



**Ausschliessungspatent**

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

**1573 65**

Int.Cl.<sup>3</sup> 3(51) G 01 N 33/54

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(1) AP G 01 N/ 2272 748  
(31) P3003836.9

(22) 28.01.81  
(32) 02.02.80

(44) 03.11.82  
(33) DE

- (1) siehe (73)  
(2) RIEKE, ERWIN, DR.; WUERZBURG, UWE, DR.; HENNRICH, NORBERT, DR.; DE;  
(3) MERCK PATENT GMBH, DARMSTADT; DE;  
(4) INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN, 1020 BERLIN, WALLSTR. 23/24

34) VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG EINER KOMPONENTE AUS EINER GRUPPE REZEPTOREN UND SUBSTANZEN

57) Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bestimmung einer Komponente aus einer Gruppe bestehend aus spezifisch bindenden Rezeptoren und Substanzen, die von diesen Rezeptoren spezifisch gebunden werden koennen, durch Messung der Aktivitaet von durch Inkubation daran gebundenen Enzymen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man in der Komponente nach Immobilisierung an einem wasserunloeslichen Traeger mit der jeweils anderen Komponente inkubiert, anschließend nach ueblichem Waschen mit an Saccharid bindenden Enzymen inkubiert und die Enzymaktivitaet bestimmt. Als an Saccharid bindende Enzyme koennen solche mit Lectineigenschaften bzw. Lectine mit enzymatischer Aktivitaet verwendet werden.

227274 8

-1-  
-A-

Titel der Erfindung:

Verfahren und Mittel zur Bestimmung  
einer Komponente aus einer Gruppe beste-  
hend aus spezifisch bindenden Rezeptoren  
und Substanzen, die von diesen Rezeptoren  
5 spezifisch gebunden werden können

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bestim-  
mung einer Komponente aus einer Gruppe bestehend aus spe-  
zifisch bindenden Rezeptoren und Substanzen, die von  
diesen Rezeptoren spezifisch gebunden werden können,  
10 insbesondere Verfahren und Mittel zur immunologischen  
Bestimmung von Antikörpern, Antigenen und Haptenen  
in Lösung über die vermittelnde Wirkung einer  
enzymatischen Aktivität.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Für die bisher beschriebenen Enzymimmunoassays werden  
15 Kupplungsprodukte aus einem Markerenzym und einem Anti-  
körper bzw. einem Antigen benötigt (DAS 2.206.103). Mit  
Hilfe dieser Antikörper-Enzym-Konjugate werden die über  
ein Immunosorbens gebundenen Antigene markiert. Die ge-  
bundene Enzymaktivität ist ein Maß für die Menge an vor-  
20 handenem Antigen. Für Wettbewerbsverfahren müssen z. B.

Kupplungsprodukte hergestellt werden, die mit dem Antigen der Probe um die Bindung an das Immunosorbens konkurrieren. Hier verhält sich die gebundene Enzymaktivität umgekehrt proportional zur Menge an vorhandenem Antigen.

- 5 Die Notwendigkeit, Antikörper- bzw. Antigen-Enzym-Konjugate herstellen zu müssen, beinhaltet eine Reihe wesentlicher Nachteile: Durch die chemische Verknüpfung eines Antikörpers (Antigens) mit einem Enzym wird der Antikörper (Antigen) in seinem Bindungsverhalten gestört,  
10 d. h. die Bindungsaffinität nimmt ab; durch die chemische Verknüpfung eines Enzyms mit einem Antikörper (Antigen) wird die enzymatische Aktivität wesentlich vermindert; die Stabilität der Konjugate ist geringer als die Stabilität der Einzelsubstanzen;  
15 die Konjugate stellen sehr heterogene Verbindungen mit breitem Molekulargewichtsspektrum dar, wodurch eine reproduzierbare Herstellung außerordentlich erschwert wird; die enzymatische Aktivität wird mit den an eine feste Phase gebundenen Konjugaten bestimmt,  
20 wobei die Diffusion von Substraten und Produkten den enzymatischen Umsatz beeinflusst.

Ziel der Erfindung:

- Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren und Mittel zur Bestimmung von Antikörpern, Antigenen und Haptenen zur Verfügung zu stellen, mit denen  
25 die geschilderten Nachteile vermieden werden können.

- Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe dadurch gelöst, daß man anstelle eines Kupplungsprodukts aus einem Markerenzym und einem Antikörper bzw. Antigen ein Enzym bzw. ein enzymatisch aktives Lectin verwendet, das neben  
30 der Substratbindungsstelle weitere Bindungsstellen für den Antikörper bzw. das Antigen besitzt.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung einer Komponente aus einer Gruppe bestehend aus spezifisch bindenden Rezeptoren und Substanzen, die von diesen Rezeptoren spezifisch gebunden werden können, durch Messung der Aktivität von durch Inkubation daran gebundenen Enzymen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine der Komponenten nach Immobilisierung an einem wasserunlöslichen Träger mit der jeweils anderen Komponente inkubiert, anschließend nach üblichem Waschen mit an Saccharid bindenden Enzymen inkubiert und die Enzymaktivität bestimmt.

