

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af et agglomerat dannet af et bindingsmiddel og den tilsvarende acceptorsubstans ved såkaldt "blot overlay assay", i det følgende kaldet blot-overlejringsanalyse. Sidstnævnte substans er sædvanligvis indeholdt i en vandig testprøve og bliver på et senere trin af analysen adsorberet på og/eller bundet kovalent til en immobiliseringsmatrix. Eksempler på immobiliseringsmatrixer er nitrocellulose- (NC)-film (tynde plader af salpetersyreforestret cellulose med kendt porøsitet), diazobenzylloxymethyl- (DBM)- og diazophenylthioether- (DPT)-modificeret cellulosepapir, papir eller celluloseacetat aktiveret med cyanogenbromid og nylonbaserede membraner såsom "Gene Screen" og "Zetabind". Sidstnævnte er en nylonmatrix (en polyhexamethylenadipamin betegnet "Nylon 66"), der er modificeret ved indføring af talrige tertiære amino-

15 grupper under fremstillingen. Disse immobiliseringsmatrixer omtales i almindelighed som "blotting media", i det følgende betegnet blottingmedier. (Se for eksempel J.M Gershoni og G.E. Pallade, Analytical Biochemistry 131, 1-15 (1983)).

Blot-overlejringsanalysemetoder kan generelt opdeles i to forskellige teknikker:

20

A. Ved sandwichoverlejringsanalysen knyttes det rensede eller beredede specifikke bindingsmiddel til immobiliseringmatrixen i henhold til B (se nedenfor), fortrinsvis som en lille plet, og acceptorsubstansen gives lejlighed til at binde til det, hvilket resulterer i, at der på matrixen sker immobilisering af acceptorsubstansen, som derefter kan påvises. På grund af det specifikke bindingsmiddels specificitet er det muligt at isolere acceptorsubstansen fra en kompleks testprøve såsom urin, plasma, serum, andre legemsfluidier, cellefri translationssystemer, celle- og vævslysater, etc., og at anvende denne metode til semikvantitative og/eller kvalitative (diagnostiske) analyser: den såkaldte "sandwich blot overlay assay" (SBOA). Hidtil har den praktiske værdi af SBOA været ubetydelig, fordi man kun har haft forholdsvis komplekse påvisningsmetoder til rådighed. Den foreliggende opfindelse gør påvisningen meget enkel, og interessen i at anvende et SBOA til diagnostisk brug kan

35 øges.

B. Ved den direkte blot-overlejringsanalyse knyttes acceptorsubstansen direkte til et aftryksmedium ved en procedure, der er kendt som "transferring", i det følgende kaldet overførsel, eller blotting. For-

skellige metoder dertil er velkendte fra litteraturen. For eksempel anbringes små dråber indeholdende en kendt eller ukendt mængde acceptorsubstans (renset eller ikke) i en vandig opløsning af størrelsesordenen 1 μ l (men andre volumener kan også anvendes) som pletter på blottingmediet for at give acceptorsubstansen mulighed for at blive knyttet til blottingmediet. Sådanne pletaftryk har potentiel anvendelighed til diagnostisk påvisning af tilstedeværelsen af specifikke bindingsmidler for den immobiliserede acceptorsubstans i forskellige legemsfluider. Hvis acceptorsubstansen indgår i en kompleks blanding, kan blandingen først adskilles ved forskellige kromatografiske teknikker såsom tyndtlagskromatografi eller elektroforeseteknikker, for eksempel i polyacrylamidgeler såsom natriumdodecylsulfat- (SDS)-elektroforese, isoelektrisk fokusering, 2-D-gel-elektroforese, gradient gel- og syre-urinstofgelelektroforese og ikke-denaturerende gelelektroforese for at lette identifikation af acceptorsubstansen. I nogle tilfælde som for eksempel til nukleinsyrer kan agargeler også anvendes. De elektroforetisk opløste komponenter (såsom proteiner, peptider og nukleinsyrer) overføres derefter til immobiliseringsmatrixen ved procedurer kendt som kapillar-, vakuum- eller elektrooverførsel (eller -aftrykning). Komponenterne immobiliseres derefter på aftryksmediet under vidtgående bibeholdelse af det oprindelige elektroforetiske mønster. Dette færdige mønster kan gøres synligt ved kendte farvningsteknikker såsom ved hjælp af "amido black" og "coomassie blue" og komponenten, som er under undersøgelse (acceptorsubstansen), kan påvises (se senere) og dens placering sammenlignes med hele det elektroforetiske mønster.

Hidtil har de fleste af de anvendte specifikke bindingsmidler været proteiner, som bindes til veldefinerede områder i acceptorsubstansen. Lectiner anvendes til påvisning af glycoproteiner. Polyklonale og monoklonale antistoffer til påvisning af de tilsvarende antigener eller haptenener (for eksempel biotin eller biotinylerede DNA-prober med antibiotin, DNP på dinitrophenylerede proteiner med anti-DNP). Blot-overlejringsanalyser anvendes allerede i vid udstrækning til påvisning af antistoffers specificitet og til screening af produktionen af monoklonale antistoffer. Ud over disse i vid udstrækning anvendte systemer kan mange andre indbyrdes protein-protein (for eksempel calmodulin- eller actin-bindingsproteiner) eller protein-ligand (for eksempel avidin-biotin) reaktioner, hvor den ene af komponenterne immobiliseres, analyseres. Blandt disse er DNA-protein- og RNA-proteinreaktioner, receptor-ligand-

reaktioner og i almindelighed vilkårlige andre indbyrdes makromolekylemakromolekylereaktioner af tilstrækkelig specificitet og affinitet.

En væsentlig del af blot-overlejringsanalyserne er den metode, der anvendes til synliggørelse af den immobiliserede acceptorsubstans. Der eksisterer både direkte og indirekte teknikker. Ved synliggørelsen benyttes markører: radioaktive isotoper (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S eller ^{125}I) efterfulgt af autoradiografisk fremkaldelse, enzymer som kan danne uopløselige farvede produkter eller fluorochromer. Ved direkte metoder bindes markøren til det specifikke bindingsmiddel. Ved indirekte metoder bindes det til et makromolekyle, som specifikt kan bindes til det første specifikke bindingsmiddel. Hvis sidstnævnte er et antistof, kan makromolekylet være protein A eller et sekundært antistof. Flertrinsteknikker, som avidinbiotinyleret peberrodsperoxidasekompleks- (ABC)-metoden og umærket peroxidase-antiperoxidase-(PAP)-metoden kan også anvendes til antistoffer.

