



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 76380  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT**

C (45)

(51) Kv.Ik./Int.Cl.<sup>4</sup> C 12 Q 1/28

## SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	840548
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	10.02.84
(23) Alkuperäpäivä - Giltighetsdag	10.02.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	12.08.84
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.06.88
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32) (33) (31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	11.02.83
20.04.83 Iso-Britannia-Storbritannien(GB)	
8303820, 8310721 Toteennäytetty-Styrkt	

(71) National Research Development Corporation, 101 Newington Causeway, London, Iso-Britannia-Storbritannien(GB)

(72) Larry Jan Kricka, Northfield, Birmingham,  
Gary Harold Gregory Henry Thorpe, Hadsworth, Birmingham,  
Thomas Patterson Whitehead, Leamington Spa, Warwickshire,  
Iso-Britannia-Storbritannien(GB)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Luminoiva tai luminometrinen määrittäminen -  
Lysande eller luminometrisk bestämning

(57) Tiivistelmä

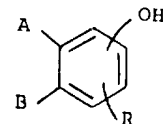
Parannettu luminoiva tai luminometrinen määrittäminen, erityisesti immuunimäärittäminen, jossa tapahtuu luminoiva reaktio peroksidiasientsyymin, hapetusaineen, kemiluminoivan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin ja herkkyyttä parantavan aineen välillä, jolla on yleinen kaava I.

Edullisia materiaaleja ovat piparjuuriperoksidaasi entsyyminä, vetyperoksidi hapetusaineena, jokin 4-jodifenolista, 4-fenyylifenolista tai 2-kloori-4-fenyylifenolista parantavana aineena, ja joko luminoli tai isoluminoli ftalatsiinidionina. Erityisen edullisessa toteutusmuodossa piparjuuriperoksidaasi liitetään määritettävän aineen vasta-aineeseen ja se toimii tällöin määrittämerkkiaineena immuunimäärittäyksessä.

(57) Sammandrag

Förbättrad luminiserande eller luminometrisk bestämning, särskilt immunbestämning, vid vilken en luminiserande reaktion sker mellan ett peroxidasenzym, ett oxidationsmedel, en kemiluminiserande 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion och ett sensitivtetsförbättrande medel med den allmänna formeln I.

Lämpliga substanser är pepparrotsoxidas som enzym, väteperoxid som oxidationsmedel, 4-jodfenol, 4-fenyylfenol eller 2-klor-4-fenyylfenol som sensitivtetsförbättrande medel, och antingen luminol eller isoluminol som ftalazindiol. Vid en särskilt föredragen utföringsform kopplas pepparrotsperoxidaset till en antikropp till den substans som skall bestämmas och det fungerar härvid som bestämningsmärksubstans vid en immunbestämning.



I

## Luminoiva tai luminometrinen määrittäminen

Tämä keksintö koskee parannettua luminoivaa tai luminometrinen määrittäminen, erityisesti immuunimäärittäminen ja taudinmäärittäminen-sarjaa, joka on suunniteltu määrittäminen helpottamiseksi.

Immuunimäärittäminen on yleisimmin käytettyjä analyttisiä tekniikoita kliinisessä laboratoriossa. Nykyään useimmissa immuunimäärittämissä käytetään merkkiaineen radioaktiivista isotooppia, erityisesti jodi-125:tä. Radioaktiivisilla isotoopeilla on kuitenkin lukuisia suuria haittoja. Ensiksi merkkiaineen käyttöön liittyy erittäin radioaktiivisten ja näin ollen potentiaalisesti vaarallisten aineiden käyttö. Toiseksi radioaktiivisesti merkityn aineen varastointi-ikä on usein suhteellisen lyhyt, ei vain siksi, että radioaktiivinen isotooppi on luonteeltaan jatkuvasti hajoava, vaan myös koska radioaktiivisesti merkityt proteiinit ovat usein epästabiileja. Kolmanneksi on usein vaikeaa merkitä proteiineja riittävästi herkästi ja nopeasti havaittavan reagenssin aikaansaamiseksi. Neljänneksi radioaktiivisesti merkittyjen aineiden hävittäminen on vaivalloista.

Nämä haitat ovat kiihdyttäneet elinkelpoisten vaihtoehtojen etsimistä radiomerkkaukselle. Ollakseen sopiva merkkiaineena aineen on täytettävä ainakin seuraavat kolme vaatimusta:

- a. sen pitäisi olla havaittava sekä nopeasti että hyvin pieninä määrinä, kun se on kiinnitetty ligandiin, kuten antigeeniin tai vasta-aineeseen;
- b. pitäisi olla mahdollista kiinnittää se vaikuttamatta sen määrittäminen, ligandiin kuten antigeeniin tai vasta-aineeseen, ja
- c. kun se on kiinnitetty, se ei saisi merkittävästi muuttaa ligandin ominaisuuksia.

Eräitä lupaavimpia vaihtoehtoisia merkkiaineita ovat joko aineet, jotka voivat itse ottaa osaa reaktioon, joka johtaa

luminoivan valon säteilyyn, tai aineita, jotka sopivasti käsiteltyinä tuottavat yhdisteitä, jotka kykenevät osallistumaan luminoivaan reaktioon. Luminoiva reaktio (kemiallinen reaktio, joka johtaa luminoivan valon säteilyyn) on yleensä kestoltaan riittävä tehdäkseen mahdolliseksi säteilleen valon toteamisen ja mittaamisen ja salliakseen täten merkityn materiaalin paljouden määrittämisen. Toisaalta luminesenssin mittaaminen on nopea prosessi ja voidaan saattaa päätökseen muutamassa sekunnissa useiden minuuttien sijasta, jonka radioaktiivisuuden mittaaminen vaatii. Yleiskatsauksen asiasta on esittänyt T.P. Whitehead et al., *Clinical Chemistry* 25, 1531-1546 (1979).

Luminesenssia on käytetty kolmessa luminoivan tai luminimetrisen immuunimäärityksen pääsystemissä:

- a. organoluminoivat tai organoluminometriset immuunimääritykset, joissa on käytetty kemiluminoivia tai bioluminoivia yhdisteitä, jotka osallistuvat suoraan luminoiviin reaktioihin (ts. jotka konvertoidaan viritettyyn tilaan ja palaavat sitten virittymättömään tilaan emittoiden fotonin) ligandien, kuten proteiinien, hormonien, hapteenien, steroidien, nukleiinihappojen, aineenvaihtoaineiden, antigeenien ja/tai vasta-aineiden merkitsemiseen. Esimerkkejä sopivista yhdisteistä ovat luminoli ja isoluminoli;
- b. luminoivan katalyytin tai kofaktorin immuunimääritykset, joissa luminoivien reaktioiden katalyyttejä tai kofaktoreita on käytetty merkkiaineina. Esimerkki sopivasta katalyytistä on peroksidaasientsyymi; ja
- c. entsyymivälitteiset immuunimääritykset, joissa luminoivia reaktioita on käytetty niiden tuotteiden määrittämiseen, joita muodostuu entsyymimerkkiaineiden vaikuttaessa sopiviin alusta-aineisiin. Eräs esimerkki tämän tyyppisestä immuunimäärityksestä on vasta-ainevälitteisen glukoosioksidaasin määrittäminen antamalla entsyymi/vasta-ainereagenssin reagoida glukoosin kanssa vetyperoksidin muodostamiseksi ja mittaamalla sitten muodostuneen vetyperoksidin määrä lisäämällä luminolia hallituissa olosuhteissa luminoivan reaktion initioimiseksi.

Yllä esitettyjen immuunimääritysten herkkyyden määrää osittain

merkkiaineen tai merkkiaineen tuotteen toteamisen alaraja. Kun kyseessä on luminoiva tai luminometrinen immuunimääritys, systeemin herkkyys riippuu osittain luminoivassa reaktiossa emittoidusta valosta merkityn materiaalin yksikköä kohti. Tämän keksinnön eräänä pyrkimyksenä on saada aikaan luminoiva tai luminometrinen immuunimääritys, jolla on parantunut herkkyys, joka on saavutettu määrittämällä merkitty materiaali tai merkkiaineen tuote tällä parannetulla luminoivalla reaktiolla.

Vaikka tämä parannettu luminoiva reaktio on erityisen hyödyllinen immuunimäärityksen merkkiaineiden tai niiden tuotteiden määrittämisessä, sitä ei ole millään muotoa rajoitettu tähän käyttöön. Niinpä tämän keksinnön lisäpyrkimyksenä on saada aikaan luminoiva tai luminometrinen määrittäminen (immuunimääritys tai muu), jolla on parannettu herkkyys, joka on saavutettu liittämällä tämä parannettu luminoiva reaktio määrittämenetelyyn.

