

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164840 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0653/86

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/58
G 01 N 33/533

(22) Indleveringsdag: 11 feb 1986

(41) Alm. tilgængelig: 12 aug 1986

(44) Fremlagt: 24 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 11 feb 1985 US 700578

(71) Ansøger: *Becton Dickinson and Company; Mack Centre Drive; Paramus; New Jersey 07652-1149, US

(72) Opfinder: Daniel B. *Wagner; US, Robert A. *Baffi; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt i en væske

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 17908
US pat. nr. 4341957

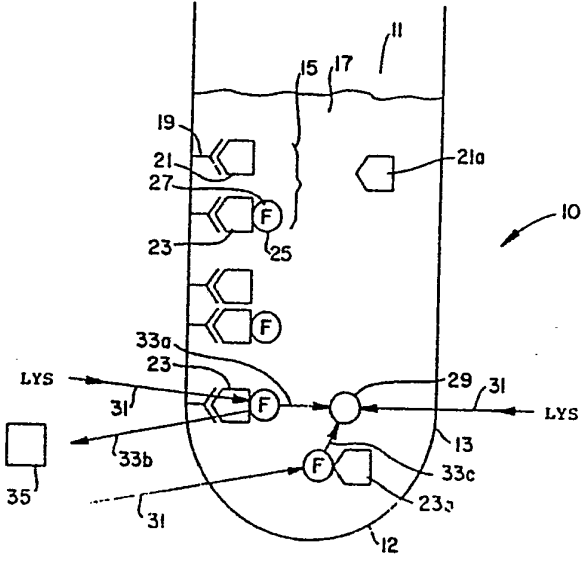
(57) Sammendrag:

0653-86

En fremgangsmåde til fastfaseimmunobestemmelse uden adskillelse af en analyt indbefatter, at en anti-analyt bundet til overfladen af en fast bærer bringes i kontakt med analytten, et lysabsorberende materiale og et fluorescerende sporstof for analytten. Den fremkomne blanding inkuberes. Metoden indbefatter tilførsel af stimuleringslys til blandingen og tidsopløst måling af fluorescensemission fra sporstoffet. Al stimuleringslys og fluorescensemission absorberes af det lysabsorberende materiale med undtagelse af det, der absorberes og emitteres af sporstoffet bundet til anti-analytten, hvorved den eneste påviste fluorescensemission er fra det bundne sporstof. Da frit sporstof i den flydende fase i bestemmelsesmediet ikke emitterer fluorescens, er adskillelse af den bundne og den frie fraktion unødvendig. Opfindelsen indbefatter et udstyr af materialer, der er nyttigt til udførelse af en immunobestemmelse v.d fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

fortsættes

0653-86



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt i en væske.

- 5 Forskellige bestemmelsessystemer, der er både hurtige og følsomme, er blevet udviklet for at bestemme koncentrationen af et stof i en væske. Immunbestemmelser afhænger af bindingen af et antigen eller haptent til et specifikt antistof og har været særligt nyttige, fordi de giver en høj grad af specificitet og følsomhed. Disse bestemmelser anvender i almindelighed
- 10 et af de ovennævnte reagenser i mærket form, idet det mærkede reagens ofte omtales som sporstoffet. Immunbestemmelsesmetoder kan udføres i opløsning eller på en fast bærer og kan være enten heterogene eller homogene. Heterogene bestemmelser kræver en adskillelse af bundet sporstof fra frit (ubundet) sporstof.
- 15 Homogene bestemmelser kræver ikke et adskillelsestrin og giver derfor en betydelig fordel med hensyn til hastighed, bekvemmelighed og let automatisering sammenlignet med heterogene bestemmelser.
- 20 Radioimmunbestemmelser (RIA), der anvender radioisotoper som mærker, giver en høj grad af følsomhed og reproducerbarhed og er egnede til automatisering til hurtig behandling af et stort antal prøver. Alle RIA-metoder kræver imidlertid et adskillelsestrin, fordi den målte parameter (kernehenfald) ikke kan kontrolleres
- 25 ved ændring af målebetingelser eller komponenter. Desuden er isotoper dyre, har forholdsvis kort holdbarhed, kræver dyrt og indviklet udstyr, og omfattende sikkerhedsforanstaltninger til deres håndtering og bortskaffelse må følges.
- 30 Enzymer er også blevet anvendt som mærker til immunbestemmelse. Enzymimmunbestemmelse (EIA) kan være homogen og kræver ikke forsigtighedsforanstaltninger mod radioaktivitet. Konjugation af et enzym med et protein er i reglen simpel, og det fremkomne protein-enzymkonjugat er i almindelighed stabilt. EIA afhænger
- 35

imidlertid af reaktionen af enzymkonjugatet med et substrat til frembringelse af en farve, som måles og kræver derfor det yderligere trin at tilvejebringe et enzymsubstrat. Desuden må man lade hengå tilstrækkelig tid til farveudvikling, og
5 der må have et dyrt spektrofotometer til måling af farveændringen.

Nogle af de ovennævnte ulemper, der står i forbindelse med RIA eller EIA, er blevet overvundet ved anvendelse af fluoro-
10 chromer som mærker ved immunbestemmelse. Fluoroimmunbestemmelse (FIA) giver direkte påvisning af mærket og kan let tilpasses til homogene målingsmetoder. Kendte homogene FIA-metoder, der anvender organiske fluorochromer, såsom fluorescein eller rhodaminderivater, har imidlertid ikke opnået samme høje følsomhed som RIA eller EIA stort set på grund af lysspredning med urenheder suspenderet i bestemmelsesmediet og af baggrundsfluorescensemission fra andre fluorescerende materialer, der findes i bestemmelsesmediet. Spredning er særlig besværlig med fluorochromer, der har en kort (50 nm eller mindre) Stoke's
15 forskydning (forskellen mellem bølgelængden af absorptionen og emissionen). F.eks. er Stoke's forskydningen af fluorescein-isothiocyanat kun 20-30 nm. Baggrundsfluorescens er særlig besværlig, når bestemmelsesmediet er serum. Følsomheden af en bestemmelse i serum kan blive reduceret op til 100 gange sammenlignet med en identisk bestemmelse i puffer.
20
25

Udviklingen af tidsopløst fluorimmunbestemmelse (TR-FIA) har bidraget til at overvinde disse problemer. Ved denne fremgangsmåde bliver et fluorochrommærke med forholdsvis lang henfaldstid for fluorescensemissionen anslået med en lyspulsering, og fluorescensemissionen fra mærket måles efter en forud valgt
30 forsinkelse. Baggrundsemission med kort henfaldstid (i almindelighed mindre end 10 ns) ophører i det væsentlige under forsinkelsen og generer derfor ikke måling af den specifikke emission fra mærket. TR-FIA er mest effektiv, når det fluorescerende mærke har en henfaldstid på 100 til 1000 ns og en lang Stoke's forskydning (100 nm eller mere).
35

En klasse mærker, der tilfredsstiller kravene til TR-FIA er lanthanidchelaterne. Lanthanidioner, især ioner af europium og terbium danner meget fluorescerende chelater med lang Stoke's forskydning (op til 250 nm) med organiske ligander, især med β -diketoner. Liganddelen af chelatet absorberer stimuleringslys og overfører den absorberede energi til den chelaterede metalion. Metalionen udsender energien som fluorescens med særlig lang henfaldstid (1 ms). En diskussion af brugen af lanthanidchelater i TR-FIA er anført i *Analytical Biochemistry*, 137 335 (1984).

