(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 32 152 T2** 2006.07.20

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 957 163 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 152.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP98/03833**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 940 595.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/011766**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.03.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.11.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.07.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/66*** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
23574097 01.09.1997 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:
Toyo Ink Mfg. Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel, 80538 München

(72) Erfinder:
RYUFUKU, Masayuki, Chuo-ku, Tokyo 104-0031, JP; TANAKA, Hozumi, Chuo-ku, Tokyo 104-0031, JP; TAKEUCHI, Hideyuki, Chuo-ku, Tokyo 104-0031, JP

(54) Bezeichnung: **LUMINESZENZMETHODE FÜR DAS LUCIFERIN/LUCIFERASE-SYSTEM UND LUMINESZENZREAGENS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technische Gebiete

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System, das eine Lumineszenzreaktion stabilisiert, und ein Luciferase-Nachweisreagens. Das Lumineszenzverfahren für das Luciferin/Luciferase-System und das Luciferase-Nachweisreagens, die durch die vorliegende Erfindung an die Hand gegeben werden, können bei allen Nachweissystemen angewendet werden, die ein Luciferase-Enzym als Reporter und Signal verwenden.

Hintergrund

[0002] Bei einer Lumineszenzreaktion mit Luciferin/Luciferase in vitro wird herkömmlicherweise dessen Lumineszenzmuster in einem Flash-Zustand beobachtet. Daher ist es unmöglich, die Lumineszenzreaktion präzis ohne Verwendung einer Vorrichtung mit einem spezifischen Mechanismus für des Injizieren eines Reagens zu messen. K.V. Wood et al. haben aber ein Lumineszenzsystem mit einer relativ langen Halbwertszeit von 5 Minuten geschaffen. (Wood, K.V. Recent advantage and prospects for beetle luciferase as genetic reporters. In: Bioluminescence and Chemiluminescence current status. Proceeding of the VIth International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Cambridge, September 1990. S. 543. Herausgegeben von P. Stanley und L.J. Kricka.). Infolgedessen ist es möglich geworden, eine Lumineszenz-Einheit in einem Luciferin/Luciferase-System mit einem Luminometer oder einem Flüssigszintillationszähler, der keine automatische Reagens injizierende Vorrichtung hat, präzis zu messen. Daher wird ein Reporternachweisverfahren, bei dem als Reporter in einer Kulturzelle erzeugtes Luciferase bei hoher Empfindlichkeit gemessen wird, verbreitet verwendet. Wenn aber das Reporternachweisverfahren bei einem so genannten High Throughput Screening für das Entwickeln einer Medikation verwendet wird, ist die Lumineszenz-Halbwertszeit von 5 Minuten nicht ausreichend. Für das Messen vieler Proben durch Verwenden von 96 Mikrotiterplatten-Vertiefungen müssen zum Beispiel Lumineszenzreagenzien mehrmals zugegeben werden und die Messung muss jedes Mal ausgeführt werden. Dadurch bestehen Einschränkungen hinsichtlich Betrieb und Messung.

[0003] Weiterhin oxidiert als Lumineszenzsubstrat in einem Lumineszenzreagens enthaltenes Luciferin leicht während der Lagerung in einer Lösung, so dass es ein Oxyluciferin bildet. Es ist bekannt, dass Oxyluciferin die Enzymreaktion einer Luciferase hemmt. Herkömmliche Luciferin als Lumineszenzsubstrat enthaltende Lumineszenzreagenzien weisen ein großes Problem auf, da eine Lumineszenzaktivität aufgrund der Oxidation des Luciferin schlechter wird. Dieses Problem verhindert die weitere Ausweitung der Einsatzmöglichkeiten der Luciferase als Reporter verwendenden Analyse. Daher wird die Entwicklung eines neuen Stabilisierungsverfahrens erwartet.

[0004] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System, das die Halbwertszeit einer Lumineszenzreaktion verlängert, sowie ein Luciferase-Nachweisreagens an die Hand zu geben.

[0005] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung betrifft ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin-/Luciferase-System, das die Verschlechterung einer Lumineszenzaktivität verhindert und eine stabile Lumineszenzreaktion gibt, sowie ein Luciferase-Nachweisreagens.