Als immobilisierte Komponente kann eine modifizierte Komponente verwendet werden, deren Saccharidgruppierung chemisch oder enzymatisch so verändert ist, daß sie keine an Saccharid bindenden Enzyme mehr bindet.

In einer Variante des Verfahrens kann man eine an einem wasserunlöslichen Träger immobilisierte Komponente gleichzeitig oder nacheinander mit der jeweils anderen Komponente und einem Kupplungsprodukt aus der jeweils anderen Komponente und einem Saccharid-haltigen Molekül inkubieren. In einer weiteren Variante kann man eine an einem wasserunlöslichen Träger immobilisierte Komponente mit der jeweils anderen, zu bestimmenden Komponente inkubieren und anschließend nach üblichem Waschen mit einer weiteren Saccharid-haltigen, an die zu bestimmende Komponente bindenden Komponente inkubieren.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens, enthaltend einen wasserunlöslichen Träger, an den eine der Komponenten oder ein Komplex aus den Komponenten, wovon eine der Komponenten aus einem Kupplungsprodukt mit einem Saccharid be-

steht, gebunden ist - gegebenenfalls ein Kupplungsprodukt aus einer der Komponenten und einem Saccharid-haltigen Molekül - ein an Saccharid bindendes Enzym und Substrate zur Bestimmung der Enzymaktivität.

- 5 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren exakter und schneller arbeitet als die herkömmlichen Enzymimmunoassays. Es kann auf die Herstellung von Antikörper- bzw. Antigen-Enzym-Konjugaten verzichtet werden, wodurch eine Störung der
- 10 immunologischen Reaktion ausgeschaltet wird; das Enzym muß nicht modifiziert werden und kann daher bis zu seiner Verwendung in einer für das Enzym bevorzugten Form gelagert werden; die Reagenzien können reproduzierbar und standardisierbar hergestellt werden;
- 15 da das Enzym durch das Substrat wieder aus der Bindung mit dem Antikörper (Antigen) abgelöst wird, verläuft die enzymatische Reaktion in Lösung und nicht auf der Röhroberfläche; die Bindung des Enzyms an Antikörper verläuft außerordentlich schnell (bereits nach
- 20 15 - 60 Minuten kann die Inkubation abgebrochen werden); die für ein Kompetitionsverfahren herzustellenden Antigen-Saccharid-Konjugate haben eine gegenüber Antigen-Enzym-Konjugaten wesentlich höhere Haltbarkeit, außerdem wird das Antigen durch den Einbau von Zuckerresten
- 25 nur unwesentlich modifiziert.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können prinzipiell alle organischen Substanzen, zu denen ein Bindungspartner existiert, quantitativ bestimmt werden. Die bevorzugte Ausführung gestaltet sich besonders einfach, wenn die

30 zu bestimmende Substanz in ihrem molekularen Aufbau Saccharidgruppierungen aufweist, die von einem mit Saccharid reagierenden Enzym bzw. einem Lectin mit enzymatischer Aktivität erkannt und gebunden werden können. Dies ist bei Antikörpern, bei einer Vielzahl von

35 Antigenen und bei einigen Haptenen der Fall.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Probelösung, die die zu bestimmende Substanz enthält, mit dem an einem wasserunlöslichen Träger immobilisierten Bindungspartner, der oder an den die zu bestimmende Substanz spezifisch bindet, inkubiert. Während der Inkubation bindet eine der Konzentration der Substanz entsprechende Menge über ihren Bindungspartner an das Trägermaterial. Nach dem Entfernen der Probelösung wird das Trägermaterial gewaschen, um unspezifisch anhaftende Substanzen zu entfernen. Anschließend wird dieses Trägermaterial mit einem mit einer Saccharidgruppierung reagierenden Enzym für eine kurze Zeit in Kontakt gebracht, wobei das Enzym an die zu bestimmende Substanz gebunden wird. Nach dem Auswaschen von nicht gebundenem Enzym wird dem Trägermaterial eine Lösung mit einem Enzymsubstrat zugesetzt. Die Enzymaktivität kann dann photometrisch gemessen werden und ist direkt ein Maß für die Menge der zu bestimmenden Substanz in der Probelösung.

Dieses einfache Verfahren läßt sich bei Verwendung von immobilisierten Antikörpern oder sonstigen Rezeptoren zur Bestimmung von Saccharid-haltigen Antigenen und Haptenen oder bei immobilisierten Antigenen oder Haptenen zur Bestimmung ihrer entsprechenden Antikörper oder Saccharid-haltigen Rezeptoren verwenden.

