(19) DANMARK (11) **DK 173781 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **G 01 N 33/532 G 01 N 33/58**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 06483**

(22) Indleveringsdag: **1988-11-21**

(24) Løbedag: **1988-11-21**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-05-20**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2001-10-08**

(30) Prioritet: **1987-11-19 NL 8702769**

(73) Patenthaver: **H.B.T. Holland Biotechnology B.V., Niels Bohrweg 13, NL-2333 CA Leiden, Holland**
Staat der Nederlanden (Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)), Bornsesteeg 53, NL-6700 AB Wageningen, Holland

(72) Opfinder: **Albert Willem Jacob Van Doorn, Jacob Marislaan 60, NL-6813 JX Arnhem, Holland**
Jan Herman Wichers, Tarthorst 703, NL-6708 JA Wageningen, Holland
Wilhelmus Martinus Jozef Van Gelder, M.L. Kingplantsoen 2, NL-6671 BP Zetten, Holland

(74) Fuldmægtig: **Patrade A/S, Fredens Torv 3 A, 8000 Århus C, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til bestemmelse i en prøve af en eller flere bestanddele i reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans under anvendelse af mindst en mærket bestanddel, en fremgangsmåde til fremstilling af den mærkede bestanddel og et testsæt til bestemmelse af immunobestanddele.**

(56) Fremdragne publikationer:
EP A 7654
EP A 32270
EP A 142810
EP A 163312
US A 4341757
Journal of Chromatography, bind 376 (1986) side 175-189

(57) Sammendrag:

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af immunokemisk reaktive bestanddele under anvendelse af en eller flere mærkede bestanddele opnået ved kobling af den pågældende bestanddel direkte eller indirekte til en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof, såsom Se, Te, S, P, C, Si, eller en uorganisk forbindelse deraf, som er fri for metalliske grundstoffer, såsom SiO_2. Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af en sådan mærket bestanddel samt et således mærket materiale per se og et testsæt indeholdende en sådan mærket bestanddel.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse i en prøve af en eller flere bindingskomponenter af reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans under anvendelse af den gensidige reaktivitet af sådanne komponenter og af mindst en mærket komponent opnået ved kobling eller adsorbering af partikler på en kolloid opløsning af mærkemidlet direkte eller indirekte til komponenten, som under eller efter fuldførelse af reaktionen, fortrinsvis efter separeringen af den bundne og den frie mærkede komponent, i nævnte prøve eller i en af de efter separeringen opnåede fraktioner bestemmer tilstedeværelsen og/eller mængden af mærkemidlet ved en metode, der er egnet til opnåelse af en kvalitativ eller kvantitativ indikation på den komponent, der skal bestemmes.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af en mærket bestanddel af reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans ved kobling eller adsorbering af partikler af en kolloid opløsning på mærkemidlet direkte eller indirekte til bestanddelen, og et testsæt til anvendelse ved bestemmelse af en immunobestanddel i en vandig prøve.

Som anvendt her betyder "bestanddel af reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans" substanser eller dele deraf, såsom receptor proteiner og antigeniske determinanter, som kan være til stede på overfladen af cellerne, og immunokemiske substanser, såsom haptener, antigener og antistoffer, som kan være til stede i vandige medier, især kropsvæsker, såsom blodplasma, serum og lignende, eller dyrkningsmedier til celler. Opfindelsen berører følgelig et antal histologiske områder, såsom vævs- og cellemærkning, hvor immunokemiske reaktioner finder sted, men også koblinger kan finde sted mellem det kolloidale mærkemiddel og en ikke-immunokemisk bestanddel, såsom DNA og/eller RNA, medens yderligere koblinger mellem det kolloidale mærkemiddel og andre makromolekylære strukturer, såsom enzymer, streptavidin etc., er mulige. Ud over disse områder berører opfindelsen også immunoanalyseområdet til f.eks. diagnostiske formål, såsom bestemmelse af antistoffer, anti-

gener eller haptener i vandige prøver. I den del af beskrivelsen, som følger herefter, vil opfindelsen blive nærmere beskrevet med særlig henvisning til anvendelse af opfindelsen på sidstnævnte område, d.v.s. diagnostiske immunoanalyser, men opfindelsen er ikke begrænset til sådan anvendelse, eftersom den er lige så anvendelig til histologiske og histokemiske undersøgelsesmetoder.

