



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(51) Int. Cl.⁶: **G 01 N 33/569**
G 01 N 33/58

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD G 01 N / 338 993 5	22. 03. 90	14. 08. 91	07. 08. 97

(30) Unionspriorität:
—

(72) Erfinder: Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., 10179 Berlin, DE; Meißner, Katrin, Dipl.-Biochem., 13187 Berlin, DE; Rüdinger, Wolfgang, Dr.-Ing. Dr. med., 69488 Birkenau, DE; Sydow, Günter, Obering., 13125 Berlin, DE

(73) Patentinhaber: Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., 10179 Berlin, DE; Meißner, Katrin, Dipl.-Biochem., Dr., 06849 Dessau, DE; Rüdinger, Wolfgang, Dr.-med. Dr. Ing., 69488 Birkenau, DE;

(54) Verfahren und Testbesteck zur Aktivitätsbestimmung reverser Transkriptasen (RT)

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 3 916 595 A1
T. PORSTMANN et al., J. Immunol. Methods, 83 (1985): 169–179

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Aktivitätsbestimmung reverser Transkriptasen (RT), **dadurch gekennzeichnet**, daß Hapten-markierte oder substituierte Nukleotidtriphosphate, gegen die sich entweder spezifisch Antikörper herstellen lassen oder die durch andere Binder spezifisch gebunden werden, zur Strangpolymerisation eingesetzt werden und ihr Einbau in einem Bindungstest quantifiziert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die polymerisierten Nukleotide in einem Zwei-Seiten-Assay nachgewiesen werden, in dem bei Verwendung identischer Antikörper als Festphaseantikörper und als markierter Antikörper der gebildete Strang über einen Teil der markierten Nukleotide an den Festphaseantikörper gebunden wird und der verbleibende Teil durch die markierten Antikörper im jeweiligen Immunoassay nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Abtrennung der nicht eingebauten markierten Nukleotide durch Substratoptimierung bei der Reaktion der RT überflüssig wird oder aber im Verlauf eines Zwei-Seiten Zwei-Schritt-Assays realisiert werden kann, wobei die Strangbindung an die feste Phase nicht über eine Interaktion mit den markierten Nukleotiden realisiert wird und letztere nach dem Waschprozeß zur Entfernung der nicht eingebauten markierten Nukleotide voll dem Nachweissystem zur Verfügung steht.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein RT-Puffer Verwendung findet, der neben RSA, Poly(rA)dT₁₈, Tris HCl, DTT, MgCl₂, KCl, EGTA, Glutathion, Glycerol und Triton X-100 zusätzlich ein haptenisiertes Nukleotid enthält, wogegen spezifische Antikörper oder andere Binder verfügbar sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die RT-Aktivität des HIV-1 gemessen wird, indem die RT aus einem HIV-1-Lysat vor der RT-Reaktion durch einen insolubilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörper isoliert wird und andere, die RT-Reaktion störende Substanzen vor der RT-Reaktion eliminiert werden können.
6. Testbesteck zur Aktivitätsbestimmung reverser Transkriptasen (RT), **dadurch gekennzeichnet**, daß es aus a) festen Phasen, wie Mikrotiterplatten oder Röhrchen bzw. Kugeln mit immobilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörpern, b) festen Phasen gem. a) mit insolubilisierten Antikörpern zur Bindung des Einzel- bzw. Doppelstranges, c) markierten Antikörpern gegen die haptenisierten Nukleotide, d) einem RT-Pufferkonzentrat mit dem entsprechenden haptenisierten Nukleotid, e) einem Substratgemisch für die Enzymreaktion, f) einem Stoppreagens zum Abbruch der Enzymreaktion, g) Verdünnungsmedien für Proben und Konjugate, h) Waschpuffer, i) Kontrollmaterialien – und im Falle der Einzelstrangherstellung j) Natronlauge und k) Citrat-Phosphatpuffer – besteht.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Testbesteck zur Aktivitätsbestimmung reverser Transkriptasen (RT) unter Umgehung der bekannten Isotopentechniken und findet vorrangig Anwendung in der molekularbiologischen Grundlagenforschung und angewandten Medizin und Veterinärmedizin auf dem Gebiet der Virologie zur Charakterisierung und zum Nachweis von Retroviren, darüber hinaus in der Pharmakologie und pharmazeutischen Industrie zur Überprüfung der Wirksamkeit von Hemmsubstanzen der reversen Transkriptase.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der Nachweis der Aktivität reverser Transkriptasen erfolgt ausschließlich durch die Polymerisation Tritium-markierter oder ³²Phosphor-markierter Deoxynukleotid-Triphosphate an einer Einzelstrangmatritze (Template, meist Poly[rA] der Kettenlänge 100) mit Startersequenzen (Primer, meist Oligo [dT] der Kettenlänge 10–20) (D. Baltimore und D. Smoler: Proc. Natl. Acad. Sci. 68 [1971], 1507–1511). Der Einsatz der mit radioaktiven Isotopen markierten Nukleotide begrenzt diese Methode auf wenige Labore und ist mit allen Nachteilen, die aus dem Umgang mit radioaktivem Material herrühren, behaftet, wie z. B. der Substanzlagerung, den erforderlichen Genehmigungen zum Umgang mit diesen Substanzen, der Versuchsdurchführung in Speziallaboratorien sowie der Abfallbeseitigung. Darüber hinaus eignet sich diese Methode nur bedingt zur Automatisierung, verursacht durch die notwendige Präzipitation des Reaktionsproduktes auf eine Matrix, in der dann die radioaktiven Zerfälle gemessen werden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, den Einsatz von radioaktiven Isotopen bei der Bestimmung der RT zu umgehen, die RT-Bestimmung weitgehend zu automatisieren und die jeweilige RT spezifisch zu erfassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren und Testbestecke zu entwickeln, die einerseits den Einsatz von Nukleotiden, die mit radioaktiven Isotopen markiert sind, umgehen und andererseits durch Umgehung der Abtrennung nicht polymerisierter Nukleotide einen hohen Automatisierungsgrad bei der RT-Bestimmung ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß z. B. Tritium-markiertes Thymidintriphosphat ($^3\text{HTTP}$) gegen anders markierte Nukleotidtriphosphate, die der RT ebenfalls als Substrat dienen, ausgetauscht wird. Die an der Matrize polymerisierten markierten Nukleotide werden durch eine Bindungsreaktion nachgewiesen, wobei die gegen die Marker (Liganden) gerichteten Binder selbst markiert sind und die Signalintensität dieser Marker in Beziehung zur Aktivität der zu messenden RT steht.

