



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** av Nr. 164320

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁸ G 01 N 33/543, 33/558

(21) Patentsøknad nr.	845085	(86) Internasjonal søknad nr.	-
(22) Inngivelsesdag	18.12.84	(86) Internasjonal inngivelsesdag	-
(24) Løpedag	18.12.84	(85) Videreføringsdag	-
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.		(41) Alment tilgjengelig fra	20.06.85
		(44) Utlegningsdag	11.06.90
(71)(73) Søker/Patenthaver	DAIICHI PURE CHEMICALS CO. LTD., 13-5, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo, JP.	(72) Oppfinner	mitsugu HIBINO, Sumida-ku, Tokyo, TAIRA KANADA, Sumida-ku, Tokyo, MIYOSHI HIRATA, Sumida-ku, Tokyo, JP.

(74) Fullmektig Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 19.12.83, JP, nr. 239549/83,
08.05.84, JP, nr. 91379/84.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **IMMUNANALYSEMETODE.**

(57) Sammendrag

En komponent av en prøve kan påvises eller måles kvantitativt ved en immunreaksjon, ved at et målsubstans-immunreaktivt reagens merket med et markør-reaksjonsprodukt og/eller eventuelt gjenværende, ureagert immunreaktivt reagens bringes til å bevege seg mens man benytter seg av kapillaritet, reaksjonsproduktet eller eventuelt gjenværende, ureagert immunreaktivt reagens bringes til å kombinere seg med en substans som er pakket i et kapillarrør, og immobiliseres på en bærer og tilpasses til opptak av merket substans for å immobilisere reaksjonsproduktet eller eventuelt gjenværende, ureagert immunreaktivt reagens, og å måle mengden av den således immobiliserte merkede substans. Siden alle reagensene fylles i kapillarrøret, er det ikke brytsomt at reagensene må fremstilles og/eller noen ekstra reagenser må forkastes etter at målingen er utført. Immunanalysen kan utføres ved sengen i sykehus. En ekstremt liten mengde av prøven kan være tilstrekkelig for måling av den. Etter målingen kan kapillarrøret bli lagret slik det er eller kastes vekk med letthet.

(56) Anførte publikasjoner Europeisk (EP) patentsøknad, publ.nr. 103426, 21214,
USA (US) patent nr. 4361537.

Oppfinnelsen vedrører en immunoanalysemetode for å påvise eller kvantitativt å måle en komponent i en prøve ved en immunreaksjon.

Konvensjonelle immunanalyseteknikker anvender antigener som er merket med radioaktiv substans, enzym, fluorogene substanser eller lignende, eller antistoffer merket med radioaktive substanser, enzym, fluorogene substanser eller lignende. De merkede substanser ble da utsatt for immunreaksjoner med antistoffer eller antigener i en prøve. De immunreagerte merkede substanser ble så påvist eller kvantifisert ved påvisning eller kvantifisering av sine merkinger, dvs. radioisotoper, enzymer, fluorescerende substanser eller lignende.

Det er nødvendig ved disse konvensjonelle immunanalyseteknikker å skille de reagerte merkede eller umerkede substanser og deres tilsvarende ureagerte merkede eller umerkede substanser fra hverandre, i den hensikt å definere kvalitet eller kvantitet av det søkte antigen eller antistoff. Således var disse konvensjonelle teknikker ledsaget av slike ulemper at de krever brysomme operasjoner, erfaren arbeidskraft og tidkrevende trinn for den ovennevnte separasjon.

Vi har derfor utført et uttømmende forskningsarbeid med henblikk på å løse slike problemer ved de konvensjonelle teknikker. Som resultat er det funnet at en komponent som er til stede i en prøve lett kan påvises eller til og med måles kvantitativt i et kort tidsrom ved at den markørmerkede substans med eller uten immunreaksjon med komponenten i en prøve bringes til å bevege seg fra én sone og deretter å ta den opp og immobilisere dem selektivt i forskjellige soner i kapillarrøret mens man gjør bruk av kapillariteten eller lignende, såvel som å anvende en immobiliserende og absorberende substans for den merkede substans.

Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen en immunoanalysemetode for påvisning eller kvantitativ måling av en komponent i en prøve ved en immunreaksjon, som består av: i) å pakke i ett kapillarrør minst to faste matrikser, nemlig a) en immobilisert bærer med en merket immunreaktiv reagens festet til seg, og (b) en immobilisert bærer med en merket, for ikke-omsatt reagens opptagende substans, festet til seg. Denne immunoanalysemetode er karakterisert ved følgende 3 punkter:

164320

2

- ii) en løsning av prøven trekkes inn i kapillarrøret for utførelse av immunreaksjonen, og reaksjonsblandingen får vandre automatisk ved kapillarvirkning,
- iii) det følgende produkt eller reagens immobiliseres: (c) et immunreaksjonsprodukt mellom det merkede immunreaktive reagens og komponenten i prøven, og eventuelt (d) det ikke-omsatte, merkede immunreaktive reagens med den immobiliserte, merkede, opptagende substans, og
- iv) mengden av den således immobiliserte merkede substans måles.

Ved det at immunoanalysen i henhold til oppfinnelsen utføres i ett kapillarrør, tilveiebringes de følgende fordeler:

(1) Siden alle reagensene fylles i ett kapillarrør, er det ikke brysomt at reagensene må fremstilles og/eller ekstra reagenser må forkastes etter at målingen er utført, slik det forekommer i konvensjonelle teknikker.

(2) Det er mulig å påvise eller kvantitativt måle målkomponenten i prøven bare ved å dyppe den nedre ende av kapillarrøret i en løsning av prøven. Denne prosess er overordentlig enkel, og enhver kan således utføre målingen av målkomponenten uten behov for trenet personell. Videre krever denne måling ikke noen ytterligere innretninger eller hjelpemidler og kan utføres i et svært kort tidsrom.

(3) Derfor kan målingen utføres ved sengen i et hospital.

(4) En ekstremt liten mengde av hver prøve kan være tilstrekkelig til målingen. For måling av blodkomponenter for eksempel er det bare nødvendig å gjennomhulle en øreflipp, bringe den nedre ende av et kapillarrør i kontakt med den stukne del og deretter suge blodet inn i kapillarrøret.

(5) Etter målingen kan kapillarrøret lagres slik det er eller kan lett kastes.

Oppfinnelsens gjenstand, karakteristiske trekk og fordeler vil fremgå tydelig av den følgende beskrivelse og patentkravet, sett i forbindelse med de ledsagende tegninger, hvor:

Figur 1 til figur 16 illustrerer kapillarrør som er anvendelige ved måling i forbindelse med oppfinnelsen

Eksempelvis er antigene komponenter som er til stede i prøver, dvs. de komponenter som skal måles i overensstemmelse med

oppfinnelsen, slike som inneholdes i organismebestanddeler, for eksempel immunoglobulin, Bence-Jones-protein, α_1 -antichymotrypsin, α_1 -antitrypsin, α_1 -mikroglobulin, α_2 -mikroglobulin, β_2 -mikroglobulin, haptoglobin, ferritin, transferrin, ceruloplasmin, antitrombin III, myoglobin, myosin-lett-kjede, cryoglobulin, calmodulin, prealbumin, albumin, transcortin, tyroksin-bindende proteiner, retinol-bindende proteiner, hemopexin, fibronectin, spesifikt pregnant-glykoprotein (SPI), og så videre; enzymer inklusive GOT, GPT, ALP, ACP, LDH, γ -GTP, kreatin-kinase, LAP, amylase, makroamylase, cholin-esterase, aldolase, MAO, 5'-nukleotidase, syre-fosfatase, OCT, pankreas-lipase, plasminogen-aktivator, katalase, L-CAT, lipoprotein-lipase, fosfolipase A, DNase, RNase, terminal transferase, pepsin, trypsinogen, chymotrypsin, enterokinase, aminopeptidase, peroksidase, enolase, tyrosin-hydroksylase, dopa-dekarboksylase, dopamin- β -hydroksylase etc.; karbohydrater inklusive sure mukopolysakkarider, inulin, gangliosid, mukopolysakkarider og så videre; lipider, for eksempel kolesterol, lipoproteiner, apolipoproteiner, triglycerid, fri fettsyrer, fosfolipider, gallesyre, peroksydlipider osv.; vitaminer inklusive vitamin A, D, E og K, ubikinon, tiamin, riboflavin, vitamin B₆, nikotinsyre, folinsyre, vitamin B₁₂, askorbinsyre, inositol osv.; koaguleringsfaktorer inklusive fibrinogen, FDP, plasminogen, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor XI, Faktor XII, protromboplastin-faktor, Faktor III, Faktor V, Faktor VII, Faktor X, protrombin, β -tromboglobulin, C₁-inhibitor, β_2 -makroglobulin, α_2 -plasmin-inhibitor, blodplate-faktor 4, blodplate-membran-protein, protein C osv.; pituitære sekresjons-substanser, f.eks. veksthormon (somatotropin), somatomedin, luteiniserende hormon, follikel-stimulerende hormon, adrenocorticotropisk hormon (ASTH), LPH, MSH, β -endorfin, enkefalin, tyrotropisk hormon, prolaktin, vasopressin, neurofysin, oksytocin og lignende; tyroidkjertelsekresjonssubstanser, for eksempel T₄, total-tyroksin, fri tyroksin-indeks, fritt tyroksin, trijodotyronin, revers-T₃, langvarig tyroid-stimulerende hormon, calcitonin, tyroglobulin og lignende; adrenal-medulla og sympatiske sekresjonssubstanser inklusive katekol-amin, metanefrin, normetanefrin, vanillylmandelsyre, homovanillinsyre, 3,4-dihydroksyfenylalanin, 3,4-dihydroksyfenyleddiksyre, 3-metoksy-4-hydroksyfenyletylenglykol, dopamin- β -hydroksylase osv.; adrenal-

cortex-sekresjonssubstanser, f.eks. aldosteron, 11-deoksykorticosteron, corticosteron, 18-hydroksycorticosteron, cortisol, 11-deoksykortisol, 11-hydroksycorticosteroid, 17-hydroksy-C₂₁-steroid, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteron-sulfat, androstendion, 17-ketosteroid, osv.; germinal-kjertel og placenta-ekskresjonssubstanser, for eksempel testosteron, 5 α -dihydrotestosteron, androstendion, estron, estradiol, estriol, estetrol, katekol-estrodien, progesteron, pregnandiol, 17 α -hydroksyprogesteron, pregnantriol, chorionisk gonadotropin, placentar-laktogen og lignende; pankreas- og fordøyelsessekresjonssubstanser, inklusive insulin, proinsulin, C-peptid, pankreatisk glukagon, gastrin, sekretin, CCK-PZ, Motilyn, enteroglykagon, pankreatiske polypeptider, somatostatin, substans P, neurotensin etc.; antigener anvendt i syphitis-tester og immunoserologiske tester av patogene mikroorganismer; virus, f.eks. anti-mykoplasma-antistoff, rickettsia, anti-streptolysin O, anti-streptokinase, anti-deoksy-ribonukleokinase B, hypes simplex virus, varicella og herpes zoster virus, cytomegalovirus, EB-virus-antistoff, adenovirus, influensavirus A og B, influensavirus C, parainfluenza-virus, RS-virus, kuskavirus, meslingvirus, rubella-virus, japansk encefalitisk virus, polio-virus, hepatitis-virus A, hepatitis-virus B, hepatitis-virus S, E, C, non-A og non-B, rhinovirus, coronavirus, utvortes infektøse sykdommer, rabies, kuma, coxsacke-virus, chlamydia, Rota-virus etc.; auto-antistoffer, for eksempel antinukleært antistoff, anti-DNA-antistoff, anti-ENA-antistoff, reumatoid-faktor, antiglobulin, LE-celler, anti-mitochondria, anti-glattmuskel-antistoff, anti-magevegg-antistoff, anti-innvortes faktor-antistoff, anti-kryss-stripet-muskel-antistoff, anti-hjertermuskel-antistoff, anti-adrenal cortex-antistoff, anti-tyroglobulin-antistoff, anti-tyroid-mikrosom-antistoff, antiinsulin-antistoff, antiinsulin-receptor-antistoff, antiacetylcholin-reseptor-antistoff etc.; cellesubstanser inklusive β IE-globulin, komplementer som for eksempel C_{1q}, C_{1r}, C_{1s}, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ og lignende, T-celler, B-celler, makrofag og så videre; tumor-markører, for eksempel carcinoembryoniske antigener, α -fetoprotein, basisfetoprotein, ferritin, iso-ferritin, polyaminer, CRP, immunoeddiksyre-protein (IAP), pankreoembryoniske antigener (POA),

dødsfaktor, osv.; droger inklusive fenobarbital, primidon, fenytoin, karbamazepin, valproinsyre, lidokain-hydroklorid, digoxin, digitoxin, teofillin, deisopyramid, mexiretin, propranolol-hydroklorid, diuretika, syntetisk-steroid-midler, kloramfenikol-droger, aminoglykosid-droger, antituberkulose-droger, metotrexat, opiat, metadon, barbital, amfetamin, kokain-metabolitter, benzodiazopin-metabolitter, protoksyfen, fencyklidin, cannabinoid osv.: renin/angiotenis-HCAs inklusive renin, angiotensinogen, angiotensin I, II og III, angiotensin-konverterende enzymer, kinin, kininogen, plasma-kallikrein, glandular-kallikrein og lignende; antigener for blodgruppetester og blodforlikelighetstester: osv.; og antistoffer for de ovennevnte antigener.

