

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 159799 B

(21) Patentansøgning nr.: 2956/79

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/53

(22) Indleveringsdag: 13 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 14 jan 1980

(44) Fremlagt: 03 dec 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 jul 1978 NL 7807532

(71) Ansøger: *AKZO N.V.; Jssellaan 82; Arnhem, NL

(72) Opfinder: Johannes Hendrikus Wilhelmus *Leuving; NL

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af en eller flere komponenter i reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof, prøveudstyr til anvendelse ved fremgangsmåden og frysetørret reagens til anvendelse ved fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer

DK freml.skrift nr. 113958, 119282
GB pat. nr. 1486826

(57) Sammendrag:

2956-79

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af en eller flere komponenter af reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof, ved hvilken der anvendes en eller flere mærkede komponenter, som er fremkommet ved at koble partikler af en dispersion af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbindelse, og som har en partikelstørrelse på mindst 5 nm, direkte eller indirekte til den ønskede komponent af reaktionen. Under reaktionen eller efter en tilstrækkelig reaktionstid bestemmes de fysiske egenskaber og/eller mængden af metal og/eller det dannede metalholdige agglomerat i prøven, eller eventuelt efter en adskillelse af de bundne og frie metalmærkede komponenter i en af de afledte fraktioner på i og for sig kendte måder.

DK 159799 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af en eller flere komponenter i reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof i en vandig prøve under anvendelse af den kendte bindingsaffinitet af sådanne komponenter til hinanden. Disse komponenter kan være receptorproteiner eller immunokemiske komponenter, såsom haptener, antigener eller antistoffer.

Der kendes et stort antal immunokemiske metoder, ved hvilke tilstedeværelsen af en vis immunologisk komponent bestemmes kvalitativt og/eller kvantitativt ved at udnytte de gensidige reaktioner mellem disse komponenter, såsom reaktionen mellem antigen og antistoffet til dette antigen.

Ved undersøgelsen af sådanne reaktioner til påvisning og/eller bestemmelse af den ønskede komponent kan der gøres brug af hjælpemidler, f.eks. fysiske hjælpemidler, såsom et elektronmikroskop, eller der kan gøres brug af et reagens, som er forsynet med en mærkning, der kan påvises eller bestemmes i en lavere koncentration end det dannede immunokompleks selv.

Som eksempler på kategorien af kvalitativ immunokemisk teknik kan nævnes immunodiffusionsmetoden udviklet i 1948 af Ouchterlony og varianten deraf, immunoelektroforese, udviklet i 1953 af Grabar. Radial immunodiffusionsmetoden udviklet af Mancini i 1965 kan anvendes kvantitativt.

Immunodiffusionsteknikken kan karakteriseres ved anbringelse af et tyndt lag agar på en glasplade, hvorefter der fremstilles to huller i gelen, lidt fra hinanden. Prøvevæsken med antigen indføres i et af hullerne, og et antiserum i det andet. Som følge af diffusionen af de to stoffer i gelen, møder de hinanden og danner en synlig udfældningslinie. Selv om denne metode er forholdsvis simpel, har den et antal ulemper, især den kendsgerning, at diffusionen varer nogen tid, og at resultaterne i reglen kun giver en kvalitativ indikation. De

andre immunokemiske metoder har også deres ulemper, som bortset fra specifikke ulemper i almindelighed består af en for lang varighed af prøven, en lav følsomhed og/eller tilvejebringelse af kun kvalitative indikationer.

- 5 Foruden disse immunokemiske metoder med ikke-mærkede stoffer, er der udviklet nogle metoder med mærkede stoffer i de senere år, hvoriblandt der kan nævnes hæmagglutinationsprøven, ved hvilken en af komponenterne bindes til overfladen af erythrocyter, immunofluorescenceteknikken, ved hvilken en af komponenterne mærkes med en fluorescerende forbindelse (fluorophor),
10 den radioimmunologiske bestemmelse udviklet af Yalow og Berson, ca. 1959, ved hvilken der i stedet for en fluorophor anvendes et radioaktivt atom eller en radioaktiv gruppe som mærke, og den nyeste teknik til enzymimmunologisk bestemmelse, hvorom den første offentliggørelse fremkom i 1971 fra to
15 grupper, der arbejder uafhængigt af hinanden, nemlig de svenske forskere Engvall og Perlmann og de hollandske Schuurs og van Weemen. Den sidstnævnte bestemmelse er i princippet analog med de kendte radioimmunologiske bestemmelser, men med
20 den forskel, at der anvendes et enzym som mærke i stedet for radioaktiv mærkning.

- Den meget anvendte radioimmunologiske bestemmelse har givet mange fordele, men der findes nogle væsentlige ulemper i forbindelse med denne metode, såsom risikofaktoren, der står i
25 forbindelse med at arbejde med radioaktivt materiale, de høje priser for reagenser og apparat, den dårlige stabilitet af radioaktivt mærkede reagenser og det krav, at kun kvalificeret personale får lov at udføre disse bestemmelser.

- Den enzymimmunologiske bestemmelsesmetode har ikke disse
30 ulemper, men det er alligevel ønskeligt, at der udvikles ny bestemmelsesteknik, som er endnu mere følsom, kan udføres hurtigere, lettere kan automatiseres og/eller gøre det muligt at bestemme mere end én immunokomponent samtidigt.

Desuden er der et stort behov for en pålidelig og praktisk bestemmelse af receptorproteiner.

Dette opnås ved den foreliggende opfindelse, der angår en fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af en eller flere komponenter af reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof i en vandig prøve under anvendelse af den kendte bindingsaffinitet af disse komponenter til hinanden, og fremgangsmåden er ejendommelig ved, at der anvendes en eller flere mærkede komponenter, fremkommet ved kobling direkte eller indirekte af den ønskede komponent af reaktionen til partikler i en vandig dispersion af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbindelse, og som har en partikelstørrelse på mindst 5 nanometer, idet under reaktionen eller efter en passende reaktionstid, eventuelt efter adskillelse af de bundne og frie mærkede komponenter, de fysiske egenskaber og/eller mængden af metallet og/eller det dannede metalholdige agglomerat bestemmes i prøven eller en af de afledte fraktioner på i og for sig kendte måder, hvilken bestemmelse giver en kvalitativ og/eller kvantitativ indikation af komponenten eller komponenterne, som skal påvises og/eller bestemmes.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er særligt egnet til bestemmelse af immunokemiske komponenter, såsom haptener, antigener og antistoffer.

Partiklerne i den vandige dispersion af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner, overtrukket med et metal eller en metalforbindelse, har en partikelstørrelse på mindst 5 nanometer og fortrinsvis 10 til 100 nanometer. Dispersioner med en partikelstørrelse på 10 til 100 nanometer af den disperse fase er i reglen soler, men andre typer dispersioner er ikke udelukket.

Komponenten, der skal mærkes, kobles direkte eller indirekte

til de disperse partikler. Ved kobling forstås enhver kemisk eller fysisk binding, såsom binding via kovalente bindinger, via hydrogenbindinger, polær attraktion og adsorption.

5 Hvor der i den foreliggende beskrivelse anvendes udtrykket metalsolpartikler, skal dette forstås som betegnende partikler af en sol bestående af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbindelse.

10 Brugen af metalsolpartikler især af guldsoler, som er dækket på overfladen med antistoffer, til påvisning af fordelingen af et antigen over en celleoverflade ved hjælp af scanningelektronmikroskopi, hvor metalsolpartiklerne anvendes som kontrastforøgende mærke, er allerede blevet beskrevet for nogle år siden (se en artikel af M. Horisberger i 15 Experientia, side 1147-1149, 15. oktober 1975), men anvendelsen af disperse partikler, fortrinsvis metalsolpartikler som mærke for en immunologisk komponent til en in vitro kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af immunologiske komponenter, såsom haptener, antigener og antistoffer i et vandigt prøve- 20 medium er ikke tidligere beskrevet og har overraskende vist sig at være mulig.

Den immunokemiske teknik med metalsolpartikler ifølge opfindelsen kan være ikke blot mere følsom end den kendte radioimmuno- og enzymimmunoteknik, men gør det endvidere muligt 25 at påvise og bestemme mere end én immunologisk komponent i samme prøvemedium samtidig ved at anvende solpartikler af forskellig kemisk sammensætning som mærker.