Gewöhnlicherweise handelt es sich bei dem Liganden um ein Hapten, bei dem Binder um einen Antikörper gegen dieses Hapten, wie zum Beispiel Brom oder Digoxigenin in 5-Bromo-2-deoxy-uridin-5-triphosphat (BrdUTP) oder Digoxigenin-11-dUTP und markierten anti-BrdUTP- bzw. anti-Digoxigenin-Antikörpern. Als Marker für die Antikörper werden Enzyme, wie z. B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase bzw. Fluorochrome, verwendet. Neben der Hapten-Antikörperreaktion können bei anderen Ligand-Binder-Wechselwirkungen zum Nachweis der Nukleotidpolymerisation Biotin-markierte Nukleotide, wie z. B. Biotin-markiertes 11-dUTP und Streptavidin-markierte Peroxidase (Biotin-Streptavidin-System), zum Nachweis der RT-Aktivität eingesetzt werden. Da die frei verbliebenen markierten, mit den durch die RT polymerisierten Nukleotiden um die Antikörperbindung konkurrieren, ist die Konzentration der markierten Nukleotide so gering wie möglich zu halten, ohne jedoch einen Substratmangel für die RT zu erzeugen. Das ist in jedem Fall erforderlich, wenn die Menge eingebauter markierter Nucleotide im Anschluß an die RT-Reaktion in einem Ein-Schritt-Zwei-Seiten-Immunoassay nachgewiesen wird. Erfolgt der Nachweis im Zwei-Schritt-Immunoassay, so besteht die Möglichkeit, nach Bindung des Stranges mit den markierten Nukleotiden die noch frei verbliebenen nicht-polymerisierten Nukleotide durch Spülen (Bound/Free[BF]-Trennung) vor der Inkubation der enzym- oder fluorochrom-markierten Antikörper zu entfernen. Die Entfernung der markierten nicht-polymerisierten Nukleotide erfolgt dadurch, daß die Bindung entweder des Doppelstranges mit inkorporiertem Digoxigenin-11-dUTP oder des Einzelstranges nach alkalischer Hydrolyse oder thermischer Schmelzung (T. Porstmann, T. Ternynck und S. Avrameas: *J. Immunol. Methods* **82** [1985], 169-179), im Falle des Nachweises von inkorporiertem BrdUTP nach einem anderen Prinzip realisiert wird, z. B. immunologisch über einen Festphaseinsolubilisierten monoklonalen anti-DNA-Antikörper oder über insolubilisiertes methyliertes Rinderserumalbumin bzw. kovalent über Epoxysilan.