Som antigen typer er det, ved siden av immunoglobulin, og dets modifiserte $F(ab')_2$, Fab' , Fab , osv. De kan fremstilles ved metoder som er kjent i og for seg på fagområdet [se "Immunology-1", The Nakayama Publishing Co., Ltd. (1981)]. Dette gjelder også monoklonale antistoffer.

Illustrerende for den faste amorf, sfæriske, polygonale eller fibrøse matrise inkluderer makromolekulære proteiner; uorganiske materialer, f.eks. glass, asbest, sten, slam, gull, sølv og legeringer; syntetiske harpikser så som polystyren, polyetylen, silisiumdioksyd, fenolharpiks, akrylharpiks, cellulose, uretanharpiks, polyvinylalkohol, vinylkloridharpiks, polyvinylidenklorid, polypropylen, polytereftalat, polykarbonat, nylon, fluorkarbonharpiks og polyesterperler; og fibermatrise så som cellulose, bomull, hamp, halm, ull, silke, glassfibere, nylonfibere, Vinylon[®]-fibere, akrylfibere, polyetylenfibere og polyesterfibere. Diameterne på de sfæriske kuler kan fortrinnsvis variere fra 0,05 til 0,3 mm eller spesielt fra 0,1 til 0,17 mm. På den annen side er de polygonale perler fortrinnsvis 40-100 mesh eller typisk 80-150 mesh. For fibrenes vedkommende kan deres diameter fortrinnsvis variere fra 1 mikrometer til 0,3 mm eller spesielt fra 0,01 til 0,08 mm.

Immunreaktive reagenser som skal merkes med markører inkluderer antigener som reagerer med antistoffer i prøver eller antistoffer mot antigener i prøver, eller antigener eller antistoffer som er nyttige i konkurrerende reaksjoner med antigen eller antistoffer som er til stede i prøver. Eksempler på markingsmidler kan omfatte radioisotoper, f.eks. jod-isotoper (for

eksempel ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , tritium og lignende; enzymer som for eksempel peroksidase, alkali-fosfatase, diaforase, β -D-galaktosidase, glukose-oksidase, penicillinase og så videre; eller fluorescerende substanser, for eksempel fluorescerende isocyanat, fluorescerende isotiocyanat, Rhodaminer osv. Metoder som er kjent i og for seg på området kan følges for å merke de ovenfor beskrevne antigener eller antistoffer med disse merkningsmidler["RADIOIMMUNOASSAY, Second Series", The Kodansha Scientific Publishing Co., Ltd. (1979); J. Histo. Chem. Cytochem. 22, 1084 (1974); Immunochemistry, 6, 43 (1969); *ibid.*, 8, 871 (1971); J. Biochem. 78, 235 (1975); "FLUORESCENT ANTI-BODY METHODS", Academic Press].

Enhver substans kan anvendes som opptakssubstans når bare substansen vil kombinere seg eller fange opp nedenfor beskrevne immunreagerte merkede substanser eller ikke-immunreagerte merkede substanser. Eksempler på slike substanser er: hvis målsubstansen er antigen, så er antistoff mot antigenet, hvis målsubstansen er antistoff, så er antigen som reagerer med antistoffet, og substanser som har affinitet overfor merkingen. For å immobilisere innfangningssubstansen på fast matriks vil enten i-boende adsorpsjonsevne hos opptakssubstansen overfor den faste matriks eller en eller annen veletablert metode for et slikt formål bli anvendt. Eksempler på slike opptakssubstanser er: glassperler som er behandlet for å absorbere basiske aminosyrer eller lignende, eller glassperler på hvilke tverrbindingsmiddel er koblet. Glutaraldehyd, maleimid eller lignende kan anvendes som tverrbindingsmiddel. Således behandlede perler kompleksdannes deretter med opptakssubstansen for de merkede substanser. Hvis cellulose eller lignende anvendes som matriks, behandles cellulosen eller lignende med et oksydasjonsmiddel, for eksempel ferriperkromat, kaliumperjodat eller natriumperjodat som forårsaker at overflaten av cellulose danner aldehyd-derivater som så vil danne Schiff-basen med aminogrupper i opptakssubstansen, hvilket resulterer i immobilisering av opptakssubstansen til matrisen.

Som én utførelsesform av oppfinnelsen kan det nevnes at et kapillarrør pakkes med merket substans og uløselig matriks som kobles med opptakssubstansen som vil immobilisere den merkede substans. Spissen av således fremstilt kapillarrør bringes

deretter i kontakt med en prøvevæske som inneholder målsubstans, hvorved væsken bringes til å migrere oppad gjennom innsiden av kapillarrøret ved kapillarvirkning. Etter hvert som væsken migrerer oppad i kapillarrøret, når målsubstansen er lik den merkede substans, vil målsubstansen og den merkede substans sammen fortsette å migrere oppad inne i kapillarrøret inntil væsken møter opptakssubstansen som immobiliseres på den faste matriks. Ved det tidspunkt da de møtes vil målsubstansen og den merkede substans bli oppfanget av opptakssubstansen på den faste matriks i en mengde som er proporsjonal med konsentrasjonene av målsubstansen og den merkede substans. Mengden av den merkede substans som er oppfanget av opptakssubstansen vil reflektere konsentrasjonen av målsubstansen i prøvevæsken. Som en annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse kan det også nevnes at et kapillarrør pakkes med merket substans som reagerer med målsubstansen og med den uløselige matriks på hvilken opptakssubstansen som vil immobilisere målsubstansen er kompleksdannet. Spissen av således fremstilt kapillarrør bringes deretter i kontakt med en prøvevæske som inneholder målsubstans, hvorved væsken bringes til å migrere oppad gjennom det innvendige av kapillarrøret ved kapillarvirkning. Etter hvert som væsken migrerer oppad i kapillarrøret, når målsubstansen er reaktiv med den merkede substans, vil målsubstansen danne kompleks og komplekset såvel som ureagert målsubstans, ureagert merket substans og andre ureaktive substanser som inneholdes i prøvevæsken fortsette å migrere oppad sammen på innsiden av kapillarrøret inntil væsken treffer på opptakssubstansen for målsubstansen som var immobilisert på den faste matriks. På tidspunktet for møtet vil den ureagerte målsubstans og den merkede substans som er i komplekset med målsubstansen bli oppfanget av oppfangningsmidlet på den faste matriks i en mengde som er proporsjonal med konsentrasjonene av den ureagerte målsubstans og den merkede substans som er i kompleks med målsubstansen i væsken ved punktet for møtet med oppfangningsmidlet. Mengden av den merkede substans som er oppfanget av opptakssubstansen vil reflektere konsentrasjonen av målsubstansen i prøvevæsken.

For ovennevnte metode er det nødvendig, etter behov, å tilveiebringe annet enn hva som er nevnt ovenfor, fast partikkelformig matriks for å fylle tomrom, substrat, kromogent middel,

inhibitor og lignende. Som substrat og kromogent middel kan følgende kombinasjoner (substrat:kromogent middel) anvendes for sine respektive enzymer som merking: peroksidase [hydrogenperoksyd : o-dianisidin, o-tolidin, 4-klor-1-naftol, 2,2'-azino-e-etylbenzotiazolin-sulfonat (ABTS), 3-amino-9-etylkarbazol, 2,7-fluorendiamin, 3-metyl-2-benzotiazolinon-hydrozon (MBTH) eller tyramin]; og alkalifosfatase [p-nitrofenolfosforsyre eller 4-metylbunelliferylfosforsyre : 4-aminoantipyrin]; β -D-galaktosidase [o-nitrofenol : β -D-galaktosid eller 4-metylbunelliferyl : β -D-galaktosid]. I den hensikt å utføre ovennevnte metode er det nødvendig at en fast matriks anbringes sammen med det merkede immunreaktive reagens, substrat, kromogent middel, inhibitor og lignende på den. Det er nødvendig da å blande den faste matriks med en vandig eller alkoholisk løsning av det merkede immunreaktive reagens osv., og deretter å tørke den resulterende blanding slik at reagenset osv. vil feste seg på overflaten av den faste matriks.

Ved den her beskrevne fremgangsmåte pakkes det i et kapillarrør en fast matriks med en opptakssubstans som er immobilisert på denne for sin tilsvarende merkede substans og en fast matriks som holder et merket immunreaktivt reagens på seg, og om nødvendig en fast matriks som bærer et substrat, kromogent middel, inhibitor og lignende, som alle er blitt fremstilt ved den ovenfor beskrevne måte.

Kapillarrøret kan være laget av glass, eller enten transparent eller gjennomskinnelig syntetisk harpiks, for eksempel polyetylen, polykarbonat, polypropylen, polystyren, akrylfталat-harpiks eller lignende. Diameteren på hvert kapillarrør kan fortrinnsvis være 0,5-2 mm eller særlig 1,0-1,1 mm, mens dets lengde fortrinnsvis kan være 3-20 cm eller spesielt 5-15 cm. Det er viktig at innerveggen av kapillarrøret adsorberer noe protein på seg. Det foretrekkes således å behandle på forhånd innerveggen til kapillarrøret, for eksempel med en nøytral pufferløsning av et protein (for eksempel albumin eller lignende).

I den hensikt å pakke kapillarrøret med den faste matriks som bærer opptakssubstansen som er immobilisert på den for den merkede substans såvel som med den reagensholdige faste matriks, er det nødvendig å lukke den nedre ende av kapillarrøret med en

plugg av bomull, polyester eller lignende, og deretter å etablere et negativt trykk inne i kapillarrøret ved hjelp av en sugeinnretning, for eksempel aspirator, hvorved suging og pakking av den faste matriks i kapillarrøret foregår. Det er nødvendig å pakke kapillarrøret med minst den faste matriks som bærer opptakssubstansen som er immobilisert på den for den merkede substans og den faste matriks som holder det merkede immunreaktive reagens på seg. Om nødvendig kan kapillarrøret i tillegg være pakket med den faste matriks som holder substratet, det kromogene middel, inhibitoren og lignende som er festet på den. Det er nødvendig å pakke den faste matriks med opptakssubstansen immobilisert på denne for den merkede substans på en slik måte at prøven når den faste matriks etter at prøven er blitt utsatt for immunreaksjonen. Dette kan oppnås ved å pakke kapillarrøret med matriks som bærer en opptakssubstans som har evne til å kombinere seg med enten immunreaksjonsproduktet med det merkede reagens eller det ureagerte merkede reagens for å immobilisere den merkede substans enten som reaksjonsproduktet eller som det ureagerte immunreaktive reagens. Alternativt kan man pakke et kapillarrør med én matriks som bærer en opptakssubstans som immobiliserer enten immunreaksjonsproduktet med merket reagens eller det ureagerte merkede reagens og en annen matriks som bærer en opptakssubstans som immobiliserer både immunreaksjonsproduktet med merket reagens og det ureagerte merkede reagens separat ved en annen lokalisering slik at prøven når førstnevnte først og sistnevnte senere og da vil separere immunreaksjonsproduktet med merket reagens fra det samme av det ureagerte merkede reagens. Det er også av og til nødvendig å pakke den faste matriks som bærer opptakssubstansen som er immobilisert på denne for den merkede substans og den faste matriks som holder på seg det merkede immunreaktive reagens, substratet, det kromogene middel, inhibitoren og lignende, på en slik måte at de isoleres fra hverandre. For å sikre denne isolasjon kan en fast matriks anvendes.

Ved foreliggende oppfinnelse kan følgende grunnleggende pakkerekkefølger følges for å pakke en inert matriks som bærer en opptakssubstans som er immobilisert på den for en merket substans og en annen inert matriks som holder på seg et merket og immunreaktivt reagens hvor målkomponenten i en prøve er et

164320

10

antigen.

