



F1000106984B



SUOMI - FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 106984 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.05.2001

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

G01N 33/58, 33/532

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

932912

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

23.06.1993

(24) Alkupäivä - Löpdag

21.12.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

23.06.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/EP91/02519

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

24.12.1990 GB 9028038 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Nycomed Pharma AS, Lillogaten 3, 0401 Oslo 4, NORJA, (NO)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Holtlund,Jostein, Vardeveien 17, 1322 Høvik, NORJA, (NO)

2 •Gogstad,Geir Olav, Arildsvingen 16, 0491 Oslo 4, NORJA, (NO)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Testimenetelmä ja siihen tarkoitettu reagenssipakkaus
Testmetod och reagensförpackning avsedd för den**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 7654 (G 01N 33/58), EP A 310872 (G 01N 33/566)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Näytteissä esiintyvien analysoitavien aineiden määrittämismenetelmiä, joihin liittyy kultasoolin ja vaihtoehtoisesti entsyymin, joka kykenee aikaansaamaan luonteenomaisen reaktion, immobilisointi kiinteään faasin pinnalle. Kultasoolin hiukkasten keskimääräinen partikkelikoko on alle 20 nanometriä ainakin 75 paino-%:lla partikkeleista ja sooli saatetaan muodostamaan uudentyypinen superaggregoitu kompleksi ainakin yhden proteiinin kanssa.

Bestämningsförfaranden för analyter i prover, till vilka hör en immobilisering av guldsol och alternativt en ensym, som får tillstånd en karakteristisk reaktion, på ytan av en fast fas. Minst 75 vikt-% av guldsolens partiklar har en medeldiameter under 20 nanometer, och solet fås att forma en ny typ av superaggregerat komplex åtminstone med ett protein.

Testimenetelmä ja siihen tarkoitettu reagenssipakkaus

Tämä keksintö liittyy menetelmään analysoitavan
aineen kvalitatiiviseksi tai kvantitatiiviseksi määrittä-
miseksi vesipitoisesta mediumista.

Analysoitavien aineiden havaitseminen ja/tai mää-
rittäminen immuunimääritysmenetelmiä käyttäen on hyvin
tunnettua, mikä koskee erityisesti proteiineja, kuten
antigeeneja tai vasta-aineita, sekä sokereita, lektiinejä
ja nukleiinihappoja. Monet nykyään käytettävät menetelmät
ovat erinomaisesta herkkyydestään huolimatta kuitenkin
usein työläitä, koska niissä vaaditaan useita vaiheita,
joista jokainen voi olla pitkäkestoinen. Joitakin näistä
määrityksistä on kuitenkin pystytty yksinkertaistamaan
immobilisoimalla yksi määrittämissysteemin komponenteista
kiinteään tukimateriaaliin, koska ylimääräisten reagens-
sien poistaminen on näin helpompaa. Näissä määrityksissä
käytetään tavallisesti leimalla varustettua makromolekyy-
liä, joka voi olla varsinainen analysoitava aine tai ana-
lysoitavan aineen sitoutumisessa toimiva toinen osapuoli
ja johon on liitetty sopiva merkkiaine, kuten radioaktii-
vinen isotooppi, fluorofori tai luonteenomaisen reaktion
aikaansaava entsyymi.

Yhdessä ehdotetussa yksinkertaistuksessa on käytet-
ty näkyvänä merkkiaineena toimivaa värillistä yhdistettä,
joka on kiinnitetty yhteen immuunimäärityksen reaktanteis-
ta. Kuitenkin vain hyvin harvat värilliset yhdisteet pys-
tyvät saamaan aikaan riittävän voimakkaan signaalin.
Akzona Inc. -yhtiön US-patenttijulkaisussa 4 313 734 on
kuvattu muun muassa kolloidikullan käyttö tällaisena vä-
rillisenä materiaalina ja tässä mainitaan erityisesti,
että kultahiukkasten hiukkaskoon on oltava ainakin 5 nano-
metriä ja edullisesti 10 - 100 nm.

Patenttijulkaisussa W089/06 801 on kuvattu paran-
nettu immuunimäärityssysteemi, jossa ainakin 75 % kulta-

hiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 5 nanometriä. Tämän oli mainittu nopeuttavan kultareagenssin reaktiota immobilisoidun reaktantin kanssa sekä lisäävän värin voimakkuutta. Olemme tässä keksinnössä tehneet sen löydön, että värin voimakkuutta voidaan edelleen lisätä sitten kun patenttijulkaisun W089/06 801 mukaiset erittäin pienet kultahiukkaset saatetaan uudella aggregointimenetelmällä muodostamaan suurempia hiukkasia (superaggregoituja kultaproteiini-kolloideja). Superaggregoidut hiukkaset eroavat huomattavasti immuunimäärityksissä tähän mennessä käytetyistä monoliittisista kultahiukkasista ja niillä on mahdollista analysoida yhdisteitä vieläkin pienemmissä pitoisuuksissa kuin ne huomattavan pienet pitoisuudet, jotka patenttijulkaisun W089/06 801 mukaisilla järjestelmillä on mahdollista saavuttaa.

Pieniä kultahiukkasia on myös käytetty merkkiaineina blottaussysteemissä Janssen Pharmaceutica N.V. -yhtiön US-patenttijulkaisussa 4 775 636 kuvatulla tavalla. Tässä ei ole viitattu mitenkään siihen, että hiukkaset olisivat aggregoituja, vaan että ne ovat yksinkertaisesti sitoutuneet siihen komponenttiin, joka sillä halutaan visualisoida.

Tämän keksinnön mukaisesti tarjoamme käyttöön tutkittavassa näytteessä olevan analysoitavan aineen kvalitatiivisen tai kvantitatiivisen määrittämis menetelmän, jossa leimalla varustettu reagenssi, joka käsittää kultasoolin, joka on sitoutuneena aineeseen, joka kykenee sitoutumaan spesifisesti mainittuun analysoitavaan aineeseen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaan toiseen osapuoleen, saatetaan immobilisoitumaan sitoutuneessa muodossa kiinteään faasin pinnalle osoitukseksi analysoitavan aineen esiintymisestä tai sen määrästä näytteessä, ja jolle menetelmälle on ominaista, että leimalla varustettu reagenssi käsittää mainitun aineen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen ja kultasoolin muodostaman

superaggregoidun kompleksin, jossa ainakin 75 paino-% kultasoolin sisältämistä kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä.

Monentyyppisissä kiinteään faasiin perustuvissa
5 määrittelyksissä on edullista kytkeä analysoitavan aineen analogi tai mainitun analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimiva toinen osapuoli kiinteään tukimateriaaliin sellaisen kiinteän faasin aikaansaamiseksi, johon leimalla varustettu reagenssi saadaan immobilisoidua. Edellä sanotun perusteella tarjoamme vielä toisena
10 tämän keksinnön kohteena käyttöön sellaisen menetelmän nestemäisessä näytteessä olevan analysoitavan aineen kvalitatiiviseksi tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi, jossa mainittu näyte saatetaan kosketukseen vesipitoisessa
15 määritysmediumissa (i) kiinteän tukimateriaalin pinnalle immobilisoidun analysoitavan aineen analogin tai mainitun analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen ja (ii) sellaisen leimalla varustetun reagenssin kanssa, joka käsittää kultasoolin, joka on
20 kiinnitetty molekyyliin, joka kykenee spesifisesti sitomaan mainitun analysoitavan aineen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen, ja vaihtoehtoisesti entsyymien, joka kykenee saamaan aikaan luonteenomaisen reaktion, minkä avulla tietty määrä mainittua leimalla
25 varustettua reagenssia saatetaan immobilisoidumaan mainitulle tukimateriaalille, jonka väriä tai substraatilleen altistetun entsyymien muodostamaa väriä tarkastelemalla tai tästä tehtävällä määrittelyksellä osoitetaan mainitun analysoitavan aineen esiintyminen tai sen määrä näytteessä, ja
30 tässä menetelmässä leimalla varustettu reagenssi käsittää superaggregoidun kompleksin, joka muodostuu mainitusta aineesta tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivasta toisesta osapuolesta ja vaihtoehtoisesti mainitusta entsyymistä sekä kultasoolista, jossa vähintään 75 paino-%

kultasoolin kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä.

Kiinteä faasi, jolle leimalla varustettu reagenssi saatetaan immobilisoitumaan, voi vaihtoehtoisesti olla inertti, ja se voi immobilisoida leimalla varustetun reagenssin sitoutuneen muodon estämällä viimeksimainitun poispääsyn kiinteästä faasista fysikaalisesti esimerkiksi siten, ettei kiinteä faasi päästä leimalla varustetun reagenssin sitoutunutta muotoa kulkeutumaan huokostensa läpi, mutta päästää sitoutumattoman leimalla varustetun reagenssin kulkeutumaan näiden huokosten läpi.

Termi "analysoitavan aineen analogi" tarkoittaa tässä keksinnössä mitä tahansa molekyylylityyppiä, joka kykenee sitoutumaan spesifisesti määritettävänä olevan analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimivaan toiseen osapuoleen ja termi kattaa siten vielä uuden erän kyseistä analysoitavaa ainetta.

