



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 1 / Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **281 420 A5**5(51) **C 12 Q 1/48**
G 01 N 33/535

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 Q / 306 366 7	(22)	26.08.87	(44)	08.08.90
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Behrendt, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schmidt, Gerhard, Dr. rer. nat., DD				
(73)	siehe (71)				
(54)	Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen				

(55) molekulare Sonden; Markierung; Nachweisverfahren; Kopplung; Enzyme; Substrat; Cosubstrat; feste Phasen; hohe Empfindlichkeit

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mittels markierter molekularer Sonden erhöhter Empfindlichkeit, das in der Molekularbiologie, Genetik, Biotechnologie, Phytopathologie, Landwirtschaft, Medizin und Veterinärmedizin angewendet werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß in Lösung befindliche oder an eine feste Phase I gebundene Biomoleküle von einer an ein Enzym gekoppelten molekularen Sonde erkannt werden, das Enzym mit dem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird und das umgesetzte Substrat an einer festen Phase II oder III nachgewiesen wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mittels markierter molekularer Sonden, **gekennzeichnet dadurch**, daß in Lösung befindliche, im Gel enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomoleküle von einer an ein Enzym gekoppelten molekularen Sonde erkannt werden, das an die molekulare Sonde gekoppelte oder abgespaltene Enzym mit einem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates zur Reaktion gebracht und das umgesetzte Substrat an einer festen Phase II oder III nachgewiesen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Nachweis der Biomoleküle in folgenden Schritten durchgeführt wird:
 - a) Erkennungsschritt, in dem die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das in Lösung befindliche, im Gel enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomolekül mit dafür spezifischer Affinität angelagert wird;
 - b) Waschschrift, in dem überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - c) Enzymreaktionsschritt, in dem das Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates durch das Enzym umgesetzt wird;
 - d) Trennschritt, in dem nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat ausgewaschen oder abgetrennt wird;
 - e) Auswertungsschritt, in dem das umgesetzte Substrat an einer festen Phase II oder III gemessen oder durch geeignete Nachweisverfahren nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Erkennungsschritt a) Biomoleküle in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien aufgetrennt werden und die die Biomoleküle enthaltenden Trenn- und Trägermaterialien mit einer die enzymgekoppelten molekulare Sonde enthaltenden Lösung in Kontakt gebracht werden, wobei Biomolekül und markierte molekulare Sonde zu einem Komplex aus Biomolekül und enzymgekoppelter Sonde im Gel oder Trenn- und Trägermaterial umgesetzt werden;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde aus dem Gel oder Trenn- und Trägermaterial ausgewaschen wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) das Gel oder Trenn- und Trägermaterial mit einem zweiten Gel oder Trenn- und Trägermaterial, das das Substrat und das Cosubstrat enthält, in Kontakt gebracht und das Substrat umgesetzt wird;
 - im Trennschritt d) das zweite Gel oder Trenn- und Trägermaterial mit dem umgesetzten Substrat mit einer festen Phase III in Kontakt gebracht und das umgesetzte Substrat an ihr gebunden wird; und nach Waschschriften
 - im Auswertungsschritt e) das umgesetzte Substrat auf der festen Phase III durch Messung der Radioaktivität oder durch Autoradiographie oder ein anderes Verfahren nachgewiesen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß nach den Schritten a und b das Gel oder Trenn- und Trägermaterial, das den Komplex aus Biomolekül und enzymmarkierter molekularer Sonde enthält, mit einer festen Phase II, an die das Substrat gebunden ist, in Gegenwart eines Cosubstrates in Kontakt gebracht und das enzymatisch umgesetzte Substrat auf der festen Phase II nachgewiesen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - sich im Erkennungsschritt a) die an ein Enzym gekoppelte molekulare Sonde und das Biomolekül in Lösung befinden und dort aneinander angelagert werden;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c), in dem das Enzym des Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde in Lösung mit dem Substrat in Gegenwart des Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) die Abtrennung des enzymatisch umgesetzten Substrates vom überschüssigen Cosubstrat durch eine das Substrat selektiv bindende feste Phase III durchgeführt wird; und
 - im Auswertungsschritt e) das umgesetzte Substrat an der festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - im Erkennungsschritt a) die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert wird;

- im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) das Enzym des an eine feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit in Lösung befindlichem Substrat und Cosubstrat zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat abgetrennt und umgesetztes Substrat an eine feste Phase III gebunden wird;
 - im Auswertungsschritt das umgesetzte Substrat an der festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase I mit daran gebundenem Biomolekül und an dieses angelagerter markierter molekularer Sonde nach den Schritten a und b) im Enzymreaktionsschritt c) mit einem Gel oder einem anderen Trenn- und Trägermaterial, in dem sich Substrat und Cosubstrat befinden, überschichtet wird und anschließend im Trennschritt aus dem Gel oder Trenn- und Trägermaterial das umgesetzte Substrat auf eine feste Phase III übertragen und im Auswertungsschritt e) dort nachgewiesen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß
- im Erkennungsschritt a) die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert wird;
 - im Waschschrift b) überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
 - im Enzymreaktionsschritt c) das Enzym des an eine feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit einem an eine feste Phase II gebundenen Substrat in Gegenwart eines sich in Lösung befindlichen Cosubstrates zur Reaktion gebracht wird;
 - im Trennschritt d) überschüssiges Cosubstrat ausgewaschen oder abgetrennt wird; und
 - im Auswertungsschritt e) das umgesetzte Substrat an der festen Phase II gemessen oder autoradiographisch bestimmt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 2 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Erkennungsschritt a) das Biomolekül in einem oder mehreren Erkennungssystemen und in einer oder mehreren Reaktionsstufen zunächst von einem oder mehreren Molekülen mit spezifischer Affinität erkannt oder mit einem oder mehreren Molekülen umgesetzt wird und die mit einem Enzym gekoppelte molekulare Sonde mit mindestens einem dieser Moleküle zur Reaktion gebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 6 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase I, an die das Biomolekül gebunden ist, ein kovalent bindender, ionisch bindender oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, geladenes Polyamid, Diazobenzylloxymethylcellulose, Diethylaminoethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren oder chemisch aktiviertes Glas verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase I in Form eines Flächenmaterials eingesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase II ein das Substrat bindender Träger eingesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat bindender Träger ein kovalent bindender, ionisch bindender oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger eingesetzt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, geladenes Polyamid, Diazobenzylloxymethylcellulose, Diethylaminoethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren, chemisch aktiviertes Glas, Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase II in Form eines optisch durchlässigen Materials eingesetzt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase II in Form eines Flächenmaterials eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3 und 5 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase III ein das Substrat und/oder das enzymatisch umgesetzte Substrat selektiv bindendes Gel, Trenn- oder Trägermaterial eingesetzt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß als selektiv bindendes Gel, Trenn- oder Trägermaterial ein kovalent bindender, ionisch bindender oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger eingesetzt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Träger Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, geladenes Polyamid, Diazobenzoyloxymethylcellulose, Diethylaminoethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren, chemisch aktiviertes Glas, Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose eingesetzt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase III in Form eines optisch durchlässigen Materials verwendet wird.
22. Verfahren nach Anspruch 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß die feste Phase III in Form eines Flächenmaterials verwendet wird.
23. Verfahren nach Anspruch 2, 16 und 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Auswertungsschritt e) an optisch durchlässigen Materialien nach nichtradioaktiven Verfahren mittels optischer Methoden durchgeführt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 6 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Biomoleküle auf die feste Phase I durch Tüpfeln oder nach Auftrennung in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien durch Blottingverfahren aufgebracht werden.
25. Verfahren nach Anspruch 2 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Enzymreaktionsschritt c) mit dem an die molekulare Sonde gekoppelten Enzym oder mit dem von dieser abgespaltenen Enzym durchgeführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als molekulare Sonde, die an ein Enzym gekoppelt ist, ein mono- oder polyklonaler Antikörper, ein Antiserum, ein Protein, ein Peptid, eine einzelsträngige, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder ein Fragment davon, ein Oligodesoxyribonucleotid, eine RNS oder ein Fragment davon, ein Oligoribonucleotid, ein Protein mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül oder eine chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül eingesetzt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Protein mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül Avidin oder Streptavidin ist.
28. Verfahren nach Anspruch 26, **gekennzeichnet dadurch**, daß als chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül Biotin verwendet wird.
29. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte molekulare Sonde eine an das Enzym kovalent gekoppelte Sonde eingesetzt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte Sonde eine mittels Glutaraldehyd, Benzochinon, Bis-succinimidylestern, Bisimidaten oder Aziden gekoppelte molekulare Sonde eingesetzt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte molekulare Sonde eine über ionische Bindungen gekoppelte molekulare Sonde eingesetzt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte molekulare Sonde eine über Polyethylenimin gekoppelte molekulare Sonde eingesetzt wird.
33. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte molekulare Sonde eine über hydrophobe oder andere elektrostatische Wechselwirkungen gekoppelte molekulare Sonde eingesetzt wird.
34. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als markierte molekulare Sonde ein Fusionsprotein aus Enzym und molekularer Sonde verwendet wird.
35. Verfahren nach Anspruch 29, **gekennzeichnet dadurch**, daß die kovalent gekoppelte molekulare Sonde vom Enzym abspaltbar ist.
36. Verfahren nach Anspruch 35, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Abspaltung photochemisch oder reduktiv durchgeführt wird.
37. Verfahren nach Anspruch 1, 25 und 29 bis 33, **gekennzeichnet dadurch**, daß als enzymgekoppelte molekulare Sonde eine an das Enzym reversibel gekoppelte molekulare Sonde eingesetzt wird.

38. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Enzym eine Transferase (E. C. 2) eingesetzt wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Enzym eine Acyltransferase (E. C. 2.3) eingesetzt wird.
40. Verfahren nach Anspruch 38, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Enzym eine Phosphor enthaltende Gruppen übertragendes Enzym (E. C. 2.7) eingesetzt wird.
41. Verfahren nach Anspruch 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phosphor enthaltende Gruppen übertragendes Enzym eine Aminoglucosid-Phosphotransferase (E. C. 2.7.1) eingesetzt wird.
42. Verfahren nach Anspruch 41, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Aminoglucosid-Phosphotransferase eine Kanamycin-Phosphotransferase (E. C. 2.7.1.95) eingesetzt wird.
43. Verfahren nach Anspruch 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phosphor enthaltende Gruppen übertragendes Enzym eine Proteinkinase (E. C. 2.7.1) eingesetzt wird.
44. Verfahren nach Anspruch 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phosphor enthaltende Gruppen übertragendes Enzym eine T4-Polynucleotid-Kinase (E. C. 2.7.1.78) eingesetzt wird.
45. Verfahren nach Anspruch 40, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phosphor enthaltende Gruppen übertragendes Enzym eine Nucleotidyltransferase (E. C. 2.7.7) eingesetzt wird.
46. Verfahren nach Anspruch 45, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleotidyltransferase eine DNS-Polymerase (E. C. 2.7.7.7) eingesetzt wird.
47. Verfahren nach Anspruch 45, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleotidyltransferase eine Polynucleotid-Adenyltransferase (E. C. 2.7.7.19) eingesetzt wird.
48. Verfahren nach Anspruch 45, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleotidyltransferase eine DNS-Nucleotidylexotransferase (E. C. 2.7.7.31) eingesetzt wird.
49. Verfahren nach Anspruch 45, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Nucleotidyltransferase eine Revertase (E. C. 2.7.7.49) eingesetzt wird.
50. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Enzym eine Ligase (E. C. 6) eingesetzt wird.
51. Verfahren nach Anspruch 50, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Ligase ein Phosphorester bildendes Enzym (Repair-Enzyme) (E. C. 6.5) eingesetzt wird.
52. Verfahren nach Anspruch 51, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Phosphorester bildendes Enzym eine DNS-Ligase (E. C. 6.5.11) eingesetzt wird.
53. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat Chloramphenicol eingesetzt wird.
54. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 41, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat ein Aminoglucosid-Antibiotikum eingesetzt wird.
55. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 42, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat Kanamycin, Neomycin, Gentamycin oder Paronomycin eingesetzt wird.
56. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 43, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat phosphorylierbare Proteine eingesetzt werden.
57. Verfahren nach Anspruch 56, **gekennzeichnet dadurch**, daß als phosphorylierbare Proteine Histone eingesetzt werden.
58. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 44, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine RNS, DNS, ein Desoxyribo- oder Ribooligonucleotid oder ein Desoxyribo- oder Ribopolynucleotid eingesetzt wird.
59. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 46, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine doppelsträngige DNS eingesetzt wird.
60. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 47, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine RNS eingesetzt wird.
61. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 48, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine einsträngige oder doppelsträngige DNS eingesetzt wird.
62. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 49, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine einsträngige DNS und ein Starter (primer) eingesetzt werden.
63. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 52, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substrat eine doppelsträngige DNS eingesetzt wird.
64. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, 39 und 53, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat ein ¹⁴C- oder ³H-markiertes Acetat eingesetzt wird.
65. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, 41 bis 44 und 54 bis 58, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat ATP und/oder gamma-³²P-ATP eingesetzt werden.

66. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, 46, 48, 49, 59, 61 und 62, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat ein Gemisch der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate eingesetzt wird, wobei eines oder mehrere Desoxynucleosidtriphosphate in alpha-Stellung durch ^{32}P markiert sind.
67. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, 47 und 60, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat alpha- ^{32}P -ATP oder ein Gemisch aus alpha- ^{32}P -ATP und ATP eingesetzt wird.
68. Verfahren nach Anspruch 1-9, 46, 48, 49, 59, 61 und 62, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat ein durch ^{35}S , ^3H oder ^{125}I markiertes Desoxynucleosidtriphosphat oder ein Gemisch von markierten und ggf. unmarkierten Desoxynucleosid-triphosphaten eingesetzt wird.
69. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, 46, 48, 49, 59, 61 und 62, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat ein biotinyliertes Desoxynucleosidtriphosphat eingesetzt wird.
70. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 und 52, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Cosubstrat DNS oder markierte DNS und/oder Desoxyribopolynucleotide eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mit gesteigerter Empfindlichkeit, das vor allem in der Molekularbiologie, aber auch in der Genetik, der Biotechnologie, der Phytopathologie, der Landwirtschaft, Medizin und Veterinärmedizin angewendet werden kann.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Kopplung von molekularen Sonden an Enzyme (siehe z. B. S. Avrameas, T. Ternynck, J.-L. Guesdon, *Scand. J. Immunol.* [1978] 8, 7-23) und der Nachweis von Biomolekülen mittels enzymgekoppelter Sonden (siehe z. B. *Immunoenzymatic Techniques*, Hsrg. S. Avrameas et al., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1983) ist bekannt. Dabei wurde bisher nur eine sehr begrenzte Anzahl von Enzymen zu Nachweisverfahren herangezogen (z. B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Glactosidase, Glucoamylase, Glucoseoxidase, Glucuronidase, Lactatdehydrogenase, Ribonuclease, Tyrosinase). Ein Grund für diese Einschränkungen ist die schlechte Nachweismöglichkeit für andere Substrate. So wurden vorwiegend Substrate verwendet, die nach der Enzymreaktion farbige Reaktionsprodukte ergaben.

Bei Nachweisverfahren für Biomoleküle, die an feste Phasen gebunden sind, mittels enzymgekoppelter Sonden erfolgte der Nachweis des umgesetzten Substrates bisher stets auf der gleichen festen Phase, auf der sich auch das Biomolekül befand. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Verfahren, bei denen meist wasserunlösliche, farbige Reaktionsprodukte der Substrate auf dem Trägermaterial abgeschieden wurden, ist gering.

Speziell zum Nachweis von Nucleinsäuresequenzen aus minimalen Mengen biologischen Materials werden wesentlich empfindlichere Methoden benötigt.

Bisher war es nicht möglich, Biomoleküle durch enzymgekoppelte Sonden auf einer vom Biomolekül unabhängigen Trägerschicht nachzuweisen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen mit gesteigerter Empfindlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen zu entwickeln, bei dem durch die Verwendung an molekulare Sonden gekoppelter Enzyme und einer speziellen festen Phase zur Bindung und zum Nachweis des umgesetzten Substrates eine höhere Empfindlichkeit als bisher erreicht wird.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß Biomoleküle, die sich in Lösung befinden, im Gel enthalten oder an eine feste Phase I gebunden sein können, vor einer an ein Enzym gekoppelten molekularen Sonde erkannt werden, das an die molekulare Sonde gekoppelte oder abgespaltene Enzym mit einem Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates zur Reaktion gebracht und das umgesetzte Substrat an einer festen Phase II oder III nachgewiesen wird.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird erstmalig eine Methode zur Verfügung gestellt, durch die Erkennungsschritt und Nachweisschritt in Nachweisverfahren von Biomolekülen unter Beteiligung von Enzymen an verschiedenen Phasen, z. B. zwei Flächenträgern, durchgeführt werden und dadurch an der zweiten Phase die Verstärkungsmöglichkeiten durch die Enzymreaktion voll ausgeschöpft werden können.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind nun eine ganze Reihe von Varianten möglich, die jedoch alle in prinzipiellen Schritten ablaufen. Der Nachweis der Biomoleküle erfolgt erfindungsgemäß deshalb in folgenden Schritten:

- a) Erkennungsschritt, in dem die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das in Lösung befindliche, im Gel enthaltene oder an eine feste Phase I gebundene Biomolekül mit dafür spezifischer Affinität angelagert wird;
- b) Waschschrift, in dem überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt wird;
- c) Enzymreaktionsschritt, in dem das Substrat in Anwesenheit eines Cosubstrates durch das Enzym umgesetzt wird;
- d) Trennschritt, in dem nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat ausgewaschen oder abgetrennt wird;
- e) Auswertungsschritt, in dem das umgesetzte Substrat an einer festen Phase II oder III gemessen oder durch geeignete Nachweisverfahren nachgewiesen wird.