- (a) merket antistoff - immobilisert antigen;
- (b) merket antigen - immobilisert antistoff;
- (c) merket antistoff - immobilisert antistoff;
- (d) merket antistoff - immobilisert antistoff
(første) - merket antigen - immobilisert antistoff
(annet);
- (e) merket antistoff - immobilisert antistoff -
immobilisert antigen;
- (f) merket antistoff - immobilisert antistoff -
immobilisert anti-merking-antistoff;
- (g) merket antistoff - (immobilisert antistoff +
merket hjelpesubstans) - (immobilisert anti-merking-
antistoff + merket hjelpesubstans; og
- (h) immobilisert antistoff.

I tillegg kan disse kapillarrør (a) - (h) bli kombinert på passende måte.

I den hensikt å påvise eller kvantitativt å måle en målkomponent i en prøve ved å anvende det således fremstilte måle-kapillarrør er det nødvendig å dyppe den nedre ende av måle-kapillarrøret i en løsning av prøven for å bevirke at løsningen trekkes opp i kapillarrøret ved kapillarvirkning. Hvis målkomponenten i prøven her er et antigen, vil reaksjoner som for eksempel slike som skal omtales i det følgende, finne sted for å immobilisere den merkede substans.

Kapillarrør (a)

Antigenet i prøven reagerer først med det merkede antistoff slik at det antigen-merkede antistoff dannes. Dette antigen-merkede antistoff og det gjenværende, ureagerte, merkede antistoff bringes deretter til å bevege seg oppad kapillarrøret. Ved kontakt med det immobiliserte antigen reagerer det ureagerte merkede antistoff med det immobiliserte antigen, hvilket resulterer i dannelse av det merkede antistoff-immobiliserte antigen slik at immobilisering oppnås.

Kapillarrør (b)

Antigenet i prøven bringes, sammen med det merkede antigen, i kontakt med det immobiliserte antistoff. Begge antigener reagerer konkurrerende, hvilket resulterer i immobilisering av det merkede antigen som det merkede antigen-immobili-

serte antistoff.

Kapillarrør (c)

Antigenet i prøven reagerer med det merkede antistoff slik at det antigen-merkede antistoff dannes. Deretter bringes det antigen-merkede antistoff og det gjenværende, ureagerte merkede antistoff til å bevege seg, hvorved de kommer i kontakt med det immobiliserte antistoff. Således reagerer det antigen-merkede antistoff med det immobiliserte antistoff, hvilket resulterer i dets immobilisering som det immobiliserte antistoff-antigen-merkede antistoff.

Kapillarrør (d)

Antigenet i prøven bringes til å reagere med det merkede antistoff og danne det antigen-merkede antistoff, som deretter bringes i kontakt med det immobiliserte antistoff (først) for å immobilisere som det immobiliserte antistoff-antigen-merkede antistoff. Også hvis antigenet i prøven er til stede i større mengder enn det merkede antistoff, reagerer overskuddet av antigen, i konkurranse med det merkede antigen, med det immobiliserte antistoff (annet) slik at det immobiliseres som det merkede antigen-immobiliserte antistoff.

Kapillarrør (e)

Antigenet i prøven reagerer med det merkede antistoff for dannelselse av det antigen-merkede antistoff, som på sin side reagerer med det immobiliserte antistoff slik at det antigen-merkede antistoff immobiliseres som det immobiliserte antistoff-antigen-merkede antistoff. På den annen side bringes eventuell ureagert del av det merkede antistoff til å bevege seg videre, hvorved det reagerer med det immobiliserte antigen slik at den ureagerte fraksjon av det merkede antistoff immobiliseres som det immobiliserte antigen-merkede antistoff.

Kapillarrør (f)

Antigenet i prøven reagerer med det merkede antistoff for dannelselse av det antigen-merkede antistoff, som deretter bringes i kontakt med det immobiliserte antistoff og immobiliserer det antigen-merkede antistoff som det immobiliserte antistoff-antigen-merkede antistoff. På den annen side bringes deretter eventuell ureagert fraksjon av det merkede antistoff og det antigen-merkede antistoff som ikke var immobilisert av det

immobiliserte antistoff, deretter til å bevege seg videre slik at de reagerer med det immobiliserte anti-merking-antistoff for å immobilisere som det immobiliserte anti-merking-antistoff-merkede antistoff og det immobiliserte anti-merking-antistoff-merkede antistoff-antigen.

Kapillarrør (g)

Antigenet i prøven reagerer med det merkede antistoff og danner det antigen-merkede antistoff, som deretter bringes i kontakt med "det immobiliserte antistoff + den merkede hjelpesubstans", derved immobilisert som "det immobiliserte antistoff + den merkede hjelpesubstans"-antigen-merkede antistoff. Videre bringes eventuell ureagert fraksjon av det merkede antistoff til å bevege seg videre slik at det reagerer med "det immobiliserte anti-merking-antistoff + den merkede hjelpesubstans", og dette resulterer i dets immobilisering som "det immobiliserte anti-merking-antistoff + hjelpe-merking-substans"-merkede antistoff. Denne metode kan påvise merkingen bare når det merkede antistoff ligger side om side med hjelpesubstansen. Betegnelsen "merket hjelpesubstans" slik den her benyttes betyr for eksempel glukose-oksidase, som produserer substratet for peroksidase fra glukose ved en enzymatisk reaksjon, NADH som ko-enzym for diaforase, en substans som er nødvendig for at luminescerende substans skal bli stimulert eller lignende.

Kapillarrør (h)

Når en prøve som består av en blanding av den merkede substans (den merkede målsubstans) og prøven suges inn, reagerer målsubstansen og den merkede substans, på konkurrerende måte, med det immobiliserte antistoff for deres immobilisering. Mengden av den merkede substans måles deretter. Denne immobiliserte mengde avtar etter hvert som konsentrasjonen av målsubstansen øker. En væske, for eksempel en fosfatpufret fysiologisk saltløsning (i det følgende forkortet "PBS") suges deretter inn i kapillarrøret. Væsken tillates å bevege seg gjennom kapillarrøret mens den ureagerte merkede substans og prøvevæsken blir vasket bort. Som resultat av dette tillates den immobiliserte merkede substans og målsubstansen å forbli i kapillarrøret.

Når en blanding av en merket substans (et antistoff som har affinitet til en målsubstans, som er blitt merket) og en

prøve suges inn i kapillarrøret (a), reagerer et kombinert produkt av målsubstansen og merket substans med det immobiliserte antistoff slik at det kombinerte produkt immobiliseres. Mengden av den således immobiliserte merkede substans øker etter hvert som konsentrasjonen av målsubstansen øker. Deretter suges også en annen væske inn i kapillarrøret. Denne annen væske passerer gjennom kapillarrøret mens en eventuell ekstra porasjon av den merkede substans og væskeprøven vaskes bort. Som resultat av dette tillates således den immobiliserte målsubstans å forbli i kapillarrøret.

Ved denne oppfinnelse kan den således immobiliserte merkede substans bli målt. Hvis merkingen er en radioisotop, kan mengden bestemmes ved hjelp av en gamma-teller mens den nedre ende derav holdes ned. Alternativt kan den del av kapillarrøret som inneholder den immobiliserte radiomerkede substans kuttes av for måling. I tilfelle av at strålingen ikke kan måles med en slik gamma-teller, foretrekkes det å måle den ved hjelp av en scintillasjonsteller. Hvis merkingsmidlet er et enzym eller en fluorescerende substans, bringes merkingsmidlet til å produsere en farve ved hjelp av et substrat eller et farveproduserende middel er fylt i kapillarrøret, eller ved hjelp av lys med en stimulerende bølglengde. Således kan mengden av den merkede substans måles. Alternativt kan substratet og det farveproduserende middel bli suget etter at væskeprøven er suget inn når merkingen er enzymer.

Ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen kan kroppsvæsker som for eksempel blod, serum, plasma, lymfe, spytt og urin såvel som avløp anvendes som væskeprøver som skal analyseres. Selv hvis en væskeprøve inneholder en eller flere komponenter som er inhibitive for den tilsiktede immunreaksjon, kan måling av den fremdeles være mulig forutsatt at slike komponenter på forhånd enten blir inaktivert, fjernet eller fortynnet til så lav konsentrasjon at enhver skadelig effekt på målingen unngås.

Oppfinnelsen skal i det følgende beskrives ved hjelp av eksempler.

164320

14

Eksempel 1.

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte glasskapillarrør:

Gjennom glasskapillarrør innvendig diameter, 1 mm; lengde 100 mm) ble 0,01 M fosfatpufret saltløsning (PBS), pH 7,2, inneholdende 20 mg/ml okse-serum-albumin (BSA) ledet. Glasskapillarrørene ble deretter aspirert for fjerning av eventuelt gjenværende PBS med BSA og fulgt av lufttørring.

(2) Glassperler (GB); (diameter 0,17 mm).

(3) Albuminbelagt GB (GB.BSA).

GB ble neddyppet i PBS som inneholdt 20 mg/ml av BSA. Etter vasking av det således neddyppede GB to til tre ganger med destillert vann ble GB tørket under vakuum.

(4) Polyesterfiber:

Det ble anvendt kommersiell polyesterfiber.

(5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

1 gram av GB.BSA ble blandet i 2 ml etanol som inneholdt 6,25 mg o-dianisidin-hydroklorid. Den resulterende blanding ble deretter tørket under vakuum.

(6) Peroksidase-konjugert anti-kanin-IgG-antistoff

(α Rb-IgG-HRP):

4 mg peroksidase ble oppløst i destillert vann. Etter tilsetning av 0,2 ml av 0,1 M natriumperjodat til løsningen ble innholdet omrørt i 20 minutter ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble dialysert natten over mot 1 mM acetatpufferløsning (pH 4,0). Etter dialysen ble 0,2 M karbonatpufferløsning (pH 9,5) tilsatt for justering av dialysatet til pH 9,5. Umiddelbart etter pH-justeringen ble 1 ml av geite-anti-kanin-IgG-antistoff (10 mg/ml) i 0,01 M karbonatpufferløsning (pH 9,5) tilsatt. Innholdet ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Etter fullføring av reaksjonen ble reaksjonsblandingen blandet med 0,1 ml natriumborhydrid (4 mg/ml), og den resulterende blanding fikk henstå ved 4°C i 2 timer. Etter at reaksjonen var ferdig ble reaksjonsblandingen kromatografert gjennom Sephacryl S-200 i en kolonne med diameter 2,5 cm og lengde 30 cm og ble eluert med 0,01 M PBS. Høymolekylære fraksjoner som ble eluert først ble oppsamlet og deretter lyofilisert for lagring.

(7) α Rb-IgG-HRP-mikset GB.BSA:

8 gram av GB.BSA ble satt til en porsjon av lyofili-satet fremstilt som angitt under (6) ovenfor, og denne porsjon var ekvivalent med 1 ml av α Rb-IgG-HRP. Den resulterende bland-ing ble blandet jevnt i en morter.

(8) Kanin-IgG-fiksert GB (Rb-IgG-O):

5 ml konsentrert svovelsyre ble satt til 5 g av GB. Den resulterende blanding fikk henstå ved romtemperatur i 5 minutter. Den ble så vasket med destillert vann inntil vaske-vannet ble nøytralt. Det således vaskede GB ble dekket med 1 ml poly-L-lysin (30 mg/ml), fulgt av omrøring av den resul-te-rende blanding ved romtemperatur i 1 time og vasket med destil-lert vann. Etter vaskingen ble det poly-L-lysin-dekkede GB blandet med 2 ml av 2,5 % glutaraldehyd i PBS. Den resulteren-de blanding ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Etter vask-ing av reaksjonsblandingen med destillert vann ble 2 ml av ka-nin-IgG (5 mg/ml) tilsatt. Den således fremstilte blanding ble omrørt ved romtemperatur i 3,5 timer, fulgt av flere vaskinger med PBS og ble tørret under vakuum.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

5 merker ble anbragt, først ett ved et punkt 5 mm fra nedre ende av de albumindekkede glasskapillarrør og deretter sukses-sivt 4 merker oppover på kapillarrøret med et mellomrom på 3,5 mm. Polyesterfibre (a-1) ble pakket over de første 5 mm. Den nedre ende ble deretter koblet til en vakuumpumpe for å pro-dusere et negativt trykk i kapillarrøret slik at det dianisi-din-blandete GB.BSA (a-2) ble suget inn for å fylle opp de nes-te 3,5 mm. På samme måte ble GB.BSA (a-3), α Rb-IgG-HRP-blan-det GB.BSA (a-4), GB.BSA (a-5) og Rb-IgG-O (a-6) pakket sukses-sivt. Gb (a-7) ble deretter pakket gjennom det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende. Til slutt ble polyesterfibre pakket i de gjenværende 5 mm. (Fig. 1)

[3-1] Distinksjon mellom human-serum og kaninserum:

To kapillarrør ble tilveiebragt for påvisning. Den nedre ende av kapillarrørene ble dyppet i human-serum, mens den til-svarende for det andre kapillarrør ble dyppet i kanin-serum. Hvert serum ble tillatt å trekke seg opp til en sone som var indikert ved (a-6) i figur 1. Ved dette stadium var mengden av

det optrukkede serum ca. 8 μ l. Det tok 1 minutt for opptrekkingen. Hvert av kapillarrørene ble deretter dyppet med sin nedre ende i PBS som inneholdt 0,003 % hydrogenperoksyd, som deretter ble tillatt å bli suget opp til et punkt nær den øvre ende av kapillarrøret (8-9 cm oppover fra nedre ende). Det tok 15 minutter for denne oppsuging. Som resultat ble Rb-IgG-O-sonen [(a-6) i figur 1] farvet brun for human-serums vedkommende. Imidlertid ble det ikke observert noen farve for kanin-serums vedkommende.