Hiukkasen, jonka ei välttämättä tarvitse olla täysin pyöreä, keskiläpimitta on hiukkasen suurimmasta ja pienimmästä läpimitasta laskettu keskiarvo. Superaggregoidun kompleksin muodostavista kultahiukkasista on edullisesti vähintään 75 paino-% keskiläpimitaltaan alle 5 nm ja erityisen edullisesti tämän rajan alittaa vähintään 80 % kultahiukkasista. Sopiva hiukkasten keskiläpimitan alaraja on 1 nm. Käyttökelpoisiksi ovat osoittautuneet tietyt valmistuserät Jansson Life Sciences Products -yhtiön histologisessa värjäyksessä käytettäväksi myymästä Colloidal Gold Sol G5 -tuotteesta. Yhdessä tietyssä valmistuserässä 85 % hiukkasista oli läpimitaltaan alle 5 nm keskiläpimitan ollessa 4,5 nm ja Gaussin jakauman asettuessa välille 1,1 - 7,6 nm. Tunnettuja menetelmiä hiukan muuttamalla voidaan myös kätevästi valmistaa keskiläpimitaltaan välillä 2 - 4 nm olevia kultasoojeja, esimerkiksi muuttamalla tanniinihapon konsentraatiota Slotin ja Geuzen menetelmässä (Eur. J. Cell. Biol. 38 (1985) 87 - 93). Olemme havain-

neet, että keskiläpimitaltaan välillä 4 - 4,5 nm olevat hiukkaset ovat edullisia.

Superaggregoituja komplekseja voidaan muodostaa kultasoolista ja leimalla varustettavaksi tarkoitettusta reagenssista (proteiinista) sekoittamalla liuokseen haluttu määrä kumpaakin, säätämällä pH arvoon 1 - 5, edullisesti arvoon 3 - 4 ja edullisemmin arvoon 3,5, lisäämällä siihen sellainen määrä happoa, esimerkiksi etikkahappoa, että lopulliseksi konsentraatioksi tulee noin 10 mmol/l, ja keräämällä näin muodostuneet makroskooppiset aggregaatit talteen käyttämällä suodatusta ja sen yhteydessä pesua tai vaihtoehtoisesti sentrifugoimalla ja uudelleensuspendoimalla useita kertoja peräkkäin. Makroskooppiset aggregaatit suspendoidaan uudelleen vaihtoehtoista ultraäänikäsittelyä käyttäen neutraalissa pH:ssa olevaan liuokseen, joka sisältää esimerkiksi 2 paino-% naudan seerumin albumiinia (BSA). Makroskooppisten aggregaattien yllättävän nopean häviämisen jälkeen syntyy stabiilien superaggregoitujen kulta-proteiini-kompleksien muodostama suspensio.

Superaggregoituja komplekseja voidaan myös muodostaa joidenkin proteiinien kanssa neutraalissa pH:ssa edellyttäen, että kolloideilla on proteiineihin nähden mooliylimäärä ja että käytetyssä proteiinissa on käytetyssä todellisessa pH:ssa tietty määrä (>2) positiivisesti varautuneita ryhmiä. Parhaat tulokset saadaan kuitenkin tavallisesti happamassa pH:ssa.

Tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä käytettyjen superaggregoitujen kompleksien tarkoituksenmukainen koko on 50 - 5 000 nm, edullisesti 50 - 500 nm ja edullisimmin 100 - 200 nm. Kultasoolihiukkasten määrä kompleksia kohti määräytyy luonnollisesti hiukkasten koon ja kompleksin koon mukaan, mutta tästä voidaan esittää esimerkki, jossa 5 nm hiukkaset ovat 10 nm etäisyydellä toisistaan niiden väliin jäävien proteiinien erottamina. Tällaisissa olosuhteissa 50 nm kompleksi sisältää noin 15 hiukkasta ja

5 000 nm kompleksi noin 20 miljoonaa hiukkasta. 200 nm kompleksin havaittiin sisältävän noin 1 000 hiukkasta, mikä on yhdenmukainen sen tosiseikan suhteen, että hiukkas-

5 Edellä kuvatuilla menetelmillä aikaansaatatavissa olevat superaggregoidut kultakompleksit ja niiden valmistusmenetelmät ovat uusia ja ne muodostavat sellaisenaan vielä yhden tämän keksinnön kohteen.

10 Tavanomainen tapa, joka muodostaa jyrkän vastakohdan edellä kuvatuille menetelmille, proteiinin ja kullan konjugoimiseksi on siirtää proteiini pienen suolapitoisuuden sisältävään liuokseen, jonka pH on lähellä proteiinin pI-arvoa. Suositeltu pH-arvo on tavallisesti yhden yksikön pI-arvon yläpuolella. Tällaisessa tilanteessa proteiinissa
15 on pienin mahdollinen määrä positiivisesti varautuneita kemiallisia ryhmiä. Kun tämä liuos sekoitetaan yhteen kultakolloidien kanssa, joiden pintaosiin arvellaan paikallistuvan runsaasti elektroneja, niin proteiinin ja kolloidin välille muodostuu vain muutama sidos. Tässä tilantees-
20 sa monista proteiineista muodostuvien yksiköiden ja kolloidien väliset sillat jäävät muodostumatta ja kolloidit pysyvät liuoksessa yksittäisinä proteiinimolekyylien peittäminä hiukkasina.

25 Proteiiniliuoksen pH:ta alennettaessa kunkin proteiinimolekyylin sisältämien positiivisesti varautuneiden ryhmien määrä lisääntyy. Niinpä proteiinin ja kolloidin välisten mahdollisten ionisidosten määrä kasvaa, mikä johtaa useiden siltojen muodostumiseen sekä makroskooppisten aggregaattien muodostumiseen. Tätä pidetään normaalisti
30 erittäin epäsuotuisana tilanteena, jota tulisi välttää. Tässä keksinnössä tätä ilmiötä kuitenkin käytetään hyväksi. Proteiinia edelleen lisättäessä makroskooppiset aggregaatit yllättäen liukenevat ja muodostavat liuoksen, joka koostuu tasakokoisista, proteiinin ja kultakolloidien muo-
35 dostamista superaggregaateista. Koska kolloidien välissä

on proteiininimolekyyliä, arvelemme pinta-alan kussakin superaggregaatissa kasvaneen huomattavasti. Koska metalli-
kolloidien muodostaman värin arvellaan olevan kolloidien
pinta-alaan liittyvä fysikaalinen ilmiö, aiheutuu signaa-
lin massiivinen lisääntyminen todennäköisesti kunkin su-
peraggregaattikompleksin pinta-alan vastaavasta massiivi-
sesta lisääntymisestä.

Tällä keksinnöllä aikaansaattavia parannuksia kuvaa-
vaa on se, että se värinvoimakkuus, joka saadaan käyttäen
kiinteän tukimateriaalin pinnalle immobilisoituja ja ana-
lysoitavaa ainetta vastaavaa toista sitoutumisosapuolta
sisältäviä superaggregoituja komplekseja, voi tietyn käy-
tetyn järjestelmän mukaan olla 5 - 30 kertaa suurempi kuin
väri, joka havaitaan käytettäessä patenttijulkaisun
WO89/06 801 mukaista 4 nm kulta-vasta-aine-kompleksia.

On mahdollista muodostaa superaggregoituja kulta-
komplekseja, jotka sisältävät kahden- tai useammantyyppi-
siä proteiininimolekyyliä, mistä saadaan siten käyttöön
useita vaihtoehtoja tämän keksinnön mukaisten määritysme-
netelmien joustavuuden ja herkkyyden lisäämiseksi. Yksi
mahdollisuus on aggregoida analysoitavaan aineeseen sitou-
tumaan kykenevä yhdiste (tai tätä vastaava spesifisessä
sitoutumisessa toimiva toinen osapuoli) ja luonteenomaisen
reaktion aikaansaamiseen kykenevä entsyymi superaggregoi-
duksi kompleksiksi. Tämä antaa mahdollisuuden määrittää
analysoitavan aineen esiintyminen tai sen määrä tarkaste-
lemalla kultasoolin väriä tai määrittämällä se ja/tai al-
tistamalla entsyymi substraatille ja tarkastelemalla ent-
syymien aikaansaamaa väriä tai määrittämällä se. Silloin
kun kultasoolin väri on määritettävissä olevaa havaitse-
misrajaa heikompi, voi entsyymi saada aikaan havaittavissa
olevan värin inkuboitaessa sitä pitkähkön aikaa sopivan
substraatin kanssa. Esimerkkejä tällaisista entsyymeistä
ovat alkalinen fosfataasi ja peroksidaasit, kuten pipar-
juuriperoksidaasi. On huomattava, että silloin, kun kulta-

soolin väri on analysoitavan aineen määrittämiseksi havaittavan rajan alapuolella, niin kultasoolisuperaggregaatti toimii erityisen lievänä proteiinien välisen silloittumisen muotona, jolla on etuja tietyissä olosuhteissa tavanomaiseen kovalenttiseen silloittumiseen verrattuna.

Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa superaggregaatti, joka sisältää kaksi erilaisiin kohdemolekyyliin sitoutumaan kykenevää yhdistettä, esimerkiksi toisaalta analysoitavaa ainetta vastaan suunnatun vasta-aineen (Ab1) ja toisaalta eri antigeeniä vastaan suunnatun vasta-aineen (Ab2). Sitten kun kompleksi on sitoutunut analysoitavaan aineeseen Ab1:n välityksellä, joka puolestaan on sitoutunut suoraan tai epäsuorasti kiinteään tukimateriaaliin, niin tämän kokonaisuuden saattaminen sitten toisen superaggregoidun kompleksin yhteyteen, joka sisältää vasta-ainetta Ab2 vastaavan antigeenin (Ag2), saa aikaan toisten kompleksien keräytymisen ryhmäksi ensimmäisen ympärille sekä kultasoolin värin kokonaismäärän lisääntymisen. Tapahtumasarjaa voitaisiin haluttaessa jatkaa vielä uusina vaiheina, esimerkiksi toinen kompleksi voisi sisältää kaksi antigeenia Ag2 ja Ag3, joista viimeksi mainittu toimisi kiinnittymiskohtana vielä yhdelle kompleksille, joka sisältää tätä vastaan suunnatun vasta-aineen (Ab3).