Det væsentlige punkt ved den foreliggende opfindelse er anvendelsen af en dispersion af et metal eller en metalforbindelse eller en kerne, som er belagt med et metal eller en metalforbindelse til synliggørelse og/eller påvisning ved aftryksanalyseteknikker. Som udtrykket "kolloidale metalpartikler" anvendes i den foreliggende sammenhæng, indbefatter det dispersioner af partikler, eventuelt en sol, bestående af et metal, en metalforbindelse eller en kerne belagt med et metal eller en metalforbindelse.

Kolloidale metalpartikler kan fremstilles ved hjælp af fremgangsmåder, som er kendte inden for området, for eksempel til fremstilling af kolloidalt guld, sølv eller jernoxid og lignende. Kolloidale metalpartikler kan knyttes direkte eller indirekte til det specifikke bindingsprotein eller acceptorsubstansen eller til et makromolekyle, som bindes specifikt til det første specifikke bindingsmiddel, for eksempel protein A, sekundært antistof (når der er tale om et primært antistof) eller streptavidin og avidin (når der er tale om, at en af komponenterne er biotinyleret) under bibeholdelse af størsteparten af den oprindelige bindingsaktivitet ved at følge fremgangsmåder, som er kendte inden for området. Ved knytning forstås enhver kemisk eller fysisk binding såsom binding via kovalente bindinger, via hydrogenbroer, polær tiltrækning og adsorption.

Det har nu vist sig, at når et blottingmedium, hvortil der enten indirekte (se A) eller direkte (se B) er knyttet en acceptorsubstans,

inkuberes med en passende koncentration af et specifikt bindingsmiddel mærket med kolloidale metalpartikler (direkte påvisningsmetode) eller først med et umærket specifikt bindingsmiddel og derefter med et makromolekyle mærket med kolloidale metalpartikler (indirekte påvisningsmetode), vil akkumuleres kolloidale metalpartikler på de specifikke bindingssteder, som overraskende bliver synlige som den karakteriske farve for de anvendte kolloidale metalpartikler. For eksempel opnås der en lyserød til mørkerød farve, når et metal som guld anvendes, og en gul til brun/sort farve, når sølv anvendes. Denne farve udgør et signal, som kan aflæses kvalitativt med det blotte øje eller eventuelt måles ved kendte spektrofotometriske metoder, såsom densitometri.

Partikelstørrelsen af de kolloidale metalpartikler er fortrinsvis mellem 3 nm og 100 nm og mere foretrukket mellem 5 nm og 50 nm.

Som eksempler på kolloidale metalpartikler, der kan knyttes til specifikke bindingsmidler, er metallerne platin, guld, sølv og kobber og metalforbindelserne sølviodid, sølvbromid, hydratiseret kobberoxid, jernoxid, jernhydroxid eller hydratiseret jernoxid, aluminiumhydroxid eller hydratiseret aluminiumoxid, chromhydroxid eller hydratiseret chromoxid, vanadinoxid, arsensulfid, manganhydroxid, blyulfid, kviksølvulfid, bariumsulfat og titandioxid blevet beskrevet. Det er også kendt, at kolloider bestående af kerner belagt med ovennævnte metaller eller metalforbindelser kan anvendes. Disse partikler har lignende egenskaber som metal- eller metalforbindelsekolloiderne, men størrelse, densitet og metalindhold kan kombineres optimalt. I almindelighed kan alle kolloidale metalpartikler eller metalforbindelser, som kan bindes til specifikke bindingsmidler uden ødelæggelse af deres bindingsaktivitet, og som vil give en farveintensitet ved aftryksanalyse, som er tilstrækkelig til at kunne ses med det blotte øje, anvendes. Sensitiviteten er fortrinsvis lig med eller bedre end den, der opnås med guld eller sølv.

Anvendelsen af kolloidale metalpartikler, specielt guldsoler, som er dækket på overfladen med specifikke bindingsmidler såsom antistoffer, lectiner, protein A, avidin og mange andre, eller selv acceptorproteiner såsom antigener er nu veletableret ved mange cytokemiske mærkningsteknikker inden for transmissions- og scanningelektronmikroskopi. Et eksempel på anvendelse af en kolloidal metalpartikel bestående af en polymer belagt med et metal er dextran belagt med jern, som, når det knyttes til antistoffer, frembringer en meget værdifuld markør til transmissionselektronmikroskopi. Disse anvendelser udnytter imidlertid disse markø-

rers typiske elektronopacitet (transmissions EM) eller deres kapacitet til at emitte sekundære elektroner eller give tilbagekastning af primære elektroner (scanning EM).

5 Kolloidale metalpartikler, navnlig partikler fremstillet af guld og sølv, anvendes også som markører ved cytokemiske mærkningsteknikker i forbindelse med lysmikroskopi, efter at det har vist sig, at akkumulering af sådanne kolloidale metalpartikler på bindingssteder i vævspræparater eller på celleoverflader kan ses, forudsat at præparatet betragtes gennem et lysmikroskop.

10 Kolloidale metalpartikler anvendes også til visse kvalitative og kvantitative in vitro bestemmelser af immunologiske komponenter såsom haptener, antigener og antistoffer i vandigt medium. Disse teknikker er blevet kaldt solpartikelimmunoanalyser og passiv guldagglutinerings ("Geoghegan").

15 Den passive guldagglutinerings teknik er baseret på agglutinerings af et guldmærket antigen (guldparkler 18 til 20 nm) med umærket antistof og indbefatter anvendelse af et standardmikrotitersæt, hvori ikke-aggregeret guld flyder ned langs fordybningernes sider og danner en rød stribe. Denne teknik er analog med klassisk passiv hægagglutinerings og er
20 ligeså følsom og er blevet hævdet muligvis at kunne anvendes til omvendt agglutinerings, hvor det er antistoffet, som mærkes med guld.