Weist auch der am wasserunlöslichen Träger immobilisierte Bindungspartner Saccharidgruppierungen auf, die vom eingesetzten Enzym erkannt werden können, so können diese, falls erforderlich, zweckmäßigerweise vor dem Immobilisieren chemisch oder enzymatisch abgebaut werden.

Weist die zu bestimmende Substanz keine geeignete Saccharidstruktur auf, die die Bindung eines mit Saccharid reagierenden Enzyms ermöglicht, so kann als zusätzliches Reagenz eine bekannte Menge der zu bestimmenden Substanz verwendet werden, die jedoch chemisch oder enzymatisch mit einem geeigneten Saccharid verknüpft worden ist und durch diese Markierung von dem betreffenden Enzym erkannt werden kann. Da man dieses Konjugat in der obigen Weise bestimmen kann, ist es leicht möglich, die zu bestimmende Substanz durch ein Wettbewerbsverfahren quantitativ zu bestimmen. Man kann dabei so vorgehen, daß man die zu bestimmende Substanz aus der Probe und die markierte Substanz gleichzeitig oder mit einer zeitlichen Verzögerung mit einer limitierten Menge des am wasserunlöslichen Träger immobilisierten Bindungspartners inkubiert. Dabei konkurrieren die zu bestimmende Substanz und die markierte Substanz um die Bindung an den gemeinsamen Bindungspartner. Liegt die zu bestimmende Substanz in einer hohen Konzentration vor, so wird nur wenig der markierten Substanz an das Trägermaterial binden, d. h. die nach der Inkubation mit dem saccharidbindenden Enzym am Trägermaterial anhaftende Enzymaktivität ist bei diesem Verfahren umgekehrt proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der Probelösung.

Eine Variante dieses Verfahrens besteht darin, daß man den Bindungspartner für die zu bestimmende Substanz am wasserunlöslichen Träger immobilisiert und ihn dann mit einem Überschuß an markierter Substanz inkubiert. Hierdurch sättigt man den Bindungspartner mit der markierten Substanz ab, d. h. am Trägermaterial liegen jetzt präformierte Komplexe aus dem Bindungspartner und der markierten Substanz vor. Der Test besteht dann lediglich in

5 der Inkubation dieses Trägermaterials mit der Probelösung. Je nach der Konzentration der zu bestimmenden Substanz wird die markierte Substanz wieder aus dem Komplex verdrängt und der Nachweis kann dann über die Bindung des saccharidbindenden Enzyms erfolgen.

10 Die Markierung von Haptenen und Antigenen mit einem geeigneten Saccharid kann durch direkte chemische oder enzymatische Kupplung erfolgen. Andererseits kann die zu bestimmende Substanz aber auch an Moleküle gekuppelt werden, die in ihrer Molekülstruktur u.a. die geeignete Saccharidgruppierung aufweisen. Solche Moleküle können ein Molekulargewicht von einigen 100 bis zu 1 Million oder mehr aufweisen; vorzugsweise liegt das Molekulargewicht unter 600 000, insbesondere unter 15 300 000. Solche Moleküle sind Glycoproteine, Polysaccharide, glycosylierte Proteine oder kleinere Moleküle, die neben der geeigneten Saccharidgruppierung noch Gruppen für die Kupplung der zu bestimmenden Substanz aufweisen. Die aus der Kupplung resultierenden 20 Konjugate konkurrieren dann wie oben beschrieben um die Bindung an den immobilisierten Bindungspartner. Der weitere Testverlauf entspricht dann dem beim Kompetitionsverfahren beschriebenen.

25 Eine weitere erfindungsgemäße Möglichkeit zur Bestimmung von Substanzen, die keine geeignete Saccharidstruktur aufweisen, besteht in der Verwendung eines zusätzlichen löslichen Bindungspartners. Hierbei wird die Probe mit der zu bestimmenden Substanz mit dem immobilisierten Bindungspartner inkubiert, wobei ein der Konzentration 30 der Substanz entsprechender Anteil über den Bindungspartner an den Träger bindet. Nach dem Auswaschen der

Probelösung wird der lösliche Bindungspartner zugesetzt. Dieser lösliche Bindungspartner kann dem immobilisierten Bindungspartner entsprechen oder eine andere Zusammensetzung aufweisen. Entscheidend ist nur, daß er eine geeignete Saccharidgruppierung aufweist und mit ausreichender Affinität an die über den immobilisierten Bindungspartner am Trägermaterial gebundene Substanz bindet. Die Bindung des löslichen Bindungspartners kann dann wieder durch ein saccharidbindendes Enzym in bekannter Weise bestimmt werden. Die am Trägermaterial anhaftende Aktivität ist proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Substanz.