US-patent nr. 4.058.732 beskriver en fremgangsmåde og et apparat til brug af lanthanidchelater og tidsopløsning til analytisk fluorescerende spektroskopi.

US-patent nr. 4.283.382 beskriver en forbedring af TR-FIA, ved hvilken et lanthanidchelatomærke inkorporeres i et polymert perlegitter for at eliminere vandinduceret udslukning af mærkets fluorescensemission.

US-patent nr. 4.374.120 beskriver forøget stabilitet af lanthanidchelater opnået med et 1:1:1 chelat af lanthanid, β -diketon og en aminopolycarboxylsyreanalog, der har en funktionel gruppe, der er nyttig til binding af chelatet til et protein.

Europæisk patentansøgning EP 0.064.484-A2 beskriver en TR-FIA-fremgangsmåde, ved hvilken stoffet, der skal bestemmes, kobles til et lanthanid med en aminocarboxylsyreanalog, og lanthanidet efter inkubation spaltes fra stoffet, der skal bestemmes og chelateres til en β -diketon før påvisning.

De ovennævnte fremgangsmåder har forbedret FIA, men der er stadig et behov for en FIA med høj følsomhed, der kan udføres hurtigt uden at kræve en adskillelse af bundne og frie fraktioner.

En side af den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fastfaseimmunbestemmelse af en analyt uden adskillelse af bundne og frie fraktioner. En anti-analyt bundet til overfladen af en fast bærer, bringes i kontakt med en væske indeholdende analytten, et lysabsorberende materiale og et sporstof for analytten, som har et bundet mærke, der absorberer og udsender lys. Efter inkubation af bestemmelsesblandingen tilføjes stimuleringslys, og lysemission måles ved tidsopløsning. Størrelsen af lysemissionen sammenlignes med størrelsen af lysemission målt, når en eller flere kendte mængder analyt måles under i det væsentlige identiske betingelser.

I en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er mærket et fluorescerende farvestof med forholdsvis lang henfaldstid, og det lysabsorberende materiale er en UV-absorberende forbindelse, der har et absorptionsbånd, som overlapper sporstoffets absorptionsbånd.

I en særlig foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er analytten en serumprøve, det lysabsorberende materiale er en arylaminonaphtalinsulfonsyre, sporstoffet er et lanthanidchelate inkorporeret i en polymer partikel bundet til analytten, og sporstoffet og analytten konkurrerer om et utilstrækkeligt antal anti-analytbindingssteder.

I en anden udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen bindes i hovedsagen al analytten til både anti-analytten og sporstoffet ved en sandwichbestemmelse.

Ifølge fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres en fastfase TR-FIA, som ikke kræver en adskillelse af bundne og ubundne fraktioner, hvorved der opnås driftsmæssig enkelhed, hastighed og bekvemmelighed af homogene bestemmelser. Mærket påvises

direkte uden et yderligere substrat eller inkubationsperiode til udvikling af et påviseligt materiale. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen giver en meget følsom homogen bestemmelse, der i det væsentlige er fri for generende emission fra andre fluorescerende materialer, hvorved en analyt, der findes i meget lav koncentration kan bestemmes nøjagtigt. Fordi fremgangsmåden er ekseptionelt let at udføre, er den velegnet til automatisering.

Opfindelsen er nærmere anskueliggjort på tegningen, hvor

fig. 1 viser et glas og andre komponenter til brug i en kompetitiv immunbestemmelse i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen,

fig. 2 er en standardkurve af en bestemmelse for digoxin i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og

fig. 3 er en standardkurve af en bestemmelse for humant choriogonadotropin (HGC) i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Opfindelsen tilfredstilles af mange forskellige udførelsesformer men vil her blive beskrevet detaljeret i forbindelse med foretrukne udførelsesformer med den forståelse, at beskrivelsen kun skal betragtes som eksempler på opfindelsens principper og ikke skal begrænse opfindelsen til de illustrerede udførelsesformer. Opfindelsens omfang måles af kravene og deres ækvivalenter.

I overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan koncentrationen af et stof, der findes i en væske, bestemmes ved hjælp af en immunologisk reaktion. Stoffet, der i det følgende omtales som analytten, kan være et antigen, et haptent eller et antistof og kan findes i enhver egnet væske. F.eks. kan væsken være en puffer, saltvand eller en legems-

væske, såsom serum eller urin. I nogle tilfælde kan analytten isoleres fra en legemsvæske og derpå indføres i en anden væske, såsom en puffer med henblik på bestemmelse.

5 Ved udtrykket "immunologisk reaktion", som anvendt i den foreliggende beskrivelse, menes en specifik bindingsreaktion af et antigen og et antistof, en haptent og et antistof eller enhver passende analog af et antigen, et antistof eller en haptent, som også bindes specifikt.

10

Den immunologiske reaktion i fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres på overfladen af en fast bærer. Som det er velkendt, kan den faste bærer være enhver bærer, der ikke generer bestemmelsen. Eksempler på faste bærere, der kan anvendes, er glas og polymere materialer, såsom polyethylen, polystyren og lignende. Disse bærere kan fremstilles i enhver egnet form, såsom plader, fordybninger eller fortrinsvis rør eller glas. I den mest foretrukne udførelsesform ifølge opfindelsen udføres den immunologiske reaktion på indersiderne og bunden af et glas, fortrinsvis et plastglas, hvis ene ende er lukket.