I europæisk patentskrift EP-A-0007654 angives der en oversigt over kendte immunokemiske metoder, hvori tilstedeværelsen af en given immunologisk bestanddel bestemmes kvalitativt og/eller kvantitativt, og som anvender de gensidige reaktioner mellem sådanne bestanddele, såsom reaktionen mellem antigen og antistof derimod. Disse kendte fremgangsmåder har hver visse ulemper eller ufordelagtige træk, som ifølge ovennævnte europæiske patentskrift kan elimineres ved i en fremgangsmåde af den i indledningen beskrevne art at anvende en metalmærket bestanddel, der er opnået ved kobling eller adsorbering af komponenten direkte eller indirekte til partikler af en vandig dispersion af et metal eller en metalforbindelse eller af polymerkerner belagt med et metal eller en metalforbindelse, hvor partiklerne har en størrelse på 6 - 100 nm.

Den beskevne metal-immunokemiske teknik er ikke blot mere følsom end de kendte radio- og enzym-immunoteknikker, men herudover gør den det muligt at påvise og bestemme mere end en immunologisk bestanddel i samme prøvemedium samtidig ved anvendelse af forskellige metalmærkninger.

De kolloide metalopløsninger kan være af metaller eller metalforbindelser, såsom metaloxider, metalhydroxider eller metalsalte. Som eksempler nævnes metallerne eller metalforbindelserne af guld, sølv, jern, nikkel, aluminium, chrom, bly, vanadium, kviksølv, mangan og generelt alle de metaller, som umiddelbart kan påvises ved hjælp af kendte teknikker.

Kolloide opløsninger af metaller er f.eks. sådanne af sølv, guld eller platin. Kolloide opløsninger af metalforbindelser er f.eks. sådanne af sølviodid, jernoxid, alumini-

umhydroxid, chromhydroxid, vanadiumoxid, jernhydroxid, manganhydroxid og kviksølvsulfid.

Fortrinsvis anvendes metaller eller metalforbindelser, som ikke forekommer i prøvemediet, og af disse specielt de, som kan påvises med udvalgte teknikker i så lav en koncentration som muligt.

I europæisk patentskrift nr. EP-A-0032270 er fremstillet en oversigt over mulighederne for en kvalitativ og/eller kvantitativ bestemmelse af en immunokemisk bestanddel, hvorved der anvendes en eller flere mærkede bestanddele, som er opnået ved direkte eller indirekte kobling, såsom en bestanddel eller bestanddele i partikler af en vandig dispersion af en hydrofob farve eller pigment eller af polymere kerner dækket med en sådan farve eller pigment.

I den tidligere europæiske patentansøgning nr. EP-A-0 298 368, som kun udgør del af den kendte teknik i henhold til Art. 54(3) EPC, er der beskrevet anvendelse af kolloidale ikke-metal-partikler, navnlig grundstoffer S, Se og Te, med henblik på mærkninger.

Det har overraskende vist sig, at ikke-metalliske grundstoffer eller uorganiske forbindelser deraf, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, også kan anvendes som en mærkning, og har visse fordele i forhold til anvendelsen af metalindeholdende mærkninger.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er følgelig karakteriseret ved til mærkningen at anvende en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse med et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, hvilke uorganiske forbindelser ikke indeholder metalliske grundstoffer.

Ifølge opfindelsen er foretrukne kolloide opløsnings-partikler phospor, carbon og/eller silicium. I en anden foretrukket udførelsesform er de anvendte kolloide opløsnings-partikler uorganiske forbindelser af selen, tellur, phosphor, svovl og/eller silicium, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, såsom siliciumdioxid.

Sådanne ikke-metalliske kolloide opløsninger kan fremstilles ved et stort antal i og for sig kendte metoder.