30 Metalsolerne kan være af metaller eller metalforbindelser, såsom metaloxider, metalhydroxider og metalsalte eller af polymere kerner overtrukket med metaller eller metalforbindelser. Som eksempler kan nævnes metallerne platin, guld, sølv og kobber og metalforbindelserne sølvjodid, sølvbromid, kobberhydroxid, jernoxid, jernhydroxid, aluminiumhydroxid,

chromhydroxid, vanadinoxid, arsensulfid, manganhydroxid,
blyulfid, mercurisulfid, bariumsulfat og titandioxid.
Generelt kan anvendes alle metaller eller metalforbindelser,
5 som let kan påvises ved hjælp af kendt teknik.

Det er sommetider fordelagtigt at anvende soler med disper-
gerede partikler bestående af polymere kerner, overtrukket
med ovennævnte metaller eller metalforbindelser. Disse par-
10 tikler har lignende egenskaber som den disperse fase af
rene metaller eller metalforbindelser, men størrelse, vægt-
fylde og metalindhold kan kombineres optimalt.

Fortrinsvis anvendes metaller eller metalforbindelser, som
15 ikke er tilstede eller kun er tilstede i meget små mængder
i prøvemeditet, især de metaller eller metalforbindelser, som
har lav sporingegrænse ved egnet analyseteknik.

Metalsolpartiklerne, der skal anvendes som mærke, kan frem-
20 stilles på mange forskellige måder, der er kendt i sig selv.
Til fremstilling af f.eks. en guldsol kan henvises til en
artikel af G. Frens i Nature Physical Science 241, 20 (1973).

Metalsolpartiklerne bærer en ladning, som giver en stabili-
25 serende virkning ved gensidig frastødning. Ved tilsætning af
hovedsagelig stærke elektrolytter ændres ladningsmønstrer,
som følge af hvilket der sker aggregation og flokkulation.
Dette kan forhindres ved at overtrække partiklerne med makro-
molekyler, som har polære grupper, såsom proteiner, polyethy-
30 lenglycoler, polymere kulhydrater og polyvinylalkoholer.

Som beskyttende proteiner er det muligt at anvende antigener,
antistoffer og anti-antistoffer, eller immunokemisk aktive
fragmenter deraf, eller haptener, som er blevet koblet til
35 immunokemisk indifferente beskyttende makromolekyler, hvilket
resulterer direkte i immunokomponenter mærket med metalsol-

partikler.

Det er ikke nødvendigt, at immunokomponenter anvendes udelukkende til overtrækning af metalsolpartiklerne, for selv om dette giver en stabiliserende virkning, kan den immunokemiske reaktionsdygtighed være mindre end forventet, sandsynligvis på grund af sterisk hindring. Det har derfor vist sig fordelagtigt også at overtrække kun delvis med en immunokomponent og at fuldende overtrækningen med et andet beskyttende, men immunokemisk indifferent materiale, såsom indifferente proteiner, f.eks. albumin, en polyethylenglycol eller et andet polært makromolekyle. Som overtrækningsmateriale kan der også gøres brug af protein A eller beslægtede proteiner, som har reaktionsdygtighed over for Fc-delen af antistoffer. Efter overtrækning af metalsolpartiklerne med protein A kan der bevirkes en yderligere overtrækning med et valgt antistof.

En anden mulighed består i først at overtrække metalsolpartiklerne med et indifferent hydrofilt makromolekyle, f.eks. en polymer eller copolymer, hvorefter den immunologiske komponent kobles med overtræksmaterialet ved adsorption eller ved kovalent binding.

De små kugler fremkommet efter overtrækning kan indeholde en enkelt metalsolpartikel, men det er også muligt, at den polymere indeslutter mere end en metalsolpartikel.

Overtrækningen af metalsolpartiklerne med den indifferente polymer kan ske på to måder, enten ved at bringe metallsol i berøring med den polymere eller ved indføring af metallsol i omgivelser indeholdende en monomer eller forskellige monomere og bringe disse til at polymerisere eller copolymerisere in situ. Polymerisationen kan igangsættes under påvirkning af stråling eller ved tilsætning af igangsættere, såsom et persulfat.

Overtrækning af en metalsolpartikel ved polymerisation af
det monomere medium, hvori partiklen befinder sig, under på-
virkning af en uorganisk igangsætter, såsom et persulfat,
indebærer praktiske vanskeligheder, da solen flokkulerer ved
tilsætning af en sådan igangsætter. Det har nu vist sig, at
en sådan overtrækning er mulig ved først at beskytte metal-
solpartiklerne, derpå indføre de beskyttede partikler i det
monomere medium og derpå til sidst igangsætte polymerisatio-
nen. De ovenfor nævnte forbindelser kommer i betragtning som
beskyttende materiale.

Komponenterne mærket med metalsolpartikler anvendes som rea-
gens i almindelighed i kombination med andre reagenser til
påvisning og kvantitativ bestemmelse af receptorproteiner og
haptener, antigener og antistoffer i et vandigt prøvemedium,
hvortil enhver art immunokemisk teknik, der anvendes i radio-
immunoprøver og enzymimmunoprøver kommer i betragtning.

Opfindelsen angår derfor også prøveudstyr til brug ved sådan
immunokemisk teknik og som angivet i krav 10's indledning,
hvilket udstyr er ejendommelig ved det i krav 10's kendeteg-
nende del angivne.

En af de sædvanlige immunokemiske metoder er den kompetitive
immunoprøve, som kan anvendes til påvisning og bestemmelse af
enhver immunokomponent. Til påvisning af f.eks. et vist an-
tigen består denne metode i at bringe en prøve indeholdende
en ukendt mængde antigen i berøring med enten en vis mængde
af det pågældende metalmærkede antigen og et uopløseliggjort
antistof mod dette antigen, eller en vis mængde uopløselig-
gjort antigen og et metalmærket antistof mod dette antigen.

Efter en tilstrækkelig reaktionstid bestemmes karakteren og/
eller mængden af metallet i den bundne eller frie fraktion,

hvilket giver henholdsvis en kvalitativ eller kvantitativ indikation af antigenet, som skal bestemmes. Med passende ændringer i enkelthederne anvendes en analog fremgangsmåde til bestemmelse af andre immunokomponenter.

- 5 De såkaldte sandwich-metoder anvendes også meget. Disse er også særligt egnede til brug af en metalmærkekomponent ifølge opfindelsen. Ved disse fremgangsmåder bliver en immunologisk komponent, f.eks. et antistof, hvis et antigen skal bestemmes, gjort uopløselig ved kobling til en fast bærer. Denne
- 10 faste bærer er f.eks. den indre overflade af reaktionsbeholderen, hvori den immunokemiske reaktion udføres. Efter en indledende inkubation, eventuelt fulgt af en vask, sker der en anden inkubation med et metalmærket antistof, hvorefter metallet bestemmes i den bundne eller den frie fase. Det er
- 15 fordelagtigt at bestemme metallet i den bundne fase. Efter fraskillelse af faserne bliver i dette tilfælde det bundne mærke fortrinsvis frigjort, således at metallet kan bestemmes i den fremkomne væske.

- Endvidere kan anvendes en homogen agglutination. Hvis prøven
- 20 indeholder den immunokemiske komponent, som skal bestemmes, sker der agglutination med den mærkede immunokemiske komponent, hvilket resulterer i en ændring af optiske egenskaber. Et kvalitativt eller semikvantitativt resultat kan opnås ved iagttagelse af farveændringen. Det er også muligt at iagttage
- 25 reaktionens forløb med et spektrofotometer.

- Foruden de ovennævnte fremgangsmåder er der talrige andre immunokemiske metoder, hvori de metalmærkede immunokomponenter kan anvendes som reagens. Den foreliggende opfindelse gør det også muligt at påvise forskellige haptener, antigener,
- 30 antistoffer eller kombinationer deraf samtidig i én prøve ved som reagens for hver af komponenterne, der skal påvises at anvende en immunokomponent, der er blevet mærket med en forskellig metalsolpartikel.