20

En anti-analyt bindes til overfladen af den faste bærer. Anti-analytten kan være et antigen eller et antistof, som reagerer specifikt med analytten, eller den kan være en passende analog deraf, som reagerer specifikt med analytten. Binding af anti-analytten til den faste bærer kan udføres ved enhver sædvanlig fremgangsmåde, som f.eks. absorption eller kovalent binding. Disse fremgangsmåder er velkendte, og nærmere detaljer i så henseende anses for unødvendige for en fuldstændig forståelse af opfindelsen.

30

Mængden af anti-analyt, der skal bindes til den faste bærer, afhænger af den type bestemmelse, som skal udføres. Ved en kompetitiv immunbestemmelse, som vil blive beskrevet først, bliver en begrænset mængde anti-analyt bundet, hvorved utilstrækkelige bindingssteder står til rådighed, og analytten

35

og et sporstof for analytten beskrevet nedenfor konkurrerer om de tilgængelige steder. Ved en sandwichbestemmelse, som derefter vil blive beskrevet, bliver overskud af anti-analyt bundet, hvorved i hovedsagen al analyt er bundet til anti-analytten.

Ved en kompetitiv bestemmelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bliver anti-analytten, som er bundet til den faste bærer, bragt i kontakt med en ukendt mængde analyt i en væske, og bestemmelsesmediet inkuberes, som beskrevet nedenfor, for at inducere en immunologisk reaktion mellem analytten og anti-analytten. Et sporstof for analytten tilsættes så og en følgende inkubation udføres, således at bestemmelsesmediet indeholder fri analyt, frit sporstof, bundet analyt og bundet sporstof. Alternativt og fortrinsvis tilsættes analytten og sporstoffet samtidig, og der udføres en enkelt inkubation. Analyt og sporstof bundet til anti-analytten på den faste bærer, omtales herefter som den bundne fraktion, og analyt og sporstof, som ikke er bundet til anti-analytten, omtales i det følgende som den frie fraktion.

Sporstoffet giver et middel til at følge forløbet af den immunologiske reaktion og består ved en kompetitiv bestemmelse fortrinsvis af en kendt mængde af analytten eller en passende analog heraf koblet til et mærke. Mærket kan være ethvert stof, som absorberer og udsender lys, og som kan være koblet til analytten. Det foretrukne mærke udsender lys med lang henfaldstid, mest foretrukket fluorescensemission med lang henfald, som muliggør påvisning af det bundne sporstof uden nogen væsentlig genering fra andre lysudsendende materialer i bestemmelsessystemet. De mest foretrukne mærker absorberer stimuleringslys med bølglængde ca. 280-375 nm, udsender fluorescens med bølglængde ca. 580-630 nm og har en Stoke's forskydning fra ca. 200-250 nm. Henfaldstiden af fluorescensemissionen af de mest foretrukne mærker er fra ca. 0,5 til 1,0 ms.

Flourescerende mærker med lang henfaldstid, der er nyttige til fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er pyrenderivater og fortrinsvis lanthanidchelaterne. Den sidstnævnte klasse mærker består af en lanthanidion, såsom en ion af europium eller 5 terbium chelateret med en organisk ligand, som f.eks. en β -diketon. Eksempler på β -diketoner, der kan anvendes, er benzoylacetone, dibenzoylmethan, thenoyltrifluoracetone, benzoyltrifluoracetone, naphthoyltrifluoracetone, acetylacetone, trifluoracetylacetone, hexafluoracetylacetone og lignende. 10 Chelatering af β -diketonen med lanthanidionen udføres rutinemæssigt ved at inkubere reagenserne i passende tid. Den mængde lanthanidchelate, der skal anvendes til fremstilling af sporstoffet, afhænger af den type bestemmelse, der skal udføres og mængden af analyt i væsken og er velkendt for fagfolk.

15 Lanthanidchelatemærket kan kobles direkte til analytten på sædvanlig måde til fremstilling af sporstoffet. Alternativt og fortrinsvis inkorporeres mærket i en partikel, og partiklen bindes til analytten til dannelse af sporstoffet. Partiklen 20 kan være en polymerpartikel, såsom en perle. Enhver polymer kan anvendes, der er i stand til at inkorporere mærket og binde til analytten. De foretrukne polymerer er i det væsentlige transparente for både stimuleringslyset og fluorescensemissionen og indgår ikke i noget væsentligt antal uspecifikke overflade- 25 reaktioner med andre proteiner end analytten, som f.eks. andre proteiner i serum. En særlig foretrukket polymer til inkorporering af mærket er et polyacrylat, som f.eks. polymethylmethacrylat.

30 Mærket inkorporeres i partiklen på sædvanlige måder. F.eks. kan en polymer partikel indeholdende mærket fremstilles ved emulsionspolymerisation af en monomer i en opløsning indeholdende mærket. Ligeledes bindes partiklen til analytten på sædvanlig måde, fortrinsvis ved kovalent kobling af passende funktionelle grupper på analytten og på overfladen af partiklen. 35 De sædvanlige metoder til inkorporering af mærket i partiklen

og binding af partiklen til analytten er velkendte og anses for at ligge inden for en fagmands kunne og nærmere enkeltheder med hensyn til disse dele af fremgangsmåden er unødvendige for en fuldstændig forståelse af opfindelsen.

5

Bestemmelsesmediet indeholdende den bårne anti-analyt, væsken indeholdende analytten og sporstoffet kan inkuberes ved enhver temperatur og enhver tidsperiode, der er egnet til at lette den immunologiske reaktion og derved give de førnævnte bundne og frie fraktioner. Inkubationen kan udføres ved en temperatur fra ca. 0 til 50°C, fortrinsvis fra ca. 30 til 40°C og kan, men behøver ikke, resultere i ligevægt mellem disse fraktioner.

10

Et lysabsorberende materiale sættes til bestemmelsessystemet enten før eller efter den immunologiske reaktion og det kan være ethvert materiale, som har et absorptionsbånd, som overlapper sporstoffets absorptionsbånd, og som ikke generer den immunologiske reaktion. Egnede absorberende materialer eksemplificeres af, men begrænses ikke til stilbener, benzoxazoler, naphthalener og derivater deraf. En foretrukken gruppe er arylaminonaphthalensulfonsyrerne, som f.eks. 2-(p-anisidinylnaphthalen-6-sulfonsyre eller 1-anilinonaphthalen-8-sulfonsyre (1,8-ANS). Koncentrationen af absorberende materiale i bestemmelsesmediet kan være fra ca. 10^{-2} til 10^{-6} M, fortrinsvis fra ca. 10^{-3} til 10^{-4} M.

