



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[C] (11) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

75677

(51) Kv.lk./Int.Cl.	G 01 N 33/542
(21) Patentihakemus — Patentansökning	813369
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	28.10.81
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	28.10.81
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	01.05.82
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.03.88
(45) Patentti myönnetty — Patent meddelat	11.07.88
(86) Kv.hakemus — Int.ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	30.10.80
USA(US) 202378	Toteennäytetty—Styrkt

- (73) Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA(US)
- (72) Alfred C. Greenquist, Elkhart, Indiana,
Thomas M. Li, Elkhart, Indiana,
Patricia A. Rupchock, Elkhart, Indiana,
Richard Joseph Tyhach, Elkhart, Indiana,
Bert Walter, South Bend, Indiana, USA(US)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Koelaitte ligandin määrittämiseksi nestenäytteestä homogeenisella immuno-
kokeella, menetelmä sen valmistamiseksi ja laitteen avulla suoritettava
analyttinen menetelmä - Testanordning för bestämning av en ligand i ett
vätskeprov medelst homogen immunoanalys, förfarande för framställning av
denna och med användning av anordningen utfört analytiskt förfarande

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee homogeenista spesifistä sitomiskoe-
laitetta, menetelmää sen valmistamiseksi ja menetelmää
ligandin, kuten antiigeenin, haptteenin tai vasta-aineen
määrittämiseksi tai ligandin sitomiskyvyn määrittämiseksi
nestenäytteessä. Koelaitte sisältää kiinteän kantaja-
jäsenen, esim. kuitumateriaalista, kuten paperista tai
polymeerikalvosta tai geelistä muodostetun kantajajäse-
nen, johon on sisällytetty homogeenisen spesifisen sito-
miskoesysteemin reagenssit, joka systeemi antaa havaitta-
van vasteen, tavallisesti sähkömagneettisen säteilyn sig-
naalin, joka on riippuvainen näytteessä läsnä olevasta
ligandista tai sen määrästä tai ligandin sitomiskyvystä.
Käyttökelpoisissa homogeenisissa spesifisissä sitomis-
koesysteemeissä merkintäaineina on mm entsyymisubstraak-
ti-merkintäaineita, merkittyjä entsyymien proteettisia
ryhmiä ja entsyymimerkintäaineita. Havaittava vaste
saadaan edullisesti luminesenssi- tai fluoresenssivasteen
tai spektrofotometrin tai kolorimetrimin antamana vas-
teena, joka voidaan mitata silmämäärin tai instrumen-
tilla.

(57) Sammandrag

Uppfinningen hänför sig till en homogen, specifik, bindande analysanordning, ett förfarande för dess framställning, och ett förfarande för dess användning vid bestämningen av en ligand, såsom ett antigen, haptent eller en antikropp, i , eller av ligandbindande kapaciteten hos ett vätskeprov. Testanordningen omfattar en fast bärardel, såsom en bärardel av fibermaterial, t.ex. papper, eller av en polymerfilm eller en gel som införlivats med reagenser för ett homogent, specifikt, bindande analysystem, vilket alstrar en detekterbar reaktion, vanligtvis en elektromagnetisk strålningssignal, vilken beror på ligandens närvaro eller mängd i eller av den ligandbindande kapaciteten hos provet. Användbara homogena, specifika, bindande analysystem inkluderar som märkningsmedel märkta enzymsubstrat, märkta prostetiska grupper av enzymer och märkta enzymer. Den detekterbara reaktionen är företrädesvis en luminescent, fluorescent, spektrofotometrisk eller kolorimetrisk reaktion, vilken kan mätas genom visuell observation eller medelst instrument.

Koelaitte ligandin määrittämiseksi nestenäytteestä homogeenisella immunokokeella, menetelmä sen valmistamiseksi ja laitteen avulla suoritettava analyttinen menetelmä

5 Keksinnön kohteena on koelaitte ja menetelmä sen käyttämiseksi ligandin määrittämiseen tai ligandin sitomiskyvyn määrittämiseen nestenäytteessä, joka menetelmä perustuu spesifisen sitomiskokeen, esim. immunokokeen periaatteeseen. Erityisesti keksintö koskee kiinteässä muodossa olevia kantaja-aineita, jotka sisältävät homogeenisen spesifisen sitomiskokeen reagensseja.

10 Eri tyyppisten näytteiden analyysiin, varsinkin luonnossa olevien biologisten nesteiden, teollisuusnesteiden ym. analyysiin käytetään usein kiinteiden analyttisten yksiköiden muodossa olevia koeliuskoja, koska niiden käyttö on mukavaa ja tulokset saadaan niitä käyttäen nopeasti. Erilaisten kliinisesti merkitsevien aineiden havaitsemiseen biologisissa nesteissä, kuten veriherassa tai virtsassa koeliuskat ovat osoittautuneet sangen edullisiksi määrittäessä ihmisten ja eläinten tautien laatu ja käsittely.

15 Tavanomaiset koeliuskojen muodossa olevat koelaitteet käsittävät tavallisesti kantajajäsenen, kuten absorboivan tai huokoisen perusaineen, joka on esim. paperia, johon on sisällytetty reagensseja, jotka reagoivat kokeiltavaan nestenäytteeseen sisältyvän aineosan tai aineosien kanssa, josta reaktiosta on havaittavana tuloksena, tavallisesti sähkömagneettisena säteilynä signaali, kuten värin muutos. Kokeiltava näyte saatetaan kosketuksiin kantajajäsenen sisällytetyn reagenssin kanssa, esimerkiksi 25 kastamalla laite hetkeksi näytteeseen tai lisäämällä näyttettä laitteelle ja havaitsemalla tai mittaamalla tulos määrätyn reaktioajan kuluttua. Tällaisten koelaitteiden etuna on niiden helppo käyttö rutiinimääräyksissä, joissa laborantilta ei kulu aikaa eikä vaadita taitoa reagenssien 30 lisäämiseen näytteeseen, ja joissa tulokset saadaan helposti havaittavina tai instrumenttilukemina. Lisäksi

helposti havaittava tulos tai instrumenttilukema saadaan nopeasti.

Eri tyyppiset koeliuskat ovat olleet tunnettuja ja käytössä useiden vuosien ajan monilla eri aloilla aina tavallisimmasta pH-paperista in vitro diagnostisiin laitteisiin erilaisten virtsan ja veren aineosien toteamiseen, kuten glukoosin, proteiinin, vieraan veren ym. toteamiseen (näitä on kuvattu esim. US-patenttijulkaisuissa nro 3 164 534, 3 485 587 ja 3 012 976). Näissä tavanomaisissa koeliuskoissa olevat reagenssikoostumukset reagoivat määritettävän aineen tai määritettävien aineiden kanssa suoraan, ja niiden herkkyys on tästä syystä ja muista syistä rajoittunut käyttöön aineiden havaitsemiseksi, joita nestenäytteissä on konsentraatioina millimoolista ylöspäin.

Toisaalta spesifinen sitomiskoetekniikka on osoittautunut erittäin käyttökelpoiseksi analyttisissä menetelmissä määritettäessä erilaisia orgaanisia, diagnostiselta, lääketieteelliseltä, ympäristön ja teollisuuden kannalta tärkeitä, erittäin alhaisina konsentraatioina esiintyviä aineita. Spesifiset sitomiskokeet perustuvat ligandin, so. määritettävän sitoutumiskykyisen analyytin ja sen sitomiskomponentin vuorovaikutukseen. Kun ligandi tai sen sitomiskomponentti on vasta-aine ja toinen niistä on haptenei tai antigenei, niin koetta nimitetään immunokokeeksi.

Tavanomaisessa spesifisessä sitomiskoetekniikassa kokeiltavan nestemäisen aineen näyte yhdistetään reagenssin kanssa, jonka koostumus vaihtelee. Tällaisiin koostumuksiin sisältyy merkitty konjugaatti, joka käsittää sitomiskomponentin ja siihen sisältyvän merkintäaineen. Merkityssä konjugaatissa oleva sitomiskomponentti yhdessä reagenssin mahdollisten muiden aineosien kanssa vaikuttaa kokeiltavassa aineessa olevaan ligandiin ja muodostaa sitovan reaktiosysteemin ja tuottaa kahta lajia tai muotoa olevat merkityt konjugaatit, sidotun ja vapaan. Merkityn konjugaatin sido-

tussa lajissa sitomiskomponentti, esim. hapteni tai anti-
geeni on sitoutunut vastaavaan sitomispartneriin, esim. vas-
ta-aineeseen, kun sensijaan vapaassa lajissa sitomiskompo-
nentti ei ole tällä tavoin sidottu. Tuloksena saadun sido-
5 tun lajin sisältämä merkityn konjugaatin suhteellinen mää-
rä verrattuna vapaan lajin määrään riippuu koenäytteestä
määritettävän ligandin määrästä.

Kun sidotun lajin merkitty konjugaatti on käytännöl-
lisesti katsoen mahdoton havaita merkintäaineen havaitsemi-
10 seen käytetyllä ilmaisimella vapaan lajin sisältämän merki-
tyn konjugaatin läsnäollessa, niin sidottu laji ja vapaa
laji on kokeen suorittamiseksi erotettava toisistaan fysi-
kaalisesti. Tämäntyyppistä koetta nimitetään alalla hete-
rogeeniseksi. Kun merkityn konjugaatin sidottu laji ja va-
15 paa laji pystytään toistensa läsnäollessa havaitsemaan, ei
erottamisvaihetta tarvitse suorittaa, ja koetta kutsutaan
homogeeniseksi.

Ensimmäiseksi keksityssä erittäin herkässä spesifi-
sessä sitomiskokeessa, radioimmunokokeessa käytetään mer-
20 kintäaineena radioaktiivista isotooppia. Tällaisen kokeen
on välttämättä oltava heterogeeninen, koska merkintäaineen
ilmaisimella havaittava ominaisuus pysyy kvalitatiivisesti
muuttumattomana vapaassa ja sidotussa lajissa. Radioaktii-
visten aineiden käsittelyyn liittyvien hankaluuksien ja
25 vaikeuksien johdosta sekä tarvittavan erottamisvaiheen vuok-
si on kehitetty homogeenisia koesysteemejä, joissa radio-
isotooppien sijasta käytetään muita merkintäaineita, kuten
entsyymejä, bakteriofageja, metalleja ja organometallikom-
plekseja, koentsyymejä, entsyymisubstraatteja, entsyymiakti-
30 vaattoreita ja -inhibiittoreita, syklisointireagensseja,
orgaanisia ja epäorgaanisia katalysaattoreita, prosteetti-
sia ryhmiä, kemoluminesenssireagensseja ja fluoresoivia mo-
lekyyliä. Tällaisilla homogeenisilla spesifisillä sitomis-
koesysteemeillä saadaan havaittavissa oleva vaste esim. säh-
35 kömagneettisen säteilyn signaali, kuten kemiluminenssi- tai

fluoresenssiemissio, tai värin muutos, joka signaali riippuu kokeiltavan nestenäytteen sisältämän ligandin läsnäolosta tai määrästä.

Kaupallisesti koelaitteet spesifisten sitomiskokeiden suorittamiseen ovat tavallisesti koepakkausten muodossa, jotka sisältävät pakattuna yhdistelmänä liuoksia tai veden kanssa liuoksiksi valmistettavia koostumuksia sisältävät reagenssit, jotka tarvitaan kokeen suorittamiseen. Itse kokeen suorituksessa näitä liuoksia on käsin tai instrumenttien avulla mitattava näytettä sisältävään reaktioastiaan. Käsin suoritettaessa kokeen suorittaminen vaatii aikaa ja taitavan laborantin, ja instrumentteja käytettäessä kokeeseen tarvitaan kallis laitteisto ja sen huolto.

Tarvittavan erottamisvaiheen hankaluuden ja epäkoh-
tien välttämiseksi heterogeenisissä spesifisissä sitomiskokeissa on käytetty kiinteäfaasikoelaitteita. Yleisesti käytetty tämäntyyppinen kiinteäfaasilaitte käsittää huokosettoman pinnan, kuten koeputken tai muun astian sisäpinnan, johon vasta-aine on kiinnitetty adsorboimalla tai kovalenttisisidoksin. US-patenttijulkaisut nro 3 826 619, 4 001 583, 4 017 597 ja 4 104 410 koskevat vasta-aineella päällystettyjen koeputkien käyttöä radioimmunokokeissa. Kiinteäfaasikoelaitteita on käytetty myös heterogeenisissä entsyymiimmunokokeissa (US-patenttijulkaisut nro 4 016 043 ja 4 147 752) ja heterogeenisissä fluoresenssi-immunokokeissa (US-patenttijulkaisut nro 4 025 310 ja 4 056 724 ja GB-patenttijulkaisu nro 1 552 374).

Tällaisen heterogeenisen spesifisen sitomiskoelaitteen käytöstä kuvataan esimerkkinä seuraavassa US-patenttijulkaisussa nro 4 135 884 esitetty ns. "gamma-puikko". Koelaitte, johon sisältyy vasta-ainereagenssi, saatetaan kosketuksiin nestenäytteen kanssa ja muiden reaktiosysteemiin kuuluvien reagenssien, pääasiassa merkityn konjugaatin kanssa. Tietyn inkubointiajan jälkeen kiinteäfaasilaitte poistetaan fysikaalisesti reaktioliuoksesta ja merkintäaine mää-

ritetään joko liuoksesta tai koelaitteesta.

Samankaltaisia laitteita, joissa vasta-ainereagenssi sisältyy perusaineeseen, kuten geeliin tai paperilevyyn, on kuvattu US-patenttijulkaisuissa nro 3 925 017, 3 970 429, 5 4 138 474, 3 966 897, 3981 981 ja 3 888 629 ja DE-hakemusjulkaisussa nro 2 241 646. Samoin tunnettuja ovat heterogeenisiin spesifisiin sitomiskokeisiin käytettävät laitteet, joissa vasta-ainereagenssi on kiinnitetty läpivirtauskolonnissa olevaan perusaineeseen (US-patenttijulkaisut nro 10 4 036 947, 4 039 652, 4 059 684, 4 153 675 ja 4 166 102). Kuten kaikissa heterogeenisissä spesifisissä sitomiskoelaitteissa, koelaitteeseen on tavallisesti sisällytetty vain osa kokeen suorittamiseen tarvittavista reagensseista ja laite toimii vain keinona suorittaa välttämätön erotusvaihe mukavammin. 15

Lisäksi on myös kuvattu heterogeenisiä spesifisiä sitomiskoelaitteita, joissa useimmat tai kaikki tarvittavat reagenssit on sisällytetty samaan kantajaosaan, ja joissa reagenssin/näytteen kosketus ja vapaan ja sidotun faasin 20 erottaminen suoritetaan käyttäen hyväksi mikraatiota kantajaosan kapillaareihin. (US-patenttijulkaisut nro 3 641 235, 4 094 647 ja 4 168 146). Näissä patenteissa kuvattuja laitteita on yleensä pidetty vaikeina käyttää ja tuloksia huonosti toisiinnettavina johtuen kantajaosassa kokeen suorituksessa esiintyvistä monista kemiallisista ja fysikaalisista reaktioista ja tapahtumista sekä laitteella määritettävään ligandin tai analyytin alhaisesta konsentraatiosta. 25

Homogeenisen spesifisen sitomiskoereagenssisysteemin käyttö kiinteätilakoelaitteessa tarjoaisi koesysteemin 30 rutiinikäyttäjälle huomattavia etuja. Erittäin alhaisina konsentraatioina nestenäytteissä olevien ligandien määrittäminen yksinkertaistuisi tällöin vaiheisiin, joissa laite saatetaan kosketuksiin näytteen kanssa ja saatu signaali mitataan joko silmämääräisesti tai instrumentilla. Reagenssit olisivat kiinteinä, eikä tarvittaisi nestemäisten reagenssien säilyttämistä, jakelua ja sekoittamista, kuten käy- 35

tettäessä tunnettuja koepakkauksia. Kiinteätilalaitteet soveltuisivat myös paljon paremmin automatisointiin kuin tunnetut nestesysteemit.

Tekniikan tasoa edustavissa julkaisuissa ei ole
5 yksityiskohtaisesti kuvattu, miten homogeenista spesifistä sitomiskoereagenssisysteemiä voitaisiin käyttää kiinteätila-koelaitteissa. GB-patenttijulkaisussa 1 552 607 on kuvattu homogeenisia spesifisiä sitomiskoesysteemejä, joissa käytetään erilaisia uusia merkintäaineita, kuten kemiluminensi-,
10 ensyymi- ja koentsyymimerkintäaineita. Tämän patentin sivulla 23, riviltä 12 alkaen on esitetty mahdollisuus sisällyttää koereagenssit erilaisiin kantajiin, kuten nestettä sisältäviin astioihin tai liukenemattomiin, huokoisiin ja edullisesti absorboiviin perusaineisiin, esimerkiksi
15 huokoiseen paperiin, polymeerikalvoihin, -membraaneihin, -huovikkeisiin tai -kappaleisiin, geeleihin ym.

DE-hakemusjulkaisussa nro 2 537 275 on kuvattu homogeeninen spesifinen sitomiskoereagenssisysteemi, jossa ilmoituksen mukaan on mahdollista käyttää kokeen suoritukseen vasta-ainetta sisältäviä levyjä tai liuskoja. Julkaisussa ehdotetaan, että merkitty konjugaatti sekoitetaan ensin näytteen kanssa ja sitten reaktioseos saatetaan kosketuksiin koelaitteen kanssa, johon on sisällytetty vasta-aine. Sopivan inkubaatioajan kuluttua ehdotetaan koelaitte huuhdottavaksi
25 puskurilla ja kuivattavaksi, jonka jälkeen mitataan signaali (fluoresenssi). Tämän DE-hakemusjulkaisun koelaitte ja menetelmä muistuttavat siten paljon jo tunnettuja heterogeenisia spesifisiä sitomiskoelaitteita ja menetelmiä, joissa koelaitte upotetaan nestemäiseen reaktioseokseen, inkuboidaan, poistetaan nesteestä, pestään, jonka jälkeen tulos
30 lopuksi luetaan. Ehdotettu koelaitte ei lisäksi sisällä kantajayksikössä kaikkia sitomiskokeen reagensseja. Vain vasta-aine on ehdotettu sisällytettäväksi kantajayksikköön ja merkitty konjugaatti lisätään näytteeseen erikseen ennen
35 näytteen saattamista kosketuksiin ehdotetun koelaitteen kanssa.

Tässä keksinnössä esitetään homogeeninen spesifinen sitomiskoelate, menetelmä sen valmistamiseksi ja sen käyttö ligandin tai ligandin sitomiskyvyn määrittämiseen nestenäytteessä. Koelate käsittää (1) kiinteän kantajajäsenen, joka on absorbentti nestenäytteelle, ja (2) tähän kantajajäsenen sisällytetyn reagenssikoostumuksen, joka sisältää (i) ligandin vasta-ainetta tai muuta luonnossa esiintyvää ligandin sitomisproteiinia ja (ii) ligandin konjugaattia tai tämän analogia, jota vasta-aine tai muu sitomisproteiini pystyy myös sitomaan, kovalenttisesti liittyneenä merkintäaineeseen, joka on todettavissa sähkömagneettisen signaalin avulla, joka signaali on erilainen silloin, kun merkitty konjugaatti on sitoutunut vasta-aineeseen tai muuhun sitomisproteiiniin, kuin silloin, kun se ei ole siten sitoutunut, jolloin signaali on näytteessä olevan ligandimäärän funktio. Tälle koelaitteelle on tunnusomaista, että kiinteään kantajajäsenen on sisällytetty mainittu vasta-aine tai muu sitomisproteiini ja mainittu merkitty konjugaatti oleellisesti toisiinsa sitoutumattomina ja että laite on tehty sisällyttämällä kantajaan ensimmäisessä nesteessä toinen reagensseista, jotka ovat mainittu konjugaatti ja mainittu vasta-aine tai sitomisproteiini, ja kuivaamalla kantaja, ja sen jälkeen joko (A) sisällyttämällä kantajaan toinen mainituista reagensseista vettä sisältämättömässä nesteessä ja kuivaamalla kantaja tai (B) esijähdyttämällä kantaja, sisällyttämällä kantajaan toinen reagensseista, jotka ovat mainittu konjugaatti ja vasta-aine tai sitomisproteiini, toisessa nesteessä, saattamalla kantaja lämpötilaan, jossa toinen neste jäätyy, ja lyofilisoimalla kantaja.

Kantajajäsen voi olla luonnonkuiduista tai synteettisistä polymeerikuiduista koostuva huovike, esimerkiksi paperi tai polymeerikalvo tai geeli.

Koelaitetta käytettäessä se saatetaan kosketuksiin nestenäytteen, esimerkiksi biologisen nesteen, kuten veriheran tai virtsan kanssa, esimerkiksi upottamalla hetkeksi reagenssia sisältävä kantajajäsen näytteeseen tai

lisäämällä näytettä kantajajäsenen pinnalle. Havaittavissa oleva vaste mitataan sitten tavallisesti etukäteen määrätyn inkubointi- tai reaktioajan jälkeen, jolloin tuloksen lukee joko kokeen suorittava laborantti, tai käytetään instrumenttia. Havaittava vaste on tavallisimmin sähkömagneettisen säteilyn signaali, esimerkiksi fluoresenssi-, kemiluminesenssisignaali, värinmuutos tai spektrofotometrinen lukema.

Edullisia homogeenisia spesifisiä sitomiskoesysteemejä ovat alalla tunnetut systeemit, joissa merkintäaine ottaa osaa entsyymaattiseen reaktioon. Eräs tällainen edullinen systeemi on sellainen, jossa merkintäaineena on entsyymin proteettinen ryhmä ja jossa se, missä määrin apoenzyymi pystyy yhdistymään tällaiseen proteettiseen ryhmän muodostamaan merkintäaineeseen ja muodostamaan holoentsyymin, on riippuvainen ligandin läsnäolosta tai sen sitomiskyvystä. Holoentsyymi voidaan määrittää mittaamalla sen entsyymaattinen aktiviteetti, jonka mittaamiseen voidaan käyttää monia erilaisia menetelmiä, kuten kolorimetrista menetelmää. Eräässä toisessa edullisessa koesysteemissä merkintäaineena on entsyymisubstraatti, ja entsyymin kyky vaikuttaa tällaiseen substraattimerkintäaineeseen ja tuotteen havaittavissa oleva tuote on riippuvainen ligandin läsnäolosta tai sen sitomiskyvystä. Tällaisessa homogeenisessä spesifisessä sitomiskoesysteemisä havaittava tuote on edullisesti fluoresoiva, jolloin koelaitteen antama vastaus voidaan mitata fluorometrisesti. Käyttökelpoinen on myös sellainen homogeeninen spesifinen sitomiskoesysteemi, jossa merkintäaineena on entsyymi, jonka aktiviteetti on riippuvainen ligandin läsnäolosta tai sitomiskyvystä. Tässä tapauksessa entsyymin aktiviteetti voidaan mitata monin eri tavoin.

Kuvioissa 1-15 on graafisesti esitetty jäljempänä olevissa esimerkeissä saatuja koetuloksia.

Keksinnön mukainen koelaitte sopii käytettäväksi homogeenisen, ei-radioisotooppeihin perustuvan, spesifisen

5 sitomiskokeen suorittamiseen, esimerkiksi immunokokeiden suorittamiseen, ja se sisältää kaikki samankaltaisiin tavanomaisiin analyttisiin koeliuskoihin ja muihin koeyksikköihin sisältyvät piirteet. Kuten tavanomaisissa laitteissa keksinnön mukaisessa laitteessa on kiinteä kantaja, tavallisesti laadultaan vaihteleva perusaine, johon sisältyvät kaikki tietyn kokeen suorittamiseen tarvittavat reagenssit, jolloin käyttäjän tarvitsee vain saattaa koelaitte kosketuksiin kokeiltavan näytteen kanssa ja mitata saatu tulos. Kun koko prosessi on automatisoitu, voi samat toiminnot suorittava instrumentti olla rakenteeltaan huomattavasti yksinkertaisempi kuin tavanomaiset nestekemiallisissa systeemeissä homogeeniseen spesifiseen sitomiskokeeseen nykyisin käytetyt instrumentit.

15 Keksinnön mukainen koelaitte sisältää homogeenisen spesifisen sitomiskokeen reagensseja. Homogeeninen, spesifinen sitomiskoetekniikka perustuu yleisesti

1) sitovan komponentin ja merkintäaineen muodostaman konjugaatin ja

20 2) sitomispartnerin väliseen spesifiseen vuorovaikutukseen, jossa konjugaatin sitova komponentti sitoutuu sitomispartneriin, jolloin merkintäaineen ominaisuudet merkityn konjugaatin ollessa sitomispartnerin sitoma ovat erilaiset kuin sitomattoman konjugaatin ominaisuudet. Merkintäaineen ominaisuudet, joihin vaikutetaan, voivat olla luonteeltaan erilaisia mitattavissa olevia ominaisuuksia, esimerkiksi merkintäaineen kemiallisia tai fysikaalisia ominaisuuksia. Joissakin tapauksissa ominaisuus, johon vaikutetaan, on kemiallinen reaktiivisuus etukäteen määrättyssä reaktiossa, jossa muodostuu tai katkeaa kemiallisia, kovalenttisia tai ei-kovalenttisia sidoksia. Toisissa tapauksissa ominaisuus, johon vaikutetaan on merkintäaineen fysikaalinen ominaisuus, joka voidaan mitata ilman kemiallista reaktiota.

35 Useimmissa tapauksissa keksinnön mukainen koelaitte sisältää sellaisia homogeenisen spesifisen sitomiskokeen reagensseja, jotka vaikuttavat immunokemiallisesti näyt-

teen ligandiin tai sen sitomiskykyyn. Toisin sanoen reagenssin ja näytteen ligandin ja/tai sen sitomiskyvyn välillä on antigeeni-vasta-ainesuhde tai haptenei-vasta-ainesuhde. Tällaisia kokeita nimitetään sen vuoksi immunokokeiksi ja merkityn konjugaatin ja sitomispartnerin välinen spesifinen vuorovaikutus on immunokemiallinen sitoutuminen. Tässä tapauksessa merkityn konjugaatin sitova komponentti on siten antigeeni, haptenei tai vasta-aine (tai tällaisen fragmentti) ja sitomispartneri on vastaava immunokemiallinen sitomispartneri. On kuitenkin alalla hyvin tunnettua, että homogeenisessä spesifisessä sidontakokeessa voidaan käyttää myös muiden merkittyjen konjugaattien ja sitomispartnerien vaikutusta toisiinsa, kuten hormonien, vitamiimien, metaboliittien ja farmakologisten aineiden ja vastaavien reseptorien ja sitovien aineiden välistä vaikutusta.