Innerhalb eines jeden dieser Schritte sind auf Grund der vielfältigen Techniken zum Nachweis von Biomolekülen wiederum eine Reihe von Variationen möglich. So ist es z. B. denkbar, daß das nachzuweisende Biomolekül in Lösung oder an einer festen Phase gebunden vorliegt. Dabei kann die feste Phase nicht nur ein teilchenförmiger oder Flächenträger sein, sondern auch ein Gel, in dem die Biomoleküle frei beweglich sind, aber nicht gebunden vorliegen. Als Gele kommen die in der Molekularbiologie häufig verwendeten Agarosegele und Polyacrylamid-Gele in Betracht, die in der Regel zu Trennoperationen verwendet werden. Eine Vielfalt von Variationen sind in den Waschschriften und in den Trennschriften möglich, da unter diesen eine Anzahl von Einzelschritten zusammengefaßt sind, die nach bekannten Methoden durchgeführt werden. So können z. B. Waschungen an fester Phase mit verschiedenen, auf das System eingestellten Puffern durchgeführt werden. Es kann aber auch notwendig werden, eine oder mehrere Komponenten abzutrennen, was mittels Säulen, Trenngelen oder durch eine chromatographische Methode erfolgen kann. Andererseits ist es möglich, nur den Komplex von Biomolekül und an das Enzym gekoppelter Sonde abzutrennen und dann im Enzymreaktionsschritt nachzuweisen. Es ist sogar möglich, in einem dieser Schritte das Enzym wieder von der Sonde abzuspalten und dann nur das System auf Grund seiner Reaktion mit Substrat und Cosubstrat an einer festen Phase nachzuweisen.

Folglich existieren auch vielfältige Möglichkeiten zur Ausgestaltung des Enzymreaktionsschrittes. Dieser kann ebenfalls in Lösung stattfinden, er kann an einer festen Phase oder in einem Gel durchgeführt werden. Wird der Enzymreaktionsschritt z. B. in Lösung durchgeführt, muß anschließend das Umsetzungsprodukt des Substrates an eine feste Phase gebunden und dort nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß ein Trägermittel zur Verfügung gestellt wird, das das umgesetzte Substrat selektiv bindet. Wenn jedoch der Enzymreaktionsschritt bereits an fester Phase durchgeführt wird, d. h. das Substrat und/oder das Enzym, das noch an den Komplex aus Biomolekül und molekularer Sonde gekoppelt oder bereits von ihm abgespalten ist, befinden sich an einem festen Träger, dann wird das Substrat an der festen Phase umgesetzt und anschließend, wobei nicht umgesetztes Cosubstrat sorgfältig abgetrennt werden muß, dort nachgewiesen. Auch wenn das Enzym, das von dem Komplex aus Biomolekül und molekularer Sonde abgespalten worden ist, in Lösung vorliegt oder in einem Gel eingeschlossen ist, kann diese Umsetzung an einer festen Phase erfolgen und das umgesetzte Substrat dann an dieser nachgewiesen werden. Die Abtrennung des nicht umgesetzten Substrates kann dabei ebenfalls erfolgen, sie ist jedoch in den meisten Fällen nicht nötig. Einige der bevorzugt durchgeführten Varianten werden im Folgenden näher beschrieben.

Variante I

- a) Biomoleküle werden in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien aufgetrennt und die die Biomoleküle enthaltenden Gele oder anderen Trenn- und Trägermaterialien werden mit einer Lösung, die eine an ein Enzym gekoppelte molekulare Sonde enthält, in Kontakt gebracht, wobei Biomolekül und Sonde miteinander reagieren, so daß ein Komplex aus Biomolekül und enzymgekoppelter molekularer Sonde im Gel entsteht (Erkennungsschritt);
- b) im Waschschrift wird die überschüssige markierte molekulare Sonde aus dem Gel ausgewaschen oder abgetrennt;
- c) im Enzymreaktionsschritt wird das Gel mit einem zweiten Gel oder Trenn- und Trägermaterial, das das Substrat und das Cosubstrat enthält, in Kontakt gebracht und das Substrat umgesetzt;
- d) im Trennschritt wird das zweite Gel oder Trenn- und Trägermaterial mit dem umgesetzten Substrat mit einer festen Phase III in Kontakt gebracht und das umgesetzte Substrat selektiv an ihr gebunden;
- e) nach Waschschriften wird im Nachweisschritt das umgesetzte Substrat auf der festen Phase III durch Messung der Radioaktivität, durch Autoradiographie oder ein anderes geeignetes Nachweisverfahren nachgewiesen.

In einer speziellen Ausführungsform dieses Verfahrens wird nach den Schritten a und b das Gel, das den Komplex aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde enthält, mit einer festen Phase II, an die ein Substrat gebunden ist, in Gegenwart eines Cosubstrates in Kontakt gebracht und das enzymatisch umgesetzte Substrat an der festen Phase II nachgewiesen. Diese spezielle Ausführungsform läßt sich auch als Enzymtest zum Nachweis der Wirksamkeit des Enzyms verwenden, so daß dadurch eine weitere Anwendungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens gegeben ist.

Variante II

- a) Im Erkennungsschritt befinden sich die an ein Enzym gekoppelte molekulare Sonde und das Biomolekül in Lösung und werden dort aneinander angelagert;
 - b) im Waschschrift wird überschüssige markierte molekulare Sonde abgetrennt;
 - c) im Enzymreaktionsschritt wird das Enzym des Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde in Lösung mit dem Substrat in Gegenwart des Cosubstrates zur Reaktion gebracht;
 - d) im Trennschritt wird die Abtrennung des enzymatisch umgesetzten Substrates vom überschüssigen Cosubstrat durch eine das Substrat selektiv bindende feste Phase III durchgeführt; und
 - e) im Auswertungsschritt wird das umgesetzte Substrat an der festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt.
- Der Schritt b), d. h. die Abtrennung der überschüssigen markierten molekularen Sonde, kann z. B. an Säulen, insbesondere Affinitätsäulen, oder an Teilchensuspensionen mit einer Affinitätswirkung erfolgen. Der Enzymreaktionsschritt kann nach dieser Variante mit dem Enzym, das sich gekoppelt an der Sonde und diese wiederum angelagert an das Biomolekül befindet, erfolgen, oder das Enzym kann durch einen zwischengeschalteten Schritt von dem Komplex aus Sonde und Biomolekül abgespalten werden. Dabei kann diese Spaltung sowohl an der ursprünglichen Bindungsstelle von Enzym und molekularer Sonde erfolgen (d. h., es ist eine reversible Bindung) oder es kann in der Molekülkette („spacer“-Molekül), die zur Kopplung von Enzym und molekularer Sonde verwendet worden ist, gespalten werden. Eine solche Spaltung ist natürlich nicht nur in dieser Variante möglich, sondern kann auch in anderen Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführt werden.

Variante III

- a) Im Erkennungsschritt wird die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert;
 - b) Im Waschschrir wird überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt;
 - c) im Enzymreaktionsschritt wird das Enzym des an eine feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit in Lösung befindlichem Substrat und Cosubstrat zur Reaktion gebracht;
 - d) Im Trennschritt wird nicht umgesetztes Cosubstrat und ggf. Substrat abgetrennt und umgesetztes Substrat an eine feste Phase III gebunden; und
 - e) im Auswertungsschritt wird das umgesetzte Substrat an der festen Phase III gemessen oder autoradiographisch bestimmt.
- Nach dieser Variante befinden sich sowohl das Biomolekül, an das die molekulare Sonde angelagert wird, als auch das umgesetzte Substrat jeweils an einer festen Phase. Diese festen Phasen können gleich sein, sind dabei aber immer dem speziellen Biomolekül und dem umgesetzten Substrat angepaßt.
- Der Enzymreaktionsschritt kann wieder mit dem vollständigen Komplex aus Biomolekül, Sonde und gekoppeltem Enzym oder mit dem abgespaltenen Enzym, wie es in der Variante II beschrieben worden ist, durchgeführt werden.
- Eine weitere Variation dieser Verfahrensvariante besteht darin, daß die feste Phase I mit daran gebundenem Biomolekül und daran angelagerter markierter molekularer Sonde nach den Schritten a) und b) mit einem Gel oder anderen Trenn- und Trägermaterial überschichtet wird, wobei sich darin Substrat und Cosubstrat befinden, so die Enzymreaktion durchgeführt und anschließend aus dem Gel das umgesetzte Substrat auf eine feste Phase III übertragen wird.