15

20

25

Bundet sporstof påvises ved at anvende stimuleringslys og måle lysemissionen fra mærket i nærværelse af det lysabsorberende materiale. Stimuleringslyset har fortrinsvis en bølgelængde i absorptionsintervallet for det anvendte mærke. Når mærket er et lanthanidchelat har stimuleringslyset fortrinsvis en bølgelængde fra ca. 280 til 375 nm, mest foretrukket ca. 343 nm og er diskontinuerligt, dvs. lyspulseringer skifter med perioder, hvor lyskilden er slukket. Lyspulseringerne kan være fra ca. 0,1 til 10 μ s, fortrinsvis ca. 3 μ s i varighed. Perioderne, hvor lyskilden er slukket, kan være fra ca. 0,1 til 2,0 ms, fortrinsvis ca. 0,9 ms.

30

35

Lysemissionen måles fortrinsvis ved tidskanalisering efter en forsinkelse på ca. 0,1 til 0,5 ms, fortrinsvis ca. 0,5 ms fra afslutning af en pulsering. Bølgelængden af lysemissionen afhænger af det anvendte mærke. Når mærket er et lanthanid-
5 chelat, er emissionsbølgelængden i almindelighed fra ca. 580 til 630 nm. Mest foretrukket måles emissionen ved en bølgelængde på ca. 614 nm.

Måling af lysemission ved tidskanalisering i overensstemmelse med den foretrukne fremgangsmåde ifølge opfindelsen kan udføres i et sædvanligt spektrofotometer, som f.eks. et Spex L-111 fluorimeter (SPEX Industries, Inc., Edison, New Jersey) udstyret med en fotondetektor med lukkemekanisme. Emission kan måles i enhver vinkel med strålen af stimuleringslys.
10 Fortrinsvis måles emission i en vinkel på 2 til 20° fra strålen af stimuleringslys.
15

Det lysabsorberende materiale i væskefasen i bestemmelses-systemet absorberer alt stimuleringslys og/eller emissionslys,
20 som går igennem væskefasen og forhindrer derved effektivt påvisning af emission fra frit sporstof. På den anden side absorberer bundet sporstof og udsender bagefter påviseligt lys, som ikke har passeret gennem væskefasen.

Fremgængsmåden og komponenterne til opfindelsen er vist på fig. 1, hvori et bestemmelsessystem 10 indbefatter et fortrinsvis polystyren glas 13, der har en åben ende 11 og en lukket ende 12. Glasset 13 indeholder en bundet fraktion 15 og en væskefase 17. Den bundne fraktion 15 indbefatter anti-analyt
30 19 bundet til indersiderne af glasset 13 og bundet analyt 21 og bundet sporstof 23. Bundet sporstof 23 omfatter bundet analyt 21, som har vedhængende polymer partikel 25 med inkorporeret fluorescerende farvestofmærke 27. Væskefasen 17 indbefatter fri analyt 21a, frit sporstof 23a og lysabsorberende
35 materiale 29.

Stimuleringslys, der er skematisk vist med linien 31, passerer gennem glasset 13 og absorberes af materialet 29, eller det kan passere gennem glasset og blive absorberet af bundet sporstof 23 eller frit sporstof 23a. Fluorescensemission fra bundet sporstof 23 indbefatter emission 33a ind i væskefasen 17, hvor den absorberes af materialet 29 og emissionen 33b ud ad gennem glasset 13 uden at passere gennem væskefasen 17, hvor den påvises med et fluorimeter 35. Emissionen 33c fra frit sporstof 23a ind i væskefasen 17 absorberes af materialet 29.

Stimuleringslys reflekteret fra den faste bærer generer ikke måling af emission fra bundet sporstof, fordi emission måles, når lyskilden er slukket. Baggrundlysemission med kort henfaldstid, der står i forbindelse med serum eller andre fluorescerende materialer i bestemmelsesmediet inklusive det, der står i forbindelse med den faste bærer selv, elimineres i det væsentlige ved tidsopløst måling af emission. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er den eneste lysemission, der påvises, derfor fra sporstof bundet til overfladen af den faste bærer.

Ved en kompetitiv bestemmelse, som ovenfor beskrevet, er størrelsen af lysemissionen direkte proportional med mængden af bundet sporstof og derfor omvendt proportional med mængden af analyt, der findes i væsken. Koncentrationen af analytten i væsken kan bestemmes ved at sammenligne størrelsen af lysemission målt ved bestemmelse af analytten med emissionen, der måles efter bestemmelse af et interval af kendte mængder af analytten bestemt under i hovedsagen identiske betingelser.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan tilpasses til en fastfase sandwichbestemmelse. Denne type bestemmelse er særlig nyttig til bestemmelse af en makromolekylær analyt, som f.eks. et protein. Enhver modifikation af fastfasesandwichbestemmelse kan anvendes. F.eks. kan anti-analytten være bundet til den faste bærer i tilstrækkelig mængde til at binde i det væsentlige al analytten gennem en første determinant på analytten. Den

bårne anti-analyt kan inkuberes med analytten, det lysabsorberende materiale og et sporstof, hvori sporstoffet omfatter en mærket ligand, der er specifik for en anden determinant på analytten. Liganden kan være et antigen, et antistof eller et bundet kompleks af antigen og antistof.

Det foretrukne mærke og lysabsorberende materiale og den foretrukne metode til stimulering og påvisning af emission kan være, som beskrevet ovenfor, for den kompetitive bestemmelse. Ved sandwichbestemmelsen i denne udførelsesform ifølge opfindelsen er koncentrationen af analytten, der findes i vasken imidlertid direkte proportional med størrelsen af lysemissionen.

Et reagensudstyr eller en pakke materialer kan anvendes til udførelse af en bestemmelse af en analyt i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Udstyret kan indbefatte en fast bærer, som har bundet dertil en anti-analyt, der er specifik for analytten, et lysabsorberende materiale og et sporstof for analytten, som har bundet dertil et mærke, der er i stand til at absorbere stimuleringslys og udsende påviseligt lys. Udstyret kan også indbefatte standarder for analytten, som f.eks. en eller flere analytprøver med kendt koncentration, eller det kan indbefatte andre reagenser, såsom andre mærkede eller umærkede specifikke antigener, antistoffer eller komplekser deraf, der er nyttige til udførelse af bestemmelsen. Komponenterne i udstyret kan leveres i separate beholdere, som f.eks. flasker, eller to eller flere af komponenterne kan være forenet i en enkelt beholder.

De følgende eksempler på et modelsystem og en bestemmelse for digoxin anføres for nærmere at beskrive opfindelsen.