Kun näytteestä on tarkoitus määrittää siinä oleva tietty ligandi tai sen määrä, niin homogeenisen spesifisen sitomiskoetekniikan reagenssit käsittävät tavallisesti

1) ligandista tai sen sitovasta analogista ja siihen kemiallisesti liitetystä merkintäaineesta muodostuvan merkityn konjugaatin,

2) ligandin sitomispartnerin, esim. vasta-aineen tai sen fragmentin, luonnonreseptoriproteiinin tms. ja

3) merkityssä konjugaatissa olevan merkintäaineen mittaamiseen tarvittavan apureagenssin. Sitovaa ainetta käytetään rajoitettu määrä, jolloin näytteen sisältämä ligandi kilpailee merkityn konjugaatin kanssa sitomispartnerin sitomisessa. Merkintäaineen jakautuminen sidotun ja vapaan lajin kesken määrää siten merkintäaineen antaman havaittavan vasteen, joka puolestaan on riippuvainen läsnäolevan ligandin määrästä. Kun kokeen tarkoituksena on mitata näytteestä ligandin sitomiskyky, niin merkitty konjugaatti koostuu ligandista tai sen sitovasta analogista, joka on kemiallisesti kytketty merkintäaineeseen, jol-

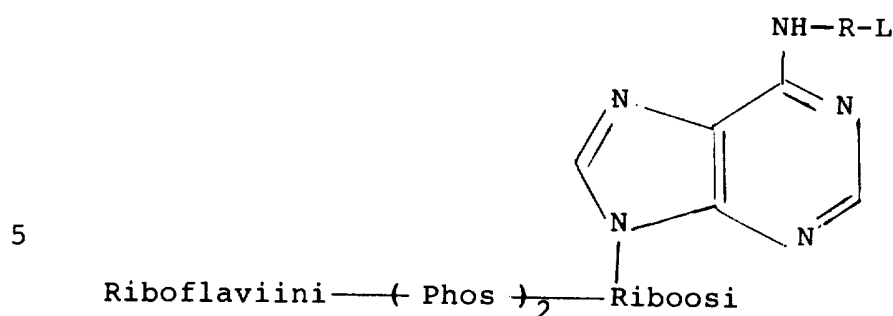
loin näytteen kyky sitoa merkitty konjugaatti, mikä riippuu esimerkiksi näytteessä olevan ligandin sitomispartnerin läsnäolosta, määrää vaikutuksen, joka havaitaan merkintäaineen signaalina.

5 Alalla tunnetaan monia erilaisia homogeenisia spesifisiä sitomiskoesysteemejä, joista seuraavassa esitetään keksintöä rajoittamattomia esimerkkejä, joista joi-
10 takin voidaan mahdollisesti käyttää keksinnön mukaiseen laitteeseen. Systemit on esitetty käytetyn merkintäaineen luonteen mukaisesti.

1. Entsyymien prosteettinen ryhmä merkintäaineena

Tässä systeemissä merkintäaineena on entsyymien prosteettinen ryhmä, jolloin katalyyttisesti inaktiivisen apoentsyymien kykyyn yhtyä prosteettiseen merkitsemisaineryhmään muodostaen aktiivisen entsyymien (holoentsyymi) vaikuttaa merkityn konjugaatin sitoutuminen sitomispartneriinsa. Tuloksena saadun holoentsyymien aktiviteetti on mitattavissa tavanomaisilla mittausjärjestelmillä, joilla saadaan lopullinen havaittava signaali. Tämän tyyppisiä
15 koesysteemejä on kuvattu US-patenttihakemuksessa sarja nro 45 423, haettu 1979-06-04 (vastaa GB-patenttijulkaisua nro 2 023 607). Erityisen edullisessa koejärjestelyssä, jossa on prosteettinen merkitsemisryhmä, käytetään merkintäaineena flaviiniadeniinidinukleotidia (FAD) ja
20 apoglukoosioksidaasia apoentsyyminä. Tuloksena oleva glukosaoksidaasiaktiviteetti voidaan mitata kolorimetrisesti käyttäen systeemiä, jossa on glukosia, peroksidiaasia ja indikaattorisysteemi, jonka värinmuutos vastaa vetyperoksidipitoisuutta.

30 Tällaisessa edullisessa koejärjestelyssä FAD-merkityllä konjugaatilla on edullisesti kaava



jossa Riboflaviini-(Phos)₂-Riboosi tarkoittaa FAD:ssa olevaa riboflaviini-pyrofosfaatti-riboosi-tähdettä, R on liitettävä ryhmä, ja L on sitova komponentti, esim. ligandi tai sen analogi.

2. Entsyymisubstraattimerkintäaineet

Tässä systeemissä merkintäaine valitaan siten, että merkitty konjugaatti on entsyymin substraattina, ja entsyymin kykyyn vaikuttaa substraatti-merkitty-konjugaattiyhdistelmään vaikutetaan joko positiivisesti tai negatiivisesti sitomalla merkitty konjugaatti sitomispartnerinsa kanssa. Entsyymien vaikuttaessa substraatti-merkitty-konjugaatti-yhdistelmään saadaan tuote, jonka jokin ominaisuus tavallisesti kemiallinen tai fysikaalinen ominaisuus, voidaan käyttää indikaattorireaktiota tai fotometri-

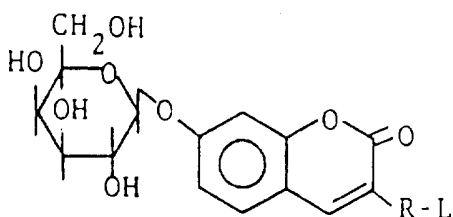
15

20

25

30

sesti mitattavaa reaktiota, esim. fluoresenssin tai valon absorption (värin) mittaamista. Tämän tyyppisiä koesysteemejä on kuvattu US-patenttihakemuksissa nro 894 836, jätetty 1978-04-10 (vastaa DE-hakemusjulkaisua nro 2 618 511) ja 87 819, jätetty 1979-10-23, sekä julkaisuissa Anal. Chem. 48:1933 (1976), Anal. Biochem., 75:55 (1977) ja Clin. Chem. 23:1402 (1977). Eriyisen edullisessa substraatti-merkityssä kokeessa käytetään merkittyä konjugaattia, jolla on kaava



5

jossa R on liittävä ryhmä ja L on sitova komponentti, esim. ligandi tai sen analogi, jolloin β -galaktosidaasientsyymin kyky pilkkoa konjugaatti, josta tuloksena saadaan fluoresenssin avulla todettava tuote, estyy konjugaatin sitoutuessa sitomispartneriinsa.

3. Koentsyymimerkintäaineet

Tässä systeemissä merkityn konjugaatin merkintäaineosalla on koentsyymiaktiivinen funktionaalisuus, ja sen kykyyn ottaa osaa entsyymaattiseen reaktioon vaikuttaa merkityn konjugaatin sitoutuminen sitomispartneriin. Tuloksena olevan entsyymaattisen reaktion määrä voidaan mitata tavanomaisin havaittavan signaalin antavin havaitsemiskeinoin. Tämän tyyppisiä systeemejä on kuvattu US-patenttihakemuksessa sarja nro 894 836, jätetty 1978-04-10 (vastaa DE-hakemusjulkaisua nro 2 618 511) ja julkaisuissa Anal.Biochem. 72:271 (1976), Anal.Biochem. 72:283 (1976) ja Anal. Biochem. 76:95 (1976).

25

4. Entsyymimodulaattorimerkintäaineet

Tässä systeemissä merkityn konjugaatin merkintäaineosalla on entsyymiä moduloiva vaikutus, kuten entsyymiä inhiboiva tai stimuloiva vaikutus, ja modulaattorimerkintäaineen kykyyn vaikuttaa entsyymin aktiivisuuteen vaikuttaa merkityn konjugaatin sitoutuminen sitomispartneriinsa. Tuloksena saadun entsyymaattisen reaktion määrä on mitattavissa tavanomaisilla havaitsemissysteemeillä, joissa mitataan lopullinen havaittava signaali. Tämän tyyppin koesysteemejä on kuvattu US-patenttijulkaisussa nro 4 134 792.

30

5. Entsyymimerkintäaineet

Tässä systeemissä merkintäaineena on entsyymi, ja entsyymin aktiviteettiin vaikuttaa merkityn konjugaatin sitoutuminen sitomispartneriinsa. Tuloksena saatu entsyymat-

5 tinen aktiviteetti voidaan mitata tavanomaisilla havaitsemissysteemeillä, joissa mitataan lopullinen havaittava signaali. Tämän tyyppin koesysteemejä on kuvattu US-patenttijulkaisuissa nro 3 817 837 ja 4 043 872.

6. Sammutettavat fluoresoivat merkintäaineet

10 Tässä systeemissä merkitty konjugaatti sisältää merkintäaineosassa fluoresoivaan ainetta, jonka fluoresenssi voidaan mitattavissa määrin sammuttaa merkityn konjugaatin ja sen sitomispartnerin välisellä reaktiolla, sitomispartnerin ollessa tavallisesti proteiini, kuten vasta-aine. Fluoresoiva merkintäaine voidaan mitata suoraan fluoresenssin ollessa havaittavana signaalina. Tätä tyyppiä olevia koesysteemejä on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 160 016 ja julkaisussa J. Clin. Path. 30:526 (1977).

15

7. Fluoresoivat polarisaatiomerkintäaineet

20 Tässä systeemissä merkintäaine on myös fluoresoiva aine, jonka mitattava ominaisuus, johon merkityn konjugaatin ja sen sitomispartnerin reaktio vaikuttaa, on fluoresenssin polarisaatio. Sitomispartnerina on tavallisesti proteiini, kuten vasta-aine. Tämän tyyppin koesysteemejä on kuvattu julkaisussa J.Exp.Med. 122:1029 (1965).

25

8. Kemiallisesti herätetyt fluoresoivat merkintäaineet

Tässä systeemissä merkintäaine on jälleen fluoresoiva aine, jonka kykyyn kemiallisesti saavuttaa energiataso, jossa se fluoresoi, vaikuttaa merkityn konjugaatin sitoutuminen sitomispartneriinsa. Merkintäaineen kemiallinen herättäminen suoritetaan tavallisesti saattamalla fluoresoiva merkintäaine in situ muodostetun korkeaenergisestä yhdisteen vaikutukselle alttiiksi. Tämän tyyppin koesysteemejä on kuvattu US-patenttihakemuksessa sarja-nro 4 580, jätetty 1979-01-18.

30

35

9. Kaksoisvasta-ainemerkintäaineet, jotka ovat stee-
risesti estettyjä

Vielä eräässä systeemissä käytetään kaksoisvasta-
aine-immunokoesysteemiä (US-patenttijulkaisut nro 3 935 074
5 ja 3 998 943). Merkittyy konjugaattiin sisältyy kaksi epi-
tooppia, joista toinen ottaa osaa immunologiseen reaktioon
ligandin ja antiligandin vasta-aineen kanssa, ja toinen si-
toutuu toiseen vasta-aineeseen, jolloin rajoituksena on,
etteivät molemmat vasta-aineet pysty samanaikaisesti si-
10 toutumaan merkittyy konjugaattiin. Toinen epitooppi voi
olla fluoresoiva aine, jonka fluoresointiin vaikuttaa hei-
kentävästi toisen vasta-aineen sitoutuminen, tai toinen
epitooppi voi joutua kilpailevaan sitoutumisreaktioon toi-
sen epitoopin merkityn muodon ja toisen vasta-aineen väli-
15 sen reaktion kanssa. Voidaan käyttää erilaisia havaitsemis-
systeemejä, joita on kuvattu edellä mainituissa patentti-
julkaisuissa. Samantyyppisiä systeemejä on kuvattu US-
patenttijulkaisuissa nro 4 130 462 ja 4 161 515 ja GB-pa-
tenttijulkaisussa 1 560 852.

20 Tässä systeemissä merkintäaine on energiansiirto-
antaja-vastaanottajaparin toinen jäsen ja sitomisaine on
konjugoitu tämän parin toisen jäsenen kanssa. Kun merkitty
konjugaatti sitoutuu sitomispartneriinsa antajakomponentin
energian ilmaisu muuttuu siirtymisen johdosta vastaan-
25 ottajakomponenttiin. Antaja on yleensä fluoresoiva aine ja
vastaanottaja sen sammuttaja, joka myös itse saattaa olla
fluoresoiva aine. Tällaisessa toteutusmuodossa fluoresointi
on havaittava signaali, mutta myös muita havaitsemissyste-
mejä voidaan käyttää. Tällaisia koesysteemejä on kuvattu
30 US-patenttijulkaisuissa nro 3 996 345, 4 174 384 ja
4 199 559 ja GB-patenttijulkaisussa nro 2 018 424.

11. Muita merkintäaineita

Esillä olevassa keksinnössä voidaan käyttää muitakin alalla kuvattuja homogeenisia spesifisiä sidontakoesysteemejä, esimerkiksi sellaisia, joiden merkintäaineina on

5 a) ei-entsyymikatalysaattoreita, kuten elektroninsiirtoaineita (US-patenttijulkaisu nro 4 160 645);

b) ei-entsyymikemiluminesenssiaineita (edellä mainittu US-patenttihakemus sarja nro 894 836);

10 c) "kanavoitumis"-merkintäaineita (GB-patenttijulkaisu nro 2 018 986);

d) "hiukkas"-merkintäaineita (GB-patenttijulkaisu nro 2 019 562);

e) merkittyjä liposomihiukkasia (US-patenttijulkaisu nro 4 193 983).

15 Ligandi

Keksinnön mukaista koetta voidaan käyttää sellaisen ligandin havaitsemiseen, jolle on olemassa vastaava spesifinen sitomispartneri, ja päinvastoin koetta voidaan käyttää ligandin sitomiseen kykenevän nesteväliaineen havaitsemiseen (tavallisesti johtuen sitomispartnerin läsnäolosta nesteväliaineessa). Ligandi on tavallisesti peptidi, polypeptidi, proteiini, hiilihydraatti, glykoproteiini, steroidi tai muu orgaaninen molekyyli, jota vastaava spesifinen sitomispartneri on olemassa biologisessa systeemissä tai voidaan syntetisoida. Funktionaalisesti ilmaistuna ligandi käsittää tavallisesti antigeenit ja niiden vasta-aineet, hapterit ja niiden vasta-aineet ja hormonit, vitamiinit, metaboliitit ja farmakologiset aineet sekä niiden reseptorit ja sitomisaineet. Ligandi on tavallisesti immunologisesti aktiivinen polypeptidi tai proteiini, jonka molekyylipaino on 1000-10 000 000, kuten vasta-aine- tai antigeenipolypeptidi tai -proteiini, tai hapteri, jonka molekyylipaino on 100-1500.

Polypeptidiligandeista voidaan mainita esimerkkeinä angiotensiini I ja II, C-peptidi, oksitosiini, vasopressiini, neurofysiini, gastriini, sekretiini, bradykiniini ja glukagoni.

5 Proteiiniligandeista voidaan erikseen mainita seuraavat luokat: protamiinit, mukoproteiinit, glykoproteiinit, globuliinit, albumiinit, skleroproteiinit, fosfoproteiinit, histonit, lipoproteiinit, kromoproteiinit ja nukleoproteiinit. Erikseen voidaan mainita seuraavat proteiinit prealbumiini, 10 α_1 -lipoproteiini, ihmisen seerumialbumiini, α_1 -glykoproteiini, transkortiini, tyroksiinia sitova globuliini, haptoglobiini, hemoglobiini, myoglobiini, seruloplasmiini, α_2 -lipoproteiini, α_2 -makroglobuliini, β -lipoproteiini, erytropoietiini, transferrini, homopeksiini, fibrinogeeni, immunoglobuliinit, kuten IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE ja niiden 15 fragmentit, esim. F_c ja F_{ab} , komplementtitekijät, prolaktiini, veren hyytymistekijät, kuten fibrinogeeni, trombiini jne., insuliini, melanotropiini, somatropiini, tyrotropiini, follikkelia stimuloiva hormoni, keltarauhashormoni, gonadotropiini, kilpirauhasta stimuloiva hormoni, plasentalaktogeeni, intrinsic tekijä, transkobalamiini, veriheran entsyymit, kuten alkalinen fosfataasi, maitohappodehydrogenaasi, 20 amylaasi, lipaasi, fosfataasit, kolinesteraasi, glutamiinioksalotikkahappotransaminaasi, glutamiinipalorypähappotransaminaasi ja uropepsiini, endorfiinit, enkefaliinit, 25 protamiini, kudosanogeneit, bakteeriantigeenit ja virusantigeenit, kuten maksatulehdukseen liittyvät antigeenit (esim. HB_s Ag, HB_c Ag ja HB_e Ag).

30 Hapteeneista voidaan esimerkkeinä mainita yleiset lääkeaineluokat, metaboliitit, vitamiinit ym. orgaaniset yhdisteet. Hapteenihormoneja ovat mm tyroksiini ja trijodi-

tyroniini. Vitamiineja ovat esim. A, B, E ja K vitamiinit, foolihappo ja tiamiini. Lääkeaineista voidaan mainita anti-
 biotit, kuten aminoglykosidit, esim. gentamisiini, tobra-
 mysiini, amikasiini, sisomisiini, kanamysiini ja netilmi-
 5 siini, penisilliini, tetrasykliini, terramysiini, kloromy-
 setiini ja aktinomysetiini, nukleosidit ja nukleotidit, ku-
 ten adenosiinidifosfaatti (ADP), adenosinitrifosfaatti (ATP),
 flaviinimononukleotidi (FMN), nikotinamidiadeniinidinukleo-
 tidi (NAD) ja sen fosfaattijohdannainen (NADP), tymidiini,
 10 guanosiini ja adnosiini; prostaglandiinit; steroidit, ku-
 ten estrogeenit, esim. estrioli ja estradioli, sterogeenit,
 androgeenit, digoksiini ja digitoksiini ja adrenokortikos-
 teroidit; sekä muut, kuten fenobarbitaali, fenytoiini, eto-
 suksimidi, karbamatsepiini, valproaatti, teofylliini, kofe-
 15 iini, propranololi, prokainamidi, kinidiini, amitryptiliini,
 kortisoli, desipramiini, disopyramidi, doksepiini, dokso-
 rubisiini, nortryptiliini, metotreksaatti, imipramiini, lido-
 kaiini, prokainamidi, N-asetyyliprokainamidi, amfetamiinit,
 katekolamiinit ja antihistamiinit.

20 Analysoitava nesteväliaine voi olla luonnossa esiin-
 tyvä tai keinotekoisesti valmistettu neste, jonka epäillään
 sisältävän ligandia. Se on tavallisesti biologinen neste
 tai sen laimennus. Biologisia nesteitä, joita voidaan ana-
 lysoida ovat esimerkiksi verihera, plasma, virtsa, sylki ja
 25 lapsivesi ja selkäydinneste.

Kantajajäsen

Keksinnössä käytettävän kantajajäsenen tulee ol-
 la absorbentti tutkittavalle nestenäytteelle. Se voi
 vaihdella muodoltaan, ja se käsitetään tässä yhteydessä
 30 laajasti. Se voi olla yksi- tai useampifaasinen ja voi
 koostua yhdestä tai useammasta sopivasta materiaalista,
 joilla materiaaleilla voi olla samanlaiset tai erilaiset
 absorptio- tai muut fysikaaliset ominaisuudet. Se voi ol-
 la hydrofobinen tai hydrofiilinen, huokoinen tai huokose-
 35 ton. Tehokkaimmillaan kantajajäsen on huolella suunnitel-
 tu sopimaan ominaisuuksiltaan juuri siihen homogeeniseen
 spesifiseen sitomiskoysteemiin, jossa sitä käytetään.

Tässä käytettynä ilmaisulla "kantajajäsen" tarkoitetaan siten mitä tahansa ainetta, perusainetta tai pintaa, johon voidaan liittää spesifisen sitomiskokeen reagensseja. Se voi olla muodoltaan monenlainen, esimerkiksi sellainen reagenssiliuska, jota käytetään liuosten kemiallisessa ja entsyymaattisessa analyysissä. Esimerkiksi US-patenttijulkaisussa nro 3 846 247 on esitetty käytettäväksi huopaa, huokoisia keraamisia liuskoja ja kudotuja tai huopautettuja lasikuituja. Paperin korvikkeena US-
5 patenttijulkaisussa nro 3 552 928 esitetään käytettäväksi puutikkuja, kangas-, sieni- tai savimateriaaleja. Paperin sijasta käytettäväksi on ehdotettu synteettisestä hartsista valmistettuja tai lasikuituhuopia GB-patenttijulkaisussa nro 1 369 139. Toisessa GB-patenttijulkaisussa nro
15 1 349 623 on ehdotettu käytettäväksi paperikantajajäsenin päällysteeksi liitettyä lievästi permeabilia ohuista säikeistä muodostettua verkkorakennetta. Tässä julkaisussa ehdotetaan myös paperin impregnoimista reagenssisysteemin osalla ja verkkorakenteen impregnoimista toisella reagenssisysteemin kemiallisella tai entsyymaattisella reagenssillä, joka on mahdollisesti yhteensopimaton ensimmäisen osan kanssa. FR-patenttijulkaisussa 2 170 397 on käytetty kantajajäseniä, joissa on yli 50 % polyamidikuituja. US-patenttijulkaisussa nro 4 046 513 on ehdotettu, että reagenssit painetaan sopivalle kantajajäsenelle. US-patenttijulkaisussa nro 4 046 514 reagoivaan systeemiin on liitetty kutomalla tai neulomalla reagensseja sisältäviä säikeitä. Kaikkia tällaisia ja muita kantajajäseniä voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä. Kantajajäsen koostuu edullisesti huokoisesta aineesta, kuten suodatinpaperista, joka
30 on impregnoitu spesifisen sitomiskoesysteemin reagenssien liuoksella tai suspensiolla. Se voi myös koostua systeemistä, joka sulkee fysikaalisesti sisäänsä nämä aineosat, kuten polymeerimikrokapseleita, jotka särkyvät koenäytteen
35 yhteyteen joutuessaan. Se voi käsittää systeemin, jossa

aineosat ovat homogeenisesti yhdistettyinä kantajajäsenen kanssa nestemäisessä tai puolijuokevassa muodossa, joka myöhemmin kovettuu, jolloin aineosat jäävät siihen sulkeutuneina.

Joka tapauksessa reagenssisysteemin tuleva käyttö määrää valitun kantajajäsenen koostumuksen tai muodon ja materiaalin, joka voi olla huokoinen, jolloin aineosat saadaan siihen imeyttämällä niitä sisältävä liuos, tai huokoseton, jolloin reagenssit voidaan painaa sille tai muodostaa jatkuvaksi päällysteeksi, tai se voi olla kudottu tai neulottu. Reagenssit liitetään kantajajäsenen monivaiheisesti. Tällöin valmistetaan kaksi tai useampia reagenssiluoksia tai -suspensioita, joihin kantajajäsen kastetaan peräkkäin kuivaamalla aina kastamiskertojen välillä. Tällaisessa tapauksessa käytetään edullisimmin huokoista materiaalia, kuten paperia. Toisena vaihtoehtona on käyttää monifaasikantajajäsentä, joka koostuu kahdesta tai useammasta huokoisen materiaalin kerroksesta, jotka on kiinnitetty toistensa päälle. Vielä eräänä mahdollisuutena on päällystää jatkuva polymeeri peräkkäin erilaisia immunokoesysteemin reagensseja sisältävillä päällysteillä. Kantajajäsenen voi sisältyä suodatuskerroksia, joiden tarkoituksena on estää mahdollisten häiritsevien aineiden pääseminen koesysteemiin, jolloin ne kuitenkin päästävät näytteen sisältävät analysoitavat aineet lävitseen.

Voidaan siten todeta, että kantajajäsenen sopiva valinta riippuu vain kahdesta tekijästä: spesifisen sitomissysteemin käyttötarkoituksesta ja luonteesta. Edellä esitettyjen tietojen perusteella sopivan kantajajäsenen valinta on rutiinikokein ratkaistavissa.

Koelaitteen valmistus

Keksinnön kohteena on myös menetelmä koelaitteen valmistamiseksi, mikä käsittää koesysteemin komponenttien sisällyttämisen kantajajäsenen. Kun tämä sisällyttäminen suoritetaan impregnoimalla yhdellä tai useammalla keksinnön mukaisen koesysteemin reagenssilla, niin impregoinnin jäl-

keen kantaja kuivataan. Impregnoinnin lisäksi keksinnön mu-
kaisten laitteiden valmistuksessa voidaan käyttää muita
sopivia menetelmiä, kuten koostumuksen painamista tai suih-
kuttamista kerrokseksi kantajamateriaalille tai liuosten
5 sisällyttämistä kalvon muodostavaan nesteeseen, jonka anne-
taan sitten kovettua.

Kun kantajajäsen sisältää useampia kerroksia, esi-
merkiksi paperista tai muusta huokoisesta materiaalista
koostuvia kerroksia, niin nämä voidaan liittää samansuun-
10 taisina toisiinsa liiman avulla, joka sallii nesteen kulun
kerrosten välillä. Integraalisten analyysiyksikköjen val-
mistamiseksi kalvonmuodostajakerrokset voidaan valmistaa
erikseen etukäteen ja laminoida sitten kokonaisuudeksi.
Kalvokerrosten materiaali voi koostua pehmittimestä ja poly-
15 meerista, josta valmistettu kalvo on muotonsa pitävä. Ker-
rosten valmistus tapahtuu tyypillisesti päällystämällä liu-
oksella tai dispersiolla pinta, josta kuivattu kerros voi-
daan irroittaa fysikaalisesti. Sopivassa menetelmässä, jos-
sa vältetään useat irroitus- ja laminoitivaiheet, valmis-
20 tetaan aluksi kerros pinnalle, josta valmistettu kerros
voidaan irroittaa, tai haluttaessa alusta-aineella, ja sen-
jälkeen seuraavat kerrokset valmistetaan suoraan peräkkäin
edelliselle päällystekerroksella. Tällainen päällystys voi-
daan suorittaa käsin käyttäen päällystysterää tai koneella
25 käyttäen kastamis- tai helmipäällystystekniikka. Koneellis-
ta päällystystekniikkaa käytettäessä on usein mahdollista
päällystää samanaikaisesti viereiset kerrokset käyttäen va-
lonherkkien valokuvafilmien ja -paperien valmistuksessa käy-
tettyä syöttösuppilopäällystystekniikkaa.

30 Kalvokerroksen materiaalina voidaan käyttää samen-
tumapolymeerikerroksia. Kalvo muodostetaan alusta-aineelle
liuottamalla polymeeri kahden nesteen seokseen, joista toi-
sella on alempi kiehumispiste kuin toisella ja hyvä polymeer-
in liuotuskyky, ja toisella on korkeampi kiehumispiste ja
35 polymeeri on siihen liukenematon tai niukkaliukoinen. Alus-

ta-aine päällystetään sitten tällaisella polymeeriliuok-
sella ja kuivataan säädetyissä olosuhteissa. Alemmalla kie-
huva liuotin haihtuu helpommin, ja päällysteessä kasvaa
liuottimen osuus, johon polymeeri on liukenematon tai
5 niukkaliukoinen. Haihtumisen jatkuessa sopivissa olosuh-
teissa polymeeri muodostaa huokoisen kerroksen. Keksinnön
tarkoituksiin voidaan käyttää monia erilaisia polymeereja
yksin tai yhdistelminä huokoisen samentumapolymeerikerrok-
sen valmistamiseksi. Tyypillisiä esimerkkejä ovat polykar-
10 bonaatit, polyamidit, polyuretaanit ja selluloosaesterit,
kuten selluloosa-asetaatti. Valmistettaessa kerroksia, jot-
ka sisältävät merkittäviä konjugaattia tai muuta reagenssia,
voidaan valmistaa päällystysliuos tai -suspensio, joka si-
sältää perusaineen ja siinä aktiiviset materiaalit ja pääl-
15 lystää tällä liuoksella tai suspensiolla edellä kuvatulla
tavalla alusta-aine ja kuivata se dimensioiltaan pysyväksi
kerrokseksi.

