et passende enzym. Man kan anvende en hvilken som helst kombination af enzym og substrat. Som eksempler på enzymer kan nævnes glycosidaser, glucosidaser, amylaser, proteaser, endonucleaser, lyaser og dextranaser. Efter en passende reaktionstid kan den resulterende prøve induceres til vedværende at udsende elektromagnetisk stråling efter direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er effektiv til formålet. Den udsendte stråling kan bestemmes kvantitativt, og herud fra kan man bestemme den mængde enzym, der er tilstede i prøven. Fordelen er, at man opnår en forstærkning af

det elektrokemiluminescerende signal fra de spaltede fragmenter, som hver især er mærket med en elektrokemiluminescerence gruppe.

EKSEMPEL 19

Afsløring af streptokokker af en elektrokemiluminescerende enzymforsøg.

En prøve indeholdende streptokokker kan bringes i kontakt med en reagensblanding indeholdende et syntetisk peptid mærket med en elektrokemiluminescerende gruppe. Det syntetiske peptid er et substrat specifikt for peptidase frembrakt af bakterien. Indvirkning af peptidasen på det syntetiske peptid bevirker frembringelsen af fragmenter mærket med den elektrokemiluminescerende gruppe. Efter et passende tidsrum kan den fremstillede prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling ved direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er i stand til at inducere den elektrokemiluminescerende gruppe til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling. Udsendt stråling kan kvantificeres, og mængden af tilstedeværende streptokokker i prøven kan bestemmes herud fra.

EKSEMPEL 20

Enzymimmunoforsøg for hepaitis B overfladeantigen baseret på elektrokemiluminescens.

En blodprøve indeholdende hepatitis B overfladeantigen (HBsag) bringes i passende tidsrum i kontakt med et antistof specifikt for HBsag og mærkes med dextranase. Ikkebundet antistof til HBsag fjernes, og antigen-antistofkomplekset bringes i kontakt med en dextratpolymer mærket med elektrokemiluminescerende gruppe. Indvirkning af

dextranasen på de mærkede polymere vil bevirke frembringelse af fragmenter, der hver især er mærket med den elektrokemiliuminescerende gruppe. Efter passende tidsrum kan den fremstillede prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling ved direkte udsættelse for en elektrokemisk energikilde, der er i stand til at inducere den elektrokemiluminescerende gruppe til varigt at udsende elektromagnetisk stråling. Udsendt stråling kan kvantificeres, og mængden af hepatitis B overfladeantigen tilstede i prøven bestemmes herudfra.

EKSEMPEL 21

Homogen undersøgelse for bradykininreceptorer under anvendelse af en elektrokemiluminescerende-mærket bradykinin.

En vævsprøve indeholdende bradykininreceptorer præpareres på passende måde og bringes i kontakt med bradykinin mærket med en elektrokemiluminescerende gruppe. Efter et passende tidsrum kan den fremstillede prøve induceres til varigt at udsende elektromagnetisk stråling ved direkte eksponering for en elektrokemins energikilde, der er i stand til at inducere den elektrokemiluminescerende gruppe til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling. Udsendt stråling kan kvantificeres, og mængden af bradykininreceptor tilstede i prøven bestemmes herudfra. Dette forsøg kan også anvendes til at måle andre ligandreceptorgensidig indvirkninger som f.eks. østrogen-østrogenreceptor. Herudover kan denne undersøgelse anvendes til at bestemme og kvantificere mængden af umærkede ligander ved nvendelse af en kompetitiv bindingsforsøgsmetode.

EKSEMPEL 22

Anvendelse af en elektrokemiliminescerende gruppe til at afsløre nucleinsyrehybrider.

En prøve indeholdende nucleinsyre hybrider som f.eks. dobbeltstrenget DNA, DNA-RNA dubeltter eller dobbeltstrenget RNA bringes i kontakt med en elektrokemiluminescerende gruppe, der specielt kiler sig ind i nucleinsyrehybrider. Efter passende tisdrum kan den fremstillede prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling ved direkte eksponering for en elektrokemisk energikilde, der er i stand til at inducere den elektrokemiluninescerende gruppe til varigt at udsende elektromagnetisk stråling. Udsendt stråling kan kvantificeres, og mængden af nucleinsyrehybrider, der findes i prøven, bestemmes herudfra.

EKSEMPEL 23

Afsløring af humant T-celleleukemivirus III (HTLV-III) antigen kompleksbundet til antistof i spyt ved hjælp af et homogent immunoforsøg under anvendelse af elektrokemiluminescens.

En spytprøve indeholdende HTLV-III kompleksbundet til antistof bringes i kontakt med en opløsning indeholdende et kaotopisk middel for at itubryde antigen- antistofkomplekset. Denne opløsning bringes herefter i kontakt med et antistof specifikt for HTLV-III og mærket med elektrokemiluminescerende gruppe. Det kaotopiske middel fjernes, hvilke muliggør at de mærkede og umærkede antistoffer kan rekombinere med antigen. Efter passende tidsrum kan den fremstillede prøve induceres til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling ved direkte eksponering for en elektrokemisk energikilde, der er i

stand til at inducere den elektrokemiluminescerende gruppe til vedvarende at udsende elektromagnetisk stråling. Udsendt stråling kan kvantificeres, og mængden af human T-celleleukemivirus III (HTLV-III) antigen tilstede i prøven kan bestemmes herudfra. Disse metoder kan også anvendes til prøver indeholdende andre typer antigen-antistofkomplekser som f.eks. hepatitis antigen- antistofkomplekser, cytomegolavirus-antistofkomplekser og non-A, non-B hepatitis-antistofkomplekser i serum.

EKSEMPEL 24

Immunoforsøg til afsløring og identificering af en hel række stafylokok enterotoxiner.

Monoklonale antistoffer specifikke for hver af stafylokokenterotoxinerne A, B, C ,D og E og monoklonale antistoffer, der er krydsreaktive med disse enterotoxiner, blev renset. Hver antistof rensedes fra askities væske ved passage af askitesvæsken gennem en søjle af stafylokokprotien A koblet til en agarosegels understøttelsesmatrix, der er udstyret med bindings-eluerings og regenerationspuffere som del af det monoklonale antistofrensningssystem (Bid-Rad Laboratories, Inc.). Ved rensningsmetoden forfiltreredes to ml askitesvæske typisk indeholdende 5-15 ml monoklonalt antistof pr. ml ved at anbringe et Metricell membranfilter (Gelman Sciences, Inc.) mellem to F-13 analytiske papirer (Schleicher and Schuell, Inc.) i bunden af en 10 ml injektionssprøjte (Becton Dickenson, Inc.) indføre askitesvæsken i injektionsnålen, indsætte stemplet og filtrere askitesvæsken over i en opsamlingsbeholder. Filtratet blandedes med lige rumfang af bindingspufferen og påførtes en 5 ml protein A agarosesøjle. Søjlereagensreservoiret fyldets herefter med bindingspufferen for at påbegynde elueringen. Elueringen kontrolleredes for absorbans ved 280 nm

(A_{280}), og der opsamledes 1 ml fraktioner. Når A_{280} var nået tilbage til en stabil basislinieværdi, vaskedes søjlen med 5 lejerumfang bindingspuffer, og elueringspufferen anvendtes herefter til at eluere det rensede immunoglobulin fra søjlen. For at neutralisere immunoglobulin opsamledes elutatet i 0,3 ml 1 M Tris-HCL, pH 9,0. Når A_{280} atter var vendt tilbage til en stabil basislinieværdi vaskedes søjlen med 5 lejerumfang elueringspuffer, efterfulgt af 10 lejerumfang regenerationspuffer og 5 lejerumfang bindingspuffer, således at søjlen var parat til næste rensningscyklus.

Fraktionerne indeholdende det rensede immunoglobulin blev slået sammen og koncentreret under anvendelse af en omrørt ultrafiltreringscelle (Amicon Corp.) Slutkoncentrationen af renset monoglobulin var mere end 5 mg/ml bestemt ved hjælp af Lowry forsøgsmetoden for total protein. Det rensede antistof dialyseredes over for to udskiftninger af phosphat-pufferet saltvand (PBS) indeholdende 0,1 % natriumazid i 48 timer ved 4 °C.

De rensede monoklonale antistofferf titreredes i et 96-brønds mikrotiterplade ELISA system til opnåelse af et mål for deres immunologiske reaktivitet for specifik enterotoxin. Slutpunkt titrene for de antistoffer, der blev opnået, blev sammenlignet med referencetiterværdier for tidligere undersøgte prøver af hver antistof. Antistoffer med tilstrækkeligt titer blev accepteret som immunologisk funktionelt beklædende antistoffer til immobilisering til en dianogstisk reagensholder f.eks. en dyppestav eller til konjugation til et enzym til anvendelse som prober ved immunoforsøg.

Det diagnostiske reagensholdesystem (dyppestave) med nitrocellulosemembraner fastgjort præpareredes til immobilisering af antistoffer til membranoverfladen ved først

at dybbe membranerne i phosphatpufferet saltvand i 1 time ved stuetemperatur for at forbedre membranens opfugtelighed. Staven fjernes fra opløsningen, og man lod membranen lufttørre. Opløsninger af rensede monoklonale antistoffer, der hver var specifikke for en af stafylokokenterotoxinerne A, B, C, D, eller E og en ikke-specifik kontrol muse-immuno-globulin (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) påførtes forskellige områder af membranen ved at anbringe 2 mikroliter antistofopløsning direkte på membranoverfladen. Koncentrationen af hver anvendt antistof var en sådan, der var kendt for at mætte bindingspladserne fra nitrocellucose: 250 mikrogram/ml 3A antistof (specifikt for A toxin), 50 mikro gram/ml 2B antistof (specifikt for B toxin), 300 mikrogram/ml 1C3 antistof (specifikt for C1, C2, og C3 toxiner), 200 mikrogram/ml 3D antistof (specifikt for D toxin), 250 mikrogram/ml 4E antistof (specifikt for E toxin) og 200 mikrogram/ml ikke-specifikt kontrol museimmunoglobulin. Dyppestavene lufttørredes ved stuetemperatur, og de tilbageblevne proteinbindingspladser påmembranen blokeredes ved neddypning af stavene i en opløsning af phosphatpufferet saltvand indeholdende 0,5 % Tween 20 og 3 % bovint serum albumin. Efter inkubation natten over ved stuetemperatur i denne blokerende opløsning lufttørredes stavene.

Rensede monoklonale antistoffer 2A (specifik for A og E toxiner), 6B (specifik for B, C1, og C3 toxiner), og 1D (specifik for D toxin) lænkedes kovalent til enzymalkalisk phosphortase til anvendelse som konjugerede prober for at bestemme tilstedeværelsen af A, B, C1, C2, C3, D og E toxiner bundet til antistoffer immobiliseret på membranoverfladen af den diagnostiske reagensholdige dyppestav. Hvert konjugat fremstilledes ved hjælp af en støkiometrisk kontorlleret totrinsmetode, der anvender glutaraldehyd som det bifunktionelle tværbindingsmiddel.

Ved denne metode sattes 0,47 ml EIA grad alkalisk phosphatase (2500 enh./mg, Boehringer Mannheim Corp.) til 1,5 ml. 50 mM kalium phosphatpuffer pH 7,2 indeholdende 13,4 mikroliter vandig glutaradehydopløsning (25 %, Sigma Chemical Co.). Blandingen omrørtes i 90 minutter ved stuetemperatur for at muliggøre fastgørelse af glutaraldehyd til fri aminogrupper fra enzymmolekylet. Efter denne inkubation sattes en 2 ml prøve af renset monoklonalt antistof i en koncentration på 1 mg/ml til, blandingen omrørtes yderligere 90 minutter og anbragtes på is for at afbryde konjugationsreaktionen. Konjugatet dialyseredes over for 2 udskiftninger phosphatpufferet saltvand indeholdende 0,1 % natriumazid i 48 timer ved 4 °C. Bovint serumalbumin tilsattes dialysatet til slutkoncentrationen på 3 % for at stabilisere under den langvarige lagring ved 4 °C. antistof-enzymkonjugaterne titreredes i et 96-brønds mikrotiterplade ELISA system til opnåese af et mål for deres immunologiske reaktivitet for specifikt enterotoxin. De opnåede slutpunktstiterværditer for konjugaterne sammelignedes med referencetiterværdier for forud undersøgte prøver af hver konjugat. Konjugater med tilstrækkeligt titer accepteredes til anvendelse som prober ved dyppestavforsøg for stafylokokinterotoxiner.

Faste fødevarer såsom skinke, pølse, nudler og ost, der er repræsentanter for fødevaretyper der sædvanligvis assoieseres med udbrud af stafylokokfødevareforgiftning, omdannedes til en homogen væskesuspension for at udføre forsøget for undersøgelse for stafolykokenterotoxiner. I et typisk ekstraktion tilsattes 20 ml vand til 20 g fødevarer, og blandingen homogeniseredes i 30 sekunder under anvendelse af en laboratorieblender (Tekmar Co.) Til mere viscose fødevarer anvendtes 2 gange dette rumfang vand.

Stafylokokenterotoxin sattes til fødevaren enten før eller efter homogenisering. Fødevarehomogenatet undersøgtes

direkte under anvendese af den diagnostiske reagensdyppestav beskrevet ovenfor. Positive resultater blev opnået med de fødevareprøver, hvortil lave niveauer af enterotoxin sattes. Yderligere extraktionstrin blev udført på fødevarehomogenaterne for at forbedre følsomheden for stafylokokenterotoxinafsløring. Homogenatet justeres typisk til pH 4,5 med 6 N HCl og centrifugeret i 20 minutter ved 20.000 x g, og den supernatante del indstilledes til pH 7,5 med 5 N NaOH, centrifugeredes atter 20 minutter ved 20.000 x g, og den supernatante del anvendtes direkte ved dyppestavsforsøget. Fødevareextrakter præpareret på denne måde, havde en følsomhed for enterotoxinafsløring på 1 nanogram pr. milliliter af extrakten for hver afprøvede toxin i fødevaren.

Flydende fødevarer såsom mælk undersøgtes direkte ved at neddyppe den diagnostiske dyppestav i den flydende fødevare og foretage forsøg på samme måde som for de faste fødevarehomogenater. Ved at undersøge disse fødevare bestemtes det også, at følsomheden kan forbedres til 1 nanogram pr. milliliter ved at udføre de yderligere ovenfor beskrevne extraktionstrin.

Diagnostiske reagensholdere (dyppestave) udstyret med en nitrocellulosemembran, der bærer monoklonale antistoffer specifikke for de enkelte stafylokokenterotoxiner neddyppedes i et reagensglas indeholdende 1 ml flydende fødevarer, fødevarehomogenat eller fødevareekstrakt fremstillet som beskrevet ovenfor, eller 1 ml PBS. hver af disse opløsninger indeholdt 1 ng/ml af et tilsat stafylokokenterotoxin eller en blanding af enterotoxiner hver med en koncentration på 1 ng/ml. Dyppestaven forblev neddyppet i disse prøveopløsninger i 1 time ved stuetemperatur under omrystning på en roterende omryster. Stavene fjernedes herefter fra prøverne og vaskedes under omrystning i 5 minutter i PBS med 0,5 % Tween 20,

herefter 2 gange yderligere under omrystning i PBS alene, 5 minutter pr. afvaskning. En blanding af monoklonale antistof-alkaliske phophatasekonjugater præpareret som beskrevet fremstilledes på følgende måde: 1:1000 fortyndinger af 2A konjugat (specifikt for A og E toxiner), 6B konjugat (specifikt for D, C1, C,2 og C3 toxiner) og 1D konjugat (specifikt for D toxin) fremstilledes i den samme opløsning (30 mikroliter af hver konjugat i 30 ml PBS indeholdende 0,5 % Tween 20 og 3 % BSA). Stavene neddyppedes i denne konjugatblanding, 2 ml pr. stav, og inkuberedes i 30 minutter ved stuemperatur under omrystning. Stavene vaskedes 2 gange i PBS-Tween, herefter 3 gange under omrystning i PBS, 5 minutter pr. vask, for at fjerne ubundet monoklonalt antistof/alkalisk phosphatasekonjugat fra membranoverfladen.

Efter at have fjernet ubundet monoklonalt antistof-enzymkonjugat fra den diagnostiske reagensdyppestav påviste tilstedeværelsen af bundet konjugat ved at neddyppe staven i en opløsning af 5-brom-4-chlor indolyl phosphat (BCIP, Sigma Chemical Co.) og nitroblå tetrazolium (NBT, Sigma Chemical Co.). BCIP og NBT opløsningerne fremstilledes hver for sig på følgende måde: 3,2 ml BCIP opløses i 10 ml 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5 nM $MgCl_2$ og 8,8 NBT opløstes i 10 ml af samme opløsning. Disse opløsninger blandedes umiddelbart inden anvendelsen. Stavene neddyppedes i substratblandingen i 30 minutter ved stuetemperatur under omrystning, herefter rensedes i vand og lufttørredes, hvilket gav en permanent aflæsning af forsøgsresultatet. Hele forsøgsmetoden kræver få til ingen afpipetteringstrin, minimal håndteringstid og kan udføres i løbet af omtrent 2 timer. Substratet for enzymkonjugatet BCIP hydrolyseredes med konjugatet bundet til toxinet på membranen til opnåelse af et reaktionsprodukt, der reducerer NBT til et uopløseligt blåt produkt, der binder til membranen på staven. Tilstedeværelsen af

stafylokonenterotoxin i prøven, der var bundet med det immobiliserede første monoklonale antistof på membranen og afsløret ved binding af det andet monoklonale antistof-enzymkonjugat indiceredes ved tilstedeværelsen af en blå plet på nitrocellulosemembranen. Når der ikke fandtes stasfylokokenterotoxin i prøven, forblev nitrocellulosemembranen hvid. Området af membranen, hvortil kontrol muse-immunoglobulin var immobiliseret, forblev i hvert tilfælde hvid. Identifikation af det specielle stafylokokenterotoxin, der forefandtes, d.v.s. A, B, C, D eller E indiceredes ved tilstedeværelsen af en blå plet på det afgrænsede og identificerbare område af membranen, hvortil det monoklonale antistof specifikt for dette toxin var immobiliseret. Denne metode, der anvender en diagnostisk reagensdyppestav, er i stand til at afsløre 1 nanogram pr. milliliter af en eller flere stafylokokenterotoxiner i en flydende fødevare, i fødevarehomogenat eller et fødevareekstrakt.

EKSEMPEL 25

Enzymimmunoforsøg (EIA) for coliforme bakterier.

Forsøg blev udført for at sammenligen aflæsningseffektiviteten for fækale coliformeer for at smmenligne den omhandlede fremgangsmåde (CAP-EIA MPN) og EPA godkendt MPN konfirmeret metode under anvendelse af EC bullion ved 44,5 °C.

Forsøgene udførtes som et standard 5-reagensglas MPN forsøg med følgende modifikationer. I stedet for laurylsulfattryptose (LST; Difco Labs, Detroit, MI) bullion eller lactosebullion (Difco Labs, Detroit, MI) anvendtes phenolrødt lactosebullion (PRLB; Difco Labs, Detroit, MI) indeholdende 80 mikrogram/ml 4-methylumbelliferon glucuronid (MUG; sigma Chemical Co., St. Louis, MO) som det

sandsynlige substrat. PRLB anvendtes, fordi Phenolrødtfarven muliggør afsløring af syreproduktion ved forgæring af lactose. Gas, der udvikles ved lactoseforgæring, indesluttedes af de omvendet Durham glas, der var anbragt inden i hver af reagensglassene. MUG var tilsat som en mulighed for at tilvejebringe en foreløbig bekræftelse for tilstedeværelsen af E. coli. E. coli, den vigtigste fækale coliforme er den eneste organisme, der findes i vand, der kan spalte MUG under frigørelse af en fluorogen gruppe, der kan ses under UV lus (4, 10).

CAP-EIA MPN forsøgsmetoden gav 3 typer resultater: 1) syre og gasproduktion ved forgæring af lactose (foreløbig coliformanalyse); 2) fluorescens fra spaltning af MUG (foreløbig bekræftelse for E. coli eller fækale coliforme) og 3) CAP-enzym immunoforsøgsbekræftelse (bekræftende undersøgelse baseret på monoklonale antistoffer). Disse resultater efter MUG og CAP-EIA reaktioner blev herefter sammenlignet med resultater opnået ved hjælp af standardmetoder (1) baseret på lactoseforgæring ved forhøjet temperatur ved 44,5 °C i EC bullion (Difco Labs, Detroit, MI).

Forsøget udførtes på følgende måde: for at få tre 10-fold fortyndingsrækker, som er nødvendige til et MPN forsøg, indsamledes følgende rumfang vand fra en nærliggende bæk, der anvendte til at inokulere prøveglassene indeholdende 10 ml PRLB-MUG og udstyret med en polystyren brønd inden i hætten.

Række A - 5 prøveglas, 1,00 ml inokulum
Række B - 5 prøveglas, 1,10 ml inokulum
Række C - 5 prøveglas, 0,01 ml inokulum

Alle prøveglassene inkuberedes natten over i omtrent 18-20 timer ved 35 °C.