Variante IV

Diese Variante stellt eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Die Verfahrensschritte werden danach wie folgt durchgeführt:

- a) Im Erkennungsschritt wird die durch ein gekoppeltes Enzym markierte molekulare Sonde an das an eine feste Phase I gebundene Biomolekül angelagert;
 - b) im Waschschrir wird überschüssige markierte molekulare Sonde ausgewaschen und/oder abgetrennt;
 - c) im Enzymreaktionsschritt wird das Enzym des an eine feste Phase I gebundenen Komplexes aus Biomolekül und markierter molekularer Sonde mit einem an eine feste Phase II gebundenen Substrat in Gegenwart eines sich in Lösung befindlichen Cosubstrates zur Reaktion gebracht; und
 - d) im Trennschritt wird überschüssiges Cosubstrat ausgewaschen oder abgetrennt; und
 - e) im Auswertungsschritt wird das umgesetzte Substrat an der festen Phase II gemessen oder autoradiographisch bestimmt.
- Bei dieser Variante besteht die Möglichkeit, und das ist eine völlig neue Art der Durchführung des Nachweises von Biomolekülen, zwei feste Träger, insbesondere Flächenträger, miteinander in Kontakt zu bringen und durch Zugabe der Lösung eines Cosubstrates die Enzymreaktion in Gang zu setzen. Dabei werden Flächenträger bevorzugt, z. B. solche, wie sie in der WP 254012 beschrieben worden sind. Es ist jedoch ebenfalls möglich, Teilchen miteinander umzusetzen, die unterschiedlich beschichtet sind, unter anderem auch Latexpartikel aus Kunststoffen mit einem magnetischen Kern.
- Das Enzym kann im Reaktionsschritt c) sowohl an die molekulare Sonde gekoppelt als auch von ihr wieder abgespalten sein. Dieser letzte Fall ist besonders dann günstig, wenn DNS als Substrat verwendet wird und das Enzym z. B. eine Ligase oder ein anderes Reparatorenzym ist.

Im Erkennungsschritt ist bei allen Verfahrensvarianten möglich, daß bereits hier eine Verzweigung der Reaktion stattfindet oder daß zwischen das Biomolekül und die markierte molekulare Sonde weitere Moleküle zwischengeschaltet werden. Das kann sich bei empfindlichen Enzymen als vorteilhaft erweisen. Es ist dabei möglich, das bekannte Avidin/Biotin-System zu verwenden und damit eine mögliche Verstärkung bereits im Erkennungsschritt auszunutzen. Als letzte Stufe des Erkennungsschrittes erkennt dabei die markierte molekulare Sonde nicht direkt das Biomolekül selbst, sondern die vorhergehenden Reaktionspartner-Moleküle der Kaskade. Folglich besteht im Erkennungsschritt die Möglichkeit, daß das Biomolekül in einem oder mehreren Erkennungssystemen und einer oder mehreren Reaktionsstufen zunächst von einem oder mehreren Molekülen mit spezifischer Affinität erkannt bzw. mit einem oder mehreren Molekülen umgesetzt wird und die mit einem Enzym gekoppelte molekulare Sonde mit mindestens einem dieser Moleküle reagiert.

Als feste Phasen sind eine Reihe von Materialien geeignet, die nach dem Stand der Technik bekannt sind und als Trägermaterialien für Biomoleküle eingesetzt werden. Die feste Phase I, an die das Biomolekül gebunden ist, kann ein kovalent bindender, ionisch bindender oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger sein. Über elektrostatische Wechselwirkungen binden z. B. Nitrocellulose und Polyvinylidenfluorid, während Polyamide (z. B. Nylon-Membranen) oder geladene Polyamide sowie Diethylaminoethylcellulose über ionische Kräfte binden. Kovalent bindende Träger sind z. B. derivatisierte Cellulose, z. B. Diazobenzylloxymethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose (z. B. nach DD-WP 220.316). Darüberhinaus können Polystyren ohne oder mit Aktivierung (z. B. durch Sulfonierung oder Aminierung/ Diazotierung) oder chemisch aktiviertes Glas verwendet werden. Bevorzugt zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden feste Phasen I, die in Form von Flächengebilden vorliegen.

Die feste Phase II ist ein Träger, der das Substrat, das wiederum vom an die molekulare Sonde gekoppelten Enzym abhängt, zu binden vermag. Auch hier können, in Abhängigkeit vom Substrat, wieder kovalent bindende, über ionische Kräfte bindende oder über elektrostatische Wechselwirkungen bindende Träger eingesetzt werden, wie sie bereits genannt worden sind. Folglich kommen für die feste Phase II wiederum Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, geladenes Polyamid, Diethylaminoethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren, chemisch aktiviertes Glas oder andere derivatisierte Cellulosen in Betracht. Vor allem die ionisch bindenden Cellulosen, z. B. Phosphorcellulose (ein Umsetzungsprodukt der Cellulose mit Phosphorsäure und daher Phosphorsäuregruppen an den Anhydroglucoseeinheiten der Cellulose), Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carbonsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose, wie sie z. B. in der WP 254012 oder im DD-WP 237.844 beschrieben worden sind.

In einer besonderen Ausführungsform kann die feste Phase II in Form eines optisch durchlässigen Mediums ausgebildet sein, z. B. einem Film, der das Substrat binden kann. Solche Materialien sind besonders zur routinemäßigen Auswertung, z. B. bei medizinischen Bestimmungsverfahren, besonders geeignet, da eine große Anzahl von Proben gleichzeitig maschinell ausgewertet werden kann. Die feste Phase II wird zum Nachweis bevorzugt als Flächenmaterial eingesetzt; die Filme stellen dann den Fall eines optisch durchsichtigen Flächenmaterials dar.

Die feste Phase III, die das Substrat und/oder das enzymatisch umgesetzte Substrat selektiv binden kann, kann nun ein Gel oder ein anderes Trenn- und Trägermaterial sein. Ebenso kann diese feste Phase III ein kovalent bindender, ein ionisch bindender oder ein über elektrostatische Wechselwirkungen bindender Träger sein. Hier kommen, da die umgesetzten Substrate verschiedenartigster Natur sein können, im Prinzip die gleichen bekannten Materialien in Betracht, wie sie bereits weiter oben beschrieben worden sind, nämlich Nitrocellulose, Polyvinylidenfluorid, Polyamid, modifiziertes Polyamid, Diazobenzoyloxymethylcellulose, Diethylaminoethylcellulose, durch Cyanurchlorid aktivierte Cellulose, aktiviertes Polystyren, chemisch aktiviertes Glas, Phosphorcellulose, Carboxymethylcellulose oder durch Cyanurchlorid und eine Verbindung, die eine Aminogruppe und eine Carboxylsäure-, Phosphorsäure- oder Sulfonsäuregruppe aufweist, modifizierte Cellulose. Auch die feste Phase III kann in Form eines optisch durchlässigen Mediums verwendet werden. Es gelten hier die gleichen Möglichkeiten und Vorteile wie bei der festen Phase II. Bevorzugt wird der Nachweis mit der festen Phase III als Flächenmaterial durchgeführt, wenn sie z. B. als Film, Membran oder als Wirtfaservlies ausgebildet ist. Cellulosematerialien können in Papierform verwendet werden.

Die Auswertung bei den optisch durchlässigen festen Phasen, insbesondere dann, wenn sie in Form eines Filmes ausgebildet sind, erfolgt mittels optischer Methoden, z. B. bei gefärbten Produkten durch Densitometrie, durch Colorimetrie oder Photographie. Die Biomoleküle können auf die feste Phase I nach üblichen Verfahren aufgetragen werden. So werden sie insbesondere durch Tüpfeln, nach der Auftrennung in Gelen oder anderen Trenn- und Trägermaterialien durch sog. Übertragungs- oder Transfertechniken (Blottingverfahren) aufgebracht.

Die molekulare Sonde, die zur Erkennung des Biomoleküls dient, kann ein mono- oder polyklonaler Antikörper, ein Antiserum, ein Protein, ein Peptid, eine einzelsträngige, doppelsträngige oder partiell doppelsträngige DNS oder ein Fragment davon, ein Oligodesoxyribonucleotid, eine RNS oder ein Fragment davon, ein Oligoribonucleotid, ein Protein mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül oder eine chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül sein. Das Protein mit spezifischer Affinität zu einem anderen Biomolekül ist dabei bevorzugt Avidin oder Streptavidin. Die chemische Verbindung mit Affinität zu einem Biomolekül ist bevorzugt Biotin.