Die Voraussetzung für die oben beschriebene Verfahrensvariante besteht darin, daß die zu bestimmende Substanz mehrere Bindungsstellen aufweist, damit sowohl der immobilisierte als auch der lösliche Bindungspartner binden können. Weist die zu bestimmende Substanz jedoch nur eine Bindungsstelle auf, so ist es möglich, mehrere Moleküle dieser Substanz chemisch an ein Trägermolekül zu binden, so daß Konjugate entstehen, die mehrere Bindungspartner binden können. In diesem Fall muß dann zuerst ein Wettbewerbsverfahren durchgeführt werden, d. h. das Konjugat und die zu bestimmende Substanz konkurrieren um die Bindung an dem immobilisierten Bindungspartner. Die Menge an gebundenem Konjugat hängt von der Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der Probelösung ab. An das gebundene Konjugat kann dann der lösliche Bindungspartner binden, der dann wiederum für die Bindung des saccharidbindenden Enzyms zur Verfügung steht. Die am Träger anhaftende Enzymaktivität ist umgekehrt proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der Probe.

227274 8

- <sup>9</sup>/<sub>12</sub> -

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Enzyme mit Lectineigenschaften bzw. Lectine mit enzymatischer Aktivität geeignet, die mit Sacchariden reagieren, vorzugsweise Galactoseoxidase, Galactosidase und/oder  
5 Mannosidase. Als besonders geeignet hat sich Galactoseoxidase aus *Dactylum dendroides* erwiesen.

Als wasserunlösliche Träger werden vorzugsweise Kunststoffgefäße verwendet, insbesondere Teströhrchen aus Polystyrol oder Polypropylen.

- 10 Eine Bestimmung von Antigenen wird im einfachsten Fall so durchgeführt, daß zunächst Polystyrolröhrchen mit Antikörpern beschichtet werden. Die Beschichtung erfolgt ca. 3 bis 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in einem geeigneten Puffer, z. B. Boratpuffer, Phosphatpuffer, Carbonatpuffer oder Tris-Puffer in einer  
15 Konzentration von 0,01 - 0,5 Mol/l und bei pH-Werten von 7 - 10, vorzugsweise in einem 0,1 M Boratpuffer vom pH-Wert 8,4. Danach werden die Röhrchen entleert und mit einem detergenzhaltigen Puffer gewaschen.  
20 Vorzugsweise wird dazu ein Phosphatpuffer verwendet, der etwa 0,01 bis 0,1 % eines oder mehrerer Detergenzien wie Polyoxyäthylensorbitanmonooleat, Polyoxyäthylensäther höherer Alkohole usw. enthält.

Die mit Antikörper beschichteten Röhrchen werden dann  
25 mit den zu bestimmenden Antigenen inkubiert. Diese Inkubation erfolgt ca. 2 bis 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in den genannten Puffern, vorzugsweise in einem 0,05 bis 0,2 M Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,5 dem etwa 0,5 - 2 % Ovalbumin oder ein anderes Protein  
30 zugesetzt werden. Anschließend werden die Röhrchen wieder entleert und mit einem detergenzhaltigen Puffer gewaschen.

Die anschließende Inkubation mit einem Enzym, das Lectin-  
eigenschaften hat oder mit einem Lectin mit enzymatischer  
Aktivität, erfolgt in einem 0,05 bis 0,2 M Phosphatpuffer,  
vorzugsweise in einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer vom  
5 pH-Wert 7,2. Als an Saccharid bindende Enzyme mit Lectin-  
eigenschaften eignen sich vor allem Galactoseoxidase,  
Galactosidase und Mannosidase, als Lectine mit enzyna-  
tischer Aktivität werden Phytohämagglutinine aus Lima-  
bohne oder Mungobohne bevorzugt (J.Biol.Chem. 253, 7791  
10 (1978)). Nach 15 - 60 Minuten werden die Röhrrchen wieder  
entleert und mit dem oben beschriebenen detergenzhal-  
tigen Puffer gewaschen.

Bei Verwendung von Galactoseoxidase als Enzym erfolgt  
die Nachweisreaktion mit Galactose als Substrat. Die  
15 Röhrrchen werden mit einer Reaktionslösung versetzt,  
die z. B. in einem 0,1 M Phosphatpuffer Galactose,  
Phenol, Aminoantipyrin und Peroxidase enthält. Nach etwa  
einer Stunde wird die Extinktion der Lösung bei 492 nm  
gemessen. Es können auch andere Reaktionslösungen zur  
20 Wasserstoffperoxidbestimmung eingesetzt werden, wie z. B.  
ein 0,2 M Phosphatpuffer, der Galactose, Kaliumjodid,  
Ammoniummolybdat und Äthylendinitrilotetraessigsäure  
enthält. Die entstehende Färbung wird dann bei 350 nm  
gemessen.