Den følgende dag undersøgtes alle glassene for syre- og gasproduktion såvel som for fluorescens under UV lys. Alle prøveglassene viste uklarhed (vækst) uafhængig af syre- eller gasreaktionerne og vendtes om for at lade celle-substratsuspensionen fylde polystyrenbrønden inden i hætten. De omvendte prøveglas anbragtes 1 time ved 35 °C for at muliggøre bakterier (antigen) i at klæbe til polystyren hætte-brøndene. De antigenbundne hætte-brønde fjernedes herefter fra prøveglassene for at foretsætte med antistofbaserede bekræftende forsøg.

For at udføre EIA (enzymimmunoforsøg) delen af undersøgelsen behandledes brøndene i 30 minutter ved 35 °C med en opløsning af 3 % bovint serumalbumin (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i phosphatpufferet satvand (PBS; NaCl, 8,5 g: Na_2HPO_4, 1,02 g: $NaH_2PO_4.H_2O$, 0,386 g: destilleret vand, 1000 ml, pH 7,2) for at blokere eventuelle uvundne pladser på polystyrenen. Herefter afdekanteredes BSA opløsningen, brøndene vaskedes 2 gange med PBS, herefter tilsattes 50 mikroliter af en hybridomacellesubernatant, der indeholdt monoklonale antistoffer rettet mod E. coliceller til hver brønd, og der indkuberedes 1 time ved 35 °C for at muliggøre at antistoffet kunne reager med de specifikke antigener (E. coliceller) bundet til polystyrenen. Efter afdekantering af antistofsupernatantdelen fjernedes spor af eventuelt ubundet antistof ved at vaske brøndene 3 gange under anvendelse af en PBS-Tween 20 opløsning (PBS + 0,05 % Tween 20, J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ). Et affinitets-renset alkalisk phosphortase-mærket gede-antistof over for muse-IgG (konjugat; KPL, Gaithersburg, MD) fortyndedes 1:1000 i PBS, og 50 mikroliterprøver blev sat til hver brønd. Efter 1 times inkubation ved 35 °C fjernedes eventuelt ubundet konjugat i brøndene ved 4 gange afvask med PBS-Tween 20 opløsning. Det alkaliske

phosphatasesubstrat anvendt til afsløring var natri-umpara-nitrophenylphosphat eller Sigma-104 substrat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), fremstillet i en slutkoncentration på 1 mg/ml i 10 % diethanol-aminpuffer (diethanolamin, 97 ml;NaN_3. 0,2 g; $MgCl_26H2O$, 100 mg og destilleret vand, 800 ml, pH 9,8). Substratet indsattes i 100 miokroliterprøver pr. brønd, hvorefter der inkuberedes 30 minutter ved 35 °C, hvorved reaktionen i brøndene kunne ses visuelt. For at kvantificere overførtes i dette eksempel den omsatte substratopløsningtil en mikrotiterplade og bestemtes instrumentalt ved hjælp af Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Mcleans, VA) udstyret med et 405 nm filter.

For at udføre almindelige bekræftende forsøg for fækale coliforme under anvendele af EC bullion (Difco Labs, Detroit, MI) overførtes aseptisk en øsefuld af væksten fra hver af de over natten dyrkede PRLB dyrkninger til et reagensglas indeholdende 10 ml EC boullion og udstyredes med et omvendt Durham glas. Herefter inkuberedes 24-48 timer ved 44,5 °C, således som specificeret i standardmetoder (1), hvorefter der undersøgtes for lactoseforgæring (indesluttet gas i Durham-massen). Eventuelle spor af gasbobler inden i glassene blev betragtet som positiv reaktion.

De opsummerede resultater for hvert forsøg er angivet i tabel XII og tabel XIII. Resultaterne af forsøg 1 viser, at baseret på gasproduktion ud fra lactose, fås en positiv kombination af 551, der ifølge den statistiske MPN tabel er 35 coliforme/ml (foreløbig undersøgelse). Blandt de gaspositive (+) prøveglas, var kun 4 (A2-A5) positive ved MUG forsøget, og de indeholder derfor sandsynligvis E. coli (foreløbig bekræftelse for E. coli eller fækale coliforme). Blandt de bekræftende resultater viste almindelig EC undersøgelse 5 rør (A1-A5) sig at være

positive for fækale coliforme, medens kun 4 prøveglas viste positiv reaktivitet ved CAP-EIA metoden. De positive EIA aflæsninger lå fra 0,55 indtil 1,06 med den negative reaktion omkring 0,20. De positive EIA resultater er kraftigt understøttet af de positive MUG resultater, på den måde at begge disse forsøg indicerer tilstedeværelsen af fækalecoliforme i de samme prøveglas, A2-A5. Den kendsgerning, at prøveglas A1 var negativ ved MUG og EIA, men positiv ved EC, var ikke overraskende, fordi forekomsten af falske (+) og falske (-) reaktioner, der almindeligt ses ved de almindelige MPN metoder (15, 16, 20). Selektiviteten af EC substratet sammen med de forhøjede inkubationstemperaturer er velkendt for at påvirke genfindelsen af fækale coliformer. Ca. 7 % af de fækale coliforme (E. coli) vil yderligere ikke frembringe gas på EC (falske negativer), og 8 % af ikke-fækale coliformer har vist sig at være i stand til at vokse og frembringe gas i EC boullion (falske positive). EC reaktionen observeret i rør A1 kan derfor være en falsk positiv reaktion, der vil være en forklaring for dens uoverensstemmelse med MUG og EIA resultaterne for rør A1. Med hensyn til de andre prøveglas (B1-B5, C1-C5) i samme forsøg observeredes glimrende korrealation mellem alle forsøgene. Ved andre ord, prøveglas der var MUG (-) var også EC (-) og EIA (-), hvilket bekræfter fravær af fækale coliforme disse prøveglas.

I forsøg 2 var den anvendte vandprøve, der skulle bruges til inokulering af prøveglassene, kraftigere kontramineret, fordi alle sandlynlige rør var positive for glasproduktion. Baseret på den statistiske MPN tabel vil en positiv kombination af 5 5 5 indicere tilstedeværelsen af mere end 240 coliforme/ml. Ved sammenligning opnåedes ved det bekræftende forsøg glimrende korrealition mellem MUGA, EC og antistofbaseret EIA. Hver prøveglas, der viste fluorescens (MUG +) var også positiv ved EC samt ved

EIA. EIA reaktionerne lå fra ganske svagt positive aflæsninger på 0,46 (B2) til meget kraftige reaktioner på 2,15 observeret på C4.

Resultaterne af disse to forsøg viser, at den omhandlede antistofbaserede CAP-EIA undersøgelsesmetode er så effektiv som det EPA anerkendte EC forsøg til at bekræfte tilstedeværelsen af fækale coliformer. Yderligere som vist i tilfælde med prøveglas A1 i forsøg 1, viste CAP-EIA forsøget en mindre tendens til at blive falske positive eller negtive reaktioner på grund af antistof-antigen-reaktionernes specifikke art. Yderligere frembryder CAP-EIA metoden adskillige klare fordele i forhold til den almindelige MPN undersøgelsesmetode, nemlig: 1) enkelhed, både ved det foreløbige og det bekræftende forsøg, der kan foretages under anvendelse under det samme prøveglas uden behov for yderligere overførsler eller substrat; 2) hastigheden, CAP-EIA undersøgelsen kan udføres i en tredjedel til 1/2 af den tid, der er nødvendig for et anmindeligt forsøg; og 3) specificiteten, antistofferne er højt specifikke for deres antigene targets.

Disse fordele plus det enestående hætte-brønd design af CAP-EIA, der kan give 4 adskilte resultater (syre, gas, fluorescens og EIA) fra samme prøveglas gør metoden til et særdeles udmærket alternativ til den almindelige MPN undersøgelsesmetode til analysering af coliforme og fækale coliforme i vand og/eller fødevareprøver.

Metoden med at udføre EIA i et prøveglas eller reagensglashætte indeholdende et polystyrenindskud er ikke begrænset til coliforme elkker fækale coliforme undersøgelser, men kan lige så vil anvendes til afsløring af andre bakterier.

EKSEMPEL 26

Fremstilling af 2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-propyl]-1,3-dioxolan.

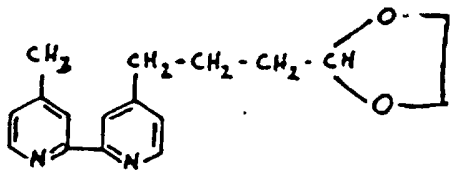
I en inert atmofære af argon sattes 30 ml tørt tetrahydrofuran (THF), og 7,65 ml tør diisopropylamin (54,6 mmol) til en trehalset, 600 ml kolbe ved hjælp af en en injektionssprøjte under omrøring. Opløsningen afkøledes til -78 °C ved at neddyppe kolben i en blanding af tør is-isopropanol i et lavt bæger. 21,6 ml 2,5 Mn-butyllithium (54 mmol) sattes langsomt til kolben. Den fremstillede opløsning omrørtes 15 minutter, og en opløsning af 9,58 g 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridin (52 mmol) opløst i 300 ml tør THF tildryppedes ved hjælp af en kanyle under omrøring i løbet af en time.

Den fremstillede brune blanding opmrørtes yderligere ved -78 °C i 2 timer, 10 g 2-(2-bromethyl)-1,3-diosylan (55 mmol) tilsattes via en injektionssprøjte, og den fremstillede blanding omrørtes ved -78 °C i 5 minutter. Reaktionsbeholderen anbragtes herefter i et isbad (10 °C) og efter 30 minutters forløb begyndte farveforandring (efter 1 times forløb var farven mørk violet; efter 2 timer var farven blå; efter 2,5 timers forløb var farven grøn; og efter 3,25 timer var farven citrongul).

Reaktionsblandingen frakøledes med 30 ml mættet NaNl efterfulgt af 10 ml vand og 50 ml ether. Den vandige fase ekstrahederes 2 gange med 300 ml ether, og de kombinerede etherfaser blev ekstraheret igen med 100 ml vand og tørret over vandfrit natriumsulfat.

For at rense reaktionsproduktet adskiltes prøven på aluminiumoxid (Merck) 90, aktivitet III, neutral. De anvendte elueringsmidler var petroleumsether/diethylether

(2:1) efterfulgt af petroleumsether/diethylether (1:1) (udgangsmaterialer elueret fuldstændigt med petroleumsether/diethylether (2:1) efterfulgt af slutproduktet). Proton MNR analye bekræftede, at opbyning af det isolerede reaktionsprodukt er



EKSEMPEL 27

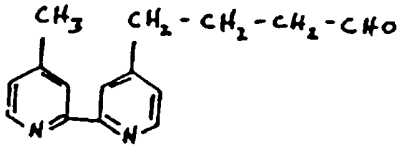
Fremstilling og rensning af 4-(butan-1-al)-4'-methyl-2,2'bipyridin.

2 g 2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-propyl]-1,3 dioxolan opløses i 50 ml 1N HCL og opvarmes 2 timer ved 50 °C. Opløsningen afkøledes, indstilledes til mellem pH 7 og 8 med natrium bicarbonat og ekstraheredes 2 gange med 100 ml chloroform.

De forenede chloroformfaser blev vasket med en ringe mængde vand, der tørret over natriumsulfat, filtreredes og inddampedes på roterende inddamper til opnåelse af en gul olie.

Den gule olie rensedes på en silicagelsøjle under anvendelse af ethylacetat/toluen (1:1) som elueringsmiddel, idet urenheden blev elueret med methanol.

Protonanalyse [δ1,96-2,11 (m,2H); 2,43 (s,3H);2,46-2,50) (t,2H); 2,53-2,80 (m,2H); 7,12-7,14 (m,2H); 8,17-8,21 (br. s,2H); 8,52-8,58 (m,2H); 9,89 (s,1H)] bekræftede, at opbygningen af reaktionsproduktet er

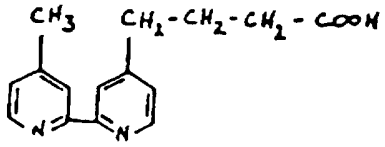


EKSEMPEL 28

Fremstilling af 4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)smørsyre.

0,5 g 4-(butan-1-al)-4'methyl-2,2'bipyridin (2,0 mmol) opløstes i 10 ml absolut acetone. 225 mg fint pulveriseret kaliumpermanganat ($KMnO_4$; 1,42 mmol) sattes portionsvis til opløsningen under omrøring. Omsætningen fulgtes ved hjælp af et tyndt lag chromatografi (siliciumoxid; ethylacetat/toluen 50:50) der viste, at medens aldehydet gradvist forsvandt, dannedes en bipyridin med lavt R_f.

Efter at omsætningen var afsluttet tilsattes vand, og MnO_2 frafiltreredes og der vaskedes med en ringe mængde Na_2CO_3(aq.). Acetonen fjernedes på en roterende inddamper og remanensen extraheredes med CH_2Cl_2 for at fjerne ikkesure bipyridiner. Den vandige opløsning indstilledes til sur reaktion ved forsigtig tilsætning af 1,0 N HCl til pH 4,8. Opløsningen blev delvis uklar, når man nåede denne pH-værdi, og suspensionen opløstes atter ved lavere pH. Blandingen extraheredes 5 gange med lige rumfang CH_2Cl_2, tørret over Na_2SO_4 og inddampet på en roterende inddamper til en olie, der straks størknede i vakuum. Det urensede faste stof omkrystalliseredes med chloroform: petroleumsether, hvorved der opnåedes hvide krysteller med smeltepunkt 103,5 °C - 105,5 °C; IR: 1704 cm^{-1}, proton NMR analyse var i overensstemmelse med følgende opbygning:



EKSEMPEL 29

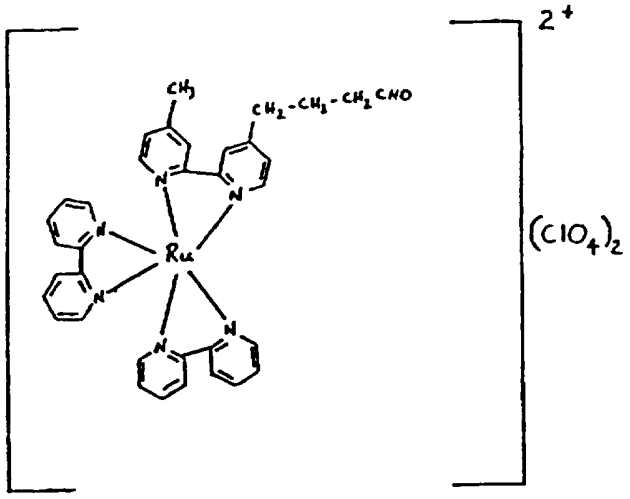
Fremstilling af bis(2,2'bipyridin)[4-(butan-1-al)-4'-methyl-2,2'-bipyridin] ruthenium (II) diperchlorat: Forbindelse I.

250 mg ruthenium bipyridyldichloriddihydrat (0,48 mmol) (Strem) i 50 ml ethylen glycol opvarmedes hurtigt til kogning og anbragtes herefter i et siliconeoliebad (130 °C. Til den fremstillede purpur-orange opløsning sattes 150 mg 2-[3-(-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)propyl]-1,3-dioxolan (0,53 mmol) i 10 ml ethylenglycol. Den fremstillede orangefarvede opløsning omrørtes 30 minutter ved 130 °C, afkøledes til stuetemperatur og fortyndedes 1:1 med destilleret vand.

En koncentreret opløsning af natrium perchlorat i vand sattes til opløsningen, hvorved der dannedes et meget finkornet orange bundfald. Blandingen afkøledes natten over, filtreres og bundfaldet vaskedes med vand.

Bundfaldet opløstes i varmt vand, og der omkrystallisere des ved tilsætning af perchlorsyre til frembringelse af klar orange krysteller, der herefter filtreredes, vaskedes med koldt vand og tørredes. Opkrystallisationen blev gentaget, hvorved der opnåedes 150 mg klart orange krystaller.

NMR analyse angav følgende opbygning



I den foreliggende beskrivelse med krav omtales ovennævnte forbindelse som forbindelse I.

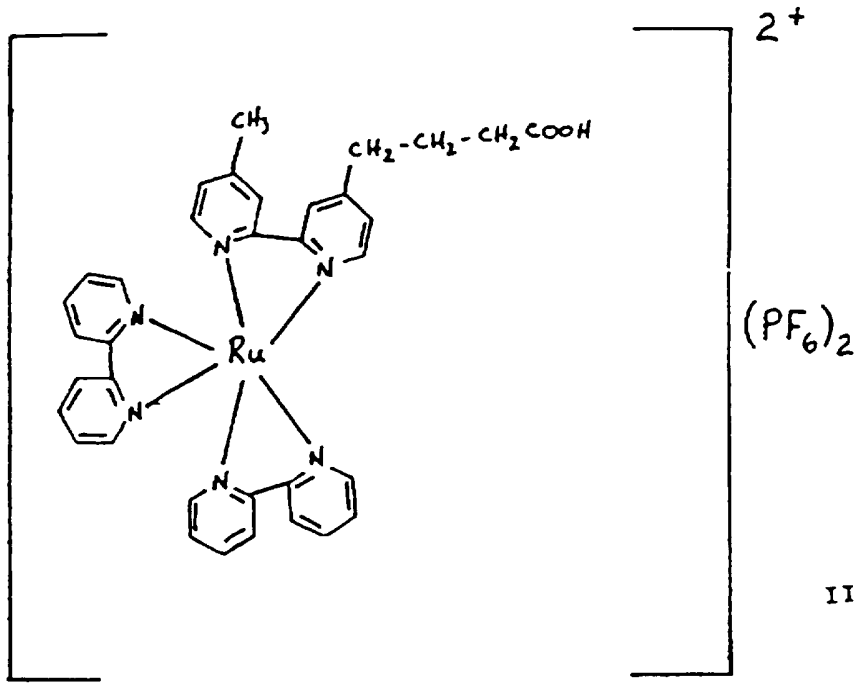
EKSEMPEL 30

Fremstilling af bis(2,2'-bipyridin)[4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-smørsyre] ruthenium (II) dihexafluorphosphat: Forbindelse II.

134 mg 4-(4-methyl-2,2'-bibyridin-4'-yl)smørsyre (0,52 mmol) opløstes i 50 ml vand. Opløsningen afgassedes med argon, og 250 mg ruthenium bipyridyodichloriddihydrat (Strem) (0,48 mmol) tilsattes. Blandingen opvarmedes under argon med tilbagesvaling i 4 timer. Vandet fjernedes ved afdampning på roterende inddamper, og remenesensen opløstes i mindst mulig mængde vand og anbragtes på en Sephadex SP-25- ionbyttersøjle. Efter eluering af urenheder med vand elueredes forbindelsen som et rødt bånd med 0,2 M NaCl opløsning, og forbindelsen isoleredes som hexafluorphosphatet ved tilsætning af en mættet vandig opløsning af NH_4PF_6. Den urensede forbindelse genudfældedes 2 gange med varm acetone med diethylether.

Analyse: Beregnet; C, 43,80 %; H, 3,36 %; N, 8,76 %.
Fundet; C, 43,82 %; H, 3,54 %; N, 8.55 %.

Proton NMR analyse var i overensstemmelse med følgende opbygning



II

EKSEMPEL 31

Fremstilling af N-[4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-butyl]-pthalimid.

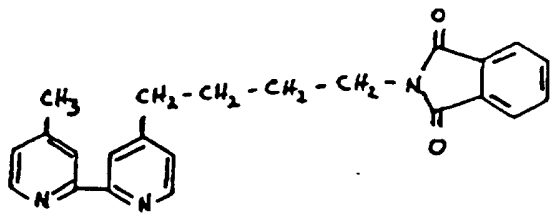
I en inert atmosfære af argon sattes 30 ml tørt tetrahydrofuran (THF) og 7,65 ml tør diisopropylamin (54,6 mmol) til en trehalset, 600 ml kolbe ved hjælp af en injektionssprøjte under omrøring. Opløsningen afkøledes til -78 °C ved at neddyppe kolben i en blanding af tør is-isopropanol i et lavt bæger. 21,6 ml 2,5 N-butyllithium (54 mmol) sattes langsomt til kolben. Den fremstillede opløsning omrørtes 15 minutter, og en opløsning af 9,58 g 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridin (52 mmol) opløst i 300 ml tør THF tildryppedes via injektionssprøjte i løbet af 1 time under omrøring.

Den fremstillede brune blanding omrørtes yderligere ved -78 °C i 2 timer, der tilsttes hurtigt 100 g 1,3-dibrompropan (0,495 mol), og den fremstillede blanding omrørtes i 1 time ved -78 °C. Herefter omrørtes blandingen yderligere 2 timer ved stuetemperatur. Blandingens farve forandredes fra brun til blå til gul. Det meste af opløsningsmidlet fjernedes ved afdampning på roterende inddamper, og 200 ml vand tilsattes, hvorved der dannedes 2 faser. Koncentreret HCl tilsattes for at sænke pH til 0. Det organiske lag bortkastedes. Det vandige lag vaskedes 2 gange med 100 ml ether. pH hævedes til mellem 1 og 2. Der udskilte en rød olie, og der extraheredes med CH_2Cl_2. Efter tørring og opløsning med vandfrit Na_2CPO_3, afdampedes det meste CH_2Cl_2 på roterende inddamper, og prøven anbragtes på en silicagelsøjle. Prøven elueredes med chloroform, hvorved der opnåedes en lysegul olie, der udkrystalliseredes efter afkøling natten over (12,37 g).