Målingen af de fysiske egenskaber og/eller koncentrationen af metallet og/eller det dannede metalholdige agglomerat i en vis fase af reaktionsblandingen kan ske under anvendelse af meget forskellig teknik, der er kendt i sig selv. Som eksempler på disse fremgangsmåder kan nævnes den kolorimetrisk bestemmelse, ved hvilken der gøres brug af den intense farve af nogle dispersioner, som endvidere ændrer farve med fysisk-kemiske ændringer, den visuelle metode, der ofte allerede er anvendelig til kvalitative bestemmelser i betragtning af den ovennævnte omstændighed, at metalsoler er farvede. Brugen af flammeemissionsspektrofotometri eller en anden plasmaemissionsspektrofotometrisk metode, som gør samtidig bestemmelse mulig, og den meget følsomme metode med flammefri atomabsorptionsspektrofotometri.

Fortrinsvis indeholder prøveudstyret en metalmærket komponent bestående af en sol, som har partikler med en størrelse, der varierer fra 10 til 100 nanometer, som er enten direkte overtrukket med komponenten i reaktionen eller med en indifferent polymer, hvortil den ønskede komponent er blevet koblet.

Den metalmærkede komponent i prøveudstyret ifølge opfindelsen kan være en metalmærket immunokomponent. Den metalmærkede komponent kan være tilstede som en dispersion, men overraskende viste det sig at være muligt at få et stabilt frysetørret produkt, som kan gendispergeres før brugen. Opfindelsen angår således også et frysetørret reagens til brug ved den omhandlede fremgangsmåde, hvilket reagens er ejendommeligt ved det i den kendetegnende del af krav 12 angivne. Den frysetørrede, metalmærkede komponent kan også indeholde stødpudestof, som kræves til udførelse af reaktionen mellem det specifikke binderprotein og det tilsvarende bindelige stof.

Opfindelsen illustreres nærmere af følgende eksempler.

5 Eksempel 1.

Kolorimetrisk bestemmelse af human placentaltactogen (HPL) ved hjælp af et antistof mærket med guldpartikler fra et kanin anti-HPL serum.

10

1.1. Fremstilling af guldsolen.

15

500 ml af en 0,10 g/l hydrogenguldchlorid (HAuCl_4) opløsning i destilleret vand opvarmes til kogepunktet i et bægerglas ved en kapacitet på 800 ml. 3,5 ml af en 10 g/l opløsning af trinatriumcitrat i destilleret vand indføres i den kogende opløsning, hvorefter guldsolen, som er blevet mørkerød efter en begyndende blå farve, koges i yderligere 15 minutter. Efter afkøling til stuetemperatur fyldes den således fremkomne røde guldsol op til et rumfang til 500 ml med destilleret vand i en volumetrisk kolbe. Den på denne måde fremkomne guldsol består af guldpartikler med diametre mellem 45 og 70 nanometer, bekræftet med elektronmikroskopi. En guldsol fremstillet på denne måde havde en pH-værdi på $3,45 \pm 0,07$ og et lysabsorptionsmaksimum ved 536 nanometer, medens $A_{536 \text{ nm}}^1 \text{ cm} = 1,15 \pm 0,03$.

20

25

1.2. Fremstilling af kanin anti-HPL sera.

30

Anti-HPL sera blev fremstillet ved at indsprøjte en HPL-opløsning i kaniner efter følgende skema:

35

Dag	Injektionsmåde	µg HPL	Opløst i NaCl 9 g/l	med CFA
1	intramuskulært	100	0,5 ml	0,5 ml
15	"	200	0,5 ml	0,5 ml
29	"	400	0,5 ml	0,5 ml
43	intravenøst	200	1,0 ml	-
50	blodprøve til bestemmelse af titeren af antiserummet i en EIA-prøve.			

Kaninerne blev tappet så snart titeren af antiserummet ved en EIA HPL-prøve var større end 1:5000. Hvis dette ikke var tilfældet, fik kaninerne en yderligere injektion af 200 µg HPL i 1,0 ml 9 g/l NaCl (intravenøst), og titeren af antiserummet blev bestemt igen 7 dage efter denne injektion. Antiseræene blev lagret ved -25°C eller frysetørret og derefter lagret som et tørt pulver ved -25°C.

1.3. Fremstilling af anti-HPL immunglobulinopløsningen af kanin anti-HPL serum.

Til dette formål opløses 600 mg frysetørret kanin anti-HPL serum i 7,5 ml af en 9 g/l NaCl opløsning. 10 ml 180 g/l Na₂SO₄ opløsning i destilleret vand tilsættes så, efterfulgt af 1,35 g fast Na₂SO₄. Den fremkomne uklare væske får lov at henstå i et centrifugeglas i 1 time, hvorefter væsken centrifugeres med 25000 N/kg i 10 minutter. Den overliggende væske frasuges, og remanensen gendispergeres i 20 ml af en 180 g/l Na₂SO₄ opløsning i destilleret vand. Denne fremgangsmåde gentages to gange.

Efter den sidste centrifugering og fjernelse af den overliggende væske ved sugning opløses remanensen i 20 ml af en 9 g/l opløsning af NaCl i destilleret vand. Denne opløsning dialyseres over for 6 liter dialysevæske bestående af en 0,3 g/l NaCl opløsning i destilleret vand, som var blevet indstillet til en pH-værdi på 7,0 med en opløsning af 0,2 mol K₂CO₃ i 1 liter destilleret vand. Dialyse fortsættes i 16

timer ved 4°C, hvorefter den dialyserede væske centrifugeres ved 160.000 N/kg i 20 minutter. Immunoglobulinopløsningen lagres i 1 ml flasker ved en temperatur på -20°C.

- 5 Immunoglobulinindholdet bestemmes ved måling af $A_{260\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ og $A_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ af en tidobbelt fortynding af immunoglobulinopløsningen under anvendelse af et spektrofotometer. Immunoglobulinindholdet G i mg/ml kan så beregnes ved anvendelse af formlen $G = 10 \times [(1,45 \times A_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}}) - (0,75 \times A_{260\text{ nm}}^{1\text{ cm}})]$.

10 1.4. Fremstilling af konjugatet af guldpartikel og kanin anti-HPL immunoglobulin.

- 500 ml af guldsolen fremstillet som beskrevet under 1.1. indstilles til pH 7,0 ved hjælp af en opløsning af 0,2 mol K_2CO_3 i 1 liter destilleret vand. 0,5 ml af kanin anti-HPL immunoglobulinopløsningen med et indhold af 125 µg immunoglobulin pr. ml, sættes dråbevis under kraftig omrøring til 25 ml af den neutraliserede guldsol. 0,5 ml af en 50 g/l opløsning af okseserumalbumin (BSA) i 5 mmol NaCl/liter i destilleret vand, som er blevet indstillet til pH 7,0 med en 0,2 ml K_2CO_3 opløsning i 1 liter vand, tilsættes så, ligeledes under omrøring.
- 20

- Det på denne måde fremkomne konjugat af guldpartikel og kanin anti-HPL immunoglobulin centrifugeres ved 25.000 N/kg i 10 minutter, hvorefter den overliggende væske frasuges. Den røde pellet, bestående af konjugatet, optages i et sådant rumfang (ca. 23 ml) TRIS, 0,01 mol/liter indstillet til pH 7,4 med 0,01 mol/liter HCl i destilleret vand (0,01 mol/liter TRIS/HCl stødpude, pH = 7,4), at den endelige $A_{536\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ er 1,00.
- 25

30 1.5. Overtrækning af Microelisa[®] plader med kanin anti-HPL immunoglobuliner.

Til dette formål fremstilles en kanin anti-HPL immunoglobulin-

opløsning med et indhold af 25 µg immunoglobulin pr. ml, i en opløsning af 0,04 mol Na_2HPO_4 pr. liter indstillet til pH 7,4 med en opløsning af 0,04 mol NaH_2PO_4 pr. liter, begge i destilleret vand, hvortil der er sat 0,1 g/l Merthiolat.

- 5 0,1 ml af den ovenfor beskrevne immunoglobulinopløsning anbringes i hver fordybning i Microelisa[®] pladen, hvorefter pladen inkuberes i 16 timer ved 0-4°C. 0,1 ml 200 g/l BSA-opløsning i en 0,04 mol/l phosphatstødpude, pH 7,4, hvortil der er sat 0,1 g/l Merthiolat, pipetteres så i hver fordyb-
- 10 ning, og det hele inkuberes i yderligere 30 minutter ved stuetemperatur. Fordybningerne i Microelisa[®] pladerne suges nu tomme og vaskes 3 gange med destilleret vand, hvorefter de holdes ved -20°C til brugen.