Um eine spezifische RT (z. B. die des die menschliche Immunschwäche AIDS verursachenden Retrovirus HIV-1) nachzuweisen, wird vor der eigentlichen RT-Reaktion die reverse Transkriptase aus dem Viruslysat durch einen insolubilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörper isoliert. Nach einer Inkubationszeit des Viruslysats in mit monoklonalen anti-HIV-1-RT-Antikörpern beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte oder Röhrchen bzw. Kugeln zwischen 60 und 240 min (vorzugsweise 90 min) bei 20 bis 25°C werden alle nicht gebundenen Bestandteile durch Absaugen der Flüssigkeit und mehrmaliges Spülen der Kavitäten, Röhrchen bzw. Kugeln mit Pufferlösungen bekannter Zusammensetzung entfernt. Anschließend wird die RT-Reaktion mit BrdUTP bzw. mit Digoxigenin-11-dUTP in Konzentrationen zwischen 0,005 und 0,05 mmol/l (vorzugsweise 0,01 mmol/l) und Poly(A)(dT)₁₀ in Konzentrationen zwischen 0,007 und 0,25 mmol/l (vorzugsweise 0,015 mmol/l) über 60-240 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C in Pufferlösungen bekannter Zusammensetzung (A. Hoffmann, B. Banapour und A. J. Levy: *Virology* **147** [1985], 326-335) durchgeführt. Der Reaktionsabbruch erfolgt im Falle des Einbaus von BrdUTP durch Zugabe von 0,4 mol/l NaOH. Die Inkubationszeit zur Poly(rA)-Degradation beträgt dabei 5-30 min (vorzugsweise 10 min). Nach anschließender Neutralisation durch Zugabe eines 0,5 mol/l Citrat-Phosphatpuffers pH 7,0 erfolgt der Probentransfer in die Immunoassayplatte oder -röhrchen. Hier reagiert der Poly(BrdU)-Strang entweder im sukzessiven Zwei-Schritt-Assay 60-120 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C mit dem insolubilisierten anti-BrdU-Antikörper, gefolgt von einer 60-120minütigen (vorzugsweise 90minütigen) Konjugatinkubation (Peroxidase-markierter anti-BrdU-Antikörper) oder aber im simultanten Ein-Schritt-Assay zusammen mit dem Konjugat und den insolubilisierten Antikörpern über 60 bis 120 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C.

Nach gleichem Prinzip läuft der Nachweis des polymerisierten Digoxigenin-dUTP ab, nur daß aufgrund der Zugänglichkeit des Digoxigenins für den Peroxidase-markierten anti-Digoxigeninantikörper die alkalische Hydrolyse zur Strangtrennung und Degradation des Poly(rA) und anschließende Neutralisation entfällt. Nach Abtrennung der ungebundenen Komponenten erfolgt die Substratreaktion wahlweise mit den Chromogenen ABTS, oPD oder TMB und H₂O₂ nach bekannten Verfahren (B. Porstmann, T. Porstmann und E. Nugel: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **19** [1981], 435-439; T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23** [1985], 41-44). Die Extinktionsbestimmung erfolgt durch Photometrie. Das erfindungsgemäße Testbesteck zur Bestimmung der RT-Aktivität ist ein Festphasenimmunoassay, der aus a) festen Phasen, z. B. Mikrotiterplatten oder Röhrchen mit immobilisierten Antikörpern zur Isolation der RT aus einem HIV-1-Lysat und b) festen Phasen (s. o.) mit insolubilisierten Antikörpern zur Bindung des Stranges mit den inkorporierten markierten Nucleosiden, c) Enzym- oder Fluorochrom-markierten Antikörpern (anti-BrdU oder anti-Digoxigenin-Antikörper) zum Nachweis der im Immunokomplex gebundenen markierten polymerisierten Nucleosiden im Ein- bzw. Zwei-Schritt-Assay, d) einem RT-Puffer (Konzentrat mit einem markierten Nukleotid), e) Natronlauge für den Abbruch der Polymerisation und für die Strangtrennung, im Falle des Einsatzes von BrdUTP f) Citrat-Phosphatpuffer (Konzentrat) für die Vorbereitung des Enzymimmunoassays, im Falle des Einsatzes von BrdUTP g) einem Substratgemisch zum Nachweis von Peroxidase, h) einem Stoppreagens für die Peroxidase-Reaktion, i) Verdünnungsmedien für Proben und Konjugate (Konzentrat), j) Waschpuffer (Konzentrat) und k) Kontrollmaterialien, besteht.