Tällaisessa amplifikaatiosysteemissä voidaan luonnollisesti odottaa käytettävän muita reseptori-ligandi-pareja, kuten (strept)avidini-biotiini, entsyymit ja entsyymi-inhibiittorit, lektiinit ja glykoproteiinit, proteiini A ja immunoglobuliinit ja niin edelleen.

Tämä systeemi voidaan myös saattaa muodostamaan kasvavia aggregaattikomplekseja lisäämällä samanaikaisesti kahta hybridiaggregaattia, joista toinen voi sitoutua analysoitavan aineen immobilisoituun reseptoriin ja jotka kumpikin erikseen sisältävät useita reagoivia ryhmiä, joita on ainakin kahta eri tyyppiä, joista toinen reagoi toisen aggregaatin kanssa. Lopputulokseksi muodostuu aggrega-

gaattiverkosto, joka muodostuminen voi olla annoksesta riippuvainen, mikäli materiaali lisätään immobilisoidun analysoitavan aineen sisältävään läpivirtaussysteemiin.

5 Kultakolloidit, jotka on aggregoitu analysoitavan aineen antigeenin kanssa reagoivalla vasta-aineella, voivat agglutinoitua analysoitavaa ainetta lisättäessä. Tämä reaktio saattaa olla hidas. Amplifioituminen voidaan saada aikaan muodostamalla ensimmäinen hybridiagregaatti, joka perustuu kultakolloideihin ja analysoitavan aineen anti-
10 geenia Ag1 vastaan reagoivaan ensimmäiseen vasta-aineeseen Ab1 ja toiseen vasta-aineeseen Ab2. Tähän lisätään toista aggregaattia, joka sisältää useita Ab2:n kanssa reagoivia Ag2-antigeenejä, jolloin agglutinaatioreaktio nopeutuu.

Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan sovel-
15 taa mihin tahansa kiinteään faasiin perustuvaan järjestelmään analysoitavien aineiden havaitsemiseksi tai määrittämiseksi. Seuraavantyyppiset määritykset ovat tyypillisiä:

1. Sandwich-määritys, jossa komponentti A on kyt-
20 ketty kiinteään tukimateriaaliin. Tähän lisätään analysoitavaa ainetta B sisältävää tutkittavaa liuosta, jolloin B sitoutuu A:han. Lisätään kultaleimalla varustettua komponenttia C ja koska C sitoutuu B:hen, niin kolloidikulta immobilisoituu ja värjää kiinteän tukimateriaalin.

25 Kukin komponenteista A, B ja C on reseptori-ligandi-tyyppejä, joissa sekä A että C kykenevät vuorovaikutukseen B:n kanssa, kun taas A ja C eivät sitoudu suoraan toisiinsa.

2. Kohdan 1 mukainen sandwich-määritys, lukuunotta-
30 matta sitä, että analysoitavaa ainetta B sisältävä tutkittava liuos ja kultaleimalla varustettu komponentti C sekoitetaan keskenään ja seos lisätään kiinteälle tukimateriaalille, johon komponentti A on kytketty.

3. Kompetitiivinen määritys, jossa komponentti A on
35 kytketty kiinteään tukimateriaaliin. Analysoitavaa ainetta

B sisältävään tutkittavaan liuokseen sekoitetaan tunnettu määrä kultaleimalla varustettua analysoitavaa ainetta B ja seos lisätään kiinteälle tukimateriaalille. B ja kultaleimalla varustettu B kilpailevat sitoutumisesta A:han ja kolloidikullan värin heikkeneminen kiinteän tukimateriaalin pinnalla osoittaa analysoitavan aineen B määrien suurenemista tutkittavassa liuoksessa.

4. Muutoin kohdan 3 mukainen kompetitiivinen määrittäminen mutta tutkittava liuos ja kultaleimalla varustettu B lisätään peräkkäin.

5. Ylimäärin komponenttia A on varustettu kolloidileimalla ja sekoitettu tutkittavaan liuokseen, joka sisältää tuntemattoman määrän analysoitavaa ainetta B. Tämän jälkeen A ja B sitoutuvat toisiinsa. Liuos lisätään huokoisen tukimateriaalin pinnalle, jolle komponentti B on immobilisoitu. Jäljelle jäävä sitoutumaton leimalla varustettu A kytkeytyy kiinteällä tukimateriaalilla olevaan immobilisoituun B:hen.

6. Analysoitava aine B saatetaan reagoimaan kultaleimalla varustetun komponentin C kanssa, vaihtoehtoisesti yhdessä yhden tai useamman muun analysoitavan aineen B sitoutumisessa toimivan sitoutumisosapuolen kanssa, yhdistelmäaggregaatin muodostamiseksi. Reaktioseos diffundoidaan sellaisen inertin suodatinväliaineen läpi, jonka huokokset ovat liian pieniä päästääkseen yhteisaggregaatin kulkeutumaan lävitseen, mutta tarpeeksi suuria päästääkseen ylimääräisen kultaleimalla varustetun komponentin C kulkeutumaan lävitseen.

Kiinteä faasi tai tukimateriaali, jonka pinnalle leimalla varustettu reagenssi saatetaan immobilisoidumaan, voi olla useassa eri muodossa, joista kuvaavia esimerkkejä ovat:

- Muovitikku, joka on vaihtoehtoisesti päällystetty mistä tahansa huokoisesta materiaalista valmistetuilla

tyynyillä. Tikku voidaan kastaa reaktioliuoksiin määrityksen eri vaiheiden suorittamiseksi.

- Koeputken seinämä, mikrotiitterilevyn kuoppa tai minkä tahansa muun sopivan reaktiokammion seinämä.

5 - Huokoinen materiaali, jollaiseksi soveltuu membraani, jossa reaktioliuosten diffuusio voi tapahtua sen läpi poikittaissuunnassa tai diffuusio voi olla lateraalista. Mikäli kyseessä on suodatusperiaatteen käyttö, on edullista, että nämä materiaalit päästävät ylimääräiset reagenssit lävitseen, ja niihin voidaan tarkoituksenmukaisella tavalla yhdistää tällaisia ylimääräisiä nesteitä absorboivaa materiaalia.

10 - Rakeet (mikropalloset mukaan lukien), jotka voidaan eristää sentrifugoimalla, suodattamalla tai, mikäli rakeet sisältävät ferromagneettisia yhdisteitä, magneetin avulla.

15 Määritettävän analysoitavan aineen analogi tai analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimiva toinen osapuoli voidaan kytkeä tukimateriaaliin kovalenttisesti, sähköstaattisesti tai hydrofobisesti tai näiden muotojen yhdistelmällä. Nämä menetelmät ovat tällä alalla vakiintuneita menetelmiä.

25 Tämän keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää monien erilaisten analysoitavien aineiden havaitsemiseen tai määrittämiseen, joita aineita ovat esimerkiksi seuraavat ligandi-reseptori-parit: antigeeni/vasta-aine, hapteeni/vasta-aine, hormoni/hormonin reseptori, sokeri/lektiini, biotiini/avidini- (streptavidini), proteiini A/immuoglobuliini, entsyymi/entsyymin kofaktori, 30 entsyymi/entsyymin inhibiittori ja nukleiinihappoparit (DNA-DNA, DNA-RNA tai RNA-DNA). Ainakin toinen tällaisista reaktion osapuolista voidaan kytkeä tai kompleksoida toisiin molekyyleihin. Niinpä biotiini tai avidini tai monet erilaiset vasta-aineet voidaan kytkeä toisiin molekyyleihin viimeksi mainittujen määrittämiseksi. Spesifinen 35

nukleiinihappokoetin voidaan esimerkiksi varustaa leimalla liittämällä siihen biotinyloituja nukleosiditrifosfaatteja. Analysoitavaan DNA:han tai RNA:han sitouduttuaan tällainen koetin voidaan havaita tai määrittää käyttämällä 5 kultasoolileimalla varustettua avidiinia tai streptavidiinia.

Yleensä silloin, kun analysoitava aine kuuluu yllä lueteltujen joukkoon, niin tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä sitoutuva osapuoli on parin toinen 10 komponentti. Sandwich-systeemeissä, joissa analysoitava aine sitoutuu sekä immobilisoituun sitoutumisosapuoleen että kultasoolileimalla varustettuun sitoutumisosapuoleen, voivat sitoutumisosapuolet olla joko samanlaisia tai erilaisia. Kukin sitoutumisosapuoli on edullisesti analysoi- 15 tavan aineen erilaisia, toisistaan selvästi erillään sijaitsevia determinantteja vastaan suunnattu vasta-ainereagenssi.