Kerrostien paksuudet ja niiden läpäisykyvyt vaihtelevat suuresti riippuen aiotusta käytöstä. Sopivia paksuuksia
20 ovat noin $5 \mu\text{m} - 100 \mu\text{m}$, vaikkakin joissakin tapauksiss
myös laajemmat paksuusvaihtelut voivat tulla kyseeseen.
Jos tarvitaan esimerkiksi suhteellisen suuri määrä vaikut-
tavaa materiaalia, kuten polymeerimateriaalia, esim. entsyymejä,
voi olla edullista valmistaa jonkin verran paksum-
25 pi kerros.

Saattaa myös olla edullista sisällyttää kantajajä-
seneeseen yksi tai useampia heijastavia kerroksia, jotka
ovat mahdollisesti havaittavaa säteilyä absorboivaa ainetta
ja helpottavat signaalin havaitsemista heijastusradiometrillä,
30 esim. heijastusffotometrillä tai vastaavalla. Tällainen hei-
jastusaine voidaan sisällyttää yhteen tai useampaan edellä
kuvatuista kerroksista tai se voidaan muodostaa omaksi ker-
rokseksi, jolla ei ole muuta merkitystä laitteessa. Hei-
jastavassa kerroksessa voidaan käyttää edullisesti heijas-
35 tavia pigmenttejä, kuten titaanioksidia ja bariumsulfaattia.

Samentumapolymeeri voi sisältää myös sopivaa heijastavaa ainetta. Eräässä edullisessa toteutusmuodossa samentumapolymeeri voi sisältää pigmenttiä heijastuskyvyn tai muun funktion parantamiseksi. Kerrokseen yhdessä polymeerin kanssa sisällytettävä pigmenttimäärä voi suuresti vaihtella, edullisia pitoisuuksia ovat noin 1-10 paino-osaa pigmenttiä yhtä samentumapolymeerin paino-osaa kohti, jolloin edullisin määrä on noin 3-6 osaa pigmenttiä yhtä samentumapolymeerin paino-osaa kohti.

10 Kantajajäsenen kerrokseen voi olla edullista sisällyttää yhtä tai useampaa pinta-aktiivista ainetta, kuten anionista tai ionitonta pinta-aktiivista ainetta. Se saattaa esimerkiksi parantaa kerroskoostumusten päällystettävyyttä ja sellaisten kerrosten kostutettavuutta, joita nestenäytteet eivät helposti kostuta ilman pinta-aktiivisen aineen apua. Kantaja-aineen kerrokseen voi olla edullista sisällyttää aineita, jotka voivat muuttaa valitulle analyysille haitalliset aineet haitattomiksi kemiallisella reaktiolla tai muuten.

20 Kuten edellä mainittiin koko analyyttinen elementti voi olla itsekantava tai se voi olla päällysteenä kantavalla aineella. Kantava aine voi olla himmeä tai valoa tai muuta energiaa läpäisevä. Kannattajajäsenen kantavaksi aineeksi tulee valita aine, joka sopii aiottuun signaalin havaitsemismenetelmään. Edullisia kannattaja-aineita ovat läpinäkyvät aineet, joiden lävitse sähkömagneettinen säteily aaltopituudeltaan noin 200-900 nm pääsee. Kannattajan ei tietenkään tarvitse läpäistä koko alueen 200-900 nm säteilyä, vaikkakin fluorometrisen analyysituloksen havaitsemisessä kannattaja-aineen lävitse on edullista, että se läpäisee leveällä aaltoalueella säteilyä tai vaihtoehtoisesti läpäisee käytetyn fluoresoivan aineen havaitsemiseen käytetyn absorptio- tai emissiospektrin. Saattaa olla myös edullista että kannattaja-aine päästää lävitseen yhden tai useamman kapean aaltopituusalueen ja on läpäisemätön vierisille aaltopituusalueille. Tämä voidaan aikaansaada imp-

regnoimalla tai päällystämällä kannattaja-aine yhdellä tai useammalla väriaineella, jolla on halutut absorptio-ominaisuudet.

Seuraavassa kuvataan esillä olevan keksinnön mu-
5 kaisten koelaitteiden valmistus:

Useampikertainen impregointi

Kantaja-ainekerros impregnoidaan ensimmäisessä liuot-
timessa olevalla ensimmäisellä reagenssiliuoksella tai sus-
pensiolla ja kuivataan. Sitten kantaja-aine impregnoidaan
10 toisella jäljellejääneiden reagenssien liuoksella tai sus-
pensiolla toisessa liuottimessa, joka on laadultaan sellai-
nen, että se estää ensimmäisessä liuottimessa olevien rea-
genssien vaikuttamisen. Tällä tavoin kummankaan liuoksen
reagenssit eivät pääse vaikuttamaan toisiinsa koelaitteen
15 valmistuksen aikana eivätkä siten reagoi ennen aikojaan.
Edullisessa toteutusmuodossa tietyt ensimmäiset reagenssit
liitetään kantaja-ainekerrokseen käyttäen kastamista vesi-
pitoiseen väliaineeseen. Muille reagensseille käytetään
sopivaa orgaanista liuotinta, kuten tolueenia, asetonia,
20 kloroformia, metyleenikloridia, n-propanolia tai etyleeni-
dikloridia. Tämä kerros kovetetaan antamalla orgaanisen liu-
ottimen haihtua. Yksityiskohtia on lähemmin selvitetty esi-
merkeissä.

Monikerroselementti

25 Monikerroselementti valmistetaan sisällyttämällä en-
simmäiseen tai päällä olevaan kerrokseen joitakin, ei kui-
tenkaan kaikkia, reagensseista, joita käytetään spesifi-
sessä sitomiskoesysteemissä, sisällyttämällä toiseen tai
alla olevaan kerrokseen muut reagenssit, kovettamalla erik-
30 seen, esimerkiksi kuivaamalla kerrokset ja kiinnittämällä
ne toisiinsa laminaarisesti. Kun käytetään absorboivaa kan-
tajamateriaalia, niin elementit valmistetaan impregnoimalla
kerrokset ja kuivaamalla impregnoidut kerrokset.

Ensimmäisellä ja toisella kerroksella on kummallakin
35 pari vastakkaisia pintoja. Toinen ensimmäisen kerroksen pin-
noista laminaarisuhteessa toisen kerroksen toisen pinnan

5 kanssa, ja näyte pannaan näiden kerrosten jommalle kum-
malle pinnalle. Ilmaisulla laminaarisuhde tarkoitetaan,
että neste tai kaasu pystyy kulkemaan tällaisten toisten-
sa päälle asetettujen kerrosten pintojen välissä. Tällai-
set kerrokset voivat olla jatkuvia tai niitä voi erottaa
toisistaan välillä oleva kerros. Välissä oleva kerros ei
saisi estää kulkua kaikkien kerrosten välillä.

Kylmäkuivausmenetelmä

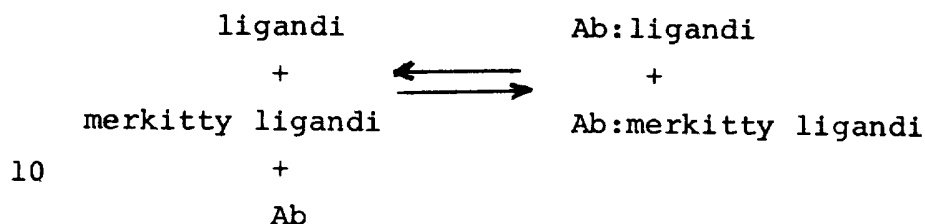
10 Tässä valmistusmenetelmässä pyritään sisällyttääes-
sä yhteensopimattomia reagensseja yhteen ainoaan analyysi-
elementin kerrokseen estämään niiden välinen reaktio. Kun
käytetään esimerkiksi absorboivaa kantajamateriaalia, niin
ensimmäinen reagenssiryhmä sisällytetään kerrosateriaa-
liin korotetussa lämpötilassa (tai vaihtoehtoisesti kylmä-
15 kuivaamalla) ja käsitellyn kerroksen annetaan kovettua.
Toinen ryhmä reagensseja, joista ainakin joku reagoi huo-
neen lämpötilassa ensimmäisen ryhmän kanssa, lisätään ja
yksikkö jäädytetään nopeasti. Jäädyttämällä estetään ennen-
aikainen reaktio ja kylmäkuivaamalla saadaan sitten vesi
20 poistettua, mikä estää ennenaikaisen reaktion kerroksen läm-
mettyä huoneen lämpötilaan.

Edullisessa toteutusmuodossa yksi reagenssiryhmä voi-
daan lisätä vesiliuoksena kerrokseen ja kuivata. Toisen rea-
genssiryhmän lisäys suoritetaan vesiliuoksessa, joka jää-
25 dytetään sitten nopeasti ja josta senjälkeen poistetaan
vesi kylmäkuivaamalla. Tällä menetelmällä voidaan yksik-
köön sisällyttää vain vesiliukoisia reagensseja ja estää
näin reagenssien väliset reaktiot. Siten vältetään myös
orgaanisten liuottimien käyttö, joista tietyt voivat vai-
30 kuttaa haitallisesti joihinkin reagensseihin (esim. entsyy-
meihin).

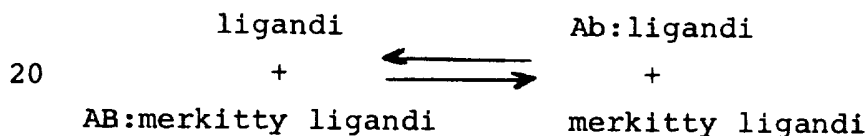
Tällä menetelmällä voidaan valmistaa koostumuksia
reagensseista, joita käytetään homogeeniseen spesifiseen
kokeeseen, jossa kaikki reagenssit ovat samassa kerrosele-
35 mentissä.

Palautuva kompleksinmuodostus

Näytteen ligandin ja merkityn ligandin kilpailu sitoutumisesta sitomispartneriin (tässä esimerkkinä käytetty vasta-ainetta "Ab") voidaan esittää seuraavalla yhtälöllä:



Kuvatussa systeemissä vasta-aine ja merkitty ligandi pidetään erillään toisistaan aina näytteen lisäämiseen asti. Tässä keksinnön mukaisen menetelmän toteutuksessa käytetään hyväksi palautuvaa reaktiota ja uudelleen tasapainottumista ligandin kanssa, kuten nähdään seuraavassa yhtälössä:



jossa syrjäytetyn merkityn ligandin määrä on suorassa suhteessa näytteen ligandikonsentraatioon. Etuna on, että kaikki reagenssikomponentit voidaan sisällyttää yhteen väliaineeseen ja saatua systeemiä käytettäessä tarvitaan vain korkeiltaan näytteen lisäys.

Analyyttisiä elementtejä valmistetaan ikuboimalla lyhyen aikaa, esim. 15 min. tiettyä konjugaattia vastaavan antiseerumin kanssa. Sitten lisätään mahdollisia lisäreagensseja, ja inkubointia jatketaan vielä jonkin aikaa, muodostuneella liuoksella impregnoidaan (tai sisällytetään muuten) kantaja-ainekerros, ja liuoksen annetaan kovettua.

Havaittava vaste

Kuten edellä mainittiin, monilla viime aikoina suunnitelluilla homogeenisilla spesifisillä sitomiskoesyste-

meillä saadaan, mahdollisesti käyttäen sovellutusta, havaittava vaste, kuten värin muutos, kemiluminesenssi- tai fluoresenssivaste, joka vastaa kokeiltavan nestenäytteen ligandia kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti.

- 5 Ilmaisulla "havaittava laji" ja muilla tässä käytetyillä samantapaisilla ilmaisuilla tarkoitetaan atomeja, kemiallisia ryhmiä (so. osia molekyylistä) tai kemiallisia yhdisteitä, jotka itsessään ovat suoraan tai epäsuorasti havaittavissa, ja ilmaisulla "havaittava vaste" sekä muilla
10 tässä käytetyillä samankaltaisilla ilmaisuilla tarkoitetaan tällaisen lajin havaittavissa olevaa ilmausta. Esimerkkejä ovat sähkömagneettisen säteilyn signaalit, kuten fluoresenssi, fosforesenssi, kemiluminesenssi, valon absorption tai reflektanssin muutos näkyvällä spektrin osalla, mikä
15 havaitaan näkyvänä värin muutoksena, tai valon absorption tai reflektanssin muutos näkyvän alueen ulkopuolella, kuten ultravioletti- tai infrapuna-alueella. Kuten immunokokeita perillä olevalle asiantuntijalle on selvää, ilmaisua "havaittava vaste" on tässä käytetty laajimmassa mielessä.
20 Sähkömagneettisten säteilysignaalien lisäksi ilmaisuun "havaittava vaste" käsitetään sisältyvän myös systeemin muiden parametrien havaittavat muutokset, kuten reaktantin havaittavat muutokset, jotka havaitaan näytteen jonkin komponentin saostumisena tai muu muutos joko immunokoesysteemissä tai
25 näytteessä. Tällaisia muita havaittavia vasteita ovat sähkökemialliset ja kolorimetriset vasteet. Havaittava vaste voi lisäksi olla sellainen, joka voidaan suoraan havaita aisteilla tai jollakin havaitsemislaitteella, kuten spektrofotometrillä, UV-valon havaitsemislaitteella, fluorometrillä,
30 spektrofluorometrillä, pH-mittarilla tai muulla. On toivottavaa, että havainto voidaan suorittaa sopivasti käyttäen havaittavan lajin koko määrää ilman, että siten vaikutetaan analyysin perusteena olevien analysoitavien aineiden reaktioista syntyneisiin diffundoituvien tuotteiden määrään.
35 Kun analyysitulokset on saatu havaittavana muutoksena,

niin se mitataan tavallisesti viemällä koe-elementti vyöhykkeen lävitse, joka on varustettu sopivalla heijastus-, transmittio- tai fluoresenssifotometrillä. Tällainen laite toimii siten, että se suuntaa energiasädekimpun, kuten
5 eräässä toteutuksessa valon kantaja-aineen lävitse. Valo heijastuu elementistä takaisin havaitsemisvälineeseen tai kulkee elementin lävitse havaitsemisvälineeseen, kun kyseessä on transmittio-havaitseminen. Edullisessa suoritus-
10 tavassa analyysituloksella havaitaan elementin alueella, joka on tlysin siinä alueessa, jossa tulos tuotetaan. Heijastuspektrofotometrin käyttö saattaa joissakin tapauksissa olla edullista, jotta voitaisiin tehokkaasti välttää mahdollisten jäännösten, kuten verisolujen optinen häirintä tai virtsan kerroksille muodostaman sakan tai tyypillisen virtsan värin optinen häirintä. Haluttaessa voidaan myös käyttää tavanomaista fluoresenssispektrofotometritekniikkaa.
15 Lisäksi voidaan käyttää transmissiotekniikkaa sellaisten reaktiotuotteiden havaitsemiseen tai määrittämiseen, joita on muodostunut säteilyenergian, kuten ultraviolettisäteilyn, näkyvän tai infrapunaisen säteilyn vaikutuksesta elementin yhteen pintaan, jolloin tämän energian "ulostulo" mitataan yksikön vastakkaisella pinnalla. Yleensä tällaisessa mittauksessa käytetään sähkömagneettista säteilyä aaltopituudella noin 200-900 nm, vaikkakin mitä tahansa
20 säteilyä, jonka elementti päästää lävitseen ja jolla voidaan kvantitatiivisesti määrittää muodostunut tuote, voidaan käyttää. Analyysin kontrolloimiseen voidaan käyttää erilaisia kalibrointimenetelmiä. Esimerkiksi kokeiltavaa ligandia sisältävän standardiliuoksen näyte vietään alu-
30 eelle lähelle aluetta, johon näytetippa vietiin, jotta analyysissä voitaisiin käyttää tulosten differenssiin perustuvaa mittausta.

Esimerkit

Seuraavat esimerkit kuvaavat kokeita, joita suoritettiin keksinnön kehitystyön yhteydessä. Niiden valaistessa edullisia suoritusmuotoja niitä ei voida kuitenkaan
35

pitää keksinnön suojapiiriä rajoittavina.

A. Prosteettisella ryhmällä merkitty immunokoelaitte

Esimerkki I

Mallisysteemi

5 Erilaisten GB-patenttijulkaisussa nro 2 023 607 kuvattujen prosteettisella ryhmällä merkittyjen homogeenisten immunokoereagenssisysteemien sisällyttämistä kuivaan koelaitteeseen kokeiltiin valmistamalla mallisysteemi. Mallisysteemissä käytetty vastaava ligandi oli N-(2,4-dinitro-

10 fenyyli)- ϵ -aminokapronihappo (tästä lähtien käytetään nimitystä "DNP"). Reagenssit, joihin sisältyivät systeemin immunokemialliset komponentit, käsittivät DNP:n vasta-aineen, DNP:n ja flaviiniadeniinidinukleotidin konjugaatin (josta tästä lähtien käytetään nimitystä "DNP-FAD") ja apoglukoosioksideasin.

15

Systeemi suunniteltiin siten, että DNP-vaste näkyi värinä, joka aiheutui apoglukoosioksideasin aktivoitumisesta DNP-FAD-konjugaatin vaikutuksesta. DNP-FAD, jota vasta-

20 aine ei sido, on suorassa suhteessa DNP-konsentraatioon. Se voidaan havaita kyvystä yhtyä apoglukoosioksideasiin, jolloin muodostuu aktiivista glukooxioksideasientsyymiä. Systeemiin sisältyi siten apoentsyymien, vasta-aineen ja konjugaatin lisäksi havaittavan vasteen saamiseksi glukooxioksideasisysteemi, joka sisälsi glukosia, 3,3',5,5'-tetra-

25 metyylibentsidiiniä (TMB) ja piparjuuriperoksideasia. Apoentsyymien aktivoituessa glukooxioksideasiksi muodostuu sininen väri, joka aiheutuu glukosin hapettumisesta vetyperoksidiksi ja sitä seuraavasta TMB:n muuttumisesta peroksideasin läsnäollessa siniseen, hapettuneeseen tilaan.

30 1. Apoentsyymien valmistus

Apoentsyymi valmistettiin erittäin puhtaasta glukooxioksideasista (Miles Laboratories, Inc., luettelo nro 31-619). 10,5 ml entsyymiliuosta (1000 yksikköä/ml) sekoitettiin dekantterissa 4,5 ml:aan glyserolia, ja seos jäädytettiin 0-4°C:seen. Seoksen pH säädettiin 10-%:sella H_2SO_4 -

35

vesiliuoksella arvoon 1,4. pH:n säätö suoritettiin koko ajan sekoittaen ja jäähdyttäen jäähauteessa. Sekoittamista jatkettiin vielä 2 tuntia, jonka jälkeen liuos kaadettiin Sephadex G-50 (medium) verkkoutettua geelisuodatus-

5 ainetta sisältävään kolonniin (1,5 x 43 cm). Sephadex oli ennen entsyymiliuoksen lisäämistä tasapainotettu 30-tilavuus-% glyserolia sisältävällä liuoksella, jonka pH oli 1,4. Entsyymiliuoksen lisäämisen jälkeen käytettiin apoentsyymien eluointiin samaa 30-% glyserolia sisältävää liuosta.

10 ta. Effluentista kerättiin fraktioita, joiden UV-absorbanssi tutkittiin aaltopituudella 280 nm. Fraktiot, joissa esiintyi absorbanssia tällä aaltopituudella, yhdistettiin puskuriliuokseen, joka sisälsi 50 mg aktiivihiihtä ja 25 mg dekstraania (Pharmacia Company nro T-70). Puskuri koostui

15 l-molaarisesta tris(hydroksimetyyli)aminometaanin vesiliuoksesta, johon oli lisätty glutamiinihappoa pH:n säätämiseksi arvoon 7,0. Saadun effluenttiliuoksen pH säädettiin sitten arvoon 7 kyllästetyllä tris(hydroksimetyyli)aminometaanin liuoksella. Lopullista liuosta sekoitettiin jäähauteessa

20 tunnin ajan. Apoentsyymiliuos lingottiin, ja supernatantti suodatettiin Millipore-suotimilla 0,5 μ m ja 0,22 μ m (Millipore Corporation).

2. DNP-FAD-konjugaatin valmistus

Konjugaatti valmistettiin seuraavasti: Trayer'in et

25 al. (Biochem. J., 139 (1974), 609-623) menetelmällä syntetisoitiin N⁶-(trifluoriasetamidoheksyyli)adenosiini-5'-monofosfaatti 56 mg (0,1 mmol) sitä liuotettiin noin 10 ml:aan vettä, ja liuokseen lisättiin 25 μ l tri-n-butyylimiamiinia (0,1 mmol). Vesi haihdutettiin vakuuissa, jäännös liuotettiin

30 tiin 10 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia, joka sitten haihdutettiin vakuuissa. Liuottaminen kuivaan dimetyyliformamidiin ja liuottimen haihduttaminen suoritettiin vielä kolme kertaa. Lopullinen jäännös liuotettiin 10 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia. Liuokseen lisättiin 80 mg N,N'-

35 karbonyylidi-imidatsolia (0,5 mmol), ja seos sai reagoida

1,5 tuntia. Sitten lisättiin 15 μ l vettä ja liuotin haihdutettiin vakuuissa. Jäännöksenä saatu N^6 -(trifluoriasetamidoheksyyli)adenosiini-5'-monofosfaatti-imidatsolidi liuotettiin 10 ml:aan dimetyyliformamidia.

- 5 47 mg (0,1 mmol) Johnson'in et al. (Anal.Biochem., 86 (1978), 526-530) menetelmällä puhdistettua riboflaviini-5'-monofosfaattia liuotettiin noin 10 ml:aan vettä, ja liuos lisättiin tipoittain 20 ml:aan asetonia, joka sisälsi 43 μ l (0,1 mmol) tri-n-oktyyliamiinia. Ennen lisäyksen päättymistä
- 10 saatiin sakka. Liuotin poistettiin kiertohaihduttimessa, kunnes riboflaviini-5'-monofosfaatti liukeni. Sitten lisättiin 5 ml asetonia ja 5-10 ml dimetyyliformamidia ja seos haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin 15-20 ml:aan kuivaa dimetyyliformamidia, ja liuos haihdutettiin kuiviin.
- 15 Sama toistettiin kolme kertaa. Jäännös liuotettiin 5 ml:aan dimetyyliformamidia, ja liuos yhdistettiin edellä saadun 10 ml:n kanssa imidatsolidin dimetyyliformamidiliuosta. Reaktioseos sai seistä huoneen lämpötilassa yön yli, sitten liuotin poistettiin. Jäännös liuotettiin 50 ml:aan vettä
- 20 ja vietiin DEAE-selluloosaa (Whatman DE 23; Whatman, Inc., Clifton, NJ) bikarbonaattimuodossa sisältävään kolonniin (2,5 x 25 cm). Kromatogrammi kehitettiin veden (2 l) ja 0,3-m ammoniumbikarbonaattiliuoksen (2 l) lineaarisella gradientilla, jolloin koottiin 23 ml:n fraktioita. Ohutkerros-
- 25 kromatografia silikageeli 60 F254:llä (E. Merck, Darmstadt, Saksan Liittotasavalta) osoitti fraktioiden 68-73 sisältävän vahvasti keltaisia (R_F 0,75) ja heikommin keltaisia (R_F 0,36) yhdisteitä. Nämä fraktiot yhdistettiin, absorptiospektrissä oli maksimit kohdissa 267 nm, 373 nm ja 450 nm.
- 30 Yhdistetystä liuksesta poistettiin liuotin ja jäännös liuotettiin noin 5 ml:aan vettä. Tämän liuoksen pH säädettiin 5-m NaOH-liuoksella arvoon 11,0, ja liuos sai sitten seistä huoneen lämpötilassa 9 tuntia. Ohutkerroskromatografia osoitti tällöin komponentin R_F 0,75 hävinneen
- 35 ja että tilalle oli muodostunut uusi keltainen yhdiste R_F 0,37. Reaktioseoksen pH säädettiin kloorivetyhapolla arvoon

8,0 ja seos vietiin bikarbonaattimuodossa olevaa DEAE-sel-
luloosaa sisältävään kolonniin (2,5 x 20 cm). Kromatogram-
mi kehitettiin veden (1 l) ja 0,2-m ammoniumbikarbonaatti-
liuoksen (1 l) lineaarisella gradientilla. Kolonnista saa-
5 tu keltainen effluentti koottiin yhteen ja liuotin haih-
dutettiin. Jäännös adsorboitiin 2 g:lle silikageeliä, joka
sitten asetettiin kolonnin yläosaan, joka sisälsi 50 g eta-
noli/l-m trietyyliammoniumbikarbonaattiliuosseoksella (pH
7,8) (tilavuussuhde 8:2) tasapainotettua silikageeliä. Kro-
10 matogrammi kehitettiin samalla liuottimella, keltainen kompo-
nentti, jonka R_F oli 0,37, koottiin ja haihdutettiin. Fla-
viini- N^6 -6-N-aminoheksyyliadeniinidinukleotidin /josta täs-
tää lähtien käytetään nimitystä N^6 (aminoheksyyli)FAD/ saan-
to oli 10 % (määritetty absorbanssin 450 nm perusteella).

15 10 ml:aan 0,21-m natriumbikarbonaatin vesiliuosta,
joka sisälsi 0,06 mmoolia N^6 (aminoheksyyli)FAD:ia, lisät-
tiin sekoittaen tipoittain 17 μ l (0,13 mmol) 2,4-dinitro-
fluoribentseeniä 1 ml:ssa absoluuttista etanolia. Reaktio-
seosta sekoitettiin pimeässä 6 tuntia, sitten siihen lisät-
20 tiin 10 μ l (0,08 mmol) 2,4-difluoribentseeniä liuotettuna
0,5 ml:aan etanolia. Reaktioseosta sekoitettiin yön yli.
Ohutkerroskromatografiolla silikageelillä (silikageeli 60,
F-254, E.Merck) liuotinsysteemissä etanoli/trietyyliammo-
niumbikarbonaatti (pH 7,5) (7:3) todettiin N^6 (aminoheksyyli)-
25 FAD:in reagoineen täydellisesti.

Reaktioseos suodatettiin Whatman nro 1 paperilla ja
suodos vietiin Sephadex LH-20 sisältävään kolonniin (2,5 x
56 cm), joka oli tasapainotettu 0,3-m ammoniumbikarbonaa-
tilla. Kromatogrammi kehitettiin samalla liuottimella, jol-
30 loin saatiin erillisinä piikkeinä useita keltaisia aineita.
Välillä 470-560 ml 0,3-m ammoniumbikarbonaattiliuoksella
eluoitunut liuos oli ainoa, joka aktivoi apoglukoosioksidaa-
sin. Edellä kuvatulla tavalla suoritettulla ohutkerroskro-
matografiolla tämä materiaali saatiin jaettua kahdeksi kel-
35 taiseksi fluoresoivaksi täpläksi (R_F = 0,84 ja 0,89). Opti-
sessä absorptiospektrissä oli maksimit kohdissa 265, 370

ja 455 nm. Tämän tuotteen näyte saatettiin reagoimaan käärmemyrkky-fosfodiesteri-*in vivo*-valmisteen (*Crotalus adamastes*) kanssa (valmistaja: Worthington Biochemical Corp.). Ohutkerroskromatografia osoitti, että reaktiotuotteet olivat riboflaviini-5'-monofosfaatti ja N⁶(2,4-dinitrofenyyliaminoheksyyli)adenosiini-5'-monofosfaatti. Täplien vahvuudesta voitiin päätellä, että täplä, jonka R_F oli 0,87, oli entsyymien hajottaman materiaalin täplä. 3 vuorokaudessa ei hajoaminen ollut täydellistä.