Die verwendeten monoklonalen anti-BrdU-Antikörper werden durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit 5-Brom-2-uridin-Ovalbumin und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit Zellen der Mausmyelomzelllinie P3X 63 HG 8/653 zu den Hybridomzelllinien H-CB-Bru 1 und 2, deren Selektion, Züchtung und Aufarbeitung des zellfreien Überstandes gewonnen. Die verwendeten anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer, Mannheim, BRD) werden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Ausführungsbeispiele

1. Methodik

Ein monoklonaler Antikörper gegen RT von HIV-1 (IgG 1), gereinigt durch Ammoniumsulfatpräzipitation, Ionenaustauschchromatographie an Mono Q-Sepharose und hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose wird mit 0,1 mol/l Karbonatpuffer, pH 9,5, nach bekanntem Verfahren (K. Catt und G. W. Traeger, *Science* 158 [1967], 1570-1572) über Nacht bei 20-25°C an die Oberfläche von Polystyrenmikrotiterplatten (Kavitätenvolumen 400 µl; Flow Laboratories, Meckenheim, BRD) adsorbiert (Benetzungsvolumen 100 µl pro Kavität).

Nach gleichem Verfahren wird ein monoklonaler anti-BrdU-Antikörper (IgG 1), gereinigt nach o. g. Fällungs- und Chromatographieschritten, an die Oberfläche von Polystyrenmikrotiterplatten (Typ: Maxisorb, Nunc, Dänemark) (Benetzungsvolumen 100 µl/Kavität) adsorbiert. Ein monoklonaler anti-DNA-Antikörper (Behringwerke, Marburg, BRD) und ein anti-Digoxigenin-Antikörper, jeweils eingestellt auf eine IgG-Konzentration von 10 µg/ml wird an die Oberfläche von Polystyrenmikrotiterplatten (Benetzungsvolumen 10 µl/Kavität) adsorbiert.

Nach Absaugen der jeweiligen Antikörperlösungen und einmaliger Spülung der Kavitäten mit Aqua dest. erfolgt eine Nachbenetzung der mit anti-RT-Antikörpern beschichteten Polystyrenplatte mit nukleasefreiem Rinderserumalbumin (RSA) (Boehringer, Mannheim, BRD) (Beschichtungskonzentration 10 g/l) und 5% (w/v) Saccharose, gelöst in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2 (Nachbeschichtungslösung) über 60 min bei 20-25°C. Die mit anti-BrdU-Antikörpern, mit anti-DNA-Antikörpern und mit anti-Digoxigenin-Antikörpern beschichteten Platten werden mit der gleichen Lösung nachbeschichtet, wobei das nukleasefreie RSA gegen RSA rüst (Serva, Heidelberg, BRD) ausgetauscht wird.

Zusätzlich werden Mikrotiterplatten (Flow Laboratories, Meckenheim, BRD; Kavitätenvolumen 400 µl) nur mit nukleasefreier RSA-haltiger Nachbeschichtungslösung beschichtet (Benetzungsvolumen 200 µl/Kavität).