Offenlegung der Erfindung

[0006] Erfindungsgemäß wird ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System an die Hand gegeben, das das in Reaktion bringen einer Luciferase-Lösung, die eine erhöhte Menge aufgelösten Kohlendioxids enthält, mit Luciferase umfasst.

[0007] Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System an die Hand gegeben, bei dem der pH-Wert der Luciferin-Lösung in dem Bereich von 5,0 bis 8,5 eingestellt wird.

[0008] Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System an die Hand gegeben, bei dem die Menge des aufgelösten Kohlendioxids in der Luciferin-Lösung durch Zugabe von Trockeneis erhöht wird.

[0009] Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Lumineszenzverfahren für ein Luciferin/Luciferase-System an die Hand gegeben, bei dem die Menge des aufgelösten Kohlendioxids in der Luciferin-Lösung durch Einleiten ei-

nes Kohlendioxidgases erhöht wird.

[0010] Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Luciferase-Nachweisreagens an die Hand gegeben, welches eine Luciferin-Lösung umfasst, die eine erhöhte Menge an aufgelöstem Kohlendioxid enthält.

[0011] Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Luciferase-Nachweisreagens an die Hand gegeben, welches eine ein getrocknetes Luciferin enthaltende erste Komponente und eine zweite Komponente aus einer Lösung, die eine erhöhte Menge an aufgelöstem Kohlendioxid enthält, umfasst.

Bevorzugte Ausführung der Erfindung

[0012] In der vorliegenden Erfindung bezeichnet der Begriff „Luciferase" alle Luciferasen, die eine Biolumineszenz betreffen, beispielsweise eine Glühwürmchen-Luciferase, eine Renilla-Luciferase und eine Cypridina-Hilgendorfii-Luciferase.

[0013] In der vorliegenden Erfindung bezeichnet der Begriff „Luciferin" Lumineszenzsubstrate, die den Luciferasen entsprechen, die eine Biolumineszenz betreffen, beispielsweise eine Glühwürmchen-Luciferase, eine Renilla-Luciferase und eine Cypridina-Hilgendorfii-Luciferase.

[0014] Als Verfahren zur Steigerung der Menge aufgelösten Kohlendioxids in einer Luciferase-Lösung als Lumineszenzreagens für eine Luciferase wird in der vorliegenden Erfindung ein Verfahren der Zugabe eines Kohlendioxidgases oder von Trockeneis bevorzugt. Beispiele für das Verfahren umfassen sogar ein Verfahren, bei dem eine anorganische Verbindung wie Natriumbicarbonat, das durch dessen Zugabe in Wasser ein Gas erzeugt, zugegeben wird. Es ist aber bevorzugt, ein Kohlendioxidgas oder ein Trockeneis zu verwenden, das Lebewesen wie Mikroorganismen kaum beeinträchtigt und das keine chemische Reaktion oder dergleichen erzeugt.

[0015] Dank der Verwendung eines Kohlendioxidgases wird die Lumineszenzreaktion von Luciferase lange Zeit fortgesetzt. Gleichzeitig kann ein Lumineszenzsubstrat, Luciferin, in der Lösung vor einer Oxidationsverschlechterung aufgrund aufgelösten Sauerstoffs geschützt werden.

[0016] Für das Steuern des pH-Werts einer Lumineszenzlösung wird in der vorliegenden Erfindung eine anorganische Säure wie Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Borsäure, eine organische Säure wie Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Propionsäure, Mucinsäure, Benzoesäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure oder Fumarsäure, eine anorganische alkalische Verbindung wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, wässrige Ammoniaklösung, Natriumcarbonat und Kaliumcarbonat oder eine organische Base wie Anilin, Pyridin, Imidazol, Monomethylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Monoethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Ethanolamin, Diethanolamin oder Triethanolamin zugegeben. Durch Steuern eines pH-Werts bei einem bevorzugten pH-Wert von pH 5 bis 8,5 wird während einer Lumineszenzreaktion die Verschiebung zu einer alkalischen Seite verhindert, was zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität von Luciferase dienen kann.

