



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

155 082

Int.Cl.³

3(51) C 12 Q 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q/ 225 305

(22) 19.11.80

(44) 12.05.82

(71) STAATLICHES INSTITUT FÜR IMMUNPRÄPARATE U. NÄHRMITTEL BERLIN;DDR;

(72) MOHR, JUTTA, DR. RER. NAT., DIPL.-CHEM.;FRANZ, HARTMUT, PROF. DR. DR.;DDR;

(73) siehe (72)

(74) ADW DER DDR, FZ F. MOLEKULARBIOL. U. MEDIZIN, AG PATENT- UND NEUERERWESEN, 1115 BERLIN,
LINDENBERGER WEG 70

(54) VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG VON ENZYM-IMMUNO-ASSAYS

(57) Das Ziel der Erfindung besteht darin, den Enzym-Immuno-Assay ökonomischer zu gestalten. Erfindungsgemäß benutzt man anstelle von Antikörper/Enzym-Konjugaten Antikörper/Lektin-Konjugate und setzt anschließend in einem weiteren Schritt mit einem kohlenhydrathaltigen Enzym um. Der Vorteil dieser Verfahrensweise besteht darin, daß auch Enzympräparate geringeren Reinheitsgrades eingesetzt werden können. Die Erfindung ist in der medizinischen Diagnostik anwendbar.

Dr. Mohr.

Prof. Dr. Dr. Franz

"Verfahren zur Durchführung von Enzym-Immuno-Assays"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von Enzym-Immuno-Assays. Das Verfahren ist in der medizinischen Diagnostik anwendbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Der in den letzten Jahren entwickelte Enzym-Immuno-Assay (EIA) stellt eine Methode zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern dar, die in Empfindlichkeit und Spezifität dem Radio-Immuno-Assay vergleichbar ist (A. Voller, D. E. Bidwell, Ann Bartlett, Bull. World Health Organ. 53, 1979, S. 55 - 65).

Die Bestimmung eines Antigens wird im EIA in folgenden Schritten durchgeführt:

- 1) Der dem Antigen entsprechende Antikörper wird an einem Träger (z. B. PVC, Polystyrol) fixiert.
- 2) Die zu untersuchende antigenhaltige Lösung wird aufgebracht, bei der Inkubation reagiert das Antigen mit dem fixierten Antikörper.
- 3) Nach Entfernen der Lösung und Waschen wird ein Antikörper/Enzym-Konjugat aufgebracht und erneut inkubiert. Dabei reagieren freie Antigen-Determinanten mit dem Konjugat.
- 4) Nach Entfernen des Konjugats und Waschen wird das Enzym in an sich bekannter Weise bestimmt. Der erhaltene Wert entspricht der Antigenmenge in der untersuchten Lösung.

Zur Herstellung des Antikörper/Enzym-Konjugats werden Enzyme hoher Reinheit benötigt, z. B. Meerrettichperoxidase mit ca. 250 E/mg. Die Hochreinigung von Enzymen ist aufwendig und bedingt deren hohen Preis.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, den EIA ökonomischer zu gestalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den EIA ohne den Einsatz hochgereinigter Enzyme durchzuführen.

Erfindungsgemäß werden anstelle von Antikörper/Enzym-Konjugaten Antikörper/Lektin-Konjugate eingesetzt, die im Anschluß an die Inkubation in einem weiteren Schritt mit kohlenhydrathaltigen Enzymen umgesetzt werden.

Als Lektine kommen alle gut zugänglichen Lektine in Betracht. Besonders günstig ist der Einsatz des aus *Canavalia ensiformis* gewinnbaren Concanavalin A. Das Konjugat wird durch Umsetzung mit dem Antikörper in einer Pufferlösung unter Zusatz von Glutaraldehydlösung in an sich bekannter Weise gewonnen. Nach der Inkubation mit dem Konjugat wird gewaschen und mit der Lösung eines kohlenhydrathaltigen Enzyms (z. B. Meerrettichperoxidase) inkubiert und gewaschen. Anstelle eines kohlenhydrathaltigen Enzyms können auch Enzyme eingesetzt werden, die vor der Umsetzung kohlenhydrathaltig gemacht oder an Kohlenhydrat angereichert werden. Anschließend erfolgt in üblicher Weise die Bestimmung des Enzyms.

Die erfindungsgemäße Verfahrensweise hat den Vorteil, daß auch Enzympräparate geringen Reinheitsgrades eingesetzt werden können. Im Fall von Meerrettichperoxidase können Präparate mit 25 - 32 E/mg verwendet werden. Demgegenüber fällt der zusätzliche Verfahrensschritt (Inkubation mit der Enzymlösung) praktisch nicht ins Gewicht. Das Verfahren ist in der medizinischen Diagnostik auch für Routineuntersuchungen anwendbar, z. B. zur Untersuchung von Blutkonserven auf die Anwesenheit von HBs-Antigen.