EKSEMPEL 1

Polymethylmethacrylatperler på ca. 150 nm indeholdende ca. 1% naphthoyltrifluoracetone-europiumchelat (NTFA₃Eu) blev suspenderet i vand og sprøjtet på overfladen af polystyrenkuvetter. Kuvetterne blev tørret natten over ved omgivelsernes temperatur, hvorved perlerne klæbede til overfladen og ikke blev fjernet ved vask med vand. De således belagte kuvetter blev anvendt til at repræsentere den bundne fraktion af en TR-FIA, dvs. den faste bærer med dertil bundet anti-analyt og sporstof.

En vandig suspension af ca. 1×10^4 perler per ml blev sat til alle kuvetter for at repræsentere væskefasen i en TR-FIA indeholdende frit sporstof.

Vandige opløsninger af 1,8-ANS af de koncentrationer, der er anført i tabel I blev sat til kuvetterne. En kontrolkuvette fik kun vand.

Under anvendelse af et SPEX L-111 fluorimeter udstyret med en fotondetektor med lukkemekanisme, blev der tilført stimuleringslys af 343 nm vinkelret på kuvetterne. Fluorescensemissionen ved 614 nm blev målt efter en forsinkelse på 0,5 ms i vinkler på 11° og 90° med stimuleringslysstrålen. Resultaterne er anført i tabel I og viser virkningen af 1,8-ANS-koncentrationen på fluorescensemissionen af de suspenderede perler.

TABEL I

Koncentration af 1,8-ANS (mol per liter)	Antal påviste fotoner	
	11°	90°
0	31.500	32.300
1×10^{-2}	1.300	45
1×10^{-3}	1.300	876
1×10^{-4}	27.200	31.400

Det ses, at 1,8-ANS med en koncentration på $1 \times 10^{-3} \text{M}$ eliminerede al emission med undtagelse af den, der tilskrives de bundne perler.

5 EKSEMPEL 2

To grupper på hver tre kuvetter blev overtrukket, som beskrevet i eksempel 1 med to forskellige koncentrationer af perler. En kuvette i hver gruppe modtog vand og repræsenterede den bundne fraktion i en TR-FIA. En anden kuvette i hver gruppe modtog en suspension af perlerne og repræsenterede den bundne og frie fraktion i en TR-FIA. Den tredje kuvette i hver gruppe modtog en suspension af perlerne indeholdende $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 1,8-ANS.

15 Stimulering og måling af fluorescensemission ved 11° blev udført, som beskrevet i eksempel 1. Resultaterne er anført i tabel II.

20 TABEL II,

	<u>Antal påviste fotoner</u>	
	Kuvette 1	Kuvette 2
25 Belagt kuvette + vand (bundet fraktion)	2.300	40.000
Belagt kuvette + suspenderede perler (bundet og frie fraktioner)	32.400	71.000
30 Belagt kuvette + suspenderede perler + $5 \times 10^{-3} \text{m}$ 1,8-ANS (bundet og frie fraktioner og lysabsorberende materiale)	2.700	38.000

Det ses, at i nærværelse af det absorberende materiale, blev perlerne på kuvetteoverfladen (bundet fraktion) selektivt stimuleret, og deres fluorescensemission påvist i nærværelse af et stort overskud af perler i suspension (fri fraktion).

EKSEMPEL 3A. Fremstilling af de fluorescerende polymerpartikler.

5 En polymerperle bestående af butylmethacrylat:glycidylmethacrylat:sulfoethylmethacrylat i forholdet 92:6:2 og indeholdende 1% NTFA₃Eu blev fremstillet på følgende måde. Bismethylenacrylamid (0,05 g) og polyethylenoxid (0,1 g) blev opløst i afioniseret vand (25 ml) og acetone (4 ml). Der blev frem-

10 stillet en anden opløsning, som indeholdt butylmethacrylat (0,78 ml) sulfoethylmethacrylat (0,2 g) glycidylmethacrylat (0,5 ml) og NTFA₃Eu (25 mg). De to opløsninger blev sammenblandet, og pH-værdien indstillet til 5,5 med 1 N NaOH. Efter god omrøring under N₂ blev blandingen bestrålet i 12 timer

15 ved 7,50 Mr/time. Den hvide emulsion blev centrifugeret i en centrifuge med gradvis stigende hastigheder. Pilleren, der blev samlet ved 30.000 omdrejninger per minut, blev vasket tre gange med 0,1% polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) i saltvand med fosfatstødpude (PBS 0,01 M blanding af momo- og dinatriumphosphat i 0,15 M NaCl). Pilleren blev til

20 sidst suspenderet i en 10% opløsning af 1,3-diaminopropan, hvori pH-værdien blev indstillet til 10 med 1 N HCl. Suspensionen blev omrørt natten over og så vasket tre gange og suspenderet i 30 ml PBS.

25

B. Fremstilling af PSA-digoxin partikelkonjugatet.

En prøve (1,0 ml) af partikelsuspensionen beskrevet i A blev aktiveret ved tilsætning af glutaraldehyd ved en slutkoncentration på 1%. En 4 timers inkubation blev fulgt af tre vask-

30 ninger i PBS. Til 1 ml af de aktiverede perler blev sat 5 mg af et okseserumalbumin (BSA)-digoxinkonjugat. Blandingens blev omrørt natten over ved stuetemperatur. Perlerne blev vasket tre gange, suspenderet i 25 ml PBS og lagret ved 4°C.

35

C. Overtrækning af polystyrenkuvetter med kaninanti-digoxin-immunoglobulin.

5 En totusindeganges fortynding af kaninanti-digoxinimmunoglobulin blev fremstillet i 0,1M carbonatstødpude, pH 9,5. Denne opløsning blev pipetteret til 3 ml niveauet i kuvetterne. Efter inkubation ved stuetemperatur i 4 timer blev kuvetterne udsuget og vasket i rækkefølge med en 2% BSA-opløsning i PBS og til slut i PBS. Kuvetterne blev tørret og lagret ved 4°C.

10

D. Bestemmelse af en standardkurve for digoxin i fosfatstødpude.

15 Duplikerede fortyndingsrækker af digoxin blev fremstillet i PBS indeholdende BSA (2%) og Tween 20 (0,5%) i intervallet fra 1 til 10.000 ng/ml, og derefter blev 3 ml af hver af disse opløsninger og en blindprøve af PBS pipetteret i kuvetterne, der forud var belagt, som beskrevet i C. Til hver af disse kuvetter blev sat 30 µl af BSA-digoxinpartikelkonjugatet frem-

20 stillet i afsnit B. Kuvetterne blev inkuberet ved 37°C i 40 minutter. Til hver af kuvetterne blev sat 0,1M 1,8-ANS (30 µl) og fluorescensemission ved 614 nm blev målt efter en forsinkelse på 0,5 ms i en vinkel på 11° med stimuleringslysstrålen. Resultaterne er vist i tabel III og fig. 2.