Ausführungsbeispiele:

25 Beispiel 1.

Bestimmung von anti-BSA Antikörpern

a) Herstellung von BSA-beschichteten Röhrrchen

Polystyrolröhrrchen wurden adsorptiv mit Rinder-  
serumalbumin (BSA) beschichtet. Hierfür wurden  
30 die Röhrrchen mit 1 ml einer Lösung von 10 µg BSA

5 pro ml 0,1 M Boratpuffer (pH 8,4) gefüllt und 20 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit einem Phosphatpuffer gewaschen, der 0,05 % Polyoxyäthylensorbitanmonooleat enthielt.

b) Inkubation mit anti-BSA

10 Eine Lösung von anti-BSA (IgG aus Kaninchen) wurde durch Zusatz von 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen von 1 bis 10 000 ng IgG/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösungen wurden in die mit BSA beschichteten Röhrchen gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer  
15 gewaschen.

c) Inkubation mit Galactoseoxidase

20 450 Einheiten Galactoseoxidase wurden in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und vor Gebrauch mit dem gleichen Puffer 1 : 30 verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde den Röhrchen zugesetzt. Nach 15 - 60 Minuten wurden die Röhrchen entleert und einmal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

d) Nachweisreaktion

25 Die Röhrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung folgender Zusammensetzung versetzt: 100 ml einer Lösung von 2,35 g Phenol und 50 g Galactose pro Liter 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) wurden mit 1 ml einer Lösung von 0,2 M Aminoantipyrin versetzt. Hierzu wurden 5 ml einer Lösung  
30 von 1 mg/ml Peroxidase gegeben. Nach 60 Minuten

221214 8

- 12 -  
- 13 -

wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm im Photometer gemessen. Wie die nachstehende Tabelle zeigt, korreliert die Extinktion mit der Menge an zugesetzten Antikörpern gegen BSA.

Menge an anti-BSA [ng/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
0	0,012
1	0,035
10	0,063
100	0,080
1000	0,122
10000	0,268

#### Beispiel 2

Bestimmung von Antigenen, die Zuckerreste enthalten:  
15 human-IgG (h-IgG)

a) Beschichtung von Röhrchen mit Antikörpern gegen h-IgG aus Schaf (a-h-IgG)  
Polystyrolröhrchen wurden adsorptiv mit Antikörpern gegen h-IgG (a-h-IgG) beschichtet. Hierfür wurden die Röhrchen mit 1 ml einer Lösung von 10 µg a-h-IgG pro ml 0,1 M Boratpuffer (pH 8,4) gefüllt und 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.  
20

b) Inkubation mit h-IgG

Eine Lösung von h-IgG wurde durch Zusatz von 0,1 M Phosphatpuffer (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen von 1 - 10 ng/ml verdünnt. Jeweils 1 ml

227214 8

13  
- 16 -

dieser Lösungen wurde in die mit a-h-IgG beschichteten Röhrcchen gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrcchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

5

c) Inkubation mit Galactoseoxidase

450 Einheiten Galactoseoxidase wurden in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und vor Gebrauch mit dem gleichen Puffer 1 : 50 verdünnt.

10

Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde den Röhrcchen zugesetzt. Nach 15 - 60 Minuten wurden die Röhrcchen entleert und einmal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

d) Nachweisreaktion

15

Die Röhrcchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 60 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Die Extinktion korreliert mit der Menge an zugesetztem h-IgG, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

20

Menge an h-IgG [µg/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
0	0,213
1	0,220
2	0,225
4	0,232
6	0,236
8	0,242
10	0,271

25

## Beispiel 3

Bestimmung von Antigenen nach Markierung mit Zuckerresten: Mit Melibiose markiertes Rinderserumalbumin (BSA-Melibiose)

- 5 a) Beschichtung von Röhrchen mit Antikörpern gegen BSA aus Kaninchen ( $\alpha$ -BSA)

Polystyrolröhrchen wurden adsorptiv mit Antikörpern gegen BSA ( $\alpha$ -BSA) beschichtet. Hierfür wurden die Röhrchen mit 1 ml einer Lösung von 10  $\mu$ g  $\alpha$ -BSA pro ml Boratpuffer (pH 8,4) gefüllt und 20 Stunden bei Raumtemperatur stengelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

- 10 b) Herstellung von BSA-Melibiose-Konjugaten

15 68 mg BSA, 100 mg Melibiose und 10 mg Natriumcyanoborhydrid wurden in 5 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) gelöst und bei 37°C 48 Stunden stengelassen. Die Lösung wurde zur Abtrennung der überschüssigen Melibiose über Sephadex G-25 in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) chromatographiert.