4 g af den urensede 4-(4-brombutyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridin (13,3 mmol) fremstillet på denne måde sattes herefter til en suspension af 2,46 g caliumphthalimid (13,3 mmol) i 60 ml dimethylformamid (DMF). Herefter omrørtes blandingen ved omtrent 50 °C i to timer. 90 ml $CHCl_3$ sattes til blandingen, hvorefter der tilsattes 125 ml vand. $CHCl_3$ laget fraskiltes, og det vandige lag extraheredes 2 gange med 50 ml chloroform. De forenede $CHCl_3$ lag vaskedes med 50 ml H_2O, der tørredes over vandfrit Na_2SO_4og inddampedes på roterende inddamper, hvorved der opnåedes en svagt orangefarvede olie, der størknede ved henstand natten over. Den urensede forbindelse omkrystalliseredes med acetone/ethanol, hvorved der opnåedes 2,21 g (44,5 %) hvide krystaller med (smeltepunkt 114,5-117,8 °C).

Analyse: Beregnet; C, 74,38 %; H, 5,70 %; N, 11,31 %.
Fundet; C, 73,98 %; H, 6,14 %; N, 11,28 %.

Ir: Phthalimidcarbonyl-strækning 1771 og 1704 cm^{-1}. Proton NMR analyse viste aromatisk resonans (δ 7,75-7,85, m, 4H) ud over de sædvanlige bipyridylderivatsignaler. Disse resultater er i overensstemmelse med følgende opbygning



EKSEMPEL 32

Fremstilling af theopyllin-8-smørsyre-[4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-butyl]amid: Forbindelse III.

370 mg (1 mmol) N-[4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-butyl]-phthalimid opslemmedes i 100 ml ethanol, der behandledes med hydrazinhydrat (720 mg, 1,4 mmol), omrørtes og opvarmedes 4 timer ved tilbagesvaling, i løbet af hvilket tidsrum alt det faste materiale opløstes. Mod afslutningen af reaktionen begyndte et hvidt bundfald at dannes.

Under afkøling indstilledes reaktionsblandingen til basisreaktion med 50 % NaOh, og herefter udhældes i 100 ml vand. Der opnåedes en opløsning, Na_2CO_3 tilsattes for at udsalte forbindelsen som en olie. Aminen extraherede under anvendelse af tre 40 ml portioner CH_2Cl_2. Extrakterne tørredes med $CaSO_4$, filtreredes og inddampedes, hvorved aminobipyridinderivatet opnåedes som en farveløs olie (udbytte = 0,135 g; 56 %).

1,34 g (5,6 mmol) 4-[4-(1-aminobutyl)]4'-methyl-2,2'-bipyridin og theopyllin-8-smørsyre (1,18 g; 4,4 mmol)

opløstes ved stuetemperatur i 10 ml tør pyridin. Til opløsningen sattes 1,16 g (5,6 mmol) diclychlohexylcarbodiimid. Der omrørtes natten over ved stuetemperatur. Tyndtlagschromatografi på alluminiumoxid (mobil fase = 15 % methanol/chloroform) afslørede en enkel produktplet med en R_f på 0,68. Det udfældede dicyclohexylures fjernedes ved filtrering, og pyridinen afstrippedes til opnåelse af et fast stof, der findeltes i ether og filtreredes (udbytte = 2,13 g; 99 %).

EKSEMPEL 33

Fremstilling af bis-(2,2'-bipyridin)[theopyllin-8-smørsyre-4-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)-butylamid] ruthenium (II) dichlorid: Ru (II)-forbindelse III konjugat.

Til en blanding af 154 mg (0,296 mmol) bis-)2,2'-bipyridin) ruthenium (II) dichlorid dihydrat og 175 mg (0,357 mmol) af forbindelse (III) beskrevet ovenfor sattes 40 ml ethanol/vand (1:1, rumfang/rumfang). Denne blanding blev argonafgasset i mørke i 15 minutter og opvarmet med tilbagesvaling i mørke under argon i 3 timer til fremstilling af en klar, kirsebærrød opløsning. Den fremstillede klare kirsebærrøde opløsning henstod for at afkøle til stuetemperatur, og opløsningsmidlet afstrippedes under anvendelse af en roterende inddamper, idet opløsningen forblev i mørke ved en temperatur på mindre end eller lig med 37 °C.

Den fremstillede remanens opløstes i ca. 1-3 ml methanol, påførtes en Sephadex LH-20 chromatografisk søjle, (75 cm x 3 cm) og elueredes med en gennemstrømningshastighed på ca. 0,4-0,7 ml/min. Et klart rødt bånd (forbindelsen) blev tæt fulgt af et brunt, ikke-luminiscerende bånd (urenhed) og toluminiscerende bånd. Det røde produktbånd viste sig at være kontamineret med en ringe mængde af

materiale fra det brune, ikke-luminiscerende bånd. Det kontaminerende materiale adskiltes fra slutproduktet ved at køre prøven på en anden Sehadex LH-20 søjle under ligende betingelser.

Det røde fremstillede produkt opnåedes ved at afstrippe opløsningsmidlet ved roterende inddampning. Det fremkomne faste materiale opløstes i ca. 1 ml methanol og genudfældedes i ca. 75 ml diethylether til opnåelse af et orangefarvet pulver, der frafiltreredes.

Analyse: Beregnet; C, 54,51 %; H, 5,72 %; N, 13,99 %; O, 10,47 %; cl, 6,44 %.

Fundet; C, 55,04 %; H, 6,35 %; N, 13,18 %; 0, 10,62 %; cl, 6,68 %.

EKSEMPEL 34

Modulering af elektrokemiluminescenssignal frembragt af Ru (II)-forbindelse (III) konjugat under anvendelse af antistoffer specifikke for theophyllin.

Ru(II)-forbindelse (III) konjugatet beskrevet i eksempel 33 fortyndedes til en slutkoncentration på 150 nM under anvendelse af 0,1 M phosphatpuffer, pH 6,0 indeholdende 0,35 M natriumfluorid (PBF puffer). Monoklonalt antistof (klon nr. 9,49, ascitesprøve nr. WO 399, katalog nr. 046) specifikt for theophyllin indkøbtes fra Kallestad Laboratories, Inc. (Chaska, MN). Det monoklonale antistof fortyndedes til forskellige koncentrationer under anvendelse af PBF puffer (mellem 21,9 mikrogram protein/ml til 700 mikrogram/ml).

Et andet monoklonalt antistof (kontrol MAB) der ikke var reaktivt med theophyllin indkøbtes fra Sigma (St. Louis, MO) og fortyndedes til forskellige koncentrationer mellem 21,9 mikrogram protein/ml til 700 mikrogram/ml under an-

vendelse af PBF puffer. En standardopløsning af theophyllin fremstilledes under anvendesle af theophyllin leveret af Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI, katalog nr. 26-140-8, molvægt 180,17). Theophyllin opløstes i PBF puffer til en slutkoncentration på 75 mikromolær og fortyndedes med PBF puffer til 6 mikromolær til anvendelse ved analysen. Inden man målte elektrokemiluminescensen tilsattes en opløsning indeholdende 250 mM oxalsyre og 5 rumfang/rumfang-% Triton-X 100 (ECL opløsning) til reaktionsblandingen. Målingerne blev foretaget med et Berthold luminometer, mer var mdificeret for at muliggøre anbringelsen af to platingazeelektroder i forsøgsglasset indeholdende reaktionsopløsningen. Elektroderne var forbundet til en potentiostat, og elektrokemiluminescensmålinger blev foretaget ved at føre et påtrykt potentiale over elektroderne fra 1,5-2,5 volt med en scanningshastighed på 50 mV/sek. Det anvendte Berthold luminometer til målingerne havde et højforstærknings, rødtfølsomt fotoforstærkerrør. Luminumetereffekten til recorderen justeredes til 10^5 tællinger/ volt. Målingerne registreredes på en X-Y-Y' recorder, og tophøjden anvendes som måling på elektrokemiluminescens. Elektroderne rensedes mellem målingerne ved at afrense med en puffer med pH 4,2 indeholdende 0,1 M phosphat, 0,1 M citrat, 0,025 oxalsyre, og 1 % Triton X- 100; pulsere elektroderne i denne opløsning mellem +2,2 til -2,2 volt i 60 sekunder, hvorefter man behandlede med +2,2 volt i 10 sekunder. Herefter fjernedes elektroderne fra opløsningen, afrensedes i destilleret vand og blev tørret. Forsøget udførtes som vist i tabel XIV.

En opløsning af kontrol monoklonale antistoffer, antistoffer over for theophyllin eller PBF puffer sattes til et sæt forsøgsrør (trin 1). Til rørene sattes theophyllin eller PBF puffer (trin 2). Opløsningerne blev kort blandet ved at ryste reagensglassene og lade reagere 25

minutter ved stuetemperatur. Herefter sattes en opløsning af Ru(II)-forbindelse (III) konjugat til rørene (trin 3). Reagensglassene rystedes og henstod ved stuetemperatur i 15 minutter. Til sidst sattes 100 mikroliter ECL opløsning til hvert rør, og elektrokemiluminescensen måltes som beskrevet ovenfor. Resultaterne er angivet i tabel XV.

Tabel XIV

Eksperimentel opbygning til undersøgelse af virkningen af antistof-Ru(II)-forbindelse (III) konjugatindvirkninger på elektrokemiluminescens.

Trin 1 100 mikroliter af:	Trin 2 200 mikroliter af:	Trin 3 100 mikroliter af:
A. Kontrol monoklonalt antistof (2,19 mikrogram til 70 mikrogram)	Puffer	Ru(II)-forbindelse III konjugat
eller		
B. Anti-theopyllin antistof (2,19 mikrogram til 70 mikrogram)	Puffer eller theopyllin	Ru(II)-forbindelse III konjugat
eller		
C. PBF puffer	Puffer	Ru(III)-forbindelse III konjugat eller puffer

Tabel XV

Virkning af antistof og theophyllin på elektroluminescens af Ru(II)-forbindelse (III) konjugat

Antostof protein koncentration mikrogram/rør	Kontrol MAB + Ru(II) forbindelse III	Anti-theopyllin MAB + Ru(II)-forbindelse III	Anti-theopyllin MAB + theopyllin Ru(II)-forbindelse III
		Luminescensmåling	
2,19	55.000	40.000	43.000
	55.000	41.000	57.000
4,38	57.000	22.500	37.000
	57.000	25.000	36.000
8,75	53.000	20.000	33.500
	50.000	22.000	30.500
35,0	43.000	13.500	17.500
	41.000	14.000	16.000
70,0	42.000	11.000	11.000
	37.500	12.000	12.500

Elektrokemiluminescensen af dobbelte prøver måltes som beskrevet ovenfor. Elektrokemiluminescensen af Ru(II)-forbindelse III konjugat anvendt i ovennævnte undersøgelse var 57.200, når der måltes i puffer uden tilsætning af antistof. Baggrunden for pufferblandingen var 5750.

Resultaterne viser, at et monoklonalt antistof, der specifikt genkender theophyllin, dersom det bringes i kontakt med en analog af theophyllin, hvortil en ruthenium-forbindelse er knyttet f.eks. Ru(II)-forbindelse III vil bevirke nedgang i elektrokemiluminescensen. Nedgangen

i elektrokemiluminescens er proportional med antistofkoncentrationen, dersom Ru(II)-forbindelse III konjugatkoncentrationen holdes konstant. Dersom et antistof anvendes, der ikke reagerer med theophyllin, ses kun en ringe nedgang i elektrokemiluminescensen ved den højeste koncentration af antistof.

Resultaterne viser også, at dersom theophyllin bringes i kontakt med anti-theophyllin-antistof og herefter Ru(II)-forbindelse III konjugatet sættes til denne blanding, er størrelsen af elektrokemiluminescens større. Dette viser, at theophyllin konkurrere med binding af antistof til Ru(II)-forbindelse III konjugat hvilket bevirker en større mængde Ru(II)-forbindelse III konjugat, der kan frembringe elektrokemiluminescens.

EKSEMPEL 35

Analyse af theopyllin i serum baseret på et homogent elektrokemiluminescens immunoforsøg.

Baseret på resultaterne beskrevet i eksempel 34 udvikledes et homogent immunoforsøg for theophyllin under anvendelse af antistof over for theophyllin og Ru(II)-forbindelse III konjugatet beskrevet i eksempel 33 i et kompetitivt bindingsforsøg. De anvendte materialer var som beskrevet i eksempel 34, bortset fra at PBF puffere var 0,1 M phosphatpuffer, pH 6,0 indeholdende 0,1 M natriumchlorid. Til denne analyse udvalgtes en særlig koncentration af monoklonalt antistof overfor theophyllin. Antistofkoncentrationen var 55 mikrogram/ml. Ru(II)-forbindelser III konjugatkoncentrationen indstilledes til 175 nM. Theophylin sattes til humant serum til opnåelse af slutkoncentrationer på 2,5, 5, 10, 20 og 40 mikrogram theophyllin/ml serum. Analysen udførtes ved at sætte 10 mikroliter serum til 290 mikroliter anti/theophyllin mo-

noklonalt antistof og holde opløsningen ved stuetemeratur i 25 minutter. Herefter sattes 100 mikroliter Ru(II)-forbindelse III konjugat til hvert rør til opnåelse af en slutkoncentration på 35 nM, og herefter holdt man denne opløsning ved stuetemperatur 1 15 minutter. Dernæst tilsattes 100 mikroliter ECL opløsning beskrevet i eksempel 34 til hvert rør, og opløsningernes elektrokemiluminescensegenskaber måltes som beskrevet tidligere under anvendelse af en trimmebølge på 1,5 volt til 2,5 volt ved 50 mV/sek. Resultaterne er angivet i figur 2 og viser, at der er en korrelation mellem koncentrationen af theophyllin i en serumprøve og mængden af elektrokemiluminescens udsendt af reaktionsblandingen. Denne observation viser, at det er muligt at udvikle en analysemetode for theophyllin.

Baseret på disse resultater kan fagmanden udvikle et homogent elektrokemiluminescens immunoforsøg til afsløring og kvantificering af en særlig analyt i et biologisk materiale.

EKSEMPEL 36

Analyse af theophyllin i hæmolyseret, lipeide, ikteriske og normale serumprøver baseret på en homogen elektrokemiluminiscens immunoanalyse og sammenligning med en fluorescenspolariseringsanalyse.

Koncentrationen af theophyllin i forskellige serumprøver bestemtes under anvendelse af en homonogen elektrokemiluminescens immunoanalysemetode. Opbygningen af forsøget var et kompetitivt bindingsforsøg under anvendelse af et monoklonalt antistof specifikt for theophyllin og Ru(II)-forbindelse III konjugatet beskrevet i eksempel 33. Reagenser og metoder til frembringelse af elektrokemiluminescens er som beskrevet i det tidligere eksempel.

Fluorescenspolariseringsanalysen anvendt til at måle koncentration af theophyllin i forskellige serumprøver udførtes under anvendelse af et automatisk TDX instrument fra Abbott Laboratories (North Chicago, IL). Hæmolyserede, lipæmiske, ikteriske og normale sera undersøgtes ved analyserne, og resultaterfne for anormale sera er angivet i tabel XVI nedenfor.

Tabel XVI

Homogent theophylinanalysemetode, egenskaber ved potentielt problematiske sera.

Serum	Faktorkon-koncentration	Normalt område
Hæmolyseret	12,4 mg/dl hæmoglobin	0-3,2 mg/dl
Lipæmisk	405 mg/dl triglycerider	10-190 mg/dl
	196 mg/dl cholesterol	120-200 mg/dl
Ikterisk	10 mg/dl bilirubin	0-1,5 mg/dl

Forskellige mængder theophyllin sattes til serumprøverne til slutkoncentrationer på mellem 2,5 mikrogram theophyllin/ml og 40 mikrogram theophyllin/ml. Resultaterne af det homogene elektrokemiluminescens immunoforsøg er angivet i figur 3. Hver serumprøve analyseres også for koncentration af theophylin ved hjælp af en fluorescenspolariseringsanalysemetode. Koncentrationen af theophyllin målt ved hjælp af det homogene elektrokemiluminescens immunoforsøg og ved fluorescenspolariseringsanalysemetoden sammenlignedes. Resultaterne blev afsat som en spredning og er vist i figurerne 4A-D. Punkterne for resultaterne

analyseredes ved hjælp af lineær regression og korrelationskoefficienterne beregnedes. Analysen viser en glimrende korrealation mellem de to analysemetoder. Korrelationskoefficienterne (r) var mellem 0,98 og 1,00. Hældningerne på kurverne får normale, hæmolyserede og lipæmiske serumprøver var mellem 0,8 og 1,2 , hvilket viste glimrende genfindelse af theophyllin fra disse serumprøver.

Skønt elektrokemiluminescensen udsendt af de ikteriske (gulsotholdige) serumprøver indeholdende theophylin var større end for de andre serumprøver, var den proportional højere ved hver theophyllinkoncentration. Dette fremgår af figur 4D. Korrealationskoefficienten er 1,00 for punkterne når man sammenligner elektrokemiluminescens og fluorescenspolarisering; imedlertid er hældningen 2,14, hviket viser højere genfindelse for theophyllin i den ikteriske serumprøve.

Baseret på disse resultater kan koncentrationen af theophyllin i en ekterisk prøve bestemmes ved at optegne en standardkurve for prøven ved at tilsætte kendte mængder Ru(II)-forbindelsekonjugat til prøver af den ikteriske serum. Disse resultater viser, at et homogent elektrokemiluminescens immunoundersøgelsesmetode kan anvendes til at måle koncentrationen af theophyllin tilstede i serumprøver indeholdende unormale niveauer af hæmoglobin, lipider og bilirubin.

En homogen elektrokemiluminescens immunoundersøgelsesmetode frembyder fordelse i forhold til en fluorescenspolariseringsmetode på grund af alsidigheden ved ECL detektion, f.eks. mere følsom detektion ved højere koncentrationer af biologike molekyler.

Et homogent elektrokemiluminescens imunoforsøg frembyder yderligere fordele i forhold til en fluorescenspolariseringsmetode fordi ingen indfaldende lyskilde er nødvendig; Elektrisk stimulering er det eneste krav til effektiv lysfrembringelse. Som en følge heraf er der ikke behov for speciel optik. Da målingsprincippet er rent specifikt photonemmision induceret ved elektrokemisk stimulering, er systemets følsomhed potentiel betydeligt større end fluorescenspolarisering og større dynamisk område er opnåeligt. Måling af en betydelig større mængde forskellige analyter er også mulig med en homogen elektrokemiluminescens immunoforsøgsmetode end hvad der opnås ved fluorescenspolariseringsmetoden på grund af den selektive modulering af elektrisk stimuleret kemiluminescens af biobolekylære genkendelsestildragelser som f.eks. den gensidige indvirkning mellem antistof-antigen.

Baseret på disse resultater vil fagmanden vide, at homogene elektrokemiluminescens immunoanalysemetoder til at afsløre andre analyter i anormale serumprøver er mulige at udvikle.

EKSEMPEL 37

Undersøgeslse for theophyllin i serumbaseret på en homogen elektrokemiluminescens immunoalalysemetode og sammenligning med en højtryksvæskechromatografisk (HPLC) metode.

Forskellige mængder theophyllin sattes til humane serumprøver til opnåelse af slutkoncentrationer mellem 2,5 mikrogram theophyllin/ml og 40 mikrogram theophyllin/ml. Hver prøve opdeltes herefter i 2 prøver, og koncentrationen af theopyllin i prøven bestemtes ved hjælp af en homogen elektrokemiluminescens immunoanalysemetode og sammenlignedes med de opnåede resultater for samme serum-

prøver under anvendelse af en HPLC metode. Af det homogene elektrokemiluminescens immunoforsøg var et kompetitivt bindings forsøg under anvendelse af et monoklonalt antistof specifikt for theophyllin og Ru(II)-forbindelse III konjugatet. Reagenserne og metoderne ved denne analysemetode er som beskrevet i det tidligere eksempel. Den anvendte HPLC metode til at måle koncentrationen af theophyllin i forskellige serumprøver er beskrevet nedenfor.

Theophyllin (1,3-dimethylxanthin) hældes fra serumproteiner ved udfældning af sidstnævnte med acetonitril. Den supernatante væske indeholdende theophyllin blev kørt pået HPLC system udstyret med en Waters Associates Micro Bondapak C18 søjle, (3,9 mm x 30 cm). Chromatogrammet var fuldstændig opløst i mindre tid end 10 minutter.

Følgende reagenser anvendtes: Natriumacetat (reagensgrad), afioniseret vand (renset ved hjælp af Millipore Milli Q· system), acetonitril (HPLC grad) og theyphyllin standard (Sigma). Opløsningmidlet anvendt til udfældning af serumproteinerne var en 20 mM natriumacetatpuffer, pH 4,0 indeholdende 14 rumfang/rumfang-% acetonitril. Den HPLC mobile fasepuffer var 10 mM natriumacetatpuffer, pH 4,0 indeholdende 7 rumfang/rumfang-% acetinitril. Strømningshastigheden var 1,5 ml/min., og eluanten kontrolleredes ved hjælp af et UV spektrometer ved 270 nm. Følsomheden af UVf absorbantdetektoren var sat til 0,02 absorbansenhed fuld udslag (AUFS). Stuetemperaturen lå typisk mellem 22 og 24 °C.

Resultaterne af den homogene elektrokemiluminescerende immunoanalyse og HPLC anaysen til bestemmelse af koncentrationen af theophyllin i serum er angivet i figur 5. Resultaterne blev anbragt som punkter, og disse punkter analyseredes ved hjælp af lineær regression. Korrela-

tionskoefficienten beregnedes. Korrelationskoefficienten (r) var 0,98, hvilket viser glimrende korrelation mellem de to undersøgelsesmetoder.