[0017] Wenn der pH-Wert jenseits des Bereichs von 5,0 bis 8,5 liegt, wird die Lumineszenzreaktion extrem verhindert. Wenn der pH-Wert hoch in dem obigen Bereich liegt, kann eine starke Lumineszenz-Einheit erhalten werden. Die Halbwertszeit wird aber verkürzt. Wenn der pH-Wert dagegen niedrig ist, ist die Lumineszenz-Einheit klein. Es kann aber eine lange Halbwertszeit erreicht werden. D.h. die Kombinationsveränderung von pH und einer Pufferkomponente davon kann die Lumineszenz-Einheit und die Halbwertszeit der Lumineszenz in gewissem Maße einstellen, wenn eine Lumineszenzlösung der gleichen Zusammensetzung verwendet wird. Die Pufferlösungskomponente zur Steuerung eines pH-Werts kann beliebig sein, solange sie nicht eine Luciferase-Aktivität verhindert. Die Pufferlösung umfasst allgemeine Pufferlösungen wie Trisulfat, Citronensäure und Bernsteinsäure, Good-Pufferlösungen wie HEPES und MES sowie breite Pufferlösungen wie GTA. Die Konzentration der Pufferkomponente kann eine beliebige Konzentration sein, sofern sie nicht einen pH-Wert in dem vorbestimmten Bereich vom Start der Lumineszenz bis zu einem Zeitpunkt, da die Lumineszenz um die Hälfte gesunken ist, ausreichend halten kann.

[0018] Das erfindungsgemäße Luciferase-Nachweisreagens wird so erzeugt, dass bei seinem Mischen mit einer Luciferase enthaltenden Probe eine Reaktion gestartet wird und eine Konzentration einer Komponente hinsichtlich einer Lumineszenzreaktion, beispielsweise einem Lumineszenzsubstrat, erhalten wird, wobei die Konzentration ausreicht, um eine zu messende Luciferase abzugeben. Das Lumineszenzreagens umfasst ein Kit eines gefrorenen Erzeugnisses und ein Kit eines gefriergetrockneten Erzeugnisses.

[0019] Das gefrorene Erzeugnis wird durch Gefrieren einer Komponente erhalten, die Luciferin, ATP, CoA, eine Pufferlösungskomponente, Magnesiumione, etc. enthält. Kohlendioxid wird vor dem Gefrieren in einer Lösung zwangsaufgelöst. Das gefrorene Erzeugnis wird bei etwa –70°C gelagert. Nachdem das gefrorene Erzeugnis aufgetaut und vollständig Raumtemperatur erreicht hat, wird es verwendet.

[0020] Der Kit des gefriergetrockneten Erzeugnisses umfasst eine erste Komponente, die durch Gefriertrocknen einer Lösung, die Luciferin, ATP und CoA enthält, erhalten wird, und eine zweite Komponente einer Lösung, die eine Pufferlösungskomponente und Magnesiumione enthält. Die erste Komponente und die zweite Komponente werden direkt vor der Verwendung gemischt. In diesem Fall wird Kohlendioxid in der Lösung der zweiten Komponente zwangsaufgelöst und abgedichtet gelagert. Das gefriergetrocknete Erzeugnis und die Lösungskomponente werden gefroren gelagert. Nachdem das gefriergetrocknete Erzeugnis und die Lösungskomponente aufgetaut sind und Raumtemperatur erreicht haben, werden diese Komponenten vor der Verwendung gemischt.

[0021] Sowohl das gefrorene Erzeugnis als auch das gefriergetrocknete Erzeugnis können in einem Lösungszustand 24 Stunden lang bei Raumtemperatur oder einen Monat lang bei niedrigen Temperaturen (4°C) bei praktisch keinem Verlust der Lumineszenzeigenschaften gelagert werden.

[0022] Die vorliegende Erfindung wird unter Bezug auf Beispiele eingehend erläutert.

Beispiel 1

[0023] Auf 10 ml eines Luciferase-Nachweisreagens des „Pica Gene Luminescence Kit" (Produktnr. „PGL100", bezogen von TOYO INK MFG. Co., LTD), wurde eine GTA-Pufferlösung, deren pH-Wert auf 6,7 eingestellt war, zugegeben, um eine Endkonzentration von 100 mM zu erhalten. Dann wurde ein Trockeneis in einer Menge von 1 g pro 10 ml des Lumineszenzreagens zugegeben und das Trockeneis wurde vollständig verdampft. Als Stabilisator für Luciferase wurde Glycerol zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1% erhalten wurde, und das Gemisch wurde gut gemischt, um eine Lumineszenzlösung zu erzeugen.