- 20 c) Inkubation mit BSA-Melibiose

Eine Lösung von BSA-Melibiose wurde durch Zusatz von Phosphatpuffer (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen von 0,1 - 10 ng/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösungen wurde in die mit  $\alpha$ -BSA beschichteten Röhrchen gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur stengelassen. Danach wurden die

221214 8

15  
- 18 -

Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

Die Inkubation mit Galactoseoxidase erfolgte analog Beispiel 2 c.

5 d) Nachweisreaktion

Die Röhrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 60 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Die Extinktion korreliert mit der Menge an zugesetztem BSA-Melibiose-Konjugat, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

Menge an BSA-Melibiose [µg/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
0,1	0,237
1,0	0,294
10,0	0,329

In analoger Weise können Thyroxin oder ein Konjugat aus Thyroxin und BSA mit Melibiose markiert werden. Diese Konjugate oder auch ein Konjugat aus Thyroxin und einem  $\gamma$ -Globulin können unter Verwendung von mit anti-Thyroxin beschichteten Röhrchen quantitativ bestimmt werden.

## Beispiel 4

Bindung der Galactoseoxidase in einer Sandwich-Reaktion: Bestimmung von BSA

Die Beschichtung von Röhrchen mit Antikörpern gegen BSA aus Kaninchen ( $\alpha$ -BSA) erfolgte analog Beispiel 2 a.

## a) Inkubation mit BSA

Eine Lösung von BSA wurde durch Zusatz von Phosphatpuffer (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen von 1 - 10 000 ng/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösungen wurde in die mit  $\alpha$ -BSA beschichteten Röhrchen gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

b) Inkubation mit  $\alpha$ -BSA

Die Röhrchen wurden 3 Stunden mit je 1 ml einer Lösung von 1 ng  $\alpha$ -BSA in 10 mM Tris-Puffer inkubiert und dann entleert. Es wurde zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

Die Inkubation mit Galactoseoxidase erfolgte analog Beispiel 2 c.

## c) Nachweisreaktion

Die Röhrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 60 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm

gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Die Extinktion korreliert mit der Menge an zuge-  
setztem BSA, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

5	Menge an BSA [µg/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
	1	0,396
	10	0,419
	100	0,465
	1 000	0,493
10	10 000	0,543

Beispiel 5

Bindung der Galactoseoxidase an Antikörper und  
modifizierte Antikörper

a) Beseitigung der Oligosaccharide bei Glycoproteinen

15 4 mg anti-human-IgG aus Schaf (a-h-IgG) wurden in  
1 ml dest. Wasser gelöst und mit 0,2 ml einer  
frischen 0,1 M Natriumperjodatlösung 20 Minuten  
bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lö-  
20 sung gegen 1 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,4) bei  
4°C über Nacht dialysiert. Nach Zugabe von 1 ml  
einer 0,1 M Lysinlösung in 0,2 M Natriumcarbonat-  
puffer (pH 9,5) wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur  
gerührt und dann 0,1 ml einer Lösung von 4 mg  
25 Natriumborhydrid pro ml zugefügt. Nach 2 Stunden  
wurde gegen Boratpuffer (pH 8,4) dialysiert.

b) Beschichtung von Röhrchen mit a-h-IgG und modifiziertem a-h-IgG

5 Von den Antikörpern wurden Verdünnungen zu 0,1, 1,0 und 10 µg pro ml in Boratpuffer (pH 8,4) hergestellt. Polystyrolröhrchen wurden mit je 1 ml der jeweiligen Lösung über Nacht stehengelassen. Danach wurden die Röhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

10 Die Inkubation mit Galactoseoxidase erfolgte analog Beispiel 2 c.

c) Nachweisreaktion

15 Die Röhrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 60 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Die Extinktion korreliert mit der Menge an a-h-IgG im Beschichtungspuffer, wie die nachstehende Tabelle zeigt. Oxidiertes a-h-IgG zeigte nur noch eine sehr geringe Bindungsaffinität zu Galactoseoxidase.

20	a-h-IgG im Beschichtungspuffer	Extinktion bei 492 nm	modifiziertes a-h-IgG im Beschichtungspuffer	Extinktion bei 492 nm
	[µg/ml]	[OD]	[µg/ml]	[OD]
	0,1	0,04	0,1	0,01
25	1,0	0,47	1,0	0,02
	10,0	0,53	10,0	0,03

## Beispiel 6

Bestimmung von Antigenen, die Zuckerreste enthalten:  
human-IgE (h-IgE)

- 5 a) Beschichtung von Röhrrchen mit Antikörpern gegen  
h-IgE aus Ziege (a-h-IgE)

10 Polystyrolröhrrchen wurden adsorptiv mit a-h-IgE  
beschichtet, das analog Beispiel 5 modifiziert  
worden war. Hierfür wurden die Röhrrchen mit 1 ml  
einer Lösung von 0,1  $\mu$ g a-h-IgE pro ml Borat-  
puffer (pH 8,4) gefüllt und 20 Stunden bei Raum-  
temperatur stehengelassen. Danach wurden die  
Röhrrchen entleert und zweimal mit detergenzhalti-  
gem Phosphatpuffer gewaschen.