Hældningen på kurven var 1,197, hvilket viser glimrende genfindelse af theophyllinet fra serumprøven ved den homogene elektrokemiluminescerende immunoanaysemetode i forhold til standardmetoden baseret på HPLC. Den homogene elektrokemilumimescensanalysemetode frembyder fordele i forhold til HPLC metoden, fordi den er hurtig, følsom, og man let kan håndtere flere prøver. Baseret på disse resultater vil fagmanden erkende, at homogene elektrokemiluminescens immunoanalysemetoder til afsløring af særlige analyter, der kan afsløres ved hjælp af HPLC og lignende metoder kan udvikles.

EKSEMPEL 38

Fremstilling af theophyllin-bovint serumalbumin konjugater.

Theophyllin bovint serumalbumin (BSA) konjugater fremstilledes ud fra theophyllin-3-methyl-smørsyre, theophyllin-8-smørsyre og theophyllin-7-eddikesyre på følgende måde. 50 mg BSA opløstes i 1,5 ml 0,15 M $NaHCO_3$, pH 9,0. For sig tilsattes 16 mg ethyl-3'3-dimethylaminopropylcarbodiimidhydrochlorid (EDCl), 11 mgf N-hydroxysuccinimid (NHS) og enten 17, 8 mg theophyllin-7-eddikesyre, 20 mg theophyllin-8-smørsyre eller 20.9 mg theophyllin-3-methylsmørsyre oplyst i dimethylsulfoxid, og opløsningen opvarmedes 1-2 timer ved 45 °C. Opløsningen sattes dråbevist til BSA opløsningen og reagerede 1 time. Theophyllin konjugater af BSA rensedes ved gelfiltreringschromatografi på en Sephades G-25 søje (1,6 cm x 38 cm) under anvendelse af 0,15 M PBS/0,1 % azid, pH 7,4

som den mobile fase og en strømningshastighed på 30 ml/time.

EKSEMPEL 39

Fremstilling af theophyllin-BSA biomag· partikler.

4 ml rumfang af Biomag·-aminpartikler (Advanced Magnetis, Inc., Cambridge, MA) vaskedes 2-3 gange i separate T-kolber med phosphatpufferet saltvand (Sigma) (PBS), pH 7,4 indeholdende 0,008 % Nonidet P-40 (NP-40).j Til den våde Biomag· kage sattes 10 ml 5 % glutaraldehyd (Sigma) i PBS, og aktiveringen skred fremad i løbet af 3 timer under anvendelse af en roterende blander. De aktiverede Biomag· partikler vaskedes som beskrevet ovenfor til et totalantal på 4 afvaskninger og overførdtes til en T-kolbe.

6,8 mg theopyllin-BSA fremstillet som beskrevet i eksempel 38 i 10 ml PBS/NP-40 sattes til den aktiverede våde kage af Biomag·. Der omsattes natten over ved 4 °C under blading.

Den våde kage af aktiveret Biomag· vaskedes 3 gange med 20 ml 1 % BSA/0,15 M PBS/0,1 % azid (pH 7,4) idet den første afvaskning varede omtrent 30 minutter under anvendelse af en roterende blander.

EKSEMPEL 40

Fremstilling af forbindelse I-anti-theophyllin konjugat.

1,1 ml af et muse-anti-theophylin monoklonalt antistof (Kallestad, fremstillings nr. W0399; 4,6 mg/ml) centrifugeredes ved 10.000 g i 8 minutter. Pufferen ombyttedes med 0,2 $NaHCO_3$, 0,15 M NaCl, med azid pH 9,0 under anven-

delse af en Amicon Centricon· 30 koncentrator (centrifugeret ved 3000 x g). Antistofopløsningen fortyndedes til 2 ml, og 3,2 mg forbindelse I tilsattes. Der omsattes i 2 timer ved stuetemperatur under omrøring og 79 mikroliter vandig $NaBH_4$ i en mængde på 1 mg/ml tilsattes, og opløsningen omrørtes 30 minutter.

Den fremstillede opløsning anbragtes på en Sephadex G-25 søjle (1,0 cm x 18,0 cm) forudbragt i ligevægt med tris puffer, og der elueredes med en hastighed på 15 ml/time. Fraktionerne indeholdende forbindelse I-anti-theophyllin konjugatet bev slået sammen, overført til dialyserør og dialyseret mod 0,15 M phosphat/0,15 M NaF (PBS) pH 6,9 (4 l).

EKSEMPEL 41

Analyse af theophylin i serum baseret på en heterogen elektrokemiluminescensanalysemetode.

Under anvendelse af en immunometrisk forsøgsopbygning udvikledes en heterogen analysemetode for theophytyllin under anvendelse af et I-mærket anti-theophyllin antistof og theophyllin BSA immobiliseret på Biomag· magnetiske partikler. Antistofkoncentrationen var 20 mikrogram/ml. Den magnetiske partikelkoncentration var en vægt/rumfang-% faste partikler. theopyllin tilsattes til en slutkoncentration op 10 og 40 mikrogram/ml serum. Theopyllin serumstandarderne fortyndedes 1000 gange i PBF puffer (natriumphosphat puffer, pH 7,0, 0,1 M natriumfluorid) indeholdende 0,1 % BSA.

Analysen udførtes ved tilsætning af 75 mikroliter af de fortyndede serumstandarder til 75 mikroliter antistof konjugeret til forbindelse I og indubere opløsningen 20 minutter ved stuetemperatur. Herefter tilsattes 50 mikro-

liter theophyllin-BSA-Biomag· partikler, og suspensionen henstod i 5 minutter. Partiklerne fraskiltes magnetisk, og 100 mikroliter af den supernatante del måltes for elektrokemiluminescens som beskrevet i eksempel 48.

Theopyllinkoncentration mikrogram/ml++	ECL*	SD	% CV
0	8,758	81	0.9 %
10	11,078	368	3,0 %
40	14,106	674	4,8 %

*ECL tællinger pr. 10 sekunder

++ korrigeret ved fortynding.

Baseret på disse resultater kan fagmanden udvikle en heterogen elektrokemiluminescens immunoundersøgelsesmetode for andre analyter af interesse i et biologisk materiale.

EKSEMPEL 42

Fremstilling af et forbindelse II-digoxigenin konjugat.

100,2 mg (0,104 mmol) forbindelse II, 41 mg (0,105 mmol) digoxigenin (Sigma) og 28 mg (0,136 mmol) 1,3-dicychlohexylcarbodiimid (DCC) sattes til en 50 ml rundbundet kolbe udstyret med en omrører. Til den fremstilede blanding satte 8-10 ml vandfrit pyridin (Aldrich Sure-Seal) under anvendelse af en injektionssprøjte med en 18 gauge nål. Kolben tilproppedes, forsegledes med Teflon tape, og indholdet omrørtes forsigtigt til opnåelse af en rød opløsning. Kolben henstod i mørke under omrøring i indelukke i 24 timer, på hvilket tidspunkt 6 mg (0,015 mmol) digoxigenin og 20 mg (0,097 mmol) DCC tilsattes. Opløsningen tilpropedes, to der omrørtes i mørke ved stuetemperatur. Den næste dag sås ingen dicyclohexylurinstof-

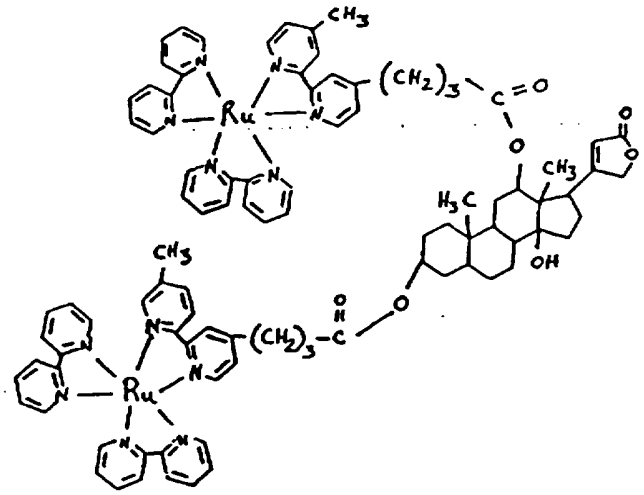
udfældning. Yderligere 18 mg (0,05 mmol) digoxigenin og 103 mg (0,50 mmol) DCC tilsattes. Kolben forseglede ater og omrøringen fortsatte i mørke. Efter 72 timers forløb tilsattes yderligere 103 mg DCC, og opløsningen omrørtes 3 timer i mørke.

5-10 dråber vand sattes til opløsningen, der herefter strippedes til tørhed på en roterende inddamper i mørke til frembringelse af et rødt fast stof.

Det fremkomne røde faste stof blev dækket med aluminiumfolie og tørret natten over i vacuum over $CaSO_4$ i en essikator. Det tørrede faste materiale opløstes herefter i 3-5 ml methanol, og omtrent 0,25 g vandfrit fast $LiClO_4$ tilsattes blandingen. Når $LiClO_4$ var opløst anbragtes opløsningen på en Sephadex LH-20 søjle (75 cm x 19 mm), og der elueredes med methanol med en strømningshastighed påmellem 7-10 sekunder/dråbe.

Der sås 3 bånd efterhånden som chromatografien skred frem; et svagt orange (rødtluminiscerende) første bånd (fraktion 1); et mørkerødt andet bånd, der repræsenterer hoveddelen af reaktionsproduktet (fraktion 2), og et tredje bånd, der fulgte efter de to første bånd (sandsynligvis uomsat udgangsmaterialed), der bortkastedes.

Fordi bånd 1 og 2 knapt var adskilte på søjlen isoleredes eventuelt orange produkt i bånd 2 ved at dyppe en methanolopløsning af fraktion 2 (15 ml) i omtrent 300 ml tør diethylether (omrørt). Det fremkomne bundfald frasugedes på et 15 ml medium glasfilter og vaskedes 5 gange med 15 ml diethylether. Den tilbageblevne ether fjernedes ved at tørre komplekset natten over over $CaSO_4$ i en vacuum esikator. Det faste materiale bestemtes til at være



EKSEMPEL 43

Elektorkemiluminescens (ECL) af forbindelse II-digoxigenin konjugat: Modulering af ECL signal ved hjælp af anti-digoxin antistof.

Monoklonalt antistof overfor digoxin fortyndedes til følgende koncentrationer i immunoførsøgspuffer:
1, 10, 50, 200 og 400 mikrogram/ml.

Forbindelse II-digoxigenin konjugat (50 mikromolær) fortyndedes til 150 nM i immunoforsøgspuffer (0,1 M phosphatpuffer, pH 6,0, indeholdende 0,1 M natrium fluorid).

Til 200 mikroliter immunoforsøgspuffer i polypropylenrør (12 mm x 75 mm) sattes 100 mikroliter af forskellige koncentrationer af digoxin antistof og 100 mikroliter forbindelse II-digoxigenin konjugat (150 nM). Rørerne blandedes på en hvirvelblander og inkuberedes 15 minutter ved stuetemperatur. Efter inkubation tilsattes 100 mikroliter

ECl opløsning (beskrevet ovenfor) og elektrokemiluminescensen måltes. Resultater:

Specifik antistof koncentration mikrogram/rør	$\bar{x}$ ECL signal
0,1	108000
1	114000
5	82500
10	64000
20	52000
40	36000

Totale ECL tællinger for 30 nM forbindeler II-digoxigenin konjugat = 113666 (tophøjde).

Ved en koncentration på 40 mikrogram/rør var ikke specifik antistofmodulering af signalet 67000 tællinger i forhold til 36000 tællinger i nærværelse af et specifikt antistof overfor digoxin.

Som det fremgår af figur 6 viste en stigende koncentration af anti-digoxin antistof, når der omsattes med en fast koncentration af forbindelse II-digoxigenin konjugat, stigende modulation af det elektrokemiluminescerende signal. Denne egenskab kan anvendes med fordel til at udvikle en homogen elektrokemiluninescensbaseret analysemetode til måling af digoxin i serum eller plasma.

EKSEMPEL 44

Homogen digoxinanalyse.

Baseret på resultaterne beskrevet i eksempel 43 kan en homogen elektrokemiluminescens immunoanalyse for digoxin udvikles under anvendele af antistof overfor digoxin og

forbindelse II-digoxigenin konjugat under anvendele af en kompetitiv bindingsforsøgsmetode. Reagenserne, der kan anvendes er beskrevet i eksempel 43. Til denne analyse udvælges en særlig koncentration af monokonalt antistof overfor digoxin. Antistofkoncentrationen kan være mellem 75-100 mikrogram pr. ml. Forbindelse II-digoxigenin konjugatkoncentrationerne kan være mellem 5-15 nM (slutkoncentration).

Digoxinstandard sættes til humant serum til opnåelse af en slutkoncentration på 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 8 og 16 nanogram digoxin pr. ml serum.

Analysen udføres ved at sætte 10-30 mikroliter serum til 300 mikroliter anti-digoxin monoklonalt antistof og hensætte opløsningen 30 minutter ved stuetemperatur. Herefter kan 100 mikroliter af forbindele II-digoxigenin konjugatet sættes til hvert rør til opnåelse af en slutkoncentration inden for området 5-15 nM, og opløsningen inkuberes 20 minutter ved stuetemperatur. 100 mikroliter af ECL opløsningen beskrevet ovenfor kan tilsættes hvert rør, og ECL kan måes som beskrevet tidligere.

EKSEMPEL 45

Fremstilling af Oubain-bovint serumalbunin konjugat.

50 mg ouain octahydrat (Aldrich) opløstes i 5 ml afioniseret H_2O. 81 mg $NaIO_4$ sattes til det opløste oubain, og blandingen inkuberedes 2 timer ved stuetemperatur. Reaktionen blev afbrudt ved at lede blandingen over en Dowex 1X-8 ionbytter harpikssøjle (5 ml), der var ækvilibreret med afioniseret vand intil pH var mellem 5 og 6. Den oxiderede oubainfraktion opsamledes, når dråber, der kom ind i affaldsbeholderen viste tegn på blanding.

100 mg krystallinsk lyophiliseret bovint serumalbumin (Sigma) (BSA) opløstes i 5 ml 0,1 M kaliumphosphatpufferet saltvand, pH 7,4 indeholdende 0,05 % azid. Den oxiderede oubainopløsning dryppedes til BSA opløsningen under omrøring. Den fremstillede opløsning omsattes 1 time ved stuetemperatur, inden der tilsattes 30 mg $NaCNBH_4$ (Aldrich). Opløsningen omrørtes herefter natten over ved stuetemperatur.

opløsningen koncentreredes (11 ml til 4 ml) under anvendelse af polyethylenglycol-8000, og fri oubain og overskud af borhydrid fjernedes fra opløsningen ved gelfiltrering på Sephadex G-25 (søjle = 0,6 cm x 37 cm; elueringsmiddel = 0,1 M K_2PO_4/0,15 M MaCl, pH 7,5 0,05 % NaN_3). Fraktionerne 11-17 blev slået sammen, og proteinkoncentrationen bestemtes ved at måle absorbans ved 280 nm (efter fortynding).

EKSEMPEL 46

Fremstilling af oubain-BSA-Sepharose.

2 g cyanbromid aktiveret Sepharose 4A (Pfharmacia) vaskedes med 400 ml 1 mM HCl i 50 ml protioner på en glasbrink med sinteret skive. Harpiksen vaskedes herefter med 20 ml 0,1 M $naHCO_3$, 0,5 M NaCl puffer, pH 9,0 (koblingspuffer). Efter overførsel af harpiksen til en polypropylenbeholder tilsattes 30 mg oubain-BSA opløst i 15 ml koblingspuffer. Den aktiverede harpiks henstod for at reagere med oubain-BSA i 2 timer under roterende blanding. De tilbageblevne aktive pladser omsattes med 7 ml 0,5 M ethanolamin (pH 8,0) i 2 timer ved stuetemperatur. Under anendelse af en tragt med sintret skive underkastedes harpiksen vask med 100 ml af hvert af følgende opløsninger: Koblingspuffer; 0,15 M PBS; 1 mM HCl; koblingspuffer; 0,2 % NP-40 i PBS og PBS. Harpiksen genopslemmedes til 11 mm, og en til-

strækkelig mængde af denne suspension sattes til en 1,0 cm indvendig diameter søjle (Pharmacia) til opnåelse af et totalt lejerumfang på 3,5 ml.

EKSEMPEL 47

Fremstilling og affinitetsrensning af et anti-digoxin-forbindelse I konjugat.

450 mikroliter af en 1 mg/ml stamopløsning af et muse-anti-digoxin monoklonalt antistof (Cambridge Medical Diagnostics, katalog nr. 200M-014, omstillings nr. MA 2507F) koncentreredes til 100 mikroliter under anvendelse af in amicon Centricon 30· koncentrerende enhed. Til dette koncentrat sattes 900 mikroliter 0,2 M natrium bicarbonatpuffer, pH 9,6 og 0,6 mg forbindelse I. Reaktionen (amidering) skred frem ved stuetemperatur i 2 timer inden 30 mikroliter 1,0 $NaBH_4$ (vandig) (Sigma) tilsattes. Den fremstillede opløsning henstod 1 time.

Overskud af forbindelse I og andre produkter adskiltes fra antistof konjugatet ved Sephadex G-25 chromatografi (søjle = 1,0 cm $_{ID}$ x 18 cm; elueringsmiddel = 0,1 M phosphatpufferet saltvand). Pøven fraktioneredes i 1 ml portioner med en strømningshastighed på 20 ml/time, og absorbansen ved 280 nm kontrolleredes ved 2,0 AUFS og 0,5 AUFS.

Fraktionerne 5, 6, 7 og 8 blev slået sammen, anbragt for en forudvasket oubain-BSA-Sepharoseaffinitetssøjle (3,5 ml søjle med 1 cm diameter) og elueret med en strømningshastighed på 15 ml/time. Efter at ikke tilbageholdt materiale var elueret hævedes strømningshastigheden til 30 ml/time, indtil der var opsamlet 20 ml eluat. Salt-

vandskoncentrationen af den mobile fase forøgedes til 0,5 M og yderligere 20 ml elueredes gennem søjlen.

Oubainspecifikt anti-digoxin-forbindelse I konjugat fjernedes ved tilsætning af 4 M og 6 M KSCN. Fraktioner svarende til anti-digoxin-forbindelse I konjugat blev slået sammen og dialyseret mod 10 mM phosphatpufferet saltvand (4 l; pH 7,4) efterfulgt af 0,1 M phosphatpuffer (4 l; pH 7,0)

EKSEMPEL 48

Heterogent elektrokimiluninescens immunoanalyse for digoxin.

10 mg fast digoxin opløstes i 10 ml DMSO:H_2O (8:2) til opnåelse af en digoxinkoncentration på 1 mg/ml (herefter stam standard).

Arbejdsstandarder blev fremstillet ud fra stamstandarden til følgende koncentrationer i 0,5 M phosphatpuffer, pH 7,0 indeholdende 0,12 % BSA og 0,15 M NaF (i det efterfølgende betegnet ECL puffer): 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 mg/ml. 5 ng/ml, og 0 ng/ml.

75 mikroliter anti-digoxin-forbindelse I konjugat (fortyndet 1:90) og 75 mikroliter af hver af standarderne pipetteredes i et glasrør, blandedes på et hvirvelapparat og inkuberedes 20 minutter ved stuetemperatur.

50 ml forudvasket oubain-BSA-biomag· partikler sattes til hvert rør, blandedes på nævnte apparater oginkuberedes 5 minutter ved stuetemperatur. Biomag· partiklerne fraskiltes, og den supernatante del overførtes til et separat rør.

100 mikroliter af den supernatante del blandedes med 400 mikroliter 0,125 M kaluimphosphat, 0,125 M citronsyre; 32 mM oxalsyre og 1,25 % Triton X-100 i et reagensglas.

Prøven anbragtes i et Berthold instrument, og elektrokemiluminescensen måltes som tidligere beskrevet, bortset fra at proceduren blev modificeret ved at trin-dele det påtrykte potentiale fra den åbne strømkreds til 2,2 V og integrere photontællingerne i 10 sekunder.

Elektroden rensedes mellem målingerne under anvendelse af phosphat-citrat puffer som følger:

(a) Elektroden pulseres under anvendelse af 3 sekunders intervaller svingende mellem -2,2 V og +2,2 V i 1 minut.

(b) Hvil elektroden ved +2,2 V i 10 sekunder.

(c) Skyl elektroden med afioniseret vand og tryk tør.

Resultaterne er angivet i figur 7.

EKSEMPEL 49

Mærkning af DNA med en elektrokemiluminescerende gruppe.

Følgende 2 metoder er blevet anvendt til at mærke DNA med en elektrokemiluminescerende gruppe.

Syntese A.

1,0 A_{260} af leverandørsyntetiseret 38 mer (MBI 38)

TCACCAATAAACCGCAAACACCATCCCGTCCTGCCAGT*

Hvor T* er thymidinmodificeret carbon 5 med

$-CH=CH-CO-NH-(CH_2)_7-NH_2$

opløstes i 100 mikroliter 0,01 M phosphatpuffer, pH 8,7. 100 mikroliter af en opløsning af bis(2,2'-bipyridin)[4-butan-1-al)-4'-methyl-2,2'-bipyridin]ruthenium (II) diperchlorat (forbindelse I) (2,3 mg i 300 mikroliter af 0,01 M kaliumphosphatpuffer, pH 8,7) tilsattes. Indholdet omrørtes og henstod natten over ved stuetemperatur.