Solpartikelimmunoanalyser ligger inden for to kategorier. Den første kaldes homogen solpartikelimmunoanalyse og er baseret på agglutinerings af antistofmærkede kolloidale partikler med immunokemisk di- eller
25 multivalente antigener eller med haptener koblet til et bærerprotein. Agglutinerings resulterer i en farvereduktion målt kolorimetrisk med puffer som blindprøve. Agglutinerings af de kolloidale metalpartikler kan derefter inhiberes af frie haptentmolekyler fra prøven. Sådanne metoder beskrives i europæisk patentskrift nr. 0007654.

30 Den anden type solpartikelimmunoanalyse er baseret på bundet/fri kolloidal metalpartikelkonjugatadskillellesmetoder, som er analoge med radioimmunoanalyse og enzymimmunoanalyse. Sådanne metoder beskrives i europæisk patentskrift nr. 0007654. En sådan metode kaldes "Sandwich Sol Particle Immunoassay" (SSPIA) og er analog med en sandwich ELISA eller
35 fastfasesandwichradioimmunoanalyse. Ved en typisk SSPIA adsorberes et antistof mod antigenet, som skal bestemmes, først på overfladen af en mikrotitreringsplade (for eksempel fremstillet af polystyren). En prøve (antigenstandard eller blindprøve) opløst i et passende puffersystem af-

pipetteres i fordybningerne, som er belagt med antistof, og inkuberes på passende måde. Guldmærket antistof tilsættes, og reaktionsblandingen inkuberes yderligere. Fordybningerne suges tomme og vaskes for at fjerne ubundet konjugat. Endelig frigøres det bundne immunkompleks sammen med
5 de homogeniserede kolloidale metalpartikler. Enten inspiceres farveintensiteten af den opnåede dispersion visuelt, eller metalkoncentrationen måles ved hjælp af et kolorimeter. Den visuelle inspektionsmetode (for eksempel farven af det dispergerede guld) har kun kunnet anvendes ved højere antigenkoncentrationer.

10 Det bør bemærkes, at solpartikelanalyser også er blevet beskrevet som værende værdifulde til ikke-immunologiske analyser, i almindelighed "til påvisning og/eller bestemmelse af én eller flere komponenter fra reaktionen mellem et specifikt bindingsprotein og den tilsvarende substans, som kan bindes, i en vandig testprøve under anvendelse af sådanne
15 komponenters kendte bindingsaffinitet for hinanden, hvorved der anvendes én eller flere mærkede komponenter, som er opnået ved direkte eller indirekte kobling af den ønskede komponent fra reaktionen til partikler af en vandig dispersion af et metal, en metalforbindelse eller en polymer kerne, som er belagt med et metal eller en metalforbindelse med en partikelstørrelse på mindst 5 nm, og der under reaktionen eller efter en passende reaktionstid eventuelt efter adskillelse af bundne og fri mærkede komponenter foretages en bestemmelse af de fysiske egenskaber og/eller af mængden af metallet og/eller af det dannede metalholdige agglomerat i testprøven eller én af de opnåede fraktioner på kendt måde,
20 hvilken bestemmelse giver en kvalitativ og/eller kvantitativ indikation for komponenten eller komponenterne, som skal påvises og/eller bestemmes.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af kolloidale metalpartikler som markører ved blot-overlejringsanalysemetoder. Denne anvendelse er helt ny og har overraskende vist sig at være mulig.
30

Som udtrykket kolloidale metalpartikler anvendes, indbefatter det en dispersion af et metal, en metalforbindelse eller en kerne belagt med et metal eller en metalforbindelse.

Anvendelsen af kolloidale metalpartikler som markører gælder alle
35 former for aftryksanalyser og giver den fordel, at kolloidale metalpartikler, som akkumuleres på bindingsstederne ved aftryksmediets overflade, bliver direkte synlige for det blotte øje med en følsomhed, som i det mindste er sammenlignelig med den meget høje følsomhed af eksiste-

rende teknikker, såsom enzymbaserede aftryksanalyser. Det understreges, at opfindelsen ikke ville have nogen praktisk værdi uden sidstnævnte punkt. Det har den vigtige fordel, at analysen kan aflæses uden behov for en sekundær enzymatisk reaktion, autoradiografi eller et betragtnings-
5 ningssystem for fluorescerende farver eller for en frigørelse af de bundne kolloidale metalpartikler for efterfølgende måling med det blotte øje (lav følsomhed), ved kolorimetri eller CRAAS (højere følsomhed) som ved sandwichsolpartikelimmunoanalyse. Den væsentligste fordel ved metoden er, at den er så enkel i kraft af, at farven fremkaldes under reaktion-
10 tionen. Dette gør det muligt at afbryde reaktionen, når det ønskede signal er frembragt, eller at kalibrere systemet for at opnå et forudbestemt resultat inden for en fastsat tidsgrænse.

Anvendelsen af guldmærkede antistoffer er meget enklere end og ligeså følsom som en efter den almindelige opfattelse meget følsomme immunoperoxidasemetode. Denne simple analyse kan anvendes til et testud-
15 styr til indirekte påvisning af tilstedeværelsen af specifikke bindingsmidler for en acceptorsubstans, som er knyttet til blottingmediet, og et med kolloidale metalpartikler mærket specifikt bindingsmiddel for det første specifikke bindingsmiddel. Hvis det specifikke bindingsmiddel er
20 et antistof, kan det være et med kolloidale metalpartikler mærket sekundært antistof eller protein A. Den vil i praksis kunne anvendes som en meget simpel dyppepindsprøve, for eksempel en Spot-blot-overlejringsanalyse til hurtig screening for tilstedeværelsen af antistoffer for et udvalgt antigen i en vandig testprøve, såsom serum.