On selvää, että termiin "vasta-aine" kuuluu tässä keksinnössä

20 (a) mikä tahansa immunoglobuliinien useista eri luokista tai alaluokista, esimerkiksi IgG ja IgM, jotka ovat peräisin mistä tahansa tavanomaisesti käytetystä eläimestä;

(b) monoklonaaliset vasta-aineet; ja

25 (c) sellaiset monoklonaalisten tai polyklonaalisten vasta-aineiden fragmentit, joissa vasta-aineeseen sitoutuva kohta on säilynyt, toisin sanottuna fragmentit, joista puuttuu Fc-osa (eli Fab, Fab', F(ab'))₂) tai niin sanotut "puolimolekyyli"-fragmentit, jotka on saatu aikaan pilkkomalla 30 malla pelkistävissä olosuhteissa ehjän vasta-aineen raskaan ketjun komponentteja toisiinsa kiinnittävät disulfidisidokset.

Seuraavaksi on esitetty epätäydellinen luettelo niistä immunogeenityypeistä, joita voidaan havaita tai 35 kvantitoida tämän keksinnön mukaisen menetelmän avulla.

	proteiinit	glykoproteiinit
	nukleoproteiinit	peptidihormonit
	seerumin proteiinit	komplementin proteiinit
	hyyttymistekijät	mikrobisidiset tuotteet
5	virustuotteet	bakteerituotteet
	sienten tuotteet	spesifiset immunogeenit
	albumiini	angiotensiini
	bradykiniini	kalsitoniini
	karsinoembryonaa-	kreatiniinikinaasin
10	linen antigeeni	isoentsyymit
	korionmammotropiini	koriongonadotropiini
	kortiokotropiini	erytropoietiini
	hyyttymistekijä VIII	fibrinogeeni
	alfa-2-H-globuliini	fibriinin hajoamis-
15	folliotropiini	tuotteet
	gastrini	gastriniisulfaatti
	glukagoni	gonadotropiini
	haptoglobiini	hepatiitti-B:n pinta-
	immunoglobuliinit	antigeeni
20	(A, D, E, G, M)	ihmisen C-reaktiivinen
	insuliini	proteiini
	kallidiini	lipotropiini
	melanotropiini	myoglobiini
	oksimosiini	pankreotsymiini
25	istukan somato-	paratryiini
	mammotropiini	prolaktiini
	proangiotensiini	relaksiini
	somatotropiini	somatomediini
	sekretiini	tyrotropiini
30	somatostatiini	vasotosiini
	tymopoiyetiini	
	vasopressiini	
	alfa-1-fetoproteiini	alfa-2-H-globuliini

35 Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä suoritettavaa määrittystä varten erityisen mielenkiintoisia analysoi-

tavia aineita ovat veren proteiinit, kuten fibriinin hajoamistuotteet, esimerkiksi D_2 , jotka sitoutuvat immunoglobuliineihin, kuten IgG:hen; ihmisen C-reaktiivinen proteiini; kreatiniinikinaasin isoentsyymit; ja myoglobiini.

5 Analysoitava aineen liuosta voidaan käyttää suoraan tai se voidaan laimentaa esimerkiksi sopivalla puskuriliuoksella. Kultasoolivalmiste voidaan myös valmistaa vaihtelevansuuruisina laimennoksina tarkoituksenmukaista puskuriliuosta käyttäen, jolloin laimennokset valitaan
10 siten, että määrityksen kaikkien vaiheiden jälkeen saadaan haluttu värinvoimakkuus (toisin sanottuna absorbanssi tai heijastus). Taustan värin vähentämiseksi voi olla haluttua pestä tukimateriaali ennen määrittystä esimerkiksi puskuriliuoksella ylimääräisten reagenssien poistamiseksi.

15 Milloin määrittäminen perustuu immobilisoidun tukimateriaalin pintaan jääneen kultasoolin kokonaismäärään, voidaan väri arvioida reflektometriä, densitometriä tai muuta tämän tyyppistä laitetta käyttäen.

Toisen määrityksessä olevan sitoutumisosapuolen tai
20 analysoitavan aineen analogin immobilisointiin käytetty tukimateriaali voi olla esimerkiksi nitroselluloosaa, paperia tai reagenssien, kuten syaanibromidin, avulla aktivoitua selluloosa-asetaattia tai nailonia, joka on modifioitu tertiaarisia aminoryhmiä lisäämällä. Tällaisia tukimateriaaleja käytetään käyttötarkoituksiinsa huokoisten
25 membraanien muodossa.

Tämän keksinnön mukaisessa erityisen edullisessa menetelmässä inertti tukimateriaali on membraani, esimerkiksi nailonmembraani, kuten Hybond N (tätä pitää kaupan
30 yhtiö Amersham International), joka adsorboi helposti proteiineja ja jonka huokoset kykenevät päästämään nestettä lävitseen. Membraanin toiselle puolelle asetetaan edullisesti absorboiva tyyny, kuten selluloosasta valmistettu imupaperi, ja tyynyn päälle asetetaan nestettä läpäisemätön ja edullisesti valkoinen liuska. Membraanin toiselle
35

puolelle asetetaan samanlainen nestettä läpäisemätön liuska ja tähän liuskaan on tehty esimerkiksi noin 3,5 mm suuruinen reikä, jonka kautta analysoitavaa ainetta sisältävä liuos ja määritysnesteet voidaan lisätä membraanille. Ensin membraani aktivoidaan lisäämällä pieni erä, esimerkiksi noin 2 µl, vesipitoista liuosta, joka sisältää tunnetun määrän analysoitavan aineen toista sitoutumisosapuolta, jonka jälkeen se kuivataan esimerkiksi jättämällä se kuivumaan huoneenlämpöön. Tämän jälkeen membraanille lisätään tunnetun suuruinen määrä, esimerkiksi noin 25 µl, analysoitavaa ainetta sisältävää vesipitoista liuosta ja sen annetaan kulkeutua tämän läpi alla olevaan absorboivaan tyyppyn. Tämän jälkeen membraanille lisätään esimerkiksi 25 µl vesipitoista liuosta, joka sisältää tunnetun määrän kolloidikultasoolihiukkasia, jotka on varustettu analysoitavan aineen sitoutumisessa toimivasta toisesta osapuolesta, joka voi olla sama tai eri aine kuin membraanille ensin lisätty aine, muodostuvalla leimalla, ja tämän annetaan kulkeutua membraanin läpi.

20 Membraanille voidaan lisätä vaihtoehtoisesti pieni erä vettä tai puskuria, jotta kultasoolireagenssi saataisiin huuhdeltua tämän läpi ja tausta siten värjäytymään mahdollisimman vähän. Membraanille immobilisoituneen kultasoolin määrä määritetään sitten reflektometrillä tai 25 paljaalla silmällä väriasteikkoon vertaamalla.

Edellä esitetyssä käyttömenetelmässä (6) membraani voi olla halutun huokoisuuden omaavaa liuskamateriaalia, joka voi olla inerttiä, koska sen ainoana tehtävänä on toimia suodattimena. Analysoitavan aineen aggregoitumista 30 komponentin C kanssa voidaan tehostaa lisäämällä kaksi tai useampi erilaista analysoitavan aineen sitoutumisessa toimivaa osapuolta, jotta saadaan aikaan sen tyyppinen silloittuminen, joka johtaa suurempien aggregaattien muodostumiseen. Komponentti C voi vaihtoehtoisesti käsittää analysoitavan aineen sitoutumisosapuolen immobilisoituna ra- 35

keisiin, esimerkiksi monodispersseihin rakeisiin, kuten Dynosphere-rakeisiin (Dynal A/S, Oslo, Norja).

Tämä keksintö sisältää myös tämän keksinnön mukaisen menetelmän suorittamiseen tarvittavat testipakkaukset, jotka käsittävät (a) kiinteän faasin, jonka pinnalle leimalla varustettu reagenssi saatetaan immobilisoitumaan osoitukseksi analysoitavan aineen esiintymisestä tai määrästä näytteestä ja (b) leimalla varustetun reagenssin, jolle on tunnusomaista, että leimalla varustettu reagenssi käsittää superaggregoidun kompleksin, joka muodostuu aineesta, joka kykenee spesifisesti sitoutumaan mainittuun analysoitavaan aineeseen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaan toiseen osapuoleen, ja kultasoolista, jossa ainakin 75 paino-% kultasoolin kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä. Testipakkauksen edullinen muoto käsittää (a) kiinteän tukimateriaalin analysoitavan aineen analogin tai analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen tai analysoitavan aineen ja yhden tai useamman muun reagenssin muodostaman kompleksin immobilisoimiseksi, (b) mainitun analysoitavan aineen analogin tai sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen ja (c) reagenssin, joka käsittää superaggregoidun kompleksin, joka muodostuu molekyylistä, joka kykenee sitoutumaan spesifisesti analysoitavaan aineeseen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaan toiseen osapuoleen, ja kultasoolista, jossa ainakin 75 % kultasoolin hiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä. Kun superaggregoituun kompleksiin liitetään entsyymi, joka kykenee saamaan aikaan luonteenomaisen reaktion, niin testipakkaukseen voidaan liittää myös pakkaus, josta saadaan käyttöön entsyymin substraatti.