Die Kopplung des Enzyms an die molekulare Sonde zu ihrer Markierung kann nach verschiedenen Verfahren, die im Prinzip für bestimmte Enzyme beschrieben sind, erfolgen. Die Bindung der Sonde an das Enzym kann z. B. kovalent durch eine Reihe von bifunktionellen Kopplungsreagenzien erfolgen. Derartige Kopplungsreagenzien sind z. B. Glutaraldehyd, Benzochinon, Bis-succinimidylester wie Bis-sulfosuccinimidylsulfat und Disuccinimidyltartrat, Bisimide wie Dimethylsuberimidat und Dimethyladipimidat, Azide wie N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxy-succinimid oder 4,4'-Dithio-bis(phenylazid). Dabei kann ein Kopplungsmolekül zwei unterschiedliche Gruppen tragen oder ggf. im Molekül reduktiv oder photochemisch spaltbare Gruppen aufweisen. Beispiele für solche Kopplungsreagenzien sind N-Succinimidyl-(4-azidophenyl)-1,3'-dithiopropionat oder Sulfosuccinimidyl-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat.

Weiterhin können molekulare Sonde und Enzym direkt kovalent miteinander verbunden sein. Eine solche Kopplung kann z. B. in Gegenwart von Kondensationsmitteln wie Carbodiimiden durchgeführt werden.

Die Bindung des Enzyms an die molekulare Sonde kann ebenso über ionische Bindungen erfolgen. Eine ionische Bindung kann z. B. direkt zwischen Protein und DNS gebildet werden. In der Regel werden jedoch Reagenzien zugesetzt, die eine Bindung ermöglichen, z. B. Polyethylenimine unterschiedlicher Molmassen, Polyelektrolyte oder Ampholyte.

Da Enzyme über Hydrophobe und hydrophile Bereiche verfügen, ist es möglich, sie auch über elektrostatische Wechselwirkungen an die molekulare Sonde zu binden. Als elektrostatische Wechselwirkungen sollen weiterhin von der Waals'schen Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen verstanden werden.

Ein besonderer Fall ist es, wenn ein Fusionsprotein als markierte molekulare Sonde verwendet wird, das entweder natürlich vorkommt oder gentechnisch erzeugt werden kann. Bei diesen können Enzym und molekulare Sonde direkt miteinander verbunden sein und bereits so hergestellt werden.

Die Kopplungsstelle von molekularer Sonde und Enzym kann nun wieder spaltbar sein. Es werden dann z. B. solche Moleküle eingebaut, wie sie weiter oben bereits genannt wurden, die z. B. eine -S-S-Gruppierung im Molekül aufweisen oder eine photochemisch spaltbare Gruppe. Darüber hinaus kann die Kopplung so durchgeführt werden, daß sie reversibel ist, indem z. B. die oben genannten ionischen Bindungen oder ein über elektrostatische Wechselwirkungen arbeitendes Bindungsprinzip angewendet wird.

Als Enzyme kommen zwei große Gruppen in Betracht, die Transferasen (nach E. C. Gruppe 2) und die Ligasen (E. C. Gruppe 6). Unter den Transferasen werden insbesondere die bevorzugt, die radioaktiv markierbare Gruppen übertragen, z. B. Acyltransferasen (E. C. 2.3), Phosphor enthaltende Gruppen übertragende Enzyme (E. C. 2.7) oder Polymerasen (E. C. 2.7.7). Insbesondere werden folgende Enzyme als besonders geeignet zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrachtet:

An:inoglucoSID-Phosphotransferase (E.C. 2.7.1), insbesondere die
Kanamycin-Phosphotransferasen (E.C. 2.7.1.95),
Proteinkinasen (E.C. 2.7.1),
T4-Polynucleotid-Kinase (E.C. 2.7.1.78),
Nucleotidyltransferasen (E.C. 2.7.7),
DNA-Polymerasen (E.C. 2.7.7.7),
Polynucleotid-Adenyltransferase (E.C. 2.7.7.19),
DNS-Nucleotidylxotransferase (E.C. 2.7.7.31),
Revertasen (E.C. 2.7.7.49),
Phosphorester bildende Enzyme (repair enzymes) (E.C. 6.5),
DNS-Ligasen (E.C. 6.5.11).

Jedes dieser Enzyme reagiert nun mit einem speziellen Substrat. Die im folgenden aufgeführten Substrate gelten folglich nicht für jedes Enzym, sondern nur für solche, für die das Substrat spezifisch ist. Manche Substrate werden jedoch von mehreren Enzymen umgesetzt, jedoch in der Regel nach unterschiedlichen Mechanismen und auf unterschiedliche Art und Weise oder unter Bildung unterschiedlicher Reaktionsprodukte. Substrate sind also:

Chloramphenicol, AminoglucoSID-Antibiotika, insbesondere Kanamycin, Neomycin, Gentamycin und Paromomycin;
phosphorylierbare Proteine, z.B. Histone;

DNS, RNS, Desoxyribo- oder Ribo-oligonucleotid, Desoxy- oder ribopolynucleotid, doppelsträngige DNS, einsträngige DNS plus Primer (Starter).

Die Enzyme benötigen zusätzlich zu ihrem Substrat ein Cosubstrat. Dieses Cosubstrat ist der Baustein, der zur Veränderung des Substrates verwendet wird. Bei der Acyltransferase kann so das Cosubstrat z.B. ein ^{14}C -oder ^3H -markiertes Acetat sein. Bei den Phosphotransferasen ist das Cosubstrat in der Regel Adenosintriphosphat und/oder durch ^{32}P markiertes Adenosintriphosphat (ATP). Daneben können auch die vier Desoxynucleosidtriphosphate (die des Adenosins, des Guanosins, des Cytidins und des Thymidins) übertragen werden. Die Markierung der Desoxynucleosidtriphosphate kann in der alpha- oder in der gamma-Stellung erfolgen und je nach Enzym wird dann die eine oder andere Form umgesetzt. Außer durch ^{32}P können die Desoxynucleosidtriphosphate durch ^{35}S , ^3H oder ^{125}I markiert sein, wobei jedes Nucleosid markiert sein kann, oder es kann nur ein Nucleosid markiert sein.

Weiterhin kann das Cosubstrat ein biotinyliertes Nucleotid sein, so daß nach der Enzymreaktion z.B. eine Reaktion mit an Avidin oder Streptavidin gebundenen Enzymen möglich und damit eine Auswertung mit Farbstoffen genutzt wird.

Als Cosubstrate können darüber hinaus bereits markierte DNS oder Desoxyribopolynucleotide ggf. im Gemisch mit unmarkierten Molekülen eingesetzt werden, die insbesondere als Cosubstrate für Ligasen in Betracht kommen.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein neues Prinzip des Nachweises von Biomolekülen dar. Die Verwendung von molekularen Sonden mit daran gekoppelten Enzymen und der Nachweis des umgesetzten Substrates an einer festen Phase hat eine große Vielfalt an Ausführungsformen. Das Verfahren kann auf eine Vielzahl von Biomolekülen angewendet werden und ist deshalb universell anwendbar. Bei der Anwendung wird ein Verstärkungsfaktor von mindestens 10 erreicht, er liegt im allgemeinen jedoch wesentlich darüber. Die erreichbare Verstärkung ist von den eingesetzten Stoffen und von der gewählten Verfahrensvariante abhängig und kann nur für den speziellen Fall exakt angegeben werden. Durch die unterschiedlichen Ausführungsformen besteht beim Arbeiten nach bestimmten Varianten die Möglichkeiten, die verwendeten Biomoleküle mit mehreren Sonden nachzuweisen, d.h. die blots sind z.B. wiederverwendbar. Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nicht auf die beschriebenen Verfahrensvarianten beschränkt, sondern wird bei weiterer Ausarbeitung des Verfahrens darüber hinausgehen.

Verwendete Pufferlösungen

PBS: 8g NaCl, 0,2g KH_2PO_4 , 2,9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2g KCl werden in Wasser gelöst und auf 1l aufgefüllt, pH = 7,4

TBS: 0,15M NaCl, 50mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH = 7,4

GET: 2,5mM Tris/HCl, pH = 8,0, 5mM Glucose, 1mM Ethylendiamintetraessigsäure, Tetranatriumsalz (EDTA)

Lysepuffer: 125mM Tris/HCl, pH = 6,8, 2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 20mM Tris/HCl, pH = 7,4, 10mM Dithiothreitol, 0,1% SDS

Lösepuffer: in 100ml 20mM Tris/HCl, pH = 8,8, werden 48g Harnstoff gelöst und dazu 1% Nonidet NP40 und 10% β -Mercaptoethanol gegeben.