- b) Inkubation mit h-IgE

15 Eine Lösung von h-IgE wurde durch Zusatz von Phos-  
phatpuffer (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen  
von 1 - 100 ng/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser  
Lösungen wurde in die mit a-h-IgE beschichteten  
Röhrrchen gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur  
20 stehengelassen. Danach wurden die Röhrrchen ent-  
leert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphat-  
puffer gewaschen.

Die Inkubation mit Galactoseoxidase erfolgte ana-  
log Beispiel 2 c.

- 25 c) Nachweisreaktion

Die Röhrrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung  
analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 60 Minuten

wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Die Extinktion korreliert mit der Menge an zugesetztem h-IgE, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

Menge an h-IgE [ng/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
1	0,054
10	0,069
100	0,081

#### 10 Beispiel 7

Bestimmung von Antikörpern, die Zuckerreste enthalten, mit  $\beta$ -Galactosidase: a-BSA

Die Beschichtung von Röhrrchen mit BSA und die Inkubation mit anti-BSA erfolgte analog Beispiel 1 a und 1 b.

#### 15 a) Inkubation mit $\beta$ -Galactosidase

Eine Kristallsuspension von  $\beta$ -Galactosidase mit 5 mg/ml wurde 1 : 500 mit 10 mM Tris-HCl-Puffer verdünnt, der 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Mercapto-  
 20 äthanol und 10 mM Natriumchlorid enthielt. Je 1 ml dieser Enzymlösung wurde in die Röhrrchen gegeben. Nach 2 Stunden wurden die Röhrrchen entleert und einmal mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen.

#### b) Nachweisreaktion

25 Zu den Röhrrchen wurde jeweils 1 ml einer Substratlösung gegeben, die sich wie folgt zusammensetzt:

5 15 ml 0,3 M Kaliumphosphatpuffer mit 3 mM Magnesiumchlorid, 4,5 ml 1 M Mercaptoäthanol, 7,5 ml 14 mM 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in 10 mM Tris-Acetat-Puffer mit 10 mM Magnesiumchlorid und 18 ml dest. Wasser. Nach 1 - 2 Stunden wurde die Extinktion der Lösung im Photometer bei 405 nm gemessen. Die Werte korrelieren mit der Menge an zugesetztem  $\alpha$ -BSA, wie die nachstehende Tabelle zeigt.

10	Menge an $\alpha$ -BSA [ng/ml]	Extinktion bei 405 nm [OD]
	1	0,14
	10	0,17
	100	0,22
	1 000	0,25
15	10 000	0,33

Beispiel 8

Bestimmung von Choriongonadotropin (hCG)

a) Beschichtung von Röhrcchen mit Antikörpern gegen Choriongonadotropin ( $\alpha$ -hCG).

20 Polystyrolröhrcchen wurden adsorptiv mit  $\alpha$ -hCG beschichtet. Hierfür wurden die Röhrcchen mit 1 ml einer Lösung von 10  $\mu$ g  $\alpha$ -hCG pro ml 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,0) gefüllt und 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrcchen  
25 entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

b) Inkubation mit hCG

30 Eine Lösung von hCG (3000 I.U./mg) wurde durch Zusatz von 0,1 M Phosphatpuffer (mit 1 % Ovalbumin) auf Konzentrationen von 1 bis 320 I.U./ml verdünnt.

Jeweils 1 ml dieser Lösungen wurde in die mit a-hCG beschichteten Röhrrchen gegeben und 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Röhrrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

c) Inkubation mit Galactoseoxidase

450 Einheiten Galactoseoxidase wurden in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und vor Gebrauch mit 0,01 M 2-Morpholinäthanol-sulfonsäure-Puffer (pH 5,0) 1:100 verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde den Röhrrchen zugesetzt. Nach 5-60 Minuten bei 4°C wurden die Röhrrchen entleert und einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen.

d) Nachweisreaktion

Die Röhrrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm im Photometer gemessen.

Wie die nachstehende Tabelle zeigt, korreliert die Extinktion mit der Menge an zugesetztem hCG.

Mengen an hCG [mI.U./ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]
0	0,020
1,25	0,026
12,5	0,050
125,0	0,100
313,0	0,174

Analoge Ergebnisse wurden erhalten, wenn anstelle von 2-Morpholinäthanol-sulfonsäure als Verdünnungspuffer für die Galactoseoxidase (Schritt c) die folgenden

Puffer verwendet wurden:

Acetat, Citrat, Tris, Glycin, Glycylglycin, N,N-Bis-(2-hydroxy-äthyl)glycin, Piperazin-1,4-diäthansulfonsäure.