Esimerkkejä määrittämisistä, jotka eivät ole immuunimäärityksiä, mutta joihin voi liittyä kyseessä oleva luminoiva reaktio, ovat:

- a. elastaasimääritys, joka perustuu peroksidaasin vapautumiseen liukenemattoman peroksidaasielastiinin valmistuksessa,
- b. glukoosimääritys, joka perustuu yhdessä liikkumattomaksi tehtyyn glukoosioksidaasiin ja peroksidaasiin, ja
- c. peroksidaasientsyymin, 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin tai hapettimen, kuten vetyperoksidin määrittäminen, kun nämä materiaalit eivät ole merkkiaineita eivätkä merkkiaineiden tuotteita.

Aikaisemmassa FI-patentissamme 70728 on esitetty parannettu luminoiva tai luminometrinen määrittämenetelmä, jossa peroksidaasientsyymin, hapettimen ja kemiluminoivan dihydroftaaliatsiinidionin annetaan reagoida, ja menetelmälle on tunnusomaista, että reaktio suoritetaan määrätyn 6-hydroksibensoiatsoli-yhdisteen läsnäollessa herkkyuden parantajana.

Tämän keksinnön laajimman näkökohdan mukaisesti aikaansaadaan tämän vuoksi parannettu luminoiva tai luminometrinen määrittäminen,

jossa luminoiva reaktio tapahtuu peroksidaasientsyymin, ha-  
 pettimen ja kemiluminoivan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin  
 välillä, jolloin reaktio suoritetaan fenoliyhdisteen läsnäol-  
 lessa, jolla on kaava



jossa

(i) A ja B ovat vety; ja R on halogeeni; fenyyli;

-Y--V, Y:n ollessa -CH<sub>2</sub>-, -O- tai -N=N- ja V:n ollessa  
 vety tai Y:n ollessa -O-, -S- tai -S-S- ja V:n ollessa hydr-  
 oksyyli; -N=N-, W:n ollessa vety tai karboksi;

--CO-; -CH=CH-Z, Z:n ollessa karboksi tai 2,4-dinit-  
 rofenyyli; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> tai C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyyli;

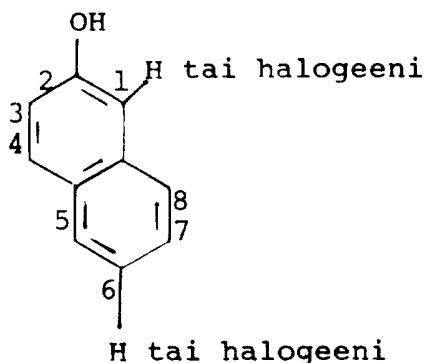
(ii) A on vety; B on halogeeni tai C<sub>1-6</sub>-alkyyli; ja R on  
 halogeeni;

(iii) A on halogeeni; B on vety; ja R on halogeeni tai fe-  
 nyyli; tai

(iv) A on vety tai halogeeni; R ja B yhdessä ovat nafta-  
 leeniytimen täydentävä ketju, jolla suunnassa R:stä B:hen on  
 kaava

$\begin{matrix} 5 & 6 & 7 & 8 \\ -\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-, & \text{X:n ollessa vety tai halogeeni, jolloin kaavan} \\ | \\ \text{X} \end{matrix}$

(1) mukainen yhdiste on  $\beta$ -naftoli, jolla on kaava:



ja halogeeni kaikissa tapauksissa (i)-(iv) yllä tarkoittaa  
 klooria, bromia tai jodia.

Määrittely on edullisesti immuunimäärittely.

Tämä keksintö perustuu hämmästyttävään havaintoon, että tiettyjen helposti saatavien fenolien tai naftolien lisääminen tunnettuun 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni/hapetusaine/peroksidiaasisysteemiin parantaa merkittävästi muodostuneen luminoivan reaktion herkkyyttä.

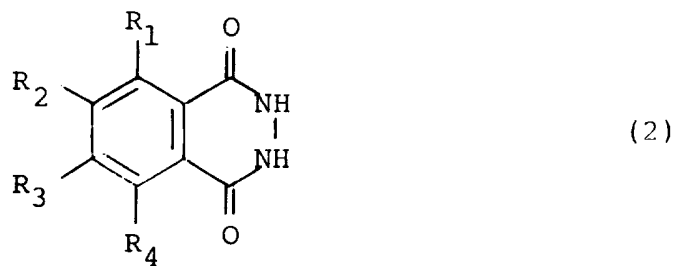
Tässä keksinnössä sanonta "parantunut" tarkoittaa, että tämän luminoivan reaktion kokonaisvaloemissio ja/tai tämän luminoivan reaktion signaali/taustasuhde on suurempi kuin mikä saavutetaan 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni/hapetusaine/per-

oksidaasisysteemillä ilman herkkyyttä parantavaa ainetta. Vain ne määritykset, joihin liittyy luminoiva reaktio, joka on näin "parantunut", sattuvat tämän keksinnön suojaajiiriin.

Tämän systeemin erityisetuna on, että näiden fenolien tai naf-  
tolien lisäyksen aikaansaama parannus on spesifinen peroksi-  
daasientsyymiä käyttäville reaktioille.

Tämän keksinnön mukainen kemiluminoiva 2,3-dihydro-1,4-ftalat-  
siinidioni (DPD) voi olla mikä tahansa DPD, joka konvertoituu  
viritettyyn tilaan kemiluminoivassa reaktiossa ja palautuu  
sitten virittymättömään tilaan emittoiden valoa.

2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionilla on edullisesti yleinen  
kaava (2)



jossa  $R_1$  on amino- tai substituoitu aminoryhmä ja jokainen ryhmä  $R_2$ ,  $R_3$  ja  $R_4$  on H, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkyyli-, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkenyyl-, hydroksyyli-,  $C_1$ - $C_6$ -alkoksyyl-, karboksyyli-, amino- tai substituoitu aminoryhmä tai  $R_2$  on amino- tai substituoitu aminoryhmä ja kukin ryhmistä  $R_1$ ,  $R_3$  ja  $R_4$  on H, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkyyli-, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkenyyl-, hydroksyyli-,  $C_1$ - $C_6$ -alkoksyyl-, karboksyyli-, amino- tai substituoitu aminoryhmä tai  $R_1$  ja  $R_2$  on ajateltu yhdessä ja ovat bentsoryhmän amino- tai substituoitu aminojohdannainen ja kumpikin ryhmästä  $R_3$  ja  $R_4$  on H, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkyyli-, valinnaisesti substituoitu  $C_1$ - $C_6$ -alkenyyl-, hydroksyyli-,  $C_1$ - $C_6$ -alkoksyyl-, karboksyyli-, amino- tai substituoitu aminoryhmä. Erityisen edullisia ftalatsiinidioneja käytettäväksi tässä keksinnössä ovat luminoli ja isoluminoli.

Tässä keksinnössä substituoituun aminoryhmään liittyy amidorhymä.

Muoto, jonka kemiluminoiva DPD saa tämän keksinnön luminoivassa määritysmenetelmässä, riippuu tarkasteltavan määrityksen tyypistä. Sellaisten määritysten kuin organoluminoivien tai organoluminometrinen immuunimääritysten kyseessä ollen, joissa ftalatsiinidionia käytetään merkkiaineena, kemiluminoiva DPD on 2,3-dihydro-1,4-ftalatsonidionin substituoitu aminojohdannainen, jossa aminoryhmä on liittynyt ligandiin, kuten proteiiniin, hormoniin, hapteniin, steroidiin, nukleinihappoon, aineenvaihdunta-aineeseen, antigeeniin tai vasta-aineeseen. Aminoryhmä voi olla liittynyt suoraan ligandiin tai sillan muodostavan haaran kautta. Sopivat sillan muodostavat haarat ovat tähän alaan perehtyneille hyvin tunnettuja, mitä osoittaa niiden selostaminen brittiläisessä hakemusjulkaisussa 2 008 247A ja US-patentissa 4 104 029. Edullisia sillan muodostavia haaroja ovat ne, jotka on johdettu hemisukkinaatti-, hemiglutaraatti-, hemimaleaatti-, karboksimeyyli-, glukuronidi-, merkaptoasettaatti- ja karboksimeyylijohdannaisista. Aminoryhmä voidaan liittää ligandiin millä tahansa sopivalla hyvin tunnetulla menettelyllä, joista jälleen tiettyjä selostetaan brittiläisessä hakemusjulkaisussa 2 008 247A ja US-patentissa 4 104 029. Edullisia liittämismenettelyjä on seka-anhydridien, karbodiimidien ja/tai aktiivisten estereiden käyttö.

Vaikka kemiluminoivia DPD-aineita, jotka sopivat käytettäväksi niissä määrityksissä, joissa käytetään ftalatsiinidionia merkkiaineena, voivat olla mitkä tahansa 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin substituoidut aminojohdannaiset, joiden aminoryhmä on liittynyt ligandiin, edullisia aineita ovat 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni (luminoli) ja 6-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni (isoluminoli), kummassakin tapauksessa aminoryhmän ollessa liittynyt ligandiin, erityisesti vasta-aineeseen.