Testipakkauksen sisältämä kiinteä faasi voi vaihtoehtoisesti olla analysoitavan aineen kanssa kosketukseen saatettavaksi kelpaava käyttövalmis kiinteä tukimateriaali, missä on käytetty analysoitavan aineen analogin tai

analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen kytkemistä tukimateriaaliin etukäteen. Joissakin määrityksissä tällainen reagenssipakkaus voi sisältää vakiomäärän analysoitavaa ainetta, vakiomäärän tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaa toista osapuolta ja kultasoolireagenssin. Vakiomäärät analysoitavaa ainetta tai spesifisessä sitoutumisessa toimivaa toista osapuolta tai reagenssia voivat olla vesipitoisina liuoksina tai ne ovat tavallisemmin lyofilisoituja valmisteita, jotka on tehty liuotettaviksi juuri ennen käyttöä. Yhdessä määritysmuodossa kiinteä tukimateriaali voi olla inertti huokoinen membraani, jonka tehtävänä on pitää analysoitavan aineen ja sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen muodostama kompleksi aggregoituneessa muodossa, mutta mahdollistaa kultasoolireagenssin diffusoituminen menetelmän 6 mukaisesti. Tällaisessa systeemissä analysoitavaa ainetta sisältävän kompleksin kokoa voidaan suurentaa käyttämällä mainittua sitoutumisessa toimivaa toista osapuolta tai analysoitavaa ainetta suhteellisen suuriin hiukkasiin, esimerkiksi edellä mainittuihin Dynosphere-hiukkasiin, kiinnitettynä.

Vaikka tässä tarkastelussa ja seuraavissa esimerkeissä päähuomio on kiinnitetty reseptori-ligandi-määrityksiin, niin on selvää, että uusilla superaggregoiduilla komplekseilla on hyvin monia erilaisia muita käyttömuotoja aloilla, joilla kultakolloideille on löytynyt sovellutuksia. Niinpä aggregaatteja voidaan käyttää blottausmenetelmissä kytkettynä vasta-aineeseen tai muuhun sitoutuvaan materiaaliin, joka on suunnattu näytteessä esiintyväksi epäiltyä yhdistettä vastaan; ne ovat käyttökelpoisia myös värjättäessä kudisleikkeitä valo- tai elektronimikroskopialla tai muita värjäysmenetelmiä varten; sentrifugoinnissa ne ovat käyttökelpoisia merkkiaineina; ja agglutinaatiomäärityksissä ne voivat korvata nykyään käytetyt lateksihiukkaset. Ammattimies kykenee helposti näkemään muita

sovellutusmuotoja, joissa superaggregoidut kompleksit voivat korvata muuntyyppisiä nykyään käytettyjä hiukkasia.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu ainoastaan tätä esimerkkiä valaiseviksi esimerkeiksi:

5 **Esimerkki 1**

Keskiläpimitaltaan 4 nm hiukkasista koostuva kulta-kolloidi valmistettiin julkaisussa Mulphordt, Experientia 38 (1982) s. 1127 - 1128, kuvatulla tavalla.

10 Fibriinin hajoamistuotetta, D-dimeeriä, vastaan suunnattu hiiren monoklonaalinen vasta-aine S4H9 kehitettiin tavanomaista hybridoomateknologiaa käyttäen, vasta-aine valmistettiin hiiren askites-nesteessä ja lopuksi puhdistettiin. Ennen käyttöä puhdistettu vasta-aine dialysoitiin tislattua vettä vastaan ja sen konsentraatio
15 säädettiin arvoon 1,5 mg/ml.

Käytettiin kultakolloidisuspensiota, jonka optinen tiheys oli 540 nm:n aallonpituudella 40 (arvioituna kolloidisuspension laimennuksesta). Suspensio valmistettiin sentrifugoimalla, poistamalla 90 - 95 % supernatantista ja
20 suspendoimalla se ennen käyttöä uudelleen tislattuun veteen. 25 ml:aan tätä liuosta lisättiin etikkahappoa, jonka lopulliseksi konsentraatioksi tuli 10 mmol/l, millä pH asetui arvoon noin 3,5, jonka jälkeen lisättiin välittömästi 15 ml vasta-aineen S4H9 dialysoitua liuosta. Seosta
25 sekoitettiin 20 minuutin ajan. Makroskooppiset aggregaatit tulivat välittömästi näkyviin. 20 minuutin kuluttua suspensio sentrifugoitiin 5000 x g:n voimalla 10 minuutin ajan. Supernatantti poistettiin ja sedimentoituneet aggregaatit suspendoitiin uudelleen tislattuun veteen siten,
30 että lopulliseksi tilavuudeksi saatiin 40 ml. Lisättiin 10 ml 10-%:ista naudan seerumin albumiini (BSA) -liuosta. Suspensio jäädytettiin jäällä ja sen jälkeen sille suoritettiin lievä ultraäänikäsittely noin 15 sekunnin ajan. Tätä suuremmat tilavuudet voidaan edullisesti käsitellä
35 ultraäänellä läpivirtausjärjestelmässä. Suspensio laimen-

nettiin nelinkertaisesti 200 ml lopputilavuuteen, jonka jälkeen se steriilisuodatettiin 0,22 mikrometrin suodattimella ja lopuksi sen NaCl-konsentraatio säädettiin arvoon 20 mmol/l. Elektronimikroskopoimalla saatiin selville,
5 että kolloidit esiintyivät läpimitaltaan 100 - 200 nm:n suuruisina ryhmittyminä (kuvio 1).

Suspensio läpäisi 0,22 mikrometrin suodattimen (= 220 nm), kun taas 100 nm:n ja 50 nm:n läpimittaiset suodattimet pidättivät värilliset kolloidit täydellisesti.

10 Valmistettiin standardikonjugaatti käyttäen vasta-aineiden normaalia leimausmenetelmää Slotin ja Geuzen kuvaamalla tavalla (Eur. J. Cell. Biol. 38 (1985) s. 87 - 93). Tässä menetelmässä ei muodostunut aggregaatteja, koska konjugaatiomenetelmän aikana pH pidettiin lähellä vasta-
15 aineen pI-arvoa. Kullan ja vasta-aineen suhteen arvioitiin tuloksena olevissa konjugaateissa olevan 1 : 1 ja elektronimikroskopiaalla varmistettiin, että kultahiukkaset olivat sattumanvaraisesti jakautuneena liuoksessa (kuvio 2).

20 Konjugaatit tutkittiin seuraavalla testivälineellä:

1 x 1 cm:n pala nitroselluloosamembraania, jonka huokoskoko oli 0,6 μ m, asetettiin 0,28 mm paksun valkoisen polyvinyylikloridiliuskan (PVC) alle siten, että siinä
25 oleva 3,5 mm:n reikä oli membraanin keskellä. Membraani kiinnitettiin muoviin kaksipuolista teippiä käyttäen. Tämän jälkeen kiinnitetyllä membraanilla varustettu PVC-liuska kiinnitettiin 1 mm paksuiseen selluloosapaperityynyyn sille teipin alueelle, jota membraani ei peittänyt. Väline suljettiin toisen 0,40 mm paksuisen PVC-liuskan
30 alle kiinnittämällä liuska tyynyyn kaksipuolista teippiä käyttäen. Tällainen rakenne mahdollistaa nesteen kulun ylemmässä PVC-liuskassa olevan reiän kautta membraanin läpi ja sen kertymisen tyynyyn. Membraani aktivoitiin liisäämällä 2 μ l S4H9-vasta-aineliuosta, jonka pitoisuus oli

3,0 mg/ml, ja sen annettiin kuivua ennen sen käyttöä seuraavissa vaiheissa.

Membraanin pinnalle lisättiin testivälineessä oleviin rinnakkaisiin reikiin 25 µl plasmanäytettä, jonka tiedettiin sisältävän D-dimeeriä. Noin 20 sekunnin kulu-
5 tua plasma oli kulkeutunut membraanin läpi tyynyyn. Kumpaankin kahteen rinnakkaiseen reikään lisättiin erikseen 25 µl kultakonjugaatteja aggregoituneessa muodossa ja 25 µl kultakonjugaattia aggregoitumattomassa muodossa. Kun
10 neste oli kulkeutunut membraanin läpi, lisättiin pisara 0,15-molaarista NaCl:a ylimääräisen konjugaatin huuhtelemiseksi pois. Kontrolleiksi suoritettiin näitä kahta konjugaattia käyttäen samat vaiheet plasmanäytteelle, jonka tiedettiin sisältävän normaalin pienen pitoisuuden D-dimeeriä. Tulokset luettiin laitteiden avulla käyttäen
15 IBM-PC-tietokoneeseen liitettyä reflektometriä (Color Eye, Macbeth) ja Macbethin tietokoneohjelmaa.

Saadut tulokset osoittivat, että normaalilla plas-
malla, jonka D-dimeeripitoisuus oli pieni, muodostunut
20 väri antoi 540 nm:n aallonpituudella vastaavan pienen reflektanssin, joka oli <0,18. Aggregoitumattoman konjugaatin avulla muodostunut väri oli tavallisesti heikko, kun taas aggregoitua konjugaattia käyttäen saatu väri oli reflektanssiarvojen perusteella noin kymmenen kertaa voimakkaampi. Tulokset osoittavat, että uusi konjugaattimuoto
25 sai aikaan huomattavasti suuremman nettotuloksen kuin tavanomaiset konjugaatit. Aggregoituminen ei vaikuttanut taustasignaaliin.

Lisäksi suodatustesti osoittaa, että aggregoituneiden kultakolloidien koko oli alueella 100 - 200 nm. Tämä
30 varmistettiin elektronimikroskopian avulla.

Esimerkki 2

Tässä esimerkissä osoitetaan, että aggregoituja konjugaatteja voidaan muodostaa myös edellistä menetelmää

yksinkertaisemmalla menetelmällä ilman ultraäänikäsitte-
lyä.