[3-2) Distinksjon mellom human-blod og kanin-blod, begge inneholdende en antikoagulant (EDTA):

Fremgangsmåtene fra [3-1] ble fulgt med unntagelse av at PBS som inneholdt 0,03 % hydrogenperoksyd ble anvendt som substratløsning. Som resultat ble den sone som tilsvarte Rb-IgG-O farvet brun for human-blods vedkommende, mens det ikke ble observert noen farve for kanin-blods vedkommende.

Eksempel 2:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagt glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glass-kapillarrør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (1) med unntagelse av at glass-kapillarrør med diameter 1,5 mm og lengde 125 mm ble anvendt.

(2) Glassperler (GB) (diameter: 0,17 mm)

(3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

Det samme albumin-belagte GB ble anvendt som referert i eksempel 1, [1], (3).

(4) Polyesterfiber

(5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Det samme dianisidin-miksede GB.BSA ble anvendt som referert i eksempel 1, [1], (5).

(5) Peroksidase-konjugert kanin-IgG (Rb-IgG-HRP):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (6) med unntagelse av at geite-anti-kanin-IgG-antistoff ble erstattet av kanin-IgG.

(7) Rb-IgG-HRP-mikset GB.BSA:

16 gram av GB.BSA ble satt til en porsjon av lyofili-satet fremstilt som angitt under (6), og denne porsjon er ekvivalent med 1 ml av Rb-IgG-HRP. Den resulterende blanding ble ensartet blandet i en morter.

(8) Anti-kanin-IgG-antistoff-fiksert GB (α Rb-IgG-O):

Fremgangsmåtene fra eksempel 1, [1], (8) ble fulgt med unntagelse av at geite-anti-kanin-IgG-antistoff ble brukt istedenfor kanin-IgG.

(9) Stempel med hull:

Det ble laget et hull i den øvre del av en gummisugekopp med dimensjoner som tilsvarte kapillarrørets.

(10) Heparin og EDTA-mikset GB.BSA;

I en morter ble 10 mg heparin, 1,15 g av EDTA 2K og 8,84 g av GB.BSA blandet ensartet. En 0,2 g porsjon av den resulterende blanding ble tatt ut, og tilsatt ytterligere 9,8 g av GB.BSA. Den således oppnådde blanding ble omrørt jevnt på samme måte.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Fremgangsmåtene fra eksempel 1, [2] for å fremstille de følgende kapillarrør.

Polyesterfibre (b-1) ble pakket langs de første 5 mm, heparin og EDTA-blandet GB.BSA (b-2) langs de neste 3,5 mm, dianisidin-blandet GB.BSA (b-3) langs de neste 3,5 mm, og likeledes GB.BSA (b-4), Rb-IgG-HRP-blandet GB.BSA (b-5), GB.BSA (b-6) og α Rb-IgG-O (b-7) respektive pakket 3,5 mm hver. Gb (b-8) ble så pakket i det resterende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og de gjenværende 5 mm ble pakket med polyesterfibere.

(Figur 2)

[3] Distinksjon mellom friskt human- og kanin-blod:

Det ble tilveiebragt to kapillarrør, og gummisugekopper, hver med et hull, ble festet respektive til de øvre ender av kapillarrørene. Den nedre ende av et av kapillarrørene ble brakt i kontakt med et hakk laget i en del av et menneskeøre, mens den nedre ende av det annet kapillarrør ble brakt i kontakt med et hakk laget i en del av et kanin-øre. Hvert friske blod ble langsomt suget til sone (b-7) i figur 2, mens det ble gjort bruk av gummisugekoppen. I dette stadium var mengde av det oppsugede blod ca. 15 μ l. Det tok 20 sekunder med oppsugingen. Deretter ble nedre ende av hvert av kapillarrørene dyppet i PBS som inneholdt 0,003 % hydrogenperoksyd. PBS inneholdende 0,003 % hydrogenperoksyd ble suget opp, mens det ble gjort bruk

av gummisugekoppen, til et punkt nær den øvre ende (9-10 cm oppover fra den nedre ende) av kapillarrøret. Det tok 7 minutter med oppsugingen. Som resultat ble den sone som tilsvarte anti-Rb-IgG [(b-7) i figur 2] farvet brun for human-blods vedkommende, men for kanin-blods vedkommende ble den samme sone lett farvet sammenlignet med førstnevnte.

Eksempel 3:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glasskapillarrør fra eksempel 1, [1], (1) ble anvendt.

(2) Glassperler (GB; diameter: 0,1 mm)

(3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

GB.BSA ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (3) med unntagelse av at 0,1 mm glassperler ble anvendt istedenfor de 0,17 mm glassperler.

(4) Absorberende bomull

(5) Peroksidase-konjugert anti-C-reaktivt protein-antistoff (α CRP-HRP):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, med unntagelse av at geite-anti-CRP-antistoff ble benyttet istedenfor geite-anti-kanin-IgG-antistoff.

(6) α CRP-HRP-blandet GB.BSA:

8 gram av GB.BSA (3) ble satt til en porsjon av lyofilisatet fremstilt som angitt under (5), og denne porsjon var ekvivalent med 1 ml av α CRP-HRP. Den resulterende blanding ble blandet jevnt i en morter.

(7) α CRP-antistoff-fiksert GB (α CRP-O):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (8) med unntagelse av at geite- α CRP-antistoff ble anvendt istedenfor kanin-IgG, og glassperlene i [1], (2) i dette eksempel ble anvendt.

(8) Farveproduserende substratløsning:

PBS inneholdende 0,03 % hydrogenperoksyd, 0,25 % gelatin og 0,03 % o-tolidin.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

De følgende kapillarrør ble fremstilt ved å følge metodene fra eksempel 1, [2]. Den absorberende bomull (c-1) ble pakket

langs de første 5 mm, og GB.BSA (c-2), α CRP-HRP-blandet GB.BSA (c-3), GB.BSA (c-4) og α CRP-O (c-5) ble deretter pakket respektive 5 mm hver. GB (c-6) ble pakket i det resterende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra den øvre ende av kapillarrøret, og den absorberende bomull ble pakket i de resterende 5 mm.

(Figur 3)

[3] Bestemmelse av nærvær eller fravær av CRP:

Fire kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning av CRP. Deres nedre ender ble respektive dyppet i (I) kaninserum, (II) normalt humanserum, (III) pasientserum og (IV) serum inneholdende 5 mg/dl av CRP. Væskeprøvene ble hver suget opp til sone (c-3) i figur 3. Her var mengden av hver av de således oppsugede prøver ca. 5 μ l. Det tok 30-60 sekunder med oppsugingen.

Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i en farveproduserende substratløsning. Den farveproduserende substratløsning ble oppsuget til et punkt (8-9 cm oppover fra den nedre ende) nær den øvre ende av hvert kapillarrør. Oppsugingen tok 20 minutter. Som resultat ble det ikke observert noen farve i den sone som tilsvarte α CRP-O [(c-5) i figur 3] i tilfellet av (I) og (II), mens en grønnaktig farve ble observert i den samme sone i tilfellet av (III) og (IV).

Eksempel 4:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glass-kapillarrør fra eksempel 1, [1],

(1) ble anvendt.

(2) Glassperler (GB; diameter; 0,1 mm)

(3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

Albumin-belagt GB fra eksempel 3, [1], (3) ble anvendt.

(4) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (5) med unntagelse av at 0,1 mm glassperler ble anvendt istedenfor de 0,17 mm glassperler.

(5) Glukose-oksidas-konjugert absorberende bomull

(GOD-O):

Det ble tilveiebrakt 780 mg av den absorberende bomull og 214 mg natriumperjodat, som var tilsatt 40 ml destillert vann. Den resulterende blanding ble omrørt ved romtemperatur i 1 time.

164320

20

Etter reaksjonen ble reaksjonsblandingen vasket grundig med destillert vann, fulgt av tilsetning av 10 mg av glukose-oksidasen. Etter at disse ble blandet ved romtemperatur i 3 timer ble den resulterende blanding vasket grundig med destillert vann og ble så tørret under vakuum.

(6) Glukose-mikset absorberende bomull (Glu-mikset absorberende bomull):

Det ble tilveiebragt 1 g av den absorberende bomull, fulgt av blanding av denne med 100 mg glukose. Deretter ble 2 ml destillert vann tilsatt, og den resulterende blanding ble omrørt godt for oppløsning av glukosen. Så ble den absorberende bomull tørret under vakuum.

(7) Peroksidase-konjugert anti-fibrin-nedbrytningsprodukter (α FDP-HRP):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (6) unntatt at geite-kanin-IgG-antistoff ble erstattet med muse-anti-FDP-antistoff (monoklonalt antistoff-1).

(8) α FDP-HRP-mikset GB.BSA:

8 gram av GB.BSA (3) ble satt til en porsjon av lyofilisatet fremstilt som angitt under (7), og denne porsjon var ekvivalent med 1 ml av α FDP-HRP. Den resulterende blanding ble omrørt jevnt i en morter.

(9) α FDP-fiksert GB (α FDP-O):

Fremstilt på samme måte som angitt i eksempel 1, [1], (8) med unntagelse av at kanin-IgG ble erstattet med muse- α FDP-antistoff (monoklonalt antistoff-2).

(10) Glutation-mikset GB.BSA:

10 mg glutatation og 5 g av GB.BSA ble blandet ensartet i en morter.

(11) Absorberende bomull

[2] Fremstilling av kapillarrør for påvisning:

Fra den nedre ende av hvert albumindekket glasskapillarrør ble det første merke satt ved 5 mm og det annet ved 10 mm fra den nedre ende. Så ble det satt seks merker hvert med et mellomrom av 3,5 mm. To fiber-reagenser ble innsatt fra nedre ende. GOD-O (d-2) ble først pakket fra et punkt 5 mm oppover fra nedre ende til et punkt 10 mm oppover fra samme nedre ende, og den Glu-miksede absorberende bomull (d-1) ble deretter pakket fra

den nedre ende til punktet 5 mm oppover fra nedre ende, begge ved anvendelse av en nål. Deretter, under oppsuging fra nedre ende, ble det pakket, i hvert tilfelle i en lengde av 3,5 mm, det dianisidin-miksede GB.BSA (d-3), GB.BSA (d-4), glutation-miksede GB.BSA (d-5) α FDP-HRP-miksede GB.BSA (d-6), GB.BSA (d-7) og α FDP-O (d-8) respektive. GB (d-9) ble så pakket i det resterende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og den absorberende bomull ble pakket langs de gjenværende 5 mm.

(Figur 4)

[3] Påvisning av FDP i urin:

To kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. Ett av kapillarrørene ble dyppet i urin som inneholdt FDP (D_2) i en mengde av 50 μ g pr. ml av urin, mens det annet kapillarrør ble dyppet i normal human-urin. Begge urinprøver ble oppsuget til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i sine tilsvarende kapillarrør. Her var mengden av hver av de oppsugede urinprøver ca. 25 μ l. Det tok 9 minutter med oppsugingen. Som resultat ble den sone som tilsvarte α FDP-O [(d-8) i fig. 4] farvet brun i tilfellet av den FDP-tilsatte urin. Det ble imidlertid ikke observert noen farve i tilfellet av den normale human-urin.

Eksempel 5:

[1] Materialer:

- (1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glass-kapillarrør fra eksempel 1,

[1], (1) ble anvendt.