Kun kyseessä ovat muut määritykset kuin ne, joissa käytetään ftalatsiinidioneja merkkiaineina, kemiluminoiva DPD on

2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni, erityisesti yllä lueteltua edullista tyyppiä, joka ei ole liittynyt ligandiin. Tässä tapauksessa kemiluminoiva DPD voi olla vapaana liuoksessa tai tehty liikkumattomaksi matriisiin. Erityisen edullisia materiaaleja ovat luminoli ja isoluminoli.

Mitä tahansa yleisen kaavan I fenolia tai naftolia, joka parantaa luminoivaa reaktiota kemiluminoivan DPD:n, hapetusaineen ja peroksideasin välillä, voidaan käyttää kyseisessä määrityksessä. Kuitenkin seuraavien herkkyyttä parantavien aineiden on havaittu antavan erityisen korkeat herkkyyden parantumistasot erityisesti, kun kemiluminoiva DPD on luminoli tai isoluminoli. Herkkyyttä parantavat aineet ovat 4-kloorifenoli, 4-bromifenoli, 4-jodifenoli, 4-bromi-2-kloorifenoli, 2,4-dikloorifenoli, 3,4-dikloorifenoli, 4-metyylifenoli, 4-tert.-butyyylifenoli, etyyli-3-(4-hydroksifenyyli)propionaatti, 4-bentsyyylifenoli, 4-(2',4'-dinitrostyryyli)fenoli, 4-hydroksikanelihappo, 4-fenyyylifenoli, 2-kloori-4-fenyyylifenoli, 4-(4'-hydroksifenyyli)bentsofenoni, 4-(fenyyliatso)fenoli, 4-(2'-karboksifenyyliatso)fenoli, 4-fenoksifenoli, 4-(4'-hydroksifenoksi)fenoli, 4-hydroksifenyyylisulfidi, 4-hydroksifenyylidisulfidi, naft-2-oli, 1-brominaft-2-oli, 6-brominaft-2-oli ja 1,6-dibrominaft-2-oli. Näistä herkkyyden parantajista 4-jodifenoli, 4-fenyyylifenoli ja 2-kloori-4-fenyyylifenoli ovat erityisen tehokkaita, 4-jodifenolin ollessa kaikkein tehokkain.

Mitä tahansa peroksidaasientsyymiä (International Union of Biochemistry on määritellyt luovuttajaksi, vetyperoksidiksi; oksidoreduktaasiksi (EC n:o 1.11.1.7)), joka katalysoi 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin, erityisesti luminolin luminoivaa reaktiota, voidaan käyttää tämän keksinnön luminoivassa määritysmenetelmässä. Esimerkkejä ovat kasviperoksidaasit. Edullisesti entsyymi on kuitenkin piparjuuriperoksidaasi (EC n:o 1.11.1.7).

Muoto, jonka peroksidaasientsyymi ottaa tämän keksinnön luminoivassa määritysmenetelmässä, riippuu tarkasteltavana olevasta määritystyyppistä. Sellaisten määritysten, erityisesti immuunimääritysten kyseessä ollen, joissa peroksidaasia käytetään merkkiaineena, se liittyy ligandiin, kuten proteiiniin, hormoniin, hepteeniin, steroidiin, nukleiinihappoon, metaboliittiin, antigeeniin tai vasta-aineeseen. Yleensä peroksidaasi liittyy ligandiin sillan muodostavan haaran kautta. Sopivia sillan muodostavia haaroja ja liittämismenettelyjä ovat ne, joita kuvattiin yllä kemiluminoiville DPD-aineille.

Kun kyseessä ovat muut määritykset kuin ne, joissa käytetään peroksidaasia merkkiaineena, entsyymi on vapaassa muodossaan, joko liuoksessa tai liikkumattomana matriisissa eikä liitettyä ligandiin.

Mitä tahansa hapetusainetta, joka reagoi 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioniin, erityisesti luminolin tai isoluminolin kanssa aiheuttaen DPD:n virittymisen niin, että se emittoi valoa luminoivassa reaktiossa, voidaan käyttää kyseisessä luminoivassa reaktiossa. Erityisen edullisia hapetusaineita ovat perboraatti-ioni ja vetyperoksidi.

Määrityksissä, erityisesti immuunimäärityksissä, joissa käytetään 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionia tai peroksidaasientsyymiä merkkiaineena ligandille, tunnettu määrä hapetusainetta lisätään reaktioseokseen, yleensä sopivasta lähteestä. Tietyissä muissa määrityksissä hapetusaineen, yleensä vetyperoksidin määrä on kuitenkin tuntematon. Tässä toisessa määritystyyppissä merkkiaine on aine, usein entsyymi, kuten glukoosioksidaasi, joka osallistuu alusta-aineen konvertointiin hapetusaineeksi. Niinpä tässä tapauksessa kyseistä luminoivaa reaktiota käytetään merkityn ligandin määrän määrittämiseen mittaamalla hapetusaineen pitoisuus luminoivassa reaktioseoksessa.

Valon emittoitumista tämän keksinnön luminoivasta määritysmenetelmästä vaikka se riippuukin pääasiassa peroksidaasin, hapettimen,

herkkyyttä parantavan aineen ja kemiluminoivan DPD:n valinnasta, määräävät myös sekundääriset tekijät, kuten lämpötila, pH, reagenssin pitoisuus, sekoitusnopeus ja valon mittausmenetelmä. Kyseisen systeemin herkkyyden maksimoimiseksi nämä sekundääriset tekijät tulee säätää maksimi valoemission saamiseksi toistettavalla ja helposti mitattavalla tavalla signaalin ja taustan välisen suhteen ollessa mahdollisimman suuri.

Valitut olosuhteet ovat yleensä kompromissi, johon liittyy peroksidaasin entsyymi- tai katalyyttinen aktiivisuus, reaktion kinetiikka, käytetty laitteisto, signaalin suhde taustaan ja vaadittu herkkyys.

Nyt on havaittu, että optimitulosten saavuttamiseksi kyseinen luminoiva reaktio tulee suorittaa kohtuullisissa lämpötilan, joka vaihtelee välillä 10-50°C, ja pH:n olosuhteissa, joka vaihtelee välillä 6-10, useimmiten välillä 7-9. Sopivia puskurointiaineita tämän keksinnön menetelmään ovat fosfaatti, tris(hydroksimetyyli)aminometaani, 2-amino-2-metyyli-1,3-propanidioli, asetaatti, karbonaatti ja boraatti.

Yleensä luminoivassa reaktioseoksessa olevien reagenssien pitoisuudet lukuunottamatta määriteltävää materiaalia, pidetään vakiona. Muuttuja voi olla esimerkiksi merkityn liganidin, merkkiaineen tuotteen, hapetusaineen tai sitomattoman peroksidaasin pitoisuus.

Seuraavat reagenssipitoisuudet ovat erityisen sopivia käytettäväksi kyseessä olevassa luminoivassa reaktiossa:

peroksidaasi	0,1 $\mu$ g	- 5000 mg/litra
hapetusaine	10 $\mu$ moolia-	300 mmoolia/litra
kemiluminoiva DPD	0,5 $\mu$ moolia-	200 mmoolia/litra
herkkyyttä parantava aine	1 $\mu$ mooli	- 100 mmoolia/litra

Suoritettaessa kyseinen luminoiva reaktio tietyt näistä neljästä olennaisesta reagenssista (mutta jättäen ainakin yhden pois) asetetaan näyteputkeen. Luminoiva reaktio laukaistaan

sitten lisäämällä putkeen puuttuvat olennaiset reagenssit. Emittoidun valon paljous voidaan määrittää standardi mittausvälineellä, kuten monistusvaloputkella, josta tuleva signaali syötetään piirturiin, oskilloskooppiin tai asteikkomittariin ja esitetään tai rekisteröidään siinä. Valo voidaan myös joissakin tapauksissa todeta paljaalla silmällä tai rekisteröidä valokuvauslevylle. Edullisesti kuitenkin valon paljous määritellään luminometrillä, joka on brittiläisessä hakemusjulkaisussa n:o 2 025 609A esitettyä tyyppiä.

Tämän keksinnön luminoivaa määritysmenetelmää voidaan käyttää kolmessa immuunimäärityksen päätyypissä, jokaisen ominaispiirteen ollessa ligandiin kiinnittyneen merkkiaineen tyyppi. Merkkiaineet ovat:

- a. 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin amino- tai substituoitu aminojohdannainen, jossa aminoryhmä on liittynyt ligandiin,
- b. peroksidaasientsyymi ja
- c. muu aine kuin kohdissa a ja b luetellut ja yleisesti entsyymi, kuten glukosioksidaasi, joka osallistuu substraatin konvertointiin materiaaliksi, joka voidaan määrittää kyseessä olevalla luminoivalla reaktiolla (yleisesti vetyperoksidi tai peroksidaasi).