[0024] 10 µl einer Enzymlösung, die 100 ng/ml Luciferase enthielt, wurde auf eine Messküvette für ein Luminometer („LB9506", bezogen von Berthold) gegeben. Dann wurden 100 µl der oben erzeugten Lumineszenzlösung zugegeben und die Küvette wurde sofort auf das Luminometer gesetzt. Direkt nach Zugabe des Reagens (0 Minuten) bis zu Verstreichen von 7 Sunden (420 Minuten) wurden Lumineszenz-Einheiten im zeitlichen Verlauf gemessen. Bei der Lumineszenzreaktion mittels des obigen Lumineszenzreagens wurde die Lumineszenz-Einheit (RLU/s) bei einem in etwa konstanten Wert 5 Minuten nach Start stabilisiert, wenngleich die Lumineszenz-Einheit in zunehmender Richtung war. 30 Minuten ab Start erreichte die Lumineszenz-Einheit ihren Spitzenwert und wurde dann allmählich gedämpft. Danach kam die Lumineszenz-Einheit zwei Stunden nach Start auf 50% der maximalen Lumineszenz-Einheit, so dass sie eine Halbwertszeit erreichte.

[0025] Bei Verdünnen der Luciferase-Enzymlösung und Zugabe der verdünnten Lösung in dem Bereich von 10 ng (10^{-9}g) auf 1 fg (10^{-15}g) wurden ferner 10 fg Luciferase-Enzym in der obigen Lumineszenzlösung nachgewiesen.

[0026] Weiterhin wurde die erzeugte Lumineszenzlösung dreimal gefroren und aufgetaut. Es wurde nahezu keine Abnahme einer Lumineszenz-Aktivität beobachtet. Die erzeugte Lumineszenzlösung wies nach einmonatiger Lagerung bei 4°C keine Abnahme der Aktivität auf.

Beispiel 2

[0027] Auf 10 ml eines Luciferase-Nachweisreagens des „Pica Gene Luminescence Kit" (Produktnr. „PGL100", bezogen von TOYO INK MFG. Co., LTD), wurde eine Citronensäure-Pufferlösung, deren pH-Wert auf 6,3 eingestellt war, zugegeben, um eine Endkonzentration von 100 mM zu erhalten. Dann wurde ein Trockeneis in einer Menge von 1 g pro 10 ml des Lumineszenzreagens zugegeben und das Trockeneis wurde vollständig verdampft. Als Stabilisator für Luciferase wurde Glycerol zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1% erhalten wurde, und das Gemisch wurde gut gemischt, um eine Lumineszenzlösung zu erzeugen.

[0028] 10 µl einer Enzymlösung, die 100 ng/ml Luciferase enthielt, wurde auf eine Messküvette für ein Luminometer („LB9506", bezogen von Berthold) gegeben. Dann wurden 100 µl der oben erzeugten Lumineszenzlösung zugegeben und die Küvette wurde sofort auf das Luminometer gesetzt. Direkt nach Zugabe des Reagens (0 Minuten) bis zu Verstreichen von 7 Stunden (420 Minuten) wurden Lumineszenz-Einheiten im zeitli-

chen Verlauf gemessen. Bei der Lumineszenzreaktion mittels des obigen Lumineszenzreagens wurde die Lumineszenz-Einheit (RLU/s) bei einem in etwa konstanten Wert 10 Minuten nach Start stabilisiert. 60 Minuten ab Start erreichte die Lumineszenz-Einheit ihren Spitzenwert und wurde dann allmählich gedämpft. Selbst nach 7 Stunden wurde die Lumineszenz-Einheit noch bei 67% der maximalen Lumineszenz-Einheit gehalten.

[0029] Bei Verdünnen der Luciferase-Enzymlösung und Zugabe der verdünnten Lösung in dem Bereich von 10 ng auf 1 fg wurden ferner 100 fg Luciferase-Enzym in der obigen Lumineszenzlösung nachgewiesen.