- (2) Glassperler (GB; diameter: 0,17 mm)

- (3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

GB.BSA fra eksempel 3, [1], (3) ble anvendt.

- (4) Polyesterfiber

- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 1, [1], (5) ble anvendt.

- (6) Peroksidase-konjugert kanin-IgG-antistoff (Rb-IgG-HRP):

Rb-IgG-HRP fra eksempel 2, [2], (6) ble anvendt.

- (7) Rn-IgG-HRP-mikset GB.BSA:

Det Rb-IgG-HRP-miksede GB.BSA fra eksempel 2, [1],

(7) ble anvendt.

(8) Kanin-IgG-fiksert GB (Rb-IgG-O):

Rb-IgG fra eksempel 1, [1], (8) ble anvendt.

[2] Fremstilling av kapillarrør for påvisning:

Ved å følge fremgangsmåtene fra eksempel 1, [2] ble følgende kapillarrør fremstilt:

Polyesterfibrene (e-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av det dianisidin-miksede GB.BSA (e-2), GB.BSA (e-3), Rb-IgG-HRP-miksede GB.BSA (e-4), GB.BSA (e-5) og Rb-IgG-O (e-6) respektive langs 3,5 mm ganger 3,5 mm. Gb (e-7) ble deretter pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og polyesterfibrene ble til slutt pakket i det gjenværende 5 mm. (figur 5)

[3] Bestemmelse av nærvær eller fravær av anti-Rb-IgG-antistoff:

To kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. De nedre ender av kapillarrørene ble dyppet respektive i geiteserum under immunisering med Rb-IgG (I) og normalt geiteserum (II) (bekreftet ved Ouchterlony-metoden). Prøvene ble suget opp til punktene (e-3) i figur 5. I dette stadium var mengden av hver av prøvene ca. 3 µl. Det tok 20 sekunder.

Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS som inneholdt 0,03 % hydrogenperoksyd. PBS inneholdende 0,03 % hydrogenperoksyd ble suget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm nedover fra de nedre ender) av kapillarrørene. Det tok 20 minutter med oppsugingen. Som resultat ble den sone som tilsvarte Rb-IgG-O [(e-6) i fig. 5] farvet brun for geiteserums vedkommende som inneholdt anti-Rb-IgG-antistoff (I), mens ingen farve ble observert for det normale geiteserums vedkommende (II).

Eksempel 6:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glass-kapillarrør fra eksempel 1, [1], (1) ble anvendt.

(2) Albumin-belagte glassperler (GB.BSA):

GB.BSA fra eksempel 3, [1], (1) ble anvendt.

(3) Absorberende bomull

(4) Peroksidase-konjugert anti-human-serum albumin-antistoff (α HSA-HRP):

Fremstilt på samme måte som α Rb-IgG-HRP fra eksempel 1 [1], (6) med unntagelse av at geite-anti-kanin-IgG-antistoff ble erstattet av kanin-anti-human-serum-albumin-antistoff.

(5) α HSA-HRP-mikset GB.BSA:

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (6) med unntagelse av at α -HSA-HRP (4) fra dette eksempel ble anvendt istedenfor α CRP-HRP.

(6) α HSA-antistoff-fiksert GB(α HSA-O):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (7) med unntagelse av at geite- α CRP-antistoffet ble erstattet med kanin- α -HSA-antistoff.

(7) Farveproduserende substratløsning:

0,01 M fosfatpufret saltløsning inneholdende 0,3 % hydrogenperoksyd, 0,25 % gelatin og 0,03 % 2,2'-azinodi(3-etylbenz-tiazolin)-6-sulfonsyre.

[2] Fremstilling av kapillarrør for påvisning:

Følgende kapillarrør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [2]:

Den absorberende bomull (f-1) ble pakket langs de første 5 mm, og deretter GB.BSA (f-2) langs de neste 7 mm, det α HSA-HRP-miksede GB.BSA (f-3) langs 3,5 mm, GB.BSA (f-4) langs 7 mm, og α HSA-O (f-5) langs 3,5 mm. GB.BSA (f-6) ble deretter pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og den absorberende bomull ble også pakket i de gjenværende 5 mm. Etter fullførelse av pakkingen ble det satt et merke ved et punkt 5 cm oppover fra nedre ende.

(Figur 6)

[3] Bestemmelse av nærvær eller fravær av human-albumin i avløpsvæske:

Tre reagensrør ble tilveiebrakt for påvisning. De nedre ender av reagensrørene ble dyppet respektive i PBS inneholdende human-serum i en mengde av 1 ml pr. liter av PBS (I), avløpsvæske 1 (II) og avløpsvæske 2 (III). Disse prøver ble suget opp til sonene (f-5) i figur 6. I dette stadium var mengden av hver av de oppsugede prøver ca. 9 μ l. Det tok 1 minutt

med oppsugingen. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i en farveproduserende substratløsning. Den farveproduserende substratløsning ble suget opp til punkter ca. 5 cm oppover fra de nedre ender av kapillarrørene. Dette tok 15 minutter. Som resultat ble, i tilfellet (I) og (II), blå farve observert respektive i de soner som tilsvarte α HSA-O [(f-5) i figur 6], mens ingen farve ble observert i tilfellet (III). Av disse resultater var det mulig å bestemme at avløpsvæske 1 inneholdt human-albumin.

Eksempel 7:

[1] Materialer:

- (1) Albumin-dekkede glass-kapillarrør:

Albumin-dekkede glasskapillarrør fra eksempel 1, [1],

(1) ble anvendt.

- (2) Glassperler (GB; diameter: 0,1)

- (3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

GB.BSA fra eksempel 3, [1], (3) ble anvendt.

- (4) Polyesterfiber.

- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 4, [1],

(4) ble anvendt.

- (6) Peroksidase-konjugert anti- α -fetoprotein-antistoff (monoklonalt antistoff: fremstilt av oss) (α -AFT-HRP):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (6) med unntagelse av at geite-anti-rabbit-IgG-antistoff ble erstattet med muse-anti- α -fetoprotein-antistoff (monoklonalt antistoff-1).

- (7) α AFP-HRP-mikset GB.BSA:

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (6) med unntagelse av at α CRP-HRP ble erstattet med α AFP-HRP (6) fra dette eksempel.

- (8) Anti- α -fetoprotein-antistoff-fiksert GB. (α AFT-O):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (7) med unntagelse av at geite- α -CRP-antistoff ble erstattet med muse-anti- α -fetoprotein-antistoff (monoklonalt antistoff-2; fremstilt av oss).

- (9) α -fetoprotein-fiksert GB (AFP-O):

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (7)

med unntagelse av at geite- α -CRP-antistoff ble erstattet med α -fetoprotein (produkt fra The Green Cross Corp.).

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

De følgende kapillarrør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [2].

Polyesterfibrene (g-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av det dianisidin-miksede GB.BSA (g-2), GB.BSA (g-3), α -AFP-HRP-mikset GB.BSA (g-4), GB.BSA (g-5), α AFP-O (g-6), GB.BSA (g-7) og AFP-O (g-8), 3,5 mm hver. Deretter ble GB (g-9) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra dets øvre ende, og polyesterfibrene ble igjen pakket i de gjenværende 5 mm.

(Figur 7)

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

Seks kapillarrør ble tilveiebrakt for målinger. De nedre ender av kapillarrørene ble dyppet respektive i serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 0 g pr. ml av serum (I), serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 100 ng pr. ml av serum (II), serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 1 μ g pr. ml av serum (III), serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 10 μ g pr. ml av serum (IV), normal-human-serum (V) og pasient-serum (VI). Disse prøver ble oppsugget til sonene (g-8) i fig. 7. Mengden av hver av de oppsugede prøver var ca. 10 μ l. Det tok 2 minutter for oppsugingen. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS som inneholdt 0,003 % hydrogenperoksyd. PBS inneholdende 0,003 % hydrogenperoksyd ble sugget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) av kapillarrørene. Dette tok 25 minutter. Som resultat ga prøven (I) ingen farve overfor α AFP-O [(g-6) i figur 7], men etterlot en mørk farve ved AFP-O [(g-8) i figur 7]. Prøve (II) ga α AFP-O [(g-6) i figur 7] et lett farveskjær og mørkfarvet AFP-O [(g-8) i figur 7]. Prøve (III) farvet ikke bare α AFP-O [(g-6) i figur 7], men også AFP-O [(g-8) i figur 7]. For prøve (IV) ble α AFP-O [(g-6) i figur 7] mørkfarvet, og AFP-O [(g-8) i figur 7] fikk et lett farveskjær. Prøvene (V) og (I) ga de samme resultater, mens prøvene (VI) og (II) ga de samme resultater. Av ovenstående resultater ble det ikke observert noe α -fetoprotein i normal-human-serumet, mens det ble påvist i pasient-serumet som inneholdt α -fetoprotein i en mengde av ca. 100 ng/ml

av serumet.

Eksempel 8:

[1] Materialer:

- (1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:
Albumin-belagte glass-kapillarrør fra eksempel 1 [1],
(1) ble anvendt.
- (2) GB (diameter 0,17 mm)
- (3) GB.BSA
GB.BSA fra eksempel 1, [1], (3) ble anvendt.
- (4) Polyesterfiber
- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:
Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 1, [1],
(5) ble anvendt.
- (6) Natriumperborat-mikset GB.BSA:
12 mg natriumperborat og 10 g av GB.BSA ble blandet
jevnt i en morter.
- (7) Glutation-mikset GB.BSA:
40 mg glutatation og 10 g av GB.BSA ble blandet jevnt i
en morter.
- (8) Peroksidase konjugert med anti-fibrin-nedbrytnings-
produkt-antistoff (monoklonalt antistoff-1) (α FDP-HRP):
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (6)
med unntagelse av at geite-anti-kanin-IgG-antistoffet ble er-
stattet med muse-antifibrin-nedbrytningsprodukt-antistoff
(monoklonalt antistoff-1, fremstilt av oss).
- (9) α FDP-HRP-mikset GB.BSA:
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (7)
med unntagelse av at α -Rb-IgG-HRP ble erstattet av α FDP-HRP.
- (10) α -FDP-antistoff-fiksert GB (α FDP-O):
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (8)
med unntagelse av at muse-antifibrin-nedbrytningsprodukt-anti-
stoffet (monoklonalt antistoff-2 fremstilt av oss) ble anvendt
istedenfor Rb-IgG.
- (11) FDP-fiksert GB (FDP-O):
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (8)
med unntagelse av at Rb-IgG ble erstattet av FDP.
- (12) Albumin-mikset GB.BSA:
20 mg av okseserumalbumin og 1 g GB.BSA ble blandet

jevnt i en morter.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

De følgende kapillarrør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [2].

Polyesterfibrene (h-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av det albumin-miksede GB.BSA (h-2), dianisidin-mikset GB.BSA (h-3), natriumperborat-mikset GB.BSA (h-4), glutathion-mikset GB.BSA (h-5), GB.BSA (h-6), α FDP-HRP-mikset GB.BSA (h-7), GB.BSA (h-8), α FDP-O (h-9), GB.BSA (h-10) og FDP-O (h-11), 3,5 mm hver. Deretter ble GB (h-12) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og polyesterfibrene ble pakket i de gjenværende 5 mm.

(Figur 8)

[3] Påvisning av FDP i urin:

4 kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. De nedre ender av kapillarrørene ble dyppet respektive i normal urin (I), urin tilsatt FDP i en mengde av 50 μ g pr. ml av urin (II), urin tilsatt FDP i en mengde av 1 mg pr. ml av urin (III) og pasient-urin (IV). Disse prøver ble suget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i sine tilsvarende kapillarrør. Mengden av hver av de således oppsugede urinprøver var ca. 25 μ l. Dette tok 20 minutter. Som resultat farvet urinprøve (I) ikke α FDP-O [(h-9) i figur 8], men ga en mørk farve ved FDP-O [(h-11) i figur 8]. Urinprøve (II) ga en brun farve ikke bare til α FDP-O [(h-9) i figur 8], men også til FDP-O [(h-11) i figur 8]. I tilfellet urinprøve (III) ble en mørk farve observert ved α FDP-O [(h-9) i figur 8], og et lett farveskjær ble også observert ved FDP-O [(h-11) i figur 8]. I tilfellet urinprøve (IV) var det mulig å bestemme, på bakgrunn av de resultater som er oppnådd med hensyn til urinprøve (II), at urinprøve (IV) inneholdt FDP i en mengde av ca. 50 μ g pr. ml av urinprøven.