25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Omhandlede fremgangsmåde omfatter således, at man i på hinanden følgende trin

- i. immobiliserer acceptorsubstansen på en immobiliseringsmatrix
30 kendt som blottingmedium
- i.i. enten ved direkte adsorption og/eller kovalent binding, i almindelighed kaldet blotting, eventuelt efter anvendelse af en procedure til elektroforetisk adskillelse og anvendelse af en procedure til overførsel eller blotting fra det
35 elektroforetiske medium til blottingmediet og efterfølgende undertrykkelse af tilbageværende proteinbindingssteder på kendt måde såsom ved anvendelse af BSA, gelatine, PEG eller Tween 20,

- i.ii. eller ved at lade acceptorsubstansen blive bundet af et specifikt bindingsmiddel, som er blevet immobiliseret på blottingmediet ved, at aftryksmediet bringes i kontakt med en vandig opløsning, der indeholder acceptorsubstansen,
- 5 ii. i et givet tidsrum bringer blottingmediet fra i) i kontakt med
- ii.i. enten med kolloidale metalpartikler mærkede specifikke bindingsmidler i en passende koncentration eller
- ii.ii. først umærket specifikt bindingsmiddel i en passende koncentration og derefter et med kolloidalt metal mærket
- 10 protein, som er specifikt for det umærkede specifikke bindingsmiddel,
- hvorefter aftryksmediet vaskes og lufttørres, og
- iii. aflæser det farvede signal, som er frembragt af og karakterisk for de bundne kolloidale metalpartikler ved overfladen af blottingmediet med det blotte øje eller ved anvendelse af kendte spektrofotometriske teknikker såsom densitometri.

Opfindelsen angår også testudstyr til anvendelse til den direkte eller indirekte bestemmelse af én af komponenterne i reaktionen mellem

20 et specifikt bindingsmiddel og den tilsvarende acceptorsubstans ved en blot-overlejringsanalyse, hvilket udstyr omfatter en med kolloidale metalpartikler mærket komponent, som er opnået ved at koble en komponent i reaktionen eller en komponent, som kan anvendes til indirekte at påvise denne reaktion, til kolloidale metalpartikler, som defineret ovenfor,

25 samt andre reagenser. Hvis reaktionen er af den immunologiske type, kan testudstyret anvendes til sandwich-blot-overlejringsanalyser (se eksempel III) og til påvisning af tilstedeværelsen i serum af antistoffer for udvalgte antigener (se eksempel I).

I en udførelsesform af opfindelsen gøres der brug af den kendsgerning, at påvisningen af de kolloidale metalpartikler, som er bundet til

30 overfladen af blottingmediet, som resultat af en blot-overlejringsanalyse også kan synliggøres indirekte og/eller forbedres ved anvendelse af en fysisk fremkalder, som kan reduceres til de tilsvarende metaller. Egne fysiske fremkaldere er for eksempel sølvlactat, sølvnitrat og lignende. Når for eksempel sølv anvendes som fysisk fremkalder, finder

35 reaktionen fra start sted ved overfladen af metalpartiklerne, som katalyserer reduktionen, og bliver derefter autokatalytisk på disse partikler. Det resulterer i dannelse af et sort, stærkt kontrastgivende sig-

nal, som er tilvejebragt ved akkumulering af metallisk sølv. Dette giver en betragtelig forøgelse af følsomheden. For at opnå lysufølsomme sølvpræcipitater har man også fundet ud af, at aftrykene må fikseres med et fiksativ, som anvendes til mikrofotograftryk.

- 5 Fysiske fremkaldere har været anvendt i mange år til synliggørelse af vandopløselige metaller, navnlig metalsulfider i væv (se Danscher, Histochemistry 71, 1-16, 1981). Metalsulfiderne og metallisk sølv har en katalytisk virkning på reduktionen af sølvioner. Kolloidalt guldmetal i væv kan også vises med en fysisk fremkalder, og dette er blevet udnyttet af Holgate et al. (J. Histochem. Cytochem. 31, 938-944, 1983)) til indfø-
10 føring af immunoguld/sølvfarvningsmetoden, som resulterer i en følsomhed, som er langt bedre end den oprindelige immunoguldfarvningsmetodes.

- Hovedfordelen ved denne udførelsesform ligger i den meget store følsomhed, som overstiger følsomheden af alle andre eksisterende påvisningsmetoder til blot-overlejringsanalyse. Den kan også benyttes, når
15 brugeren ønsker at økonomisere med mængden af reagenser, som anvendes, eller når der er ekstremt små mængder acceptorsubstans og/eller specifikt bindingsmiddel til rådighed.

- I en yderligere udførelsesform anvendes et fotografisk fiksativ, hvorved baggrunden mindskes, og stabiliteten af reaktionsproduktet af
20 den fysiske fremkalder forbedres.

Opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel I

- 25 En simpel Spot-blot-overlejringsimmunoanalyse til indirekte påvisning af antistoffer mod hundehjernetubulin og -calmodulin med guldmærkede sekundære antistoffer i serum fra immuniserede kaniner.

I.1 Fremstilling af antisera

30

I.1 Fremkaldelse af antisera

- 1 mg hundehjernetubulin (ekstraheret fra SDS-polyacrylamidgeler) i 1,0 ml puffer (0,1M PIPES, pH 6,9) eller 1 mg elektroforetisk rent hundehjernetcalmodulin (i H₂O) blandedes med 1,0 ml komplet Freund's adjuvans
35 (DIFCO). Efter homogenisering injiceredes antigenet intradermalt 5 steder langs rygsøjlen på hvide kaniner. Boosterinjektioner blev givet hver 4. uge. Antigen fremstilledes på samme måde, bortset fra at der anvendtes ukomplet Freund's adjuvans. 1 uge efter hver booster, tappedes

der blod fra kaninerne (± 60 ml blod), og serum fremstilledes og opbevarede i portioner ved -20°C indtil brug.

1.2 Kolloidalt guldmærkede sekundære antistoffer

- 5 Disse blev leveret fra Janssen Life Sciences Products, 2340 Beerse, Belgien. Kode: GAR G20. Der er tale om affinitetsrensede gedeantistoffer mod kanin IgG, som er mærket med 20 nm kolloidale guldpartikler.

Fremstilling af nitrocellulosepapirstrimler med antigenholdige pletter

- 10 Ti 10 μl dråber af 4-fold seriefortyndinger (begyndende med 250 ng/ μl) af ren tubulin i 0,1M PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , pH 6,75 eller ren calmodulin i H_2O anbragtes som pletter i en række på tørre nitrocellulosestrimler (6 cm x 0,6 cm). Når pletterne var tørret (ca. 5 minutter) undertryktes tilbageværende proteinbindingssteder på strimlerne
15 ved inkubation med en opløsning af 5% oksealbumin (BSA) i 20 mM Tris-pufret saltvand, pH 8,2 i 30 minutter ved 37°C .