10 3. Koelaitteen valmistus

Koelaitte valmistettiin sisällyttämällä aineosat kahdella kastamisella paperiperusaineeseen. Ensimmäinen imeytys suoritettiin kastamalla 2-mmolaliseen TMG-asetoniliuokseen. Eaton & Dickman 205 suodatinpaperin palaset (4 x 4 cm) kastettiin TMB-liuokseen (ensimmäinen kastaminen), poistettiin liuoksesta ja kuivattiin kiertoilmahuoneessa 90°C:ssa 1-2 minuuttia.

Toinen kastamisliuos valmistettiin yhdistämällä seuraavat aineosat mainitussa järjestyksessä:

20	Vesipitoinen puskuri (pH 6,4) ^{x)}	0,4 ml
	Glukoosi (1-m)	0,2 ml
	Piparjuuriperoksidaasi (153 yks/mg: 1,25 mg/ml)	0,2 ml
	Polyvinyylialkoholi (Monsanto 20-30; 10 g/100 ml vettä)	0,2 ml
25	Naudan seerumialbumiini (Miles Laboratories, Inc.; 20 mg/ml vettä)	0,05 ml
	Apoglukoosioksidaasi (5,0 nanomoolia FAD-sitomiskohtia/ml)	0,4 ml
	Osittain puhdistettu DNP:n vasta-aine ^{xx)}	0,56 ml

30 ^{x)} Puskuri sisältää vesiliuoksena 10,8 g tris(hydroksimetyyli)aminometaania, 9,7 g glutamiinihappoa ja 1,6 g sitruunahappoa 100 ml:ssa liuosta.

35 ^{xx)} Osittain puhdistettu vasta-aine valmistettiin DNP-anti-seerumista (Miles Laboratories, Inc.). Immunoglobuliinifraktio eristettiin saostamalla ammoniumsulfaatilla Livingston'in ("Methods in Enzymology", vol. XXXIV, W.B. Jakoby

ja M Wilchek, 3 painos, sivu 725; Academic Press, New York, 1974) kuvaamalla menetelmällä. Tällä menetelmällä saatu lopullinen sakka liuotettiin 50 mmolaariseen kaliumfosfaattiin (pH 6,8) sellaiseksi tilavuudeksi, joka vastasi alkuperäistä seerumia. Tämä liuos dialysoitiin yön yli 4°C:ssa samaa puskuria (50-mmolaarinen kaliumfosfaatti, 500 tilavuusosaa) vastaan.

Ennen käyttöä kokeessa edellä valmistettu apoentsyymiliuos dialysoitiin 20-mmolaarista trisglutamaattipuskuria vastaan (pH 7,0), joka sisälsi 10 paino-% mannitolia.

Tätä toista kastamisliuosta käytettiin sitten aikaisemmin TMB:llä impregnoidun paperin impregnoimiseen. TMB-pitoinen paperi kastettiin toiseen kastamisliuokseen, poistettiin liuoksesta ja kuivattiin kiertoilmaunissa 90°C:ssa 6 minuuttia.

Koelaitteet valmistettiin kiinnittämällä kuivatun paperin 5 x 5 cm kokoiset palat kaksiakselisesti orientoituneiden polystyreeniliuskojen (0,5 x 8,3 cm) toiseen päähän. Kiinnittäminen suoritettiin käyttäen kaksipuolista teippiä ("Duble-Stick"; 3M Company).

Reagenssisysteemi valmistettiin lopulliseen muotoonsa saattamalla edellä valmistettu laite kosketuksiin 1- μ molaaristen DNP-FAD-konjugaattivesiliuosten kanssa. Kaikki laitteen kokeilussa käytetyt liuokset sisälsivät tämän määrän konjugaattia ja vaihtelevan määrän ligandia, DNP, tai ei lainkaan ligandia, Näin valmistettiin 4 koeliuosta:

Koeliuos	Sisältö
1	1 μ M DNP-FAD
30 2	1 μ M DNP-FAD ja 1 μ M DNP-kaproaattia
3	1 μ M DNP-FAD ja 4 μ M DNP-kaproaattia
4	1 μ M DNP-FAD ja 10 μ M DNP-kaproaattia

75677

4. Kokeen arviointi

Koelaitteiden suorituskyvyn kokeilussa jokainen niistä kastettiin 15 /ul:lla edellä olevia liuoksia. Koe-
liuoksen kanssa kosketuksissa oltuaan jokaista laitetta
5 inkuboitiin 6 minuuttia kannellisessa petrimaljassa, jon-
ka pohjalla oli kostutettu suodatinpaperipalane. Petri-
malja toimi kosteuskammiona.

Edellä kuvatulla tavalla valmistetun ja inkuboidun koelaitteen suorituskyky analysoitiin instrumentilla "Rapid
10 Scannes". Tämä laite on skannaus-reflektanssispektrofotomet-
ri, johon liittyy PDP-12 laskin, valmistaja Digital Equip-
ment Corporation. Tätä instrumenttia käytetään näkyvällä
reflektanssi-spektrin alueella olevaan nopeaan mittaukseen.
Laskin pystyy varastoimaan spektrin tulokset ja laskutulok-
15 set. Reagenssiliuskojen suorituksen mittaamisella Rapid
Scanner-laitteella on visuaaliseen havaintoon verrattuna
seuraavat edut:

1) Valolähde ja näytteen ulkoiset olosuhteet pysy-
vät muuttumattomina. Silmämäärin arvioitaessa valolähde voi
20 vaihdella, jolloin vaihteluja voi esiintyä sekä aaltopituuk-
sissa että valolähteen asemassa tarkasteltaviin liuskoi-
hin nähden.

2) Rapid Scanner-laitteen detektoriominaisuudet pysy-
vät muuttumattomina. Silmämääräisessä tarkastelussa detek-
25 tori (so. havaintoja tekevän henkilön silmät) vaihtelee eri
henkilöillä ja eri päivinä.

3) Rapid Scanner-laitteella saadaan tarkemmat kvan-
titatiiviset havaintotulokset kuin ihmissilmin, jolloin tu-
loksia voidaan verrata toisiinsa objektiivisemmin kuin visua-
30 aalisten havaintojen ollessa kysymyksessä.

Rapid Scanner-laite on firmassa Ames Company Divi-
sion of Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana USA suunniteltu, ja tarkempia tietoja rakenteesta ja suorituskyvys-
tä saadaan tästä firmasta.

35 Koelaitteet, joihin oli lisätty neljää eri liuosta, analysoitiin Rapid-Scanner-laitteella. Saadut spektrit on

esitetty kuviossa 1. Kuvion 1 neljä käyrää kuvaavat reflektanssi-%:a aaltopituuden funktiona. Erityisen mielenkiintoinen on liuskojen suoritus aaltopituudella 600 nm, joka on hapetetun TMB:n sinivärin maksimiabsorption aaltopituus. Heijastus-% alenee ligandin konsentraation kasvaessa, mikä osoittaa laitteen kykyä kvantitatiivisesti analysoida liuoksia, joiden DNP-kaproaattikonsentraatiot vaihtelevat. Lisäksi eri ligandiliuoksilla saadut värierot olivat riittävän suuria, joten myös silmämäärin voitiin havaita värin riippuvuus ligandin konsentraatiosta.

Tämä koe osoittaa, että vasta-aine ja apoentsyymi voivat samanaikaisesti kilpailla vastaavasta konjugaatista, tässä tapauksessa DNP-FAD:sta ilman määrättyä reagenssien lisäysjärjestystä. Lisäksi koe osoittaa, että käytännössä immunokemiallisen koestyemien reagenssit voidaan sekoittaa ja varastoida kauan ennen itse kokeen suorittamista.

Esimerkki II

Yhdistetty immunokoelaitte

Tässä kokeessa pyrittiin parantamaan esimerkin I mallisysteemiä sisällyttämällä konjugaatti suoraan kantaja-elementtiin ennen kokeen suorittamista ja siten tuottamalla yhdistetty homogeeninen immunokoelaitte.

Buckey S-22 paperin pala (3,75 x 6,25 cm) kastettiin ensimmäiseen kastamisliuokseen, joka oli 5-mmolaarinen TMB-liuos asetonissa, joka sisälsi 0,1 g/100 ml emulgointiainetta (GAF ON-870, General Aniline & Film Corp.). Tämä viimeksi mainittu ensimmäisen kastamisliuoksen komponentti on polyetyleenioksidipolymeeri, jonka päätteissä on pitkäketjuiset rasva-alkoholit. Polymeerin etyleenioksidi/rasva-alkoholimoolisuhde on 30:1. Paperi kuivattiin 50°C:ssa minuutin ajan.

Kuivaamisen jälkeen paperi kastettiin toiseen kastamisliuokseen, joka oli valmistettu seuraavista aineosista:

	Vesipitoinen puskuri	
	(1-m trisglutamaatti, pH 6,4)	0,4 ml
	Glukoosi (1,0-m)	0,2 ml
	Piparjuuriperoksidaasi	
5	(153 yks/mg, 1,25 mg/ml)	0,2 ml
	Polyvinyylialkoholi (Monsanto 20-30; 10 g/100 ml vettä)	0,2 ml
	Naudan seerumialbumiini	
	(Miles Laboratories, Inc; 20 mg/ml vettä)	0,05 ml
10	Apoglukoosioksidaasi (50 nanomoolia FAD-sitomiskohtia/ml)	0,08 ml
	Osittain puhdistettu DNP:n vasta-aine (katso esim. I)	0,27 ml
	Tislattu vesi	0,6 ml

15

Paperi kuivattiin 50°C:ssa 12 minuuttia, sitten se kastettiin kolmanteen kastamisliuokseen, joka oli valmistettu sekoittamalla 250 μ l 80- μ molaarista DNP-FAD-konjugaatin vesiliuosta n-propanolin (9,75 ml) kanssa, jolloin saatiin 2- μ molaarinen DNP-FAD-kastamisliuos. Kolmannen impregnoinnin jälkeen paperi kuivattiin 50°C:ssa 4 minuuttia.

Valmistettiin koelaitteita kolminkertaisesti impregnoidun paperin 0,5 x 0,5 cm palasista liittämällä palaset kaksiakselisesti orientoituneen polystyreenin liuskojen (0,5 x 8,3 cm) toiseen päähän. Kiinnittäminen suoritettiin kaksipuolisella teipillä "Double-Stick" (3M Company).

Näitä koelaitteita kokeiltiin erilaisia DNP-konsentraatiota sisältävillä liuksilla kastamalla koelaitteet liuoksiin ja inkuboimalla sitten 3 minuuttia ja analysoimalla liuskat Rapid-Scanner-laitteella (katso esim. I) valon reflektanssin mittaamiseksi. Aaltopituudella 600 nm saadut tulokset nähdään graafisena esityksenä kuviossa 2, jossa K/S on esitetty DNP-konsentraation funktiona. K/S määritellään seuraavasti:

35

75677

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R)^2}{2R}$$

jossa K on vakio, S on käytetyn heijastusvälineen sironta-
kerroin, ja R on koeliuskasta saadun reflektanssin osuus.

5 Tämä kaava esittää yksinkertaistetussa muodossa Kubelka-
Munk yhtälön (Gustav Kortüm, "Reflectance Spectroscopy",
sivut 106-111, Springer-Verlag, New York (1969)).

Rapid Scanner-laitteella saatuja tuloksia käytettiin
myös suorituskyvyn arviointiin laskemalla värieroyksiköt
10 (ΔE), jotka on esitetty taulukossa A. ΔE on arvo, joka
on suhteellinen värinmuodostukseen tuloksena koelaitteen
apoentsyymin ja DNP-FAD-konjugaatin läsnäolosta yhdessä in-
dikaattorin, peroksidaasin ja glukoosin kanssa. Rapid-Scan-
ner-laitteella saatuja kolmiherätearvoja on käytetty E:n
15 laskemiseen sopimuksen mukaisesti, joka on kuvattu julkai-
sussa "Supplement nro 2 to Commission Internationale de
L'Eclairage (Paris), Publication nro 15, Colorimetry, (E.-
1.3.1), 1971".

20

Taulukko A

DNP-kaproatitasojen välinen visuaalinen erottaminen
DNP-kaproatatti

(μ M)	E
0-1	10,5
1-2	3,2
2-4	4,5
4-8	5,2

25

30

Tulokset osoittavat, että kiinteässä tilassa oleva
täysin yhdistetty homogeeninen immunokoelaitte on käyttö-
kelpoinen.

Esimerkki III

Kantajaperusaineessa olevan apoentsyymin parannettu
pysyvyys

35

Pyrkimyksenä oli kokeilla kantajaperusaineessa, ku-

ten paperissa olevan apoglukoosioksidaasin stabiloimista ja siten koelaitteen reaktiivisuuden, herkkyyden ja varastoinnin parantamista. Reagenssiliuskoja valmistettiin muuten samalla tavalla kuin esimerkissä I paitsi, että vasta-

5 aine jätettiin pois. Käytettiin kahden kastamisen systeemiä kastamalla Eaton & Dikeman 205 paperinpalat (4 x 4 cm) ensin TMB-asetoniin, kuivaamalla ja kastamalla ne sitten toiseen liuokseen, joka sisälsi muut reagenssisysteemin aine-

10 osat, jotka tarvitaan sen tekemiseksi herkäksi konjugaatin suhteen. Tällä tavalla valmistettuja laitteita kuumarasi-

tettiin ja niihin lisättiin konjugaattia naudan seerumialbumiinin (BSA) ja polyvinyylialkoholin (PVA) vaikutuksen tutkimiseksi apoentsyymien pysyvyyteen.

Eaton & Dikeman 205 suodatinpaperin (4 x 4 cm) pala-

15 set impregnoitiin 2 ml:lla 3,3',5,5'-tetrametyylibentsididiin (TMB) 2-mmolaarista liuosta asetonissa. Paperi kuivat-

tiin kiertoilmauunissa 90°C:ssa 1-2 minuuttia. Valmistettiin toinen kastamisliuos, joka sisälsi trisglutamaatti-sitraat-

tipuskuria (pH 6,4) konsentraationa 0,33-m (katso esim. I),

20 glukoosia konsentraationa 0,1-m, 19 yks/ml piperjuuriperok-

sidaasia, glukoosioksidaasiapoentsyymiä (1,3 nmoolia FAD-si-

tomiskohtia/ml), naudanseerumialbumiinia (BSA) 0,5 mg/ml ja polyvinyylialkoholia (PVA) 10 mg/ml. TMB-impregnoidut pape-

rit kastettiin sitten hetkeksi toiseen kastamisliuokseen

25 ja kuivattiin kiertoilmauunissa 90°C:ssa noin 7 minuuttia.

Valmistettiin koelaitteita kaksiakselisesti orientoituneista polystyreeniliuskoista (noin 0,5 x 8,3 cm) kiinnittämällä niiden toiseen päähän impregnoidut, kuivatut paperinpalat (0,5 x 0,5 cm). Kiinnittäminen suoritettiin kaksi-

30 puolisella teipillä Double-Stick (3M Company). Tällä tavoin valmistettuja koeliuskoja säilytettiin ruskeissa pulloissa 4°C:ssa silikageelikuivausaineen kanssa ennen kuumarasitus-

kokeita.

Sekä sellaiset liuskat, jotka sisälsivät BSA:ta ja

35 PVA:ta että sellaiset, jotka eivät sisältäneet niitä, saatettiin kuumarasituskokeeseen säilyttämällä niitä 3 vrk sul-

jetuissa, kuivausainetta sisältävissä pulloissa 50°C:ssa. Rasituskokeen jälkeen liuskojen suorituskyky arvioitiin pipetoimalla niille 15 µl 4-umolaarista DNP-FAD-liuosta ja inkuboimalla 6 minuuttia kannella suljetussa pe-rimal-
 5 jassa, jossa oli märkä suodatinpaperipalanen. Kuumakäsittelemättömät liuskat ympätettiin samalla tavalla kuin edellä ja inkuboitiin 2 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen liuskat analysoitiin esimerkissä I kuvatulla tavalla Rapid Scanner-laitteella. Rapid Scanner tulos ilmoitettiin värieroyksiköinä (< E) reagoimattomien liuskojen suhteen, so. sellaisen liuskojen suhteen, jotka oli kastettu DNP-FAD-konjugatin sijasta vain tislattuun veteen. Rapid-Scanner analyysin tulokset nähdään taulukossa B.

15

BSA/PVA	<u>Taulukko B</u>	
	E	E
	Rasittamaton	Kuumarasitettu
Ei sisällä	2,2	2,1
BSA+PVA	19,9	13,6

20

Taulukon B tulokset osoittavat, että ilman BSA- ja PVA-lisäystä liuskoilla saatu vaste heikkenee merkittävästi, kun sensijaan BSA:n ja PVA:n läsnäollessa saadaan 6,5-9-kertainen värierotuksen paraneminen. Lisäksi BSA ja PVA parantavat merkittävästi liuskojen stabiliteettia kuumarasituskokeessa. Tämän kokeen tulokset osoittavat siten erittäin selvästi stabilointiaineilla saavutettavat edut valmistettaessa kiinteässä muodossa olevia apoentsyymiin perustuvia immunokolaitteita.

30

Esimerkki IV

Mallisysteemin soveltaminen teofyllinikokeeseen

Kokeen tarkoituksena oli esimerkeissä I-III kuvattujen mallisysteemien soveltaminen kliinistä merkitystä omaavaan teofyllinikokeeseen. Teofylliini /1,3-dimetyyliksantiini; katsoi The Merck Index, 9. painos sivu 1196 (1976)/
 35 on astman hoidossa käytettävä lääkeaine. Useimpien potilai-

2. Koelaitteen valmistus

Teofylliinikokeeseen tarkoitettuja reagenssilius-
koja valmistettiin käyttäen tätä teofylliini-FAD-konju-
gaattia. Buckey S-22 paperin kappaleita (4 x 4 cm) impreg-
noitiin ensimmäisellä kastamisliuoksella, joka koostui 5-
mmolaarisesta TMB:stä asetonissa, joka sisälsi 0,1 g/100 ml
emulgointiainetta ON-870 (General Aniline and Film Corpora-
tion). Kastamisen jälkeen ensimmäiseen liuokseen impregnoi-
dut paperin kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa minuutin
ajan. Kuivaamisen jälkeen paperit impregnoitiin toisella
kastamisliuoksella. Toisena kastamisliuksena oli 0,33-m
puskuri, joka kuvattiin esimerkissä 1 (pH 6,4), joka oli
0,1-molaarinen glukoosin suhteen ja sisälsi 19 yks/ml pi-
parjuuriperoksidaasia sekä glukoosioksidaasiapoentsyymiä
(1,0 nmoolia FAD-sitomiskohtia/ml), osittain puhdistettua
teofylliinin vasta-ainetta (0,14 ml kastamisliuoksen ml:aa
kohti), 0,5 mg/ml härän seerumialbumiinia ja 0,5 g polyvi-
nyylialkoholia 100 ml:aa kohti. Teofylliinin antiseerumi
koottiin teofylliini-immunogeenikonjugaatilla immunoiduis-
ta kaniineista Cook'in et al. /Res.Comm.Chem.Path.Pharma-
col. 13:497-505 (1976)/ kuvaamalla menetelmällä. Seerumi
puhdistettiin osittain samoin kuin esimerkissä I. Kuivatut
paperit kastettiin lyhyesti toiseen kastamisliuokseen ja
kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa 12 minuuttia.

Kahteen kertaan impregnoidut paperit impregnoitiin
sitten kolmannella liuoksella, joka sisälsi 0,5- μ molaari-
sena liuksena asetonissa FAD-teofylliinikonjugaattia. Pa-
perit kuivattiin minuutin ajan 50°C:ssa kiertoilmaunissa.

Valmistettiin koelaitteita kolme kertaa impregnoi-
dun paperin kappaleista (0,5 x 0,5 cm) kiinnittämällä ne
polystyreeniliuskoille (0,5 x 8,3 cm) kaksipuolisella tei-
pillä Double-Stick (3M Company).

Kokeiden suorittamiseksi valmistetuilla koelaitteilla
valmistettiin veteen teofylliiniliuoksia, joiden konsentraa-
tiot vaihtelivat välillä 0-8 μ m. Laitteet kastettiin näihin

liuoksiin ja 2 minuutin inkuboinnin jälkeen analysoitiin Rapid Scanner'illä esimerkissä I kuvatulla tavalla. Annosvastekäyrä nähdään kuviossa 3, jossa K/S on esitetty teofylliini-konsentraation funktiona.

- 5 Käyristä nähdään, että eri teofylliini-määrillä liuoksissa saadaan selvästi havaittavia värieroja ja että värin muutokset osoittavat kulloinkin teofylliinin konsentraation.

Esimerkki V

Mallisysteemin sovellutus fenytoiinikokeeseen

- 10 Samoin kuin esimerkissä IV pyrittiin esimerkkien I-III mallisysteemi soveltamaan kliinisesti merkittävään analyysiin, fenytoiinin määrittämiseen. Kokeessa osoitettiin homogeenisen, prosteettista ryhmää merkintäaineena käyttävän immunokokeen soveltuvuus kuivana reagenssiliuskana fenytoi-
- 15 niinin toteamiseen. Kuten edellisissä esimerkeissä kantajaperusaineessa saattoi tapahtua samanaikaisesti prosteettisella ryhmällä merkityn fenytoiinin ja analysoitavan näytteen (fenytoini) välinen kilpailu sitoutumisesta fenytoiinin vasta-aineeseen.
- 20 1. Fenytoiini-FAD-konjugaatin synteesi
14,7 mg:aan (40,0 μ mol) 5-(2'-karboksibutyryylioksi-fenylyli-5-fenylylihydantoinia 1,8 ml:ssa molekyyliseuloilla kuivattua dimetyyliformamidia (DMF) lisättiin argonkehässä 0,10 ml (40,0 μ mol) 400- μ molaarista isobutyryliklooriformiaatin liuosta DMF:ssä. Reaktioseosta sekoitettiin tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Reaktioseokseen lisättiin sit-
- 25 ten 10,0 μ moolia N⁶(aminoheksyyli)-FAD:ia 2,0 ml:ssa molekyyliseuloilla kuivattua dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja sitten 0,05 ml 400- μ molaarista trietyyliamiinin liuosta
- 30 DMF:ssä. Seosta sekoitettiin 19 tuntia huoneen lämpötilassa, sitten seos laimennettiin vedellä 450 ml:ksi ja johdettiin peristalttisen pumpun avulla Whatman DE-52 selluloosa-anioninvaihtohartsia (bikarbonaattimuoto) sisältävään kolonniin (1,5 x 30 cm). Kolonni eluoitiin veden (1,5 l) ja 0,3-m
- 35 trietyyliammoniumbikarbonaatin vesiliuoksen (1,5 l) gradientilla. Koottiin noin 16 ml:n fraktioita, joista fraktioissa

70-88 todettiin apoglukoosioksidaasiaktiiviteetin perusteella olevan haluttua tuotetta. Nämä fraktiot yhdistettiin, ja liuoksen pH säädettiin arvoon 7. Tuotetta saatiin 4,78 μ moolia (47,8 %:n saanto) määritettynä liuoksen absorbanssin perusteella aaltopituudella 450 nm käyttäen FAD:in nmolaarisen liuoksen ekstinktiokorrointa ($E_{450} = 11,3$) määrittämisen perustana.

2. Koelaitteen valmistus

Koelaitteet valmistettiin kastamalla paperinpala peräkkäin kolmeen liuokseen, joista jokainen sisälsi erilaisia immunokoesysteemin komponentteja, joiden oletettiin antavan positiivisen tuloksen fenyytoiniinin läsnäollessa, ja kuivaamalla paperi aina kastamisten välillä. Paperinpala (5 x 5 cm) (S-22, Buckeye Cellulose Corp. Memphis, TN) kastettiin 5-mmolaariseen TMB:n asetoniliuokseen, joka sisälsi 0,1 % (paino/tilav.) emulgointiainetta ON-879 (General Aniline & Film Corp.). 1 minuutin kuivaamisen jälkeen 50°C:ssa paperi kastettiin toiseen vesiliuokseen, joka sisälsi trisglutamaattipuskuria, pH 6,4 (0,2-m), glukoosia (0,1-m) piparjuuriperoksidaasia (19 yks/ml), apoglukoosioksidaasia (1,0 nmoolia FAD-sitomiskohtia/ml), 0,5 mg/ml naudan seerumialbumiinia, 0,5 g/100 ml polyvinyylialkoholia (katso esimerkki III) ja antifenyytoiniseerumia (0,14 ml antiseerumia/ml). Antiseerumi saatiin muodostumaan o-kaproyyli-difenyylihydantoinia vastaan samoin kuin esimerkissä IV.

Paperi kuivattiin 50°C:ssa kiertoilmaunissa 12 minuuttia ja impregnoitiin sitten kastamalla kolmanteen liuokseen, joka sisälsi FAD-fenyytoinikonjugaattia (0,5- μ m) n-propanolissa ja 0,1 g/100 ml polymeeriä Gafquat 734, joka on kvaternäärisiä amiiniryhmiä sisältävä polymeeri (General Aniline & Film Corp.).

3-4 minuutin kuivaamisen jälkeen 50°C:ssa impregnoidusta paperista valmistettiin koeliuskoja kiinnittämällä 0,5 x 0,5 cm suuruisia kappaleita reagenssia sisältävää paperia kaksiakselisesti orientoituneen polystyreeniliuskan (0,5 x 8,3 cm) toiseen päähän. Kiinnittäminen suoritettiin

tiin kaksipuolisella teipillä Double-Stick (3M Company).

Näiden koelaitteiden käyttökelpoisuuden määramiseksi fenyytoinin analyysiin niille vietiin fenyytoinia sisältäviä 0-8- μ molaarisia koeliuoksia ja 2 minuutin kulluttua tulos luettiin Rapid Scanner-laitteella. Kuviossa 5 4 nähdään K/S:n muutos fenyytoinikonsentraatioilla 0, 0,5-, 1-, 2-, 4- ja 8- μ m vedessä.

Kuvion 4 tuloksista havaitaan, että koelaitte osoittaa hyvin fenyytoinin läsnäolon ja määrittää helposti sen erilaiset konsentraatiot. 10

Esimerkki VI

Yhdistetyn mallisysteemin käyttö fluoresenssi-immunokoelaitteessa

Esimerkin II yhdistetyn mallisysteemin soveltuvuutta fluoresenssi-immunokokeeseen kokeiltiin seuraavasti. 15 Koelaitte valmistettiin samoin kuin esimerkissä II käyttäen kuitenkin TMB:n sijasta p-hydroksifenyylietikkahappoa. Hapettamalla p-hydroksifenyylietikkahappo peroksidilla peroksidaasin läsnäollessa saadaan fluorometrisesti havaittavissa oleva tuote. 20

Laite valmistettiin seuraavasti: Buckey S-22 paperin palanen impregnoitiin seuraavalla liuoksella:

	Tris-glutamaattipuskuri (1-m, pH 6,4)	0,8 ml
25	Glukoosi (1-m vesiliuos)	0,4 ml
	Piparjuuriperoksidaasi (153 yks/mg, 1,25 mg/ml) -	0,4 ml
	Polyvinyylialkoholi (5 g/100 ml)	0,4 ml
	Naudan seerumialbumiini (20 mg/ml)	0,1 ml
30	Gafquat 734 (10 g/100 ml vettä katso esim. V)	0,2 ml
	Apoglukoosioksidaasi (40 nmoolia FAD-sitomiskohtia/ml)	0,16 ml
	Osittain puhdistettu DNP-vasta-aine (katso esim. I)	0,54 ml
35	p-hydroksifenyylietikkahappo (80- μ molaarinen vesiliuos)	0,04 ml
	Tislattu vesi	0,96 ml

Impregnoinnin jälkeen paperi kuivattiin kiertoilma-
uunissa 50°C:ssa 22 minuuttia.