Enzympuffer: 20mM Tris/HCl pH 7,2, 125mM NH_4Cl , 20mM MgCl_2 , 10mM Dithiothreitol

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Kopplung von polykloralem Antikörper an Kanamycin-Phosphotransferase

1 ml Anti-Humanserumalbumin-Antiserum (Kaninchen) mit 0,9% NaCl wird mit 10mg Benzochinon in 0,3ml Ethanol 1 Stunde bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht. Danach wird überschüssiges Benzochinon mittels einer Sephadex-G25-Säule abgetrennt und der Komplex Benzochinon-Antikörper fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden in einem Immunttest gegen Humanserumalbumin (HSA) geprüft. Die gesuchte Fraktion wird mit 1mg Kanamycin-Phosphotransferase in 1 ml 1M Bicarbonat-Puffer (pH-Wert 9) über Nacht bei Zimmertemperatur im Dunkeln zur Reaktion gebracht.

Das Reaktionsprodukt wird über Nacht gegen 0,9% NaCl-Lösung dialysiert und so verwendet. Es kann nach der Dialyse auch in Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert werden.

Beispiel 2

Immunologischer Nachweis von HSA durch einen Kanamycin-Phosphotransferase gekoppelten Antikörper mit Nachweis des umgesetzten Substrates auf einer festen Phase III

Ein Gemisch aus verschiedenen Markerproteinen und HSA wurde in einem Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf Nitrocellulose übertragen (Blot). Dieser Blot wird mit einem Kanamycin-Phosphotransferase-gekoppelten Antikörper nach Beispiel 1 in TBS (durch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan gepufferte Kochsalzlösung von 0,9%) und 1% Gelatine 4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert (Verdünnung 1:500). Danach wird der Blot mit dem angelagerten, an Enzym gekoppelten Antikörper 4mal 15 Minuten in TBS gewaschen und mit einem 1%-Agarosegel (im Reaktionspuffer hergestellt) mit 20mMol Tris/HCl, pH = 7,2, 125mMol NH₄Cl, 1 mMol Dithioerythrol, 20mMol MgCl₂, 2nMol Adenosintriphosphat (ATP), das 1 µCi gamma-³²P-ATP/ml und 20 µg/ml Kanamycin enthält, 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Agarosegel wird anschließend auf Phosphorcellulose-Flächenträger aufgelegt und das Kanamycin auf die Phosphorcellulose übertragen (0,5kg/3 Stunden, Zimmertemperatur). Der Nachweis des mit ³²P markierten phosphorylierten Kanamycins erfolgt durch Autoradiographie des Phosphorcellulose-Flächenträgers (2 Stunden, Zimmertemperatur).

Beispiel 3'

Immunologischer Nachweis von HSA mittels eines Kanamycin-Phosphotransferase-markierten Antikörpers auf eine feste Phase II

Humanserum wird in einem 1,5%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird mit einem an Kanamycin-Phosphotransferase gekoppelten Antikörper 1 Stunde bei Zimmertemperatur mit TBS mit 2% BSA (Rinderserumalbumin) (Verdünnung 1:500) inkubiert und danach 1 Stunde mit TBS gewaschen. Das Gel wird zunächst in einem Reaktionspuffer wie in Beispiel 2, bestehend aus 20mMol Tris/HCl, pH = 7,2 125mMol NH₄Cl, 1 mMol Dithioerythrol, 20mMol MgCl₂ und 2nMol ATP, das 1 µCi gamma-³²P-ATP enthält, eine halbe Stunde inkubiert und danach mit einem Träger nach WP 254012, der aus Cellulose, die mit Cyanurchlorid und anschließend mit Sulfanilsäure umgesetzt wurde, besteht und an dieses Produkt ionisch Kanamycin gebunden wurde, in Kontakt gebracht und 30 Minuten bei 37°C umgesetzt. Nach Waschung 30 Minuten in Wasser des Trägers II mit dem Substrat und dem phosphorylierten Substrat wird dieser 1 Stunde bei Zimmertemperatur autoradiographiert und so das ³²P-markierte Kanamycin auf dem Träger II nachgewiesen, wodurch das Vorhandensein von HSA im Trenngel bewiesen wird.

Beispiel 4

Immunologischer Nachweis von Humanserumalbumin nach Protein-Blot auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockbedingungen (Verwendung eines Protein A-NPT II-Fusionsproteins)

a) Konstruktion eines Protein A-NPT II-Fusionsproteinvektors, Expression und Gewinnung des Fusionsproteins

In den Multi-cloning-site eines Protein A-Fusionsprotein-Vektors pRIT 2 (B. Nielsen, L. Abrahmsen, M. Uhlen, EMBO-Journal 4[4] [1985], S. 1075–1080) wird das NPT II-Gen (Tn5) (S. Brenner, Nature 329 [1987], S. 21) aus E. coli im offenen Leseraster eingesetzt. Die Transformation von E. coli (NF 1) und die Selektionierung des entsprechenden Klonen über die Ampicillinresistenz erfolgen nach üblichen Methoden.

Die Anzucht des Protein A-NPT II-Fusionsprotein-Klonen erfolgt im Flüssigmedium NB 1 (Immunpräparate Berlin, DDR) nach über Nacht durchgeführter Vorkultur 6 Stunden bei 30°C. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C wird das Fusionsprotein exprimiert (Promoter PR des Phagen). Nach 2 Stunden werden die Zellen azentrifugiert, einmal mit GET-Puffer gewaschen, in GET resuspendiert und in Portionen zu je 10¹⁰ Zellen in Eppendorf-Röhrchen abzentrifugiert. Zur Gewinnung des Fusionsproteins werden einmal 10¹⁰ Zellen im Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml 20mM Tris/HCl-Puffer, pH = 6,8, bei 0°C resuspendiert und 5mal kurz von außen beschallt. Nach Abkühlung in Eis wird erneut 3mal kurz beschallt. Die Zellreste werden bei 4°C abzentrifugiert (5 Minuten). Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und in ein zweites Eppendorf-Röhrchen überführt.

b) Immunologischer Nachweis

Eine Verdünnungsreihe aus Proteinen mit Humanserumalbumin (HSA) im Nanogramm-Picogramm-Bereich wurde im SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elektrotransfer auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran (Blot) 30 Minuten an der Luft getrocknet und danach in TBS mit 1 Vol.-% Tween 20 eine Stunde bei 37°C geblockt. Eine weitere Blockierung erfolgt anschließend in TBS mit 0,2 Vol.-% Tween 20 innerhalb von 30 Minuten (Block I).

Die Inkubation mit dem Antiserum Anti-HSA-Immunglobulin (Kaninchen) erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 eine Stunde bei Zimmertemperatur. Danach wurde eine Stunde mit TBS mit 0,1 Vol.-% Tween 20 bei Zimmertemperatur gewaschen (6 Wechsel). Nach erneuter Blockierung mit TBS und 0,2 Vol.-% Tween 20 (30 Minuten bei Zimmertemperatur) (Block II) wurden 50 µl des oben hergestellten Lysates mit dem Fusionsprotein aus Protein A und NPT II in ein Volumen von 10ml gegeben und eine Stunde bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Nitrocellulose-Membranen (Hybond C, Amersham International) eine Stunde mit TBS gewaschen (6 Wechsel).

Ein nach DD-WP 254.012 aus mit Cyanurchlorid aktivierter Cellulose und Sulfanilsäure hergestellter und mit Kanamycin beladener Träger wird auf eine Glasplatte gelegt und mit dem Enzympuffer, der ³²P-γ-ATP mit einer Konzentration von 2 Mill. cpm/ml (spezifische Aktivität 150 TBq/mMol) enthält, getränkt. Die oben erhaltenen Blots auf Nitrocellulose werden mit der beim Elektrotransfer gelseitigen Seite auf den feuchten, das Kanamycin tragenden Träger gelegt. Anschließend wird die Nitrocellulose-Membran nochmals von oben mit dem ³²P-γ-ATP enthaltenden Enzympuffer getränkt und schließlich mit einer Glasplatte gleicher Größe abgedeckt. Dieses System wird allseitig mit PE-Folie verschlossen und zunächst eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei während dieser Zeit die Glasplatten mittels eines Gewichtes leicht zusammengedrückt werden. Nach der Inkubation wird aus dem System der Kanamycin tragende Träger entnommen und eine Stunde mit bidest. Wasser gewaschen. Die Nitrocellulose-Membran wird sofort erneut auf einen Kanamycin enthaltenden Träger aufgelegt, mit ³²P-γ-ATP enthaltendem Enzympuffer befeuchtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit bidest. Wasser gewaschen. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der im Kontakt verwendeten, mit Kanamycin beladenen Träger. Die Nitrocellulose-Membranen werden nach Waschung mit bidest. Wasser (frei von ³²P-γ-ATP) zur Kontrolle mit autoradiographiert.

Durch die Autoradiogramme der im Kontakt verwendeten Träger wird die Lage der HSA-Banden bis in den Picogramm-Bereich als geschwächte Banden auf dem Röntgenfilm dargestellt (Exposition: 30 Minuten bei Zimmertemperatur, Röntgenfilm HS 11, VEB ORWO Wolfen).