Eksempel 9:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte kapillarrør:

Albumin-belagte kapillarrør fra eksempel 1, [1], (1) ble anvendt.

- (2) Glassperler (GB; diameter: 0,17 mm)
- (3) Albumin-belagte glassperler (GB.BSA):
Det albumin-belagte GB fra eksempel 1, [1], (1) ble anvendt.
- (4) Polyesterfibre
- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:
Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 1, [1], (5) ble anvendt.
- (6) Peroksidase-konjugert anti- α -fetoprotein-antistoff (α AFP-HRP):
Det peroksidase-konjugerte anti- α -fetoprotein-antistoff fra eksempel 7, [1], (6) ble anvendt.
- (7) α AFP-HRP-mikset GB.BSA:
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (7) med unntagelse av at α Rb-IgG-HRP ble erstattet med α AFP-HRP.
- (8) Anti- α -fetoprotein-antistoff-fiksert GB (α AFP-O):
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (8) med unntagelse av utbytting av kanin-IgG med anti- α -fetoprotein-antistoff.
- (9) Anti-peroksidase-antistoff-fiksert GB (α HRP-O):
Fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [1], (6) med unntagelse av at kanin-IgG ble erstattet med geite-anti-peroksidase-antistoff.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Ved å følge fremgangsmåtene fra eksempel 1, [2], ble de følgende kapillarrør fremstilt.

Polyesterfibre (i-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av det dianisidin-miksede GB.BSA (i-2), GB.BSA (i-3), α AFP-HRP-mikset GB.BSA (i-4), GB.BSA (i-5), α AFP-O (i-6), GB.BSA (i-7) og α HRP-O (i-8), hver 3,5 mm. Deretter ble GB (i-9) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra den øvre ende av kapillarrøret, og polyesterfibre ble pakket i de gjenværende 5 mm.

(Figur 9)

[3] Påvisning av α -fetoprotein i serum:

3 kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. De nedre ender av kapillarrørene ble dyppet respektive i serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 0 g pr. ml av serum (I),

serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 500 ng pr. ml av serum (II), og serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 10 μ g pr. ml av serum (III). Serumprøvene ble suget opp til sonene (i-8) i figur 9. Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var ca. 10 μ l. Oppsugingen tok 1 minutt. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS inneholdende 0,003 % hydrogenperoksyd for oppsuging til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i kapillarrørene. Dette tok 20 minutter. Som resultat ga serumprøve (I) ingen farve til α AFP-O [(i-6) i figur 9], men produserte en intens brun farve ved α HRP-O [(i-8) i figur 9]. Serumprøve (II) farvet ikke bare α AFP-O [(i-6) i figur 9], men også α HRP-O [(i-8) i figur 9]. Serumprøve (III) ga dyp farve til α AFP-O [(i-6) i figur 9] og farvet også α HRP-O [(i-8) i figur 9]. Av de ovenstående resultater ble konsentrasjonene av α -fetoprotein skjelnet fra hverandre ved farvene i sonene (i-6) og (i-8) i figur 9.

Eksempel 10:

[1] Materialer:

- (1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

Albumin-belagte glass-kapillarrør fra eksempel 1 [1],

- (1) ble anvendt.

- (2) Glassperler (GB; diameter: 0,1 mm)

- (3) Albumin-belagt GB (GB.BSA):

GB.BSA fra eksempel 3, [1], (1) ble anvendt.

- (4) Polyesterfiber

- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 4, [1],

- (4) ble anvendt.

- (6) Peroksidase-konjugert anti- α -fetoprotein-antistoff

(monoklonalt antistoff-1; produsert av oss; Fab') (α AFP-HRP):

1,5 ml av 0,1 M fosfatpufferløsning (pH 7,0) inneholdende 10 mg peroksidase og 0,2 ml dimetylsulfoksydløsning inneholdende 16 mg N-suksinimidyl-4-(N-maleimido-metyl)cykloheksan-1-karbonat (SMCC) ble dryppet under røring. De ble blandet og reagert ved 30°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble sentrifugert (ved 3000 opm i 10 minutter), og det utfelte overskudd av reagens ble fjernet. Maleimidisert peroksidase ble separert

ved gelkromatografi (Sephadex G-25; 0,1 M fosfatpufferløsning pH 6,0). Ved siden av ble $F(ab')_2$ fremstilt på kjent måte. Merkaptoetylaminhydroklorid ble deretter satt til 0,1 M fosfatpufferløsning (pH 6,0) inneholdende renset $F(ab')_2$ (som stammer fra monoklonalt antistoff-1; produsert av oss) i en mengde av 10 mg pr. ml av pufferløsningen inntil den endelige konsentrasjon av merkaptoetylaminhydrokloridet nådde 0,01 M. Innholdet ble reagert ved 37°C i 90 minutter. Reaksjonsblandingen ble utsatt for gelkromatografi ved anvendelse av Sephadex G-25 og 0,1 M fosfatpufferløsning inneholdende 5 mM av EDTA som elueringsmiddel for å separere Fab'. Enzym-konjugert Fab' ble utsatt for gelkromatografi ved anvendelse av "Ultrogel ACA-44" (produkt fra LKB) og 0,1 M fosfatpufferløsning (pH 6,5) som elueringsmiddel. De således separerte og rensete produkter ble lyofilisert.

(7) α AFP-HRP-mikset GB.BSA:

Fremstilt på samme måte som i eksempel 3, [1], (6) med unntagelse av at α CRP-HRP ble erstattet med α -AFP-HRP.

(8) Anti- α -fetoprotein-antistoff-fiksert GB (α AFP-O):

α AFP-O fra eksempel 7 [1], (8) ble anvendt.

(9) Glukose-oksidase polymerisert med albumin-perler, mikset GB.BSA (GOD-O):

100 mg glukose-oksidase og 400 mg oksealbumin ble tilveiebrakt. Disse ble oppløst i 5 ml av 0,02 M acetatpufferløsning (pH 5,0), fulgt av tilsetning av 2 ml 2,5 % glutaraldehyd. Den resulterende blanding ble omrørt forsiktig og ble så tilatt å henstå i 1 time. Etter dette ble den koagulert og ble deretter sentrifugert for oppsamling av utfellingsproduktet. Det således oppsamlede utfellingsprodukt ble tilsatt 20 ml 0,1 M lysin. Den resulterende blanding fikk henstå natten over. Den ble så vasket med destillert vann, og utfellingsproduktet ble oppsamlet. Det ble tørret for bruk. 7 mg av det således oppnådde produkt og 1 g av GB.BSA ble blandet ensartet.

(10) Glutation-mikset GB.BSA:

Det glutationsmikset GB.BSA fra eksempel 4, [1], (10) ble anvendt.

(11) PBS inneholdende glukose i en mengde av 1 mg pr. ml av PBS.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Ved å følge fremgangsmåtene fra eksempel 1, [2] ble de følgende kapillarrør fremstilt:

Polyesterfibrene (j-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av dianisidin-mikset GB.BSA (j-2), GB.BSA (j-3), α AFP-HRP-mikset GB.BSA (j-4), glutation-mikset GB.BSA (j-3), α AFP-HRP-mikset GB.BSA (j-4), glutation-mikset GB.BSA (j-5), GOD-O (j-6) og α AFP-O (j-7), 3,5 mm hver. Deretter ble GB (j-8) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm fra øvre ende av kapillarrøret, og polyesterfibrene ble også pakket langs de gjenværende 5 mm.

(Figur 10).

[3] Påvisning av α -fetoprotein i serum:

3 kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. Deres nedre ender ble dyppet respektiv i serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 0 g pr. ml av serum (I), serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 500 ng pr. ml av serum (II), og serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 10 μ g pr. ml av serumet. Serumprøvene ble suget opp til sonene (j-7) i figur 10. Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var ca. 9 μ l. Oppsugingen tok 2 minutter. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS som inneholdt glukose i en mengde av 1 mg pr. ml av PBS. Det glukoseholdige PBS ble suget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i kapillarrørene. Dette tok 25 minutter. Som resultat ga serumprøve (I) ingen farve til α AFP-O [(j-7) i figur 10]. I tilfellet serumprøve (II) ble α AFP-O [(j-7) i figur 10] farvet. Serumprøve (III) ga en dyp farve til α AFP-O [(j-7) i figur 10]. Av de ovenstående resultater var det mulig å skjelne konsentrasjonene av α -fetoprotein fra hverandre.

Eksempel 11:

[1] Reagenser:

(1) Albumin-belagte kapillarrør:

Albumin-belagte kapillarrør fra eksempel 2, [1],

(1) ble anvendt.

(2) Glassperler (GB; diameter: 0,17 mm)

(3) Albumin-belagte glassperler (GB.BSA):

GB.BSA fra eksempel 1, [1], (3) ble anvendt.

(4) Absorberende bomull.

(5) Fluorescein-isotiocyanat-merket anti-kanin-IgG-antistoff (α Rb-IgG-FITC):

Til 5 mg av geite-anti-kanin-IgG-antistoff i 1 ml saltløsning ble 0,1 ml 0,5 M karbonatpufret saltløsning (pH 9,5) tilsatt for oppløsning av antistoffet. 0,05 M karbonatpufret saltløsning (pH 9,5) inneholdende FITC i en mengde av 2 mg pr. ml av saltløsningen, som var fremstilt ved siden av, ble anbrakt i et 20 ml begerglass. IgG-løsningen ble anbrakt i et dialyserør, og røret ble deretter neddyppet i FITC-løsningen. De ble reagert med hverandre ved 4°C natten over. Etter reaksjonen ble innholdet av dialyserøret utsatt for gelkromatografi (Sephacryl S-200; løsning: 0,01 M fosfat-pufret saltløsning) for å separere den resulterende fluorescein-merkede forbindelse. Den således rensede og separerte forbindelse ble lyofilisert.

(6) α Rb-IgG-FITC-mikset GB.BSA:

2 g GB.BSA ble satt til en porsjon av lyofilisatet fremstilt i ovennevnte trinn (5), og denne porsjon var ekvivalent med 1 ml av α Rb-IgG-FITC. Den resulterende blanding ble omrørt jevnt i en morter.

(7) Rb-IgG-fiksert GB (Rb-IgG-O):

Rb-IgG-O fra eksempel 1, [1], (8) ble anvendt.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

De følgende rør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [2].

Den absorberende bomull (k-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av GB.BSA (k-2) langs de neste 3,5 mm. Deretter ble α Rb-IgG-FITC-mikset GB.BSA (k-3), GB.BSA (k-4) og Rb-IgG-O (k-5) likeledes pakket, hver 3,5 mm. Deretter ble GB.BSA (k-6) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret opp til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og den absorberende bomull ble pakket langs de gjenværende 5 mm. (Figur 11)

[3] Skjelning mellom human-serum og kanin-serum:

2 kapillarrør ble tilveiebrakt for bestemmelse. Ett av kapillarrørene ble dyppet i human-serum, mens det annet kapillarrør ble dyppet i kanin-serum. Serumprøvene ble suget opp til et punkt nær øvre ende (8-9 cm oppover fra nedre ende) i

sitt tilsvarende kapillarrør (figur 11). Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var ca. 60 μ l. Oppsugingen tok 30 minutter. Da kapillarrørene med de således oppsugede serumprøver ble eksponert for lys fra en stimulerende lampe ble det, for humanserums vedkommende observert fluorescens ved sone (k-5) i fig. 11). Imidlertid ble det ikke observert fluorescens i tilfellet kaninserum.

Eksempel 12:

[1] Materialer:

(1) - (8):

De samme materialer som i eksempel 1, [1] ble anvendt.

(9) Stempel med et hull:

Et hulldefinerende stempel av samme type som beskrevet i eksempel 2, [1], (9) ble anvendt.

(10) Heparin og EDTA-mikset GB.BSA:

Heparin og EDTA-mikset GB.BSA lik det som er beskrevet i eksempel 2, [1] ble anvendt.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Det ble satt 5 merker på hvert av de albumin-dekkede glasskapillarrør, først ett ved et punkt 5 mm fra nedre ende av de albumin-dekkede glasskapillarrør og deretter etter hverandre fire merker oppover på kapillarrørene med mellomrom 3,5 mm. Polyesterfibrene (a-1) ble pakket langs de første 5 mm. Nedre ende av kapillarrøret ble så koblet til en vakuumpumpe slik at det ble produsert et negativt trykk i kapillarrøret. Heparinet og det EDTA-miksede GB.BSA (a-1') og det dianisidin-miksede GB.BSA (a-2) ble deretter suget inn og pakket suksessivt langs de følgende 3,5 mm områder. På lignende måte ble GB.BSA (a-3), α Rb-IgG-HRP-mikset GB.BSA (a-4), GB.BSA (a-5) og Rb-IgG-O (a-6) pakket suksessivt. GB (a-7) ble deretter pakket i det gjenværende rom til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og til slutt ble polyesterfibrene pakket langs de gjenværende 5 mm.