1.3 Testprotokol for påvisning af tubulin- og calmodulinantistoffer.

Sammenligning af anvendelsen af guldmærkede antistoffer med

- 20 ABC-peroxidasepåvisningsmetoden

Den under hele proceduren anvendte puffer var 0,1% BSA-Tris (0,1% BSA i 20 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl pH 8,2, 20 mM NaN_3), med mindre andet er anført.

- 25 a. Inkubation med primært antiserum

- 2 strimler inkuberedes med 1 ml kaninantitubulinserum, 1:1000 fortyndet i 0,1% BSA-Tris, i tilproppede 5 ml plastreagensglas ved stuetemperatur i 2 timer.
- 2 strimler inkuberedes som ovenfor med samme antiserum
30 absorberet på tubulin bundet kovalent til Sepharose-4B for at tjene som kontrol for antigenspecificitet.
- 2 strimler inkuberedes som ovenfor med 1 ml kaninanticallmodulinserum, 1:1000 fortyndet i 0,1% BSA-Tris, ved stuetemperatur i 2 timer.
- 35 - 2 strimler inkuberedes som ovenfor med samme absorberet på calmodulin bundet kovalent til Sepharose-4B.

Efter inkubation med de absorberede og ikke-absorberede primære antiserer vaskedes strimlerne 3 x 10 minutter i 0,1% BSA-Tris. 1 strimmel

fra hvert par inkuberedes yderligere med GAR G20 (se 1.3.b).

Den anden inkuberedes med det meget følsomme Vectastain ABC immunoperoxidaseudstyr fra Vector Laboratories anvendt i overensstemmelse med fabrikantens instruktioner (se 1.3.c).

5

b. Inkubation med guldmærket sekundært antistof: GAR G20

De vaskede strimler (se 1.3.a) inkuberedes med GAR G20, fortyndet til O.D. $\frac{1 \text{ cm}}{520 \text{ nm}} = 0,2$ i 0,1% BSA-Tris + 0,4% gelatine, i 2 timer. Efter denne inkubation vaskedes strimlerne i 0,1% BSA-Tris i 2 x 10
10 minutter og lufttørredes.

c. Inkubation med Vectastainudstyret

De vaskede strimler (se 1.3.a) inkuberedes med sekundær biotinylet antistofopløsning (1:200 i 0,1% BSA-Tris) i 1 time. Strimlerne vaskedes i et overskud af 0,1% BSA-Tris i 3 x 10 minutter og inkuberedes derefter i avidin-biotinylperoxidasekomplekset i 1 time. Komplekset fremstilledes i henhold til fabrikantens instruktioner: 100 μl reagens A (avidin DH) sættes til 10 ml PBS (Dulbecco's, uden Mg^{2+} og Ca^{2+}). 100 μl reagens B (biotinylet peberrodspoxidase) tilsættes under kontinuert
15 omrøring. Komplekset anvendtes efter 5 minutter. Strimlerne vaskedes i 0,1% BSA-Tris (2 x 10 minutter) og derefter i 100 mM Tris-HCl-puffer, pH 7,6. Den immobiliserede peroxidase gjordes derefter synlig med 4-chlor-1-naphtol som substrat: 20 mg 4-chlor-1-naphtol opløstes i 1 ml ethanol og fortyndedes yderligere med 20 ml 100 mM Tris-HCl-puffer, pH 7,6, op-
20 varmet til ca. 50°C. 200 μl 1% H_2O_2 tilsættes, og substratopløsningen anbragtes på strimlerne med en sprøjte gennem et mikrofilter (0,2 μm , millipore) monteret på sprøjten. Reaktionen fik lov til at forløbe i 5 minutter og blev afbrudt ved, at strimlerne vaskedes med H_2O og lufttørredes.

30

1.4 Vurdering

Ved ABC-proceduren påvises positiv reaktion som en blå farve. Når kolloidalt guld anvendes, opnås der ved positiv reaktion en lyserød-rødlig farve med den anvendte guldpartikelstørrelse (større guldpartikler, for eksempel 40 nm giver en purpuragtig farve). Følsomheden er den samme
35 for begge metoder og er i størrelsesordenen 5 ng/ μl for tubulin og 30 ng/ μl for calmodulin under de anvendte betingelser. Specificiteten vises ved den negative reaktion, når de pågældende antisera adsorberes af de-

res respektive antigen.

Eksempel II

- 5 Screening for tilstedeværelse af monoklonale museantistoffer for mikrotubulusassocierede proteiner i kultursupernatanter fra hybridomer i vækst under anvendelse af guldmærkede gedeantistoffer mod muse IgG.

2.1 Immunisering af mus

- 10 Mus (Balb/C) fik injiceret en homogeniseret blanding (se eksempel 1.1) rottehjernemikrotubulusproteiner (100 µg/mus) (fremstillet ved to cykler af temperaturafhængig polymerisation-depolymerisation) og komplet Freund's adjuvans. Injektioner gives subkutan 5 steder på ryggen. Boosterinjektioner af antigen (100 µg) fremstillet med ukomplet Freund's adjuvans blev givet 3 gange med 14 dages mellemrum. 3 dage før fusion af 15 miltcellerne med myelomcellelinien boostedes mus ved intravenøs injektion af 50 µg antigen/mus i 100 µl PBS-puffer.

2.2 Fusion af miltceller med NS-1-myelomceller

- 20 NS-1-celler fusioneredes med miltceller fra to immuniserede mus på kendt måde, og de resulterende hybridomer dyrkedes i 5 plader med 96 fordybninger (Nunc) ved 37°C i en vandmættet atmosfære indeholdende 7% CO₂. Efter ca. 2 ugers vækst udtoges 100 µl af kultursupernatanten fra fordybninger indeholdende hybridomer i vækst og testedes for tilstedeværelse af udskilte monoklonale antistoffer (se 2.4).