25

TABEL III

	<u>Digoxinkoncentration (ng/ml)</u>	<u>Intensitet (fotoner)</u>
	0	8700
30	1	8700
	10	8200
	100	7000
	1000	6100
35	10000	4500

EKSEMPEL 4A. Fremstilling af anti-HCG immunoglobulinpartikelkonjugat.

5 En prøve (1,0 ml) af partikelsuspensionen beskrevet i eksempel 3A blev aktiveret ved tilsætning af glutaraldehyd ved en slutkoncentration på 1%. En 4-timers inkubation blev fulgt af tre vaskninger i PBS. Til 1 ml af de aktiverede perler blev
10 sat 50 μ l af en 1 mg/ml opløsning i PBS af et monoklonalt antistof betegnet HCG-13 udviklet på sædvanlig måde mod HCG. Blandingen blev omrørt natten over ved stuetemperatur. Perlerne blev vasket tre gange, suspenderet i 25 ml PBS og lagret ved 4°C.

15 B. Belægning af polystyrenkuvetter med monoklonalt anti-HCG-4 immunoglobulin.

En femtusindganges fortynding af et andet monoklonalt antistof udviklet mod HCG betegnet HCG-4 blev fremstillet i 0,1M
20 carbonatstødpude, pH 9,5. Denne opløsning blev pipetteret til 3 ml-niveauet i kuvetterne. Efter inkubation ved stuetemperatur i 4 timer blev kuvetterne udsuget og vasket i rækkefølge med en 2% BSA-opløsning i PBS og til slut PBS. Kuvetterne blev tørret og lagret ved 4°C.

25

C. Bestemmelse af en standardkurve for HCG i fosfatstødpude.

Duplikerede fortyndingsrækker af HCG blev fremstillet i PBS af 10-dobbelt koncentration i intervallet fra 0,15 til 1,5
30 $\times 10^5$ mIU/ml. Disse opløsninger og en blindprøve af PBS blev pipetteret i kuvetterne, der var blevet belagt som beskrevet i B. Efter en 1-times inkubation ved 37°C blev mikroperlerne (50 μ l) beskrevet i A tilsat, og inkubationen blev fortsat i 1 time til. Til hver af kuvetterne blev sat 0,1M 1,8-ANS
35 (30 μ l), og fluorescensemission ved 614 nm blev målt efter en forsinkelse på 0,5 ms i en vinkel på 11° med stimuleringslysstrålen. Resultaterne er anført i tabel IV og fig. 3.

TABEL IV

	<u>HCG-koncentration (mIU/ml)</u>	<u>Intensitet (fotoner)</u>
	0	1.000
5	0,15	1.380
	15	1.750
	1.500	2.000
	150.000	2.600

10 En fremgangsmåde ifølge opfindelsen til fastfasefluorimmunbestemmelse indbefatter således tilsætning af et lysabsorberende materiale til væskefasen i bestemmelsessystemet. Det lysabsorberende materiale absorberer al stimuleringslys og/eller emitteret lys med undtagelse af det, der absorberes af og ud-

15 sendes fra bundet sporstof, hvorved emissionen fra bundet sporstof kan påvises og måles i nærværelse af et stort overskud af frit sporstof. Adskillelse af den bundne og den frie fraktion undgås således, og der fås en enkel og bekvem homogen bestemmelse. Ved måling af lysemission fra det bundne sporstof under

20 anvendelse af tidsopløsning kan interferens fra reflekteret stimuleringslys og fra lysspredning og baggrundsemission minimeres, hvorved der kan opnås en højere følsomhed af bestemmelsen. Fremgangsmåden kan let tilpasses til alle modifikationer af fastfasekompetitive bestemmelsessystemer og systemer af

25 sandwichtypen. Opfindelsen indbefatter et udstyr af målematerialer, der kan anvendes til enten manuel bestemmelse eller automatiseret bestemmelse.

P a t e n t k r a v .

30 -----

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt i en væske, k e n d e t e g n e t ved, at
- 35 (a) der fremstilles en blanding ved at bringe en antianalyt bundet til overfladen af en fast bærer i kontakt med en væske indeholdende en ukendt mængde analyt, et lysabsorberende mate-

riale og et sporstof for analytten, hvilket sporstof indeholder et fluorescerende farvestof og vælges fra en gruppe sporstoffer, der udgøres af et antigen, et antistof og et bundet antigen-antistofkompleks, hvorhos det fluorescerende farvestof er bundet dertil, og sporstoffet reagerer specifikt med analytten,

(b) blandingen inkuberes,

10 (c) blandingen udsættes for en exciterende lyspuls, idet intensiteten og varigheden af lyspulsen er tilstrækkelig til at exciteringslyset delvis vil blive absorberet af sporstoffet,

15 (d) fluorescensstrålingen fra det bundne sporstof iagttages, hvilken emission klinger af i løbet af et tidsrum, der er tilstrækkelig langt til at emissionen kan iagttages efter afslutning af lyspulsen, og al lysemission hidrørende fra de andre komponenter i blandingen udover det bundne sporstof er klinget af, og

20 (e) mængden af analyt i væsken bestemmes ved at sammenligne fluorescensemissionen med fluorescensemissionen for en kendt mængde analyt.

25 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at analytten vælges fra en gruppe af analytter omfattende antigener, haptener og antistoffer, og antianalytten vælges fra en gruppe antianalytter omfattende antigener og antistoffer.

30 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at sporstoffet yderligere omfatter analytten, at det fluorescerende farvestof er bundet dertil, og at sporstoffet reagerer specifikt med antianalytten.

35 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at en begrænset mængde antianalyt, der er bundet til bæreren, samt analytten og sporstoffet bindes kompetitivt til antianalytten.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at i hovedsagen al analytten bindes til antianalytten, og at sporstoffet bindes til analytten.
- 5 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det fluorescerende farvestof er et lanthanidchelat.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at lanthanidchelatat indkorporeres i en polymerpartikel.
- 10 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at væsken er et serum.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det lysabsorberende materiale har et absorptionsbånd, som overlapper sporstoffets absorptionsbånd.
- 15 10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det lysabsorberende materiale er en arylaminonaphthalensulfonsyre.
- 20 11. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at intensiteten af pulsen er fra 1×10^{40} til 2×10^{40} fotoner.
- 25 12. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at pulsens varighed er ca. 1 - 10 μ s.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at pulsens bølgelængde er ca. 280 - 375 nm.
- 30 14. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at fluorescensemissionens bølgelængde er ca. 580 - 630 nm.
- 35 15. Fremgangsmåde ifølge krav 6, kendetegnet ved, at fluorescensemissionens afklingningstid er ca. 0,5 - 1,0 ms.

16. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at fluorescensemissionen måles mellem på hinanden følgende pulser.
- 5 17. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at fluorescensemissionen måles mellem 0,5 og 0,75 ms og en puls.
- 10 18. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at fluorescensemissionen måles fra en vinkel, som afviger fra 2 til 20° fra retningen af den exciterende lyspuls.
- 15 19. Fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt i en væske, k e n d e t e g n e t ved, at
- (a) der fremstilles en blanding ved at bringe en antianalyt, der er bundet til overfladen af en fast bærer, i kontakt med væsken, som indeholder en ukendt mængde analyt, et lysabsorberende materiale og et sporstof for analytten, hvilket sporstof
- 20 indeholder et påviseligt mærkestof, der er i stand til at absorbere og emitte lys,
- (b) man lader en tilstrækkelig tid gå til at analytten og sporstoffet kan bindes til antianalytten,
- 25 (c) blandingen udsættes for det exciterende lys,
- (d) lysemissionen fra det bundne sporstof iagttages i forhold til tiden, og
- 30 (e) mængden af analyt i væsken bestemmes ved sammenligning af den iagttagede lysemission med lysemissionen, som er opnået med en kendt mængde analyt.
- 35 20. Fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt, der findes i en serumprøve, k e n d e t e g n e t ved, at

- (a) der fremstilles en blanding ved at bringe en antianalyt, som er bundet til overfladen af en fast bærer, idet antallet af tilgængelige bindingssteder hos antianalytten er utilstrækkeligt til at binde hele analytten, i kontakt med en serumprøve indeholdende en ukendt mængde analyt, en arylaminonaphthalensulfonsyre og et sporstof for analytten, hvilket sporstof indbefatter analytten, hvortil der er bundet en partikel, hvori et lanthanidchelatomærkestof er inkorporeret,
- 5
- (b) blandingen inkuberes,
- 10
- (c) blandingen udsættes for en exciterende lyspuls med bølglængden ca. 280 - 375 nm og intensiteten 1×10^{40} - 2×10^{40} fotoner samt varigheden 1 - 10 μ s,
- 15
- (d) fluorescensemissionen fra det bundne sporstof med bølglængden ca. 580 - 630 nm og afklingningstiden ca. 0,5 - 1,0 ms iagttages, hvilken emission måles mellem på hinanden følgende excitationspulser fra en vinkel, som afviger 2 - 20° fra retningen af pulsen, og ca. 0,50 - 0,75 ms efter en afsluttet puls, og
- 20
- (e) mængden af analyt i serumprøven bestemmes ved at sammenligne fluorescensemissionen med den fluorescensemission, som iagttages, når en blanding indeholdende en kendt mængde af analyt bestemmes i overensstemmelse med trinene (a) til (e).
- 25
21. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g n e t ved, at partiklen er en polymerpartikel.
- 30
22. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g n e t ved, at lanthanidchelatatet er en europium- eller terbiumion, som er blevet chelateret med en β -diketon.
- 35
23. Fremgangsmåde til bestemmelse af en ukendt mængde analyt i en serumprøve, k e n d e t e g n e t ved, at

(a) der fremstilles en blanding ved at bringe en antianalyt, som er bundet til overfladen af en fast bærer, idet antallet af tilgængelige bindingssteder hos antianalytten er tilstrækkeligt til at binde i væsentlige hele analytten, i kontakt med
5 en væske indeholdende en ukendt mængde analyt, en arylamino-naphthalensulfonsyre og et sporstof for analytten, hvorhos der i sporstoffet indgår en ligand, som er specifik for analytten, og der til liganden er bundet en partikel, hvori et lanthanid-chelatmærkestof er inkorporeret,

10

(b) blandingen inkuberes,

(c) blandingen udsættes for en exciterende lyspuls med bølglængden ca. 280 - 375 nm og intensiteten 1×10^{40} - 2×10^{40}
15 fotoner samt varigheden 1 - 10 μ s,

(d) fluorescensemissionen fra det bundne sporstof med bølglængden ca. 580 - 630 nm og afklingningstiden ca. 0,5 - 1,0 ms iagttages, hvilken emission måles mellem på hinanden følgende
20 excitationspulser fra en vinkel, som afviger 2 - 20° fra retningen af pulsen, og ca. 0,5 - 0,75 ms efter en afsluttet puls, og

(e) mængden af analyt i serumprøven bestemmes ved at sammenligne fluorescensemissionen med den fluorescensemissionen, som iagttages, når en blanding indeholdende en kendt mængde analyt bestemmes i overensstemmelse med trinene (a) til (e).
25

24. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at partiklen er en polymerpartikel.
30

25. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at liganden vælges fra en gruppe ligander omfattende antigener, antistoffer og bundne antigen-antistofkomplekser.
35

26. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at lanthanidchelatatet er en europin- eller terbiumion, som er chelateret med en β -diketon.