5 Beispiel 9

Bestimmung von human-IgE (h-IgE)

- a) Beschichtung von Rörhrchen mit Antikörpern gegen h-IgE aus Kaninchen (a-h-IgE)

10 Polystyrolrörhrchen wurden adsorptiv mit a-h-IgE beschichtet. Hierfür wurden die Rörhrchen mit 1 ml einer Lösung von 10  $\mu$ g pro ml Carbonatpuffer (pH 8,0) gefüllt und 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden die Rörhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

- 15 b) Inkubation mit h-IgE

Eine Lösung von h-IgE wurde durch Zusatz von Phosphatpuffer (mit 1 % Rinderserumalbumin) auf Konzentrationen von 1 - 250 ng/ml verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde in die mit a-h-IgE beschichteten Rörhrchen gegeben und 6 Stunden bei Raumtemperatur stehenlassen. Danach wurden die Rörhrchen entleert und zweimal mit detergenzhaltigem Phosphatpuffer gewaschen.

25 Die Inkubation mit Galactoseoxidase erfolgte analog Beispiel 8 c bei einer Inkubationstemperatur von 10°C.

- c) Nachweisreaktion

30 Die Rörhrchen wurden mit 1 ml einer Reaktionslösung analog Beispiel 1 d versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion der Lösung bei 492 nm gegen den Nullwert im Photometer gemessen. Wie die nachstehende

221274 8

24  
- 27 -

Tabelle zeigt, korreliert die Extinktion mit der Menge an zugesetztem h-IgE.

Menge an h-IgE [ng/ml]	Extinktion bei 492 nm [OD]	
5	1	0,276
	10	0,396
	100	0,756
	250	1,458

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Komponente aus einer Gruppe bestehend aus spezifisch bindenden Rezeptoren und Substanzen, die von diesen Rezeptoren spezifisch gebunden werden können, durch Messung der Aktivität von durch Inkubation daran gebundenen Enzymen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine der Komponenten nach Immobilisierung an einem wasserunlöslichen Träger mit der jeweils anderen Komponente inkubiert, anschließend nach üblichem Waschen mit an Saccharid bindenden Enzymen inkubiert und die Enzymaktivität bestimmt.  
5
2. Verfahren nach *Punkt* 1, dadurch gekennzeichnet, daß als an Saccharid bindende Enzyme solche mit Lectineigenschaften bzw. Lectine mit enzymatischer Aktivität verwendet werden.  
10
3. Verfahren nach *den Punkten* 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als an Saccharid bindende Enzyme Galactoseoxidase, Galactosidase und/oder Mannosidase verwendet werden.  
15
4. Verfahren nach *den Punkten* 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als immobilisierte Komponente eine modifizierte Komponente verwendet wird, deren Saccharidgruppierung so verändert ist, daß sie keine an Saccharid bindenden Enzyme und/oder Lectine mehr bindet.  
5  
10
5. Verfahren nach *den Punkten* 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine an einem wasserunlöslichen Träger immobilisierte Komponente gleichzeitig oder nacheinander mit der jeweils anderen Komponente und einem Kupplungsprodukt aus der jeweils anderen Komponente und einem Saccharid-haltigen Mole-  
15

6. Verfahren nach *den Punkten* 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine an einem wasserunlöslichen Träger immobilisierte Komponente mit der jeweils anderen, zu bestimmenden Komponente inkubiert und anschließend nach üblichem Waschen mit einer weiteren Saccharid-haltigen, an die zu bestimmende Komponente bindenden Komponente inkubiert.
7. Verfahren nach *den Punkten* 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität des gebundenen Enzyms bzw. Lectins bestimmt.
8. Verfahren nach *den Punkten* 1- 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität des Enzyms bzw. Lectins in der nach der letzten Inkubation erhaltenen Lösung bestimmt.
9. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach *den Punkten* 1 - 8, enthaltend einen wasserunlöslichen Träger, an den eine der Komponenten oder ein Komplex aus den Komponenten, wovon eine der Komponenten aus einem Kupplungsprodukt mit einem Saccharid besteht, gebunden ist - gegebenenfalls ein Kupplungsprodukt aus einer der Komponenten und einem Saccharid-haltigen Molekül - ein an Saccharid bindendes Enzym und Substrate zur Bestimmung der Enzymaktivität.
10. Mittel nach *Punkt* 9, dadurch gekennzeichnet, daß der wasserunlösliche Träger ein Kunststoffgefäß ist.
11. Mittel nach *den Punkten* 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß der wasserunlösliche Träger ein Teströhrchen aus Polystyrol oder Polypropylen ist.