Yllä esitetyissä immuunimäärityksissä määriteltävän aineen tai vasta-aineen merkkaaminen tällaiseen aineeseen on mahdollista. Riippuen käytetyn merkkiaineen tyypistä määrittäminen voi olla joko heterogeeninen tai homogeeninen. Edellisessä tapauksessa monimutkaisia nesteitä, kuten seerumia voidaan analysoida; jälkimmäisessä tapauksessa kuitenkin alustava uutto- tai puhdistusvaihe voi olla tarpeen.

Tyypillisiä heterogeenisiä tai homogeenisiä luminoivia tai luminometrisiä immuunimäärityksiä hahmotellaan alla:

1. Heterogeeninen luminoiva tai luminometrinen immuunimääritys  
Tässä immuunimääritystyyppissä määritettävän aineen annetaan reagoida sen vasta-aineen kanssa. Vapaa vasta-aine erotetaan

sitten sidotusta vasta-aineesta. Reaktion paljous määritetään merkkaamalla joko vasta-aine, määritettävä aine tai muu molekyyli, joka kykenee reagoimaan vapaiden tai sidottujen yhdisteiden kanssa erotuksen jälkeen.

## 2. Kilpaileva heterogeeninen luminoiva immuunimääritys

Tässä tapauksessa tuntematon määrä määritettävää ainetta sekoitetaan tunnettuun määrään sanottua ainetta, joka on liitetty merkkiaineeseen, ja tunnettuun, mutta rajoitettuun määrään sen vasta-ainetta. Seurauksena on kilpaileva reaktio vasta-aineelle tarkoitettun merkatun ja merkkaamattoman aineen välillä. Vasta-aineen ja merkkaamattoman aineen väliset ja vasta-aineen ja merkatun aineen väliset kompleksit erotetaan vapaasta merkatusta ja merkkaamattomasta aineesta.

Vasta-aineeseen sitoutuneen merkatun aineen määrä on verrannollinen merkkaamattoman aineen määrään määritettävässä liuoksessa. Nämä määrät voidaan määrittää joko mittaamalla vasta-aineeseen sitoutuneen merkkiaineen määrä tai mittaamalla jäljelle jääneen vapaan merkatun aineen määrä. Esimerkkejä tästä määrittäytystyypistä, jossa peroksidaasi on merkkiaine ja vasta-aine on sidottu kiinteään faasiin, nimittäin lasikoeputken seinämiin, esitetään brittiläisessä hakemusjulkaisussa 2 044 927A.

## 3. "Kaksikohtainen" heterogeeninen luminometrinen immuunimääritys

Tässä immuunimäärittäytystyypissä määritettävä aine sidotaan ensin sen merkkaamattomaan vasta-aineeseen, joka vuorostaan sidotaan kiinteään faasin tukiaineeseen, kuten muoviin. Kompleksia (vasta-aineen ja ko. aineen välillä) käsitellään sitten merkatulla vasta-aineella. Merkatun vasta-aineen analyysi saadusta kiinteästä kompleksista voidaan sitten suorittaa erottamalla kiinteä kompleksi liuoksesta ja määrittämällä sitten joko erotetussa kiinteässä kompleksissa olevan merkkiaineen määrä tai liuokseen liuenneessa merkatussa jäännösvasta-aineessa olevan merkkiaineen määrä.

Tämän tyyppisen immuunimäärittäytystyypin vaihtoehtoisissa toteutus-

muodoissa määritettävä aine voidaan joko sitoa peräkkäin merkattuun vasta-aineeseen ja merkkamattomaan, kiinteään tuettuun vasta-aineeseen tai sitoa sekä merkattuun että merkkamattomaan vasta-aineeseen yhdessä sidosvaiheessa.

#### 4. Homogeeninen luminoiva tai luminometrinen immuunimääritys

Tämä on sovellettavissa immuunimäärityksiin, joissa merkkiaine on 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin amino- tai substituoitu aminojohdannainen. Se riippuu siitä, että valo, joka emittoituu kiinnostavasta vapaasta merkatusta aineesta (tai sen vasta-aineesta), on voimakkuudeltaan ja aallonpituudeltaan erilainen kuin valo, joka emittoituu kiinnostavasta sidotusta merkatusta aineesta (tai sen vasta-aineesta).

Eräissä esimerkeissä havaittiin, että sen valon voimakkuus, joka emittoitui (progesteroni-isoluminolijohdannais-)konjugaatin, verikatalyytin ja vetyperoksidin reaktiosta, oli pienempi kuin samassa reaktiossa, joka suoritettiin anti-progesteronin IgG läsnäollessa.

Näin ollen määrittäessä inkuboitui ensin tuntematonta progesteroninäytettä tunnetun määrän kanssa anti-progesteronia IgG. Kun tasapaino oli saavutettu, lisättiin tunnettu määrä progesteroni-isoluminolijohdannaiskonjugaattia ja sen jälkeen tunnettu määrä verta ja vetyperoksidia. Emittoitunut valo mitattiin ja tuntemattomassa näytteessä oleva progesteronin määrä määritettiin sen avulla standardikäyrästä. (Mitä enemmän progesteronia on läsnä tuntemattomassa näytteessä, sitä vähemmän vapaata IgG:tä on jäljellä tasapainossa ja sitä pienempi on valosaanto luminoivasta reaktiosta).

Tällä tavoin progesteronin määrittäminen voidaan saavuttaa ilman, että vaaditaan erotusvaihetta.

Kaikissa yllä esitetyissä immuunimäärityksissä paljouden määrittäminen, toteamis- tai paikantamisvaiheissa voidaan käyttää tämän keksinnön mukaista luminoivaa reaktiota.

Yllä esitetyissä immuunimäärityksissä käytetyt vasta-aineet voidaan ostaa kaupallisesti tai valmistaa tunnetulla immunologisella tekniikalla. Vasta-aineet voivat olla vasta-aineiden monimutkaisen seoksen muodossa tai ne voivat olla yhtenä tai useampana monoklonaalisena vasta-aineena. Yleensä vaaditaan vain pieni tilavuusmäärä vasta-ainetta ja sitä pidetään pH-, ionivahvuus- ja lämpötilaolosuhteissa, jotka ovat asianmukaisia sen aktiivisuudelle.

Seuraavan epätäydellisen luettelon aineiden vasta-aineita voidaan hyödyllisesti käyttää immuunimäärityksissä, joissa käytetään kyseessä olevaa luminoivaa reaktiota: proteiinit, kuten insuliini, alfafetoproteiini ja ferritiini, hormonit, kuten kasvuhormoni, paratyroidihormoni, follikkelia stimuloiva hormoni, keltarauhashormoni, kilpirauhasta stimuloiva hormoni, adrenokortikotrooppinen hormoni, glukagoni, prolaktiini ja kalsitoniini, hapteenit/steroidit, kuten estrioli, progesteroni ja kortisoli, lääkkeet, kuten digoksiini, anti-geenit kuten solun pinta-antigeenit ja alkiokautinen syöpäantigeeni ja vasta-aineet, kuten sikotautiviruksen vasta-aine, ihmisen immunoglobuliini G (IgG), kaniinin IgG, lampaan IgG, marsun IgG, aasin IgG ja ihmisen immunoglobuliinit E ja M.

Tämän keksinnön luminoivaa määritysmenetelmää voidaan myös käyttää muissa määrityksissä kuin yllä kuvatuissa immuunimäärityksissä. Näitä ovat:

1. Elastaasin määrittäminen, joka perustuu peroksidaasin vapautumiseen liukenemattomasta peroksidaasielastiinivalmisteesta

Tässä määrittämisessä elastiini-peroksidaasikonjugaattia inkuboidaan vaihtelevien määrien kanssa elastaasientsyymiä. Ennalta määrätyn ajan kuluttua reagoimaton konjugaatti poistetaan sentrifugoimalla ja yläpuolisesta nesteestä määritetään sitoutumaton peroksidaasi.

Yläpuolisessa nesteessä olevan sitoutumattoman peroksidaasin määrä on verrannollinen elastaasin aktiivisuuteen testatussa näytteessä.

2. Proteinaasin määrittäminen, joka perustuu isoluminolin vapautumiseen synteettisestä peptidialustasta

Tässä määrittämisessä liikkumattomaksi tehtyä synteettistä peptidialustaa, Affigel 10-Ala-Ala-Ala-Phe-isoluminolia käsitellään vaihtelevilla määrillä proteinaasia. Ennalta määrätyn ajan kuluessa reagoimaton alusta-aine poistetaan sentrifugoimalla ja yläpuolisesta nesteestä määritetään isoluminoli. Yläpuolisessa nesteessä olevan isoluminolin määrä on verrannollinen proteinaasiaktiivisuuteen testatussa näytteessä.

3. Glukoosin määrittäminen, joka perustuu yhdessä liikkumattomaksi tehtyyn glukoosioksidaasiin ja peroksidaasiin

Tässä määrittämisessä glukoosioksidaasi ja peroksidaasi tehdään yhdessä liikkumattomiksi tukiaineelle, esim. Sepharose<sup>®</sup> tai muoviputkille. Tähän lisätään luminolin ja herkkyyttä parantavan aineen liuos. Lopuksi lisätään glukoosin liuos ja valoemissio rekisteröidään. Valoemissio on suoraan verrannollinen glukoosin määrään liuoksessa.