Til fremstilling af f.eks. en kolloid phosphoropløsning refereres der til Berichte 37, 14 (1904); for en kolloid siliciumopløsning til en artikel af G. Wegelin i Kolloid Z. 14, 65-69, 1914; og for en kolloid siliciumoxidopløsning til J. of Colloid and Interface Science 26, 62-69, 1968.

Til fremstilling af nogle af ovennævnte kolloide opløsninger udvikledes en ny metode, som anvender borhydridsalte til reduktion af oxider af de ikke-metalliske grundstoffer. Metoden er nærmere beskrevet i eksemplerne.

Den kolloide opløsnings partikler af ikke-metalliske grundstoffer bærer en ladning, som tilvejebringer en stabiliserende effekt på grund af gensidig frastødning. Ved tilsætning af i hovedsagen stærke elektrolytter ændres ladningsmønstret, hvilket resulterer i agglutinering og flokkulering. Dette kan forebygges ved indeslutning af partiklerne med makromolekyler med polære grupper, såsom proteiner, polyethylenglycoler, polymere carbohydrater, polyvinylalcoholer og lignende. Egnede beskyttende proteiner er antigener, antistoffer og anti-antistoffer eller immunokemisk aktive fragmenter deraf, eller haptener, koblet til immunokemisk inert beskyttende makromolekyler, som direkte resulterer i immunokomponenter mærket med partikler fra kolloide opløsninger af ikke-metalliske grundstoffer.

Det foretrækkes imidlertid ikke at anvende udelukkende immunobestandele til indeslutning af partikler af kolloide opløsninger af ikke-metalliske grundstoffer, men den immunokemiske reaktivitet er mindre, end det kan forventes, muligvis som et resultat af sterisk forhindring. Det har dog vist sig fordelagtigt, at indeslutningen kun delvist udføres med en imunobestanddel, og at den skal fuldføres med et andet beskyttende, men immunokemisk inert materiale, såsom inerte proteiner, f.eks. albumin, en polyethylenglycol eller andet polært makromolekyle. Et andet egnet indeslutningsmateriale er protein A eller beslægtede proteiner, der har reaktivitet med Fc delen af antistofferne. Efter indeslutningen af den kolloide opløsnings partikler af ikke-metalliske grundstoffer

af protein A, kan tilvejebringes en yderligere indeslutning med et ønsket antistof.

En anden mulighed er, at partiklerne af den kolloide opløsning af ikke-metalliske grundstoffer først indeslutte med en inert hydrofil polymer eller copolymer, hvorefter den immunologiske bestanddel kobles til indeslutningsmaterialet ved adsorption eller ved hjælp af covalente bindinger.

De efter indeslutningen opnåede kugler kan indeholde en enkelt kolloid partikel, men det er også muligt for polymeren at indeslutte mere end en kolloid partikel.

Den inerte polymers indeslutning af de kolloide partikler kan tilvejebringes på forskellige måder, såsom som det findes beskrevet i det ovennævnte europæiske patentskrift nr. EP-A-0007654.

De ikke-metalliske kolloide partikler, som anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, udviser et antal fordele i forhold til de metalliske kolloide partikler, der findes beskrevet i ovennævnte patentansøgning. Eksempler på sådanne fordele er:

1. Selen er mindre kostbart end guld.
2. Fremgangsmåden til fremstilling af kolloide carbonopløsninger er enklere og hurtigere end kolloide guldopløsninger.
3. Partikler af kolloide guldopløsninger er enten små og monodisperse eller større og ikke monodisperse (jfr. J.H.W. Leuvering, Thesis 1984), hvorimod dette ikke er tilfældet, eller i det mindste i meget mindre omfang er tilfældet, ved ikke-metalliske kolloide opløsninger (jfr. A. Watillon, J. Colloid and Interface Science 27 (3) 505-15, 1968). Disse partikler er monodisperse i praktisk taget en hvilken som helst størrelse.
4. Ikke-metalliske kolloide opløsninger kan omfatte såvel en negativ som en positiv ladning afhængig af fremstillingsmetoden (jfr. Gmelins Handbuch Anorg. Chemie 1953 A pp 26-27), hvilket ikke er tilfældet ved, eksempelvis, kolloide guldopløsninger.
5. Til anvendelse som en mærkning i følsomme testsystemer, såsom agglutinerings- (eller inhibering af agglutine-