100 mikroliter af en mættet vandig opløsning af natriumborhydrid sattes til blandingen for at omdanne den reversible imin Schiffske basebinding til ikke-reversibel aminbinding. Omsætningen fik lov at foregå ved stuetemperatur i 2 timer. Opløsningen behandledes forsigtigt med nogle få dråber fortyndet eddikesyre for at bratkøle overskud af natriumborhydrid. Reaktionsopløsningen anbragtes på en P-2gelfiltreringssøjle (18 inch x 1/2 inch), der forud var bragt i ligevægt med 0,1 M triethylammoniumacetat, pH 6,77. Søjlen elueredes med denne puffer, og 2 ml fraktioner opsamledes med en gennemstrømningshastighed på 20 ml/time. DNA eluerede i fraktioner 9 og 10 og var udmærket adskilt fra uomsat rutheniumbipyridylkompleks. Den opsamlede DNA prøve udviste typisk UV absorbtion og viste yderligere et fluorescensemmissionsspektrum ved 620 nm, når der magnitiseredes ved 450 nm. Fluorescensemmissionen viste tilstedeværelsen af rutheniumbipyridylgruppen i DNA prøven. Produktet går som et enkelt orangefluorescerende bånd ved polyacrylamid gelelektroforese. Den elektroforetiske mobilitet af det mærkede DNA (MBI 38-forbindelse I konjugat) er omtrent den samme som det umærkede DNA.

Syntese B.

Rutheniumkomplekset omdannedes først til et N-hydroxysuccinimid derivat ved at opløse 3 mg i 60 mikroliter vandfrit dimethylformamid og behandle med en opløsning af N-hydroxysuccinimid (52 mg) i 200 mikroliter vandfrit DMF i nærværelse af 94 mg dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Man lod reaktionen skride fremad ved 0 °C i 4 timer. Udfældet dicyclohexylurinsto fracentrifugeredes, og den supernatante del (200 mikroliter) sattes til oplsningen af amino-bundet DNA (beskrevet under syntese A) i 0,01 M phosphatpuffer pH 8,77 ($2A_{260}$ i 100 mikroliter puffer). Der omsattes natten over ved sturtemperatur. En betydelig mængde fast materiale kom til syne under omsætningen, der fjernedes ved filtrering gennem glasuld. Filtratet koncentreredes og opløstes i 0,5 ml 1 M triethylammoniumacetat (pH 6,8). Herefter chromatograferedes reaktionsblandingen som beskreved under syntese A. Det mærkede DNA viste alle spektrale og elektroforetiske egenskaber som omtalt for materialet fremstillet under syntese A.

EKSEMPEL 50

Elektrofrembragt kemiluminescensegenskaber ved mærket DNA.

Den mærkede DNA prøve f.eks. 49, syntese A (MBI 38 forbindelse I) anvendtes til at undersøge forbindelsens elektrokemiluminiscerende egenskaber. Forskellige koncentrationer af mærket DNA opløstes i 0,5 ml 01 M phosphatpuffer, pH 4,2 indeholdende 0,1 M citrat, 25 mM oxalat og 1,0 % Triton X-100, og der måltes på et modificeret Berthold luminometer. Figur 8 viser responsen af det elektrokemiluminescerende signal på forskellige DNA koncentrationer.

EKSEMPEL 51

Hybridiseringsundersøgelser af forbindelse I-mærket oligonucleotid.

Den komplementære strand til den 38 mer-forbindelse beskrevet i eksempel 50 syntetiseredes under anvendelse af ABI model 380B DNA syntisatoren og betegnedes MGEN-38.

For at bestemme om den kovalente fastgørelse af forbindelse I til oligonucleotidet påvirkede hybridiseringsegenskaberne af MBI 38 oligonucleotidet udførtes følgende forsøg. Forskellige koncentrationer af targetfragmentet (MGEN-38) blev anbrag som pletter på et lag Gelman RP nylonmembran, fixseret og afsøgt med probe med enten MBI 38 eller MBI 38-forbindelse I. Begge fragmenter behandledes med T4 poynucleotidkinase og gamma ^{32}P[ATP] og mærket med ^{32}P ved 5' enden. Hybridiseringsfølsomhederne af DNA og forbindelse I-mærket DNA sammenlignedes herefter.

Konsentrationen af MGEN-38 DNA, der lå fra 50 ng ned til 0,05 ng blev anbragt som pletter på en nylonmembran og lufttørret. Dobbelte membraner blev fremsillet. Pletterne blev behandlet i 2 minutter hver i: 1,5 M NaCl-0,5 M NaOH for fuldstændigt at denaturere DNA; 1,5 M, NaCl-0,5 M TRIS for at neutraliserer blotten og endelige i 2X SSC. Blotten blev bagt i vacuumovn ved 80 0 C i 2 timer.

Hybridiseringsproben blev fremstillet på følgende måde: 3 mikrogram MBI 38 og MBI 38-forbindelse I blev kinasebehandlet med 10 enheder T4 kinase og 125 mikrokurie af gamma ^{32}P-ATP. Procent isotopindarbejdelse i DNA blev bestemt og vist nedenfor.

MBI 38 totaltælling 4,1 x 10^5 cpm/mikroliter

Indarbejdede tællinger $3,1 \times 10^5$ cpm/mikroliter

% indarbejdelse = 75,6 %

MBI 38-forbindelse I
totaltælling $3,2 \times 10^6$ cpm/mikroliter

Indarbejdet tælling $2,6 \text{ c } 10^5$ cpm/mikroliter

% indarbejdelse 81,2 %

Præhybridiserings- og hybridiseringsopløsninger fremstilledes som beskrevet af Maniatis (24). Blots blev præhydriseret i 4 timer ved 53 °C med 50 mikrogram/ml kalvethymus DNA. Blottene blev herefter anbragt i hybridiseringsopløsning indeholdende de respektive prober ved 10.000.000 cpm. og henstod for at hybridisere natten over (12 timer) ved 53 0 C. Den følgende dag blev blottene vasket på følgende måde:

To gange med 2X SSC + 0,1 % SDS ved 53 °C i 15 minutter for hver afvaskning

to gange med 0,2 x SSC + 0,1 % SDS (som ovenfor)

to gange med 0,16 x SSC + 0,1 % SDS (som ovenfor).

Blottene lufttørredes herefter og exponeredes for Kodak X-omat· film ved -70 °C.

Analyse af røngtenbillede (se fig. 9) viste, at meget ens hybridiseringsmønster observeredes mellem MBI 38 og MBI 38-forbindelse I proben. I begge tilfælde observeredes hybridisering af proben til 0,5 ng af target, og svage spor af hybridisering observeredes ned til 0,05 ng af

target DNA. Der afsløredes ingen hybridiseringsaktivitet af proben for den negative kontrol DNA (fag lamba DNA anbragt i en koncentration på 50 ng).

EKSEMPEL 52

Forbindelse I-mærket DNA probe hybridiseringsspecificitetundersøgelse.

Genom DNA fra adskillige E. coli cg ikke-E. colistammer isoleredes som beskrevet af Maniatis (24). De anvendte organismer var:

E. coli stamme EC8 - naturligt isolat
E. coli stamme PclA - enteropatogenstamme
E. coli stamme 10HO7 - enterotoxigenstamme
E. coli stamme EC50 - anturligt isolat
E. coli stamme B - laboratoriestamme
E. coli stamme K12 - laboratoriestamme

Enterobacter aerogenes
Citrobacter freundii
Salmonella paratyphi B
Salmonella potsdam.

DNA fra ovennævnte stammer blev pletanbragt dobbelt i 3 mikrogramprøver på en Gelman RP nylonmembran og på en S & S nitrocellulosemembran. Som negativ kontrol pletanbragtes 50 ng fag lamda DNA. Positiv kontrol bestod af forskellige koncentrationer af den komplementære streng, MGEN-38, fra 50 ng ned til 0,5 ng. Blottene blev fremstillet og behandlet som beskrevet som i eksempel 51.

Probet DNA bestod af 3,0 mikrogram MBI 38-forbindelse I fragment, der var T4 kinasebehandlet ved 120 mikrokurie

gamma ^{32}P-ATP for at indarbejde radioaktivitet. Følgende mængde aktivitet indarbejdedes.

MBI 38-forbindelse totale tællinger - 3,35 x 10^6 cpm/mikroliter

indarbejdede tællinger - 1,50 x 10^6 cpm/mikroliter

% indarbejdelse - 44,7 %.

I dette forsøg anvendtes 2.600.000 cpm aktivitet som probeafsøgelse for hvert filter. Hybridiseringsopløsningerne, betingelserne, vaskeopløsningerne og forsøgsmetoderne var som beskrevet i eksempel 51.

Røntgenfilmen af blotten (fig. 10) viser, at både de positive og negative kontroller reagerede i overensstemmelse hermed. Der afsløredes ingen hybridiseringsaktivitet med lambda DNA (50 ng) og stærk hybridisering obserververedes ved den komplementære sekvens, MGEN-38, med til 0,5 ng koncentration. Disse fund er i fuldstændig overensstemmelse med resultaterne af sensitivitetsundersøgelsen.

EKSEMPEL 53

Forbindelse I mærkning af humant IgG.

2 ml humant IgG (2,5 mg/ml) dialyseredes mod 2 l 0,2 M natriumbicarbonatpuffer, pH 9,6, natten over ved 4 °C under sagte omrøring. Forbindelse I fremstilledes i et 100 mol overskud i forhold til tilstedeværende protein (2,7 mg/100 mikroliter dimethylformamid) og henstå for at oplyses. Det dialyserede protein tildryppedes tag-aldehydet under forsigtig omrøring ved stuetemperatur i 2 timer. 100 mol overskud (i forhold til protein) af natriumborhydrid (100 mikroliter af en 1,24 mg/ml opløsning i afioniseret vand) sattes til opløsningen om omrørtes forsigtigt yderligere 30 minutter ved stuetemperatur.

Konjugatet anbragtes på en Sephadex G-25 søjle (1,0 cm x 18,0 cm) bragt i ligevæget ved stuetemperatur med 0,2 M jTris, pH 8,0, og eluanten kontrolleredes ved 280 nm. Den tomme rumfangstop opsamledes, blev slået sammen og dialyseret mod 2 l trispuffer. Konjugatet afprøvedes for immunologisk aktivitet bed standard ELISA forsøg og lagret ved 4 °C indtil brug.

EKSEMPEL 54

Biomag·/gede-anti-human IgG partikel præparation.

En 2,5 ml prøve af 5 % Biomag·-amin afsluttede partikler (Advanced Magnetics, Cambridge, MA) overførtes til en ren stor T-kolbe og vaskedes 5 gange med phosphatpufferet saltvand (PBS). Den våde kage genopslemmedes i 12,5 ml 5 % frisk glutaraldehyd (Sigma) og roteredes over top og bund ved stuetemperatur i 3 timer. Den våde kage overførtes til en anden T-kolbe og vaskedes 3 gange med PBS. De aktiverede partikler genopslemmedes til 12,5 ml med PBS og overførtes til et 15 ml centrifugerør. Til denne suspension sattes 12,5 mg gede-anti-humant IgG (H+L) (Jackson Labs) i 2 ml PBS. røret roteredes top over bund i 3 timer ved stuetemperatur og herefter natten over ved 4 °C. Den næste dag vaskedes partiklerne 2 gange med PBS indeholdende 1 vægt/rumfang-% bovint serum albumin (BSA) efterfulgt af lagring i 12,5 ml PBS indeholdende 0,1 % BSA ved 4 °C indtil brugen.

EKSEMPEL 55

Pseudo-homogent humant IgG elektrokemiluminescensanalyse under anvendelse af Biomag· magnetisk baserede partikelanalyse.

Forbindelse I-humant IgG konjugat fortyndedes 1:50 i 0,15 M phosphatpuffer indeholdende 0,1 % BSA og ombragtes i portioner i 250 mikroliter/rør. 150 mikroliter af diluenten (PB w/BSA som ovenfor) sattes til hvert rør, hvorefter der sattes enten forskellige fortyndinger af analyten (humant IgG) eller diluenten (negative kontroller). Yderligere anvendtes en ikke-specifik analyt (gede-anti-kanin IgG) i visse rør, for at checke analysespecificiteten. 50 mikroliter 1 % Biomag· koblet med gede-anti-humant IgG (H&L) tilsattes hvert rør. Rørene blandedes på en hvirvelblander og inkuberedes ved stuetemperatur i 15 minutter under forsigtig omrystning. Partiklerne fjernedes magnetisk fra opløsningen, og 100 mikroliter af den fremkomne supernatant overførtes til et Berthold rør, hvortil 400 mikroliter af en citrat-oxalat-Triton X-1-opløsning var sat. Rørene blandedes på en hvirvelblander og aflæstes i et modificeret Berthold luminumeter udstyret med et R-268 fotoforstærkerrør og en 0,29 inch diameter cirkulær 54 gauge dobbelt platinmesh elektrode understøtet med en ledende malings-beklædt polycarbonat-understøttelse og forbundet til spændingskilden gennem en 0,01 inch diameter platintråds/sølvmalingskontakt. Det tilførte potentiale gik trinvis fra +1,4 til +2,15 V, medens en 10 sekunders integration blev foretaget. Mellem aflæsningerne rensedes elektroden elektrokemisk ved afioniseret vand, neddyppedes herefter i 0,1 M phosphatcitratpuffer indeholdende oxalsyre og Triton X-100 og trinvis optrapning af den tilførte spænding fra -2,2 V til +2,2 V (med 3 sekunder ved hver spænding) i 2 minutter og 20 sekunder, efterfulgt af en hvilepause ved spændingen på +2,2 V i 10 sekunder. Elektroden fjernedes fra renseopløsningen, afrensedes med afioniseret vand og blev trukket tør med et absorberende stykke materiale. I denne forsøgsopstilling var elektrokemiluminescenssignalet direkte proportional med analytkoncentrationen.

EKSEMPEL 56

Fremstilling af bis(2,2'-bipyridin)maleimidohexansyre, 4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-butylamid ruthenium (II) diperchorat: forbindelse IV.

4-[4-(1-aminobutyl)]-4'-methyl-2,2'-bipyidin, fremstillet som beskrevet i eksempel 32 ud fra 500 mg (1,35 x 10^{-3}mol) phthalimid opløstes i 5 ml tør pyridin med 0,313 g (1,48 x 10^{-3} mol) maleimid hexansyre og 0,306 g (1,48 x 10^{-3} mol) DCC. Efter lagring natten over frafiltreredes dicyclohexylurinstof, og pyridinen afstrippedes under vacuum. Remanensen rensedes ved søjlechromatografi (aktivitets II aluminium oxid, 5 % MeOH/CH_2Cl^2) til opnåelse af den rensede forbindelse. Udbytte 0,56 g

(95 %) 100 mg (2,3 x 10^{-4} mol) maleimido-hexansyre, 4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-butylamid og 100 mg (2,06 x 10^{-4}mol) bis-(2,2'-bipyridin) rutheniumdichloriddihydrat opløstes i 50 ml ethanol/vand (1:1), afgassedes med argon og opvarmedes 4 timer med tilbagesvaling. Den fremstillede klart orange opløsning fortyndedes med 25 ml fast $NaClO_4$ 25 ml ethanol og 25 ml acetone og afdampedes langsomt i vacuum. Da materialet var tørt tilsattes yderligere 25 ml vand og 25 ml acetone, og opløsningen inddampedes på roterende inddamper til ca. 15-20 ml. Det faste udfældede materiale opsamledes, vaskedes med vand og tørredes. Prøven rensedes ved præparativtivt TLC påaluminiumoxid underanvendelse af 1:9 methanol/chloroform. Det hurtigt løbende bånd isolierdes ved afskrabning fra pladen, og forbindelsen elueredes ved omrøring i methanol/chloroform (1:1). Efter filtrering for at fjerne aluminiumoxidet inddampedes den orangefarvede opløsning til tørhed til opnåelse af 86,7 mg renset forbindelse (72 %).

EKSEMPEL 57

Mærkning af hCG peptid med foribindelse IV.

2 mg humant chorion gonadotropin (hCG) peptid (#109-145, JP141, Vernon Stevens, Ohio State University) opslemmedes i 1 ml 0,15 M citratpuffer, pH 6,0, og 1,13 mg forbindelse IV opløset i 300 mikroliter dimethylformamid. Peptidopløsningen dryppedes til forbindelse IV opløsningen i løbet af 1 minut. Opløsningen omrørtes forsigtigt 1 time ved stuetemperatur. Prøven anbragtes derefter på en Bio-gel P-2 søjle (Bio-Rad; 1 cm x 45 cm) der var bragt i ligevægt ved stuetemperatur ved 0,2 M Tris-base, pH 8,5 med en strømningshastighed på 15 ml/time, og eluanten kontrolleredes ved 280 nm. Hulrumsrumfanget af gennemløbningen opsamledes, blev slået sammen og påført en QAE-Sephadex A-25 søjle (Pharmacia; 1 cm x 10 cm), der var bragt i ligevægt ved stuetemperatur med 50 mM Tris-HCl, pH 7,0. Dette blev foretaget for at fjerne eventuelle umærkede peptider (der vil adsorbere til den positivt ladede harpiks; den positive ladning af det mærkede peptid muliggør, at det kan passere gennem søjlen uden yderligere behandling). Eluanten undersøgtes ved 280 nm, og den første hovedtop opsamledes, blev slået sammen og koncentreret ved lyophilisering. Den tørrede forbindelse påslemmedes i mindst muligt rumfang PBF. hCG peptid-forbindelse IV konjugatet lagredes ved 4 °C indtil anvendelsen.

EKSEMPEL 58

Rensning af kanin-anti-hCG peptid ved hjælp af DEAE

AFFI-gel blåt chromatografi.

4 ml DEAE-AFFI-gel blåt (Bio-Rad) hældtes på en chromatografisøjle (1 cm x 10 søjlestørrelse) og ækvilibreredes ved stuetemperatur med 0,2 M Tris-HCl indeholdende 0,028 M NaCl, pH 8,0 i 1 time med en 40 ml/time gennemstrømningshastighed. Gennemstrømningshastigheden sænkedes til 20 ml/time og 1 ml kanin-anti-hCG peptid (anti 109-145, Vernon Stevens, Ohio State University), der var prædialyseret overfor søjlepuffer, påførtes søjlen. 1 ml fraktioner opsamledes, og eluanten kontrolleredes ved 280 nm. Hulrumstoppen opsamledes, blev slået sammen fra flere gennemløb og koncentreredes ved at anbringe eluanten i en 12K MMWCO dialysesæk, der var omgivet af polyethylenglycol 6000 (Sigma). Antistoffet undersøgtes for immunoreaktivitet under anvendelse af standard ELISA metoder og for renhed ved hjælp af HPLC, hvilket bevirkede forekomsten af 1 hovedtop, der tydede på et rent aktivt præparat.

EKSEMPEL 59

Titrering af hCf peptid-forbindelse IV konjugat mod renset kanin-anti-hCG peptid: Elektrokemiluminescens signalmodulering.

hCG peptid-forbindelse IV konjugat fortyndedes i 0,1 M phosphatpuffer indeholdende 0,1 M citrat, pH 6,2. Prøver af denne blanding anbragtes i mikrofugerør. Det forud rensede anti-peptidantistof fortyndedes til forskellige koncentrationer og sattes til rørene, der blandedes i en hvirvelblander og inkuberedes 1 time ved stuetemperatur. Lige inden aflæsning af elektrokemiluminescens overførtes en prøve til et Berthold rør, hvortil oxalsyre og Triton X-100 (Sigma) var sat. Rørene blandedes på en hvirvelblander og aflæsningen under anvendelse af en trimmebølge (+1,5 til +2,5 V ved 50 mV/sek., ved hvilke 3 scanninger blev foretaget, idet man tog tophøjden af den

anden scanning som værdien) på et Berthold luminometer under anvendelse af et R-268 fotoforstærkerrør med dobbelt platin mesh blev foretaget. Mellem aflæsningerne rensedes elektroden elektrokemisk ved først at rense den med afioniseret vand og herefter neddyppe den i 0,1 M Phosphat-citratpuffer, pH 6,1 indeholdende 25 nM oxalat og 1 % Triton X-100. Den tilførte spænding blev tilsluttet med 3 sekunder ved hver spænding mellem +2,2 og -2,2 V i 1 minut og 50 sekunder og bragt i ligevægt ved +2,2 V i 10 sekunder. Herefter blev strømmen afbrudt, og elektroden fjernet fra renseopløsningen og renset med afioniseret vand og trykket tør med et absorberende klæde.

Resultaterne viser en generel tendens, hvor elektrokemiluminescenssignalet var direkte proportional med koncentrationen af antistof til peptidet. Dette er i modsætning til andre eksperimenter, ved hvilken elektrokemiluminescenssignalet falder efterhånden som den elektrokemiluminescensmærkede analyt bringes i kontakt med antistof.

EKSEMPEL 60

Elektrokemiluminescenssignalydelse: Stabilitetsdata for Ru(II)-forbindelse III konjugat.