Anschließend wird die Flüssigkeit aus den Kavitäten abgesaugt, und die Platten werden 30 min bei 37°C mit Luftumwälzung im Brutschrank nachgetrocknet. Vor Testbeginn werden die Kavitäten einer beschichteten Platte einmal mit Waschpuffer (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,3 mol/l NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) gespült und anschließend trockengesaugt.

2. Beispiele

2.1. Allgemeiner RT-Aktivitätstest zur Bestimmung der HIV-1-RT aus Viruslysate
50,0 µl HIV-1-RT enthaltendes Viruslysate, gereinigt aus dem Kulturüberstand HIV-1 infizierter Lymphozyten durch Fällung über Nacht mit 30% (w/v) Polyethylenglycol 6000 (Serva, Heidelberg, BRD), finale Konzentration 10% (w/v), Zentrifugation bei 6000 U/min über 10 min bei 4°C und anschließender Pelletierung des Virus bei 25000 U/min über 60 min bei 4°C, welches in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,8, 2 mmol/l Dithiothreitol, 0,2% (v/v) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, BRD) und 20% (v/v) bidestilliertem Glycerol aufgenommen wird, werden zusammen mit 50 µl RT-Puffer folgender Zusammensetzung

Substanz	finale Konzentration
RSA	0,1 mg/ml
BrdUTP (bzw. Digoxigenin-11-dUTP)	0,015 mmol/l
Poly(rA)(dT) ₁₈	0,02 mmol/l
Tris/HCl pH 8,1 (Serva)	50 mmol/l
DTT	5 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
KCl	150 mmol/l
EGTA	0,5 mmol/l
Gluthation	0,3 mmol/l
Glycerol	0,1%
Triton X-100	0,05%

in den nur mit nukleasefreien RSA-beschichteten Platten 90 min bei 37°C inkubiert. Im Parallelansatz wird im RT-Puffer das BrdUTP durch Digoxigenin-11-dUTP ausgetauscht (Konzentration 0,015 mmol/l). Anschließend werden für den Nachweis des inkorporierten BrdU 50 µl/Kavität 0,4 mol/l NaOH zugegeben, und nach einer Hydrolysezeit von 15 min bei 37°C wird die Lösung durch Zugabe von 100 µl/Kavität 0,5 mol/l Citrat-Phosphat-Puffer, pH 7,0 neutralisiert. 50 µl dieser Lösung werden in die mit monoklonalem anti-BrdU-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten dosiert, in deren Kavitäten unmittelbar zuvor 50 µl Peroxidase-markierte monoklonale Antikörper, eingestellt auf eine Konzentration von 5 g IgG/l, dosiert wurden. Für den Nachweis des inkorporierten Digoxigenin-dUTP werden 50 µl aus dem Parallelansatz entnommen und in die mit anti-Digoxigenin-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Enzymimmunoassayplatte dosiert, in die unmittelbar zuvor 50 µl der 1:2000 verdünnten Stammlösung peroxidase-markierter anti-Digoxigenin-Antikörper pipettiert wurden. Nach kurzem Schütteln werden die jeweiligen Reaktionsgemische 120 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Gemische abgesaugt, und die Kavitäten werden dreimal mit Waschpuffer (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,3 mol/l NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen. Nach Abtrennung der ungebundenen Reaktanten erfolgt die Substratreaktion mit o-Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid (100 µl je Kavität) nach bekanntem Verfahren (T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23 [1985], 41-44) durch Zugabe von 100 µl/Kavität. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird die Enzym-Substratreaktion durch Zugabe von 100 µl/Kavität 2,0 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Anschließend werden die Kavitäten bichromatisch bei 492 und 690 nm vermessen.

2.2. Allgemeiner RT-Aktivitätstest zur Bestimmung von hochgradig gereinigter AMV-RT
Hochgradig gereinigte AMV-RT (Boehringer, Mannheim, BRD) wurde mit dem BrdUTP- bzw. Digoxigenin-11-dUTP- und Template-Primer-freien RT-Reaktionspuffer (siehe Beispiel 1) auf eine Volumenaktivität von 0,20 U/ml eingestellt und von hier bis zu einer Aktivität von 0,02 U/ml linear verdünnt.

50 µl von den AMV-RT-Lösungen der unterschiedlichen Aktivität wurden zusammen mit 50 µl doppelt konzentriertem RT-Reaktionspuffer mit BrdUTP bzw. mit Digoxigenin-11-dUTP- und Template-Primer in den mit nukleasefreiem RSA beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte inkubiert. Alle übrigen Reaktionsbedingungen gleichen denen von Beispiel 2.1. Von dem AMV-RT-freien RT-Reaktionspuffer wurden 21 Bestimmungen als Leerwertkontrolle durchgeführt. Die Summe aus dem Extinktionsmittelwert dieser Bestimmungen und dessen dreifachen Standardabweichung wurden als untere Nachweisgrenze definiert. Zur Einschätzung der analytischen Empfindlichkeit wurden verschiedene AMV-RT-Konzentrationen 10fach bestimmt und der Extinktionsbereich vom Extinktionsmittelwert $\times E_{492nm} \pm 3SD$ ermittelt.

2.3. HIV-1-spezifischer RT-Aktivitätstest

100 µl des geometrisch mit BrdUTP- und Template-Primer-freien RT-Puffer verdünnten Viruslysats werden in die mit dem anti-HIV-1-RT-Antikörper beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte dosiert und 30–90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgesaugt, und nicht gebundene Bestandteile werden durch dreimaliges Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer entfernt. Für die nachfolgende enzymatische RT-Reaktion werden 100 µl RT-Puffer (siehe Allgemeiner RT-Aktivitätstest, Beispiel 1) in die Kavitäten dosiert und 90 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Schritt an verläuft der Test weiter wie unter Allgemeiner RT-Aktivitätstest, Beispiel 2.1., beschrieben.

Zur Spezifitätskontrolle des Tests gegenüber HIV-1 assoziierter RT wurde AMV-RT, eingestellt auf eine Volumenaktivität von 50 Einheiten (U)/ml, geometrisch bis zu einer Aktivität von 0,09 U/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Verdünnungen wurden in die mit Anti-HIV-1-RT-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatten dosiert und 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen der Lösung und dreimaligem Spülen der Kavitäten mit Waschpuffer wird der Test wie unter Beispiel 2.1. beschrieben weitergeführt.

3. Ergebnisse

Zu Beispiel 2.1.: HIV-RT läßt sich unter der im Beispiel 2.1. beschriebenen Methode mit BrdUTP bis zu einer Aktivität von 0,20 U/ml nachweisen. Mit Digoxigenin-11-dUTP liegt die Nachweisgrenze zwischen 0,05 und 0,10 U/ml. Die höhere Empfindlichkeit ist wahrscheinlich durch die Vermeidung der Probenverdünnung durch Hydrolyse und Neutralisation bedingt, wie sie im Falle des BrdUTP-Nachweises im Einzelstrang durch den Zwei-Seiten-Bindungsassay nicht zu umgehen ist (Abb. 2). Zu Beispiel 2.2.: Die untere Nachweisgrenze für AMV-RT liegt bei 0,03 U/ml. Auch hier wird mit dem Nachweis des inkorporierten Digoxigenin-11-dUTP eine doppelt so hohe Empfindlichkeit (0,015 U/ml) erzielt. Die Extinktionen im Immunoassay zum Nachweis von Poly-BrdUTP verhalten sich über den Bereich von 0,02 bis 0,2 U/ml RT linear zur eingesetzten RT-Aktivität (Abb. 1). Die analytische Empfindlichkeit bei der Erfassung der geringsten Differenz zweier unterschiedlicher RT-Konzentrationen beträgt für beide Systeme 0,01 U/ml (Abb. 1).

Zu Beispiel 2.3.: Der HIV-RT-Aktivitätsnachweis ist um den Faktor 5–10 (BrdUTP) und 10–20 (Digoxigenin-11-dUTP) empfindlicher als der Nachweis der RT-Aktivität des gleichen Präparates im Allgemeinen RT-Aktivitätstest, bedingt durch Entfernung von hemmenden Substanzen (PEG) vor der RT-Reaktion (Abb. 2). AMV-RT-Aktivität läßt sich in diesem Test nicht nachweisen, da sie über den anti-HIV-1 RT Antikörper nicht gebunden und demzufolge durch die nachfolgende BF-Trennung vor der RT-Enzymreaktion aus dem Reaktionsgefäß entfernt wurde (Abb. 2).