rings-)metoder har teststrip-metodologien og plet/blot-teknikker, uorganiske ikke-metalliske kolloidale partikler med en relativt lav specifik masse fordelen af en højere opløsningsstabilitet ved større partikelstørrelser sammenlignet med uorganiske metalliske grundstoffer udvisende meget højere specifik masse. Større partikelstørrelser foretrækkes generelt, eftersom de forbedrer testens følsomhed: Detektering af antistof-kolloidale partikel-antigen komplekser dannet i den immunokemiske reaktion lettes af et højere indhold af den detekterbare mærkning i komplekserne. Ud over anvendelsen af større partikler kan også testfølsomheden forbedres ved kobling af en stor mængde immunokemisk inert protein til de kolloidale partikler på bekostning af mængden af specifikt bindende protein, som er koblet til nævnte partikler. Sådan en for- holdsregel vil resultere i en reduktion af den totale bindingskapacitet af mærkningskonjugatet.

I USA-patentskrift nr. US-A-4,341,757 er der beskrevet en fremgangsmåde, ved hvilken selen er en del af en mærkning. En selenforbindelse indføjes først i en organisk forbindelse, hvorefter helheden bindes til en immunokemisk bestanddel. Når et kompleks dannes med en anden specifik immunokemisk bestanddel, isoleres dette kompleks, og selenet i komplekset bestemmes eksempelvis ved atomisk adsorption.

I europæisk patentskrift nr. EP-A-0032270 er der beskrevet en fremgangsmåde, ved hvilken der gøres brug af et sporingsmiddel bestående af en dispersion i vand af en hydrofob farve eller pigment med en immunokemisk komponent bundet dertil ved hjælp af en kemisk reaktion. Det resulterende kompleks er i stand til at reagere med en specifik anden immunokemisk bestanddel. Farven eller/og pigmentet, der anvendes, giver farve til mærkningssystemet. Denne fremgangsmåde er ikke specifik, eftersom det ikke på forhånd kan udelukkes, at farvedelen af systemet - som i sig selv er en organisk bestanddel - reagerer med andre produkter, der er tilstede i prøvevæsken.

Immunobestanddelene, der er mærket med kolloide opløsnings-partikler af ikke-metalliske grundstoffer, anvendes som reagenter, almindeligvis i kombination med andre reagenter, til påvisning og mængdebestemmelse af haptener, antigener og antistoffer i et vandigt testmedium, hvortil alle slags immunokemiske teknikker, som anvendes i radioimmunoanalyser og enzym-immunoanalyser, er egnede.

Opfindelsen angår følgelig også testsæt til anvendelse ved sådanne immunokemiske teknikker og indeholder som den vigtigste bestanddel en immunobestanddel mærket med et ikke-metallisk grundstof eller en uorganisk forbindelse deraf, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, bestående af en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof, hvis partikler enten er direkte indesluttede af den ønskede immunobestanddel eller af en inert polymer, til hvilken immunobestanddelen er koblet eller adsorberet.

En af de konventionelle immunokemiske teknikker er den sammenlignende immunoanalyse, som kan anvendes til påvisning og bestemmelse af en immunobestanddel. Til påvisning af f.eks. et bestemt antigen omfatter denne metode kontakt af en prøve med en ukendt mængde antigen med enten en forud bestemt mængde af det pågældende antigen, mærket med et ikke-metallisk grundstof, og et uopløseligt antistof mod dette antigen, eller en forud fastlagt mængde uopløseligt antigen mærket og et antistof rettet mod dette antigen mærket, med et ikke-metallisk grundstof eller forbindelse deraf.

Efter fuldførelse af reaktionen bestemmes naturen og/eller mængden af det ikke-metalliske grundstof i den bundne eller frie fraktion, hvilket giver henholdsvis en kvalitativ og kvantitativ indikation på det antigen, der skal bestemmes. Mutatis mutandis, en lignende metode gælder for bestemmelse af andre immunobestanddele.