Ru(II)-forbindelse III konjugat fortyndedes til 300 nM i 0,1 M phosphat-ciratpuffer, pH 6,1 enten med eller uden 1 % normalt humant serum (NHS). Hver af puffertyperne inkuberedes ved 4 0, 20 0, 37 0 og 55 °C og undersøgtes ved prøveudtagning på inkubationsdagene 3, 4 og 5. Prøverne bragtes i ligevægt ved stuetemperatur og bedømtes for deres elektrokemiske signal. 400 mikroliter prøve blandedes med 100 mikroliter 125 mM oxalsyre-5 % Triton X-100 i et rør, anbragtes i et modificeret Berthold luminometer med et Hamamatsu R-268 fotoforstærkerfør og en dobbelt mesh platingaze elektrode. Aflæsningen blev fore-

taget ved at variere den påførte spænding konstant mellem +1,5 til +2,5 V med 50 mV/sek. i 3 behandlinger, og højden af den anden behandlingstop registreredes og omdannedes til elektrokemiluminescenttællinger. Mellem tællingerne rensedes elektroden elektrokemisk ved at rense med afioniseret vand, neddyppe elektroden i 0,1 M phosphat-citratpuffer indeholdende 25 mM oxalat og 1 % Triton X-100 og pulsere spændingen fra -2,2 til +2,2 V med en 3 sekunders pause ved hver spænding i 1 minut og 50 sekunder. Spændingen forblev ved +2,2 V i 10 sekunder og blev herefter afbrudt. Elektroden fjernedes fra renseopløsningen, der vaskedes med afioniseret vand og blev trukket tør med et absorberende klæde. Resultaterne viser, at der var overensstemmende signal i hver puffertype under forsøgets varighed. Dette viser reagensets evne og stabilitet til at fremkalde et elektrokimiluminescerende signal.

EKSEMPEL 61

Immunoreaktivitetsundersøgelse af Ru(II)-forbindelse III konjugat: Stabilitetsundersøgelser.

Ru(II)-forbindelse III konjugat fortyndedes og inkuberedes under de betingelser der er beskrevet i eksempel 60. Prøver blev udtaget på dag 3, 4 og 5, afkølet til stuetemperatur og undersøgt for immunoreaktivitet ved hjælp af partikelkoncentratonsfluorescensimmunoforsøget (PCFIA) under anvendelse af en Pandex Screen Machine indkøbt fra Pandex, Inc., Mundelein, IL. PCFIA blev foretaget som et kompetitivt forsøg. Latexpartiklerne (Pandex) konjugeredes med theophyllin-BSA. En konstant mængde af disse partikler blandedes med Ru(II)-forbindelse III konjugatforsøgsopløsningen til slutkoncentrationer af antitheopyllin monikonalt antistof (ascites, Hyclone katalog nr. E-3120M, forsøgsfremstilling nr. RD200) og en kon-

stant mængde gede-anti-muse IgG-FITC konjugat (Pandex, katalog nr. 33-020-1 forsøgsnr. COL). Efter inkubation oparbejdedes prøverne og aflæstes på Pandex Screen Machine. Resultaterne viser, at der ikke var nogen betydende tab af aktivitet, selv efter 5 dages inkubation ved 55 °C.

EKSEMPEL 62

Elektrokemiluminescens af forskellige ruthenium- og osmiumforbindelser.

Elektrokemien ved forskellige osmium- og rutheniumforbindelser måltes som 1 mM opløsninger i 10 ml nitrogengennemskyllet acettonitril med 0,1 M tetrabutylammonium tetrafluorborat som en elektrolyt. Arbejdselektroden var en platinskiveelektrode indkøbt hos Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN. En platintråds modelelektrode og en 1,0 mm sølvtråd anvendtes som en referenceelektrode. Målingerne blev foretaget ved at scanne fra -2,2 til +2,2 V (vs SCE) med en scanningshastighed på 100 mV/sekund. Efter hver elektrokemisk måling bestemtes spændingsforskellingen mellem en mættet Calomel referenceelektrode (SCE) og sølvtråden. Således er de angivne værdier korrigeret til spænding over for SCE.

Elektrokemiluminescens (ECL) målinger blev foretaget i 0,5 ml vandige opløsninger indeholdende 0,1 M phosphatecitratpuffer (pH 4,2), 25 mM oxalsyre og 1 % Triton X-100. Det anvendte elektrodesystem bestod af 2 platingaze (52 gauge) elektroder forbundet til en "Radio Shack" transistorsokkel (nr. 276-548) ved en 0,1 mm platintråd. Elektroderne blev anbragt på ydersiden af et 60 mm tykt stykke celluloseacetatplast. Plasten var udformet således, at et ca. 0,5 cm diameter hul muliggjorde, at opløsningerne let kunne flyde mellem arbejds og modrefe-

renceelektroder. Elektroderne blev forbundet til potentiostaten, således at en elektrode fungerede som en arbejdselektrode (der var nærmere fotoforstærkerrøret) og den anden elektrode fungerede som mod- og referenceelektrode. Målingerne blev foretaget ved at variere konstant fra 1,5 til 2,5 V (dobbeltspænding) med en scanningshastighed på 50 mV/sek. ECL målingerne er angivet som signal til støjforhold d.v.s. eller signal til baggrundsforhold og en given koncentration af forbindelsen. Baggrunden er defineret som luminescenstællinger observeret med puffer og ingen tilsatte ECL forbindelser. Luminescensmålingerne var maximum lysafgivelsen observeret under den første eller anden lineære afsøgning.

Både elektrokemiluminescens (ECL) og cykliske spændingsmålinger af hver opløsning blev foretaget med enten en EG&Gf Model 273 potentiostat eller en bipotentiostat fra Ursar Scientific Instruments, Oxford, England. Photonfluxen for hver ECL måling blev kontrolleret med et Berthold Biolumat LB95000 luminometer fra Wilebad, Vesttyskland, modificeret således, at enten et to- eller treelektrodesystem kunne anbringes i 0,5 ml måleopløsning. Både elektrokemiske og elektrokemiluminescensmålingerne blev registreret på en Kipp & Zonen Model BD 91 X, Y, Y' recorder fra Delft, Holland.

Fluorescensmålingerne blev foretaget med 50 mikromolær opøsninger af den ønskede forbindelse i 3,0 ml ECL opløsning, eller dersom uopløselig i ECL, opløsning i acetonitril. Målinger blev foretaget på et Perkin-Elmer LS-5 fluorescens spectrofotometer. Prescanninger af opløsningernes excitations- og emissionsspektre blev udført inden excitations- og emissionsspektrene registreredes, således at emissionsspektret kunne måles, medens der bestråledes ved maximum excitationsbølgelængde og omvendt,

idet excitationsspektret kunne registreres, medens man kontrollerede maximumemissionsbølgelængden.

Forbindelse	E_{ox} vs. SCE	E_{red}	Fluorescens emission max.	ECL(S/N)[1] & Conc.
a) $Ru(biby)_3$	1,07 V	-1,52	625 nm	1×10^{-5}M (2,5)
b) $Ru(4,4'-CO_2\text{-}bipy)_3$	1,19 V	N.D.	628 nm	2×10^{-9}M (4,5)
c) Ru(4,4'CO_2 et-bipy)$_3$	1,54 V	-0,89 V	636 nm	1×10^{-10}M (2,01)
d) $Ru(bipy)_2$ (C-8-theo-pyllin C-4-bipy)	1,17 V	N.D.	624 nm	1×10^{-9}M (0,97)
e) $OS(bipy)_2$ (CO)(PY)	1,82 V	-0,99 V	585 nm	1×10^{-8}M
f) OS(DPPene) (BPY) (bpyoxal)	1,60 V	N.D.	630 nm	6×10^{-8}M (10,8)

1(S/N) er signal til støjforhold, hvor signalet er defineret som ECL output (luminescenstællinger) af en forbindelse ved en given koncentration, og støjen er luminescenstællinger af pufferen, hvori forbindelsen var opløst.

I modsætning til ECL af de andre forbindelser, der måltes ved pH 4,2, viste forbindelsen C også signifikant ECL ved den physiologiske værdi oH 7,0.

a) Tris (2,2'-bipyridin)-ruthenium $^{2+}$

b) Tris (4,4'-carboxylat-2,2'-bipyridin-ruthenium $^{2+}$

c) Tris (4,4'-carboethoxy-2,2'-bipyridin)-ruthenium $^{2+}$

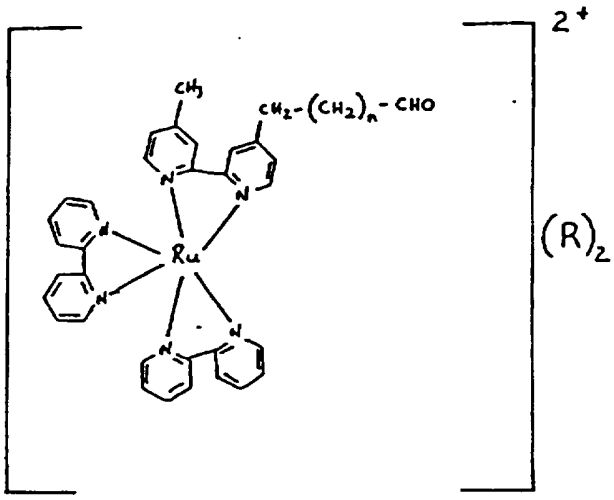
d) bis(2,2'-bipyridin)[theophyllin-8-smørsyre-4-(4-methyl-2,2'-bipyridin)-4'-yl)butyl)amid]ruthenium(II) dichlorid

e) [bis-(2,2'-bipyridin){monocarbonyl}pyridyl]osmium(II) dihexafluorphsphat

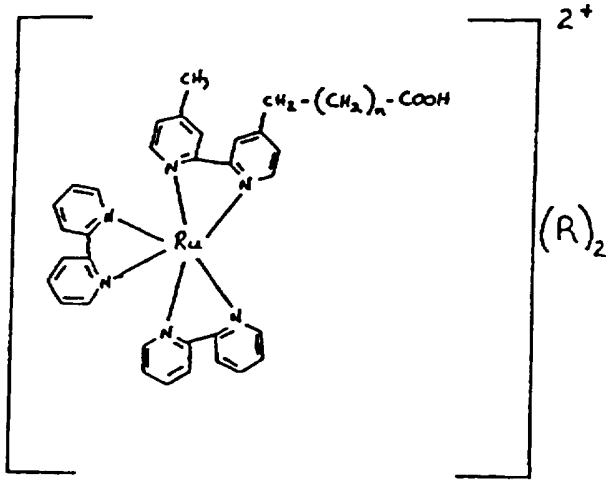
f) (2,2'-bipyridin[cis-bis(1,2-diphenyphosphin)ethylen] {2-[3-(4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl)propyl]-1,3-dioxolan}2-osmium(II) dichlorid.

P a t e n t k r a v :

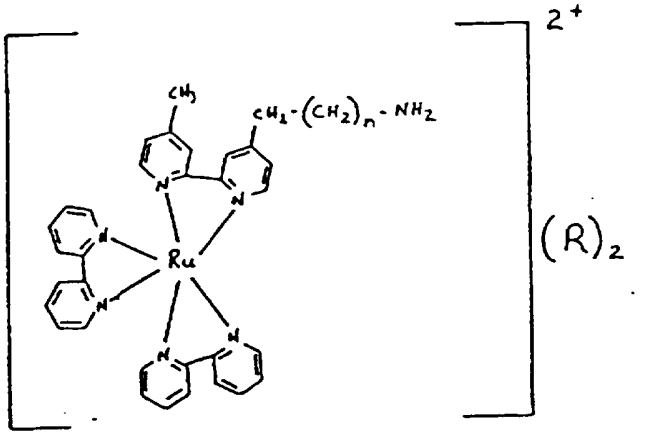
1. Elektrokemiluminescerende kompleks k e n d e t e g - n e t ved, at komplekset er valgt blandt



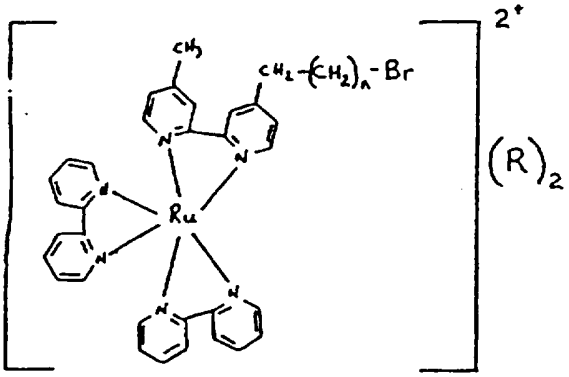
I



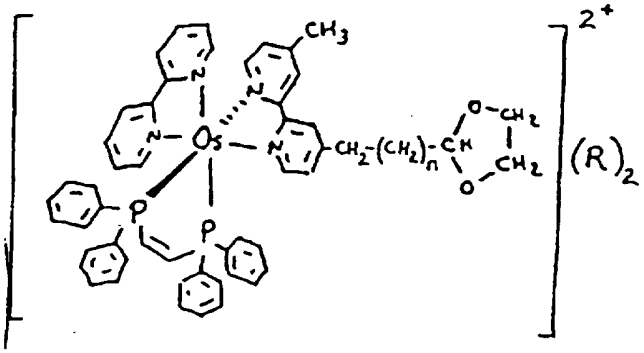
II



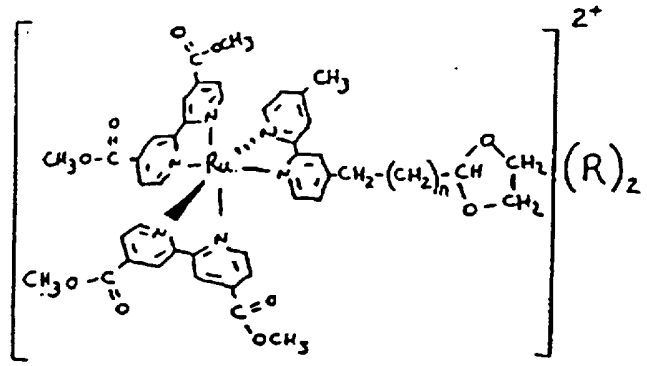
III



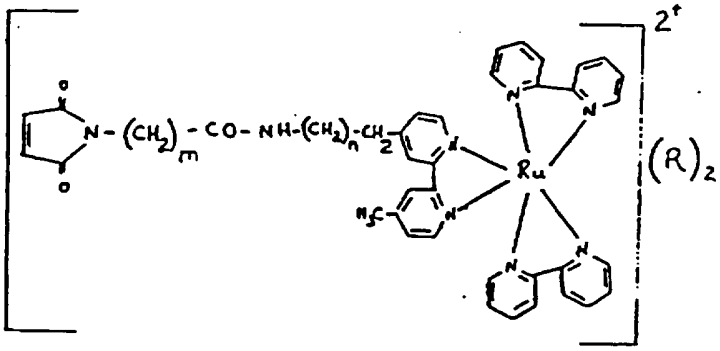
IV



V



VI



VII

hvor det for formlerne I til VI gælder, at R er en anion og n er et heltal, og hvor det for formel VII gælder, at R er en anion, og m og n begge er heltal, som kan være ens eller forskellige.

2. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at n er 2 i hver af formlerne I, II, V og VI.

3. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at n er 3 i hver af formlerne III og IV.

4. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at m er 5 og n er 3 i formel VII.

5. Biologisk forbindelse, k e n d e t e g n e t ved, at den har strukturen

X-Y-Z

hvori X betegner et eller flere nucleotider, som kan være ens eller forskellige, en eller flere aminosyrer, som kan være ens eller forskellige, et antistof, en analyt af interesse eller en analog til en analyt af interesse;

Y betegner en bindende gruppe, som indeholder mindst et carbonatom, og som er knyttet til X og Z, og

Z betegner et kompleks ifølge krav 1.

6. Biologisk forbindelse, k e n d e t e g n e t ved, at den har strukturen

$$X-CH=CH-CO-NH-(CH_2)_n-NH-CO-(CH_2)_m-Z$$

hvori X betegner et eller flere nucleutider, som kan være ens eller forskellige;

Z betegner en elektrokemiluminescerende kemisk gruppe,
n er et helt tal på 1 eller derover, og
m er et helt tal på 1 eller derover.

7. Biologisk forbindelse, k e n d e t e g n e t ved, at den har strukturen

$$[T-Y-Z]^{2+}(R)_2$$

hvori T er theophyllin;
Y er en bindende gruppe, der knytter T til Z;
Z er en bis-(2,2'-bipyridin)[4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-yl]ruthenium (II), og
R er en anion.

8. Biologisk forbindelse ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at Y er knyttet til carbonatomet i T-gruppens 8-stilling.

9. Biologisk forbindelse ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at Y har strukturen

$$(CH_2)_m\text{-}CO\text{-}NH\text{-}(CH_2)_n$$

hvori m og n hver for sig er et helt tal på 1 eller derover.

10. Biologisk forbindelse ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at m er 3 og n er 4.

11. Biologisk forbindelse ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at m og n begge er 3.

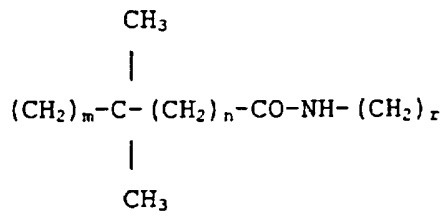
12. Biologisk forbindelse ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at Y har strukturen

$$(CH_2)_m\text{-}\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}\text{-}(CH_2)_n\text{-}CO\text{-}NH\text{-}(CH_2)_r$$

hvori m, n og r hver for sig er et helt tal på 1 eller derover.

13. Biologisk forbindelse ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at m er 1, n er 1 og r er 4.

14. Biologisk forbindelse ifølge krav 8, k e n d e - t e g n e t ved, at Y har strukturen



hvori m, n og r hver for sig er et helt tal på 1 eller derover.

15. Biologisk forbindelse ifølge krav 14, k e n d e - t e g n e t ved, at m er 1, n er 1 og r er 4.

16. Biologisk forbindelse ifølge krav 7, k e n d e - t e g n e t ved, at Y er knyttet til nitrogenatomet i T-gruppens 7-stilling.

17. Biologisk forbindelse ifølge krav 16, k e n d e - t e g n e t ved, at Y har strukturen

hvori n er et helt tal på 1 eller derover.

18. Biologisk forbindelse ifølge krav 17, k e n d e - t e g n e t ved, at n er 4.

19. Biologisk forbindelse, k e n d e t e g n e t ved, at den har strukturen

hvori X repræsenterer en eller flere aminosyrer, som kan være ens eller forskellige, idet der indgår mindst én aminosyre, som er cystein eller methionin, og

Z er bis(2,2'-bipyridin)maleimidohexonsyre-4-methyl-2,2'-bipyridin-4'-butylamid-ruthenium(II), som gennem carbonatomet i maleimidets 3- eller 4-stilling er knyttet til en svovl-substituent i cystein eller methionin.

LITTERATRULISTE

1. Weber, S.G., et al., Photoelectroanalytical Chemistry: Possible Interference in Serum and Selective Detection of Tris (2, 2' - bypyridine) ruthenium(II) in the Presence of Interferents, Clinical Chemisty, 29, 1665-1672 (1983).

2. Rubinstein, I. og Bard, A.J., Electrogenerated Chemiluminescence. 37. Aqueous ECL Systems Based On Ru (2, 2' - bypyridine)$_3^{2+}$ and Oxalate or Organic Acids, J. Am. Chem. Soc., 103, 512-516 (1981).

3. White, H.S. og Bard, A.J., Electrogenerated Chemiluminescence. 41. Electrogenerated Chemiluminescence and Chemiluminescence of the Ru (2, 2' - bpy)$_3^{+2}$ - $S_2O_8^{-2}$ System in Acetonitrile - Water Solutions, J. Am. Chem. Soc., 104, 6891 (1982).

4. Curtis, et al., Chemiluminescence; A New Method for Detecting Fluorescent Compounds Separated By Thin Layer Chromatography, J. Chromatography, 134, 343-350 (1977).

5. Sprintschnik, G., et al., Preparation and Photochemical Reactivity of Surfactant Ruthenium (II) Complexes in Monolayer Assemblies and at Water - Solid Interface, J. Am Chem. Soc., 99, 4947-4954 (1977).

6. Minnich, S.A., et al., Enzyme Immunoassay for Detection of Salmonellae in Foods, Appl. and Environ. Micro., 43, 1124-1127 (1982).

7. Thomason, B.M., Current Status of Immunofluorescent Methodology for Salmonellae, J. Food Prot., 44, 381-384 (1981).

8. Mattingly, J.A., An Enzyme Immunoassay for the Detection of All Salmonella Using a Combination of a Myeloma Protein and a Hybridoma Antibody, J. Immunol. Meth., 73, 147-156 (1984).

9. Thompson, N.E. et al., Detection of Staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radio-immunoassays: Comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems, Appl. and Environ. Micro., forelæsning.

10. American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater. 15. udg. American Public Health Association, Inc., New York (1980).

11. American Public Health Association, Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C (1976).

12. Clark, H.F., Geldreich, E.E., Lester, H.L., og Kabler, P.W., The membrane filter in sanitary microbiology, Public Health Rep. 66:951-957 (1951).

13. Feng, P., og Hartman, P.A., Fluorogenic assays for immediate confirmation of Escherichia coli., Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329 (1982).

14. Geldreich, E.E., Standard method Revisions (16. udgave for Conventional coliform Procedures. I : New developments in drinking water microbiology workshop, 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology (1985).

15. Hussong, D., Colwell, R.R., og Weiner R.M., Rate of occurrence of false-positive results from total coliforms most-probable-number analysis of shellfish and estuaries. Appl. Environ. Microbiol. 40:981-983 (1980).