15 1.6. Forsøgsprotokol for HPL bestemmelse med konjugat af guldpartikler og kanin anti-HPL immunoglobulin.

1.6.a. Bestemmelse af en standardkurve for HPL.

En standardkurve blev konstrueret for HPL efter nedenstående protokol.

- 20 1. Pipetter 0,1 ml af standard HPL-opløsning i en fordybning i en Microelisa[®] plade overtrukket med kanin anti-HPL immunoglobulin og inkuber i 2 timer ved stuetemperatur.

2. Sug fordybningen tom og vask den med 0,1 ml 0,01 mol/l tris/HCl stødpude, pH 7,4.

- 25 3. Pipetter 0,1 ml konjugat af guldpartikel og kanin anti-HPL immunoglobulin ($A_{536\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,00$) i fordybningen og inkuber natten over ved stuetemperatur.

4. Tøm fordybningen ved sugning og vask den med 0,3 ml 0,01 mol/l tris/HCl/NaCl stødpude, pH 7,4.

5. Pipetter 0,1 ml 0,1 mol/l HCl-opløsning i vand i fordybningen og lad denne virke i 30 minutter i et rysteapparat.

6. Mål lysabsorptionen ved 536 nm med et spektrofotometer af lille rumfang.

5 Resultaterne af bestemmelsen af en standardkurve er anført i nedenstående tabel.

	HPL koncentration i standardopløsningen, ng/ml	$A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ ved slutningen af prøven
10	0	0,030
	0,2	0,030
	0,8	0,060
	3,2	0,106
	12,5	0,136
15	50	0,188
	200	0,220

Opløsningsmidlet for HPL standardopløsningen er 0,04 mol/l fosfatstødpude + 1 g/l BSA + 9 g/l NaCl, pH 7,4.

1.6.b. Bestemmelse af HPL i serum fra svangre kvinder.

20 Sera fra svangre kvinder blev fortyndet således, at HPL-niveauet lå fra 5 til 80 ng/ml.

Fortyndingsmidlet for seraene var 0,04 mol/l fosfatstødpude, pH 7,4 + 1 g/l BSA + 9 g/l NaCl.

25 Ved hjælp af forsøgsprotokollen, beskrevet under 1.6.a., blev HPL-koncentrationerne af de fortyndede sera bestemt under anvendelse af den konstruerede standardkurve. Efter korrektion for fortyndingsfaktoren, fremkom følgende resultater.

Serum	HPL-indhold, EIA-prøve	HPL-indhold, MIA
A	4,5 $\pm$ 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{ml}$	4 $\pm$ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{ml}$
B	3,2 $\pm$ 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,5 $\pm$ 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
C	0,7 $\pm$ 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\pm$ 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5 Eksempel 2.

Bestemmelse af HPL ved hjælp af guldpartikelmærkede antistoffer og atomabsorptionsspektrofotometri.

2.1. Fremstilling af reagenser og overtrukne Microelisa[®] plader.

- 10 Fremgangsmåden til fremstilling af konjugat af guldpartikler og kanin anti-HPL immunoglobulin og Microelisa[®] plader overtrukket med kanin anti-HPL immunoglobulin var den samme som beskrevet i eksempel 1.

2.2. Forsøgsprotokol.

15 2.2.a. Bestemmelse af standardkurve for HPL.

- For at konstruere en standardkurve for HPL blev der foretaget seriefortyndinger af HPL af i rækkefølge 1, 10, 100 og 1000 ng/ml og en blank. Opløsningsmidlet for HPL var 0,04 mol/l phosphatstødpude, pH 7,4, hvortil der var sat 1 g/l BSA og
- 20 9 g/l NaCl.

1. Pipetter 0,1 ml standard HPL-opløsning i fordybningen i den overtrukne Microelisa-plade og inkuber i 2 timer ved stuetemperatur.

2. Sug fordybningen tom og vask med 0,1 ml 0,02 mol/liter tris/HCl stødpude, pH 7,4.
- 25

3. Pipetter 0,1 ml konjugat af guldpartikel og anti-HPL antistof ($A_{536 \text{ nm}}^1 = 1,00$) i fordybningen og inkuber nat-

ten over (ca. 16 timer).

4. Sug fordybningen tom og vask den med 0,02 mol/l tris stødpude, pH 7,4.

5. Pipettér 0,1 ml HCl, 0,1 mol/l, i fordybningen og lad dette reagere under rystning på en rystemaskine i 30 minutter.

6. Mål nu topværdien af lysabsorptionen ved 242,8 nm i et flammeatomabsorptionsspektrofotometer udstyret med en injektor af lille rumfang.

10 Et typisk eksempel på en standardkurve fremkommet på denne måde er vist i nedenstående tabel.

	HPL koncentration i standardopløsning	Topværdi af lysabsorption ved 242,8 nm efter afslutning af prøven
15	0 ng/ml	0,020
	1 ng/ml	0,040
	10 ng/ml	0,160
	100 ng/ml	0,200
	1000 ng/ml	0,220.

20 2.2.b. Bestemmelse af HPL i serum fra svangre kvinder.

Sera fra svangre kvinder blev fortyndet således, at HPL-niveauet lå i intervallet 5-80 ng/ml. Fortyndingsmidlet fra seraene var 0,04 mol/l phosphatstødpude (pH = 7,4) + 1 g/l BSA + 9 g/l NaCl. Ved hjælp af den under 2.2.a. beskrevne forsøgsprotokol blev HPL-koncentrationerne af de fortyndede sera bestemt under anvendelse af den konstruerede standardkurve.

Eksempel 3.

Visuel påvisning af hepatitis B_s antigen (HBsAg) ved hjælp

af konjugat af guldparkler og fåreanti-HBs immunoglobulin.

3.1. Fremstilling af guldsolen.

Se eksempel 1.1.

3.2. Fremstilling af fåre anti-HBs sera.

- 5 Får blev injiceret med rensat HBsAg-opløsning.

3.3. Fremstilling af fåre anti-HBs immunoglobulinopløsningen.

- 1,4 g fast Na_2SO_4 sættes til 10 ml fåre-anti-HBsAg serum. Efter at alt natriumsulfatet er opløst, får den uklare væske lov at henstå 1 time ved stuetemperatur. Væsken centrifugeres så ved 25.000 N/kg i 10 minutter. Den overliggende væske fjernes ved sugning, og remanensen gendispergeres i 10 ml 140 g/l Na_2SO_4 -opløsning i destilleret vand. Denne fremgangsmåde gentages to gange.

- Efter centrifugering sidste gang og fjernelse af den overliggende væske ved sugning, bliver den dannede pellet opløst i 10 ml 9 g/l NaCl-opløsning i destilleret vand. Denne opløsning dialyseres over for 6 liter af en 0,3 g/l NaCl-opløsning i destilleret vand, indstillet til pH 7,0 med en opløsning af 0,2 mol/l K_2CO_3 . Dialysen sker i 16 timer ved 4°C, hvorefter den dialyserede væske centrifugeres i 20 minutter ved 160.000 N/kg.

Immunoglobulinopløsningen lagres i portioner på 1 ml i flasker ved -20°C. Immunoglobulinindholdet bestemmes ved den allerede beskrevne $A_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$, $A_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ -metode.

- 25 3.4. Fremstilling af konjugat af guldparkler og fåre anti-HBs immunoglobulin.

Fremstillingen af konjugatet er identisk med fremstillings-

måden, der er beskrevet i eksempel 1, pkt. 4, med undtagelse af, at der blev anvendt en fortyndet opløsning (125 ng immunoglobulin pr. ml) af fåre-anti-HBs immunoglobulinopløsningen i stedet for kanin anti-HPL immunoglobulinopløsningen.

5 3.5. Overtrækning af Microelisa[®] plader med fåre anti-HBs immunoglobuliner.

Overtrækningen af Microelisa[®] pladerne med fåre anti-HBs immunoglobuliner udføres på den måde, der er beskrevet i eksempel 1, pkt. 5, idet der blev anvendt fåre anti-HBs immunoglobulinopløsning i stedet for en kanin anti-HPL immunoglobulinopløsning. Ti kontrolfordybninger var inkluderet i hver plade. Disse fordybninger blev overtrukket med en immunoglobulinopløsning fra human serum, som var negativ ved følgende prøver:

- 15 Hepanosticon og Hepanostika
 Monosticon
 Rheumanosticon
 Immunodiffusion over for normal fåreserum
 EIA for anti-HBs.