[0030] Weiterhin wurde die erzeugte Lumineszenzlösung dreimal gefroren und aufgetaut. Es wurde nahezu keine Abnahme einer Lumineszenz-Aktivität beobachtet. Die erzeugte Lumineszenzlösung wies nach einmonatiger Lagerung bei 4°C keine Abnahme der Aktivität auf.

Beispiel 3

[0031] Auf 10 ml eines Luciferase-Nachweisreagens des „Pica Gene Luminescence Kit" (Produktnr. „PGL100", bezogen von TOYO INK MFG. Co., LTD), wurde eine GTA-Pufferlösung, deren pH-Wert auf 6,7 eingestellt war, zugegeben, um eine Endkonzentration von 100 mM zu erhalten. Dann wurde ein Kohlendioxidgas mit einem Gaseinleitungsrohr bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 20 ml/min etwa 3 Minuten lang in die Reagenslösung eingeleitet, während es leicht perlte. Als Stabilisator für Luciferase wurde Glycerol zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1% erhalten wurde, und das Gemisch wurde gut gemischt, um eine Lumineszenzlösung zu erzeugen.

[0032] 10 µl einer Enzymlösung, die 100 ng/ml Luciferase enthielt, wurde auf eine Messküvette für ein Luminometer („LB9506", bezogen von Berthold) gegeben. Dann wurden 100 µl der oben erzeugten Lumineszenzlösung zugegeben und die Küvette wurde sofort auf das Luminometer gesetzt. Direkt nach Zugabe des Reagens (0 Minuten) bis zu Verstreichen von 7 Stunden (420 Minuten) wurden Lumineszenz-Einheiten im zeitlichen Verlauf gemessen. Bei der Lumineszenzreaktion mittels des obigen Lumineszenzreagens wurde die Lumineszenz-Einheit (RLU/s) bei einem in etwa konstanten Wert 5 Minuten nach Start stabilisiert, wenngleich die Lumineszenz-Einheit in zunehmender Richtung war. 30 Minuten ab Start erreichte die Lumineszenz-Einheit ihren Spitzenwert und wurde dann allmählich gedämpft. Danach kam die Lumineszenz-Einheit zwei Stunden nach Start auf 50% der maximalen Lumineszenz-Einheit, so dass sie eine Halbwertszeit erreichte.

[0033] Bei Verdünnen der Luciferase-Enzymlösung und Zugabe der verdünnten Lösung in dem Bereich von 10 ng auf 1 fg wurden ferner 10 fg Luciferase-Enzym in der obigen Lumineszenzlösung nachgewiesen.

[0034] Weiterhin wurde die erzeugte Luminneszenzlösung dreimal gefroren und aufgetaut. Es wurde nahezu keine Abnahme einer Lumineszenz-Aktivität beobachtet. Die erzeugte Lumineszenzlösung wies nach einmonatiger Lagerung bei 4°C keine Abnahme der Aktivität auf.

Vergleichsbeispiel 1

[0035] 10 µl einer Enzymlösung, die 100 ng/ml Luciferase enthielt, wurde auf eine Messküvette für ein Luminometer („LB9506", bezogen von Berthold) gegeben. „Pica Gene Luminescence Kit" (Produktnr. „PGL100", bezogen von TOYO INK MFG. Co., LTD) wurde als herkömmliches Lumineszenzreagens erzeugt. 100 µl des erzeugten Reagens wurden auf die Küvette gegeben. Die Küvette wurde sofort auf das Luminometer gesetzt. Direkt nach Zugabe des Reagens (0 Minuten) bis zu Verstreichen von 7 Stunden (420 Minuten) wurden Lumineszenz-Einheiten im zeitlichen Verlauf gemessen. Ab Start der Lumineszenzreaktion wurden sehr hohe Lumineszenz-Einheiten erhalten. Die Lumineszenz-Einheit erreichte aber nach etwa 5 Minuten eine Halbwertszeit. 2 Stunden ab Start der Reaktion war die Lumineszenz-Einheit auf 1,4% der maximalen Lumineszenz-Einheit (RLU/s) gesunken. Ferner war sie 7 Stunden ab Start auf 0,7% der maximalen Lumineszenz-Einheit (RLU/s) gesunken. Nach dreimaligen Einfrieren und Auftauen der erzeugten Lumineszenzlösung war die Lumineszenz-Aktivität auf 90% gesunken. Nach einmonatiger Lagerung bei 4°C war die Aktivität der Lumineszenzlösung auf 10% oder weniger gesunken.