Kuivattu paperi impregnoitiin 2- μ molaarisella
DNP-FAD-konjugaatin liuoksella n-propanolissa ja kuivat-
5 tiin 50°C:ssa 5 minuuttia.

Kuivatun reagenssipaperin toiselle puolelle kiinni-
tettiin metallista Mylar-teippiä (3M Company). Paperi kiin-
nitettiin kaksiakselisesti orientoituneelle polystyreeni-
kalvolle Double-Stick-teipillä, joka kiinnitettiin Mylar-
10 kerrokseen. Saatu koelaitte käsitti 0,5 x 1 cm suuruisen My-
lar-taustaisen reagenssipaperipalasan kiinnitettynä 0,5 x 8,3
cm suuruiselle polystyreeniliuskalle.

Valmistettiin samalla tavalla vertailuksi kontrolli-
laite impregnoimattomasta paperista, jonka taustana oli
15 Mylar ja joka oli kiinnitetty polystyreeniliuskalle.

Fluoresoivien liuskojen suorituskykyä tutkittiin
valomonistimella. Kvartsikuitu-optinen laite oli tutkitta-
van laitteen tason suhteen 45°C:een kulmassa. Tämä kuitu-
optinen laite oli varustettu elohopealampulla ja virityssuo-
20 dattimella, joka päästi lävitse aaltopituuden 314 nm. Tie-
tyn laitteen fluoresenssi saatiin suoraan toisesta kuitu-
optisesta laitteesta, joka oli 45°C:een kulmassa näytelait-
teen tason suhteen ja joka oli varustettu interferenssi-
liuottimella (420 nm). Tulokset luettiin millivolteina
25 käyttäen valomonistinta.

Fluoresoivien koelaitteiden kokeilemiseksi pipetoi-
tiin reagenssipaperille 30 μ l:n DNP-pitoisia koeliuoseriä
ja papereita inkuboitiin 11 minuuttia huoneen lämpötilassa
kosteuskammiossa. DNP-liuosten konsentraatiot vaihtelivat
30 0:sta 8- μ molaariseen. Fluoresenssin vahvuus mitattiin valo-
monistimella 0-, 1-, 2-, 4- ja 8- μ molaarisista liuoksista.
Koe toistettiin käyttäen kontrollilaitetta. Kuviossa 5 näh-
dään koelaitteilla saadut annos-vaste-tulokset. Kontrolli-
laitteella saadut tulokset osoittivat, ettei kuviossa 5
35 esitettyihin tuloksiin vaikuttanut mikään analysoitavaan

DNP-näytteeseen sisältyvä fluoresoiva sisäinen tekijä.

Tämä koe osoittaa vakuuttavasti, että homogeenisen immunokoetekniikkaan perustuvaa kiinteäfaasilaitetta, jossa käytetään havaittavn vasteen saamisen fluoresenssia, voidaan menestyksellä käyttää.

B. Entsyymi-substraattimerkittyjä immunokolaitteita

Esimerkki VII

Paperi-monikerroselementti

Tässä esimerkissä kuvatussa kokeessa valmistettiin integraalinen monikerroksinen analyysielementti, jonka kykyä kvantitatiivisesti määrittää fluorometrillä teofylliinin läsnäolo nestenäytteessä.

Antiseerumin valmistus

Teofylliinin antiseerumi valmistettiin menetelmällä, joka on kuvattu US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819, haettu 1979-10-23, joka julkaisu liitetään tähän viitteenä.

Konjuugaatin valmistus

Galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliini-konjuugaatti valmistettiin samoin US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

Elementin valmistus

Teofylliini-spesifisen elementin yhden kerroksen valmistukseen käytettiin liuosta, joka sisälsi seuraavat komponentit:

25

<u>Komponentti</u>	<u>Määrä</u>
Vesi	27 μ l
0,1-m bicine-puskuri (pH 8,5)	20 "
Teofylliini antiseerumi	100 "
30 β -galaktosidaasi (78 yks/ml) x)	3 "

x) Yksiköt on määritelty julkaisussa Clin. Chem. 23:1402 (1977).

Whatman 31 ET paperin (Whatman, Inc. Clifton, N.J.)
35 3 x 1,2 cm palanen liitettiin kaksipuolisella teipillä poly-

styreenialustalle (8,2 x 1,2 cm), ja Whatman 31 ET paperille pipetoitiin edellä valmistettua liuosta. Paperi kuivattiin kiertoilmauunissa 50°C:ssa 10 minuuttia.

Toinen liuos valmistettiin liuottamalla konjugaatti
 5 50 μ l:aan vettä ja laimentamalla liuos lopulliseen kon-
 sentraatioon 14,4- μ m. Näin valmistettua liuosta pipetoi-
 tiin 1,0 x 3,0 cm palaselle Whatman 54 paperia. Impregnoitu
 paperi kuivattiin kiertoilmauunissa 50°C:ssa 10 minuuttia.
 Toinen kerros kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä ensim-
 10 mäisen paperikerroksen toiseen päähän.

Koeliuos

Teofylliinistä valmistettiin 0,05-m bicine-puskuriin
 (pH 8,5) liuokset jotka sisälsivät 0,5, 1,0, 2,5 5,0 ja
 40 μ g/ml teofylliiniä.

15 Analyysimenetelmä

Edellä kuvatulla tavalla valmistetut alusta-aineelle
 kiinnitetyt analyysielementit pantiin jokainen mekaaniseen
 pitimeen, joka sopii sijoitettavaksi fluorometriin pysty-
 asentoon. Juuri ennen eleäntin ja pitimen asettamista
 20 fluorometriin konjugaattia sisältävälle valotettavalle ker-
 rokselle pipetoitiin 250 μ l yhtä edellä valmistetuista teo-
 fylliiniliuoksista.

Fluorometri oli säädetty siten, että se antoi viri-
 tysvalon aaltopituudella 405 nm, joka osui elementtiin 60°:een
 25 kulmassa pinnan kohtisuorasta ja että emittoitu valo havait-
 tiin aaltopituudella 450 nm. Fluoresenssin mittausta suori-
 tettiin 30°:een kulmassa kohtisuoran suhteen.

Kullakin näytteellä saatu fluoresenssivaste mitat-
 tiin ensin aikana 0-200 sekuntia ja lukemat otettiin 200
 30 sekunnin kuluttua.

Tulokset

Tällä analyttisellä menetelmällä saatiin lukemat
 suhteellisen fluoresenssin muodossa. Havaittua suhteellista
 fluoresenssia verrattiin käytetyssä teofylliininäytteessä
 35 olevaan teofylliinimäärään. Fluoresenssivaste ajan funktio-
 na on esitetty kuviossa 6. Fluoresenssi ajankohtana 200 sek

piirrettiin teofylliinikonsentraation funktiona standardikäyrän saamiseksi. (Kuvio 7).

Johtopäätökset

Saadut tulokset osoittivat, että integraalisella
5 analyysielementillä voitiin saada kvantitatiivisesti havaittava vaste kaikkien näytteiden teofylliinipitoisuudesta. Reaktion inhibiition aiheutti teofylliinin vasta-aineen läsnäolo. Lisäämällä reofylliinin konsentraatiota inhibiitio voitettiin, ja tuloksena oli teofylliinin määrästä riippuva fluoresoivan tuotteen lisääntynyt muodostuminen.
10

Esimerkki VIII

Kylmäkuivattu elementti

Tässä esimerkissä kuvatussa kokeessa valmistettiin teofylliinin määrittämiseen yksikerroselementti käyttämällä
15 lämpötilakontrollia reagenssien määräaikaisen reaktion estämiseen.

Antiseerumin valmistus

Teofylliinin antiseerumi valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla
20 menetelmällä. Antiseerumi valmistettiin saostamalla ammoniumsulfaattiliuoksella (33 mg/100 ml), liuottamalla sakka 0,05-m bicine-puskuriin (pH 8,5) ja dialysoimalla liuos samaa puskuria vastaan (pH 8,5). Saatu teofylliinikonsentraatti sisälsi noin 200 /umoolia teofylliinisitomiskohtia/ml.
25

Konjugaatin valmistus

Galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliinikonjugaatti valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla tavalla.

Elementin valmistus

30 Yksikerroksisen spesifisen teofyllinielementin valmistuksessa käytetty ensimmäinen liuos sisälsi seuraavat aineosat:

Aineosa	Määrä
35 0,5-m bicine-puskuri (pH 8,5)	10 /ul
Teofylliinin vasta-ainekonsentraatti	150 /ul
β -galaktosidaasi (88 yks/ml)	40 /ul

Kooltaan 0,5 x 1,0 cm oleva Whatman 31 ET paperi (Whatman, Inc., Clifton, NJ) kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä polystyreenialustalle (8,2 x 0,5 cm), ja paperille pipetoitiin 20 μ l edellä valmistettua liuosta. Paperi kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa 10 minuuttia ja esijäähdytettiin sitten alhaisessa ilman kosteudessa kuivajällä 5 minuuttia.

6,13-mmolaarista teofylliini-umbelliferoni-galaktoosiliuosta dimetyylisulfoksidissa (DMSO) laimennettiin 0,077-mmolaariseksi vedellä, ja tätä liuosta vietiin edellä kuvatulla tavalla käsitellyille papereille kullekin 20 μ l. Elementtejä kylmäkuivattiin yli yön.

Koeliuos

Teofylliinistä valmistettiin 0,05-m bicine-puskuriin liuokset, joiden konsentraatiot olivat 0,0, 4,0, 16,0 ja 40 μ g/ml.

Analyysin suoritus

Edellä kuvatulla tavalla valmistetut ja alustalle kiinnitetyt analyyttiset elementit pantiin jokainen sopivaan mekaaniseen pitimeen, joka sopi asetettavaksi reflektanssifotometriin vaakasuoraan asentoon. Juuri ennen elementin ja pitimen asettamisesta reflektanssifotometriin kunkin elementin mittauspinnalle pipetoitiin 50 μ l yhtä edellä valmistetuista teofylliiniliuoksista. Fotometri oli säädetty mittaamaan reflektanssimuutoksia aaltopituudella 400 nm.

Kunkin näytteen reflektanssi mitattiin ensin aikana 0-200 sek ja sitten otettiin lukemat 200 sekunnin kohdalla.

Tulokset

Edellä kuvatulla menetelmällä saadut koetulokset on esitetty graafisesti kuviossa 8. Ordinaatan yksiköt (K/S) on määritelty esimerkissä II.

Johtopäätös

Tulokset osoittavat, että integraalisella analyysielementillä saadaan kustakin kokeillusta näytteestä teofylliinikonsentraation kvantitatiivinen kromogeeninen vaste.

Näissä olosuhteissa antiseerumin läsnäolo estää reaktion, ja tämä estyminen kumoutuu vähitellen teofylliiniin kasvavan konsentraation vaikutuksesta.

Esimerkki IX

5 Useampikertaisella impregnoinnilla valmistettu elementti

Tässä esimerkissä kuvatussa kokeessa valmistettiin yksi ainoa kerros, jonka kykyä kvantitatiivisesti määrittää teofylliini nestenäytteestä ja lukea tulos fluoremetrillä kokeiltiin.

Antiseerumin valmistus

Teofylliinin antiseerumi valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

15 Konjugaatin valmistus

Galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliini-konjugaatti valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

Elementin valmistus

20 Teofylliinispesifisen elementin valmistuksessa käytetyt liuokset sisälsivät seuraavat aineosat:

Vesiliuos

Aineosa	Määrä
Teofylliiniantiseerumi	400 μ l
25 0,5-m bicine-puskuri, pH 8,5	160 "
Vesi	35 "
β -galaktosidaasi (132,7 yks/ml)	5 "

Orgaaninen liuos

Aineosa	Määrä
30 Metyleenikloridi	1,00 ml
Konjugaatti (771- μ molaarinen DMSO:ssa)	4,2 μ l
1 x 1 cm Whatman 31 ET paperi laiminoitiin hopea-Mytilarille (3M Co.) ja kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä 8,3 x 1 cm:n polystyreenitukiaineelle, tämän jälkeen	
35 edellä valmistettu vesiliuos pipetoitiin Whatman 31 ET paperille. Myös muita alla olevia heijastavia kerroksia, esi-	

merkiksi hopeoituja tai läpinäkymättömiä kerroksia voidaan käyttää. Paperi kuivattiin kiertoilmauunissa 50°C:ssa 15 minuuttia. Sitten vesiliuoksen kuivatun jäännöksen sisältävälle paperille pipetoitiin orgaaninen liuos ja
 5 kuivattiin kiertoilmauunissa 50°C:ssa 15 minuuttia.

Koeliuos

Teofylliiniä lisättiin veteen konsentraatioiksi 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 10,0, 20,0 ja 40,0 µg/ml.

Analyysimenetelmä

10 Edellä kuvatulla tavalla valmistetut tukiaineelle kiinnitetyt analyysielementit pantiin mekaaniseen pitimeen, joka sopi asetettavaksi fluorometriin vaakasuoraan asentoon. Juuri ennen elementin ja pitimen sijoittamista fluorometriin elementin valotettavalle pinnalle pipetoitiin 70 µl yhtä
 15 edellä kuvatuista teofylliiniiliuoksista.

Fluorometri oli säädetty antamaan viritysväli-aaltopituudella 404 nm, joka osui elementtiin 90°:een kulmassa, ja mittaamaan emittoitua valoa aaltopituudella 450 nm. Fluoresenssimittaus suoritettiin 90°:een kulmassa.

20 Kunkin näytteen fluoresenssivaste mitattiin ensin aikana 0-6 minuuttia ja sitten 6 minuutin kohdalla.

Tulokset

Edellä kuvatulla menetelmällä saadut tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 9. Ordinaatan yksiköt on ilmoitettu millivolteina.
 25

Johtopäätös

Saaduista tuloksista nähdään, että analyysielementillä voidaan kvantitatiivisesti määrittää teofylliini kaikilla kokeilluilla konsentraatioilla.

30 Näissä olosuhteissa antiseerumi inhiboi reaktiota ja tämä inhibiitio voidaan asteittain voittaa lisäämällä teofylliinin konsentraatiota.

Esimerkki X

Palautuvaan kompleksinmuodostukseen perustuva elementti

35

Tässä esimerkissä kuvatuissa kokeissa valmistettiin

yksikerroselementtejä, joita kokeiltiin teofylliinin, karbamatsepiinin, tobramysiinin ja gentamisiinin kvantitatiivisiin määrityksiin fluorometrillä. Seuraavassa taulukossa on ilmoitettu näiden lääkkeiden terapeuttiset seerumikonsentraatiot ja minimimyrkyllisyystasot:

Lääkeaine	Terapeuttinen alue	Myrkyllinen taso
Teofylliini	10-20 /g/ml	35 /g/ml
10 Karbamatsepiini	4-12 "	15 "
Tobramysiini	5-10 "	12 "
Gentamisiini	5-10 "	12 "

Antiseerumien valmistus

15 Teofylliinin, karbamatsepiinin, tobramysiinin ja gentamisiinin antiseerumit valmistettiin menetelmällä, jotka on kuvattu edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819.

Konjugaatin valmistus

20 Galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliini, galaktosyyli-umbelliferonikarbamatsepiini, galaktosyyli-umbelliferoni-tobramysiini ja galaktosyyli-umbelliferoni-sisomiini (gentamisiinin analogi) valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

Elementin valmistus

30 Spesifisten teofylliinin, karbamatsepiinin, tobramysiinin ja gentamisiinin yksikerroselementtien valmistukseen käytettiin taulukossa C esitettyjen komponenttien liuoksia.

Taulukko C

Komponentti	Teofylliini- elementti	Karbamatse- piini ele- mentti	Tobramysiini- elementti	Gentamisiini- elementti
Antiseerumi	100 /ul	100 /ul	100 /ul	100 /ul
Konjugaatti	1,7 "	1,2 "	3,4 "	19,2 "
Konsentraatio	(1771 /uM DMSO:ssa)	(936 /uM DMSO:ssa)	(294 /uM muurahais- hapossa)	(678 /uM muurahais- hapossa)
0,5-m bicini- puskuri (pH 8,5)	40 /ul	40 /ul	40 /ul	40 /ul
Vesi	53,4 "	53,9 "	51,7 "	35,9 "
β -galaktosidaasi	4,9 "	4,9 "	4,9 "	4,9 "

Whatman 31 ET paperin 1 x 1 cm suuruiset palaset laminoitiin hopea-Mylarin kanssa ja kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä polystyreenitukiaineelle (8,3 x 1 cm). Paperikerroksille pipetoitiin sitten edellä mainittuja liuoksia. Paperit kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa 15 minuuttia.

Koeliuokset

Teofylliiniä, karbamatsepiiniä, tobramysiiniä ja gentamisiinia lisättiin veteen liuoksien saamiseksi, joilla oli alla esitetyt konsentraatioalueet:

<u>Lääkeaine</u>	<u>Konsentraatioalue</u>
Theofylliini	0,4,0 $\mu\text{g/ml}$
Karbamatsepiini	0-0,4 "
15 Tobramysiini	0-0,6 "
Gentamisiini	0-2,0 "

Analyysimenetelmä

Valmistetut tukiaineille kiinnitetyt analyysielementit pantiin kammioon, jossa voitiin pitää vakiokosteus. Ennen kammion sulkemista kullekin analyysielementin valotettavalle pinnalle pipetoitiin 70 μl yhtä edellä valmistettua lääkeaineliuosta.

Huoneen lämpötilassa 15 minuutin kuluttua kehitty-
nyt fluoresenssi mitattiin fluorometrillä, joka oli varustettu mekaanisella pitimellä, joka soveltui analyysielementin pitämiseen vaakasuorassa asennossa. Fluorometri oli säädetty antamaan viritysvaloa 90°:seen kulmassa pinnan suhteen aaltopituudella 405 nm ja havaitsemaan emittoitua valoa aaltopituudella 450°. Fluoresenssi-mittaus suoritettiin 90°:een kulmassa.

Tulokset

Edellä kuvatussa menetelmässä saadut tulokset on esitetty graafisesti kuvioissa 10, 11, 12 ja 13 teofylliinille, karbamatsepiinille, tobramysiinille ja gentamisiinille. Ordinaatan yksiköt on ilmaistu millivolteina.

Johtopäätös

Saadut tulokset osoittavat, että integraalisella analyysielementillä voidaan kvantitatiivisesti määrittää kunkin lääkeaineen konsentraatiot. Teofylliinin, karbamatsepiinin, tobramysiinin ja gentamisiinin konsentraatioiden korottamisesta on tuloksena vastaavasti analyysielementin fluoresenssin lisääntyminen. Edellä kuvatuissa kokeissa käytettyjen menetelmien ansiosta oli mahdollista sisällyttää kaikki komponentit yhteen ainoaan elementtiin.

10 Esimerkki XIKalvomonikerroselementti

Tässä esimerkissä kuvatussa kokeessa valmistettiin integraalinen kaksoiskerrosanalyysielementti käyttäen kah- ta kalvoa jotka sisälsivät substraattimerkityn fluoresenssi-immunokokeen komponentit. Elementtiä kokeiltiin teofylliinin kvantitatiivisessa määrittäyksessä "front face" fluorometrillä.

Antiseerumin ja konjugaatin valmistus

Antiseerumin ja konjugaatin valmistus suoritettiin 20 esimerkissä VII kuvatulla tavalla.

Elementin valmistus

Käytettiin seuraavia perusliuoksia:

2- β :nen agarosi (Miles no. 49-051) 0,05-m bicine-puskurissa (pH 8,5). Liuotus tapahtui kuumentamalla 100°C:seen, 25 sitten liuos jäädytettiin termostaatissa 60°C:seen. 10- β :nen Triton X100.

β -galaktosidaasi (86 yks/ml 0,5-m bicine-puskurissa, pH 8,5.

6,67- β :nen polyvinyylipyrrolidoni (Aldrich nro 85 647-9, 30 keskimääräinen molekyylipaino 360 000) kloroformissa. Galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliini (konjugaatti), 6,16-mmolaarinen dimetyylisulfoksidissa.

Teofylliiniantiseerumi ja β -galaktosidaasi lisät- tiin agarosiliuokseen 60°C:ssa, jolloin saatiin seuraava 35 koostumus:

Komponentti	Määrä
Agaroosiliuos	0,25 ml
Teofylliinantiseerumi	0,75 "
β -galaktosidaasi	0,03 "
5 Triton X100	0,01 "

Antiseerumi kuumennettiin ennen lisäämistä 60°C:seen. Tavanomaisella spaattelilla levitettiin polyesterilevyille (3M Co., tyyppi 2352) 2,5 cm leveä kalvo, joka 10
vuudessaan muodosti 0,5 cm paksuisen kalvon. Geelitynyt kalvo kuivattiin 10 minuuttia 47°C:ssa.

Ensimmäisen kalvon päälle levitettiin spaattelilla toinen kuivana 0,005 cm:n kalvo. Se sisälsi konjugaattia polyvinyylipyrrolidonin (PVP) kloroformi-liuoksessa. Sillä 15
oli seuraava koostumus:

Komponentti	Määrä
PVP:n kloroformiliuos	0,4 ml
Kloroformi	0,6 "
20 Konjugaattiliuos	0,015 ml

Kalvo kuivattiin huoneen lämpötilassa. Polyesterilevy kiinnitettiin hopeoidulle Mylarille kaksipuolisella teipillä. Tämän materiaalin kappaleita (5,5 x 1 cm) kiinnitettiin jälleen kaksipuolisella teipillä polystyreenikantajalle. 25

Koeliuos

Teofylliinistä valmistettiin 0,05-m bicine-puskuriin (pH 8,5) liuokset, joiden konsentraatiot olivat 1, 2, 30
4, 8 ja 10 μ g/ml.

Analyysimenetelmä

30 μ l yhtä koeliuoksista pantiin edellä kuvatulle analyysielementille ja fluoresenssi mitattiin 5 minuutin kuluttua. Mittaus suoritettiin esimerkissä X kuvatulla tavalla. 35

75677

Tulokset

Saadut tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 14. Fluoresenssi on esitetty mielivaltaisina yksikköinä teofylliini-konsentraation funktiona.

5 Johtopäätös

Tulokset osoittavat, että immunokokeen yhteensopimattomat reagenssit voidaan etukäteen koota analyysielementtiin monikerroskalvoksi, jossa ei tapahdu kokeen aineosien ennen aikaista reaktioita, ja jolla voidaan kvantitatiivisesti määrittää näytteen lisäämisen jälkeen analysoidava aine.

C. Fluoresenssin sammuttamiseen perustuvat immuno-
koelaitteet

Esimerkki XII

15 Tässä kokeessa valmistettiin yksikerroselementti, jolla kokeiltiin kvantitatiivista teofylliinin määrittämistä "front face" fluorometrillä suoritetulla suoraan fluoresenssin sammuttamiseen perustuvalla fluoroimuunokokeella.

Antiseerumin valmistus

20 Teofylliinin antiseerumi valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

Konjugaatin valmistus

25 Umbelliferoni-teofylliini (konjugaatti) valmistettiin hydrolysoimalla galaktosyyli-umbelliferoni-teofylliini (GUT) β -galaktosidaasilla. GUT valmistettiin edellä mainitussa US-patenttihakemuksessa sarja nro 87 819 kuvatulla menetelmällä.

Elementin valmistus

30 Teofylliinin spesifisen elementin valmistuksessa käytettiin seuraavia liuoksia:

Vesiliuos

<u>Komponentti</u>	<u>Määrä</u>
Teofylliiniantiseerumi	50 μ l
35 Vesi	30 "
0,5-m bicine, pH 8,5	20 "

Orgaaninen liuos

<u>Komponentti</u>	<u>Määrä</u>
Tolueeni	1,00 ml
5 Konjugaatti (0,16-mmolaarinen tolueeniliuos)	4 μ l

1 x 1 cm Whatman 31 ET paperi laminoitiin hopeoidun Mylarin kanssa ja kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä 8,3 x 1 cm suuruiselle polystyreenipohjalle. Paperille pipetoitiin 20 μ l edellä valmistettua vesiliuosta. Myös muunlaiset heijastavat hopeoidut tai läpikuultamattomat kerrokset sopivat alla oleviksi kerroksiksi. Paperi kuivattiin kiertoilmaunissa 40°C:ssa 20 minuuttia. Vesiliuoksen kuivatun jäännöksen sisältävälle paperille pipetoitiin sitten 20 μ l orgaanista liuosta ja paperi kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa 15 minuuttia.

Koelios

Teofylliinistä valmistettiin veteen liuokset, joiden konsentraatiot olivat 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 10,0, 20,0 ja 40,0 μ g/ml.

Analyysimenetelmä

Edellä valmistettu ja tukiaineelle kiinnitetty analyysielementti asetettiin mekaaniseen pitimeen, joka sopi vaaka-asentoon fluorometriin. Juuri ennen elementin ja pitimen asettamista fluorometriin elementille pipetoitiin 70 μ l yhtä edellä valmistetuista teofylliiniliuoksista.

Fluorometri oli säädetty antamaan viritysvaloa 90°C:seen kulmassa elementin pinnan suhteen aaltopituudella 405 nm ja mittaamaan emittoitua valoa aaltopituudella 450 nm. Fluoresenssimittaus suoritettiin 90°:een kulmassa.

Fluoresenssi mitattiin 2 minuutin kuluttua.

Tulokset

Edellä kuvatussa kokeessa saadut tulokset on esitetty kuviossa 15. Ordinaatan yksiköt on ilmoitettu sammumis-%:na.

35 Johtopäätös

Analyysielementillä saadut tulokset osoittavat, että

analyysielementillä voidaan kvantitatiivisesti määrittää
kaikista kokeilluista näytteistä teofylliinipitoisuus.

Näissä olosuhteissa fluoresenssi sammuu antiseerumin
läsnäollessa ja sammuminen voidaan progressiivisesti estää
5 lisäämällä teofylliinikonsentraatiota.

D. Entsyymimerkittyjä immunokoelaitteita

Esimerkki XIII

Tässä esimerkissä kuvatussa kokeessa suoritettiin
teofylliinin entsyymimerkitty homogeeninen immunokoe kaik-
10 ki tarvittavat aineosat sisältävällä monikerroselementillä.

Antiseerumi

Teofylliinin antiseerumi saatiin Syva Company'n (Palo
Alto, Kalifornia) toimittamasta EMIT^R-aad teofylliinikoe-
pakkauksesta.

15 Konjugaatin valmistus

G6PDH-teofylliini (konjugaatti) saatiin samoin EMIT-
aad teofylliinikoepakkauksesta.