20 3.6. Forsøgsprotokol for en visuelt aflæselig prøve.

1. Pipetter 0,1 ml af prøven i en fordybning i en overtrukket Microelisa-plade og inkuber i 2 timer ved 37°C.
2. Vask hver fordybning tre gange med 0,3 ml 0,02 mol/l tris/HCl stødpude, pH 7,4.
- 25 3. Pipetter 0,1 ml konjugat af guldpartikler og fåre-anti-HBs ($A_{536}^{1\text{ cm}} = 1,00$) i fordybningen og inkuber natten over ved stuetemperatur.
4. Tøm fordybningen ved sugning og vask den tre gange med 0,3 ml 0,01 mol/l tris/HCl/NaCl stødpude, pH 7,4.

5. Pipetter 0,1 ml 0,1 mol/l HCl opløsning i destilleret vand i fordybningen, og lad dette virke i 30 minutter på rysteapparat.

- 5 6. Bedøm visuelt farven af væsken i fordybningen og sammenlign den med den tilstedeværende kontrolfordybning.

Sera, som gav en stærk positiv reaktion i Hepanostika-prøven, kunne generelt stadig skelnes fra kontrollerne i 8-dobbelt fortynding.

Eksempel 4.

- 10 Bestemmelse af testosteron ved hjælp af et konjugat af sølvpartikler og testosteron-11 α -succinyl-okseserumalbumin.

4.1. Fremstilling af sølvsolen.

- 8,5 ml af en 10 g/l AgNO₃-opløsning i destilleret vand fortyndes med 486,5 ml destilleret vand, og 5 ml af en 10 g/l opløsning af trinatriumcitrat, 2H₂O i destilleret vand til-
 15 sættes så. 40,0 ml af en 10 g/l opløsning af hydrazin i destilleret vand sættes til denne opløsning ved stuetemperatur under kraftig omrøring under anvendelse af magnetisk om-
 20 rører. En grå-gul-grøn sølvsol med stærk Tyndall spredning dannes i løbet af 60 sekunder. Efter 10-dobbelt fortynding med destilleret vand, var pH-værdien 8,85, og solen havde en lysabsorption på $A_{416 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 0,83$.

- 20 ml af den ufortyndede sol blev centrifugeret i 10 minutter ved 25.000 N/kg. 15 ml af den overliggende væske blev
 25 fjernet ved sugning og erstattet med 15 ml af en 0,1 g/l trinatriumcitrat, 2H₂O-opløsning i destilleret vand (pH 6,88).

Vaskeprocessen blev gentaget to gange. Efter den sidste vask blev rumfanget fyldt op til 20 ml med den 0,1 g/l natriumcitratopløsning.

Efter 4-dobbelt fortynding med destilleret vand, havde solen følgende egenskaber:

$$\begin{array}{lll} \lambda_{\text{maks.}} & = & 416 \text{ nm} \\ A_{416 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} & = & 1,12 \\ 5 \quad \text{pH} & = & 7,0. \end{array}$$

4.2. Fremstilling af testosteron-11 α -hemisuccinat-BSA.

40 mg testosteron-11 α -hemisuccinat opløses i 2 ml dimethylformamid, og opløsningen afkøles til -15°C.

140 mg okseserumalbumin opløses i 3 ml destilleret vand, hvorefter der tilsættes 1 dråbe 4N NaOH og 2 ml DMF, og det hele afkøles til -15°C.

12,5 μ l N-methylmorpholin og 12,5 μ l isobutylchlorformiat sættes nu til steroidopløsningen. Efter 3 minutter sættes opløsningen til BSA-opløsningen. Efter omrøring i 1 time ved -15°C og 3 timer ved 0°C, overføres opløsningen til en dialysesæk og dialyseres natten over over for rindende postevand. Dialysatet føres gennem en Sephadex G25 søjle, eventuelt efter centrifugering, og proteinfraktionen opsamles og frysetørres.

4.3. Fremstilling af antisera for testosteron.

20 Kaniner blev immuniseret ved injektion af 1,25 mg testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA, opløst i 2,5 ml fysiologisk saltopløsning, og 2,5 ml fuldstændig Freund's adjuvant (1 ml i.m. 3 gange, interval 1 uge). De fik så en intravenøs injektion af 1 ml af en opløsning af 1,25 mg testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA i 5 ml fysiologisk saltopløsning.

Injektionsskemaet blev gentaget, indtil titeren af antiserummet var tilstrækkelig høj. Kaninerne blev så tappet, og seraene blev lagret ved -20°C indtil anvendelsen.

4.4. Fremstilling af polystyrenglas overtrukket med kanin-immunoglobulin over for testosteron.

En kanin-anti-testosteron-immunoglobulinopløsning fremstilles ved udsaltning med 180 g/l Na_2SO_4 som beskrevet i eksempel 1, pkt. 2.

Den dialyserede immunoglobulinopløsning fortyndes (til en koncentration på 1 μg immunoglobulin/ml) med en stødpude bestående af 0,1 mol/liter $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 60 g/l saccharose, indstillet til pH 7,4 med 4 mol/l NaOH. 1 ml af immunoglobulinopløsningen pipetteres i hver 3 ml polystyrenglas og inkuberes natten over ved stuetemperatur. Glassene tømmes så ved sugning og fyldes med 1 ml 10 g/l BSA-opløsning i ovennævnte stødpude. Efter to timer tømmes glassene ved sugning og vaskes tre gange med 3 ml destilleret vand. Rørene tørres fuldstændigt ved sugning og tørres yderligere over silicagel natten over. De pakkes så i aluminiumfolie i sæt på 25 med en pose silicagel og lagres ved 4°C.

4.5. Fremstilling af konjugat af sølvpartikler og testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA.

20 ml af sølvsolen, fremstillet som beskrevet i 4.1., blev fortyndet med 80 ml 0,3 g/l NaCl, og pH-værdien blev indstillet til 7,0 med 0,01 mol/l NaOH-opløsning i destilleret vand. $A_{421 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,08$.

3 ml af en opløsning af testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA, 175 $\mu\text{g/ml}$ i 0,3 g/l NaCl indstillet til pH 7,0 med 0,01 mol/l NaOH, sættes så dråbevis til 15 ml af denne sol under kraftig omrøring med magnetisk omrører.

Det hele inkuberes i ca. 10 minutter, hvorefter der tilsættes 2 ml 10 g/l Carbowax 20M-opløsning i 0,3 g/l NaCl, indstillet til pH 7,0 med 0,01 mol/l NaOH. Det rå konjugat vaskes derefter ved at centrifugere 10 ml med 25.000 N/kg i 20

minutter. 9 ml overliggende væske fjernes nu ved sugning og erstattes af 9 ml vaskevæske bestående af 1 g/l Carbowax 20M-opløsning i 0,3 g/l NaCl, indstillet til pH 7,0 med 0,01 mol/liter NaOH opløst i destilleret vand. Efter vask 3 gange, 5 centrifugeres konjugatet igen, hvorefter den overliggende væske fjernes ved sugning. Remanensen gendispergeres i 0,02 mol/liter phosphatstødpude, pH 7,4. Konjugatopløsningen har nu en pH-værdi på 7,4 og $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,08$. De vaskede konjugater lagres ved 4°C indtil brugen.

10 4.6. Forsøgsprotokol for bestemmelse af testosteron med konjugatet af sølvpartikler og testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA.

1. Pipetter en 1 ml prøve i et polystyrenglas overtrukket med kanin-anti-testosteron immunoglobulin og inkuber i 2 timer 15 ved stuetemperatur.

2. Tøm glasset ved sugning og vask 3 gange med 2 ml 0,02 mol/liter phosphatstødpude, pH 7,0.

3. Pipetter 1 ml af konjugatet af sølvpartikler og testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA, $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,08$, i glasset og inkuber i 16 timer. 20

4. Sug nu glasset tomt og vask med 2 ml 0,02 mol/liter phosphatstødpude, pH 7,0.

5. Pipetter 1 ml 0,1 mol/liter HCl, opløsning i destilleret vand, i glassene og lad dette virke i 30 minutter.

25 6. Mål væsken i glasset $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$.

4.7. Resultater.

Prøvemedierne blev kolorimetrisk bestemt ved hjælp af en standardkurve, hvorved der kunne bestemmes mængder af testo=

steron af størrelsesordenen 0,5 ng/ml og større.