[0036] Tabelle 1 zeigt die Messergebnisse der Beispiele und des Vergleichsbeispiels. Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt gegenüber dem herkömmlichen Verfahren ausgezeichnete Ergebnisse bei der Kontinuität und Stabilität der Lumineszenz.

Tabelle 1

	Änderungen der Lumineszenz-Einheit im zeitlichen Verlauf und Beibehaltungsverhältnisse der Lumineszenz-Einheit			
Verstrichene Stunden	Vergleichsbeispiel 1	Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3
0 Stunden	2.270.882	698.851	44.725	701.274
	100%	100%	100%	100%
0,5 Stunden	689.060	716.254	42.541	712.527
	30,3%	102,5%	95,1%	101,6%
1 Stunde	149.067	581.821	42.839	582.496
	6,6%	83,3%	95,8%	83,1%
2 Stunden	31.283	357.833	40.710	358.285
	1,4%	51,2%	91,0%	51,1%
3 Stunden	17.178	200.816	38.503	201.224
	0,8%	28.7%	86,1%	28,7%
5 Stunden	7.433	79.764	33.771	80.012
	0,3%	11,4%	75,5%	11,4%
8 Stunden	3.953	38.641	28.940	38.851
	0,2%	5,5%	64,7%	5,5%

Hinweis: 100 µl jedes Lumineszenz-Reagens wurden auf 1 ng/10 µl einer Luciferase-Lösung zugegeben, Lumineszenz-Einheiten wurden direkt nach Reaktionsstart mit einem Luminometer („LB9506", bezogen von Berthold) gemessen, um eine relative Lumineszenz-Einheit pro Zeiteinheit Sekunde zu messen.

Gewerbliche Eignung

[0037] Wenn die erfindungsgemäß erzeugte Lumineszenzlösung verwendet wird, wird die Lumineszenzstabilität verglichen mit einer herkömmlichen Lumineszenzlösung mit einer Halbwertszeit der Lumineszenz von 5 Minuten beträchtlich verbessert. Bei Verwendung der Lumineszenzlösung mit einem hohen pH-Wert wird die Halbwertszeit um das 20fache oder mehr bei einer Nachweisempfindlichkeit von 10 fg erhöht. Bei Verwendung der Lumineszenzlösung mit einem niedrigen pH-Wert wird die Halbwertszeit um das 90fache oder mehr bei einer Nachweisempfindlichkeit von 100 fg erhöht.

[0038] Wie vorstehend beschrieben wird erfindungsgemäß ein Lumineszenzmessverfahren an die Hand gegeben, das anstelle des herkömmlichen Luciferase-Lumineszenzmessverfahrens bezüglich Kontinuität und Stabilität ausgezeichnet ist, wobei das Verfahren durch Schnelligkeit und hohe Empfindlichkeit gekennzeichnet ist.

Patentansprüche

1. Verfahren für das Stabilisieren der Lumineszenzreaktion zwischen Luciferin und Luciferase, welches die Zugabe von Kohlendioxid zu einer Luciferin enthaltenden Lösung und in Kontakt bringen der Lösung mit Luciferase umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kohlendioxid in Form von Trockeneis

zugegeben wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kohlendioxid in Form von Kohlendioxidgas zugegeben wird.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Lösung von 5,0 bis 8,5 reicht.

5. Zur Verwendung als Luciferase-Nachweisreagens geeignete Lösung, welche durch Zugabe von Kohlendioxid zu einer Luciferin enthaltenden Lösung erhalten werden kann.

6. Luciferase-Nachweisreagens, welches Luciferin und eine Lösung, der Kohlendioxid zugegeben wurde, umfasst.

7. Reagens nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung in gefrorener Form ist.

8. Zur Verwendung bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 geeignetes Kit, welches umfasst:
(a) eine gefriergetrocknete Lösung von Luciferin und
(b) eine Lösung, der Kohlendioxid zugegeben wurde.

9. Kit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponente (a) weiterhin ATP und CoA umfasst und die Komponente (b) weiterhin Magnesiumionen und eine Pufferlösung umfasst.

10. Kit nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass Komponente (b) gefroren ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen