
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8005330**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Reagens en werkwijze voor de bepaling van aldolase van het menselijke spiertype.**

⑤1 Int.Cl.³: G01N33/54.

⑦1 Aanvrager: Eisai Co., Ltd. te Tokio.

⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8005330.

②2 Ingediend 24 september 1980.

③2 Voorrang vanaf 25 september 1979.

③3 Land van voorrang: Japan (JP).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 122047/79 .

②3 - -

⑥1 - -

⑥2 - -

④3 Ter inzage gelegd 27 maart 1981.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

N.O. 29.471

Reagens en werkwijze voor de bepaling van aldolase van het menselijke spiertype.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op reagentia en een werkwijze voor de bepaling van aldolase van het menselijke spiertype.

Aldolase is een algemene uitdrukking voor de enzymen, die de aldol-condensatie en splitsing tussen dihydroxyacetonfosfaat en een reeks aldehyden katalyseren.

Het aldolase volgens de onderhavige uitvinding is bedoeld voor een fructose difosfaat aldolase (E.C. 4. 1. 2. 13. fructose-1, 6-fosfaat D-glycelaldehyde-3-fosfaat lyase), dat omkeerbaar fructose-1.6-difosfaat ontleedt tot dihydroxyacetonfosfaat en D-glycelaldehyde-3-fosfaat. Dit enzym houdt zich bezig met de voornaamste gang van het glycolysesysteem en verspreidt in het bijzonder in hoofdzaak in de spier, daarbij belangrijk bijdragend aan het energiemetabolisme.

Zoogdier aldolase omvat drie typen isoenzymen, dat wil zeggen het spiertype (A type), het levertype (B type) en het hersentype (C type). Het is bekend, dat de samenstellingsverhouding van deze isoenzymen varieert volgens de metamorfose van het levende lichaam, zoals differentiatie van de fetale lever bij de rat, kankervorming van het organisme bij de mens, de rat en dergelijke.

Er zijn twee methoden bekend voor de bepaling van het aldolase van het menselijke spiertype, waarvan de ene de elektroforese-methode is en de andere een methode is, die de meting omvat van de ontledingsactiviteit van twee substraten, dat wil zeggen fructose-1.6-difosfaat (FDP) en fructose-1-fosfaat (FIP) voor het aldolase, [FDP-ALD activiteit en FIP-ALD activiteit], waarbij de activiteitsverhouding (FDP/FIP) bepaald wordt.

Deze methoden brengen echter verschillende problemen met zich mee.

Bij de elektroforese-methode is het probleem, dat de gemigreerde punten van de menselijke aldolase isoenzymen zo dicht bij elkaar zijn, dat de onderscheiding moeilijk is en de nauwkeurige kwantitatieve bepaling niet kan worden bereikt.

80 05 330

Bij de meetmethode van de activiteitsverhouding FDP/FIP wordt benadrukt, dat de uitvoering bijzonder gecompliceerd is voor de meting van de FIP-ALD activiteit, vergezeld gaande van geen kwantitatieve bepaling.

- 5 Onlangs is een methode vermeld door middel van radio-immunobepaling. Vergeleken met de hiervoor vermelde methoden is deze methode beter in de gevoeligheid van de bepaling en de gevoeligheid van het instrument en eveneens in
10 nadelen, doordat het reagens niet kan worden opgeslagen vanwege de snelle afname van het voor het merken te gebruiken radioisotoop; speciale machines en inrichtingen en een speciale ruimte zijn vereist voor de meting van het radioisotoop; het hanteren van het radioisotoop bij de meting
15 en de verwijdering van afvalprodukten daarvan zijn moeilijk, omdat het gebruik van het radioisotoop vergezeld gaat van een gezondheidsgevaar.

Er is nu een reagens ontwikkeld, dat gebruikt kan worden voor de enzym-immunobepaling van het aldolase van het
20 menselijke spiertype en een werkwijze voor de bepaling van het aldolase van het menselijke spiertype onder toepassing van dit reagens. Volgens deze werkwijze kunnen verschillende nadelen volgens de bekende werkwijzen worden opgelost of verminderd.

- 25 De werkwijze volgens de uitvinding is een enzym-immunobepaling, genaamd "sandwich methode". Bij deze methode wordt de meting uitgevoerd door middel van de volgende trappen:

- 30 (a) een monster wordt in contact gebracht met een onoplosbaar gemaakt antilichaam voor aldolase van het spiertype, gevolgd door afscheiding van de vaste fase;
- (b) de vaste fase wordt in aanraking gebracht met een met enzym gemerkte antilichaam voor aldolase van het spiertype, gevolgd door afscheiding van de vaste fase;
- 35 (c) de vaste fase wordt in aanraking gebracht met het substraat van het enzym en
- (d) het absorberend vermogen van het ontledingsprodukt van het enzym wordt gemeten.

Het volgende zal meer in het bijzonder deze werkwijze
40 toelichten.

80 05 330

Bij trap (a) wordt een antilichaam, onoplosbaar gemaakt door combinatie met een drager, geïncubeerd tezamen met een monster, zoals serum, enz., zodat het antigeen (aldolase van het menselijke spiertype) in het monster kan
 5 reageren met het onoplosbaar gemaakte antilichaam. Nadat de reactie voltooid is wordt de reactieoplossing verwijderd en wordt de vaste fase gewassen met een bufferoplossing, gedestilleerd water of dergelijke.

Bij trap (b) wordt de vaste fase verkregen bij trap
 10 (a) geïncubeerd tezamen met een met enzym gemerkt antilichaam, met het gevolg, dat het met enzym gemerkte antilichaam combineert met het antigeen, dat vooraf gecombineerd is met het onoplosbaar gemaakte antilichaam. Nadat de reactie voltooid is wordt de reactieoplossing verwijderd en
 15 wordt de vaste fase gewassen met een bufferoplossing, gedestilleerd water of dergelijke.

Bij trap (c) wordt de vaste fase verkregen bij trap (b) geïncubeerd tezamen met een substraat van enzym om de enzymreactie te bewerkstelligen. Na de vooraf bepaalde tijd
 20 wordt de reactie beëindigd door daaraan een stop oplossing van de enzymreactie toe te voegen.

Bij trap (d) wordt het absorberend vermogen van het ontledingsprodukt van het substraat in de reactieoplossing van trap (c) gemeten. De meting van het absorberend vermogen wordt uitgevoerd met een absorptie fotometer onder toepassing van een geschikte golflengte voor de kwantitatieve bepaling van het ontledingsprodukt van het substraat.
 25

Het absorberend vermogen van de bekende hoeveelheid van het standaard-monster voor controle wordt vooraf gemeten met dit meetsysteem, om een werkkromme vast te stellen van de hoeveelheid antigeen tegen het absorberend vermogen. De hoeveelheid antigeen in het monster kan bepaald worden uit de werkkromme door meting van het absorberend vermogen van een onbekende hoeveelheid monster met hetzelfde meet-
 35 systeem.

De fig. 1-4 van de bijgevoegde tekeningen laten werkkrommen zien van het aldolase van het menselijke spiertype verkregen volgens de enzym-immunobepaling volgens voorbeeld V.

40 Fig. 5 laat een werkkromme zien van het aldolase van

80 05 330

het menselijke spiertype verkregen volgens de enzym-immunobepaling van voorbeeld VI.

Fig. 6 laat de resultaten zien van de bepaling van het aldolase van het menselijke spiertype in de menselijke sera
5 verkregen volgens de enzym-immunobepaling van voorbeeld VII.

De volgende beschrijving licht het reagens toe voor de bepaling toe te passen bij de onderhavige werkwijze.

A) Het antilichaam van aldolase van het spiertype

Antiserum wordt verkregen door aldolase van het spier-
10 type van een zoogdier zoals mens, konijn, hond, aap, rund, enz. bij het andere dier te immuniseren.

Het immune dier wordt bij voorkeur gekozen uit verschillende soorten vogels, omdat de aldolase van het spiertype geen duidelijk immunologisch onderscheid tussen de
15 zoogdieren toont.

Voorbeelden van vogels, die de voorkeur verdienen, zijn hoenders, kalkoen, eend en dergelijke.

Het verdient de voorkeur het geïnactiveerde serum van het dier, dat de bron is van het aldolase van het spier-
20 type, toe te voegen aan het verkregen anti-serum, waarbij door absorptie het andere onzuivere antilichaam verwijderd wordt.

De zuivering van deze antisera kan worden uitgevoerd door middel van affiniteitschromatografie onder toepassing
25 van een drager gecombineerd met het aldolase van het spiertype van een zoogdier, waarbij het zoogdier gekozen is uit mens, konijn, aap, rund, enz., bijvoorbeeld. Dragermaterialen, die kunnen worden toegepast voor dit doel zijn agarose, gekoppeld dextran, enz.. De gecombineerde drager kan bereid
30 worden door een drager te activeren met broomcyaan of dergelijke, de geactiveerde drager toe te voegen aan de oplossing van het aldolase van het spiertype en de gemengde oplossing bij een lage temperatuur te roeren. Het gezuiverde antilichaam van aldolase van het spiertype wordt verschaft
35 door het anti-serum toe te voegen aan een kolom gevuld met deze gecombineerde drager en de affiniteitschromatografie uit te voeren. Elutie van het antilichaam van aldolase van het spiertype uit de kolom kan worden uitgevoerd met een zwak alkalische oplossing.

40 Bij deze affiniteitschromatografie varieert de gevoe-

80 05 330

ligheid in de meetmethode van de onderhavige uitvinding, afhankelijk van de combinatie van het soort aldolase van het spiertype gecombineerd met de drager en het soort aldolase van het spiertype gebruikt voor de bereiding van het anti-serum.

Bij anti-serum van aldolase van het menselijke spiertype wordt een werkkromme, die de voorkeur verdient, verkregen zoals aangegeven in fig. 1 door toepassing van het antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype, dat bereid is door zuivering met de drager gecombineerd met het aldolase van het menselijke spiertype. Bij anti-sera van aldolase van het konijne spiertype worden werkkrommen, die meer de voorkeur verdienen, verkregen door zuivering onder toepassing van de drager gecombineerd met het aldolase van het menselijke spiertype en de drager gecombineerd met aldolase van het runder spiertype, dan de drager gecombineerd met aldolase van het konijne spiertype, zoals aangegeven in de fig. 2, 3 en 4.

B) Het met enzym gemerkte antilichaam van aldolase van het spiertype

Als toe te passen enzymen voor het merken kunnen de enzymen vermeld worden, die in het algemeen gebruikt worden voor de enzym-immunobepaling, bijvoorbeeld alkalifosfatase, peroxidase, β -D-galactosidase, glucoamylase, glucose-oxydase en dergelijke.

Het merken kan worden bereikt volgens alle gebruikelijke methoden, zoals bijvoorbeeld de ~~glutar~~aldehydemethode, de Nakane-methode, de maleïmide-methode, de gemengde zuuranhydriden-methode, de carbodiimide-methode, enz.. Bij de ~~glutar~~aldehyde-methode wordt de merking bereikt door toevoeging van enzym aan het antilichaam en toevoeging van ~~glutaar~~aldehyde, zodat de concentratie 0,2 - 0,8 % kan bereiken en tenslotte de uitvoering van de reactie bij kamertemperatuur. De reactieverhouding van het enzym tot het antilichaam is bij voorkeur 1 : 1 volgens concentratie, hoewel het 1 : 2 tot 2 : 1 kan zijn.

Het met enzym gemerkte antilichaam wordt in het algemeen gebruikt als een reagens door het te verdunnen met een bufferoplossing en dergelijke. Het is eveneens gewenst een geïnactiveerd konijne-serum toe te voegen in een hoeveelheid

van ongeveer 20 % aan de verdunde oplossing. Zoals aangegeven in fig. 4 geeft de toevoeging van het geïnactiveerde konijne-serum een werkkromme, die meer de voorkeur verdient, dan die verkregen door een bufferoplossing alleen of door
5 de bufferoplossing, die runderserumalbumine bevat.

C) Het onoplosbaar gemaakte antilichaam van aldolase van het spiertype

Als drager kunnen onoplosbare vaste stoffen worden gebruikt, die combineerbaar zijn met een antilichaam. Tot
10 voorbeelden van dergelijke vaste stoffen behoren bijvoorbeeld polystyreen, cellulose, agarose, glas, gekoppeld dextran, polysiloxanrubber, metaal, enz.. Als vormen kunnen vermeld worden buis, microtiterplaat, poeder, bol, schijf, plaat, foelie, enz..

15 In het geval van de polystyreenmicrotiterplaat kan het antilichaam combineren met het wandoppervlak van de plaat, wanneer het antilichaam op geschikte wijze verdund wordt met een bufferoplossing of dergelijke, waarna de verdunde oplossing wordt toegevoegd aan de plaat en het geheel ten-
20 slotte wordt bewaard.

D) De anderen

Als substraat worden substraten van enzymen gebruikt, die gebruikt zijn voor het met enzym gemerkte antilichaam. Wanneer het gebruikte enzym alkalifosfatase is, worden als
25 substraten p-nitrofenylfosfaat, β -glycerolfosfaat, fenylfosfaat, β -naftylfosfaat, fenolftaleïnefosfaat of dergelijke gebruikt.

Als stop oplossing voor de enzymreacties kunnen bekende oplossingen voor de respectievelijke enzymen worden ge-
30 bruikt. Bij de alkalifosfatase is een geschikte stop oplossing een 1 N natriumhydroxideoplossing.

De voorafgaande beschrijvingen zijn gedaan met betrekking tot de sandwich-methode, maar het aldolase van het menselijke spiertype volgens de onderhavige uitvinding kan
35 ook bepaald worden volgens de immuno-enzymometrische bepaling. Deze methode omvat reactie van het met enzym gemerkte antilichaam met een monster (antigeen), gevolgd door scheiding van het met enzym gemerkte antilichaam-antigeen reagens (B) van niet-omgezet met enzym gemerkt antilichaam (F)
40 en bepaling van de enzymactiviteit van hetzij (B) hetzij

8005330

(F) met het substraat. Als methode voor de scheiding van (B) en (F) kunnen vermeld worden de gelfiltratiemethode, de absorptiemethode door middel van onoplosbaar gemaakte antigeen, enz.. Ook bij de bepaling van het aldolase van
 5 het menselijke spiertype door middel van de immunoenzymometrische bepaling, wordt het met enzym gemerkte antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype, zoals hiervoor beschreven, als reagens gebruikt.

De volgende experimenten en voorbeelden zullen de onderhavige uitvinding verder toelichten.

Experiment 1

Anti-serum van aldolase van het menselijke spiertype

1 mg Aldolase van het menselijke spiertype werd opgelost in 0,5 ml van een fysiologische zoutoplossing en aan
 15 de oplossing werd het gelijke volume volledig toevoegsel volgens Freund onder mengen toegevoegd. Het produkt werd door injectie toegevoegd aan de spier van een hoender (White Leghorn). Het aldolase van het menselijke spiertype werd respectievelijk volgens dezelfde methode zoals hiervoor
 20 beschreven twee weken en eveneens drie weken daarna toegediend. Eén week na de laatste toediening werd het bloed verzameld uit de hoender voor het verkrijgen van anti-serum van aldolase van het menselijke spiertype.

Het normaal menselijke serum (NHS) geïnactiveerd bij
 25 56°C gedurende 2 uren werd aan dit anti-serum toegevoegd, zodat het een gehalte van 10 % kan bevatten. Het mengsel werd één uur bij 37°C geïncubeerd en een nacht bij 4°C bewaard. Het produkt werd 20 minuten gecentrifugeerd met 3000 omwentelingen/minuut. De bovenstaande laag werd verzameld voor het verkrijgen van anti-serum van aldolase van
 30 het menselijke spiertype, dat geabsorbeerd NHS bevat.

Experiment 2

Anti-serum van aldolase van het konijn spiertype

2 mg Aldolase van het konijn spiertype werden opgelost in 1 ml fysiologische zoutoplossing. Daarna werd dezelfde methode zoals beschreven bij experiment 1 herhaald voor het verkrijgen van het anti-serum van aldolase van het konijn spiertype.

Aan dit anti-serum werd normaal konijn-serum (NRS)
 40 geïnactiveerd bij 56°C gedurende 3 uren toegevoegd, zodat

80 05 330

het een gehalte van 10 % bevatte. Daarna werd dezelfde methode zoals beschreven bij experiment 1 herhaald voor het verkrijgen van anti-serum van aldolase van het konijn spiertype, dat geabsorbeerd NRS bevat.

5 Experiment 3

Antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype

Sepharose 4B— (Pharmacia Fine Chemicals AB; Agarose) (10 g) en 10 mg aldolase van het menselijke spiertype werden een nacht bij 4°C bewaard in 15 ml van een 0,1 molaire natriumcarbonaatbufferoplossing met een pH van 9,0.

De verkregen Sepharose 4B gel gecombineerd met het aldolase van het menselijke spiertype werd in een kolom gevuld en gewassen met een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 0,5 N natriumchloride bevatte. Aan deze kolom werden 3 ml anti-serum van aldolase van het menselijke spiertype, dat NHS geabsorbeerd bevat, verkregen bij experiment 1 toegevoegd en het anti-serum werd uitgestroomd met een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 0,5 N natriumchloride bevatte. Daarna werd een 0,1 N oplossing van natriumcarbonaat in water aan de kolom toegevoegd om het antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype te elueren. De fractie van antilichaam-eluaat werd onderworpen aan dialyse met een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0 voor het verkrijgen van 3 mg antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype.

Experiment 4

Antilichaam van aldolase van het konijn spiertype

De methode, die bij experiment 3 is beschreven, werd herhaald, behalve dat 3 ml anti-serum van aldolase van het konijn spiertype, met NRS geabsorbeerd, beschreven bij experiment 2 werden toegevoegd aan de Sepharose 4B gel gecombineerd met aldolase van het konijn spiertype. 3 mg Anti-serum van aldolase van het konijn spiertype werden verkregen.

Experiment 5

Antilichaam van aldolase van het konijn spiertype

Dezelfde methode zoals beschreven in experiment 3 werd herhaald, behalve dat 3 ml antiserum van aldolase van het konijn spiertype met NRS geabsorbeerd, beschreven bij ex-

periment 2, werden toegevoegd aan de Sepharose 4B gel gecombineerd met aldolase van het menselijke spiertype. 3 mg Antilichaam van aldolase van het konijne spiertype werden verkregen.

5 Experiment 6

Antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Dezelfde methode zoals beschreven in experiment 3 werd herhaald, behalve dat 3 ml antiserum van aldolase van het konijne spiertype met NRS geabsorbeerd, beschreven bij experiment 2, werden toegevoegd aan de Sepharose 4B gel gecombineerd met aldolase van het runder spiertype. Verkregen werden 3 mg antilichaam van aldolase van het konijne spiertype.

Experiment 7

15 Onoplosbaar gemaakt antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype

Aan elk van de holten verschaft op een polystyreen microtiterplaat, werden 200 μ l van een 0,05 molaire triszoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 25 μ g/ml antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype beschreven in experiment 3 bevatte, toegevoegd en vervolgens een nacht bij 4°C bewaard. De oplossing werd van de plaat verwijderd. De plaat werd met gedestilleerd water gewassen voor het verkrijgen van de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype.

Experiment 8

Onoplosbaar gemaakt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Aan elk van de holten verschaft op een polystyreen microtiterplaat werden 200 μ l van een 0,05 molaire triszoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 25 μ g/ml antilichaam van aldolase van het konijne spiertype beschreven bij experiment 4 bevatte, toegevoegd en vervolgens een nacht bij 4°C bewaard. De oplossing werd van de plaat verwijderd. De plaat werd met gedestilleerd water gewassen voor het verkrijgen van de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype.

Experiment 9

40 Onoplosbaar gemaakt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

80 05 330

Aan elk van de holten verschaft in een polystyreen-microtiterplaat werden 200 μ l van een 0,05 molaire triszoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 25 μ g/ml antilichaam van aldolase van het konijne spiertype bevatte
 5 beschreven zoals bij experiment 5, toegevoegd en vervolgens een nacht bij 4°C bewaard. De oplossing werd van de plaat verwijderd. De plaat werd met gedestilleerd water gewassen voor het verkrijgen van de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype.

10 Experiment 10

Onoplosbaar gemaakt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Onder toepassing van antilichaam van aldolase van het konijne spiertype, dat verkregen werd bij experiment 6,
 15 werd de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype verkregen op een soortgelijke wijze zoals beschreven bij het voorafgaande experiment 9.

Voorbeeld I

20 Met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype

Aan 0,3 ml water, dat 1 mg alkalifosfatase (relatieve activiteit 1000 eenheden/mg) bevatte, werd 0,2 ml van een 0,05 molaire fosforzuurbufferoplossing (pH 7,0) toegevoegd,
 25 die 1 mg antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype beschreven bij experiment 3 bevatte ^{werden} en 50 μ l van een 2,5 procents glutalaldehyde-oplossing toegevoegd. Het mengsel werd 30 minuten bij omgevingstemperatuur bewaard, gevolgd door onderwerping gedurende een nacht aan een dialyse
 30 se met een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0. Het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype werd verkregen.

Voorbeeld II

35 Met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Dezelfde methode zoals beschreven in voorbeeld I werd herhaald, behalve dat 1 mg antilichaam van aldolase van het konijne spiertype beschreven bij experiment 4 gebruikt werd
 40 met 1 mg alkalifosfatase. Het met alkalifosfatase gemerkte

80 05 330

antilichaam van aldolase van het konijne spiertype werd verkregen.

Voorbeeld III

5 Met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Dezelfde methode zoals beschreven in voorbeeld I werd herhaald, behalve dat het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype beschreven in experiment 5 werd gebruikt met 1 mg alkalifosfatase. Het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het konijne spiertype werd verkregen.

Voorbeeld IV

15 Met alkalifosfatase ge-merkt antilichaam van aldolase van het konijne spiertype

Dezelfde methode zoals beschreven in voorbeeld I werd herhaald, behalve dat het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype beschreven in experiment 6 werd gebruikt met 1 mg alkalifosfatase. Aldus werd het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het konijne spiertype verkregen.

Voorbeeld V

Enzym-immunobepaling

Een standaard antigeenoplossing van 500 ng/ml - 7,6 mg/ml werd bereid door achtereenvolgende tweevoudige verdunning van het aldolase van het menselijke spiertype met het normale konijne serum, dat 2 uren bij 56°C werd geactiveerd. De genoemde standaardoplossing (0,1 ml) werd toegevoegd aan de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het spiertype en vervolgens 60 minuten bij 37°C bewaard. De reactieoplossing werd verwijderd. De plaat werd viermaal met gedestilleerd water gewassen. Anderzijds werd het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het spiertype 150-voudig verdund met een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die 30 % normaal konijne serum bevat, geïnactiveerd gedurende 2 uren bij 56°C. Deze verdunde oplossing (0,1 ml) werd aan de plaat toegevoegd en vervolgens 60 minuten bij 37°C bewaard. De reactieoplossing werd verwijderd. De plaat werd viermaal met gedestilleerd water gewassen.

40 Een oplossing van 5 mg/ml p-nitrofenylfosfaat in een 0,1 mo-

80 05 330

laire natriumcarbonaatbufferoplossing met een pH van 9,0, die 0,001 molair magnesiumchloride bevatte, werd gescheiden bereid. Deze oplossing (0,1 ml) werd aan de plaat toegevoegd en 60 minuten bij 37°C omgezet, gevolgd door toevoeging van 0,1 ml van 1 N natriumhydroxide om de reactie te beëindigen. De reactieoplossing werd tot het 10-voudige met gedestilleerd water verdund. Het absorberend vermogen bij 405 m μ werd gemeten met een spectrofotometer om de werkkromme vast te stellen tussen het absorberend vermogen en de concentratie van het aldolase van het menselijke spiertype.

Fig. 1 laat de werkkromme zien in het geval van het hiervoor vermelde bepalingssysteem, waarbij de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype bij experiment 7 werd gebruikt als een microtiterplaat gecombineerd met antilichaam van aldolase van het spiertype en het met alkalifosfatase gemerkte antigeen van aldolase van het menselijke spiertype bij voorbeeld I werd respectievelijk gebruikt als een met alkalifosfatase gemerkt antigeen van aldolase van het spiertype.

Fig. 2 laat de werkkromme zien in het geval waarbij de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype bij experiment 8 werd gebruikt als een microtiter gecombineerd met antilichaam van aldolase van het spiertype en het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het konijne spiertype bij voorbeeld II respectievelijk werd gebruikt als een met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het spiertype.

Fig. 3 laat de werkkromme zien in het geval, waarbij de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype bij experiment 9 werd gebruikt als een microtiterplaat gecombineerd met antilichaam van aldolase van het spiertype en het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het konijne spiertype bij voorbeeld III respectievelijk werd gebruikt als een met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het spiertype.

Fig. 4 laat de werkkromme zien in het geval, waarbij de microtiterplaat gecombineerd met het antilichaam van

80 05 330

aldolase van het konijnse spiertype bij experiment 10 werd gebruikt als een microtiterplaat gecombineerd met antilichaam van aldolase van het spiertype en het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het konijnse spiertype bij voorbeeld IV respectievelijk werd gebruikt als een met alkalifosfatase gemerkt antilichaam van aldolase van het spiertype.

In de fig. 1-4 geven de horizontale assen de concentratie (ng/ml) van aldolase van het menselijke spiertype en de vertikale assen het absorberend vermogen bij 405 m μ (OD_{405 m μ}).

Zoals blijkt uit de fig. 1-4 wordt de werkkromme, die het meest de voorkeur verdient, in het onoplosbaar gemaakte antilichaam en het met enzym gemerkte antilichaam, waarbij antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype (fig. 1) wordt gebruikt, en gevolgd door de volgorde van het onoplosbaar gemaakte antilichaam en het met enzym gemerkte antilichaam, waarbij antilichaam van aldolase van het konijnse spiertype (fig. 4, 3 en 2) wordt gebruikt. Opgemerkt wordt dat, in vergelijking met de gevallen waarbij antilichaam van aldolase van het konijnse spiertype wordt gebruikt, de werkkrommen, die meer de voorkeur verdienen, respectievelijk verkregen worden in het geval (fig. 4), waarbij de drager gecombineerd met aldolase van het runder spiertype wordt gebruikt, alsmede het geval (fig. 3), waarbij de drager gecombineerd met aldolase van het menselijke spiertype wordt gebruikt, voor de zuivering van het antilichaam door middel van affiniteitschromatografie, dan de kromme verkregen in een ander geval (fig. 2), waarbij de drager gecombineerd met aldolase van het konijnse spiertype wordt gebruikt.

Voorbeeld VI

Enzym-immunobepaling

De invloed van het type verdunningsmiddel op de met enzym gemerkte antilichamen werd bestudeerd door middel van het immunobepalingssysteem volgens voorbeeld V.

Het met alkalifosfatase gemerkte antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype beschreven in voorbeeld I werd gebruikt als een met enzym gemerkt antilichaam en de microtiterplaat gecombineerd met aldolase van het

80 05 330

menselijke spiertype beschreven bij experiment 7 werd als onoplosbaar gemaakt antigeen gebruikt.

De volgende verdunningsmiddelen werden in dit voorbeeld gebruikt:

- 5 (A) een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die een concentratie van 30 % van het normale konijne serum geïnactiveerd bij 56°C gedurende 2 uren bevat,
- 10 (B) een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0, die een concentratie van 1 % van het run-der serum albumine geïnactiveerd bij 56°C gedurende 30 minuten bevat,
- (C) een 0,05 molaire tris-zoutzuurbufferoplossing met een pH van 8,0 als controle.

15 De met enzym gemerkte antilichamen verdund met elk van deze oplossingen tot het 150-voudige werden respectievelijk gebruikt. De werkkromme werd opgesteld volgens dezelfde methode zoals beschreven in voorbeeld V onder toepassing van de standaard antigeenoplossing. Elke verkregen werkkromme

20 wordt in fig. 5 getoond. De horizontale as in fig. 5 geeft de concentratie van aldolase van het menselijke spiertype (ng/ml) en de vertikale as geeft het absorberend vermogen bij 405 m/u ($OD_{405\text{ m/u}}$). De symbolen A, B en C geven de respectievelijke werkkrommen verkregen in elk geval, waar-

25 bij de verdunningsmiddelen (A), (B) en (C) respectievelijk worden gebruikt. Zoals aangegeven in de tekening is de werkkromme, die het meest de voorkeur verdient, de werkkromme A, die verkregen wordt in het geval, waarbij het verdunningsmiddel, dat het geïnactiveerde konijne serum

30 bevat, wordt gebruikt.

Voorbeeld VII

Enzym-bepalingsproef

De bepaling werd tot stand gebracht voor de concentraties van aldolase van het menselijke spiertype in sera

35 van verschillende kanker-patiënten, goedaardig zieke patiënten en gezonde mensen door middel van het immunobepalingssysteem zoals beschreven in voorbeeld V.

Het met enzym gemerkte antilichaam, dat bij dit voorbeeld werd gebruikt, was het met alkalifosfatase gemerkte

40 antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype be-

schreven in voorbeeld I en het gebruikte onoplosbaar ge-
maakte antilichaam was de microtiterplaat gecombineerd met
aldolase van het menselijke spiertype beschreven bij ex-
periment 7. Het serum-monster werd direkt gebruikt zonder
5 verdunning.

Resultaten zijn aangegeven in fig. 6. Zoals aangege-
ven in de figuren heeft het aldolase van het menselijke
spiertype de neiging aanwezig te zijn in het serum van
kanker-patiënten in een hogere concentratie dan die bij de
10 andere goedaardig zieke patiënten en die bij de gezonde
mens.

C O N C L U S I E S

1. Reagens voor de bepaling van aldolase van het menselijke spiertype, g e k e n m e r k t d o o r de aanwezigheid van met enzym gemerkt antilichaam van aldolase
5 van het spiertype.

2. Reagens volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het enzym alkalifosfatase is.

3. Reagens volgens conclusie 1 of 2, m e t h e t k e n m e r k, dat het antilichaam van aldolase van het
10 spiertype antilichaam van aldolase van het menselijke spiertype is.

4. Reagens volgens conclusie 1 of 2, m e t h e t k e n m e r k, dat het antilichaam van aldolase van het
spiertype antilichaam van aldolase van het
15 konijne spiertype is.

5. Reagens volgens conclusie 4, m e t h e t k e n m e r k, dat het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype een antilichaam is, dat werd gezuiverd door middel van affiniteitschromatografie onder toepassing
20 van een drager gecombineerd met het aldolase van het menselijke spiertype.

6. Reagens volgens conclusie 4, m e t h e t k e n m e r k, dat het antilichaam van aldolase van het konijne spiertype een antilichaam is, dat gezuiverd werd
25 door middel van affiniteitschromatografie onder toepassing van een drager gecombineerd met aldolase van het runder spiertype.

7. Reagens volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het men enzym gemerkte antilichaam van
30 aldolase van het spiertype verdund is met een bufferoplossing, die geïnactiveerd konijne serum bevat.

8. Werkwijze voor de bepaling van aldolase van het menselijke spiertype, m e t h e t k e n m e r k, dat men de volgende trappen toepast:

35 (a) het in aanraking brengen van een monster met een onoplosbaar gemaakt antilichaam van aldolase van het spiertype gevolgd door afscheiding van de vaste fase;

(b) het in aanraking brengen van de vaste fase met met enzym gemerkt antilichaam van aldolase van het spiertype
40 type gevolgd door afscheiding van de vaste fase;

8005330

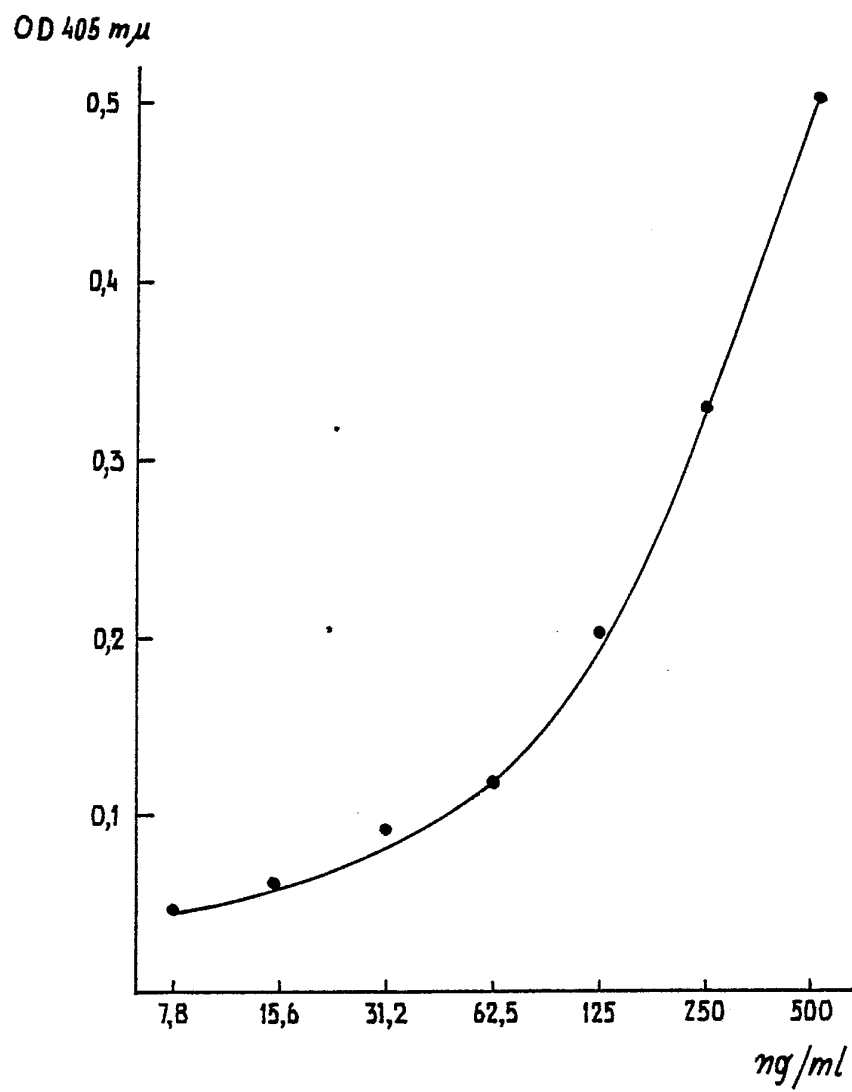
(c) het in aanraking brengen van de vaste fase met enzym-substraat en

(d) het bepalen van het absorberend vermogen van de ontledingsprodukten van het substraat.

- 5 9. Werkwijze volgens conclusie 8, m e t h e t
k e n m e r k, dat men antilichaam van aldolase van het
konijne spiertype gebruikt, dat gezuiverd is door middel
van affiniteitschromatografie onder toepassing van een dra-
ger gecombineerd met aldolase van het runder spiertype,
10 als antilichaam van aldolase van het spiertype in een onop-
losbaar gemaakte antilichaam van aldolase van het spier-
type en een met enzym gemerkt antilichaam van aldolase van
het spiertype.

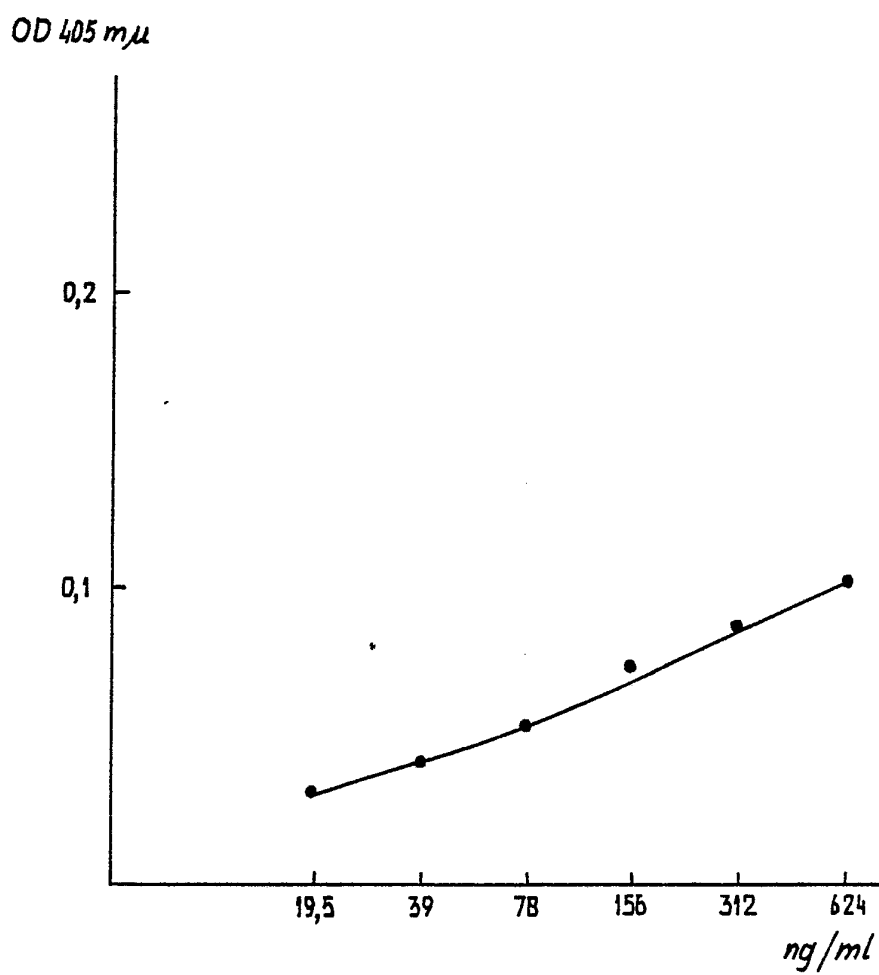
* * * * *

fig.1.



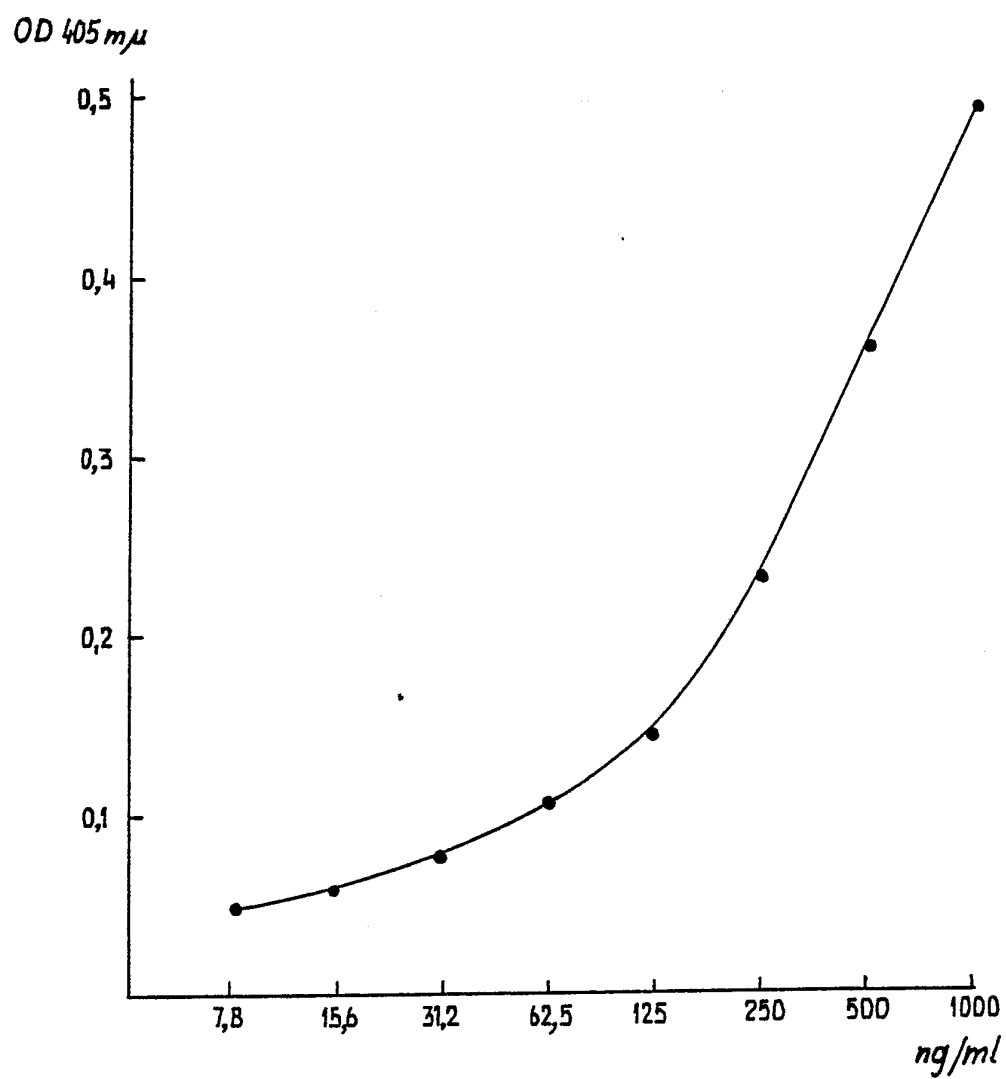
80 05 330

fig. 2.



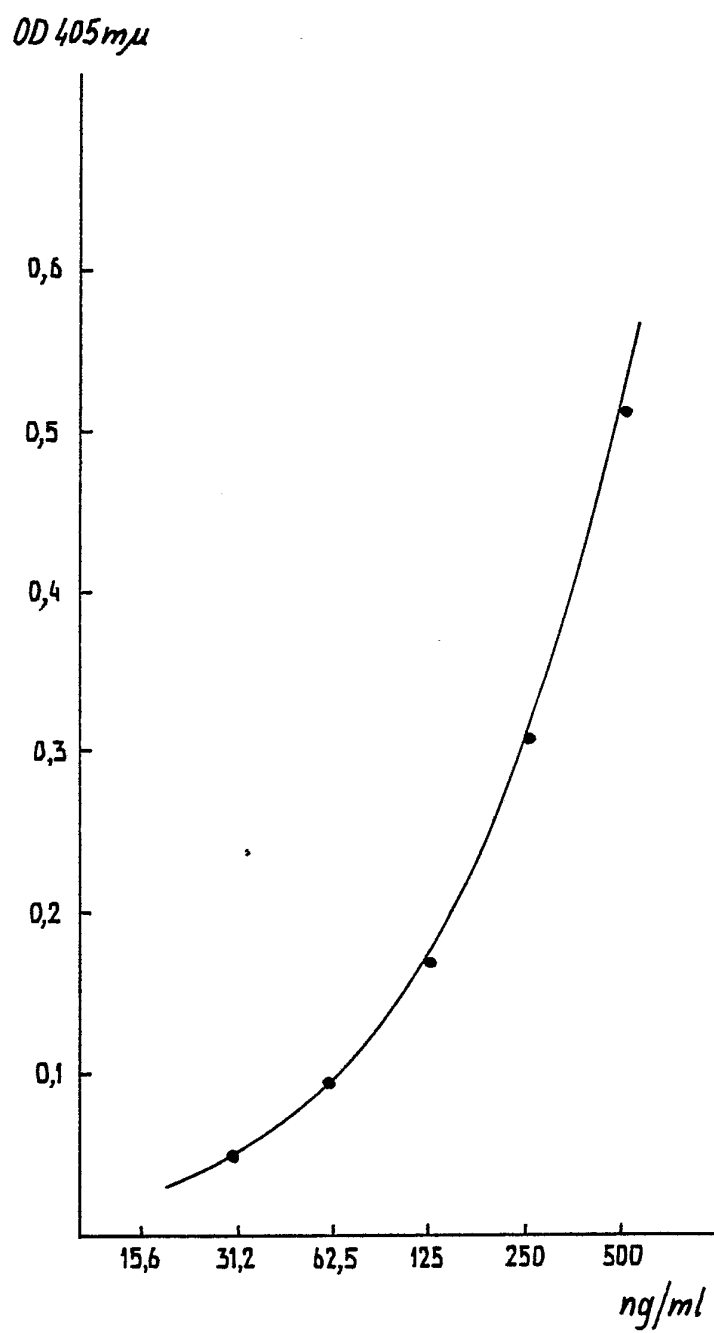
80 05 330

fig. 3.



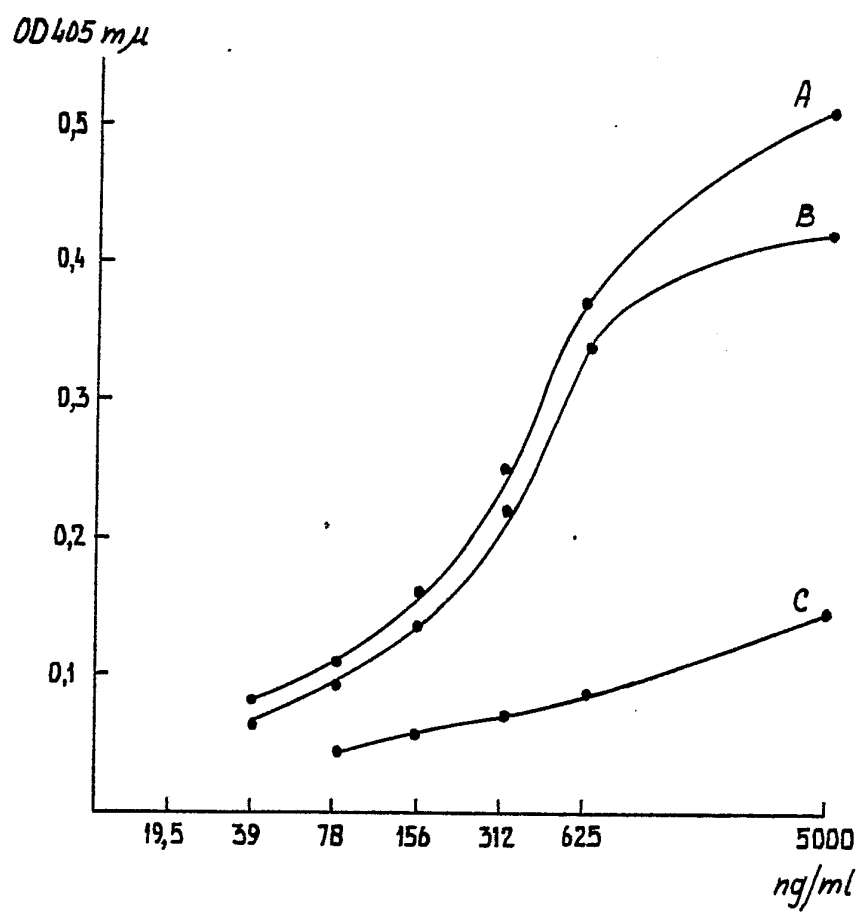
80 05 330

fig. 4.



80 05 330

fig. 5.



80 05 330

fig. 6.