[3] Skjelning mellom friskt humanblod og friskt kaninblod:

To kapillarrør ble tilveiebrakt for påvisning. Nedre ende av det ene av kapillarrørene ble brakt i kontakt med et hakk laget i et menneskeøre, og tilsvarende ble det annet kapillar-

rør brakt i kontakt med et hakk laget i en del av et kaninøre. Blod fra menneske og kanin ble langsomt suget opp til sonene (a-6) ved hjelp av stemplene. Mengden av hvert av det således oppsugede blod var ca. 9 μ l. Oppsugingen tok 20 sekunder. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS som inneholdt 0,003 % hydrogenperoksyd. Det hydrogenperoksydholdige PBS ble suget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i kapillarrørene. Dette tok 15 minutter. Som resultat ble den sone som tilsvarte Rb-IgG-O (a-6) farvet brun av blodet fra menneske. Imidlertid ble det ikke observert noen farve for kaninblods våkommende.

Eksempel 13:

[1] Materialer:

- (1) Albumin-belagte kapillarrør:

Albumin-belagte kapillarrør fra eksempel 1, [1], (1)

ble anvendt.

- (2) GB med diameter 0,1 mm

- (3) GB.BSA:

GB.BSA fra eksempel 1, [1], (3) ble anvendt.

- (4) Polyesterfiber.

- (5) Dianisidin-mikset GB.BSA:

Det dianisidin-miksede GB.BSA fra eksempel 4, [1],

(4) ble anvendt.

- (6) Natriumperborat-mikset GB.BSA:

12 mg natriumperborat og 10 g GB.BSA ble blandet jevnt i en morter.

- (7) Glutation-mikset GB.BSA:

40 mg glutatation og 10 g av GB.BSA ble blandet jevnt i en morter.

- (8) Peroksidase-konjugert anti- α -fetoprotein-antistoff

(α AFP-HRP):

α AFP-HRP fra eksempel 7, [1], (6) ble anvendt.

- (9) α AFP-HRP-mikset GB.BSA:

GB.BSA mikset med α AFP-HRP fra eksempel 7, [1], (7)

ble anvendt.

- (10) Anti- α -fetoprotein-antistoff-fiksert GB (α AFP-O):

α AFP-O fra eksempel 7, [1], (8) ble anvendt.

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

De følgende kapillarrør ble fremstilt på samme måte som i eksempel 1, [2].

Polyesterfibrene (1-1) ble pakket langs de første 5 mm, fulgt av pakking av det dianisidin-miksede GB.BSA (1-2), natriumperborat-mikset GB.BSA (1-3), glutation-mikset GB.BSA (1-4), GB.BSA (1-5), α AFP-HRP-mikset GB.BSA (1-6), GB.BSA (1-7) og α AFP-O (1-8), 3,5 mm hver. GB (1-9) ble så pakket i det gjenværende rom av kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og polyesterfibrene ble pakket langs de gjenværende 5 mm.

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

Human-serum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 200 μ g pr. ml av serum ble fortynnet med PBS til et volum 10 ganger sitt opprinnelige volum for oppnåelse av en væskeblanding av humanserum og PBS som inneholder α -fetoprotein ved en sluttkonsentrasjon av 20 μ g pr. ml av væskeblandingen (prøve A). I tillegg ble også humanserum inneholdende α -fetoprotein i en mengde av 20 μ g pr. ml av serumet (prøve B) og en supernatant oppnådd ved behandling av 0,5 ml av serumet (som inneholdt α -fetoprotein i en mengde av 20 μ g pr. ml av serumet) med 50 mg nøytralt kobberhydroksyd (prøve C) tilveiebrakt. Det ble således tilveiebrakt tre prøver. Tre kapillarrør ble tilveiebrakt. Deres nedre ender ble dyppet henholdsvis i prøve A, prøve B og prøve C. Disse prøver ble suget opp til punkter nær de øvre ender (8-9 cm oppover fra de nedre ender) i sine tilsvarende kapillarrør. Som et resultat ga prøve A en brun farve til α AFP-O [(1-8) i figur 12], mens prøve B ikke farvet α AFP-O [(1-8) i figur 12]. På den annen side ble en brun farve observert ved α AFP-O [(1-8) i figur 12] i tilfellet prøve C. Av de ovenstående resultater, selv om en substans som inhiberer ovennevnte reaksjon inneholdes i en prøve, er målingen fremdeles mulig, forutsatt at prøven behandles på forhånd, f.eks. ved at den fortynnes eller ved at det tilsettes en ytterligere substans.

Eksempel 14:

[1] Materialer:

(1) Albuminbelagte glass-kapillarrør:

PBS inneholdende okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS ble ledet gjennom glasskapillarrør med diameter 1 mm og lengde 100 mm. Glassrørene ble deretter aspirert for fjerning av eventuelt gjenværende PBS, fulgt av lufttørking.

(2) Glassperler (GB; diameter: 0,17 mm)

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(3) GB.BSA:

GB ble neddyppet i PBS inneholdende okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS. GB ble så vasket 2-3 ganger med destillert vann, og ble deretter tørket.

(4) Polyesterfiber:

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(5) ^{125}I - α -fetoprotein-mikset GB.BSA (i det følgende forkortet "RI-AFP-mikset GB.BSA"):

Til det radioaktive jodiserte AFP(^{125}I) løsning (0,9 $\mu\text{Ci/bial}$) som var inkludert i et kommersielt AFP-målesett (produkt fra Daiichi Radioisotope Co., Ltd.), ble 1,0 g av GB.BSA tilsatt. Den resulterende blanding ble omrørt jevnt og ble deretter tørret over fosforpentoksyd.

(6) Anti-AFP-GB:

Til 5 g av GB ble det tilsatt 3 ml poly-L-lysin (1%). Etter at den resulterende blanding hadde fått henstå ved romtemperatur ble den vasket med destillert vann. Glutaraldehyd ble satt til det overflatebehandlede GB, og den resulterende blanding ble hensatt. Deretter ble den på samme måte vasket med destillert vann. Så ble 5 mg av anti-AFP-antistoff satt til det således tverrbundne GB. Etter at de var tillatt å reagere ved romtemperatur i 2 timer, ble reaksjonsproduktet tørret for fremstilling av anti-AFP-GB.

(7) PBS

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Fra den nedre ende av hvert av de albumindekkede glasskapillarrør ble det laget fem merker med mellomrom 3,5 mm. Polyesterfibrene (m-1) ble pakket først. Denne nedre ende ble så koblet til en vakuumpumpe for å etablere et negativt trykk i

kapillarrøret. GB.BSA (m-2) ble så suget opp og pakket langs de neste 3,5 mm. Likeledes ble det RI-AFP-miksede GB.BSA (m-3), GB.BSA (m-4) og anti-AFP-GB (m-5) pakket suksessivt, 3,5 mm hver. GB.BSA (m-6) ble deretter pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og så ble polyesterfibrene (m-7) pakket langs de gjenværende 5 mm.

(Figur 13)

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

Fem kapillarrør ble tilveiebrakt for målinger. Fire av de fem kapillarrør ble dyppet respektive i serumprøver med kjente AFP-konsentrasjoner på henholdsvis 0, 3,125, 25 og 50 $\mu\text{g/ml}$. Det gjenværende kapillarrør ble dyppet i en serumprøve. Serumprøvene ble respektive suget opp til sonene (m-3) i figur 13. Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var 5 μl . Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS for oppsuging til de øvre ender av kapillarrørene. Oppsugingen tok 10 minutter.

Etter måling av kapillarrørene ved hjelp av en gamma-teller mens de ble holdt med sine nedre ender ned, ble de seksjoner av kapillarrørene som inneholdt den immobiliserte substans (m-5) kuttet vekk og ble målt av gamma-telleren på samme måte.

[4] Resultater:

Konsentrasjon $\mu\text{g/ml}$	Gammastråletellinger (cpm) i kapillarrør	
	Målt før avkutting	Målt etter avkutting
AFP 0	1226	1211
3,125	1219	1181
25	1076	1071
50	714	723
Prøve	768	725

Av ovenstående resultater ble det observert at intensiteten til den immobiliserte radioaktivitet avtok etter hvert som AFP-konsentrasjonen økte. Det var også mulig å måle AFP-konsentrasjonen til prøven, og den var 55-60 $\mu\text{g/ml}$.

Eksempel 15:

[1] Materialer:

(1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

PBS-holdig okse-serumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS ble ledet gjennom glass-kapillarrør med diameter 1 mm og lengde 100 mm. Glass-kapillarrørene ble aspirert for fjerning av eventuell gjenværende væske, fulgt av lufttørring.

(2) Glassperler (GB; diameter: 0,17 mm):

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(3) GB.BSA:

GB ble neddyppet i PBS inneholdende okse-serumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS. GB ble så vasket 2-3 ganger med destillert vann og ble deretter tørket.

(4) Polyesterfiber:

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(5) ^{125}I -anti- α -fetoprotein-antistoff-mikset GB.BSA

(i det følgende forkortet "RI-anti-AFP-mikset GB.BSA"):

Til det radioaktive jodiserte α -fetoprotein-antistoff (^{125}I) (lyofilisert produkt; 0,9 $\mu\text{Ci/bial}$) som var inkludert i et kommersielt AFP-målesett (produkt fra Daiichi Radioisotope Co., Ltd.), ble det tilsatt 1,0 g av GB.BSA. Den resulterende blanding ble omrørt jevnt.

(6) Anti-AFP-GB:

3 ml poly-L-lysin (1 %) ble satt til 5 g av GB. Etter at den resulterende blanding hadde fått henstå ved romtemperatur ble den vasket med destillert vann. Glutaraldehyd ble så satt til det resulterende overflatebehandlede GB. Den således fremstilte blanding fikk henstå. Så ble den vasket med destillert vann. Deretter ble 5 mg av anti-AFP-antistoff satt til det således tverrbundne GB. Etter at de hadde fått reagere med hverandre ved romtemperatur i 2 timer ble reaksjonsproduktet tørret for fremstilling av anti-AFP-GB.

(7) PBS

[2] Fremstilling av kapillarrør for målinger:

Det ble laget fem merker på hvert av de albumindekkede glasskapillarrør, med en avstand på 3,5 mm fra nedre ende av kapillarrørene. Polyesterfiberen (n-1) ble pakket først. Nedre ende ble koblet til en vakuumpumpe slik at det ble produsert

et negativt trykk i kapillarrøret. GB.BSA (n-2) ble så suget opp og pakket langs de neste 3,5 mm. På samme måte ble det RI-anti-AFP-miksede GB.BSA (n-3), GB.BSA (n-4) og anti-AFP-GB (n-5) pakket suksessivt, 3,5 mm. GB.BSA (n-6) ble så pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret. Endelig ble polyesterfibre (n-7) også pakket langs de gjenværende 5 mm.

(Figur 14)

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

7 kapillarrør ble tilveiebrakt for målinger. De nedre ender av 6 av de 7 kapillarrør ble dyppet respektive i AFP-prøver med kjente konsentrasjoner på 0, 3, 10, 100, 500 og 5000 ng/ml. Det gjenværende ene kapillarrør ble dyppet i en serumprøve. Serumprøvene ble hver suget opp til sone (n-4). Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var ca. 5 μ l. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS slik at PBS ble suget opp til punkter nær de øvre ender av kapillarrørene. Dette tok 10 minutter.

Etter måling av kapillarrørene ved hjelp av en gamma-teller mens de ble holdt med sine nedre ender ned, ble de seksjoner av kapillarrørene som inneholdt den immobiliserte substans (n-5) kuttet av og målt med gamma-telleren på samme måte.

[4] Resultater:

Konsentrasjon ng/ml	Gammastråletellinger (cpm) i kapillarrør	
	Målt før avkutting	Målt etter avkutting
AFP 0	564	110
3	585	112
10	628	138
100	776	154
500	841	191
5000	856	585
Prøve	727	149

Av ovenstående resultater ble det observert at intensiteten av den immobiliserte radioaktivitet øket etter hvert som AFP-konsentrasjonen øket. Det var også mulig å måle AFP-

164320

40

konsentrasjonen i prøven, og den var 50 - 100 ng/ml.