Kultakolloidit, testiväline ja vasta-aineet valmis-
tettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Kultakolloidisus-
pensio valmistettiin kuvatulla tavalla siihen vaiheeseen
5 saakka, jossa pH säädetään arvoon 3,5 etikkahappoa käyt-
täen. 25 ml kolloidisuspensiota, jonka pH oli säädetty,
lisättiin 12,5 ml:aan S4H9-liuosta, jonka pitoisuus oli
1,5 mg/ml. Kun suspension oli annettu olla 25 minuuttia
10 20 °C:ssa, se lisättiin 10-%:iseen BSA-liuokseen, jonka pH
oli säädetty arvoon 9,0. BSA:n lopullinen konsentraatio
oli 0,2 %. Tämän jälkeen suspension Tris-HCl-konsentraatio
säädettiin arvoon 40 mmol/l (pH 7,3). Kun suspensio jätet-
tiin sekoittumaan yön yli, näkyvät aggregaatit hävisivät
15 ja suspensio läpäisi steriilisuolettimen, jonka huokoskoko
oli 0,22 µm, mutta ei 100 nm suodatinta. Elektronimikro-
skopialla saatiin selville, että aggregaatteja muodostui,
vaikkakaan niiden pakkautuminen ei ollut yhtä tiiviistä
kuin esimerkissä 1 kuvatussa menetelmässä. Esimerkin 1
20 mukaisella tutkimusohjelmalla suoritettussa tutkimuksessa
ilmeni, että signaali lisääntyi noin viisinkertaiseksi
tavanomaisiin aggregoitumattomiin konjugaatteihin verrat-
tuna.

Esimerkki 3

25 Esimerkin 1 mukaiset vaiheet toistettiin sillä ai-
noalla poikkeuksella, että kultakolloidisuspensioon lisät-
tiin NaCl:a konsentraatioon 5 mmol/l ja suspensio jätet-
tiin 4 °C:seen 14 päivän ajaksi ennen käyttöä. Tämän mene-
telmän avulla saadaan kultakolloidit muodostamaan selvem-
30 min havaittavia aggregaatteja. Kun konjugaatit tutkittiin
esimerkin 1 mukaista tutkimusohjelmaa noudattaen, olivat
värisignaalit noin kolmekymmentä kertaa voimakkaammat kuin
aggregoitumatonta kultaa käyttäen saadut signaalit. Taus-
tataso kasvoi hieman, mikä osoittaa, että muodostuneet
35 aggregaatit olivat läpimitaltaan suurempia.

Esimerkki 4

Tässä esimerkissä osoitetaan, että tietyt vasta-aineet saattavat muodostaa aggregaatteja kultakolloidien kanssa lähes neutraalissa pH:ssa. Tällaisten aggregaattien aikaansaamaa signaalia ja niiden kokoa voidaan säätää vaihtelemalla konjugointimenetelmässä käytettävää proteiinin ja kullan keskinäistä suhdetta.

Ihmisen seerumialbumiinia kohtaan spesifinen hiiren vasta-aine, jolle annettiin nimitys 2D2, kehitettiin tunnettua hybridoomatekniikkaa käyttäen. Vasta-aineen tuotantoa kohotettiin käyttäen hiiren askites-nestemenetelmiä, vasta-aine puhdistettiin ja dialysoitiin 2-millimolaarista natriumfosfaattipuskuria (pH 6,8) vastaan. Vasta-aineen lopullinen konsentraatio oli 1,0 mg/ml.

Kultakolloidit valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Kolloidisuspension absorbanssi säädettiin arvoon 40 540 nm aallonpituudella.

Vasta-aineliuos ja kultakolloidisuspensio sekoitettiin keskenään suhteissa 1 + 2, 1 + 2,2, 1 + 2,5, 1 + 3 ja 1 + 3,5.

Kun liuoksia oli pidetty 25 minuuttia 20 °C:n lämpötilassa, niihin lisättiin yhtä suuri tilavuus 1-%:ista BSA-liuosta.

Konjugaatit tutkittiin välineissä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Membraanit aktivoitiin lisäämällä 2 µl liuosta, joka sisälsi toista ihmisen seerumin albumiinia vastaan suunnattua hiiren monoklonaalista vasta-ainetta (2D3), jonka pitoisuus oli 3,0 mg/ml. Membraanien annettiin kuivua ennen käyttöä.

Ihmisen virtsanäytteet, joihin kuhunkin oli lisätty albumiinia pitoisuuteen 0 (kontrolli), 10, 25, 50, 100 ja 200 mg/l, laimennettiin suhteessa 1 + 20 NaCl:lla, jonka konsentraatio oli 0,15 mol/l. Testivälineiden viiteen rinnakkaiseen reikään lisättiin 25 µl kutakin laimennosta. Kun laimennetut näytteet olivat imeytyneet membraaniin,

lisättiin yksi tippa kutakin konjugaattia kuhunkin rinnakkaisen sarjan reikään. Lopuksi lisättiin yksi tippa 0,15-molaarista NaCl-liuosta membraanin huuhtelemiseksi ja kukin reikä luettiin reflektometrin avulla esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

5 Tulokset on esitetty kuviossa 3 ja niistä käy ilmi, että tulokseksi saatu signaali lisääntyy huomattavasti vasta-aineen määrän noustessa. Yhdessäkään tapauksessa liuoksesta ei kyetty löytämään vapaita (kultahiukkasiin konjugoitumattomia) vasta-aineita. Tästä sekä reflektanssiarvojen suhteellisesta kasvusta johtuen ei signaalin voimistumista voida selittää pelkällä reagoivien vasta-aineiden lukumäärän lisääntymisellä. 50 nm:n suodattimia käyttäen suoritettut kokeet osoittivat myös, että suodatin 15 pidätti pääasiassa suhteessa 1 + 2 valmistetun konjugaatin, kun taas suhteessa 1 + 3,5 valmistetut konjugaatit läpäisivät sen esteettä. Niinpä ne aggregaatit, joiden signaalinmuodostamiskyky oli kasvanut, olivat muodostuneet vasta-aine 2D2:n kanssa lähes neutraalissa pH:ssa.

20 Esimerkki 5

Esimerkin 1 mukaiset suoritussvaiheet toistettiin sillä ainoalla poikkeuksella, että vasta-aine korvattiin monoklonaalisella vasta-aineella T11G8, joka oli suunnattu C-reaktiivista proteiinia vastaan. Vasta-aineen konsentraatio, vasta-aineen liuotin, kolloidikulta ja kaikki käytetyt suoritussvaiheet olivat samanlaiset kuin esimerkissä 1. Suodatustutkimuksessa havaittiin läpäisy 200 nm suodattimilla, muttei 50 eikä 100 nm:n suodattimilla.

30 Vertailun vuoksi valmistettiin vertailukonjugaatti pitämällä pH arvossa 6,5, joka on lähellä T11G8:n pI-arvoa. Tämä konjugaatti läpäisi helposti 50 nm:n suodattimen, mikä osoitti, ettei aggregaatteja ollut muodostunut. Tämä saatiin varmistettua elektronimikroskopiaalla, jolla osoitettiin vain vähäistä kultakolloidien ryhmittymistä 35 lopullisessa valmisteessa.

Nämä kaksi konjugaattia tutkittiin esimerkissä 1 kuvattua välinettä muistuttavalla välineellä. Membraani aktivoitiin lisäämällä 2 μ l C-reaktiivista proteiinia vastaan suunnatun monoklonaalisen vasta-aineen G405 liuosta, jonka pitoisuus oli 3,0 mg/ml, ja membraani kuivattiin ennen käyttöä. Kullekin membraanipalalle lisättiin muovisuojuksen aukon kautta 25 μ l laimennettuja plasmanäytteitä, joiden tiedettiin sisältävän C-reaktiivista proteiinia, jonka jälkeen lisättiin 25 μ l jompaan kumpaan kahdesta muodosta valmistettua konjugaattiliuosta, ja taustaväri-
10 rin poistamiseksi lisättiin vielä yksi tippa 0,15-molaarista NaCl-liuosta.

Kuviossa 4 on esitetty koetulokset, jotka saatiin 32 mg/l CRP:tä sisältävän plasman sarjalaimennoksista, jotka oli valmistettu suhteissa 1 : 50 - 1 : 800. Laimennin oli 0,15-molaarinen NaCl. Kuten kuvasta käy ilmi, näiden kahden konjugaatin värjäytymisen voimakkuudet membraanilla osoittautuivat huomattavan erilaisiksi aggregoidun konjugaatin saadessa aikaan yli kymmenkertaisesti lisääntyneitä signaaleja.
20

Kumpaakin konjugaattia pidettiin 4 °C:n lämpötilassa yhdeksän kuukauden ajan ja ne tutkittiin säännöllisesti. Yhdenkään konjugaatin ominaisuudet eivät muuttuneet tämän säilytysajan jälkeen, mikä osoittaa, että aggregoidut konjugaatit ovat erittäin stabiileja.
25

Esimerkki 6

Edellä kuvattu koe toistettiin korvaamalla vasta-aine T11G8 puhdistetulla ihmisen seerumin albumiinia vastaan suunnatulla kaniinin antiseerumilla (anti-HSA). Tulokseksi saadut konjugaatit tutkittiin sellaisia membraaneja sisältävässä välineessä, jotka oli päällystetty monoklonaalisella anti-HSA-vasta-aineella esimerkeissä 1 ja 5 kuvattua menetelmää käyttäen. Tulokset osoittivat, että lisättäessä laimennettua virtsaa, jonka tiedettiin sisältävän albumiinia, sai aggregoitu konjugaatti aikaan noin
30
35

kahdeksankertaisesti lisääntyneen värisignaalin verrattuna tavanomaiseen aggregoitumattomaan konjugaattiin.