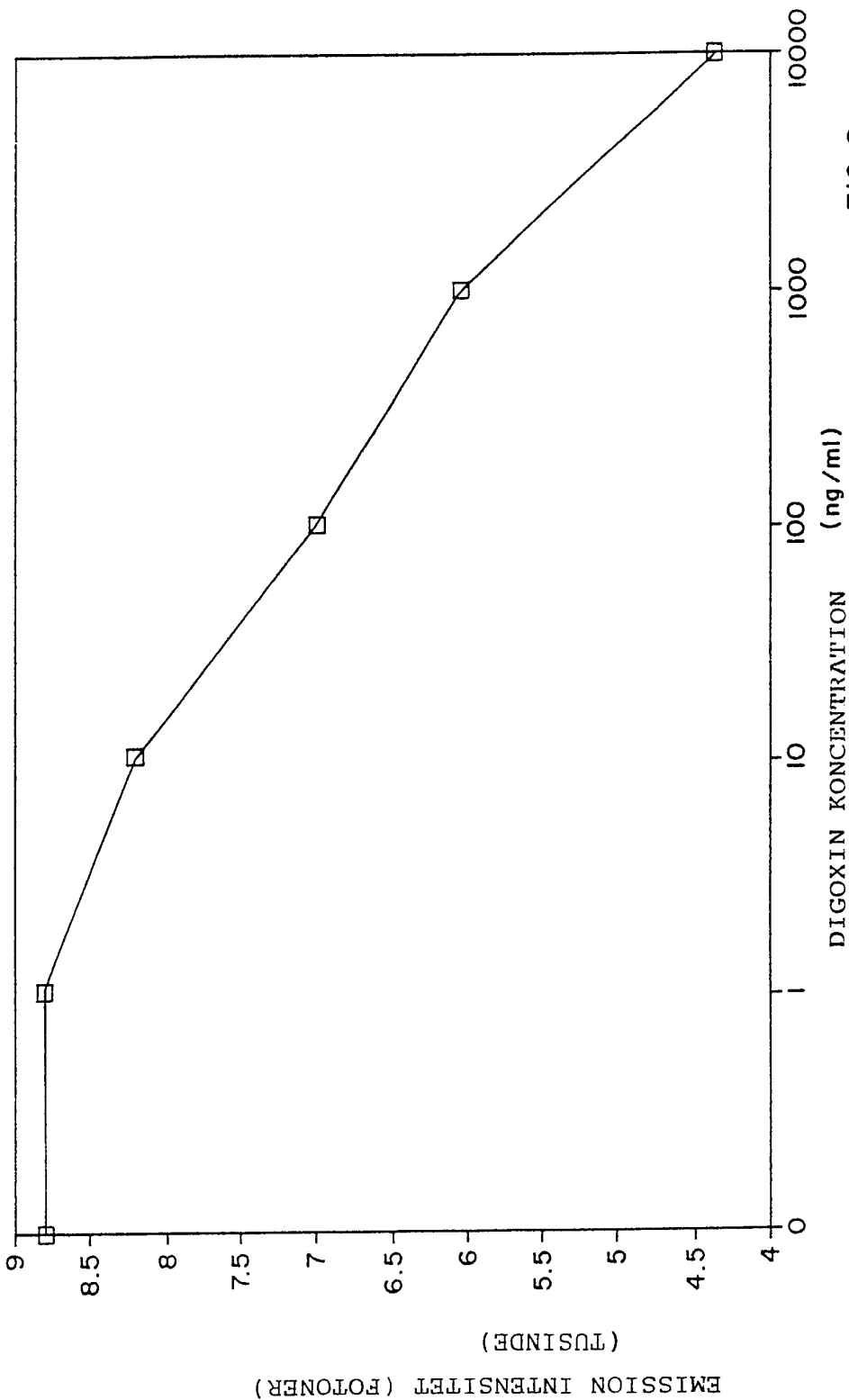


FIG. 2

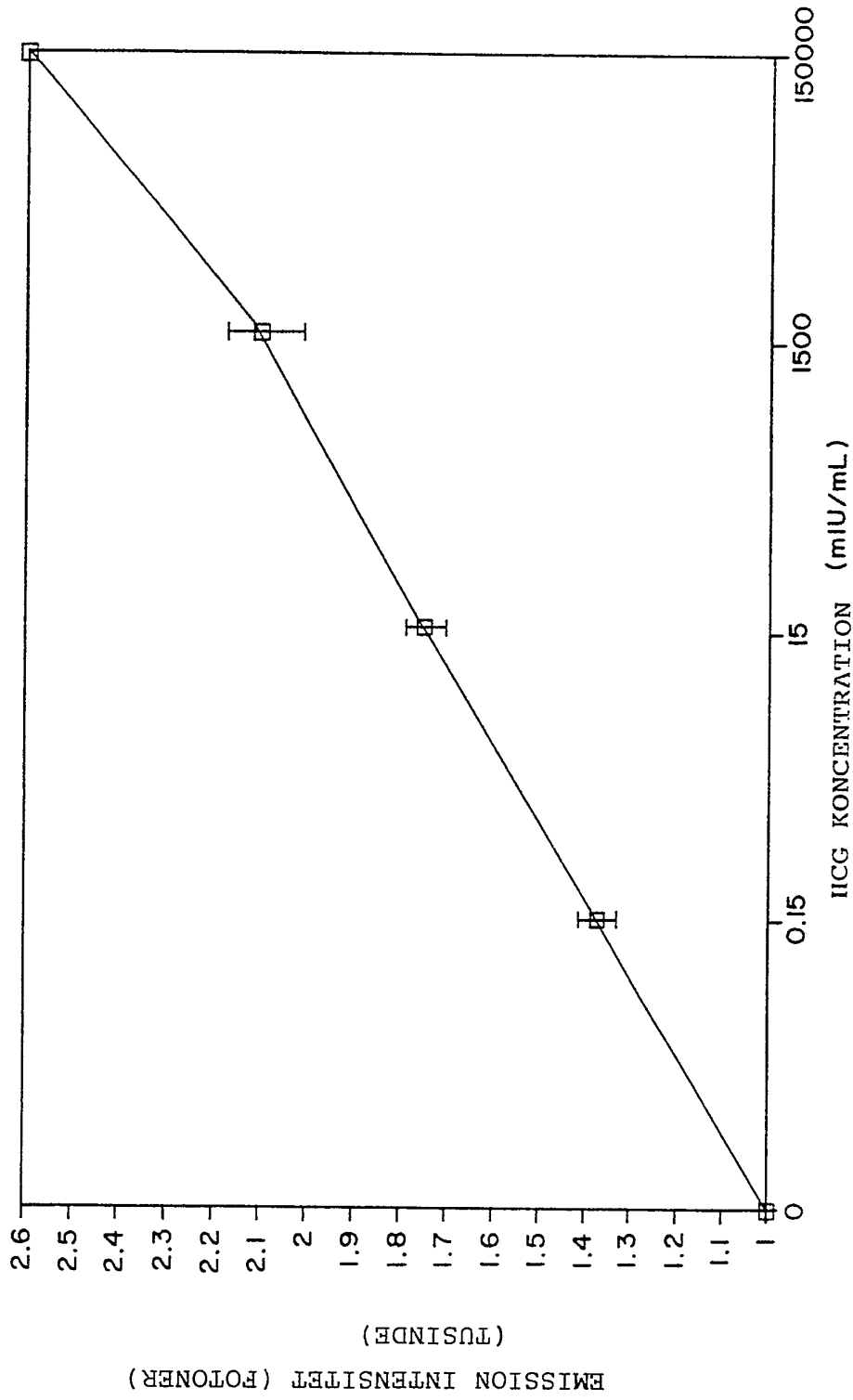


FIG. 3