Da proteinfreie Blockbedingungen verwendet wurden, kann das Protein aus der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S angefärbt werden (Färbung: 2 Minuten, Entfärbung mit Wasser: 5 Minuten). Zur Auswertung wird die Autoradiographie des im Kontakt verwendeten Trägers über die angefärbten Nitrocellulose-Blots gelegt, so daß die Banden genau zugeordnet werden können.

Beispiel 5

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose unter Protein-Blockungs-Bedingungen

Es wird ebenso wie in Beispiel 4 verfahren, jedoch wird als Block I TBS mit 0,5 Gew.-% Gelatine (1 Stunde) und TBS mit 0,25 Gew.-% Gelatine (30 Minuten) sowie als Block II TBS mit 0,25 Gew.-% Gelatine (30 Minuten) verwendet.

Die Auswertung erfolgt wie in Beispiel 4 durch Autoradiographie der im Kontakt verwendeten Träger.

Beispiel 6

Immunologischer Nachweis von α -Fetoprotein im Tüpfeltest auf Nitrocellulose

Eine Verdünnungsreihe von α -Fetoprotein (AFP) wird auf einen Streifen Nitrocellulose-Membran (Hybond C, Amersham Int.) aufgetüpfelt und bei Zimmertemperatur 30 Minuten trocknen gelassen. Die Blockierung erfolgt im Block I mit TBS und 1% Tween 20 1 Stunde bei 37°C und danach in TBS mit 0,2% Tween 20 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Zunächst wird mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) gegen HSA (Verdünnung 1:1000) inkubiert, danach mit TBS + 1% Tween 20 gewaschen, erneut mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt und mit einem zweiten Antikörper (Kaninchen-Anti-Maus) 1 Stunde inkubiert (Verdünnung 1:500). Nach Waschung mit TBS + 0,1% Tween 20 eine Stunde bei Zimmertemperatur wird erneut mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt.

Danach werden 35 μ l E. coli-Lysat, das nach Beispiel 4a hergestellt worden ist, und das das Fusionsprotein aus Protein A und NPT II enthält, zugegeben und 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS (eine Stunde bei Zimmertemperatur) wird die Nitrocellulose-Membran mit dem kanamycinbeladenen Träger (hergestellt nach DD-WP 254.012) in Kontakt gebracht und der Nachweis wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt. Die Nachweisgrenze liegt im Picogramm-Bereich.

Beispiel 7

Nachweis von Kartoffel-Virus nach Tüpfeln von Pflanzensäften auf Nitrocellulose mittels NPT II-gekoppelten Antikörpern

(Nachweis auf Trägern nach DD-WP 254.029)

a) Kopplung von Neomycin-Phosphotransferase II an Anti-Kartoffelvirus-Immunoglobuline mittels Glutaraldehyd

400 μ g nach Beispiel 4a hergestellte und gereinigte NPT II werden zusammen mit 1 mg Anti-Kartoffelvirus-Immunoglobulinen in einem Dialyseschlauch gegen PSB (16 Stunden, 4°C, 800 ml, 2 Wechsel) bei einem Schlauchvolumen von 1 ml dialysiert. Nach Umfüllen der dialysierten Probe in ein Glasröhrchen werden 5 μ l Glutaraldehyd (25%ige Lösung, Berva) zugegeben und 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Zimmertemperatur umgesetzt. Anschließend wird der Kopplungsansatz in den Dialyseschlauch zurückgefüllt und zunächst gegen PBS (4°C, über Nacht) und danach gegen TBS (4°C, 800 ml, 2 Wechsel, 16 Stunden) dialysiert. Das Reaktionsprodukt wird in Glasröhrchen abgefüllt.

b) Durchführung des Nachweises

Eine Verdünnungsreihe Kartoffelblatt-Preßsaft wird auf einen Streifen Nitrocellulose-Membran aufgetüpfelt und 30 Minuten eintrocknen lassen. Die so behandelte Membran wird 1 Stunde bei 37°C in TBS + 1% Tween 20 und anschließend 30 Minuten bei Zimmertemperatur in TBS + 0,2% Tween 20 geblockt. Danach wird das oben hergestellte Kopplungsprodukt in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS erfolgt der radioaktive Nachweis auf der mit Kanamycin beladenen Trägerschicht nach dem Kontaktverfahren analog Beispiel 4. Die Nachweisgrenze liegt im Picogramm-Bereich.

Beispiel 8

Nachweis von Kartoffelvirus aus Pflanzensäften nach Tüpfel auf Nitrocellulose mittels Protein A-NPT II-Fusionsprotein

(Kontaktträger P 81)

Es wird eine Verdünnungsreihe mit Kartoffelblatt-Preßsaft wie in Beispiel 7 hergestellt. Nach der Blockierung wird jedoch eine Stunde mit Anti-Kartoffelvirus-Immunoglobulinen (Kaninchen) (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Nach Waschen mit TBS + 0,1% Tween 20 wird erneut mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt und danach 50 μ l Lysat nach Beispiel 4a zugegeben und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS wird das Kontaktverfahren analog zu Beispiel 4b zum Nachweis durchgeführt.

Als kanamycinbeladener Träger wird jedoch Phosphorcellulose (P 81, Whatman, England) eingesetzt. Im Enzympuffer wird eine spezifische Aktivität des 32 P-ATP von 10 Mio cpm/ml verwendet.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose-Träger nach Waschung mit Wasser (1 Stunde). Die Empfindlichkeit liegt wiederum im Picogramm-Bereich.

Beispiel 9

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf Nylon-Membranen mittels Protein A-NPT II-Fusionsprotein

(Kontaktträger: kanamycinbeladene Phosphorcellulose)

Eine Verdünnungsreihe HSA wird auf einen Streifen Nylon-Membran (Hybond N, Amersham Int.) aufgetüpfelt und 30 Minuten trocknen gelassen. Die Blockierung erfolgt 2 Stunden in TBS mit 3% Rinderserumalbumin (BSA) und danach 30 Minuten in TBS mit 1% BSA. Das Gesamtverfahren erfolgt ebenso wie in Beispiel 4 beschrieben. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose (P-81)-Träger.

Beispiel 10

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose-Membranen unter proteinfreien

Blockierungsbedingungen

Die Durchführung des Verfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Jedoch wird als kanamycinbeladener Träger Phosphorcellulose (P 81, Whatman) eingesetzt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose mittels Röntgenfilm (Exposition: 15 Minuten, Zimmertemperatur).

Beispiel 11

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blockierung auf Nitrocellulose-Membranen unter proteinfreien

Blockierungsbedingungen (Kontaktverfahren mit nomycinbeladener Phosphorcellulose)

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Es wird jedoch als mit antibiotikumbeladener Träger mit Neomycin beladene Phosphorcellulose (Inkubation der Phosphorcellulose 30 Minuten mit einer Lösung aus 400mg Neomycin in 60ml Wasser und Waschen mit Wasser 30 Minuten) eingesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose mittels Röntgenfilm (Exposition: 15 Minuten, Zimmertemperatur).

Beispiel 12

Immunologischer Nachweis von HSA nach Blotting von Proteinen auf Nitrocellulose unter proteinfreien

Blockierungsbedingungen (Kontakt mit Phosphorcellulose, Kanamycin im Enzymreaktions-Puffer)

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt wie in Beispiel 4. Als Kontaktträger wird jedoch Phosphorcellulose (P 81, Whatman) ohne vorherige Beladung mit Antibiotika verwendet.

Dem Enzympuffer wird Kanamycin mit einer Konzentration von 4mg/ml zugesetzt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der Phosphorcellulose.

Beispiel 13

Wiederverwendung von Protein-Blots

Die Protein-Blots auf Nitrocellulose (Hybond C) werden nach der Durchführung des Gesamtverfahrens, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist (Runde 1), bei 70°C 2mal 15 Minuten mit dem Elutionspuffer 3% SDS, 0,1M β -Mercaptoethanol in TBS gewaschen und damit der 1. Antikörper einschließlich der enzymmarkierten Sonde eluiert. Nach der Waschung wird mit TBS + 0,1% Tween 20 erneut geblockt und das Verfahren, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist, wiederholt. Die Kontaktträger der 1. und der 2. Runde werden gemeinsam autoradiographiert. Es wird kein Intensitätsverlust nach der Wiederverwendung der Blots festgestellt.

Beispiel 14

Immunologischer Nachweis von HSA nach Proteinblotting auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Kontaktträger: mit Kanamycin beladene Carboxymethyl-Cellulose)

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Als Kontaktträger wird mit Kanamycin beladene Carboxymethyl-cellulose (CM-Membranen, Renner GmbH) verwendet. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie der CM-Membranen.