Kyseessä olevan määrittämisproseduurin pääkäyttö on kliinisisissä laboratorioissa tai lääkärin vastaanotoilla. Tällaisissa laboratorioissa ja/tai vastaanotoilla on tavallista, että määrättyssä määrittämisproseduurissa käytetyt materiaalit saadaan määrittämisvälinesarjan muodossa.

Näin ollen tämä keksintö kohdistuu myös määrittämisvälinesarjaan käytettäväksi tämän keksinnön parannetussa luminoivassa tai luminometrisessä määrittämisproseduurissa, joka sarja sisältää:

- a. peroksidaasientsyymiä,
- b. yleisen kaavan I herkkyyttä parantavaa ainetta, jossa kaavassa R, A ja B ovat samat kuin yllä määriteltiin,
- c. kemiluminoivaa 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionia.

Testivälinesarja voi sisältää myös hapetusainetta, mutta monissa tapauksissa tämä materiaali voidaan joko hankkia erikseen tai se voi olla määrittämisväline.

Edullisesti peroksidaasientsyymi, hapetusaine, herkkyyttä parantava aine ja kemiluminoiva DPD on kukin yksi luetelluista aineista, jotka ovat hyödyllisiä käytettäväksi kyseisessä määrittämisessä. Kyseessä olevan määrittämisvälinesarjan erityisen edullisessa toteutusmuodossa ainakin toinen peroksidaasientsyymistä ja kemiluminoivasta DPD:stä liitetään määrittettävän aineen vasta-aineeseen.

Valinnaisesti määrittämisvälinesarja voi sisältää myös yhtä tai useampaa standardiliuosta, jotka kukin sisältävät tunnetun määrän määrittettävää ainetta ja/tai yhtä tai useampaa edullista puskuriliuosta. Määrittämisvälinesarja voi sopivasti sisältää myös reaktioastian, joka sopii käytettäväksi sen laitteiston yhteydessä, jota käytetään määrittämisjärjestelmän suorituksen kuluessa emittoituneen valon määrittämiseen. Määrittämisvälinesarjaan voi kuulua myös sekoituslaite, jota käytetään varmistamaan reagenssien riittävä sekoittuminen.

Tämän keksinnön määrittämisjärjestelmää ja määrittämisvälinesarjaa kuvataan nyt ainoastaan esimerkin avulla.

#### Materiaalit ja menetelmät

##### Reagenssit

Piparjuuriperoksidaasi (HRP: puhtausluku (suhde optinen tiheys 430 nm:ssä/250 nm:ssä; RZ) suunnilleen 1,0) saatiin yhtiöltä Hughes and Hughes Ltd., Romford, Essex ja puhdistettiin geelisuodatuksella käyttäen 2,6 x 40 cm:n Ultragel ACA 34-kolonnia (LKB Instruments Ltd., South Croydon, Surrey). Kolonnia eluoiitiin käyttäen 0,015 moolia/l:n fosfaattipuskuria, pH 7,2, joka sisälsi 0,15 moolia/l NaCl; saadun puhdistetun peroksidaasin RZ-arvo oli n. 3,0.

Alfa-fetoproteiini (AFP), kaniinin anti-ihmisen AFP (koodi 100-008) ja kaniinin anti-ihmisen AFP/HRP-konjugaatti saatiin yhtiöltä Dako Products, Mercia Brocades Ltd., Brocades House, Pyrford Road, West Byfleet, Weybridge, Surrey.

Tyroksiini(T4), kaniinin anti-T4-päällysteiset putket ja

T4/HRP-konjugaatti saatiin yhtiöltä Boehringer Corporation, Lewes, Sussex, UK.

Rubella-viruksella (ihmisen) päällystetyt palloset ja anti-ihmisen IgG (vuohi)/HRP-konjugaatti saatiin yhtiöltä Abbott Laboratories Ltd., Diagnostic Division, Brighton Hill Parade, Basingstoke, Hampshire.

Anti-IgE:llä (vuohi) päällystetyt putket ja anti-IgE (kaniini)-peroksidaasikonjugaatti saatiin yhtiöltä Behringwerke AG, Marburg.

Luminoli (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) ja isoluminoli (6-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) saatiin yhtiöltä Sigma Chemical Co., Fancy Road, Poole, Dorset, UK. Luminolin mononatriumsuola valmistettiin edellä kuvatulla tavalla (Ham et al., Anal. Lett., 1979, 12, 535).

7-dimetyyliaminonaftaleeni-1,2-dikarboksylihappohydratsidi (kaava 2,  $R_1$  ja  $R_2$  on ajateltu yhdessä ja ovat dimetyyliaminosubstituoitu bentsoryhmä,  $R_3 = R_4 = H$ ) saatiin yhtiöltä Boehringer Mannheim.

N-(6-aminoheksyyli)-N-etyyli-isoluminoli saatiin yhtiöltä LKB, Suomi.

Kaikki fenolit ja naftolit saatiin yhtiöltä Aldrich Chemical Co., paitsi 2-kloorifenoli ja 2,4,6-trikloorifenoli (saatiin yhtiöltä Fluka AG, Chemische Fabrik, CH 9470, Buchs, Sveitsi), 2-naftoli (saatiin yhtiöltä BDH Chemicals Ltd., Atherstone, Warwickshire) ja 4-hydroksifenyyli-sulfidi (saatiin yhtiöltä Fluorochem Ltd., Glossom, Derbyshire).

Elastiini, elastaasi ja glukoosioksidaasi saatiin yhtiöltä Sigma Chemical Co., Dorset).

#### Analyysilaitteisto

Kemiluminoivat reaktiot suoritettiin 10 x 10 mm:n 4 ml:n

tilavuisilla muovisilla kertakäyttökyveteillä (W. Sarstedt Ltd., Leichester LE3 LUQ, UK). Emittoidun valon paljous määritettiin luminometrillä, jota edellä kuvattiin (Carter et al., UK-hakemusjulkaisu 2025609A), jossa on muunnos, joka sallii useiden kyvettien asettamisen peräkkäin tarkasti ja toistettavasti valomonistinputken valokatodin eteen.

Tulokset esitettiin nopealla potentiometrisella diagramma-  
piirturilla (Type PM 8202; Philips, Eindhoven, Hollanti;  
täyden skaalan näyttöaika alle 0,25 s).

#### Esimerkki 1

##### Peroksidaasin luminoiva määrittäminen käyttäen luminolia ja 4-jodifenolia

Natriumluminolia (50 mg) ja vetyperoksidia (62  $\mu$ l, 30 % paino/tilavuus) lisättiin 200 ml:aan tris-puskuria (0,1-molaarinen, pH 8,5). Liuos valmistettiin useita tunteja ennen käyttöä luminoivan reaktion initioimiseksi. 10  $\mu$ l 4-jodifenolia dimetyylisulfoksidissa (4,54 mmoolia/l) asetettiin kyvetin yhteen nurkkaan ja 10  $\mu$ l kaniinin anti-AFP-HRP-konjugaattia (1:1000-laimennus) asetettiin toiseen nurkkaan. Reaktio initioitiin ruiskuttamalla luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reagenssi (0,9 ml). Valon ulostulo mitattiin ja esitetään taulukossa 1. Signaali/taustasuhteen parannus mitattiin myös ja esitetään taulukossa 2.

#### Esimerkit 2-3

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että lisätty 4-jodifenoliliuoksen määrä nostettiin 20  $\mu$ l:aan ja 90  $\mu$ l:aan. Valon ulostulo mitattiin ja esitetään taulukossa 1. Signaali/taustasuhteen parannus mitattiin myös ja esitetään taulukossa 2.

#### Esimerkit 4-8

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 4-jodifenoli korvattiin seuraavilla herkkyyttä parantavilla aineilla:

4-bromifenoli  
4-kloorifenoli  
4-bromi-2-kloorifenoli  
2,4-dikloorifenoli  
3,4-dikloorifenoli

Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Esimerkit 9-13

Esimerkkien 4-8 menettely toistettiin paitsi, että lisätyn herkkyyttä parantavan aineen liuoksen määrä nostettiin 90  $\mu$ l:aan. Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Esimerkit 14-16

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 4-jodifenoli korvattiin seuraavilla herkkyyttä parantavilla aineilla:

4-hydroksikanelihappo  
2-naftoli  
6-brominaft-2-oli

Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Esimerkit 17-19

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 10  $\mu$ l 4-jodifenolia korvattiin 5  $\mu$ l:lla seuraavia herkkyyttä parantavia aineita:

4-fenyylifenoli  
1,6-dibrominaft-2-oli  
1-brominaft-2-oli

Tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Esimerkit 20-24

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 10  $\mu$ l 4-jodifenolia korvattiin 5  $\mu$ l:lla seuraavia herkkyyttä parantavia aineita:

76380

bis-4-hydroksifenyylisulfidi  
 bis-4-hydroksifenyylidisulfidi  
 4-(2',4'-dinitrostyryyli)fenoli  
 4-(4'-hydroksifenyyli)bentsofenoni  
 4-(4'-hydroksifenoksi)fenoli

Signaali/taustasuhteen parannus mitattiin ja esitetään taulukossa 3.