25

2.3 Fremstilling af nitrocellulosepapirstimler, på hvilke et mønster af proteiner fra en SDS-polyacrylamidgel er blevet bundet ved elektroblotting

- 30 SDS-polyacrylamidgelelektroforese af antigenet (2 x polymeriserede mikrotubulusproteiner) udførtes efter Laemmli's metode på en 7,5% gel. Antigenet, som var opløst og kogt i prøvepuffer, fyldtes oven på stabiliseringsgelen som et kontinuert lag, 300 µg pr. gel. Når farvefronten havde migreret 3 cm ind i separeringsgelen, blev elektroforesen afbrudt. En lille lodret strimmel af gelen blev udskåret til "coomassie blue" farv- 35 ning, og resten anvendtes til elektroblotting på nitrocellulosepapir. Gelen ligevægtsindstilledes i overføringspuffer [25 mM Tris-192 mM glycin/20% (vol/vol) methanol ved pH 8,3] i 30 minutter ved stuetemperatur. Gelen anbragtes på et nitrocelluloseark (udblødt i puffer på forhånd),

og der blev draget omsorg for at undgå eller fjerne alle indesluttede luftbobler. Arket anbragtes mellem to stykker filterpapir, som var udblødt på forhånd, og to nylonnetpuder. Dette resulterede i en tæt pasning i et lukket elektrodeskellet i et EC-elektroblotapparat, hvori

5 elektroblotting udførtes natten over ved 400 mA ved stuetemperatur. Efter elektroforetisk overførsel undertrykkedes resterende proteinbindingssteder på nitrocellulosepapirarket ved inkubation af arkene i 5% BSA i 20 mM Tris-pufret saltvand, pH 8,2 i 30 minutter ved 37°C. Nitrocellulosearket blev derefter udskåret i 3 mm brede strimler parallelt

10 med elektroforeseretningen. Disse strimler anvendtes til screening af supernatanten for hybridomceller.

2.4 Påvisning af monoklonale antistoffer

100 µl af hver hybridomkultursupernatant overførtes til 3,5 cm lange 0,5 ml Eppendorf tips og fortyndedes 1:5 med 0,4 ml 0,1% BSA-Tris.

15 Tips og strimler forsynedes med et kodenummer. Hver tip forsynedes med 1 strimmel og de inkuberedes i 2 timer. Strimlerne vaskedes portionsvis i et overskud af 0,1% BSA-Tris og inkuberedes også portionsvis med GAM G20 (gedeantimuse IgG, mærket med 20 nM kolloidale guldpartikler) fra

20 Janssen Life Sciences Products, 2340 Beerse, Belgien. GAM G20 fortyndedes med 0,1% BSA-Tris + 0,4% gelatine til en O.D. $\frac{1 \text{ cm}}{520 \text{ nm}} = 0,1$ og omsattes natten over. Strimlerne vaskedes med 0,1% BSA-Tris og H₂O og lufttørredes.

Positiv reaktion var klart synlig som lyserøde til rødlige bånd (se

25 vedføjede eksempler) svarende til proteinbånd med en given molekylmasse. Denne meget simple screeningsprocedure ikke blot identificerer antistofudskillende hybridomer, men giver også umiddelbar information om specificiteten af det pågældende antistof og er derfor til stor hjælp ved udvælgelse af interessante antistofudskillende hybridomer.

30

Eksempel III

En sandwichimmunoblot-overlejringsanalyse til påvisning af antigener i en vandig testprøve: påvisning af IgG'er i en vandig testprøve.

35 3.1 Analyseprincip

En lille dråbe ($\pm 1 \mu\text{l}$) af et rensat eller beriget antistof, som er monospecifikt for antigenet, som skal bestemmes, bindes ved blotting på en strimmel nitrocellulosepapir (eller et hvilket som helst bekvemt

blottingmedium), tørres, og fri proteinbindingssteder undertrykkes (se eksempel 1.3). Disse antistofholdige undertrykte strimler kan eventuelt vaskes i vand, lufttørres og opbevares. Strimlen inkuberes derefter med et volumen antigenholdig testopløsning i et fast tidsrum. Efter udvaskning af ikke-bundne stoffer inkuberes strimlerne yderligere med passende fortyndet, med kolloidale metalpartikler (for eksempel en sol af guld eller sølv) mærket monospecifikt antistof lig det, der er adsorberet på aftrykningsmediet. Eventuelt kan der anvendes to monoklonale antistoffer, som genkender forskellige antigeniske epitoper. Det ene knyttes til blottingmediet, det andet knyttes til kolloidale metalpartikler. Under faste betingelser vil analysen være i stand til at påvise en forudbestemt minimal koncentration af antigen og kan anvendes som en kvalitativ diagnostisk test, forudsat at den kan påvise en som minimum nødvendig koncentration i en given testopløsning.

15

3.2 Eksempel på princippet: påvisning af kanin IgG'er i en pufret opløsning af kanin IgG med kendt koncentration

For at afprøve muligheden for at realisere denne nye sandwichanalyse udførtes følgende forsøg:

- 20 - 6 strimler nitrocellulosepapir på 6 x 0,6 cm forsynedes med dråber (1 μ l) indeholdende faldende mængder ($\frac{1}{2}$ fortyndingsrække begyndende ved 125 ng/ μ l) affinitetsrensedede gedeantistoffer mod kanin IgG (GAR IgG) som beskrevet i eksempel 1.2.
- 25 - Resterende proteinbindingssteder undertrykkedes som beskrevet i eksempel 1.2. 1 strimmel (nr. 6) vaskedes i 20 mM Tris-puffer-saltvand, sugedes tør på filterpapir, lufttørredes og anvendtes efter tør opbevaring natten over ved stuetemperatur.
- 30 - De resterende 5 strimler inkuberedes i tilproppede plastreagensglas i 30 minutter ved stuetemperatur som følger:
 - nr. 1: med RIGG, 1 ml, 1 μ g/ml,
 - nr. 2: med RIGG, 1 ml, 0,25 μ g/ml,
 - nr. 3: med RIGG, 1 ml, 0,063 μ g/ml,
 - 35 nr. 4: med RIGG, 1 ml, 0,015 μ g/ml,
 - nr. 5: med RIGG, 1 ml, 0 μ g/ml.

Kanin IgG fortyndedes i 0,1% BSA-Tris. Strimmel nr. 6 inkuberedes med 0,25 μ g/ml RIGG.

- Strimlerne vaskedes 2 x 10 minutter i 0,1% BSA-Tris.
- Alle strimlerne inkuberedes i nøjagtig 1 time ved stuetemperatur i GAR G20 (gedeantistoffer mod kanin IgG, mærket med kolloidale guldpartikler på 20 nm i diameter) fra Janssen Life Sciences Products, 2340 Beerse, Belgien.
- 5 GAR G20 fortyndedes til en O.D. $\frac{1 \text{ cm}}{520 \text{ nm}} = 0,2$ med 0,1% BSA-Tris + 0,4% gelatine.
- Strimlerne vaskedes med 0,1% BSA-Tris efterfulgt af vand og lufttørredes.