Elementin valmistus

Yksikerros-teofylliini-spesifisen elementin yhden
20 kerroksen valmistuksessa käytetty liuos oli reagenssi A:ksi
(sisältää teofylliinin antiseerumia ja entsyymisubstraattia)
nimitetty EMIT-aad teofylliinikoepakkauksen liuos (Syva
Company).

0,5 x 1,0 cm Whatman 54 paperi (Whatman, Inc., Clif-
25 ton, NJ) kiinnitettiin kaksipuolisella teipillä polystyree-
nialustalle (8,2 x 0,5 cm), ja paperille pipetoitiin 10 μ l
edellä olevaa liuosta. Paperi kuivattiin kiertoilmaunissa
10 minuuttia.

Valmistettiin toinen liuos sekoittamalla yhtä suuret
30 tilavuusosat diaforaasi/p-jodinitrotetratsoliumvioletti (INT)-
liuosta (1,5 mg diaforaasia ja 1 mg INT 2,5 ml:ssa 0,055-m
tris(hydroksimetyyli)aminometaanipuskuria, pH 7,9) ja EMIT-
aad koepakkaukseen kuuluvan reagenssin B liuosta (joka si-
sältää entsyymimerkittyä teofylliinin konjugaattia). Toista
35 liuosta pipetoitiin 20 μ l 0,6 x 1,0 cm Whatman 54 paperille.
Impregnoitu paperi kuivattiin kiertoilmaunissa 50°C:ssa
10 minuuttia.

Toinen kerros kiinnitettiin toisesta päästään ensimmäiseen kaksipuolisen teipin liuskalla.

Koelios

Teofylliiniä lisättiin veteen lopullisiksi liuos-
5 konsentraatioiksi 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 ja 40 $\mu\text{g/ml}$.

Analyysimenetelmä

Edellä valmistetut polystyreenitukiaineelle kiinnitetyt analyysielementit pantiin kukin vaaka-asentoon reflektanssifotometrin mekaaniseen pitimeen. Juuri ennen elementin ja pitimen sijoittamista fotometriin pipetoitiin
10 kunkin elementin valotettavalle pinnalle 50 μl edellä valmistettuja teofylliiniliuoksia. Fotometri oli säädetty seuraamaan reflektanssin muutosta aaltopituudella 500 nm.

Kunkin elementin reflektanssi mitattiin ensin aikana
15 0-200 sekuntia, ja lukemat otettiin 200 sekunnin kuluttua ($K/S = (1-R)^2/2R$, jossa R on reflektanssi).

Tulokset

Tällä menetelmällä saadut tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 16.

20 Johtopäätös

Tulokset osoittavat, että integraalisella analyysielementillä saadaan puolikvantitatiivisesti määritettyä kokeiltujen teofylliiniliuosten konsentraatiot.

Patenttivaatimukset

1. Koelaite ligandin määrittämiseksi nestenäytteestä homogeenisella immunokokeella, joka koelaite käsittää

5 (1) kiinteään kantajajäsenen, joka on absorbentti nestenäytteelle, ja (2) tähän kantajajäseneen sisällytetyn reagenssikoostumuksen, joka sisältää (i) ligandin vasta-ainetta tai muuta luonnossa esiintyvää ligandin sitomisproteiinia ja (ii) ligandin konjugaattia tai tämän analogia, jota

10 vasta-aine tai muu sitomisproteiini pystyy myös sitomaan, kovalenttisesti liittyneenä merkintäaineeseen, joka on todettavissa sähkömagneettisen signaalin avulla, joka signaali on erilainen silloin, kun merkitty konjugaatti on sitoutunut vasta-aineeseen tai muuhun sitomisproteiiniin,

15 kuin silloin, kun se ei ole siten sitoutunut, jolloin signaali on näytteessä olevan ligandimäärän funktio, t u n n e t t u siitä, että kiinteään kantajajäseneen on sisällytetty mainittu vasta-aine tai muu sitomisproteiini ja mainittu merkitty konjugaatti oleellisesti toisiinsa sitoutumattomina ja että laite on tehty sisällyttämällä kantajaan ensimmäisessä nesteessä toinen reagensseista, jotka

20 ovat mainittu konjugaatti ja mainittu vasta-aine tai sitomisproteiini, ja kuivaamalla kantaja, ja sen jälkeen joko (A) sisällyttämällä kantajaan toinen mainituista reagensseista vettä sisältämättömässä nesteessä ja kuivaamalla kantaja tai (B) esijäähdyttämällä kantaja, sisällyttämällä kantajaan toinen reagensseista, jotka ovat mainittu konjugaatti ja vasta-aine tai sitomisproteiini, toisessa

25 nesteessä, saattamalla kantaja lämpötilaan, jossa toinen neste jäätyy, ja lyofilisoimalla kantaja.

30

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, t u n -
n e t t u siitä, että mainitut reagenssit sisältyvät mai-
nittuun kantajajäseneen olennaisen tasaisesti jakautuneina.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen laite,
5 t u n n e t t u siitä, että mainittu kantajajäsen on kangas-
matriisi, joka koostuu luonnonkuiduista tai synteettisistä
polymeerikuiduista.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen laite,
t u n n e t t u siitä, että mainittu kantajajäsen on poly-
10 meerikalvo tai -geeli.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen laite,
t u n n e t t u siitä, että mainittu merkintäaine on osal-
listuja entsyymaattisessa reaktiossa, joka aikaansaa mainitun
sähkömagneettisen signaalin.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen laite, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu merkintäaine on entsyymin substraat-
ti, joka entsyymi on osana mainittuun kantajajäseneen sisäl-
tyvää reagenssikoostumusta ja pystyy vaikuttamaan mainittuun
substraattiin siten, että syntyy sähkömagneettisen signaa-
20 lin avulla havaittava tuote.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen laite, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu merkintäaine on prosteettinen ryh-
mä, joka yhtyy apoentsyymiin muodostaen aktiivisen entsyy-
min, joka apoentsyymi on osana mainittuun kantajajäseneen
25 sisältyvää reagenssikoostumusta.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen laite, t u n n e t -
t u siitä, että mainittu merkintäaine on flaviiniadeniini-
dinukleotidi ja mainittu apoentsyymi on apoglukoosioksidaasi.

9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen laite, t u n n e t -
30 t u siitä, että mainittu merkintäaine on entsyymi tai ent-
syymin inhibiittori.

10. Jonkin patenttivaatimuksista 1-9 mukainen laite,
t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi säteilyä
heijastavan kerroksen ja tukikerroksen, jolloin reagenssit
35 on sisällytetty säteilyä läpäisevään reagenssikerrokseen ja
säteilyä heijastava kerros on säteilyä läpäisemätön heijas-
tava kerros, joka on (a) sijoitettu reagenssikerroksen ja

tukikerroksen väliin; (b) ligandia, reagenssikerroksen reagensseja ja niiden välisten reaktioiden tuotteita läpäisemätön; ja (c) ligandin, reagenssikerroksen reagenssien ja niiden välisten reaktioiden tuotteiden suhteen inertti.

5 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, säteilyä heijastava kerros sisältää säteilyä läpäisemättömän peilipinnan.

10 12. Jonkin patenttivaatimuksista 1-11 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että mainittu sähkömagneettinen signaali on fluoresenssi.

13. Menetelmä ligandin määrittämiseksi tutkittavasta nestenäytteestä, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

15 a) mainittu näyte saatetaan kosketukseen koelaitteen kanssa, joka koelaitte käsittää (1) kiinteän kantajajäsenen, joka on absorbentti nestenäytteelle, ja (2) tähän kantajajäsenen sisällytetyn reagenssikoostumuksen, joka sisältää (i) ligandin vasta-ainetta tai muuta luonnossa esiintyvää ligandin, sitomisproteiinia ja (ii) ligandin konjugaattia tai tämän analogia, jota vasta-aine tai muu sitomisproteiini pystyy myös sitomaan, kovalenttisesti liittyneenä merkintäaineeseen, joka on todettavissa sähkömagneettisen signaalin avulla, joka signaali on erilainen silloin, kun merkitty konjugaatti on sitoutunut vasta-aineeseen tai 20 muuhun sitomisproteiiniin, kuin silloin, kun se ei ole siten sitoutunut, jolloin signaali on näytteessä olevan ligandimäärän funktio, ja

30 b) mitataan syntyvä sähkömagneettinen signaali kantajajäseneltä erottamatta vasta-aineen tai sitomisproteiinin sitomaa merkittyä konjugaattia fysikaalisesti konjugaattista, joka jää sitoutumatta, t u n n e t t u siitä, että kiinteän kantajajäsenen on sisällytetty mainittu vasta-aine tai muu sitomisproteiini ja mainittu merkitty konjugaatti oleellisesti toisiinsa sitoutumattomina ja että laite on 35 tehty sisällyttämällä kantajaan ensimmäisessä nesteessä toinen reagensseista, jotka ovat mainittu konjugaatti ja

mainittu vasta-aine tai sitomisproteiini, ja kuivaamalla kantaja, ja sen jälkeen joko (A) sisällyttämällä kantajaan toinen mainituista reagensseista vettä sisältämättömässä nesteessä ja kuivaamalla kantaja tai (B) esijäähdyttämällä kantaja, sisällyttämällä kantajaan toinen reagensseista, jotka ovat mainittu konjugaatti ja vasta-aine tai sitomisproteiini, toisessa nesteessä, saattamalla kantaja lämpötilaan, jossa toinen neste jäätyy, ja lyofilisoimalla kantaja.

14. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen koelaitte käytettäväksi tutkittavan nestenäytteen analysoinnissa.

15. Menetelmä nestenäytteessä olevan ligandin määrittämiseen käytettävän koelaitteen valmistamiseksi reagenssien useampikertaisella sisällyttämisellä kiinteään kantajajäseneseen, joka koelaitte käsittää (1) kiinteän kantajajäsenen, joka on absorbentti nestenäytteelle, ja (2) tähän kantajajäseneseen sisällytetyn reagenssikoostumuksen, joka sisältää (i) ligandin vasta-ainetta tai muuta luonnossa esiintyvää ligandin sitomisproteiinia ja (ii) ligandin konjugaattia tai tämän analogia, jota vasta-aine tai muu sitomisproteiini pystyy myös sitomaan, kovalenttisesti liittyneenä merkintäaineeseen, joka on todettavissa sähkömagneettisen signaalin avulla, joka signaali on erilainen silloin, kun merkitty konjugaatti on sitoitunut vasta-aineeseen tai muuhun sitomisproteiiniin, kuin silloin, kun se ei ole sitoutunut, jolloin signaali on näytteessä olevan ligandimäärän funktio, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

a) kantajaan sisällytetään ensimmäisessä nesteessä toinen reagensseista, jotka ovat mainittu merkitty konjugaatti ja mainittu sitomispartneri, ja sen jälkeen

b) kantajaan sisällytetään vedettömässä nesteessä toinen mainituista reagensseista, jotka ovat merkitty konjugaatti ja sitomispartneri, ja kantaja kuivataan, jolloin merkittyä konjugaattia ja sitomispartneria ei viedä yhdessä samaan ympäristöön, joten niiden välinen sitoutumisreaktio olennaisesti estyy ja kantajaan on siten sisällytetty mainittu vasta-aine tai muu sitomisproteiini ja mainittu merkitty konjugaatti olennaisesti toisiinsa sitoutumattomina.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vaiheessa a) kantajaan sisällytetään
mainitun sitomispartnerin vesiliuos tai -suspensio ja kan-
taja kuivataan ja vaiheessa b) kantajaan sisällytetään mai-
5 nitun merkityn konjugaatin liuos orgaanisessa liuottimessa
ja kantaja kuivataan.

17. Lyofilisointimenetelmä nestenäytteessä olevan li-
gandin määrittämiseen käytettävän koelaitteen valmistamiseksi,
joka koelaitte käsittää (1) kiinteän kantajajäsenen, joka
10 on absorbentti nestenäytteelle, ja (2) tähän kantajajäsenen
sisällytetyn reagenssikoostumuksen, joka sisältää (i) ligandin
vasta-ainetta tai muuta luonnossa esiintyvää ligandin
sitomisproteiinia ja (ii) ligandin konjugaattia tai tämän
analogia, jota vasta-aine tai muu sitomisproteiini pystyy
15 myös sitomaan kovalenttisesti liittyneenä merkintäaineeseen,
joka on todettavissa sähkömagneettisen signaalin avulla,
joka signaali on erilainen silloin, kun merkitty konjugaatti
on sitoutunut vasta-aineeseen tai muuhun sitomisproteiiniin,
kuin silloin, kun se ei ole sitoutunut, jolloin signaali
20 on näytteessä olevan ligandimäärän funktio, t u n n e t t u
siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

a) kantajaan sisällytetään ensimmäisessä nesteessä joko
mainittu merkitty konjugaatti tai mainittu sitomispartneri;

25 b) kantaja kuivataan;

c) kantaja esijäähdytetään ja siihen sisällytetään
toinen mainituista reagensseista eli merkitty konjugaatti
tai sitomispartneri toisessa nesteessä;

30 d) kantaja saatetaan lämpötilaan, jossa toinen neste
jäättyy;

e) kantaja lyofilisoidaan, jolloin merkittyä konjugaattia ja sitomispartneria ei viedä yhdessä samaan ympäristöön merkittäväksi ajanjaksoksi, joten niiden välinen sitoutumisreaktio on olennaisesti estynyt ja kantajajäsenen
35 sisällytetään siten mainittu vasta-aine tai muu sitomisproteiini ja mainittu merkitty konjugaatti olennaisesti toisiinsa sitoutumattomina.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että sekä ensimmäinen että toinen neste
ovat vesipitoiset.

Patentkrav

1. Testanordning för bestämning av en ligand i ett vätskeprov medelst homogen immunoanalys, vilken testanordning omfattar (1) en fast bärarkomponent, som utgör absorbent för vätskeprovet, och (2) en reagenskomposition som inkorporerats i bärarkomponenten och innehållande (i) en antikropp eller annat naturligt förekommande bindningsprotein för liganden och (ii) ett ligandkonjugat eller en analog därav, som antikroppen eller bindningsproteinet också förmår binda, kovalent bunden vid ett märkämne, som kan detekteras medelst en elektromagnetisk signal, vilken är annorlunda då det märkta konjugatet är bundet vid antikroppen eller annat bindningsprotein är då det inte är sålunda bundet, varvid signalen är en funktion av ligandmängden i provet, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda antikropp eller annat bindningsprotein och nämnda märkta konjugat inkorporerats i den fasta bärarkomponenten väsentligen obundna vid varandra och att anordningen har gjorts genom att i en första vätska inkorporera ett av reagensen, vilka reagens är nämnda konjugat och nämnda antikropp eller bindningsprotein i bäraren och torka denna och därefter antingen (A) genom att inkorporera i bäraren det andra av de nämnda reagensen i en vätska som inte innehåller vatten och torka bäraren, eller (B) genom att först djupfrysa bäraren, inkorporera det andra av reagensen, vilka reagens är nämnda konjugat och antikropp eller bindningsprotein, i en andra vätska, i bäraren, utsätta denna för en temperatur, vid vilken den andra vätskan fryser, och lyofilisera bäraren.

2. Anordning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda reagens är väsentligen homogent inkorporerade i nämnda bärarkomponent.

3. Anordning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda bärarkomponent utgörs av en tygmatris bestående av naturfibrer eller syntetiska polymerfibrer.

4. Anordning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda bärarkomponent utgörs av en polymerfilm eller -gel.

5 k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda märkämne är deltagare i en enzymatisk reaktion som producerar nämnda elektromagnetiska signal.

10 6. Anordning enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda märkämne är substrat för ett enzym, som ingår i reagenskompositionen som inkorporerats i nämnda bärarkomponent och förmår inverka på nämnda substrat så, att en produkt bildas, som kan detekteras medelst en elektromagnetisk signal.

15 7. Anordning enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda märkämne är en prostetisk grupp som förenas med ett apoenzym och därvid bildar ett aktivt enzym, vilket apoenzym ingår i reagenskompositionen som inkorporerats i bärarkomponenten.

20 8. Anordning enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda märkämne är flavinadenindinukleotid och nämnda apoenzym är apoglukosoxidas.

9. Anordning enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda märkämne är ett enzym eller en enzyminhibitor.

25 10. Anordning enligt något av patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a d därav, att den ytterligare omfattar ett strålningreflekterande skikt och ett stödsikt, varvid reagensen inkorporerats i ett strålningspermeabelt reagensskikt och det strålningsreflekterande skiktet är 30 ett strålningsinpermeabelt skikt som är (a) anordnat mellan reagensskiktet och stödsiktet; (b) inpermeabelt för liganden, reagensen i reagensskiktet och produkterna av reaktioner mellan dessa, och (c) inert i förhållande till liganden, reagensen i reagensskiktet och produkterna 35 av reaktioner mellan dessa.

11. Anordning enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att det strålningsreflekterande skikt-
et omfattar en strålningsinpermeabel spegelyta.

12. Anordning enligt något av patentkraven 1-11,
5 k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda elektromagnetiska
signal är fluorescens.

13. Förfarande för bestämning av en ligand i ett
vätskeprov som skall analyseras, vilket förfarande omfatta-
ar följande skeden:

10 a) nämnda prov bringas i kontakt med en analysan-
ordning som omfattar (1) en fast bärarkomponent, som ut-
gör absorbent för vätskeprovet, och (2) en reagenskompo-
sition som inkorporerats i bärarkomponenten och innehållan-
de (i) en antikropp eller annat naturligt förekommande
15 bindningsprotein för liganden och (ii) ett ligandkonjugat
eller en analog därav, som antikroppen eller annat bind-
ningsprotein också förmår binda, kovalent bunden vid ett
märkämnne, som kan detekteras medelst en elektromagnetisk
signal, vilken är annorlunda då det märkta konjugatet är
20 bundet vid antikroppen eller annat bindningsprotein än då
det inte är sålunda bundet, varvid signalen är en funktion
av ligandmängden i provet, och

b) den producerade elektromagnetiska signalen mäts
på bärarkomponenten utan fysikalisk separering av det
25 märkta konjugatet som bundits vid antikroppen eller bind-
ningsproteinet från konjugatet, som inte binds, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att nämnda antikropp eller annat
bindningsprotein och nämnda märkta konjugat inkorporerats
i den fasta bärarkomponenten väsentligen obundna vid var-
30 andra och att anordningen har gjorts genom att i en
första vätska inkorporera ett av reagensen, vilka reagens
är nämnda konjugat och nämnda antikropp eller bindnings-
protein i bäraren och torka denna, och därefter antingen
(A) genom att inkorporera i bäraren det andra av de näm-
35 da reagensen i en vätska som inte innehåller vatten och
torka bäraren eller (B) genom att först djupfrysa bärar-
en, inkorporera det andra av reagensen, vilka reagens är

nämnda konjugat och antikropp eller bindningsprotein, i en andra vätska, i bäraren, utsätta denna för en temperatur, vid vilken den andra vätskan fryser, och lyofilisera bäraren.

5 14. Testanordning enligt något av patentkraven 1-12 för användning vid analys av ett vätskeprov som skall undersökas.

10 15. Förfarande för framställning av en testanordning för bestämning av en ligand i ett vätskeprov genom flerfaldig inkorporering av reagens i en fast bärarkomponent, vilken testanordning omfattar (1) en fast bärarkomponent som utgör absorbent för vätskeprovet, och (2) en reagenskomposition som inkorporerats i bärarkomponenten och innehållande (i) en antikropp eller annat naturligt förekommande bindningsprotein för liganden och (ii) ett ligandkonjugat eller en analog därav, som antikroppen eller bindningsproteinet också förmår binda, kovalent bunden vid ett märkämne, som kan detekteras medelst en elektromagnetisk signal, vilken är annorlunda då det märkta konjugatet är bundet vid antikroppen eller annat bindningsprotein än 15 då det inte är sålunda bundet, varvid signalen är en funktion av ligandmängden i provet, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar följande skeden:

25 a) ett av reagensen, vilka är nämnda märkta konjugat och nämnda bindningspartner, inkorporeras i bäraren i en första vätska, och därefter

30 b) inkorporeras det andra av reagensen, vilka är märkt konjugat och bindningspartner i bäraren, i en vätska som inte innehåller vatten, och bäraren torkas, varvid det märkta konjugatet och bindningspartnern inte samtidigt införs i samma miljö varvid bindningsreaktionen mellan dem väsentligen förhindras och nämnda antikropp eller annat bindningsprotein och nämnda märkta konjugat har inkorporerats i bäraren väsentligen obundna vid varandra.

35 16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e t e c k n a t därav, att i skedet a) inkorporeras en vattenlösning eller -suspension av nämnda bindningspartner i

bäraren och bäraren torkas och i skedet b) inkorporeras en lösning av nämnda märkta konjugat i ett organiskt lösningsmedel i bäraren och bäraren torkas.

5 17. Lyofiliseringsförfarande för framställning av en
testanordning för bestämning av en ligand i ett vätskeprov,
vilken testanordning omfattar (1) en fast bärarkomponent,
som utgör absorbent för vätskeprovet, och (2) en reagens-
komposition som inkorporerats i bärarkomponenten och inne-
hållande (i) en antikropp eller annat naturligt förekomman-
10 de bindningsprotein för liganden och (ii) ett ligandkonju-
gat eller en analog därav, som antikroppen eller bindnings-
proteinet också förmår binda, kovalent bunden vid ett märk-
ämne som kan detekteras medelst en elektromagnetisk signal,
vilken är annorlunda då det märkta konjugatet är bundet
15 vid antikroppen eller annat bindningsprotein än då det
inte är sålunda bundet, varvid signalen är en funktion av
ligandmängden i provet, k ä n n e t e c k n a t därav, att
förfarandet omfattar följande skeden:

20 a) antingen nämnda märkta konjugat eller nämnda
bindningspartner inkorporeras i bäraren i en första vätska;

b) bäraren torkas;

c) bäraren djupfrysas och det andra av nämnda rea-
gens eller märkt konjugat eller bindningspartner inkorpo-
reras i densamma i en andra vätska;

25 d) bäraren utsätts för en temperatur, vid vilken
den andra vätskan fryser;

e) bäraren lyofiliseras, varvid det märkta konjugat-
et och bindningspartnern inte samtidigt införs i samma
miljö för någon betydande tidsperiod, varvid bindnings-
30 reaktionen mellan dem väsentligen förhindras och nämnda
antikropp eller annat bindningsprotein och nämnda märkta
konjugat således inkorporeras i bärarkomponenten väsentli-
gen obundna vid varandra.

35 18. Förfarande enligt patentkravet 17, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att både den första och den andra
vätskan innehåller vatten.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: EP 13156 (G 01 N 33/52).
Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 733 380
(G 01 N 33/16). Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 2 023 607 (C 07 H 19/20).
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Iso-Britannia-Storbritannien(GB)
1 552 607 (G 01 N 33/16). USA(US) 3 641 235 (G 01 n 31/22), 4 094 647
(G 01 N 33/16), 4 160 008 (G 01 N 31/22).