Esimerkki 7

Aggregoituja konjugaatteja voidaan myös muodostaa käyttäen muita proteiineja kuin vasta-aineita. Esimerkin 1 mukainen menetelmä kultakolloidien ja aggregoitujen konjugaattien valmistamiseksi toistettiin siten, että tällä kertaa vasta-aine korvattiin naudan seerumin albumiinilla. Käytetty albumiinkonsentraatio oli 1,5 mg/ml, kuten oli asianlaita vasta-aineidenkin yhteydessä. Muodostui aggregaatteja, joiden ominaisuudet suodattimissa olivat samankaltaisia kuin vasta-aineaggregaattien ominaisuudet. Albumiiniaggregoitu kolloidikulta tutkittiin elektronimikroskopian avulla ja ryhmittyneiden kolloidien jakautuminen osoittautui siinä samalla tavalla sattumanvaraiseksi kuin esimerkissä 1 muodostuneilla aggregaateilla.

Esimerkki 8

Toinen kolloidikultaan konjugoitavissa oleva muun tyyppinen proteiini kuin vasta-aineproteiini on proteiini-A. Menetelmä oli sama kuin esimerkissä 1 käytetty menetelmä ja siinä käytettiin proteiini A:n pitoisuutta 1,5 mg/ml kuten muidenkin proteiinien yhteydessä meneteltäessä. Tuloksena oleva aggregoitunut konjugaatti sekä tavanomainen, aggregoitumaton konjugaatti tutkittiin samankaltaisella välineellä kuin esimerkissä 1 kuvattu väline. Membraani päällystettiin ihmisen seerumin albumiinia vastaan suunnatulla monoklonaalisella IgG-vasta-aineella. Koska proteiini A reagoi suoraan immunoglobuliinien kanssa, osoitti kahden konjugaatin eri laimennosten lisääminen, että lisättäessä yhtä suuri määrä konjugoitua proteiini-A:ta sai aggregoitu konjugaatti aikaan noin kaksitoista kertaa voimakkaamman signaalin kuin tavanomaisen konjugaatin kanssa aikaansaatava signaali.

Esimerkki 9

Tässä esimerkissä osoitettiin sellaisen hybridi-
aggregaatin muodostuminen, joka sisälsi kahta eri proteiini-
nia, joista toista voidaan käyttää sitoutumiseen ja toista
5 signaalin muodostamiseen. Alkalinen fosfataasi (ALP) -ent-
syymi ja kaniinin hiirtä vastaan suunnattu IgG konjugoitiin
yhdessä kultahiukkasiin. Tällainen konjugaatti mahdollistaa
hiiren IgG-molekyylien havaitsemisen joko suoraan kultavärjäytymää
tarkastelemalla tai käyttämällä entsyymiä ELISA-määrityksen
10 tapaan.

Entsyymistä (ALP) ja vasta-aineesta poistettiin suola suorittamalla geelisuodatus PD-10-pylväällä, joka
oli tasapainotettu 10-millimolaarisella etikkahapolla, jonka
jälkeen ne sekoitettiin keskenään massasuhteessa
15 1,5 : 1 (entsyymi : vasta-aine). Tämän jälkeen proteiini-
seos konjugoitiin kultakolloideihin 10-millimolaarisessa
etikkahappoliuoksessa menetellen niin, että näiden kahden
proteiinien yhteenlasketut massat kävivät yksiin esimerkissä
1 kuvatun proteiinin ja kullan välisen suhteen kanssa.
20 Superaggregoitujen saostuneiden konjugaattien annettiin
sedimentoitua passiivisesti, jonka jälkeen ne käsiteltiin
ultraäänellä ja reaktion jatkuminen estettiin nautan
seerumin albumiinilla, ja suoritus, jonka kaikkiin
vaiheisiin kului aikaa noin yksi tunti, lopetettiin steriilisuodattamalla.
25

Kuvio 5 osoittaa, millaiset mahdollisuudet tulokseksi
saatu hybridikonjugaatti antaa havaitsemiselle. Konjugaatista
tehtyjä laimennoksia lisättiin suoraan täpliksi nitroselluloosalle
siton, että ne jakautuivat tasaisesti ympyröiden sisään,
30 joiden halkaisija oli 3,5 mm. Kultavärjäytymät mitattiin
reflektometrin avulla. Tämän jälkeen nitroselluloosa siirrettiin
alkalisen fosfataasin substraattiliuokseen, joka sisälsi
bromikloori-indolyylifosfaattia (BCIP). Varovasti ravistellen
suoritetun 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen saostui
35 nitroselluloosalle tumma purppuranvärinen tuote, joka oli
peräisin ALP:n

vaikutuksesta BCIP:hen. Kuvasta 5 käy ilmi, että tätä vaihtoehtoista entsyymiaktiivisuutta hyväksi käyttämällä saatiin vielä kymmenkertainen herkkyyden lisääntyminen kultavärjäytymään verrattuna.

5 Kuviossa 6 on esitetty nitroselluloosalle täpliksi lisätyn hiiren monoklonaalisen IgG:n havaitseminen käyttäen kahta vaihtoehtoista hybridikonjugaattileimaa. Nitroselluloosalle lisättiin täpliksi yhteensä 0,1 - 100 ng vasta-ainetta laimennettuna BSA-liuokseen, jonka pitoisuus
10 oli 100 µg/ml, kahtena rinnakkaisena lisäyksenä. Nitroselluloosa kuivattiin, reaktion eteneminen pysäytettiin BSA:lla ja membraania inkuboitiin konjugaatin kanssa 0,1-%:isessa Tween 20 -liuoksessa 20 minuutin ajan. Toinen bloteista siirrettiin entsyymisubstraatti (BCIP-) -liuokseen ja sitä inkuboitiin edellä kuvatulla tavalla. Kehite-
15 tyistä bloteista käy ilmi, että kultavärjäyksellä oli mahdollista havaita 1 ng vasta-ainetta, kun taas entsyymiä käyttäen havaittiin 0,1 ng. Entsyymivärjäys vaikuttaa lisäävän herkkyyttä yhteensä noin 15-kertaisesti kultavärjykseen verrattuna.
20

Esimerkki 10

Tällä esimerkillä on osoitettu kolloidikultaa ja kahta sellaista erilaista proteiinia sisältävän hybridisuperaggregaatin muodostuminen, joista toinen proteiini on
25 analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimiva toinen osapuoli ja toinen proteiini sellainen, ettei se osallistu reaktioon, sitä ei ole näytteessä eikä se esiinny millään muulla tavalla reagensseissa. Tätä hybridisuperaggregaattia voidaan käyttää määrityksen herkkyyden
30 lisäämiseksi edelleen lisäämällä toista superaggregaattia, joka sisältää kolloidikultaa ja mainitun toisen proteiinin spesifisessä sitoutumisessa toimivaa toista osapuolta.

Nitroselluloosamembraanit päällystettiin monoklonaalisella vasta-aineella S4H9 (1 mg/ml), joka on spesifi-
35 nen D-dimeerille, fibriinin hajoamistuotteelle, ja nitro-

selluloosa sijoitettiin esimerkissä 1 esitetyn kuvauksen mukaiseen testivälineeseen. Niihin lisättiin (50 μ l) valmisteita, jotka sisälsivät D-dimeeriä konsentraatioina 0 - 8 mg/l liuotettuna 0,1-molaariseen Tris-HCl-puskuriliuokseen (pH 7,4), joka sisälsi BSA:ta, jonka pitoisuus oli 50 mg/ml, ja niiden annettiin imeytyä membraanin läpi. Tämän jälkeen immobilisoidun vasta-aineen pidättämät D-dimeerimolekyylit visualisoitiin lisäämällä 50 μ l liuosta, joka sisälsi 4 nm kolloidikullan, S4H9:n ja ihmisen seerumin albumiinin (HSA) muodostamaa superaggregaattia. Tämä superaggregaatti valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla käyttäen S4H9:n ja HSA:n painosuhteena suhdetta 1 : 1. Membraani pestiin ja membraanille jääneen kolloidikullan aiheuttaman signaalin voimakkuus määritettiin reflektometriä käyttäen. Esimerkissä 4 kuvatulla tavalla valmistettiin toinen kolloidikullan ja monoklonaalisen vasta-aineen 2D2 muodostama superaggregoitu kompleksi. Tämä toinen superaggregaatti lisättiin nitroselluloosalle ja aggregaatti immobilisoitui ensimmäisessä superaggregaatissa olevan HSA:n ja toisessa aggregaatissa olevan vasta-aineen 2D2 välisten sidosten vaikutuksesta. Membraani pestiin ja tuloksena oleva signaali mitattiin reflektometrin avulla. Voitiin osoittaa, että toisen vaiheen jälkeen saatu signaali oli neljä kertaa voimakkaampi kuin ensimmäisen vaiheen jälkeen aikaansaatu signaali.