10

3.3 Vurdering

- Pletter indeholdende så lidt som 15 ng adsorberet GAR IgG blev synlige som lyserøde pletter efter inkubation i kun 30 minutter i 1 ml af en opløsning indeholdende 15 ng/ml RIgG efterfulgt af inkubation med 1
- 15 ml GAR G20, $0,0520 \text{ nm} = 0,2$ i 1 time. Opløsninger indeholdende mindst denne mængde RIgG ville være blevet anført som positive. Resultatet for strimmel nr. 6 er identisk med resultatet fra strimmel nr. 2, hvilket indikerer, at strimlerne kan tørres efter undertrykkelsestrinnet under bibeholdelse af antistofaktiviteten.

20

Eksempel IV

- Direkte påvisning af et antigen knyttet til NC-papir med kolloidalt sølvmærket primært antistof: påvisning af pletter af muse IgG'er ved hjælp af med kolloidalt sølv mærkede gedeantistoffer mod muse IgG.
- 25 - NC-papirstrimler (6 cm x 0,6 cm) forsynedes med pletter af muse IgG (1 μ l) indeholdende en 2-fold seriefortynding fra 250-0,4 ng/ μ l, som beskrevet i eksempel 1.2.
- De resterende proteinbindingssteder undertrykkedes som i eksempel 1.2.
- 30 - Strimlerne inkuberedes med med kolloidalt sølv mærkede gedeantistoffer mod muse IgG (fra E.Y. Laboratories, SP-0011), fortyndet 1:100 i 0,1% BSA-Tris, i 1 time og 30 minutter ved stuetemperatur.
- Strimlerne vaskedes 2 x 10 minutter med 0,1% BSA-Tris
- 35 H₂O og lufttørredes.
- Positive pletter karakteriseredes ved en gul farve. Under disse betingelser kunne ± 30 ng i en 1 μ l plet påvises.

Eksempel V

Testning af specificiteten af et affinitetsrenset kaninantistof mod
kyllingekråseactin for actin i et totalt cellelysats af sekundære kultu-
rer af kyllingeembryolungeepithelceller ved anvendelse af en blot-over-
5 lejringsanalyse og guldmærket sekundært antistof efterfulgt af sølvfor-
stærkning.

5.1 Fremstilling af antiactinantiserum

Elektroforetisk rent kyllingekråseactin homogeniseredes og injice-
10 redes i kaniner som beskrevet for tubulin og calmodulin i eksempel 1.1.
Serum fremstilledes og opbevaredes som beskrevet i eksempel 1.1.

5.2 Affinitetsrensning af antistoffet mod actin

Actin kobledes til Sepharose-4-B-CNBr (Pharmacia) i overensstemmel-
15 se med fabrikantens instruktioner. Antistoffet rensedes direkte fra se-
rum. Sidstnævnte inkuberedes med den antigenholdige gel. Der anvendtes
20 ml serum til 10 mg koblet antigen. Efter 2 timers inkubation hældtes
gelen i en kolonne og vaskedes med 10 mM Tris-pufret saltvand (TBS),
indtil O.D. ved 280 nm var næsten nul. Ikke-specifikt adsorberende mate-
20 riale elueredes med TBS indeholdende 1M NaCl efterfulgt af vask med TBS.
Det specifikke antistof elueredes med 0,1M glycine-HCl-puffer ved pH 2,8.
1 ml fraktioner neutraliseredes straks med 100 μ l 1M Tris-HCl-puffer, pH
8,5. Antistofkoncentrationen målt ved 280 nm under anvendelse af en
 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 14,3. Portioner af de eluerede antistoffer opbevaredes ved -20°C
25 uden yderligere behandling.

5.3 Dyrkning af kyllingeembryolungeepithelceller

Embryoniske kyllingelungeepithelceller isoleredes fra 14 dage gamle
kyllingeembryolunger. Vævet fintdeltes manuelt og tryptiniseredes i
30 0,25% trypsin i Ca^{2+} og Mg^{2+} fri Hanks balanceret saltopløsning ved 37°C
i 20 minutter. Reaktionen blev afbrudt med medium og 10% FCS. Efter cen-
trifugering og resuspension overførtes cellerne til en 75 cm² T-kolbe og
henstilledes for tilknytning i 12 til 24 timer, før mediet ændredes. Ef-
ter 3 til 5 dage under kultur tryptiniseredes cellerne kortvarigt (2 til
35 3 minutter i 0,25% trypsinopløsning) og blev udstrøget på petriskåle, 9
cm Ø, og anvendtes efter 3 til 5 dage under kultur, når cellerne var
sammenflydende. Cellerne dyrkedes i Eagles minimum essentielle medium
suppleret med ikke-essentielle aminosyrer og 10% kalvefostereserum i en

atmosfære af fugtig luft indeholdende 5% CO₂ ved 37°C.

5.4 Fremstilling af totalt celle-SDS-lysat af kyllingeembryolungeepithelceller

- 5 Celler dyrket i petriskåle, 9 cm Ø, vaskedes i Ca²⁺ og Mg²⁺ frit PBS (Dulbecco's) og opsamledes med en gummibeklædt spatel og nedsænkedes i absolut acetone ved -20°C i Eppendorf tip (1,5 ml). Acetonen afdampedes, og den tørre celleremanens opløstes i kogende SDS-prøvepuffer indeholdende 1 mM TAME (en proteaseinhibitor). Uopløselige rester efter cen-
- 10 trifugering bortkastedes. SDS-geler (ifølge Laemmli) af dette lysat seriefortyndet med prøvepuffer og farvet med "coomassie blue" anvendtes for at vurdere den mest passende fortynding af prøven. 1:16 anvendtes til den efterfølgende elektroforetiske overførsel til en Gene screen membran (fra NEN). 1 overføringsenhed dannedes af 1 bane af et sådant
- 15 fortyndet lysat og 1 bane af en blanding af rensede referenceproteiner: Ch.g. filamin, Ch.g. myosin (H + L chain), Ch.g. α-actinin, BSA, rottehjernetubulin, svinemavetropomyosin, hver med 0,06 µg pr. bane.