Andre metoder, der ofte anvendes, er såkaldte sandwichteknikker, som også er særligt egnede til anvendelse af en bestanddel mærket med et ikke-metallisk grundstof ifølge den foreliggende opfindelse. Ifølge disse teknikker uopløseliggøres en immunologisk bestanddel, eksempelvis, et antistof

i tilfælde af, at et antigen skal bestemmes, ved kobling deraf til en fast bærer.

Denne faste bærer er f.eks. den indre overflade af reaktionsbeholderen, hvori den immunokemiske reaktion gennemføres. Efter en første inkubering, eventuelt efterfulgt af et vasketrin, udføres en anden inkubering med et antistof mærket med et ikke-metallisk grundstof, hvorefter det ikke-metalliske grundstof eller en forbindelse deraf bestemmes i den bundne eller den frie fase.

Immunobestanddelene mærket med et ikke-metallisk grundstof egner sig også godt til anvendelse i såkaldte homogene immunoanalyser, d.v.s. immunoanalyser, hvori en separering mellem den mærkede immunologiske bestanddel bundet i den immunokemiske reaktion og den stadig frie bestanddel er unødvendig.

Sådanne analyser har den fordel, at de er enkle at udføre, tilvejebringer den ønskede information relativt hurtigt og egner sig udmærket til automation.

I den egentlige analyse inkuberes f.eks. prøven (eller standardopløsningen) indeholdende antigenet, der skal bestemmes, sammen med det mærkede antistof i bunden af en mikrotiterplade. Den immunokemiske reaktion mellem antigen og (mærket) antistof vil resultere i agglutinering. Den således inducerede agglutinering af partiklerne i en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof er efterfulgt af en farveændring, som kan overvåges f.eks. spektrofotometrisk eller med det blotte øje.

Til bestemmelse af små antigener, som i immunokemisk henseende er monovalente, gøres der brug af en agglutinerings-inhiberings-reaktion, som er baseret på det samme princip.

Ud over ovennævnte teknikker findes talløse andre immunokemiske teknikker, hvorved immunobestanddelen mærket med et ikke-metallisk grundstof kan anvendes som en reagent. Den foreliggende opfindelse gør det også muligt at påvise forskellige haptener, antigener, antistoffer eller kombinationer deraf i en prøve samtidigt ved anvendelse af en immunobestanddel som en reagent for hver af de bestanddele, der

skal påvises, hvilken immunobestanddel er mærket med en anden partikel fra en anden kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof.

Målingen af tilstedeværelsen og/eller koncentrationen af det ikke-metalliske grundstof i en bestemt fase af reaktionsblandingen kan udføres på talløse, i og for sig kendte måder. Eksempler er den kolorimetriske analyse, hvorved der gøres brug af den egenskab, at nogle kolloide opløsninger af ikke-metalliske grundstoffer er stærkt farvede dispersioner: Silicium = brun -> gul, phosphor = fluorescerende blå, som herudover ændrer farve efter fysiokemiske ændringer; den visuelle metode, som undertiden er tilstrækkelig til kvalitative analyser i lyset af ovennævnte kendsgerning, at nogle kolloide opløsninger af ikke-metalliske grundstoffer er farvede; anvendelse af flammeemissionsspektrofotometri eller enhver anden plasmaemissionsspektrofotometrisk metode, som muliggør samtidig bestemmelse, og den særdeles sensitive metode med flammeløs atomisk absorptionsspektrofotometri.

I europæisk patentskrift nr. EP-A-0158746 beskrives der en fremgangsmåde, hvori kolloidale metalpartikler kan gøres bedre synlige ved anvendelse af et fysisk fremkaldermedium. Dette fysiske fremkaldermedium er en sølvindeholdende bestanddel. Det har overraskende vist sig, at synligheden af kolloidale partikler bestående af ikke-metalliske grundstoffer også kan forøges med tre til ti gange størrelsen. Selv i i det væsentlige farveløse kolloide opløsninger eller forbindelser med kolloide opløsninger, som derfor udviser særdeles lav synlighed, kan således gøres synlige som beskrevet i de følgende eksempler.

Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere forklaret i forbindelse med følgende eksempel:

Eksempel: Fremstilling af "farvede", monodisperse kolloide siliciumdioxidopløsninger

Introduktion.

Kolloidale SiO_2-partikler tilvejebringes ved hydrolysering af tetraalkylsilicatestere i en blanding bestående af alcohol, vand og ammoniak. I denne proces spiller to slags reaktioner en rolle:

Hydrolyse af tetraalkylesteren til dannelse af reaktive silanoler; i denne proces fungerer kvælstof som en katalysator.

Transformering af de dannede silanoler til SiO_2 via en kondensationsreaktion.

Diameteren af de kolloidale SiO_2-partikler, der således dannes, er hovedsagelig bestemt af de indledningsvise vand- og kvælstofkoncentrationer i reaktionsblandingen. De kolloide silikatopløsninger, der opnås på ovennævnte måde, er opaliserende og udviser en mælkehvid farve.

"Farvning" af kolloidale siliciumpartikler bliver mulig ved at tillade hydrolysen af tetraalkyl-silicatesterne og de efterfølgende kondensations/polymerisationsreaktioner at finde sted i en reaktionsbeholder, som ud over de nævnte bestanddele indeholder en farve.

En sådan farve bør være opløselig i både alkohol og vand. I forbindelse med ladningsindvirkninger, da vil farvestoffer med alkaliske egenskaber være velegnede til "farvning" af de (netto) negativt ladede SiO_2 partikler.

Hvis den valgte farve udviser fluorescerende egenskaber, er læsning i UV-området af testresultater opnået ved hjælp af immunoanalyser, hvori "farvede" SiO_2 partikler fungerer som en mærkning, blandt mulighederne. Anvendelsen af fluorescerende SiO_2 mærkninger i immunoanalyser vil generelt forøge sådanne testsystemers følsomhed.

Anvendelsen af SiO_2 mærkninger "farvet" ved hjælp af farver, som klart kan skelnes fra hinanden, og forsynet med antistoffer med den ønskede specificitet frembyder muligheden for påvisning eller mængdebestemmelse af forskellige antige-

ner, antigeniske determinanter, inden for en prøve, både hurtigt og nøjagtigt.

Fremstilling af en kolloid "farvet" SiO2 opløsning

100 mg rhodamin-isothiocyanat (RITC) fra Sigma opløstes i 862 ml absolut ethanol fra Merck.

Til denne opløsning tilsattes 74 ml 25% vandig NH_3-opløsning fra Merck under anvendelse af en magnetisk omrører til blanding af begge opløsninger. Derefter tilsattes 64 ml tetraethylorthosilicat fra Merck hurtigt under kraftig omrøring. Den indledningsvise klart purpurfarvede/røde opløsning blev synligt opaliserende efter omkring 7 minutter.

Efter 120 minutter rensedes den kolloide opløsning ved dialyse (ved hjælp af en kunstig nyre). Under dialysen sank den kolloide opløsnings pH fra pH 10,0 til 6,5. Dialysen afsluttedes, så snart dialysatet ikke længere viste sig at indeholde spektrofotometrisk målelig

(A 1 cm/560 nm = 0)

mængder af RITC.

Der dannes således en opaliserende, purpurfarvet kolloid SiO_2-opløsning indeholdt i et vandigt medium.

Gennemsnitsdiameteren af de sfæriske SiO_2-partikler er 156 nm ± 8 nm.

Før anvendelsen fortyndes den kolloide opløsning til $A(\lambda = 560\ nm) = 1,0$.

N.B.

1. Ubeskyttet kolloid opløsning flokkuleres hurtigt under indvirkning af monovalente kationer, eksempelvis Na+. Under forudsætning af korrekte betingelser beskytter fysisk adsorption af proteinerne til de kolloidale siliciumpartikler i tilstrækkelig grad den kolloide opløsning fra elektrolyt-induceret flokkulering.
   En suspension behandlet i overensstemmelse med protokollen, og til hvilken der, i stedet for 64 ml tetraethyl-orthosilicat, tilsattes 64 ml vand, udviser ingen

tydelige tegn på flokkulering efter tilsætning af elektrolyten.