16. Hussong, D., Demare, J.M., Weiner, R.M., og Colwell, R.R., Bacteria associated with false-positive most-probable-number coliform test results for shellfish and estuaries, Appl. Environ. Microbiol 41:35-45 (1981).

17. Lin, S., Evaluation of coliform tests for chlorinated secondary effluents, J. Water Pollut. Control Fed. 45:498-506 (1973).

18. Mckee, J.E., McLaughlin, R.T. og Lesgourgues, P., Application of molecular filter techniques to the bacterial assay of sewage III. Effects of physical and chemical disinfection, Sewage Ind. Waste 30:245-252 (1958).

19. Mead, J.A.R., Smith, J.N., og Williams, R.T., The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of beta-glucuronidase, Biochem. J. 61:569-574 (1954).

20. Olson, B.H., Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by modification of the most-probable-number method. Apl. Environ. Microbiol, 36:438-444 (1978).

21. Presnell, M.W., Evaluation of membrane filter methods for enumerating coliforms and fecal coliforms in estuarine waters, Proc. National Shellfish Sanitation Workshop. 1974:127-131 (1974).

22. Presswood, W.G. og Strong, D.K., Modification of mFC medium by eliminating rosolic acid, Appl. Environ. Microbiol. 36:90-94 (1978).

23. Warr, G.W. and Marchalonis, J.J., Purification of Antibodies. I: Antibody as a Tool, J. Wiley and Sons, NY, pp. 59-96. (1982)

24. Maniatis, T., Fritsch, E.F. og Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, p. 150-160, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982).

FIG. 1

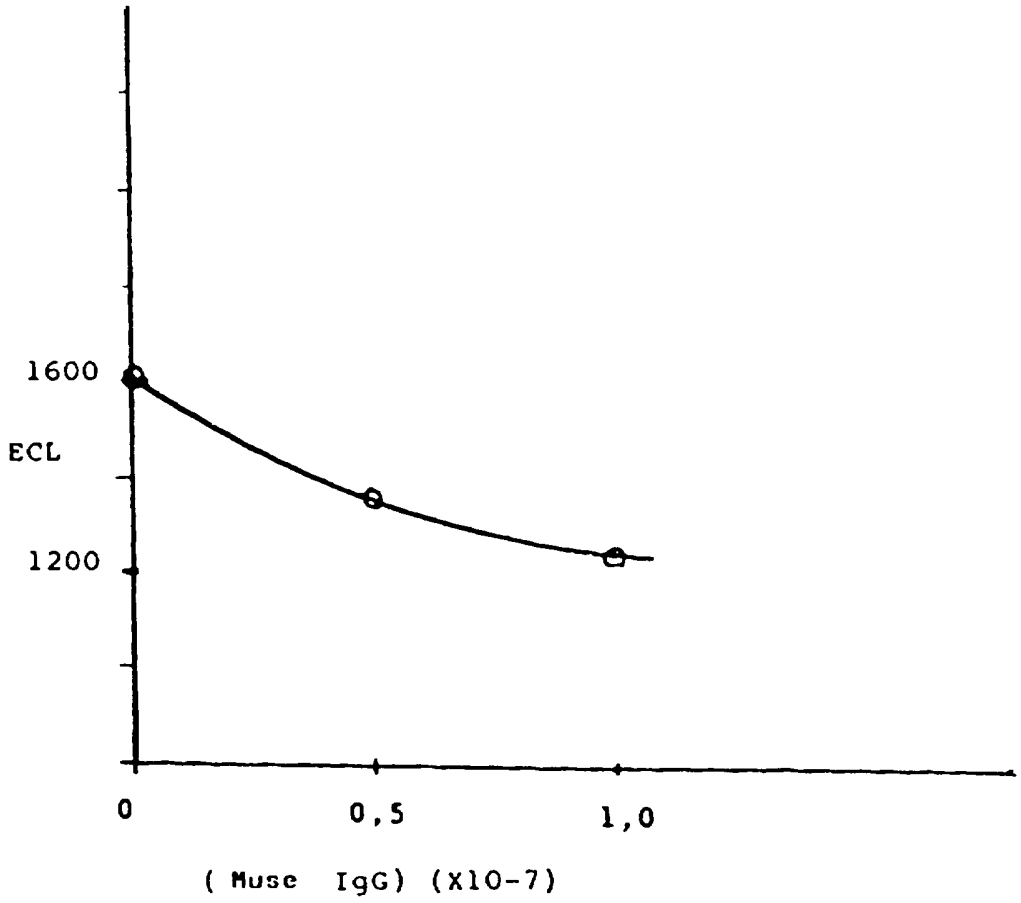


FIG. 2

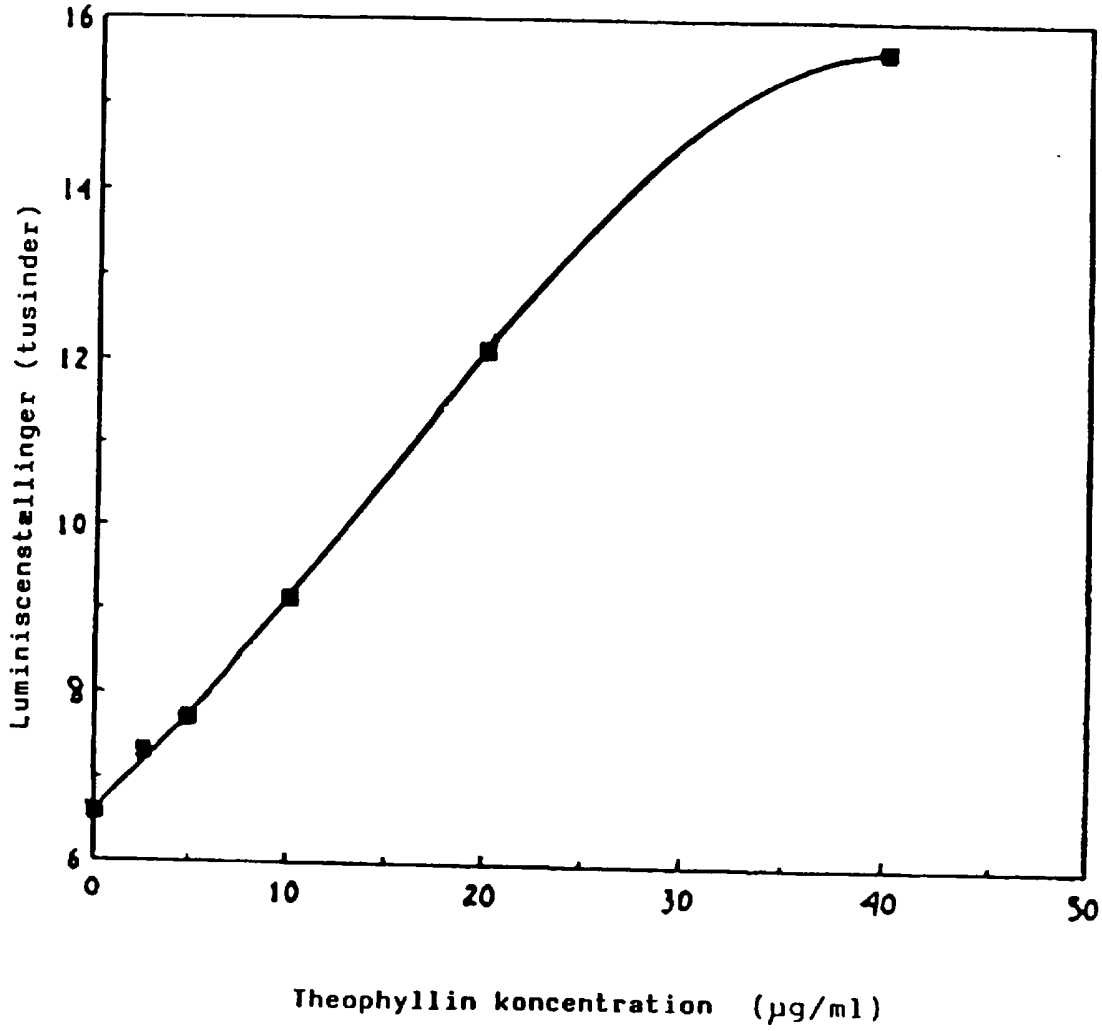

16
14
12
10
8
6
0
10
20
30
40
50
Luminiscenstællinger (tusinder)
Theophyllin koncentration (µg/ml)

FIG. 3

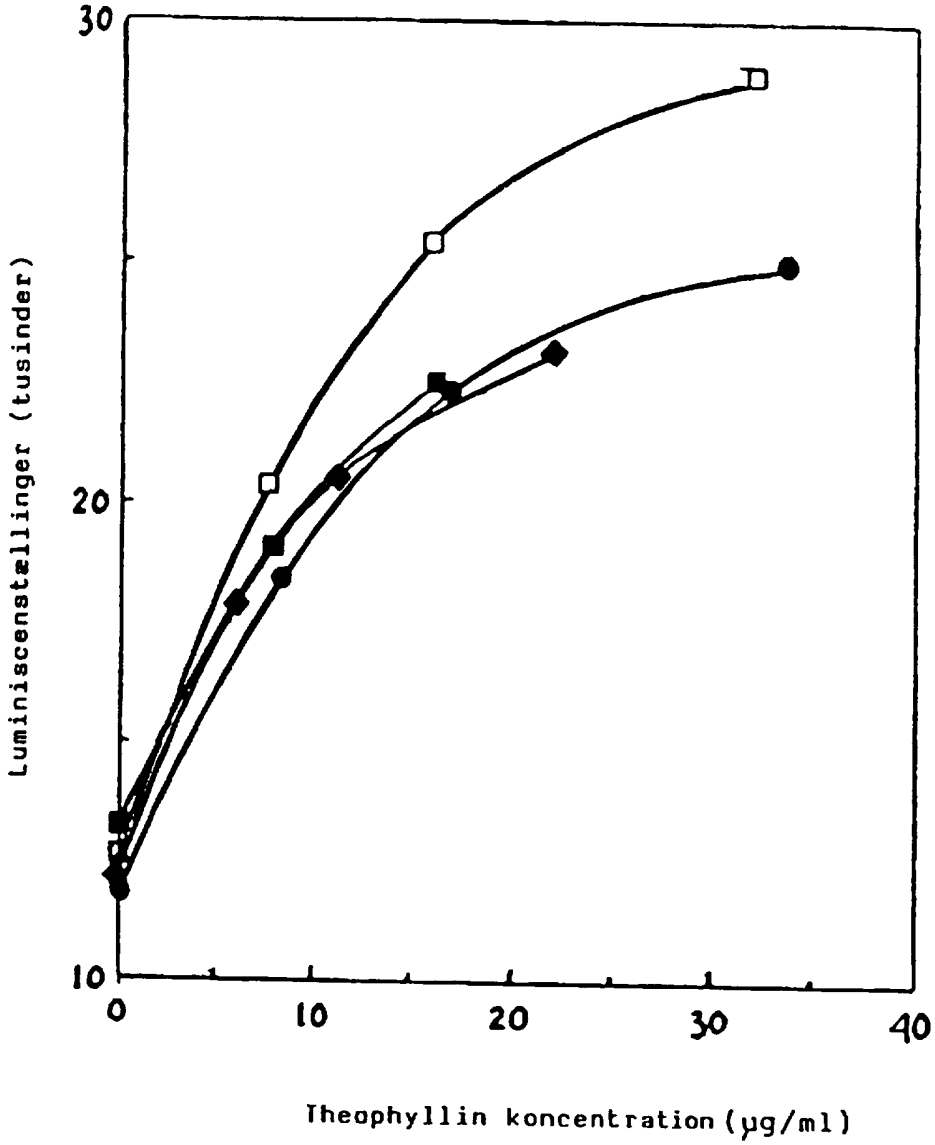

30
20
10
0
10
20
30
40
Luminiscenstællinger (tusinder)
Theophyllin koncentration (µg/ml)

FIG. 4A

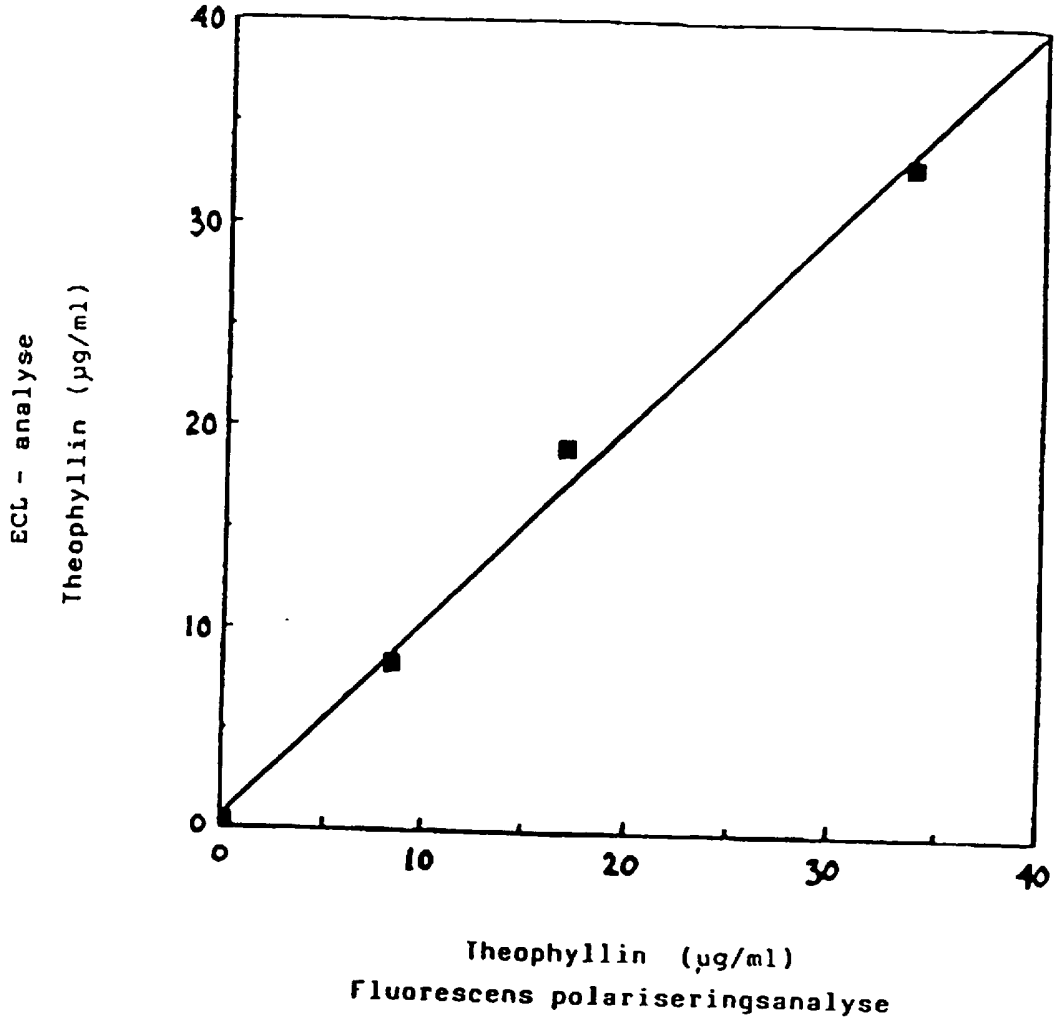

ECL - analyse
Theophyllin (µg/ml)
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
Theophyllin (µg/ml)
Fluorescens polariseringsanalyse

FIG. 4B

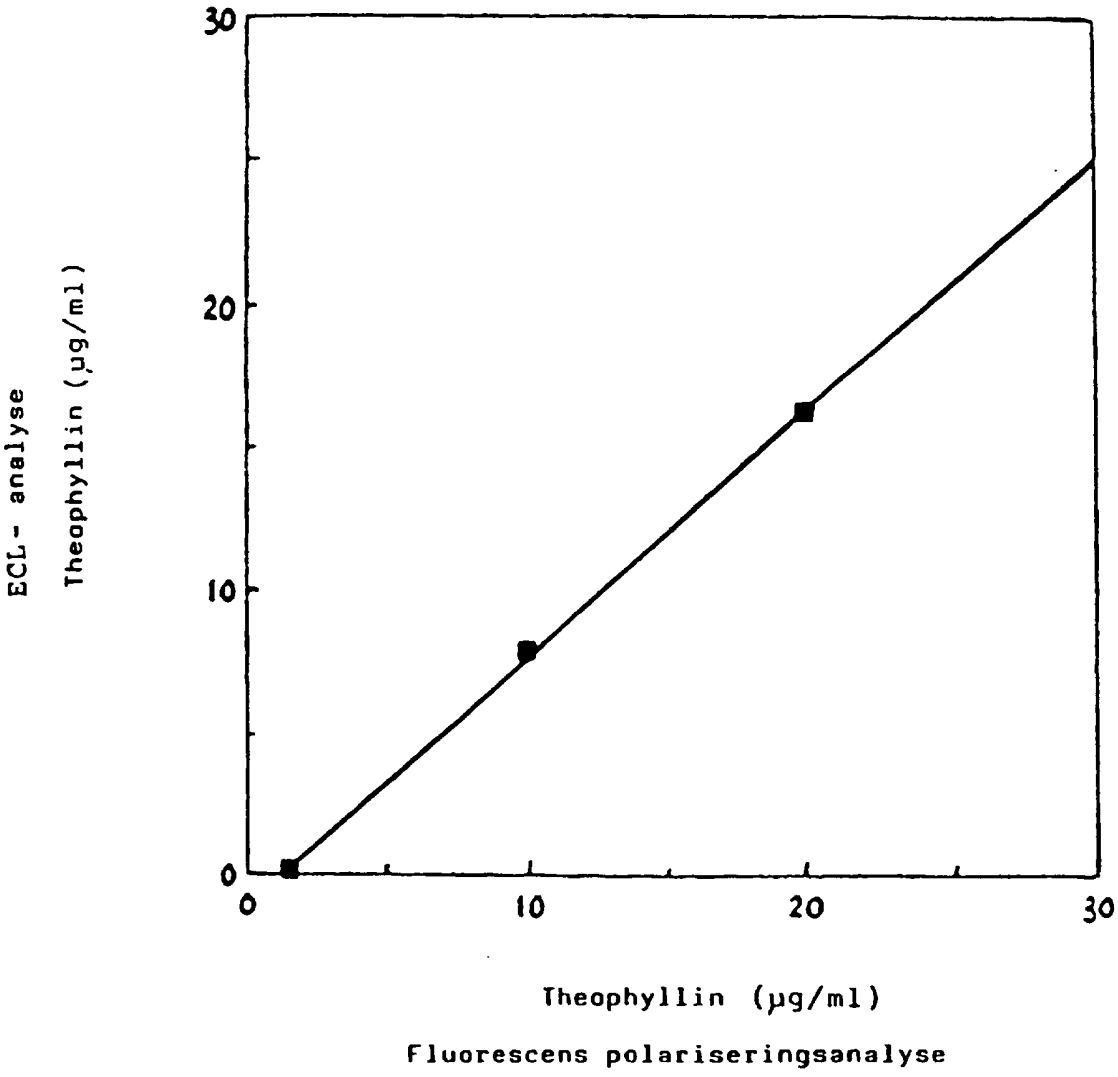

30
20
10
0
0
10
20
30
ECL- analyse
Theophyllin (µg/ml)
Theophyllin (µg/ml)
Fluorescens polariseringsanalyse

FIG. 4C

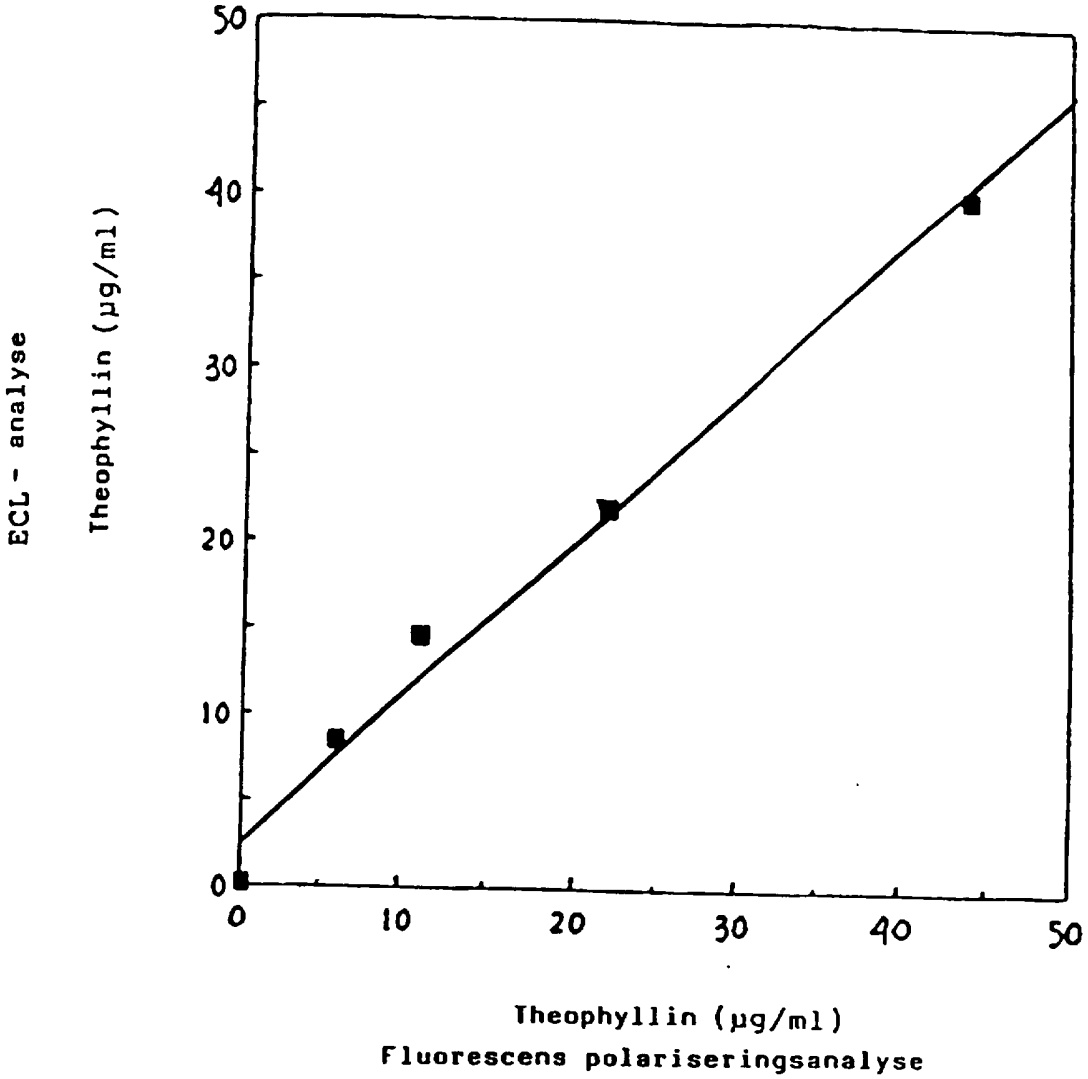

ECL - analyse
Theophyllin (µg/ml)
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
Theophyllin (µg/ml)
Fluorescens polariseringsanalyse