Beispiel 15

Immunologischer Nachweis von HSA nach Protein-Blotting auf Nitrocellulose unter proteinfreien Blockierungsbedingungen (Verwendung eines Kopplungsproduktes aus Protein A und NPT II mit einem Toluylendiisocyanat-2,4-Präpolymeren)

A) Herstellung der enzymmarkierten Sonde

a) Elektrophoretische Reinigung von NPT II aus E. coli-Lysaten

Das Zellpellet von 10ml E. coli (NPT II überexprimierend) Zellkultur (pRK 89) wird in 1ml Lysepuffer aufgenommen und beschallt. Zellreste werden bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellysate wird auf ein präparatives PAA/SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird nach Waschen mit Wasser in eine kalte Lösung von 0,25M KCl gelegt, die sichtbar gewordene NPT II-Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und zerkleinert. Das Protein wird mittels Elutionspuffer innerhalb von 3 Stunden bei Zimmertemperatur eluiert. Die durch Elution erhaltenen Lösungen werden zentrifugiert und der Überstand mit dem vierfachen volumenkalten Aceton versetzt und 3 Stunden bei -20°C stehengelassen. Danach wird bei 0°C zentrifugiert. Nach Waschen wird das Pellet in 200 μ l Lösepuffer gelöst und gegen 20mM Natriumphosphatpuffer über Nacht dialysiert (4°C). Im Endvolumen von etwa 200 μ l befinden sich ungefähr 200 μ g NPT II.

b) Kopplung

Zur Kopplung wird ein Präpolymeres aus 17,4g/l frisch destilliertem Toluylendiisocyanat-2,4 und 30g Polyethylenglykol 600 bei 50-60°C hergestellt. 100mg dieses Präpolymeren werden in 500mg Aceton gelöst; nach vollständiger Lösung werden 300mg dieser Lösung in 700mg Wasser emulgiert.

800 μ l des unter a) erhaltenen Lysates werden mit 150 μ g Protein A in 150 μ l Wasser in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt. Zu dieser Lösung werden 200 μ l der oben hergestellte Emulsion zugegeben und 1 Stunde unter Schütteln umgesetzt. Nach einer Stunde werden erneut 100 μ l frisch hergestellte Emulsion zugesetzt und noch eine Stunde umgesetzt. Danach wird mit einer Lösung von 200 μ g Lysin in 150 μ l Wasser 30 Minuten bei Zimmertemperatur gestoppt.

c) Nachweis

Die Durchführung des Gesamtverfahrens erfolgt wie in Beispiel 4. Jedoch wird an Stelle des gentechnisch hergestellten Protein A-NPT II-Fusionsproteins 50 μ l des oben hergestellten Kopplungsproduktes als enzymmarkierte Sonde verwendet. Der Nachweis erfolgt wieder durch Autoradiographie.

Beispiel 16

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf CCA-Papier (Kontaktträger nach DD-WP 254.012)

Eine Verdünnungsreihe von HSA wird auf CCA-Papier (hergestellt nach EP 0134.025) aufgetüpfelt und 30 Minuten an der Luft trocknen gelassen. Danach wird der Träger in eine Lösung aus 10% Sulfanilsäure und 10% Triethanolamin (pH = 7,5) eine Stunde bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Block erfolgt in TBS mit 0,5% Gelatine und 30 Minuten in TBS mit 0,25% Gelatine. Danach wird das Verfahren wie in Beispiel 5 durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontaktträgers nach DD-WP 254.012 und das CCA-Papiers. Auf beiden Trägern läßt sich durch ^{32}P - γ -ATP markiertes Kanamycin nachweisen.

Beispiel 17

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf ein negativiertes Papier (Kontaktträger Phosphorcellulose)

Ein negativierter Träger wird aus CCA-Papier und Sulfanilsäure nach DD-WP 237.841 hergestellt. Auf diesen Träger wird eine Verdünnungsreihe von HSA aufgetüpfelt und als Blockierungsmittel (Block I und II) eine Lösung von 10% Sulfanilsäure und 10% Triethanolamin vom pH = 7,5 verwendet. Als mit Kanamycin beladener Träger wird mit Kanamycin beladene Phosphorcellulose (P 81, Whatman) verwendet. Der Nachweis erfolgt dann wie in Beispiel 4. Der Nachweis des HSA erfolgt durch Autoradiographie an beiden Trägern.

Beispiel 18

Immunologischer Nachweis von HSA nach Tüpfeln auf einen hydrophoben Träger (Kontaktträger nach DD-WP 254.012)

Ein hydrophober Träger wird nach DD-WP durch Umsetzung des CCA-Papiers (nach EP 0134.025) mit äquimolekularen Mengen Bi-n-octylamin und Sulfanilsäure als Natriumsalz hergestellt. Auf diesen Träger wird eine HSA-Verdünnungsreihe aufgetragen. Nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur sind die Tropfen auf dem Träger eingetrocknet, man läßt noch weitere 15 Minuten nachtrocknen. Die Blockierung erfolgt im Block I und II mit TBS plus Gelatine, wie es in Beispiel 5 beschrieben worden ist. Die Durchführung des Verfahrens erfolgt ansonsten, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie auf beiden Trägern.

Beispiel 19

Immunologischer Nachweis von HSA nach Proteinblotting auf Nitrocellulose (Kontaktträger Phosphorcellulose) und Verstärkung der Nachweisreaktion

Eine Verdünnungsreihe wird auf Nitrocellulose (Hybond C, Amersham) geblottet und anschließend geblockt, wie es im Beispiel 4 beschrieben worden ist. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wird zunächst mit TBS + 0,1% Tween 20 1 Stunde gewaschen, danach wieder geblockt (TBS mit 0,2% Tween 20) und mit 10 μg Protein A in 10ml Lösung leicht geschüttelt. Daran anschließend wird erneut mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und erneut geblockt.

100 μl des vorgebildeten Komplexes aus HSA-Antihumanserumalbumin-Protein-NPT II-Fusionsprotein (hergestellt aus 50 μl Lysat nach Beispiel 4, 50 μg HSA und 50 μl Anti-HSA-Immunglobulin [Kaninchen], Inkubation bei 4°C über Nacht) werden dann zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Anschließend wird mit TBS gewaschen und das Kontaktverfahren nach Beispiel 4 mit einem mit Kanamycin beladenen Träger nach DD-WP 254.012 durchgeführt. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontakt-Trägers (30 Minuten bei Zimmertemperatur).

Beispiel 20

Immunologischer Nachweis von -Fetoprotein nach Tüpfeln auf Nitrocellulose (Kontaktträger nach DD-WP 254.012)

- Verstärkung durch mit Antikörper vernetztes Protein A-NPT II-Fusionsprotein

Die ersten Schritte des Verfahrens erfolgen, wie es im Beispiel 6 beschrieben worden ist. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper (monoklonal) wird mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und mit TBS + 0,2% Tween 20 geblockt. Danach werden 50 μl biologisch vernetztes Protein A-NPT II-Fusionsprotein zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Nach der Waschung mit TBS (1 Stunde) wird weiter wie in Beispiel 6 verfahren. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiographie des Kontaktträgers in 20 Minuten bei Zimmertemperatur.

Herstellung des biologisch vernetzten Protein A-NPT II-Fusionsproteins

50 μl eines nach Beispiel 4 hergestellten Zellsates mit Protein A-NPT II-Fusionsprotein werden mit 5 μl Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum vermischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der sich bildende Komplex aus Protein A-NPT II-Fusionsprotein und Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper wird als 2. Antikörper nach dem Nachweis eines Antigens mit dem ersten Antikörper (Maus) verwendet.

Beispiel 21

Immunologischer Nachweis von HSA (Enzym-Reaktion in Lösung)

Eine Verdünnungsreihe von HSA wird auf einzelne Rundfilter aus Nitrocellulose (Hybond C, Amersham Int.) aufgetüpfelt (Durchmesser 0,5 cm^2) und zunächst wie in Beispiel 4 weiter bearbeitet. Nach dem Inkubieren mit

Protein A-NPT II-Fusionsprotein werden die Filter 1 Stunde in TBS gewaschen und danach einzeln in Plastebehälter überführt. Es werden jeweils 0,5ml Enzympuffer, 1mg Kanamycin und ^{32}P - γ -ATP (10 Mio. cpm/ml, spezifische Aktivität 5000 C/mM) zugesetzt und 1 Stunde bei 37°C umgesetzt. Die Nitrocellulose-Membranen werden entnommen, ein Rundfilter aus Phosphorcellulose (P 81, 1 cm^2) zugesetzt und 30 Minuten geschüttelt. Die Phosphorcellulose-Filter werden entnommen, 1 Stunde mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Szintillationszähler gemessen. Die Auswertung erfolgt direkt über den Meßwert der Radioaktivität (als Kontrolle wird ein Nitrocellulose-Filter ohne HSA mitgeführt).