Eksempel 5.

Bestemmelse af titeren af human anti-Rubella sera.

5.1. Fremstilling af Rubella-antigenet.

- 5 200 ml af en værtcellesuspension (BHK 21C3 fra Rijks Instituut voor Volksgezondheid, RIV) i kulturmedium (koncentration 10^5 levende celler pr. ml) indføres i en rulleflaske (overflade 490 cm^2). Cellekulturen holdes i 16 til 20 timer ved 37°C . Kulturmediet fjernes så, og celledaget vaskes to gange med
- 10 20 ml phosphatpufret saltopløsning (PBS). 10 ml virussuspension (virustype M33 RIV) fortyndes så 1:100 med PBS og indføres i flasken, hvorefter det hele inkuberes ved 37°C i ca. 2 1/2 time.

- 15 100 ml vedligeholdelsesmedium tilsættes nu, og kulturen holdes ved 37°C . Efter en periode på mindst 64 timer, men ikke overstigende 136 timer, afhængende af bedømmelsen af den cytopathiske virkning, høstes det inkuberede monolag af inficerede celler. Vedligeholdelsesmediet fjernes, og monolaget af celler vaskes én gang med 20 ml PBS. Cellerne løsnes fra
- 20 væggen ved hjælp af sterile glasperler, optages i 90 ml PBS og fryses ved -20°C .

- Efter tøning sættes 10 ml glycinopløsning (1 mol/l), hvis pH-værdi er indstillet til 9,0 med fast NaOH, til 90 ml cellesuspension, og det hele blandes grundigt i 6 timer ved
- 25 37°C . Cellesuspensionen bliver nu ultralydbehandlet i 30 minutter med afkøling i is, og centrifugeres derefter ved 30.000 N/kg i 30 minutter ved 4°C . Den overliggende væske indeholdende Rubella-virussen opsamles og inaktiveres ved tilsætning i rækkefølge af:

- 30 1:100 (v/v) NaOH (1 mol/liter) opløsning i destilleret vand
1:100 (v/v) frisk fremstillet 10% p-propiolactonopløsning i

destilleret vand.

Væsken får lov at henstå i 48 timer ved 4°C, hvorpå den centrifugeres i 30 minutter ved 30.000 N/kg og 4°C.

Den overliggende væske er væsken indeholdende Rubella-virus-
5 sen, som om nødvendigt kan lagres ved -20°C til brugen.

5.2. Belægning af Microelisa[®] plader med Rubella-antigener.

Rubellaantigenopløsningen, fremstillet som beskrevet i 5.1.,
fortyndes 1:100 med en 0,05 mol/liter carbonatstødpude, pH
9,6. 100 µl af denne flydende Rubella-antigenopløsning pipet-
10 teres i hver fordybning i Microelisapladen, og det hele in-
kuberes så i 16 timer ved 4°C. Fordybningen i Microelisa[®]
pladen tømmes nu ved sugning og vaskes tre gange med 300 µl
0,05 mol/l fosfatstødpude, pH 7,4, hvortil der er sat 9 g/l
NaCl og 0,5 g/l Tween 20.

15 5.3. Fremstilling af fåre-anti-human immunoglobulinopløsning.

Normal human serum udsaltes med 140 g/l Na₂SO₄, der tilsættes
som fast stof i små portioner. Efter henstand 1 time ved
stuetemperatur centrifugeres den uklare væske ved 25.000
N/kg i 10 minutter. Den overliggende væske fjernes ved sug-
20 ning, hvorefter remanensen vaskes med 140 g/l Na₂SO₄-opløs-
ning i destilleret vand. Efter centrifugering og fjernelse
af den overliggende væske ved sugning, opløses remanensen i
9 g/l NaCl, hvorefter immunoglobulinopløsningen dialyseres
i 48 timer over for 9 g/l NaCl ved 4°C. Immunoglobulinind-
25 holdet bestemmes så ved $A_{260}^{1\text{ cm}}$, $A_{280}^{1\text{ cm}}$ metoden.

Får blev immuniseret med en fortyndet opløsning af denne
humane immunoglobulinopløsning efter følgende skema:

Dag 1 0,5 mg human immunoglobulin opløst i 0,5 ml fysiolo-
gisk saltopløsning, hvortil der er sat 0,5 ml fuld-

stændig Freunds adjuvans.

Injektion: Intramuskulær.

5 Dag 14 1,0 mg human immunoglobulin opløst i 0,5 ml fysiologisk saltopløsning, hvortil der er sat 0,5 ml ufuldstændig Freunds adjuvans.
Injektion: Intramuskulær.

10 Dag 28 2,0 mg human immunoglobulin opløst i 0,5 ml fysiologisk saltopløsning, hvortil der er sat ufuldstændig Freunds adjuvans.
Injektion: Intramuskulær.

Dag 42 1,0 mg human immunoglobulin opløst i 1,0 ml fysiologisk saltopløsning.
Injektion: Intravenøs.

Dag 56 Prøveudtagning af blod.

15 Immunoglobulinfraktionerne blev fremstillet af fåre-anti-human immunoglobulin-seraene ved udsaltning ved den ovenfor beskrevne metode med 140 g/l Na_2SO_4 . Efter vask 3. gang blev remanensen opløst i 9 g/l NaCl, hvorefter immunoglobulinopløsningen blev dialyseret over for en 0,3 g/l NaCl-opløsning
20 i destilleret vand, indstillet til pH 7,0 med 0,2 mol/l K_2CO_3 opløst i destilleret vand.

Efter centrifugering af denne dialyserede fåre-anti-human immunoglobulinopløsning ved 160.000 N/kg i 15 minutter, blev immunoglobulinindholdet bestemt ved $A_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$, $A_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ metoden.

25 5.4. Fremstilling af konjugat af guldpartikler og fåre-anti-human immunoglobulin.

Guldsolen blev fremstillet ved fremgangsmåden beskrevet i 1.1., og konjugatet blev fremstillet på en måde analog med den, der er beskrevet i 1.4., idet der i dette tilfælde blev anvendt

fåre immunoglobulinopløsningen fremstillet i 5.3. med et immunoglobulinindhold på 125 µg pr. ml.

5.5. Forsøgsprotokol.

5 Prøven af human sera fortyndes 1:25 med 0,2 mol/l trometamol/HCl/NaCl stødpude, pH 7,4, hvortil der var sat 0,5 g/l Tween 20.

1. 100 µl fortyndet human serum pipetteres i hver fordybning, og det hele inkuberes i 30 minutter ved stuetemperatur.

10 2. Fordybningen tømmes ved sugning og vaskes 3 gange med 300 µl 0,2 mol/l trometamol/HCl/NaCl stødpude, pH 7,4, hvortil der var sat 0,5 g/l Tween 20.

3. 100 µl konjugat af guldpartikler og fåre-anti-human immunoglobulin ($A_{536 \text{ nm}}^1 = 1,00$) pipetteres nu i fordybningen, og det hele inkuberes i 16 timer ved stuetemperatur.

15 4. Fordybningen tømmes ved sugning og vaskes tre gange med 300 µl 0,01 mol/l trometamol/HCl/NaCl stødpude, pH 7,4, hvortil der var sat 0,5 g/l Tween 20.

20 5. Pipetter 100 µl 0,1 mol/l HCl opløst i destilleret vand i hver fordybning og lad dette virke i 30 minutter under rystning.

6. Efter dette, mål lysabsorptionen ved 536 nm under anvendelse af et spektrofotometer med lille rumfang.

5.6. Resultater.

25 En $A_{536 \text{ nm}}^1$ på ca. 0,230 blev målt for sera med en HAI titer på 512, og yderligere blev der fundet en rimelig lineær sammenhæng mellem HAI titerne af de undersøgte humansera, og $A_{536 \text{ nm}}^1$ -værdierne fremkommet ved ovennævnte prøve.

Eksempel 6.

Bestemmelse af HCG ved hjælp af et konjugat af jernoxid og anti-HCG.