- Pufferfronten fik nu lov til at nå bunden af gelen, og elektroforetisk overførsel til Gene screen membranen udførtes nøjagtig som i eksempel 2.3. Blotenheden blev udskåret og de resterende proteinbindingssteder undertrykt som beskrevet i eksempel 1.2 og 2.3. Inkubation med antistof mod actin (0,5 µg/ml) og GAR G20 (O.D. 520 nm = 0,2), og fortynding af GAR G20 med 0,1% BSA-Tris + 0,4% gelatine udførtes i lukkede plastposer af omtrent samme størrelse som arket i 2 timer hver på samme
- 25 måde som beskrevet i eksempel 2.4.

Efter 2 timers inkubation med GAR G20 vaskedes arkene med 0,1% BSA-Tris og forberedtes til sølvforstærkning. På dette tidspunkt var et lyserødt-rødt bånd med samme mobilitet som actin i lysatet og svarende til actin i proteinblandingen allerede synligt.

30

5.5 Sølvforstærkning

- Arkene vaskedes i 2 minutter i 1:10 fortyndet citratforrådspuffer. Denne puffer indeholder 100 ml 25,5 g trinitriumcitrat og 23,5 g citronsyre til et pH på 4.
- 35 - Arkene inkuberedes derefter i 15 minutter omhyggeligt beskyttet mod lys i en fysisk fremkalder indeholdende
 - 60 ml deioniseret H₂O,
 - 0,85 g hydroquinon i 15,0 ml deioniseret H₂O,

10 ml citratpuffer pH 4,

0,11 g sølv lactat i 15,0 ml deioniseret H_2O .

Sølv lactatet beskyttes omhyggeligt mod lys og tilsættes de andre komponenter lige før brug.

- 5 - Efter reaktionstiden vaskedes arkene i et overskud af H_2O og behandlede med Agefix (1:4 i H_2O), et fotografisk fiksativ.
- Arkene vaskedes igen i et overskud af H_2O og lufttørres.

10

5.6 Resultater

Båndet, som tidligere kunne ses som et lyserødt-rødligt farvet bånd, var nu blevet dybt sort. Antistoffet mod actin kan anses for ekstremt specifikt og har givet tilfredsstillende resultater for immunocy-
15 tokemisk farvning af actinholdige strukturer i de dyrkede celler.

5.7 Konklusion

Denne sølvforstærkning øger påvisningsmetodens kontrast og følsomhed stærkt. For eksempel var påvisningsgrænsen 3 i stedet for 30 ng/plet
20 efter kun 5 minutters reaktion, hvis prøven i eksempel IV, der farvedes med antistoffer mærket med kolloidalt sølv, fremkaldtes yderligere.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse ved blot-over-
lejringsanalyse af et agglomerat dannet af et bindingsmiddel og den til-
svarende acceptorsubstans omfattende

5 i) immobilisering af acceptorsubstansen på et blottingmedium ved direkte adsorption og/eller covalent binding og undertrykkelse af de tilbageværende bindingssteder, eller immobilisering af acceptorsubstansen på et blottingmedium ved at lade acceptorsubstansen blive bundet af
10 et specifikt bindingsmiddel, som er blevet immobiliseret på blottingmediet, efterfulgt af undertrykkelse af tilbageværende bindingssteder, **KENDETEGNET** ved, at

ii) blottingmediet yderligere bringes i kontakt med et bindingsmiddel mærket med kolloidale metalpartikler, eller
15 blottingmediet bringes i kontakt med et umærket specifikt bindingsmiddel og efterfølgende med for det umærkede specifikke bindingsmiddel specifikt protein mærket med kolloidalt metal; og

iii) med det blotte øje eller under anvendelse af spektrofotometriske teknikker, eventuelt efter påføring af en fysisk fremkalder, på-
20 viser eller bestemmer det farvede signal, som frembringes af og er karakteristisk for de bundne kolloidale metalpartikler på stedet mellem det specifikke bindingsmiddel og den tilsvarende acceptorsubstans ved blottingmediets overflade.

25 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **KENDETEGNET** ved, at der som specifikt bindingsmiddel benyttes et specifikt bindende protein.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, **KENDETEGNET** ved, at blottingmediet vaskes før aflæsning af signalet ved overfladen deraf.

30

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, **KENDETEGNET** ved, at der som kolloidale metalpartikler anvendes guld, sølv, platin eller forbindelser af disse metaller eller jern- eller kobberforbindelser med en partikelstørrelse mellem 3 nm og 100 nm.

35

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, **KENDETEGNET** ved, at der som kolloidale metalpartikler anvendes guld eller sølv med en partikelstørrelse mellem 3 nm og 100 nm.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, **KENDETEGNET** ved, at der benyttes guld og/eller sølv med en partikelstørrelse mellem 5 og 50 nm.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, **KENDETEGNET** ved, at den endelige påvisning af de kolloidale metalpartikler gennemføres efter anvendelse af en fysisk fremkalder.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, **KENDETEGNET** ved, at der som fysisk fremkalder anvendes en som indeholder sølvioner og et reduktionsmiddel.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, **KENDETEGNET** ved, at der benyttes en fysisk fremkalder, som indeholder søvlactat eller sølvnitrat.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, **KENDETEGNET** ved, at der benyttes en fysisk fremkalder, som indeholder hydroquinon.

11. Testudstyr til påvisning eller bestemmelse af en af komponenterne i reaktionen mellem et specifikt bindingsmiddel og den tilsvarende acceptorsubstans ifølge generelle metoder til blot-overlejringsanalyse, **KENDETEGNET** ved, at det omfatter

- a) med kolloidale metalpartikler mærkede komponenter, som forårsager et farvet signal på reaktionsstedet mellem acceptorsubstansen og det specifikke bindingsmiddel ved overfladen af et blottingmedium;
- b) komponenter til en fysisk fremkalder; og
- c) andre reagenser.

12. Testudstyr ifølge krav 11, **KENDETEGNET** ved, at de andre reagenser er valgt blandt

- i) puffere
- ii) ikke-mærket bindingsmiddel og
- iii) en fikserende opløsning.