#### Esimerkit 25-28

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 10  $\mu$ l 4-jodifenolia korvattiin 20  $\mu$ l:lla seuraavia herkkyttä parantavia aineita:

4-(fenyyliatso)fenoli  
 4-(2'-karboksifenyyliaatso)fenoli  
 4-bentsyylifenoli  
 Etyyli-3-(4-hydroksifenyyli)propionaatti

Signaali/taustasuhteen parannus mitattiin ja esitetään taulukossa 3.

#### Vertailuesimerkki

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että mitään herkkyttä parantavaa ainetta ei lisätty luminoivaan reaktioseokseen. Tulokset esitetään taulukoissa 1, 2 ja 3.

#### Taulukko 1

Valoemission parantaminen eri fenoleilla ja naftoleilla

<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Parannusaine</u>	<u>Lisätty</u> <u>tilavuus(<math>\mu</math>l)</u>	<u>Valoemissio</u> <u>(mV 700 V PM)</u>
Vertailu			
0	2-kloori-4-fenyylifenoli	5	11 7137
1	4-jodifenoli	10	903
2	4-jodifenoli	20	1958
3	4-jodifenoli	90	3056
4	4-bromifenoli	10	261
5	4-kloorifenoli	10	190
6	4-bromi-2-kloorifenoli	10	80
7	2,4-dikloorifenoli	10	29
8	3,4-dikloorifenoli	10	20

Taulukko 1 (jatkoa)Valoemission parantaminen eri fenoleilla ja naftoleilla

<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Parannusaine</u>	<u>Lisätty</u> <u>tilavuus(,ul)</u>	<u>Valoemissio</u> <u>(mV 700 V PM)</u>
9	4-bromifenoli	90	1379
10	4-kloorifenoli	90	1190
11	4-bromi-2-kloorifenoli	90	555
12	2,4-dikloorifenoli	90	165
13	3,4-dikloorifenoli	90	82
14	4-hydroksikanelihappo	10	2317
15	2-naftoli	10	50
16	6-brominaft-2-oli	10	42
17	4-fenyylifenoli	5	5830
18	1,6-dibrominaft-2-oli	5	2401
19	1-brominaft-2-oli	5	651

NB: valoemissio mitataan ulostulona (mV) 700 V:n valomonistimen jännitteellä.

Taulukko 2

<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Signaali/taustasuhteen</u> <u>parannus</u>
Vertailu	1
0	3674
1	170
2	510
3	1697
4	40
5	25
7	7
8	4
9	476
10	357
12	258
13	44
14	2935
15	1698
16	1268

Taulukko 2 (jatkoa)

<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Signaali/taustasuhteen</u> <u>parannus</u>
17	3482
18	2055
19	3931

Taulukko 3

<u>Esi-</u> <u>merkki</u>	<u>Parannusaine</u>	<u>Lisätty</u> <u>tilavuus(,ul)</u>	<u>Signaali/tausta-</u> <u>suhteen parannus</u>
Vertailu	-	-	1
20	bis-4-hydroksifenyylisulfidi	5	73
21	bis-4-hydroksifenyylidisulfidi	5	1724
22	4-(2',4'-dinitrostryryyli)- fenoli	5	73
23	4-(4'-hydroksifenylyli)- bentsofenoni	5	118
24	4-(4'-hydroksifenoksi)- fenoli	5	521
25	4-(fenyliatso)fenoli	20	659
26	4-(2'-karboksifenylyli- atso)fenoli	20	171
27	4-bentsyylifenoli	20	109
28	Etyyli-3-(4-hydroksi- fenyyli)propionaatti	20	86

Esimerkit 29-32

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että 4-jodifenoli korvattiin eri vaihtoehtoisilla fenoleilla ja naftoleilla (10  $\mu$ l, 1 mg/ml liuosta DMSO:ssa). Valon ulostuloa verrattiin luminoivan reaktion valon ulostuloon ilman parannusainetta. Jos valon ulostulo oli suurempi fenolin tai naftolin läsnäollessa kuin ilman sitä, luminoivan reaktion sanottiin parantuneen. Tulokset esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4Eri fenolien ja naftolien vaikutus valon ulostuloon

<u>Esimerkki</u>	<u>Fenoli/naftoli</u>	<u>Parannus</u>
29	4-kloori-3-metyylifenoli	Kyllä
30	4-metyylifenoli	Kyllä
31	4-tert.-butyyllifenoli	Kyllä
32	4-fenoksifenoli	Kyllä

Esimerkki 33

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että N-(6-aminoheksyyli)-N-etyyli-isoluminoli korvasi luminolin.

Esimerkki 34

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että luminoli korvattiin isoluminolilla.

Esimerkki 35

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että luminoli korvattiin 7-dimetyyliaminonaftaleeni-1,2-dikarboksyylihappohydratsidilla (9-dimetyyliamino-2,3-dihydrobentso[ $f$ ]-ftalatsiini-1,4-dioni) ja ftalatsiinidioni/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> laimennettiin suhteessa 1:10 ennen käyttöä.

Esimerkki 36

Esimerkin 1 menettely toistettiin paitsi, että vetyperoksidi korvattiin natriumperboraatilla.

Esimerkki 37 - Alfafetoproteiinin (AFP) määrittäminen

a. Polystyreenipallosten päällystäminen anti-AFP:llä

(1) 500 ml:n laajasuiseen lasipulloon lisättiin 125 ml glysiini/NaOH-puskuria (0,1 moolia/l, pH 8,8) ja 0,25 g BSA:a. Liuosta sekoitettiin sitten 2 tuntia telasekoittajalla 20°C:ssa. Tämän ajan kuluttua pullo (ja sen korkki) huuhdeltiin glysiinipuskurilla (3 x 50 ml) kaiken sitoutumattoman albumiinin poistamiseksi ja lopuksi sen annettiin valua kuivaksi.

(2) 1000 polystyreenipallosta pestiin Lipsol-nesteellä (kauppanimi, 1 %, 500 ml) 30 minuuttia. Kun palloja oli pestyt tislattulla vedellä, ne asetettiin Buchner-kolviin yhdessä 200 ml:n kanssa glysiinipuskuria ja kaasu poistettiin niistä.

(3) Glysiinipuskuri (400 ml) siirrettiin esipäällystettyyn lasipulloon ja kaniinin anti-ihmisen AFP:a (1,5 ml) lisättiin. Liuosta sekoitettiin hyvin ja sen jälkeen kaasuttomat palloset lisättiin. Koko seosta sekoitettiin telasekoittimella 6 tuntia 20°C:ssa.

(4) 6 tunnin kuluttua glysiinipuskuri-vasta-aineliuos dekantoi-  
toitiin ja palloset pestiin kahdesti 400 ml:lla PBS:a (0,0015 ml/l fosfaattia, 0,15 moolia/l NaCl, pH 7,2). Kun toinen PBS-pesu oli dekantoitu, BSA:n liuos (0,5 %) PBS:sä (400 ml) lisättiin. Jälleen koko seosta sekoitettiin telasekoittimella 20°C:ssa. 30 minuutin kuluttua PBS-albumiini-liuos poistettiin ja asetaattipuskuria (0,1 moolia/l, pH 4,2, 400 ml), joka sisälsi Tween 20-pesuainetta (kauppanimi, 0,01 %) lisättiin. Sekoitusta suoritettiin 10 minuutin ajan ja sen jälkeen asetaattipuskuri korvattiin PBS-puskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween-pesuainetta (2 x 400 ml). Lopuksi PBS dekantoi-  
toitiin ja palloja kuivattiin suodatinpaperilla 20°C:ssa 30 min. Palloja säilytettiin kierrekorkkisissa pulloissa 4°C:ssa.

b. (1) Riittävästä määrästä vasta-aineella päällystettyjä palloja (vaihe a. yllä) PBS:ssä poistettiin kaasua 15-30 minuutin ajan.

(2) 50  $\mu$ l näytettä, joka sisälsi AFP:a, lisättiin kyvetiin yhdessä 0,95 ml:n kanssa PBS/BSA/Tween-pesuainetta (fosfaattia 0,015 moolia/l; NaCl 0,15 moolia/l; BSA 0,2 %; Tween 20 0,05 %; pH 7,2). Liuos lämmitettiin 37°C:een ja haudottiin sitten pallosten kanssa 1 tunnin ajan.

(3) Sen jälkeen liuos dekantoiitiin ja palloset pestiin PBS/Tween-liuoksella (200 ml 15 s, sitten 200 ml 5 min).