6.1. Fremstilling af jernoxidsolen.

- 5 En opløsning bestående af 9 mmol/l FeCl_3 og 1 mmol/l HCl opvarmes til en temperatur på 95°C i 65 timer. Den først lysegule opløsning misfarves til orangerød på grund af dannelsen af jernoxidsolpartikler. Den på denne måde fremkomne jernoxidsol består af kubiske jernoxidpartikler med en kant mellem 40 og 80 nm, bekræftet ved elektronmikroskopi. Et lokalt lysabsorptionsmaksimum findes ved 370 nm. En sol med et jernoxidindhold på 0,45 mmol/l udviser en $A_{370\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,0$ og en pH-værdi på 2,7 lige efter fremstillingen.

6.2. Fremstilling af konjugat og jernoxid og anti-HCG.

- 15 Kanin-anti-HCG blev fremstillet på en fremgangsmåde analog med den, der er beskrevet for anti-HPL sera i eksempel 1.2.

- Immunoglobulinfraktionen heraf fremkom ved tilsætning af Na_2SO_4 , fraskille remanensen, gendispergere den i en 180 g/l Na_2SO_4 -opløsning og dialysere denne dispersion over for en opløsning indeholdende 5 mmol/l NaCl. Immunoglobulinindholdet blev bestemt som beskrevet i eksempel 1.3.

- Jernoxidsolen fra 5.1. blev fortyndet og gav et jernoxidindhold på 0,45 mmol/l. Til 25 ml heraf blev sat 0,5 ml glutaraldehyd 250 g/l, og blandingen blev inkuberet i 30 minutter ved stuetemperatur og pH 2,8. Derefter blev tilsat 0,63 ml kanin-anti-HCG immunoglobulinopløsning indeholdende 640 $\mu\text{g/ml}$ immunoglobulin.

Efter inkubering i 1 time ved stuetemperatur og pH 2,7, blev blandingens pH-værdi indstillet til 7,0 med en NaOH-opløsning,

og inkubation af blandingen blev fortsat natten over ved 0-4°C.

- 5 Før brugen blev konjugaterne vasket ved centrifugering, fraspugning af den overliggende væske og gensuspendering i en stødpude bestående af 0,1 mol/l tris/NaCl/HCl (pH = 7,4), 1 g/l BSA og 0,2 g/l Carbowax 20M. Til sidst blev rumfanget af solen indstillet således, at $A_{370 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,0$.

6.3. Overtrækning af Microelisa[®] plader med kanin-anti-HCG immunoglobuliner.

- 10 Microelisa[®] plader blev overtrukket med kanin-anti-HCG immunoglobulin som beskrevet for overtrækning med anti-HPL immunoglobuliner i eksempel 1.5.

6.4. Forsøgsprotokol for HCG bestemmelse med konjugater af jernoxid og anti-HCG.

- 15 Der blev fremstillet en kurve over dosis og reaktion for HCG, der er opløst i en blanding af 0,04 mol/l fosfatstødpude, 1 g/l BSA og 9 g/l NaCl (pH = 7,4), efter følgende forsøgsprotokol.

- 20 1. Pipetter 0,1 ml af standard HCG-opløsningen i en fordybning i en Microelisa[®] plade, overtrukket med anti-HCG og inkuber i 2 1/2 time ved 37°C.

2. Sug fordybningen tom.

3. Pipetter 0,1 ml jernoxid anti-HCG ($A_{370 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,0$) i fordybningen og inkuber natten over ved 37°C.

- 25 4. Tøm fordybningen ved sugning og vask den otte gange med 0,3 ml af en opløsning indeholdende 0,1 mol/l tris/HCl/NaCl stødpude (pH = 7,4) og 0,5 g/l Tween 20.

5. Pipetter 0,1 ml af en opløsning indeholdende 0,1 mol/l NaOH og lad dette reagere i 15 minutter.

6. Mål lysabsorptionen ved 360 nm med et spektrofotometer af lille rumfang.

5 Resultaterne af en kurve over dosis og reaktion er anført i nedenstående tabel.

	HCG koncentration i standardopløsningen i mIU/ml	$A_{360 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$
10	2000	0,367
	1000	0,429
	500	0,414
	250	0,304
	125	0,275
15	63	0,205
	31	0,179
	16	0,172
	8	0,154
	4	0,142
20	0	0,096.

6.5. Bestemmelse af HCG i urinen hos svangre kvinder.

Urinen fra svangre kvinder blev fortyndet således, at HCG-niveauet lå i intervallet 1 til 500 mIU HCG/ml. Ved hjælp af forsøgsprotokollen fra 5.4. blev HCG-koncentrationen af de
25 fortyndede prøver bestemt under anvendelse af den konstruerede standardkurve.

Eksempel 7.

Bestemmelse af HCG ved hjælp af konjugat af guldpartikler og anti-HCG ved en agglutinationsprøve.

7.1. Fremstilling af reagenser.

Der fremstilles en guldsol ved fremgangsmåden beskrevet i 1.1. og kanin-anti-HCG sera og immunoglobulinfraktioner heraf som beskrevet i 5.2.

- 5 Et konjugat af guldpartikler og anti-HCG fremstilles med guldsolen og kanin-anti-HCG-opløsningerne ved fremgangsmåden beskrevet i 1.4.

7.2. Forsøgsprotokol.

- 10 1. Pipetter 1 ml af konjugatet af guldpartikler og anti-HCG ($A_{540 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,50$) i et reagensglas på ca. 3 ml.

2. Pipetter heri 0,1 ml af urinen, som skal undersøges, og bland.

3. Bedøm farven af konjugatet efter en inkubation på 1 time ved stuetemperatur:

- 15 En farveændring fra rød til farveløs viser, at prøven er stærk positiv,

en farveændring fra rød til purpur viser, at prøven er positiv og indeholder 1 IU HCG/ml eller mere,

- 20 hvis farven ikke ændres, er prøven negativ, dvs. den indeholder 0,4 IU HCG/ml eller mindre.

7.3. Resultater.

Ved hjælp af forsøgsprotokollen fra 7.2. er det muligt at diagnosticere svangerskab den 33. - 35. dag efter sidste menstruation.

Eksempel 8.Kompetitiv receptorprøve for HCG.8.1. Fremstilling af rensat HCG receptorprotein fra okse-
corpora lutea (BCL).

- 5 HCG receptorprotein fra BCL blev fremstillet ved metoden,
der er beskrevet i enkeltheder af Khan og Saxena i Enzyme
Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, redaktør S.B.
Pal, udgivet af Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1978.
Frisk BCL-væv blev pulveriseret, homogeniseret, filtreret,
10 yderligere homogeniseret og centrifugeret ved 6.500 N/kg.
Den overliggende væske blev centrifugeret ved 130.000 N/kg,
den fremkomne pellet blev homogeniseret og centrifugeret i
en zonerotor med en saccharosegradient og elueret. De fryse-
tørrede fraktioner indeholdende HCG-receptormembranerne blev
15 genopløst, og efter centrifugering blev der tilsat mannit
til den klare overliggende væske, hvorefter pH-værdien blev
indstillet til 7,0. Den fremkomne dispersion blev rensat ved
affinitetskromatografi på CNBr-aktiveret sepharose 4B koblet
med human LH. Efter eluering af den bundne receptor blev pH-
20 værdien straks indstillet til 7, og Triton X-100 blev fjer-
net ved adsorption på bio-perler. Den fremkomne dispersion
af HCG receptorprotein blev grundigt dialyseret over for PBS,
pH 7,0 og lagret ved 4°C.

25 8.2. Belægning af polystyrenmikrotitreringsplader med HCG
receptorprotein.

- Til dette formål fremstilles en HCG receptorprotein receptor-
opløsning med et indhold af 25 µg protein/ml ved fortynding
af HCG receptorproteinet i PBS med en opløsning af 0,04 mol/l
Na₂HPO₄, indstillet til pH 7,4 med en opløsning af 0,04 mol/l
30 NaH₂PO₄, hvortil der sættes 0,1 g/l merthiolat. Mikrotitrer-
ingsplader blev belagt med denne HCG receptoropløsning ifølge
protokollen, der er beskrevet i 1.5.