Dialysen af denne suspension fører til dramatisk dekolorering. Alt dette indikerer, at kolloidale RITC partikler ikke er tilstede, og at "farvede" SiO_2 partikler er tilstede i den farvede kolloide opløsning fremstillet ifølge ovennævnte fremgangsmåde.

2. Den fysiske adsorption af protein til RITC-"farvede" SiO_2 partikler i alkalisk medium, pH 9,5, frembyder teoretisk muligheden for, at proteinet bindes covalent via en tilsætningsreaktion, der involverer proteinets $-NH_2$- og/eller -SH-grupper til isothio-cyanatgruppen af RITC, i den udstrækning disse CNS-grupper er tilgængelige for proteinet. Ud over den mulige binding af proteinet til SiO_2 kan der eventuelt også være en uønsket binding af protein med RITC. Under forhold med lav(ere) pH vil den beskrevne tilsætningsreaktion blive vanskeligere.

Med hensyn til specificiteten af reaktionen mellem en RITC-SiO_2-mærket immunoglobulin og et (protein) antigen er det også vigtigt at udelukke en tilsætningsreaktion.

(c) Adsorption af monoclonal mus-IgG til kolloidalt RITC/SiO_2

Alle de følgende arbejdsoperationer er udført ved stuetemperatur, med mindre andet er angivet.

5 ml RITC/SiO_2-kolloid opløsning justeres til pH 7,0 ved hjælp af 0,1 M K_2CO_3.

50 µl museasciter tilsættes under omhyggelig omrøring til 5 ml neutraliseret RITC/SiO_2-kolloid opløsning. Efter 15 minutters inkubering fyldes op med vand til 15 ml.

Det dannede RITC/SiO_2-IgG (asciter) konjugat centrifugeres ved 1300 x g (4 °C) i 5 minutter. Supernatanten indsamles på et sugefilter, og den løse pellet bestående af konjugatet resuspenderes i 500 µl 5 mM NaCl-opløsning.

Testprocedure og resultater

1,2 x 5,5 cm nitrocelluloseprøvestrimler udskæres fra nitrocellulosepapir med en porediameter på 0,45 µm. En koncentrationsserie af gede-anti-muse polyclonalt IgG (1280 ng - 2,5 pg) spottes. Som en negativ kontrol inddrages en koncentrationsserie af β-galactosidase (1500 ng - 2,0 pg).

Krydsinkubering af de forskellige strimler udføres med både RITC/SiO_2-IgG (asciter) konjugat og med ubeskyttet RITC/SiO_2 kolloid opløsning anvendende en 1:50 fortynding i PBS + 1 % BSA i 2 timer i det højeste. Under inkuberingen omrystedes inkuberings-blandingen plus strimler kraftigt i polypropylenrør på et rysteaggregat.

Gede-anti-muse spots farves specifikt af RITC/SiO_2-IgG (asciter) konjugat op til 40 ng. Gede-anti-muse spots giver ingen specifik farvning med ubeskyttet RITC/SiO_2 kolloid opløsning.

β-galactosidase spots udviser overhovedet ingen specifik farvning, heller ikke med RITC/SiO_2-IgG (asciter) konjugatet eller med ubeskyttet RITC/SiO_2 kolloid opløsning.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til bestemmelse i en prøve af en eller flere bestanddele af reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans, hvor der gøres brug af den gensidige reaktivitet af sådanne bestanddele og af mindst en mærket bestanddel opnået ved kobling eller adsorbering af partikler af en kolloid opløsning af mærkemidlet direkte eller indirekte til bestanddelen, hvor der under eller efter fuldførelse af reaktionen, fortrinsvis efter separeringen af bindingen og den frie mærkede komponent i nævnte prøve eller i en af fraktionerne opnået efter separering bestemmes tilstedeværelsen og/eller mængden af mærkemidlet ved en metode, der er egnet til det formål at opnå en kvalitativ eller kvantitativ indikation på den bestanddel, der skal bestemmes, k e n d e t e g n e t v e d at anvende en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse med et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, hvilke uorganiske forbindelser ikke indeholder metalliske grundstoffer.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t v e d , at den mærkede bestanddel opnås ved til en kolloid opløsning at tilsætte et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, en forud bestemt mængde af den bestanddel, der skal mærkes, hvor sidstnævnte bestanddel bringes til at omslutte den kolloide opløsnings partikler helt eller delvist, og fortrinsvis efterfulgt af yderligere omslutning med et inert polært makromolekyle.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 k e n d e t e g n e t v e d , at den mærkede bestanddel opnås ved tilsætning til en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof

udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, et eller flere inerte hydrofile makromolekyler, som omslutter de ikke-metalliske partikler, hvorefter bestanddelen kobles til det omsluttende materiale ved adsorption eller via covalente bindinger.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 k e n d e t e g n e t v e d , at den mærkede bestanddel opnås ved at anbringe en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P. grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, i et medium af monomerer, at bringe monomererne til at polymerisere eller copolymerisere in situ, hvorpå omslutning af partiklerne af den kolloide opløsning af det ikke metalliske grundstof eller uorganisk forbindelse deraf, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, følger, og dernæst adsorption eller covalent kobling af bestanddelen til det polymere materiale.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4 k e n d e t e g n e t v e d , at partiklerne af den kolloide opløsning af et ikke-metallisk grundstof er udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, som ikke indeholder metalliske grundstoffer, først beskyttes af et hydrofilt makromolekyle, hvorefter (co)-polymerisation finder sted ved hjælp af en uorganisk initiator.

6. Fremgangsmåde ifølge et eller flere de foregående krav k e n d e t e g n e t v e d , at der som kolloide opløsningspartikler anvendes grundstof phosphor, carbon og/eller silicium.

7. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af de foregående krav k e n d e t e g n e t v e d , at der som den kolloide opløsnings partikler anvendes siliciumdioxid.

8. Fremgangsmåde ifølge et eller flere de foregående krav k e n d e t e g n e t v e d , at bestanddelen(e), der skal bestemmes, består af et eller flere recep-

torproteiner og/eller antigeniske determinanter, der er tilstede på overfladen af celler.

9. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af de foregående krav k e n d e t e g n e t v e d , at den eller de bestanddele, der skal bestemmes, består af en eller flere immunologiske bestanddele, såsom haptener, antigener eller antistoffer, der forefindes i en vandig prøve.

10. Fremgangsmåde til fremstilling af en mærket bestanddel af reaktionen mellem et specifikt bindende protein og den tilsvarende bindelige substans ved kobling eller adsorbering af partikler fra en kolloid opløsning af forbindelsen direkte eller indirekte til bestanddelen k e n d e t e g n e t v e d til mærkningen at anvende en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, hvilken uorganisk forbindelse ikke indeholder metalliske grundstoffer.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10 k e n d e t e g n e t v e d til mærkningen at anvende en kolloid opløsning af partikler af grundstof phosphor, carbon og/eller silicium eller siliciumdioxid.

12. Testsæt til anvendelse ved bestemmelse af en immunobestanddel i en vandig prøve, k e n d e t e g n e t v e d , at det omfatter

(a) en mærket immunobestanddel indeholdende som mærkemiddel partikler af en kolloid opløsning af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, hvilken uorganisk forbindelse ikke indeholder metalliske grundstoffer; og

(b) andre reagenter.

13. Mærket materiale bestående af en immunobestanddel (eksempelvis, immunoglobulin, protein, hapten) eller et andet makromolekylært organisk materiale (eksempelvis, DNA, RNA) indeholdende som et mærkemiddel en kolloid opløsning af partikler af et ikke-metallisk grundstof udvalgt fra gruppen

omfattende grundstof P, grundstof C og grundstof Si eller en uorganisk forbindelse af et grundstof udvalgt fra gruppen omfattende S, Se, Te, P og Si, hvilken uorganisk forbindelse ikke indeholder metalliske grundstoffer.

5