(4) Palloisia inkuboiitiin sitten 0,9 ml:n kanssa 1:1000-laimennusta kaniinin anti-ihmis - AFP/HRP-konjugaattia 1 tunnin ajan. (Konjugaatti laimennettiin PBS/BSA/Tween-liuoksella ja lämmitettiin 37°C:een ennen lisäystä pallosiin).

c. (1) Liuos dekantoiitiin jälleen kerran ja palloset pestiin ionivaihdetulla tislattulla vedellä 2 minuuttia. Veden dekantoinnin jälkeen palloset siirrettiin varovasti kyvetteihin (yksi kyvetiä kohti).

(2) Jokaisen kyvetin kulmaan asetettiin myös 10  $\mu$ l 4-jodifenolia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,1 moolia/l, pH 8,0). Luminoiva reaktio initioitiin ruiskuttamalla 0,9 ml luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-liuosta (natriumluminolia (50 mg), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62  $\mu$ l; 30 % paino/tilavuus), Tris (0,1 moolia/l, pH 8,0, 200 ml)). Valoemissio mitattiin 30 s kuluttua ja verrattiin aikaisemmin valmistettuun standardikäyrään AFP-pitoisuuden määrittämiseksi.

#### Esimerkki 38 - T4:n määrittäminen

T4 määritettiin käyttäen kilpailevaa entsyymisidoksista immuunisorboivaa määrittäystä. Näytteen seosta, joka sisälsi merkkakaamatonta T4:a ja T4/HRP-konjugaattia, haudottiin putkilla, jotka oli päällystetty rajoitetulla määrällä anti-T4:a (kaniini).

Kun tasapaino oli saavutettu, sitoutumaton materiaali pestiin putkista ja 10  $\mu$ l 4-jodifenolia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,1 moolia/l, pH 8,0) asetettiin jokaiseen putkeen. Luminoiva

76380

reaktio initioitiin ruiskuttamalla 0,9 ml luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-liuosta (natriumluminolia (50 mg), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62  $\mu$ l; 30 % paino/tilavuus), Tris (0,1 moolia/l, pH 8,0, 200 ml)). Valoemissio 30 s kuluttua mitattiin ja sitä verrattiin aikaisemmin valmistettuun standardikäyrään T4-pitoisuuden määrittämiseksi.

#### Esimerkki 39 - Vihurirokon anti-IgG:n määrittäminen

Testinäytettä, joka sisälsi vihurirokon anti-IgG:ä, inkuboitiin vihurirokkoviruksella (ihmisen) päällystettyjen pallosten kanssa Tris-puskurissa. Kun pallosta oli pesty pois reagoimattomat komponentit, niitä inkuboitiin anti-ihmisen IgG (vuohi)/HRP-konjugaatin kanssa jälleen Tris-puskurissa.

Liuos dekantoiitiin ja palloset pestiin ionivaihdetulla tislattulla vedellä. Kun pestyt palloset oli poistettu vedestä, ne siirrettiin kyvetteihin (yksi kyvetteä kohti).

Jokaisen kyvetin kulmaan asetettiin myös 10  $\mu$ l 4-jodifenolia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,1 moolia/l, pH 8,0). Luminoiva reaktio initioitiin ruiskuttamalla 0,1 ml luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-liuosta (natriumluminolia (50 mg), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62  $\mu$ l; 30 % paino/tilavuus), Tris (0,1 moolia/l, pH 8,0, 200 ml)). Valoemissio 30 s kuluttua mitattiin ja sitä verrattiin aikaisemmin valmistettuun standardikäyrään vihurirokon anti-IgG:n pitoisuuden määrittämiseksi.

#### Esimerkki 40 - IgE:n määrittäminen

Näyte, joka sisälsi ihmisen IgE:ä, lisättiin anti-IgE:llä (vuohi) päällystettyihin putkiin ja inkuboitiin 2 tuntia 20°C:ssa. Tämän ajan kuluttua putket pestiin reagoimattomien komponenttien poistamiseksi ja tunnettu määrä anti-IgE (kaniini)-peroksidaasikonjugaattia lisättiin putkiin ja inkuboitiin vielä 2 tuntia 20°C:ssa. Ylimääräiset entsyymikonjugoidut vasta-aineet pestiin sitten pois ja sitoutuneen entsyymin aktiivisuus määritettiin seuraavasti:

Jokaisen putken kulmaan asetettiin 10  $\mu$ l 4-jodifenolia (1 mg/ml) Tris-puskurissa (0,1 moolia/l, pH 8,0). Luminoiva

reaktio initioitiin ruiskuttamalla 0,9 ml luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:a (luminolia (50 mg), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62  $\mu$ l, 30 % paino/tilavuus), Tris-puskuria (0,1 moolia/l, pH 8,0, 200 ml)). Valoemissio 30 s kuluttua mitattiin ja sitä verrattiin aikaisemmin valmistettuun standardikäyrään IgE-pitoisuuden määrittämiseksi.

#### Esimerkki 41 - Elastaasin määrittäminen

Piparjuuriperoksidaasia konjugoitiin jauhettuun elastiiniin menetelmällä, jonka ovat esittäneet G.C. Saunders et al., Anal. Biochem. 1982, 126, 122. 1 ml elastiiniperoksidaasin suspensiota pestiin ja tasapainotettiin 2 ml:ssa 0,01 moolia/l:n Tris-puskuria (pH 9), joka sisälsi CaCl<sub>2</sub>:a (2 mmoolia/l), 0,5 h 37°C:ssa. Konjugaatti sentrifugoitiin ja yläpuolinen neste heitettiin pois. Eri määrät elastaasia (0-100 ng/ml) Tris-CaCl<sub>2</sub>-puskurissa lisättiin ja inkuboitiin 37°C:ssa elastiini-HRP:n kanssa. 60 minuutin kuluttua reagoimaton elastiini-HRP poistettiin sentrifugoimalla ja yläpuolisen nesteen jae poistettiin ja sentrifugoitiin. 200  $\mu$ l yläpuolista nestettä poistettiin ja asetettiin kyvetiin ja valoemissio initioitiin lisäämällä 0,9 ml luminoli/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/4-jodifenoliliuosta (natriumluminolia (50 mg), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62  $\mu$ l; 30 % paino/tilavuus), 4-jodifenolia (2 ml, 1 mg/ml DMSO:ssa) 200 ml:ssa Tris-puskuria (0,1 moolia/l, pH 8,0)).

Valoemissio 30 s kuluttua mitattiin.

#### Esimerkki 42

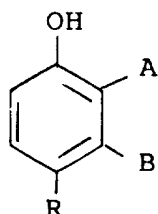
Glukoosin määrittäminen, joka perustuu yhdessä liikkumattomaksi tehtyyn glukoosioksidaasiin ja peroksidaasiin

Glukoosioksidaasi (5 mg; Sigma) ja piparjuuriperoksidaasi (5 mg; Sigma) tehtiin yhdessä liikkumattomaksi syaanibromidilla aktivoitulle Sepharose-hartsille (Pharmacia, UK) menetelmällä, jonka ovat esittäneet Ford ja DeLuca, Anal. Biochem, 1981, 110, 43. Liikkumattomaksi tehdyt entsyymit suspendoitiin fosfaattipuskuriin (0,1 moolia/l, pH 7,0). Liikkumattomaksi tehtyjen entsyymien suspensio (100 mg/l, 50  $\mu$ l) lisättiin 1 ml:aan luminolin vesiliuosta (25 mg/100 ml) ja 50  $\mu$ l:aan

4-jodifenolia (1 mg/ml DMSO:ssa), jotka sisältyivät kyvetiin. 10  $\mu$ l:n vesipitoinen näyte glukoosia sisältävää liuosta lisättiin sitten, kyvetin sisältöä sekoitettiin ja valoemissio rekisteröitiin. Huippuvaloemissio oli lineaarinen välillä 50-500 nmoolia glukoosia. Vaihtoehtoisesti glukoosioksidaasi ja peroksidaasi voidaan tehdä liikkumattomaksi muovitukien pinnalle (esim. Leon et al., Clin. Chem., 1977, 23, 1556).

