



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

213 066

Int.Cl.³

3(51) G 01 N 33/54

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N/ 2466 371

(22) 28.12.82

(44) 29.08.84

(71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN, DD

(72) RENNEBERG, REINHARD, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOCHEM.;

SCHOESSLER, WERNER, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.; JAENCHEN, MICHAEL, DR. RER. NAT.; DD;

(54) VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITAET VON MARKER-ENZYMEN BEIM ENZYMIMMUNOASSAY

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Messung der Aktivität von Marker-Enzymen in einem gekoppelten System von Enzymimmunoassay mit amperometrischen Elektroden. Das Verfahren ist für die Messung der Aktivität von Marker-Enzymen in Enzymimmunoassays im klinischen Labor, der Veterinärmedizin, der Phytopathologie und der biowissenschaftlichen Forschung geeignet.

Dr. R. Renneberg
Dr. W. Schößler
Dr. M. Jänchen

"Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Marker-Enzymen
beim Enzymimmunoassay"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Marker-Enzymen beim Enzymimmunoassay (EIA). Das Verfahren ist besonders für den Einsatz in klinischen Labors, in der Veterinärmedizin, der Phytopathologie und der biowissenschaftlichen Forschung geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Grundprinzip des EIA ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der einer der Reaktionspartner an ein Enzym gekoppelt ist (Konjugat), dessen enzymatische Aktivität als Nachweiskriterium der immunologischen Reaktion fungiert. Für die Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern gibt es eine Vielzahl von Varianten des EIA. So können sowohl die Antigene als auch die Antikörper an eine feste Phase adsorbiert werden (ELISA-Technik) als auch in homogener Phase (EMIT-Technik) bestimmt werden. Einige Varianten des EIA verwenden einen weiteren speziesspezifischen Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die Aktivität der Marker-Enzyme wird über die Messung des Substratumsatzes in der Mehrzahl der EIA spektralphotometrisch bestimmt. Das hat vor allem bei der EMIT-Technik den Nachteil, daß Trübungen und die Eigenfarbe der Probe oder von Nachweisreagenzien die Messung stören. Bei einer Reihe von Assays sind zudem teure Hilfsenzyme, Kofaktoren und Substrate

nötig, um das Reaktionsprodukt der markerenzymkatalysierten Reaktion in ein spektral gut auswertbares Produkt umzuwandeln. Weiterhin ist die Bestimmung der Aktivität des Marker-Enzyms mit Thermistoren (Börrebaeck, C., Börjeson, J., Mattiasson, B., Clin. Chim. Acta (1978), 86, 267), fluorimetrisch (Aikawa, T., Suzuki, S., Murayama, M., Hashiba, K., Kitagawa, T., Ishikawa, E., Endocrinol. (1979), 105, 1) und durch Chemilumineszenz (Velan, B., Halmann, M., Immunochemistry (1978) 15, 331) bekannt. Andererseits wurden Enzymimmunosensoren entwickelt (Aizawa, M., Marioka, A., Suzuki, S., Nagamura, Y., Anal. Biochem. (1979) 94, 22); bei denen ein elektrochemischer Sensor mit einer Membran bespannt wird, an der Antikörper immobilisiert sind. Gemessen wird bei diesen Sensoren die Aktivität der an der antikörperbeschichteten Membran über die Antigene gebundenen Marker-Enzyme. Unvoreteilhaft ist hierbei, daß der Probendurchsatz von der Dauer der Inkubation in der Meßzelle (bis zu mehreren Stunden) limitiert ist. Eine Verwendung der Enzymimmunosensoren für serienmäßige Schnellbestimmungen ist dadurch nicht möglich. Bekannt ist auch die Auswertung von EIA mit Hilfe potentiometrischer Elektroden (Meyerhoff, M. E., Rechnitz, G. A., Anal. Biochem. (1979) 95, 483, Alexander, D. W., Maltra, C., Anal. Chem. (1982) 54, 82). Dabei erfolgt die Inkubation außerhalb der Meßzelle und die Bestimmung der Aktivität von Marker-Enzymen durch Probenahme. Der Nachteil der potentiometrischen Bestimmung liegt jedoch in der langen Einstellzeit der Elektrode (10 bis 20 min), die dadurch keine serienmäßigen Schnellbestimmungen erlaubt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Nachteile der bekannten Lösungen zu umgehen und ein Verfahren zu entwickeln, das die Bestimmung der Aktivität von Marker-Enzymen im Enzymimmunoassay mit hoher Genauigkeit, hohem Probendurchsatz, unabhängig von