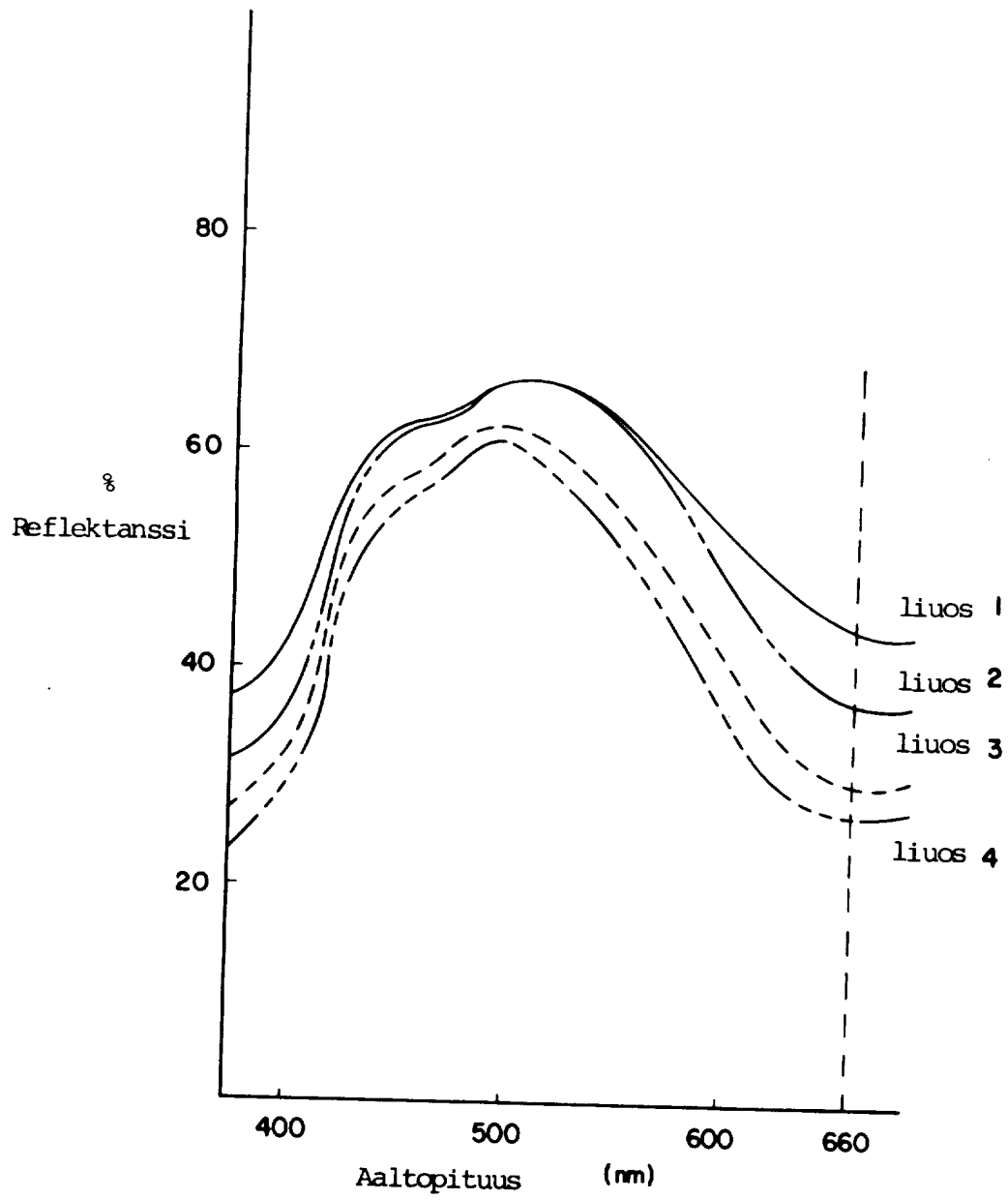


FIG. 1

75677

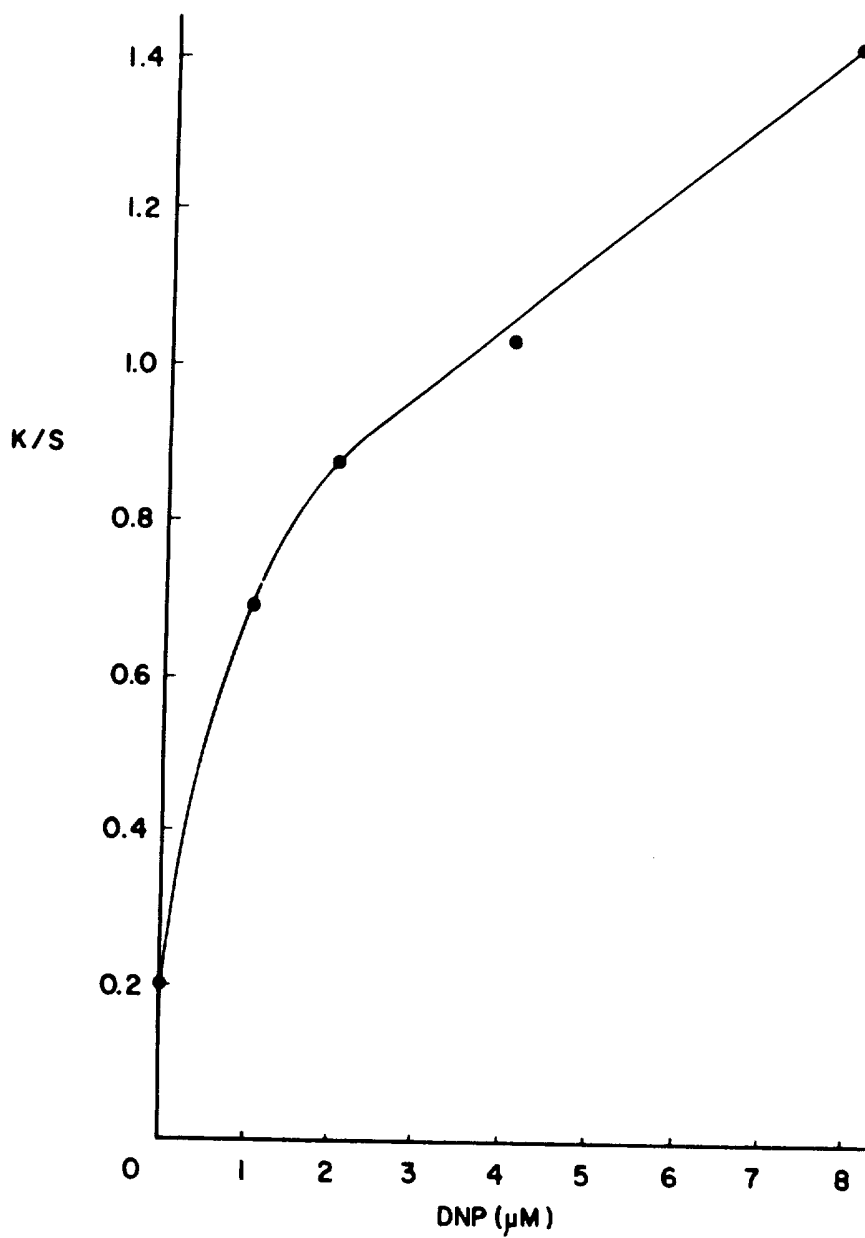


FIG. 2

75677

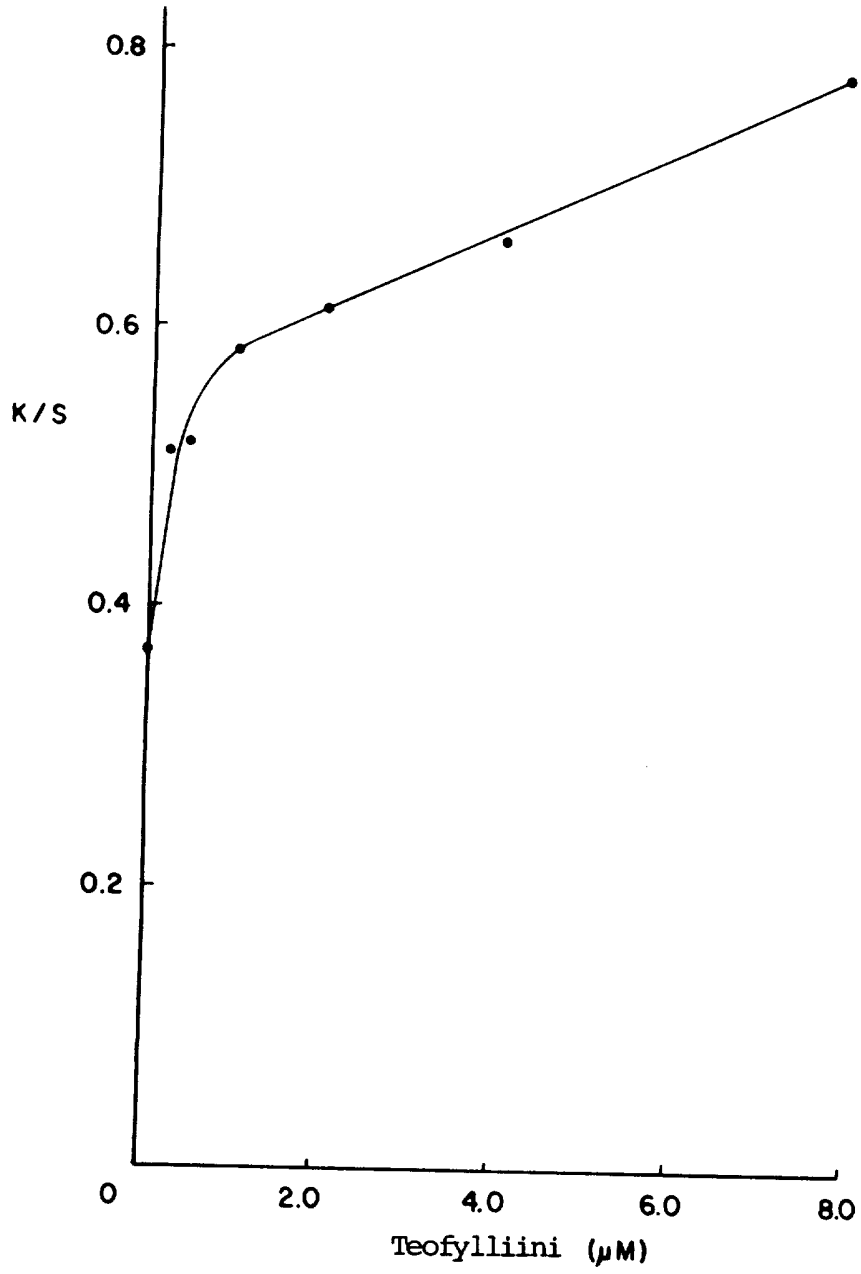


FIG. 3

75677

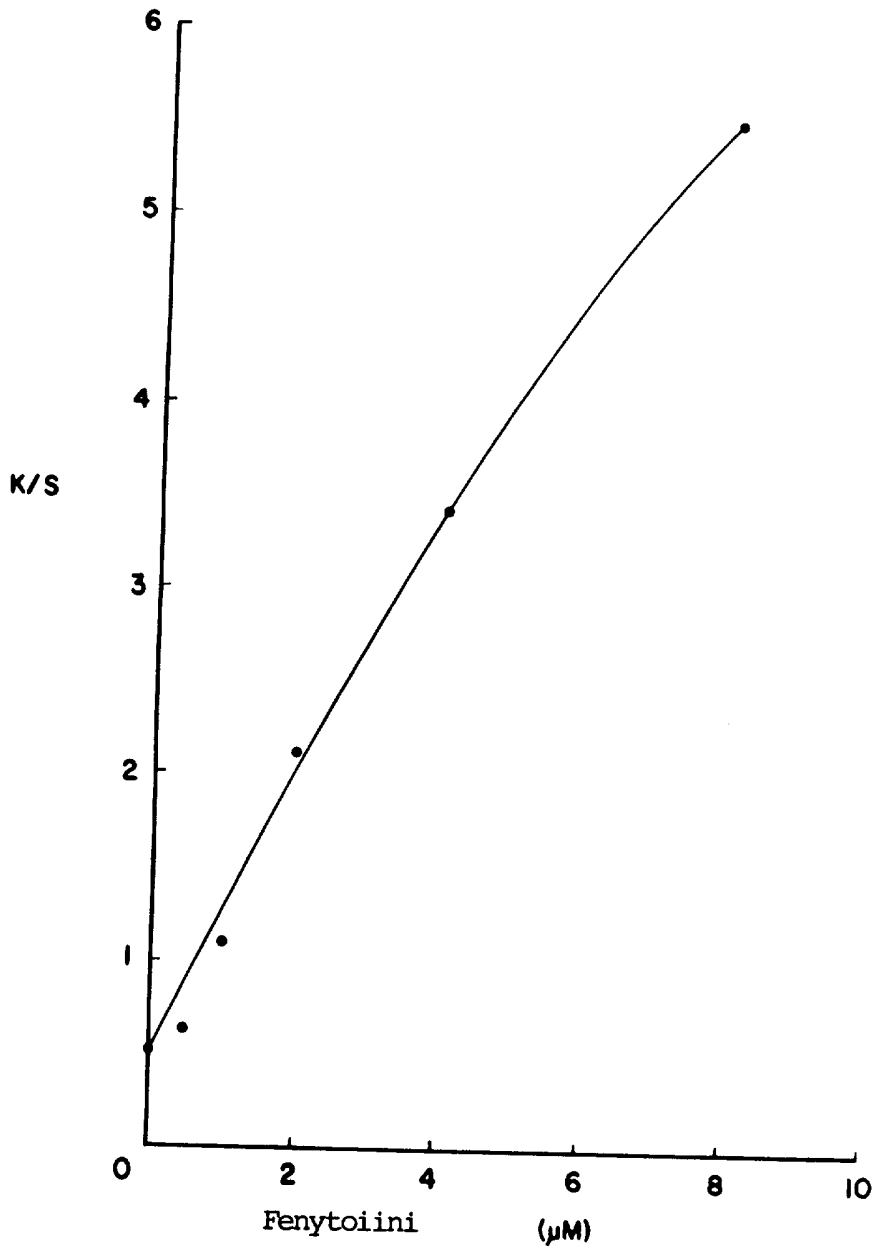


FIG. 4

75677

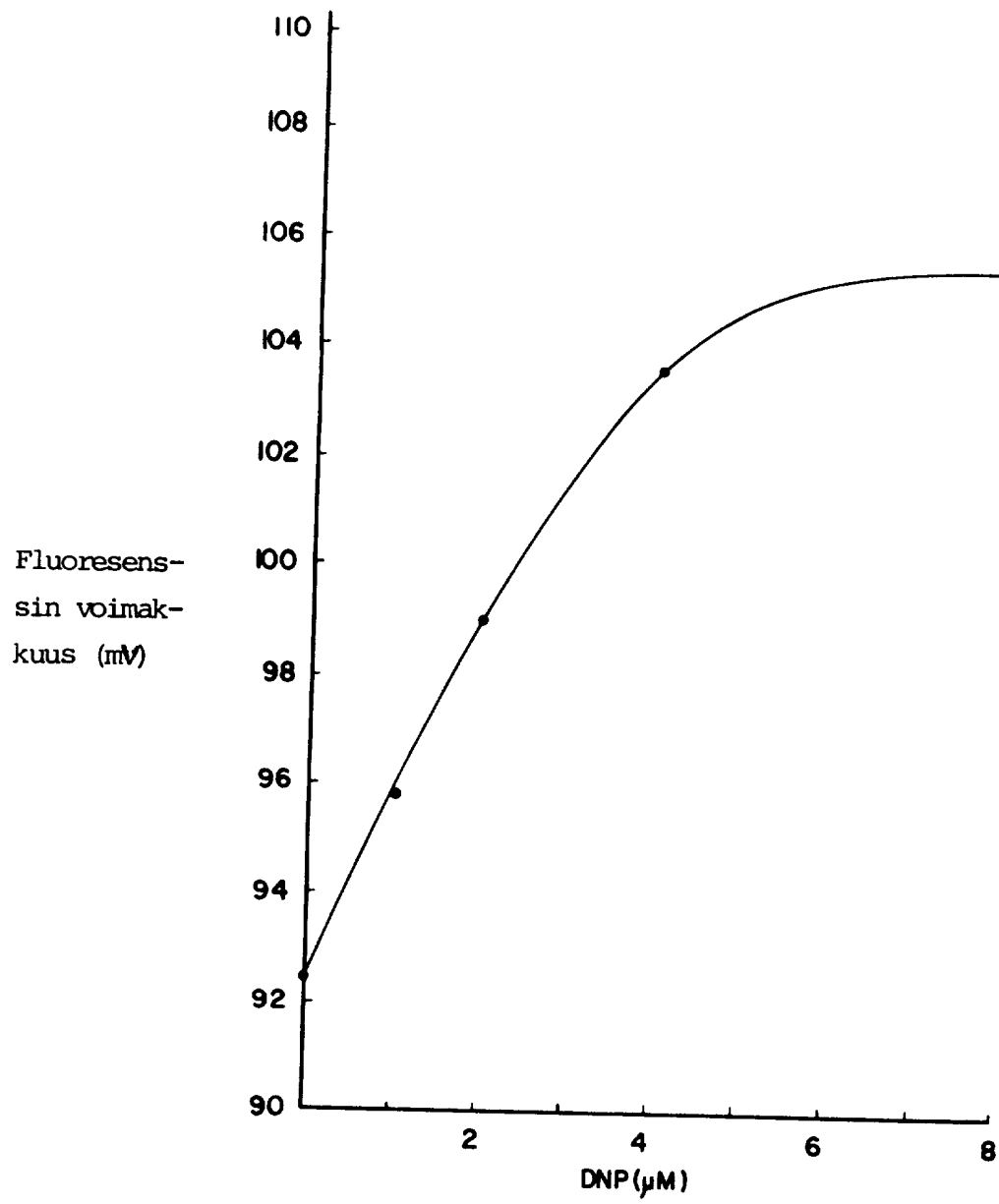


FIG. 5

75677

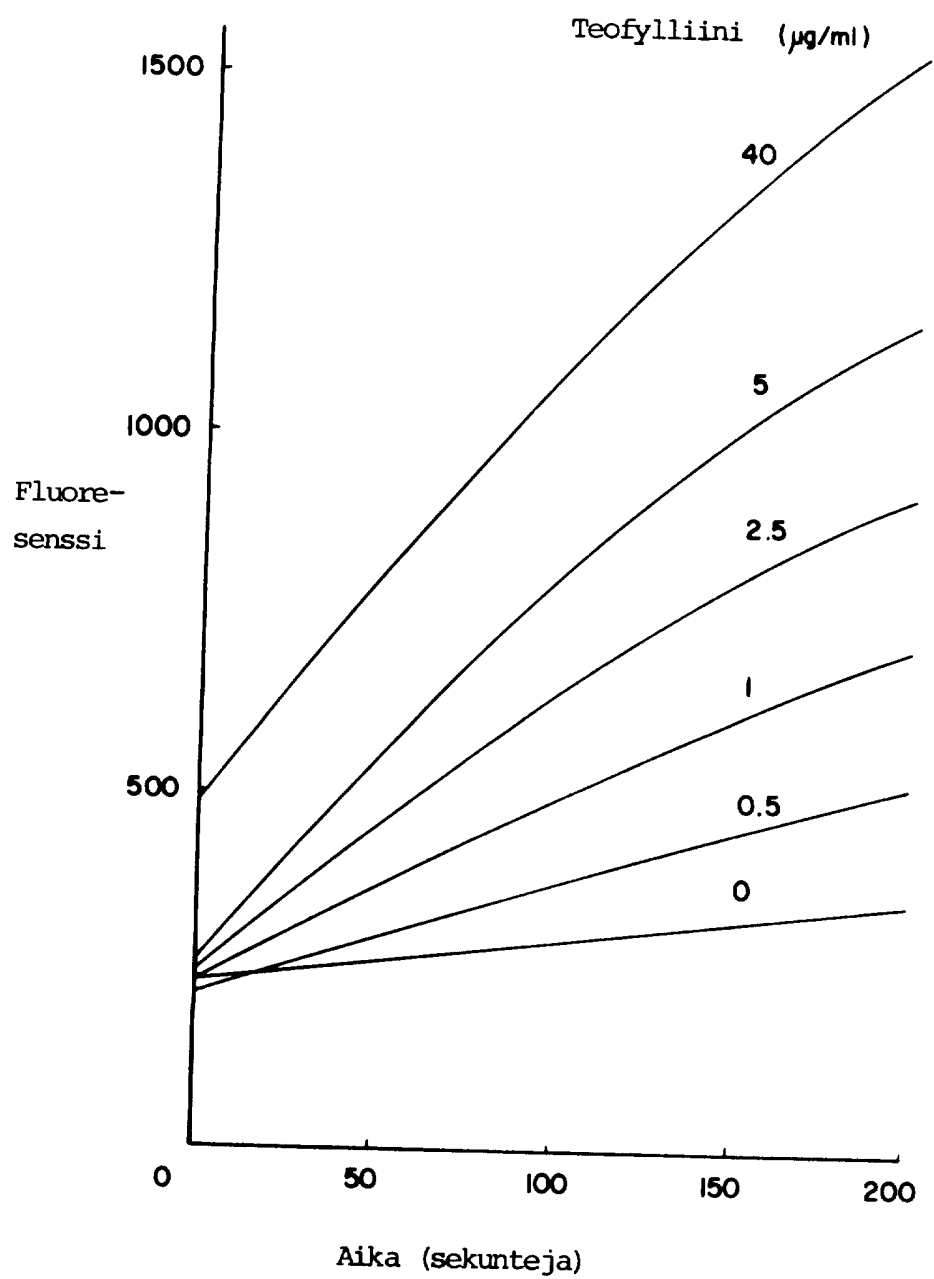


FIG. 6

75677

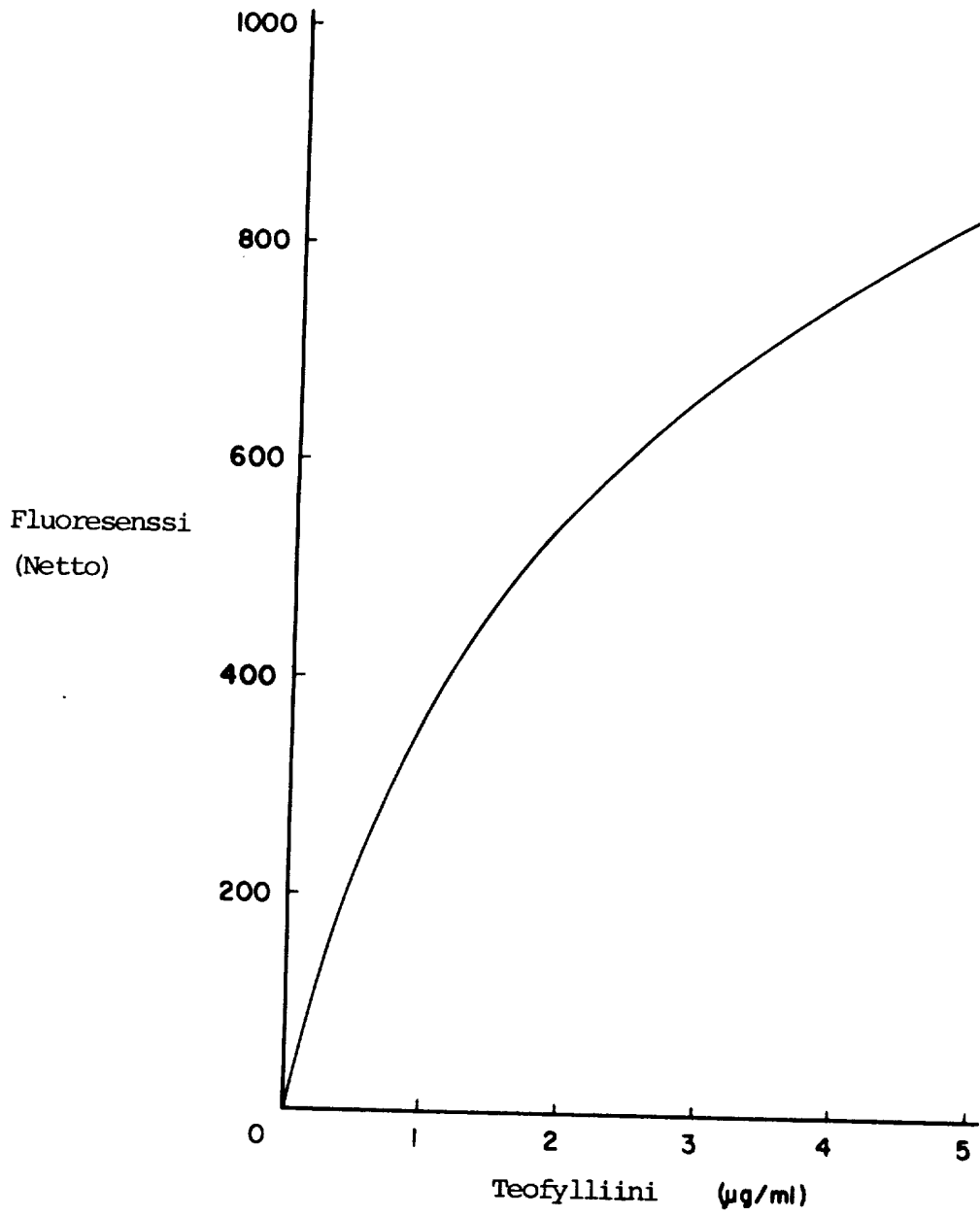


FIG. 7

75677

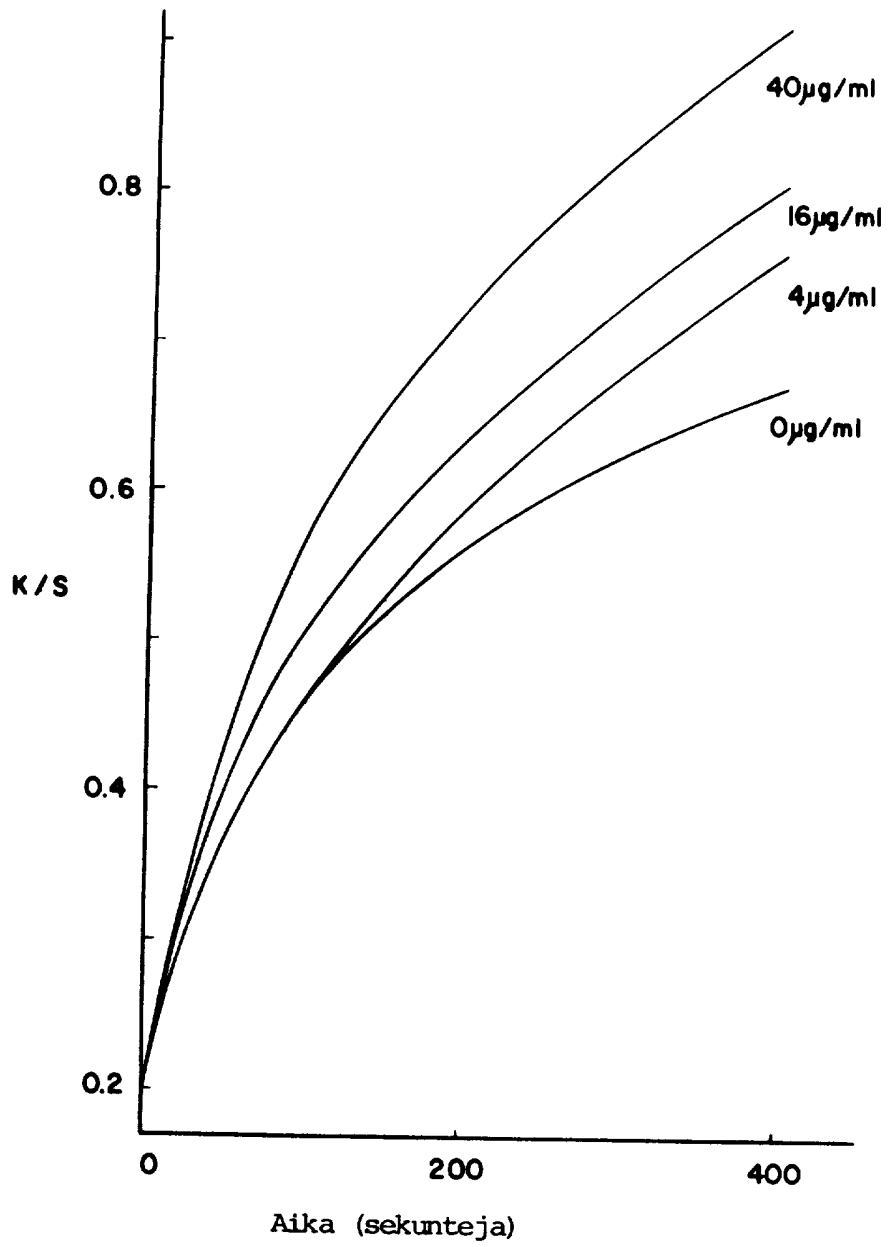


FIG. 8

75677