FIG. 4D

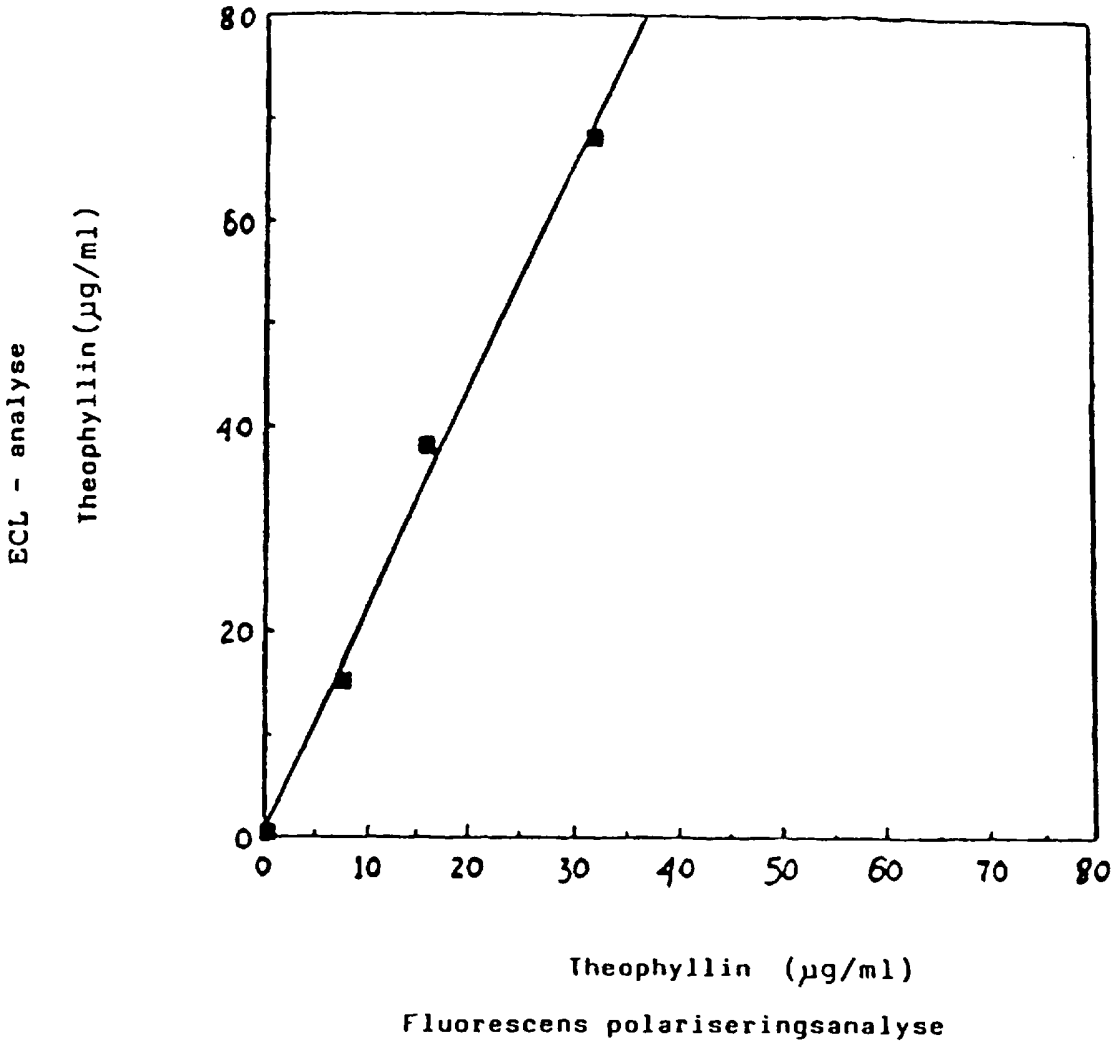

ECL - analyse
Theophyllin (µg/ml)
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Theophyllin (µg/ml)
Fluorescens polariseringsanalyse

FIG. 5

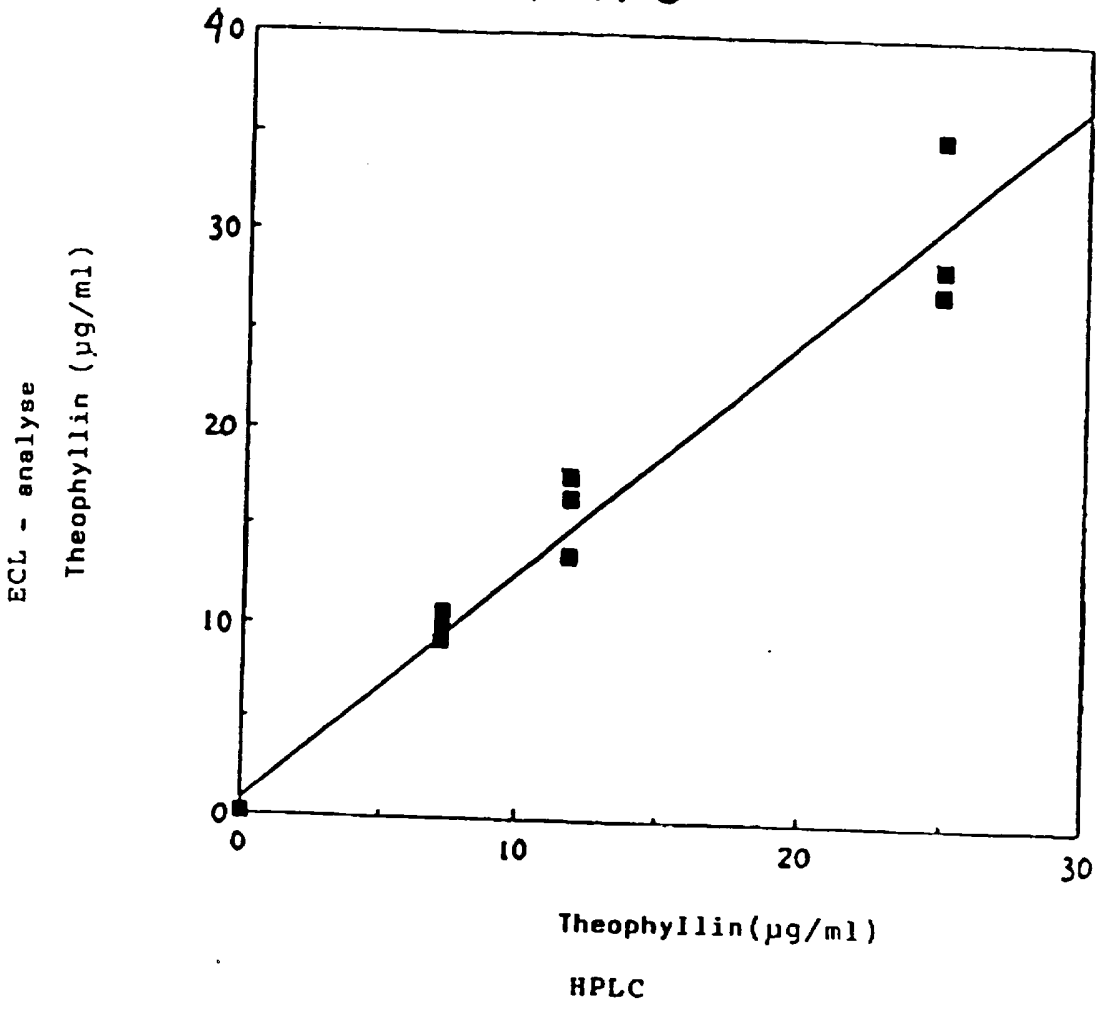

40
30
20
10
0
0
10
20
30
ECL - analyse
Theophyllin (µg/ml)
Theophyllin(µg/ml)
HPLC

FIG. 6

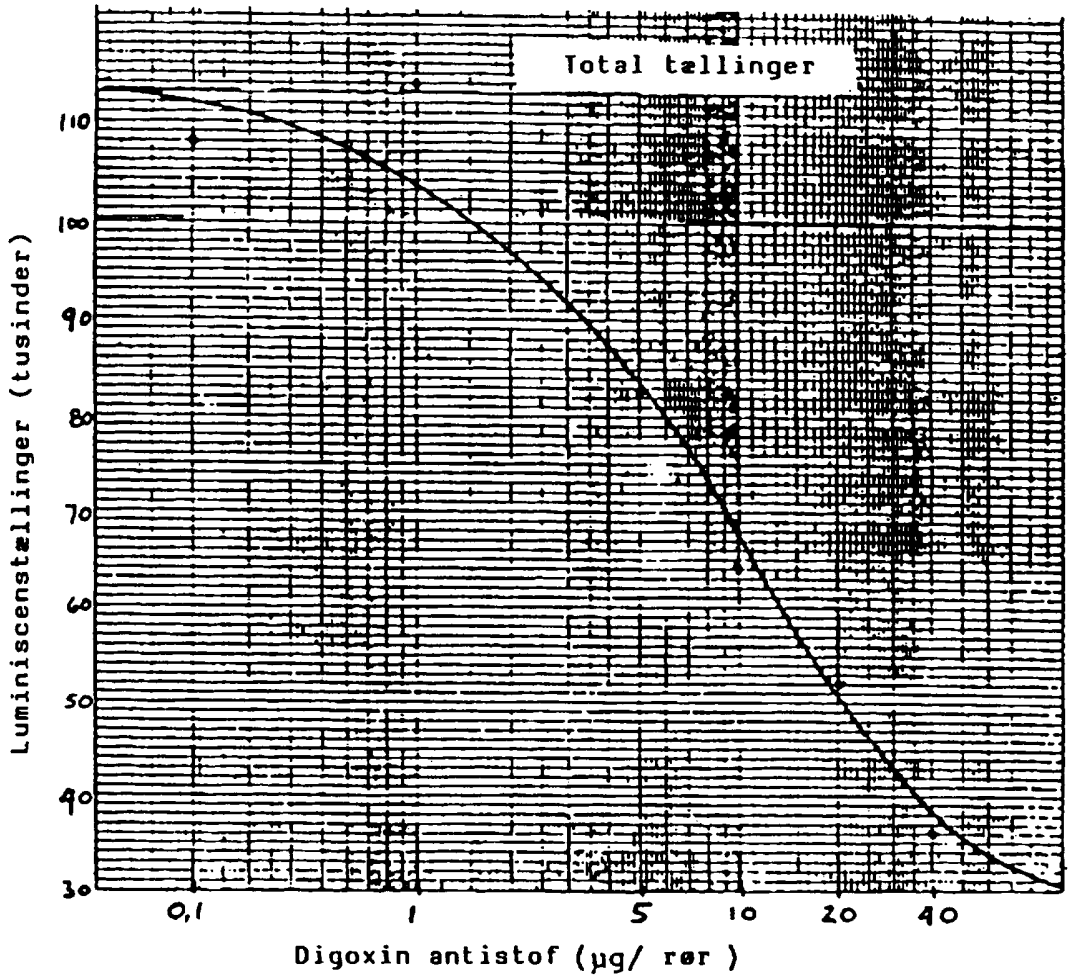

Total tællinger
Luminiscenstællinger (tusinder)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
0,1
1
5
10
20
40
Digoxin antistof (µg/ rør)

FIG. 7

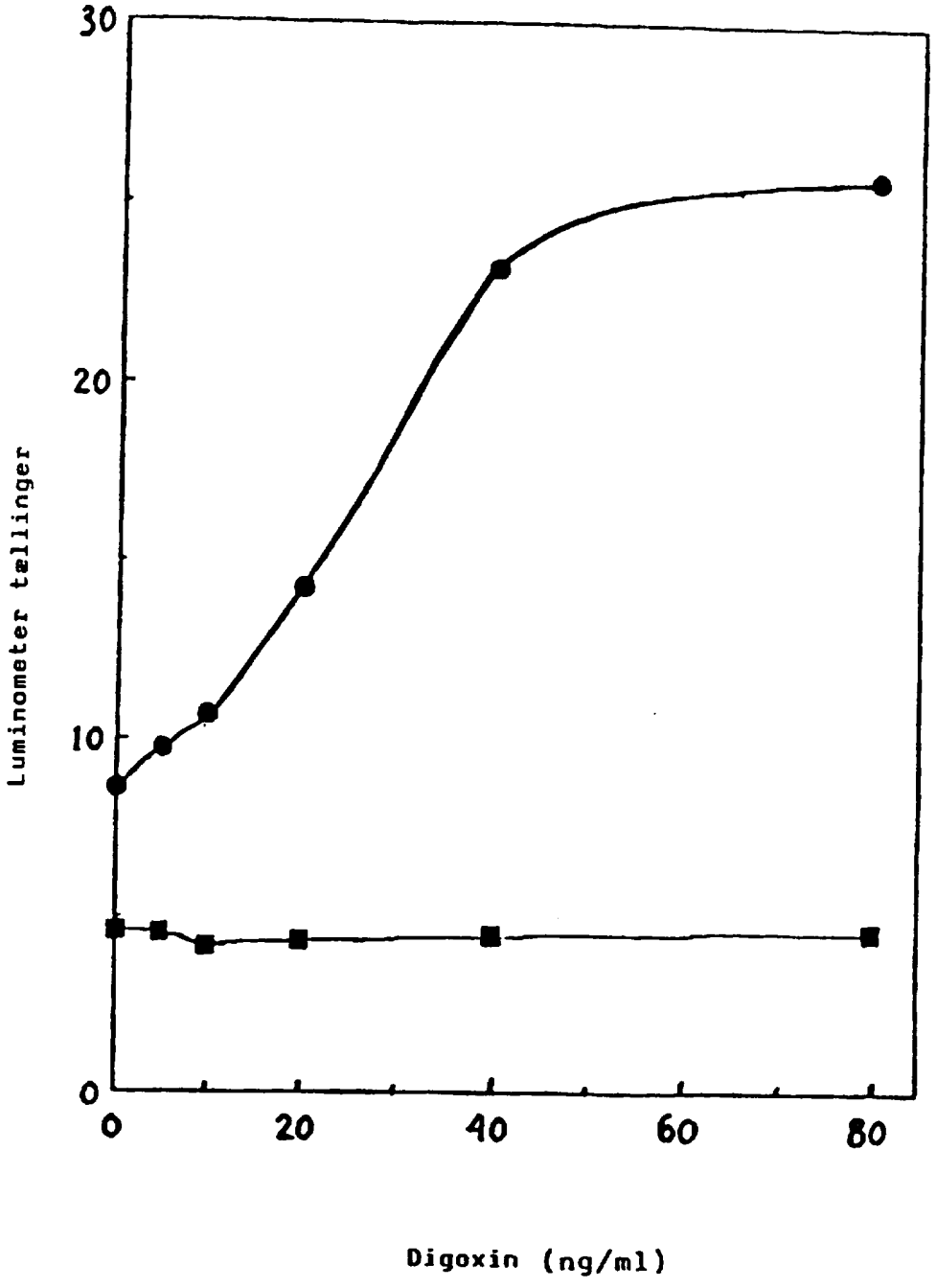


FIG. 8

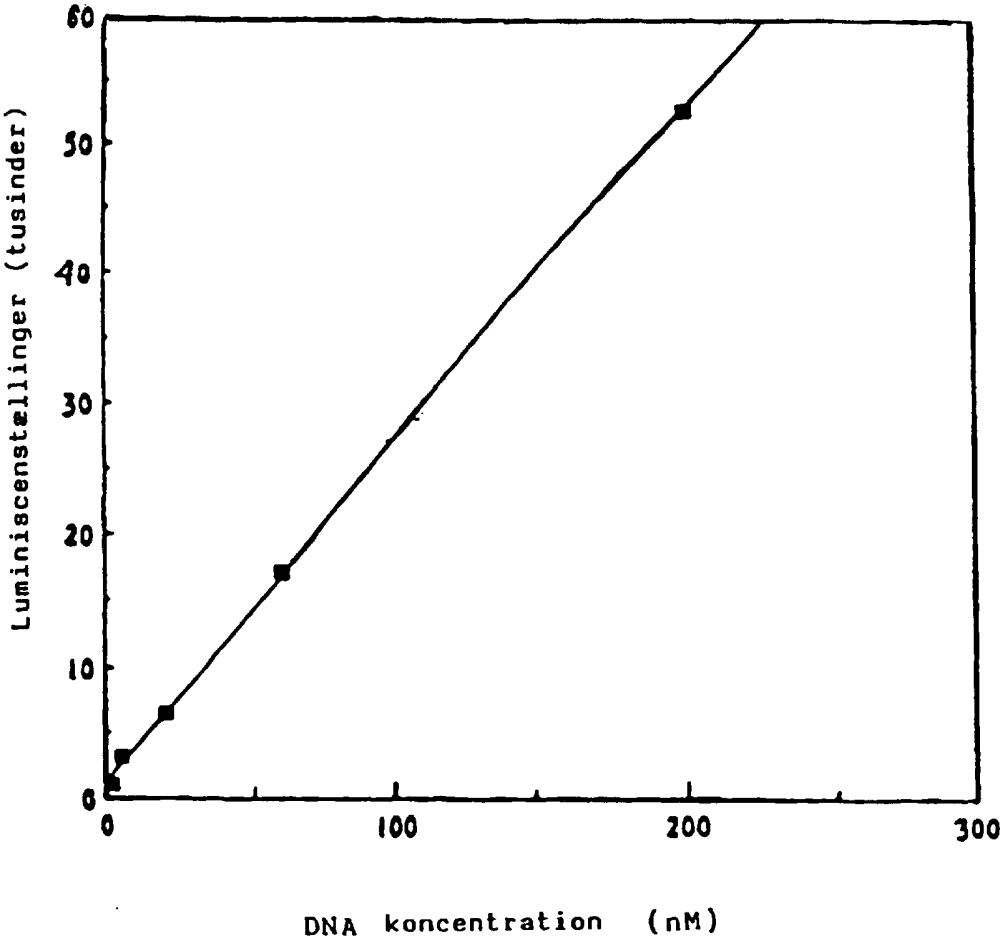

Luminiscenstællinger (tusinder)
60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
DNA koncentration (nM)

FIG. 9

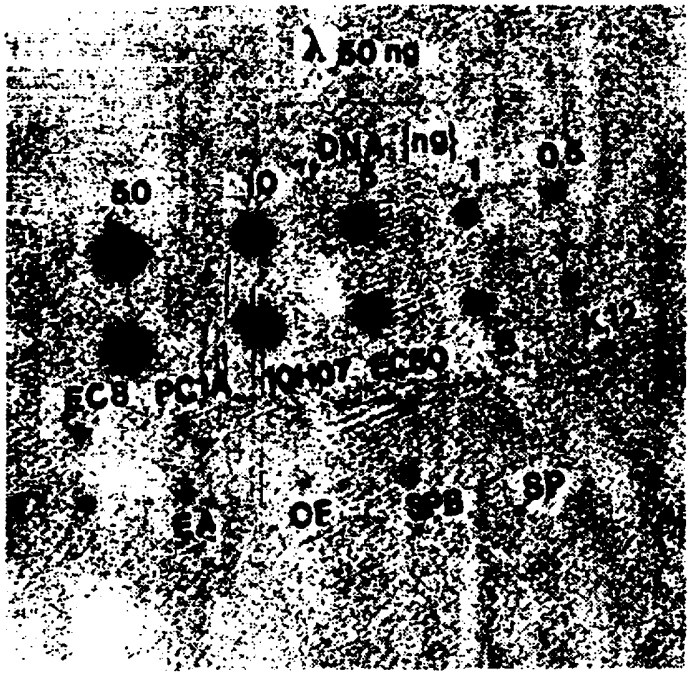



FIG. 10