Ausführungsbeispiel

Herstellung des Konjugates:

Eine Immunglobulinfraktion des Antiserums und eine Concanavalin A-Lösung werden 16 h gegen 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 6,8) dialysiert. Zu einer Lösung mit 4 mg Concanavalin A und 2 mg Immunglobulin pro ml 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 6,8) werden nach Zusatz von 0,2 M Methyl-alpha-D-mannosid oder p-Nitrophenyl-alpha-D-mannosid 0,03 ml einer 1 %igen Glutaraldehydlösung gegeben. Die Mischung wird 3 h bei Zimmertemperatur gerührt. Danach werden pro ml Reaktionsmischung 0,05 ml einer 2 M Glycin-Lösung zugegeben und nochmals 2 h gerührt. Im Gegensatz zu der von J. L. Guesdon und S. Avrameas (Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 1980, 131 C, 389 - 396) beschriebenen Methode erfolgt keine Dialyse gegen PBS.

Versuchsanordnung:

PVC-Platten (Tablettenblister) mit halbkugelförmigen Vertiefungen werden mit Proteinantigenen wie folgt beladen:

0,1 ml einer Proteinelösung in Karbonat/Bikarbonat-Puffer (pH 9,6) (A. Voller, I. E. Bidwell, A. Bartlett: Bull. Wld. Hlth. Org. 53, 1976, 55 - 65) werden pro Vertiefung aufgetragen und die Platten 16 - 20 h bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wird nach A. Voller u. a. mit PBS/Tween 20 gewaschen. Dann bringt man 0,1 ml verschiedener Verdünnungen des Konjugates in einer 0,2 M Lösung von Methyl-alpha-D-mannosid oder von p-Nitrophenyl-alpha-D-mannosid in PBS/Tween 20 in die Vertiefungen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wird wie o. a. in PBS/Tween 20 gewaschen. Danach werden je 0,1 ml Peroxidase-Lösung (AWD) in PBS/Tween 20 zugefügt und nochmals 1 h bei 37°C inkubiert. Nach nochmaligem Waschen in PBS/Tween 20 erfolgt der Nachweis der gebundenen Peroxidase mittels der Farbreaktion mit H₂O₂ und o-Phenylendiamin (G. Wolters, L. Knijpers, S. Kacaki, A. Schmurs: J. clin. Path. 29, 1976, 873 - 879).

Anwendungsbeispiel:

PVC-Platten wurden mit Human-, Kaninchen- oder Schaf-Immunglobulin-G (je 5 µg/ml) beladen. Zur Immunreaktion wurde das Konjugat in geometrischer Reihe 1 : 30 bis 1 : 7680 verdünnt.

Meerrettichperoxidase (Rohprodukt) (mindestens 32 E/mg) wurde zu 20 mg/ml in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und für den Test in einer Verdünnung von 1 : 400 bis 1 : 800 benutzt. Kontrolluntersuchungen wurden mit hochgereinigter Meerrettichperoxidase (ca. 250 E/mg) in einer Verdünnung von 10 bis 5 μ g/ml durchgeführt.

Resultate:

Mit Kaninchen-IgG wurde eine Farbreaktion bis zur Verdünnung 1 : 960 des Konjugates erhalten. Mit Schaf-IgG war die Farbreaktion negativ. Mit Human-IgG wurde bis zur Verdünnung des Konjugates 1 : 120 eine schwache Farbreaktion erhalten, die auf eine Kreuzreaktion zwischen Human- und Kaninchen-IgG hinweist. Die Anwendung einer nur geringgradig gereinigten Peroxidase ergibt bei den beschriebenen Versuchsanordnungen gleiche Empfindlichkeit und ebenso geringe Nebenreaktionen wie der Einsatz eines hochgereinigten Präparates.

1. Verfahren zur Durchführung von Enzym-Immuno-Assays, dadurch gekennzeichnet, daß man anstelle von Antikörper/Enzym-Konjugaten Antikörper/Lektin-Konjugate benutzt und anschließend in einem weiteren Schritt mit einem kohlenhydrathaltigen Enzym umsetzt.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme vor der Umsetzung kohlenhydrathaltig gemacht oder an Kohlenhydrat angereichert werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lektin Concanavalin A und als kohlenhydrathaltiges Enzym Meerrettichperoxidase verwendet.