8.3. Fremstilling af en gulddispersion.

En gulddispersion bestående af partikler med en diameter mellem 6 og 15 nm blev fremstillet ved at sætte 40 ml af en opløsning indeholdende 10 g/l natriumcitrat, $2\text{H}_2\text{O}$ til en
5 kogende opløsning indeholdende 100 mg/l hydrogenaurichlorid (HAuCl_4), og blandingen holdes kogende i 15 minutter. Den fremkomne orangerøde gulddispersion afkøles til stuetemperatur og genindstilles til et rumfang på 500 ml i en volumetrisk kolbe. Gulddispersionen havde et lysabsorptionsmaksimum ved 523 nm og $A_{523 \text{ nm}}^1 \text{ cm} = 1,0$.
10

8.4. Fremstilling af et konjugat af guldparkikler og HCG.

En opløsning indeholdende 5 mg renset HCG/ml i PBS (pH = 7,0) blev grundigt dialyseret over for en opløsning indeholdende 5 mmol/l NaCl, indstillet til en pH-værdi på 4,5
15 ved hjælp af HCl. 1 ml af den dialyserede HCG opløsning blev sat til 500 ml af gulddispersionen og omrørt i 10 minutter ved stuetemperatur. 10 ml af en opløsning indeholdende 10 g Carbowax 20 M/l blev sat til det friske konjugat og inkuberet i yderligere 10 minutter. Derefter blev pH-værdien ind-
20 stillet 7,4 ved hjælp af en K_2CO_3 -opløsning. Konjugatet blev lagret ved 4°C . Lige før brugen blev 1 ml af 1 mol/l TRIS/HCl/NaCl stødpude (pH = 7,4) indeholdende 1 g/l BSA tilsat til 10 ml af den lagrede konjugatdispersion.

8.5. Forsøgsprotokol for en kompetitiv HCG-prøve.

25 100 μl af en standard HCG-opløsning (eller prøven) blev sat til en fordybning i mikrotitreringsplader belagt med HCG receptorprotein og inkuberet i 1 time ved stuetemperatur. Derefter blev 100 μl af det pufrede konjugat af guldparkikler og HCG tilsat og inkuberet i 4 timer ved stuetemperatur.
30 Fordybningen blev tømmt og vasket med 0,3 ml 0,01 mol/l TRIS/HCl/NaCl stødpude, pH = 7,4.

Til sidst blev der tilsat 0,1 ml 0,1 mol/l NaOH-opløsning

i vand, og der blev inkuberet i 10 minutter. Lysabsorptionen i væsken i en fordybning blev målt ved 536 nm under anvendelse af et spektrofotometer af lille rumfang.

8.6. Resultater.

- 5 En kurve over dosis og reaktion for fri HCG fremkom i et HCG-koncentrationsinterval mellem 0 og 1000 mIU/ml med et midterpunkt nær 100 mIU HCG/ml. Påvisningsgrænsen var ca. 10 mIU HCG/ml. HCG-koncentrationen målt i prøverne var i reglen højere end bestemt med EIA.

10 Eksempel 9.

Sandwichprøve for HCG under anvendelse af en uopløseliggjort HCG receptor og et konjugat af guldpartikler og anti-HCG.

- 15 Til denne bestemmelse blev mikrotitreringsplader belagt med HCG receptorprotein som beskrevet i eksempel 8.2.. Et konjugat af guldpartikler og anti HCG blev fremstillet som beskrevet i eksempel 1.4. under anvendelse af kanin anti-HCG i stedet for kanin anti-HPL.

9.1. Forsøgsprotokol.

- 20 0,1 ml af en standardopløsning HCG i 0,1 mol/l TRIS/HCL/NaCl stødpude, pH = 7,4, indeholdende 1 g/l BSA (eller prøven) pipetteres i en fordybning i mikrotitreringspladen belagt med HCG receptorprotein og inkuberes i 1 time ved stuetemperatur. Derefter tømmes fordybningerne, og 0,1 ml af konjugatet af guldpartikler og anti-HCG pipetteres i hver fordybning og in-
- 25 kuberes natten over ved stuetemperatur. Fordybningerne tømmes og vaskes 6 gange med 0,3 ml 0,01 mol/l TRIS/HCL/NaCl stødpude, pH = 7,4.

0,1 ml og 0,1 mol/l NaOH pipetteres i hver fordybning og inkuberes i 15 minutter. Lysabsorptionen ved 536 nm af indhol-

det af fordybningerne måles under anvendelse af et spektrofotometer med lille rumfang.

5

9.2. Forsøgsresultater.

Kurver over dosis og reaktion fremkom for HCG koncentrationer mellem 0 og 1000 mIU/ml. Påvisningsgrænsen var ca. 5 mIU/ml. HCG koncentrationer målt i prøverne var ca. de samme som målt med EIA.

10

P a t e n t k r a v.

15

1. Fremgangsmåde til påvisning og/eller bestemmelse af en eller flere komponenter i reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof i en vandig prøve under anvendelse af den kendte bindingsaffinitet af sådanne komponenter til hinanden, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en eller flere mærkede komponenter fremkommet ved direkte eller indirekte kobling af den ønskede komponent af reaktionen til partikler i en vandig dispersion af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller metalforbindelse, som har en partikelstørrelse på mindst 5 nm, idet under reaktionen eller efter en tilstrækkelig reaktionstid, eventuelt efter adskillelse af de bundne og de frie mærkede komponenter, de fysiske egenskaber og/eller mængden af metallet og/eller det dannede metalholdige agglomerat bestemmes i prøven eller en af de afledte fraktioner på i og for sig kendt måde, hvilken bestemmelse giver en kvalitativ og/eller kvantitativ indikation af komponenten eller komponenterne, som skal påvises og/eller bestemmes.

20

25

30

35

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en eller flere mærkede komponenter, fremkommet ved direkte eller indirekte kobling af den ønskede reaktionsdeltager til partikler af en sol, som har en partikelstørrelse varierende fra 10 til 100 nm.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at den mærkede komponent er fremkommet ved til en sol af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbindelse, at sætte en vis mængde af den immunokemiske komponent, som skal mærkes, hvilken sidstnævnte fuldstændigt eller delvis belægger solpartiklerne, hvorefter yderligere overtrækning kan udføres med et immunokemisk indifferent polært makromolekyle.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at den mærkede komponent er fremkommet ved til en sol af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner, overtrukket med et metal eller en metalforbindelse at sætte et eller flere immunokemisk indifferente hydrofile makromolekyler, som overtrækker solpartiklerne, hvorefter den immunokemiske komponent kobles til overtræksmaterialet.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at den mærkede komponent fremkommer ved at indføre en metalsol i omgivelser af monomere, og sidstnævnte bringes til at polymerisere eller copolymerisere in situ, således at der sker overtrækning af solpartiklerne, hvorefter den immunokemiske komponent kobles til det polymere materiale.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2 og 5, k e n d e t e g n e t ved, at solpartiklerne først beskyttes med et hydrofilt makromolekyle, hvorefter der sker polymerisation eller copolymerisation under indflydelse af en uorganisk igangsætter.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til 6, k e n d e t e g n e t ved anvendelse af partikler af en sol af guld, sølv eller platin eller forbindelser af disse metaller eller jern eller kobberforbindelser.

5

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at der bestemmes to eller flere immunokemiske komponenter i én prøve ved anvendelse af to eller flere forskelligt mærkede komponenter.

10

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at forekomsten af en ændring i farve eller farveintensitet af reaktionsblandingen iagttages eller måles, hvilken ændring er en kvalitativ eller kvantitativ indikation af den immuno-

15

10. Prøveudstyr til anvendelse til bestemmelse af en eller flere komponenter af reaktionen mellem et specifikt binderprotein og det tilsvarende bindelige stof i et vandigt medium ved fremgangsmåden ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder:

20

a) en metalmærket komponent, som er fremkommet ved at koble en komponent af reaktionen til partikler i en vandig dispersion af et metal, en metalforbindelse eller polymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbindelse, hvilke partikler har en størrelse på mindst 5 nanometer.

25

b) andre reaktionsdeltagere.

30

11. Prøveudstyr ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at den vandige dispersion er en sol med partikler af en størrelse varierende fra 10-100 nm, som er enten direkte overtrukket med en immunokomponent eller med en indifferent polymer, hvortil immunokomponenten er blevet koblet.

35

12. Frysetørret reagens til anvendelse ved fremgangsmåden
ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder
en metalmærket komponent, der er fremkommet ved direkte eller
indirekte at koble den ønskede komponent til partikler i en
5 vandig dispersion af et metal, en metalforbindelse eller po-
lymere kerner overtrukket med et metal eller en metalforbin-
delse, og som har en partikelstørrelse på mindst 5 nm.

13. Frysetørret reagens ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t
10 ved, at det også indeholder et stødpudestof.

15

20

25

30

35