Eksempel 16:

[1] Materialer;

(1) Albumin-belagte glass-kapillarrør:

0,01-M fosfatpufret saltløsning (pH 7,2) inneholdende okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av saltløsningen ble ledet gjennom glass-kapillarrør med diameter 1 mm og lengde 100 mm. Glass-kapillarrørene ble så aspirert for fjerning av eventuell gjenværende væske, fulgt av lufttørking.

(2) Glassperler (diameter: 0,17 mm; i det følgende forkortet "GB"):

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(3) Albumin-belagt GB (i det følgende forkortet "GB.BSA"):

GB ble neddyppet i PBS som inneholdt okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS. GB ble vasket 2-3 ganger med destillert vann og ble deretter tørket.

(4) Polyesterfiber:

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(5) ^{125}I - α -fetoprotein-reagens (i det følgende forkortet "RI-AFP"):

Det radioaktive jodiserte α -fetoprotein (^{125}I) 0,9 μCi /bial) som ble inkludert i et kommersielt α -fetoprotein (i det følgende forkortet "AFP") målesett (produkt fra Daiichi Radioisotope Co., Ltd.) ble anvendt slik det var.

(6) Anti-AFP-antistoff-fiksert GB (i det følgende forkortet "anti-AFP-GB"):

3 ml poly-L-lysin (1%) ble satt til 5 g av GB. Etter at den resulterende blanding hadde fått henstå ved romtemperatur ble den vasket med destillert vann. Glutaraldehyd ble deretter satt til det overflatebehandlede GB. Etter at den resulterende blanding hadde fått hvile, ble den på samme måte vasket med destillert vann. Deretter ble 5 mg anti-AFP-antistoff satt til det således tverrbundne GB. Etter at disse hadde fått reagere ved romtemperatur i 2 timer ble reaksjonsproduktet tørket for fremstilling av anti-AFP-GB.

(7) PBS

[2] Fremstilling av kapillarrør for måling:

Fra nedre ende av hvert av de albumin-dekkede glasskapillarrør ble det satt 5 merker med avstand 3,5 mm. Polyesterfibrene (o-1) ble først pakket. Nedre ende av kapillarrøret ble koblet til en vakuumpumpe slik at det ble produsert et negativt trykk i kapillarrøret. Deretter ble GB.BSA (o-2) suget opp og pakket langs de neste 10,5 mm. På samme måte ble anti-AFP-GB (o-3) pakket langs de neste 3,5 mm. Så ble GB.BSA (o-4) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende derav, og til slutt ble polyesterfibrene (o-5) også pakket langs de gjenværende 5 mm. Så ble et annet merke satt ved et punkt 3,5 mm oppover fra nedre ende.

(Figur 15)

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

7 kapillarrør ble tilveiebrakt for målinger. De nedre ender av 6 av de 7 kapillarrør ble dyppet respektive i serumprøver med kjente AFP-konsentrasjoner på 0, 30, 300 ng/ml og 1, 25 og 50 μ g/ml. Det gjenværende ene kapillarrør ble dyppet i en serumprøve. Disse serumprøver ble suget opp respektive til sonene (o-3) i figur 15. Mengden av hver av de således oppsugede serumprøver var 5 μ l. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i RI-AFP slik at RI-AFP ble oppsuget. Mengden av hvert av de således oppsugede RI-AFP var også 5 μ l. Deretter ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS slik at PBS ble suget opp til de øvre ender av kapillarrørene. Oppsugingen tok 15 minutter.

Etter måling av kapillarrørene ved hjelp av en gamma-teller mens de ble holdt med sine nedre ender ned, ble de seksjoner av kapillarrørene som inneholdt den immobiliserte substans (o-5) kuttet av og ble målt med gamma-telleren på samme måte.

164320

42

(4) Resultater:

<u>Konsentrasjon pr. ml</u>		<u>Gammastråletellinger (cpm) i kapillarrør</u>	
		<u>Målt før avkutting</u>	<u>Målt etter avkutting</u>
AFP	0 ng	947	864
	30	943	830
	300	890	755
	1 µg	740	664
	25	301	173
	50	247	109
Prøve		608	510

Av de ovenstående resultater ble det observert at intensiteten til den immobiliserte radioaktivitet avtok etter hvert som AFP-konsentrasjonen øket. Det var også mulig å måle AFP-konsentrasjonen til prøven, og den var 2,5 - 3 µg/ml.

Eksempel 17:

[1] Materialer:

(1) Albumin-dekkede glass-kapillarrør:

PBS inneholdende okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS ble ledet gjennom glasskapillarrør med diameter 1 mm og lengde 100 mm. Glass-kapillarrørene ble deretter aspirert for fjerning av eventuell gjenværende væske, fulgt av lufttørking.

(2) GB (diameter: 0,17 mm)

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(3) GB.BSA

GB ble dyppet i PBS som inneholdt okseserumalbumin i en mengde av 20 mg pr. ml av PBS. GB ble vasket 2-3 ganger med destillert vann og så tørket.

(4) Polyesterfiber:

Det ble anvendt et kommersielt produkt.

(5) ¹²⁵I-α-fetoprotein-antistoffreagens (i det følgende forkortet "RI-anti-AFP"):

Det radioaktive jodiserte α-fetoprotein-antistoff (¹²⁵I) (lyofilisert produkt; 0,9 µCi/bial) som var inkludert i et kommersielt α-fetoprotein-målesett (produkt fra Daiichi Radioisotope Co., Ltd.) ble tilveiebrakt, til hvilket var

satt 500 μ l destillert vann for oppløsning av førstnevnte på ensartet måte.

(6) Anti-AFP-GB:

3 ml poly-L-lysin (1 %) ble satt til 5 g av GB.

Etter at den resulterende blanding hadde fått henstå ved romtemperatur ble den vasket med destillert vann. Glutaraldehyd ble så satt til det overflatebehandlede GB. Etter at den resulterende blanding hadde fått henstå, ble den på samme måte vasket med destillert vann. Deretter ble 5 mg anti-AFP-antistoff tilsatt til det således tverrbundne GB. Etter at de hadde fått reagere ved romtemperatur i 2 timer, ble reaksjonsproduktet tørket for fremstilling av anti-AFP-GB.

(7) PBS

[2] Fremstilling av kapillarrør for måling:

Fra den nedre ende av hvert av de albumin-dekkede glasskapillarrør ble det satt 5 merker med avstand 3,5 mm. Polyesterfibrene (p-1) ble først pakket. Nedre ende av kapillarrøret ble koblet til en vakuumpumpe slik at det ble produsert et negativt trykk i kapillarrøret. Deretter ble GB.BSA (p-2) oppsuget og pakket langs de neste 10,5 mm. På samme måte ble anti-AFP-GB (p-3) pakket langs de neste 3,5 mm. Så ble GB.BSA (p-4) pakket i det gjenværende rom i kapillarrøret til et punkt 5 mm nedover fra øvre ende av kapillarrøret, og til slutt ble polyesterfibrene (p-5) også pakket langs de gjenværende 5 mm. (Figur 16)

[3] Måling av α -fetoprotein i serum:

7 kapillarrør ble tilveiebrakt for målinger. De nedre ender av 6 av de 7 kapillarrør ble dyppet respektive i væskeblandinger av 5 μ l porsjoner av serumprøver som hadde kjente AFP-konsentrasjoner på 0, 3, 10, 30, 100 og 300 ng/ml og 5 μ l porsjoner av RI-AFP. Det gjenværende ene kapillarrør ble dyppet i en væskeblanding som var oppnådd ved å blande 5 μ l av en serumprøve og 5 μ l av RI-AFP. Disse blandinger ble suget opp til kapillarrørene. Oppsugingen tok 30 sekunder. Så ble de nedre ender av kapillarrørene dyppet i PBS for oppsuging av PBS til de øvre ender av kapillarrørene. Oppsugingen tok 10 minutter.

Etter måling av kapillarrørene ved hjelp av en gamma-teller mens de ble holdt med sine nedre ender ned, ble de

164320

44

seksjoner av kapillarrørene som inneholdt den immobiliserte substans (p-3) kuttet av og ble målt med gamma-telleren på samme måte.

(4) Resultater:

<u>Konsentrasjon ng/ml</u>		<u>Gamma-stråletellinger (cpm) i kapillarrør</u>	
		<u>Målt før avkutting</u>	<u>Målt etter avkutting</u>
AFP	0	773	62
	3	850	63
	10	1179	109
	30	1235	241
	100	1255	397
	300	2136	870
Prøve		1335	330

Av de ovenstående resultater ble det observert at intensiteten av den immobiliserte radioaktivitet øket etter hvert som AFP-konsentrasjonen øket. Det var også mulig å måle AFP-konsentrasjonen til prøven, og den var ca. 50 ng/ml.

P a t e n t k r a v

Immunoanalysemetode for påvisning eller kvantitativ måling av en komponent av en prøve ved en immunreaksjon som består av:

- i) pakking av minst de følgende to faste matrikser i ett kapillarrør:
 - (a) en immobilisert bærer med et merket immunreaktiv reagens festet til seg, og
 - (b) en immobilisert bærer med en merket, for ikke-omsatt reagens opptagende substans, festet til seg,
- k a r a k t e r i s e r t v e d
- ii) trekking av en løsning av prøven inn i kapillarrøret for å utføre immunreaksjonen og la reaksjonsblandingen vandre automatisk ved kapillarvirkning,
- iii) immobilisering av det følgende produkt eller reagens:
 - (c) et immunreaksjonsprodukt mellom det merkede immunreaktive reagens og komponenten i prøven, og eventuelt
 - (d) det ikke-omsatte, merkede immunreaktive reagens med den immobiliserte, merkede, opptagende substans, og
- iv) måling av mengden av den således immobiliserte merkede substans.

FIG. 2

FIG. 1

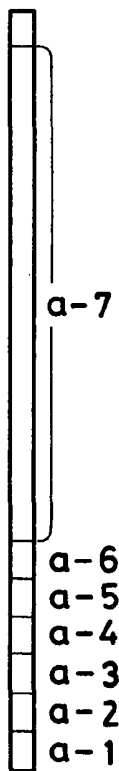


FIG. 3

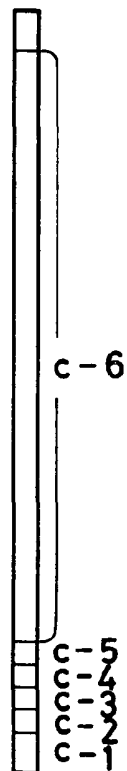


FIG. 4



FIG. 5

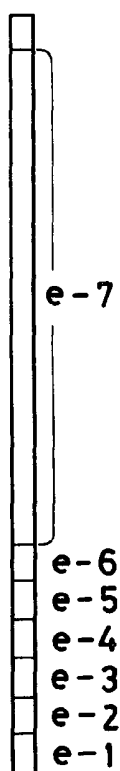


FIG. 6

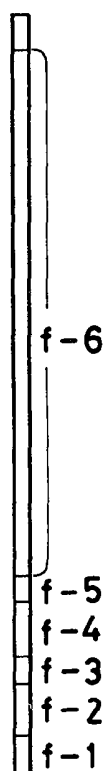


FIG. 7



FIG. 8



164320

FIG. 11

FIG. 9



FIG. 10

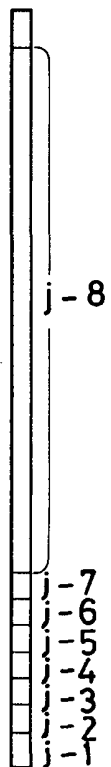


FIG. 12

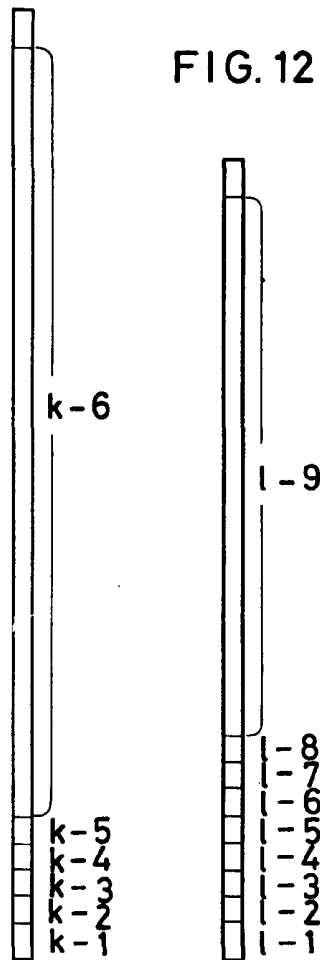


FIG. 13

FIG. 14

FIG. 15

FIG. 16