den optischen Eigenschaften der Probelösungen ohne oder mit stark verringertem zusätzlichem Verbrauch von Hilfsenzymen und ohne zusätzliche Kofaktoren oder Farbstoffe gestattet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, die Aktivität von Marker-Enzymen durch amperometrische Methoden schnell und exakt zu bestimmen. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß nach einer Vorinkubation außerhalb der Meßzelle der Substratumsatz durch das Marker-Enzym in einer Meßzelle amperometrisch direkt mit einer Sauerstoffelektrode oder aber nach Umwandlung eines elektroinaktiven Reaktionsproduktes in elektroaktive Produkte durch immobilisierte Enzyme mit einer Enzymelektrode bestimmt wird.

Bei der Messung der Aktivität des Marker-Enzyms mittels einer Sauerstoffelektrode werden als Marker-Enzyme zweckmäßigerweise Katalase, Peroxidase, Glukoseoxidase, Hämoglobinderivate und Hämine verwendet.

Zur Messung der Aktivität des Marker-Enzyms mit einer Enzymelektrode werden β -Galactosidase, alkalische Phosphatase und Glucoamylase benutzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren arbeitet mit hoher Genauigkeit und ermöglicht einen schnellen Probanddurchsatz. Die optischen Eigenschaften der Probelösungen spielen hierbei keine Rolle. Zusätzliche Hilfsenzyme, Kofaktoren oder Farbstoffe sind nicht erforderlich.

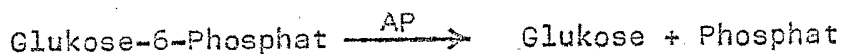
Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachstehend an zwei Ausführungsbeispielen erläutert.

1. Beispiel

Amperometrische Messung der Aktivität des Marker-Enzyms alkalische Phosphatase im Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Faktor-VIII-Antigen

Polystyrolröhrchen werden adsorptiv mit Faktor VIII-Antigen (5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet und nachfolgend dreimal mit PBS-Puffer, pH = 8,0, der 0,1 % Tween 20, 0,5 m NaCl enthält, gewaschen. Anschließend wird ein Inkubationsgemisch (0,5 ml), bestehend aus dem zu bestimmenden Plasma und einem im Überschuß vorhandenen Kaninchen-anti-human-Faktor VIII-Antikörper, in die Polystyrolröhrchen überführt und 6 h bei 37°C stehengelassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen werden 0,5 ml eines Konjugats (3 $\mu\text{g/ml}$) - bestehend aus einem Hammel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, der mittels Glutaraldehyd an das Enzym alkalische Phosphatase gebunden wurde - zugegeben und nach mehrstündiger Inkubation und nachfolgendem Auswaschen die Enzymaktivität bestimmt. Hierzu wird über den Mantel einer Sauerstoffelektrode ein Dialyseschlauch gespannt, auf den eine Enzymmembran, die 40 U/cm² Glukoseoxidase (GOD) in Gelatine enthält, gelegt wird. Diese Enzymmembran wird mit einem weiteren Dialyseschlauch zur Lösungsseite hin befestigt. Die so präparierte Elektrode taucht in die gerührte Pufferlösung ein (Na-Phosphatpuffer, pH 7,0). Nach einer entsprechenden Inkubationszeit mit 10 mM Glucose-6-phosphat in den Teströhrchen des EIA, während der das Substrat vom Marker-Enzym alkalische Phosphatase (AP) in 2 ml Diäthanolaminpuffer (pH 9,8) umgesetzt wird:



wird die Reaktion im Teströhrchen durch Zugabe von 50 μl konzentrierter HCl-Lösung abgestoppt. 0,5 ml der Reaktionslösung werden in die elektrochemische Meßzelle verbracht. Der Abfall des kathodischen Stromes (O_2 -Verbrauch) bzw. der An-

stieg des anodischen Stromes (H_2O_2 -Bildung) ist der Konzentration der durch die alkalische Phosphatase gebildeten Glukose und damit der Aktivität des Marker-Enzyms proportional. Auf der Grundlage einer Eichkurve erfolgt die Bestimmung der Aktivität des Marker-Enzyms bzw. der Konzentration des Faktor VIII assoziierten Antigens.

2. Beispiel

Amperometrische Messung der pseudoperoxidatischen Aktivität von Methämoglobin im Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG
Grundlage dieses EIA ist das sogenannte sandwich-Prinzip. Hierzu werden konstante Mengen ($10 \mu\text{g/ml}$) Hammel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper adsorptiv unter Verwendung eines $0,1 \text{ m}$ Natriumcarbonat/bicarbonat-Puffers, $\text{pH} = 9,6$, an Polystyrolröhrchen gebunden und anschließend dreimal mit PBS-Puffer, der $0,2 \%$ Rinderserumalbumin und $0,05 \%$ Tween 20 enthält, gewaschen. Nachfolgend erfolgt die Zugabe definierter (aber unterschiedlicher) Mengen von reinem Kaninchen-IgG in o. g. Puffer und Inkubation bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen wird eine geeignete Verdünnung eines Konjugats, bestehend aus dem Hammel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper und Methämoglobin, zugegeben und nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C und nachfolgendem Auswaschen des Konjugats die enzymanaloge, pseudoperoxidatische Aktivität des Hämoglobins bestimmt. Dazu wird eine Sauerstoffelektrode verwendet, die mit einem Dialyseschlauch bespannt wird. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit mit 15 mM O-Phenylendiamin in Natriumcitratpuffer ($\text{pH} 5,0$) und 5 mM H_2O_2 wird die Reaktion durch Zugabe von HCl gestoppt. $0,5 \text{ ml}$ der Reaktionslösung werden in die elektrochemische Meßzelle verbracht. Aus dem Anstieg des kathodischen Stromes kann über eine Eichkurve der Verbrauch von H_2O_2 und damit die pseudoperoxidatische Aktivität von Methämoglobin bestimmt werden. Aus der Aktivität des Methämoglobins wird die Konzentration an IgG ermittelt.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Marker-Enzymen in inkubierten Proben von Enzymimmunoassays mittels einer Indikatorelektrode, dadurch gekennzeichnet, daß die mit einer Substratlösung versetzte Probe in eine elektrochemische Meßzelle überführt und anschließend die Enzymaktivität des Marker-Enzyms über die mit einer Sauerstoffelektrode oder Enzymelektrode angezeigte Stromstärke gemessen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit der Sauerstoffelektrode die Aktivität des Marker-Enzymes in der Meßzelle über die Messung des Verbrauchs von O_2 und H_2O_2 oder die Bildung von H_2O_2 bestimmt wird, wozu als Marker-Enzyme Katalase, Peroxidase, Glukoseoxidase, Hämoglobinderivate und Hämine verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit der Enzymelektrode auf der Basis einer modifizierten Sauerstoffelektrode der Verbrauch von O_2 oder H_2O_2 oder die Bildung von H_2O_2 bestimmt wird, wozu als Marker-Enzyme β -Galactosidase, alkalische Phosphatase und Glucoamylase benutzt werden.