Patenttivaatimukset





1. Parannettu luminoiva tai luminometrinen määrittäminen, jossa kemiluminoiva reaktio tapahtuu peroksidaasientsyymin, hapettimen ja kemiluminoivan aineen 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidionin välillä, tunnettu siitä, että reaktio suoritetaan fenoliyhdisteen läsnäollessa, jolla on kaava:



(1)

jossa

(i) A ja B ovat vety; ja R on halogeeni; fenyylä;

-Y--V, Y:n ollessa -CH<sub>2</sub>- tai -O- ja V:n ollessa vety tai Y:n ollessa -O-, -S- tai -S-S- ja V:n ollessa hydroksyyli; -N=N-, W:n ollessa vety tai karboksi; --CO-;

-CH=CH-Z, Z:n ollessa karboksi tai 2,4-dinitrofenyylä;

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-C<sub>1-6</sub>H<sub>5</sub> tai C<sub>1-6</sub>-alkyyli;

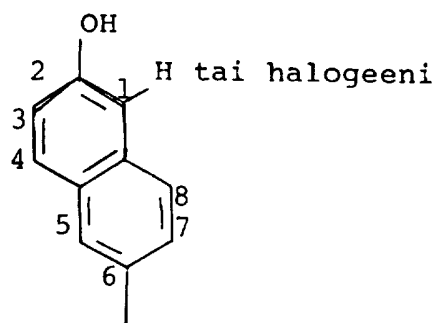
(ii) A on vety; B on halogeeni tai C<sub>1-6</sub>-alkyyli; ja R on halogeeni;

(iii) A on halogeeni; B on vety; ja R on halogeeni tai fenyylä; tai

(iv) A on vety tai halogeeni; R ja B ovat yhdessä naftaleeniytimen täydentävä ketju, jolla suunnassa R:stä B:hen on kaava

$\begin{matrix} 5 & 6 & 7 & 8 \\ -\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-, & \text{X:n ollessa vety tai halogeeni, jolloin kaavan} \\ | \\ \text{X} \end{matrix}$

(1) mukainen yhdiste on  $\beta$ -naftoli, jolla on kaava:



H tai halogeeni

ja halogeeni kaikissa tapauksissa (i)-(iv) yllä tarkoittaa klooria, bromia tai jodia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kemiluminoiva aine 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni on luminoli, isoluminoli, N-(6-aminoheksyyli)-N-etyyli-isoluminoli tai 7-dimetyyliaminonaftaleeni-1,2-dikarboksyylihappohydratsidi.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että peroksidaasientsyymi on piparjuuriperoksidaasi.

4. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hapetin on vetyperoksidi tai perboraatti-ioni.

5. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että peroksidaasientsyymi on läsnä ligandiin sidotussa muodossa ja läsnäolevan peroksidaasientsyymin määrä määritetään havaitsemalla tai mittaamalla kemiluminesenssi.

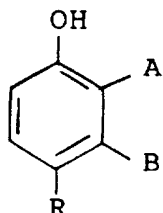
6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että fenoliyhdiste on 4-jodifenoli, 4-fenyylifenoli tai 2-kloori-4-fenyylifenoli.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni on luminoli tai isoluminoli, peroksidaasientsyymi on piparjuuriperoksidaasi ja se on läsnä ligandiin sidotussa muodossa ja läsnäolevan piparjuuriperoksidaasin määrä määritetään havaitsemalla tai mittaamalla kemiluminesenssi, hapetin on vetyperoksidi ja fenoliyhdiste on 4-jodifenoli.

8. Määrittäsvälinesarja käytettäväksi luminoivassa tai luminometrisessä määrittäsmenetelmässä, **tunnettu** siitä, että se käsittää seuraavat komponentit erillisissä säiliöissä:
- kemiluminoiva aine 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni,
  - peroksidaasientsyymi, ja
  - vaatimuksessa 1 määritetty fenolinen yhdiste.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen määrittäsvälinesarja, **tunnettu** siitä, että kemiluminoiva aine 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni on luminoli, isoluminoli, N-(6-aminoheksyyli)-N-etyyli-isoluminoli tai 7-dimetyyliaminonaftaleeni-1,2-dikarboksyylihappohydratsidi.
10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen määrittäsvälinesarja, **tunnettu** siitä, että peroksidaasientsyymi on piparjuuriperoksidaasi.
11. Jonkin patenttivaatimuksen 8-10 mukainen määrittäsvälinesarja, **tunnettu** siitä, että peroksidaasientsyymi on läsnä ligandiin sidotussa muodossa.
12. Jonkin patenttivaatimuksen 8-11 mukainen määrittäsvälinesarja, **tunnettu** siitä, että fenoliyhdiste on 4-jodifenoli, 4-fenyyllifenoli tai 2-kloori-4-fenyyllifenoli.
13. Patenttivaatimuksen 8 mukainen määrittäsvälinesarja, **tunnettu** siitä, että 2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni on luminoli tai isoluminoli, peroksidaasientsyymi on piparjuuriperoksidaasi ja se on läsnä ligandiin sidotussa muodossa ja fenoliyhdiste on 4-jodifenoli.



Patentkrav

1. Förbättrad luminiserande eller luminometrisk bestämning, vid vilken en kemiluminiserande reaktion sker mellan ett peroxidasenzym, ett oxidationsmedel och en kemiluminiserande 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion, **kännetecknad** av att reaktionen utförs i närvaro av en fenolförening med formeln:



(1)

däri

(i) A och B är väte; och R är halogen; fenyl;  $-Y-$    $-V$ , när Y är  $-\text{CH}_2-$  eller  $-\text{O}-$  och V är väte eller när Y är  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$  eller  $-\text{S}-\text{S}-$  och V är hydroxyl;  $-\text{N}=\text{N}-$   , när W är väte

eller karboxi;  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-$  ;  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{Z}$ , när Z är karboxi eller 2,4-dinitrofenyl;  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  eller  $\text{C}_1-\text{C}_6$ -alkyl;

(ii) A är väte; B är halogen eller  $\text{C}_{1-6}$ -alkyl; och R är halogen;

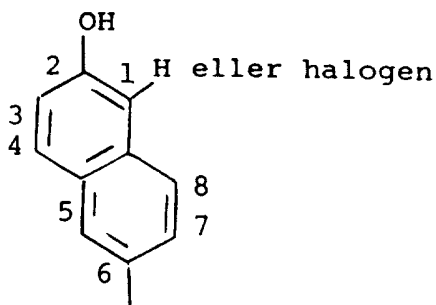
(iii) A är halogen; B är väte; och R är halogen eller fenyl; eller

(iv) A är väte eller halogen; R och B är tillsammans en naftalennukleär kompletterande kedja med formeln, i direction från R till B,

$-\text{CH}=\overset{5}{\underset{\text{X}}{\text{C}}}-\overset{6}{\text{CH}}=\overset{7}{\text{CH}}-\overset{8}{\text{H}}$ , vari X är väte eller halogen, då förening enligt

formeln

(1) är  $\beta$ -naftol med formeln



H eller halogen

och halogen vid alla ställen (i)-(iv) ovan menar klor, brom eller jod.

2. Bestämning enligt patentkravet 1, **kännetecknad** av att den kemiluminiserande föreningen 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion är luminol, isoluminol, N-(6-aminohexyl)-N-etylisoluminol eller 7-dimetylaminonaftalen-1,2-dikarboxylsyrahydrazid.

3. Bestämning enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknad** av att peroxidaseenzymet är pepparrotsperoxidase.

4. Bestämning enligt något av patentkraven ovan, **kännetecknad** av att oxidationsmedlet är väteperoxid eller perborat-ion.

5. Bestämning enligt något av patentkraven ovan, **kännetecknad** av att peroxidaseenzymet är närvarande i till en ligand kopplad form och mängden av närvarande peroxidaseenzymet bestäms genom detektering eller mätning av kemiluminiscens.

6. Bestämning enligt något av patentkraven ovan, **kännetecknad** av att fenolföreningen är 4-jodfenol, 4-fenylfenol eller 2-klor-4-fenylfenol.

7. Bestämning enligt patentkravet 1, **kännetecknad** av att 2,3-dihydro-1,4-ftalazindionet är luminol eller isoluminol, peroxidaseenzymet är pepparrotsperoxidase och det är närvarande i till en ligand kopplad form och mängden av närvarande pepparrotsperoxidase bestäms genom detektering eller mätning av kemiluminiscens, oxidationsmedlet är väteperoxid och fenolföreningen är 4-jodfenol.

8. Bestämningsmedelserie för användning vid en luminiscerande eller luminometrisk bestämning, **kännetecknad** av att den innehåller följande komponenter i avskilda behållare:

- kemiluminiscerande förening 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion,
- peroxidasenzym, och
- fenolförening enligt patentkravet 1.

9. Bestämningsmedelserie enligt patentkravet 8, **kännetecknad** av att den kemiluminiscerande föreningen 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion är luminol, isoluminol, N-(6-aminoheptyl)-N-etylisoluminol eller 7-dimetylaminonaftalen-1,2-dikarboxylsyrahydrazid.

10. Bestämningsmedelserie enligt patentkravet 8 eller 9, **kännetecknad** av att peroxidasenzymet är pepparrotsperoxidas.

11. Bestämningsmedelserie enligt något av patentkraven 8-10, **kännetecknad** av att peroxidasenzymet är närvarande i till en ligand kopplad form.

12. Bestämningsmedelserie enligt något av patentkraven 8-11, **kännetecknad** av att fenolföreningen är 4-jodfenol, 4-fenylfenol eller 2-klor-4-fenylfenol.

13. Bestämningsmedelserie enligt patentkravet 8, **kännetecknad** av att 2,3-dihydro-1,4-ftalazindionet är luminol eller isoluminol, peroxidasenzymet är pepparrotsperoxidas och det är närvarande i till en ligand kopplad form och fenolföreningen är 4-jodfenol.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—