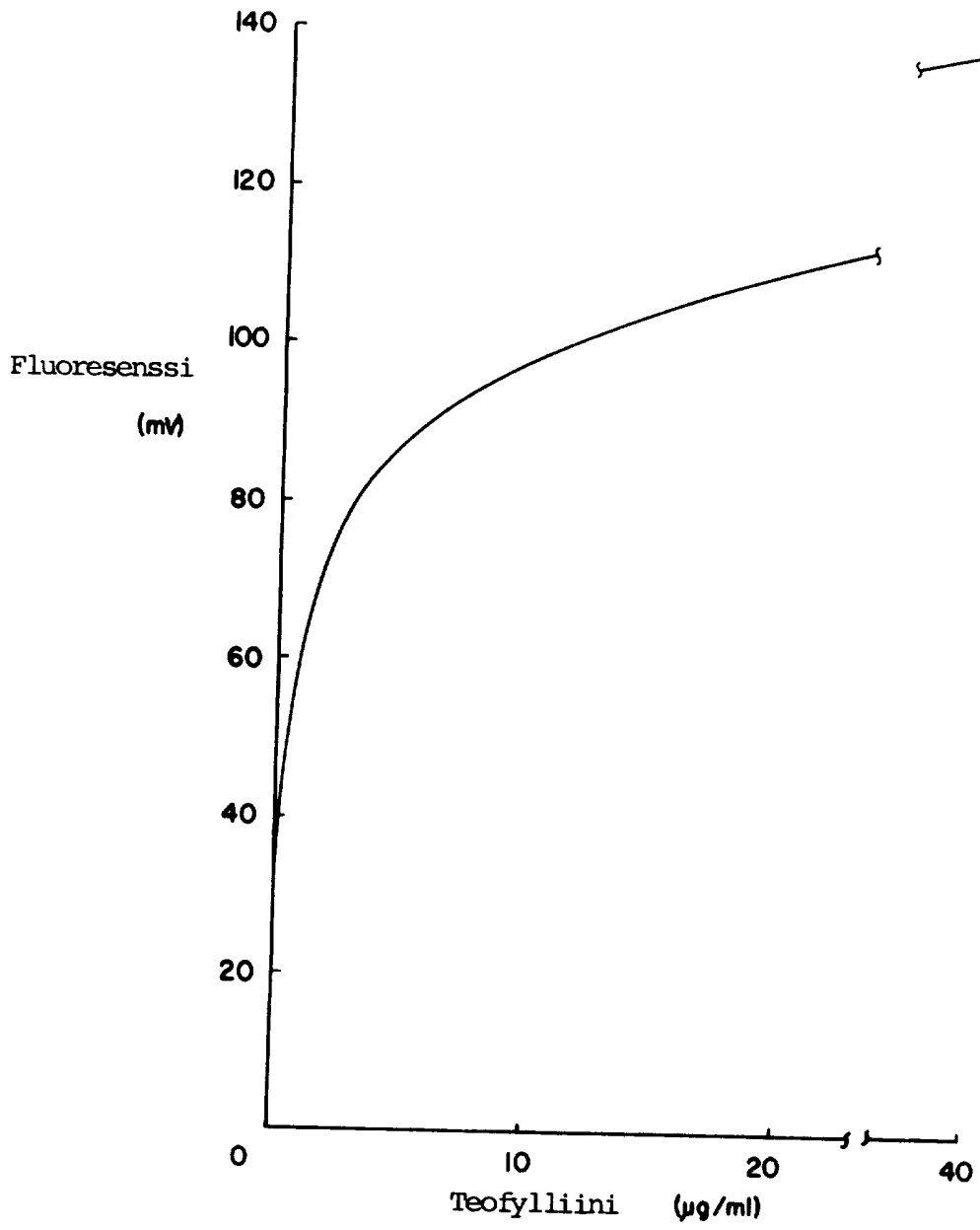


FIG. 9

75677

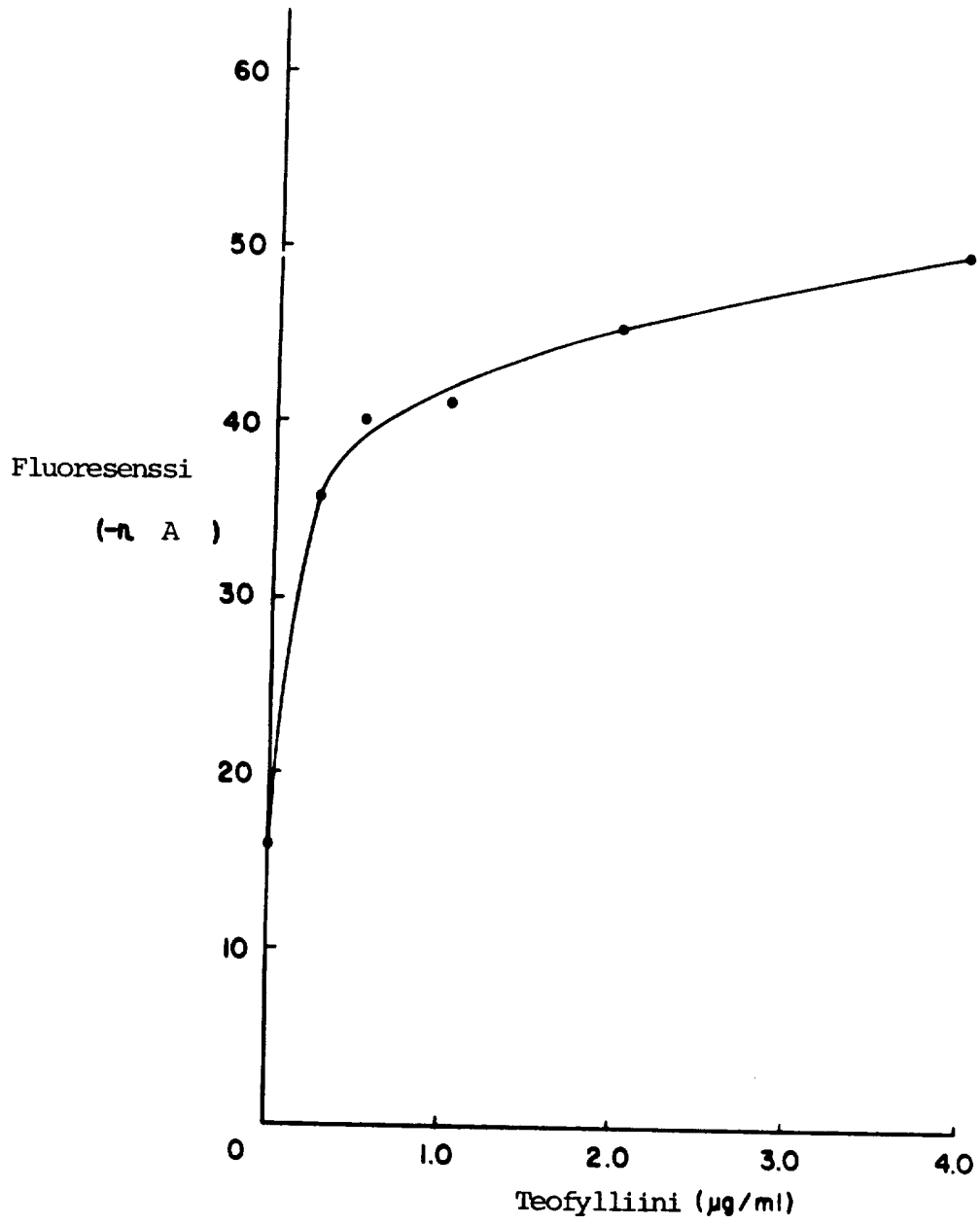


FIG. 10

75677

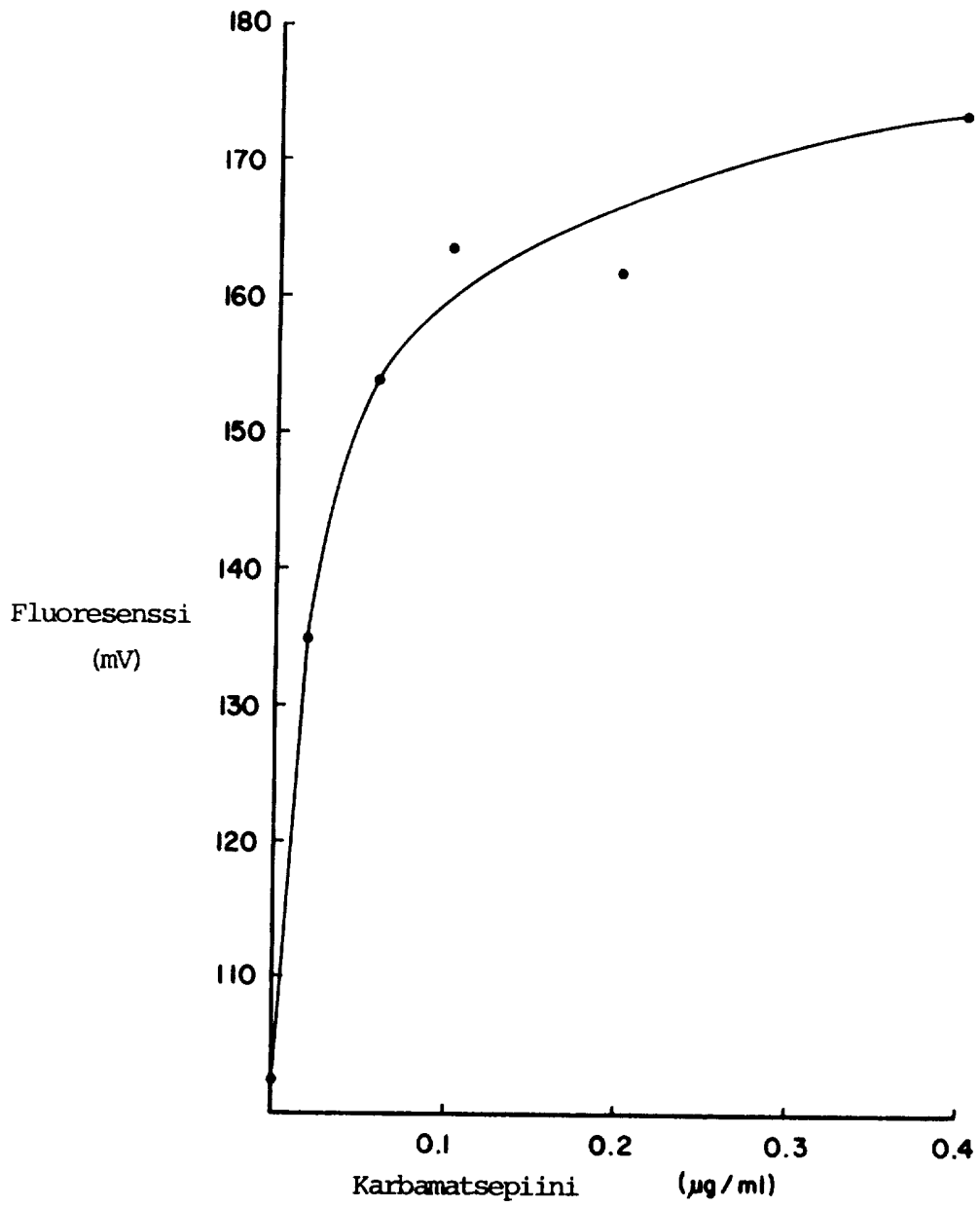


FIG. II

75677

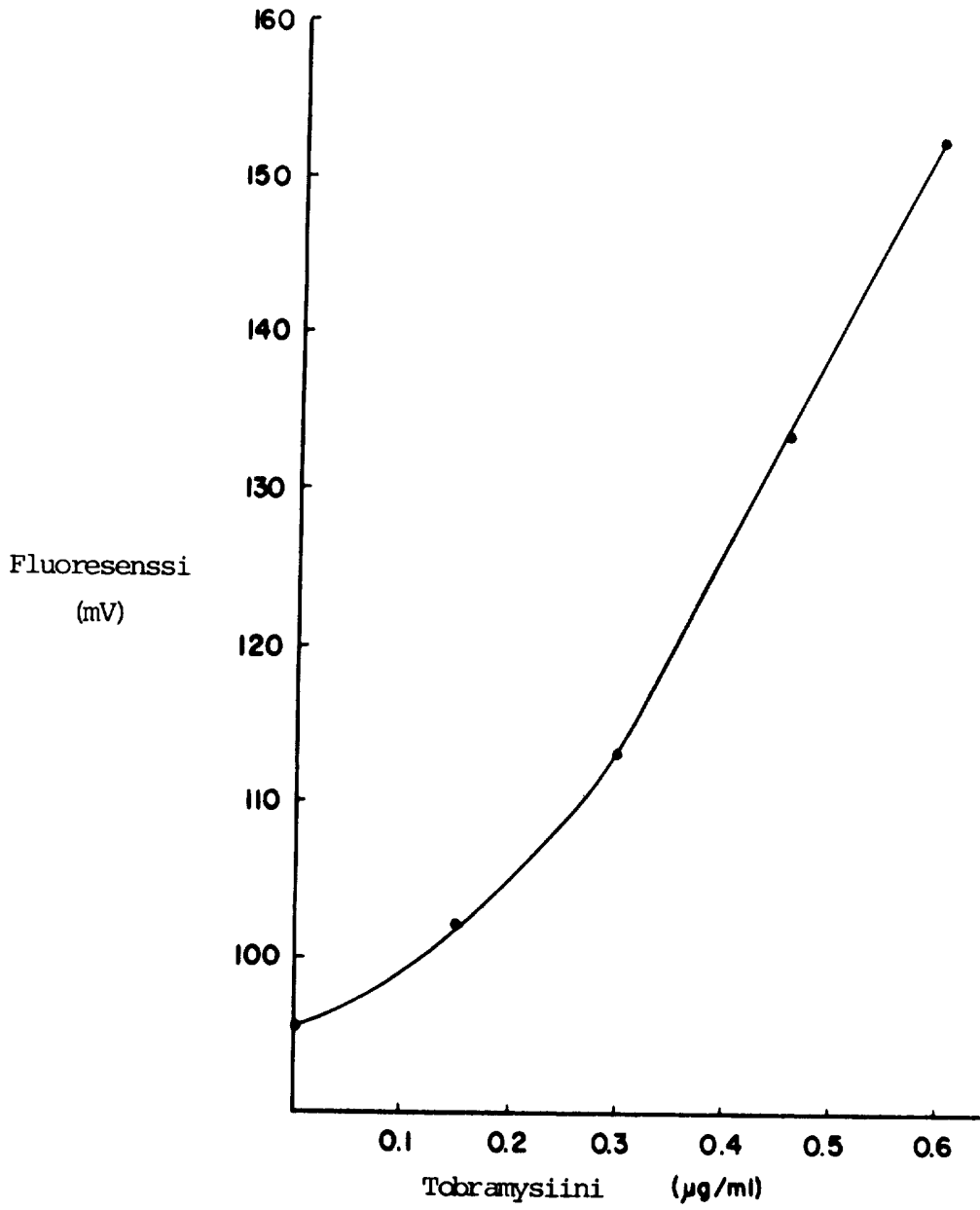


FIG. 12

75677

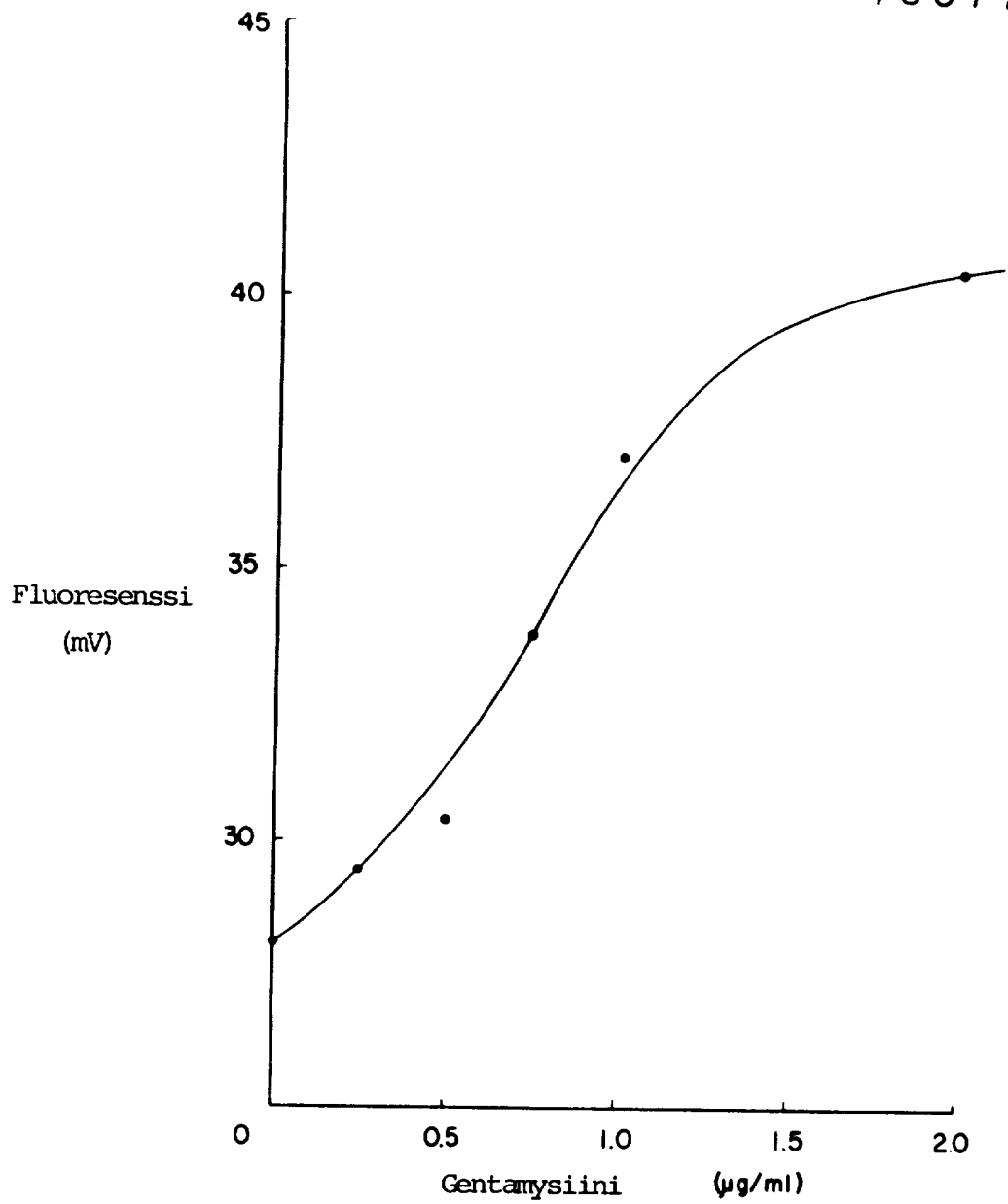


FIG. 13

75677

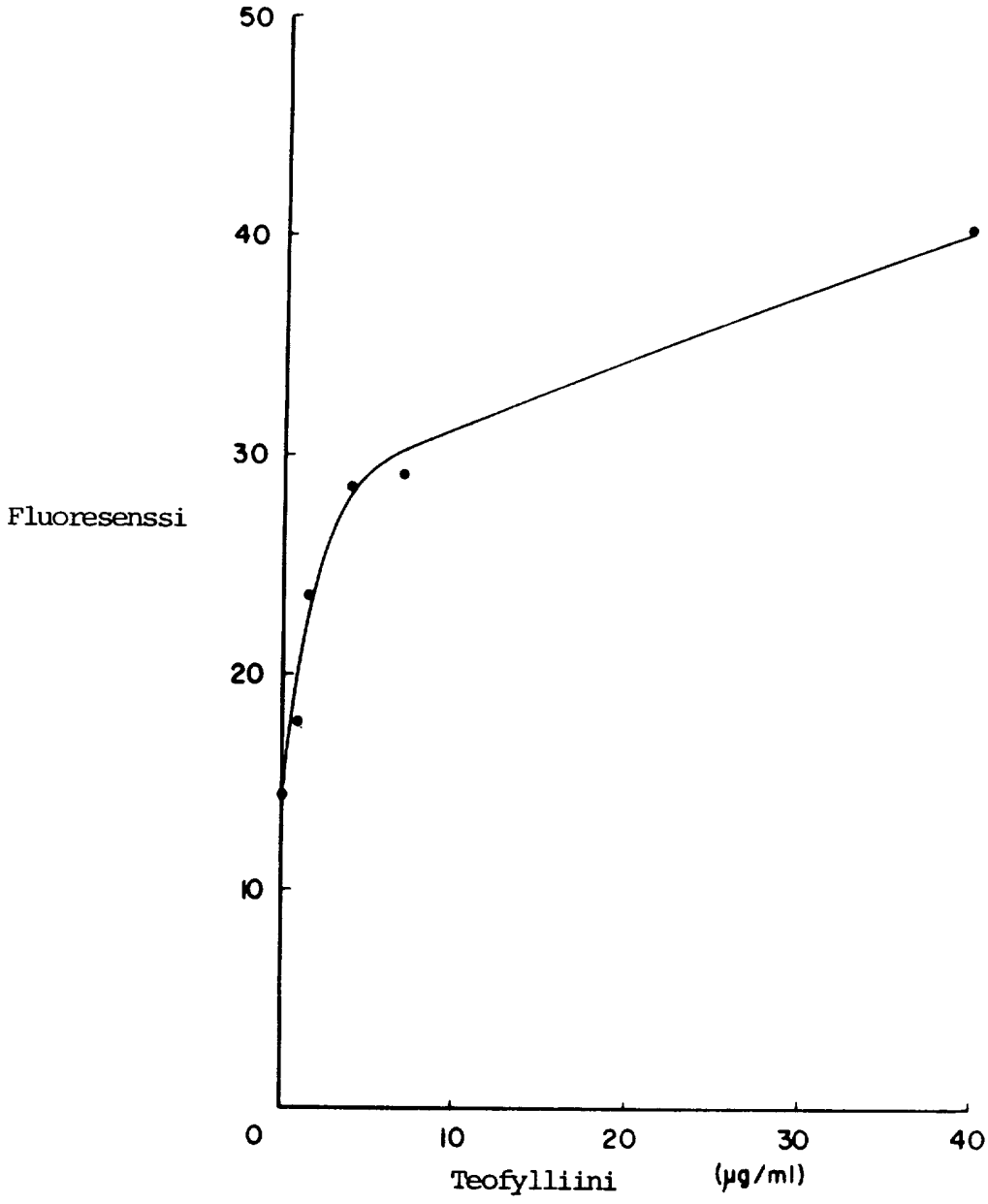


FIG. 14

75677

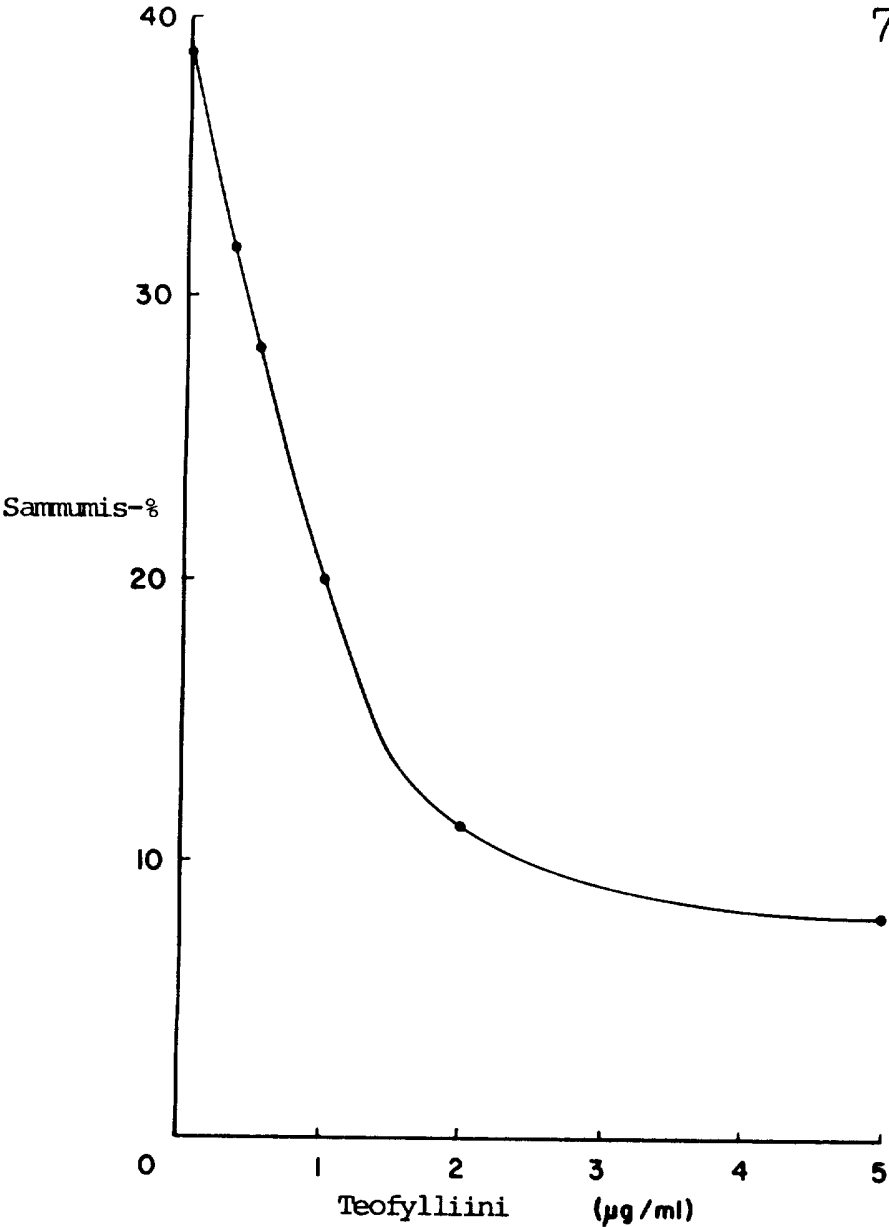


FIG. 15

75677

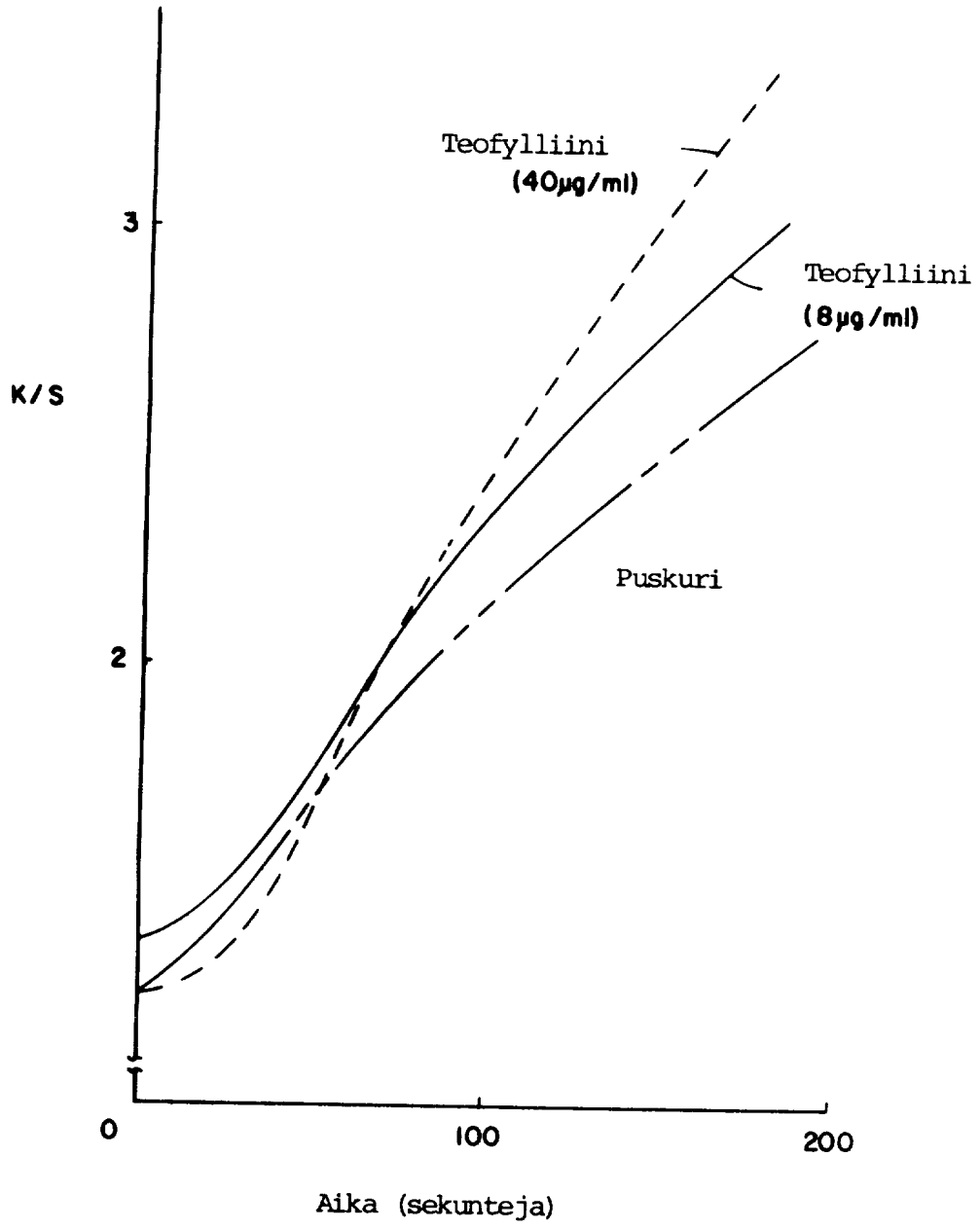


FIG. 16