Kuviossa 7 on esitetty annos-vastekäyrät, jotka saatiin käyttäen näytteessä kasvavia määriä D-dimeeriä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä tutkittavassa näytteessä olevan analysoitavan aineen kvalitatiiviseksi tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi, jossa leimalla varustettu reagenssi, joka käsittää sellaiseen aineeseen sitoutuneen kultasoolin, joka kykenee sitomaan spesifisesti mainittua analysoitavaa ainetta tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaa toista osapuolta, saatetaan immobilisoitumaan sitoutuneessa muodossa kiinteään faasiin osoittamaan analysoitavan aineen esiintymistä tai sen määrää näytteessä, t u n n e t t u siitä, että käytetään leimalla varustettua reagenssia, joka käsittää mainitun aineen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen ja kultasoolin muodostaman superaggregoidun kompleksin, jossa ainakin 75 paino-% kultasoolin kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu näyte saatetaan kosketukseen vesipitoisessa määritysmediumissa (i) kiinteään kantajaan immobilisoidun analysoitavan aineen analogin tai mainitun analysoitavan aineen spesifisessä sitoutumisessa toimivan toisen osapuolen ja (ii) leimalla varustetun reagenssin kanssa, joka käsittää patenttivaatimuksessa 1 määritellyn superaggregoidun kompleksin, minkä avulla tietty määrä mainittua leimalla varustettua reagenssia saatetaan immobilisoitumaan kantajaan, jotta se saisi suoraan tai epäsuorasti aikaan värinmuutoksen, joka viittaa analysoitavan aineen esiintymiseen tai osoittaa tämän määrän näytteessä.

3. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ainakin 75 paino-% kultasoolin sisältämistä kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 5 nanometriä.

4. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä suoritetaan kompetitiivinen määrittäminen.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä suoritetaan kerrosmäärittäminen.

6. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiinteä faasi on inertti membraani, joka adsorboi helposti proteiinia ja jossa on huokosia, joiden läpi nesteen on mahdollista kulkeutua.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että superaggregoitu kompleksi on kahden tai useamman proteiinin muodostama hybridikompleksi, johon sisältyy entsyymi, joka kykenee saamaan aikaan luonteenomaisen reaktion, kun tätä vastaava substraatti on saatettu sen vaikutukselle alttiiksi.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että superaggregoitu kompleksi on kahden tai useamman proteiinin muodostama hybridikompleksi ja värin voimistuminen saadaan aikaan lisäämällä yksi tai useampi uusi superaggregoitu kompleksi, joka kykenee sitoutumaan mainittuun ensimmäiseen hybridikompleksiin.

9. Reagenssipakkaus tutkittavassa näytteessä olevan tutkittavan aineen kvalitatiiviseksi tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi, joka käsittää (a) kiinteän faasin, johon leimalla varustettu reagenssi saatetaan immobilisoidumaan osoittamaan analysoitavan aineen esiintymistä tai määrää näytteestä ja (b) leimalla varustetun reagenssin, t u n n e t t u siitä, että leimalla varustettu reagenssi käsittää superaggregoidun kompleksin, joka muodostuu aineesta, joka kykenee spesifisesti sitoutumaan mainittuun analysoitavaan aineeseen tai tämän spesifisessä sitoutumisessa toimivaan toiseen osapuoleen, ja kultasoolista,

jossa ainakin 75 paino-% kultasoolin kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen reagenssipakkaus, t u n n e t t u siitä, että superaggregoitu kompleksiksi lisäksi sisältää entsyymin, joka kykenee saamaan
5 aikaan luonteenomaisen reaktion ja, että reagenssipakkaus lisäksi käsittää mainitun entsyymin substraatin.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen reagenssipakkaus, t u n n e t t u siitä, että kiinteä faasi on membraani, mainitulla membraanilla sijaitsee absorboiva tyyny, mainitun absorboivan tyynyn membraanista poispäin sijaitsevalla puolella sijaitsee nesteelle läpäisemätön liuska ja membraanin absorboitavasta tyynystä poispäin sijaitsevalla puolella sijaitsee nesteelle läpäisemätön
10 liuska, jossa on yksi tai useampia reikiä, ja absorboiva tyyny pystyy aikaansaamaan näytteen tai leimatun reagenssin poikittaisen diffuusion mainitun membraanin läpi, kun näyte asetetaan johonkin mainituista reijistä.

12. Menetelmä proteiinin ja kultasoolin superaggregoidun kompleksin muodostamiseksi, jossa ainakin 75 paino-% kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä, t u n n e t t u siitä, että

(i) sekoitetaan proteiini ja kultasooli keskenään sellaisessa pH-arvossa, että proteiinimolekyylissä on ainakin kaksi positiivisesti varautunutta ryhmää;
25

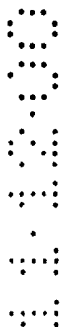
(ii) kerätään näin muodostuneet makroskooppiset aggregaatit talteen;

(iii) suspendoidaan makroskooppiset aggregaatit uudelleen liuokseen, jonka pH on neutraali, käyttäen valinnaisesti ultraäänikäsittelyä, stabiileja superaggregoituja kulta-proteiini-komplekseja sisältävän suspension muodostamiseksi.
30

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH vaiheessa (i) on alueella
35 1 - 5.

14. Proteiinin ja kultasoolin muodostama superaggregoitu kompleksi, tunnettu siitä, että ainakin 75 paino-% kultahiukkasista on keskiläpimitaltaan alle 20 nanometriä ja että se kyetään saamaan aikaan patenttivaatimuksen 12 tai patenttivaatimuksen 13 mukaisella menetelmällä.

5



Patentkrav

1. Förfarande för kvalitativ eller kvantitativ bestämning av en analyt i ett prov som undersöks, där en
5 märkt reagens som omfattar en guldsol bunden till ett ämne som specifikt kan binda nämnda analyt eller till en andra part som medverkar i den specifika bindningen, fås att immobiliseras i bunden form på en fast fas för att ge en indikation om förekomsten eller mängden av analyten i pro-
10 vet, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder en märkt reagens som omfattar ett superaggregerat komplex av nämnda ämne eller dess andra part som medverkar i den specifika bindningen och ett guldsol, där minst 75 vikt-% av guldsolens guldpartiklar har en medeldiameter under 20
15 nanometer.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda prov bringas i kontakt, i ett vattenhaltigt bestämningsmedium, med (i) en analog till analyten eller med en specifik bindningspart för
20 nämnda analyt som är immobiliserad på en fast bärare och (ii) med en märkt reagens, som omfattar det superaggregerade komplexet i patentkrav 1, med vilken en bestämd mängd av nämnda märkta reagens fås att immobiliseras på nämnda bärare, så att den direkt eller indirekt ger upphov till
25 en färgförändring som tyder på en förekomst av eller uppvisar mängden av analyten.

3. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att minst 75 vikt-% av guldsolens guldpartiklar har en medeldiameter under 5
30 nanometer.

4. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att man utför en kompetitiv bestämning.

5. Förfarande enligt något av patentkrav 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man utför en skiktbestämning.

5 6. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fasta fasen är ett inert membran som lätt adsorberar protein och som innehåller porer som vätska kan tränga i genom.

10 7. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det superaggregerade komplexet är ett av två eller flera proteiner format hybridkomplex som innehåller en enzym som får till stånd en karakteristisk reaktion då den utsätts för ett substrat därför.

15 8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det superaggregerade komplexet är ett av två eller flera proteiner format hybridkomplex, och en färgförstärkning uppnås genom att tillägga ett eller flera nya superaggregerade komplex som är kapabla att binda sig till nämnda första hybridkomplex.

20 9. Reagensförpackning för kvalitativ och kvantitativ bestämning av en analyt i ett prov som undersöks, vilken omfattar (a) en fast fas på vilken en märkt reagens fås att immobiliseras för att ge en indikation om förekomsten eller mängden analyt i provet och (b) en märkt reagens, k ä n n e t e c k n a d därav, att den märkta reagensen omfattar ett superaggregerat komplex av ett ämne som specifikt kan bindas till nämnda analyt eller till dess andra part som medverkar i den specifika bindningen, och av en guldsol där minst 75 vikt-% av guldsolens guldpartiklar har en medeldiameter under 20 nanometer.

30 10. Reagensförpackning enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a d därav, att det superaggregerade komplexet dessutom innehåller en enzym som får till stånd en karakteristisk reaktion, och av att reagensförpackningen dessutom omfattar ett substrat för nämnda enzym.

11. Reagensförpackning enligt patentkrav 9, k ä n -
n e t e c k n a d av att den fasta fasen är en membran,
en absorberande dyna är belägen på nämnda membran, ett för
vätska ogenomträngligt ark är beläget på den sida av den
5 absorberande dynan som är bortåt från nämnda membran och
ett för vätska ogenomträngligt ark med ett eller flera hål
befinner sig på den sida av membranen som är bortåt från
den absorberande dynan, och den absorberande dynan förmår
åstadkomma transversal diffusion av provet eller det märk-
10 ta reagenset genom nämnda membran då det appliceras i ett
av nämnda hål.

12. Förfarande för att preparera ett superaggrege-
ratkomplex av protein och guldsol, där minst 75 vikt-% av
guldsolens guldpartiklar har en medeldiameter under 20
15 nanometer, k ä n n e t e c k n a t därav, att

(i) proteinet och guldsollet blandas vid ett sådant
pH-värde att det i proteinmolekylen förekommer minst två
positivt laddade grupper;

(ii) man samlar ihop de sålunda formade makrosko-
20 piska aggregaten;

(iii) man suspenderar de makroskopiska aggregaten
på nytt i en vätska, vars pH är neutralt, eventuellt med
ultraljudsbehandling, för att forma en suspension som in-
nehåller stabila superaggregerade guld-protein-komplex.

25 13. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att pH-värdet i skedet (i) är mellan
1 och 5.

14. Superaggregerat komplex av ett protein och en
guldsol, k ä n n e t e c k n a t därav, att minst 75
30 vikt-% av guldpartiklarna har en medeldiameter under 20
nanometer, och att det kan erhållas med förfarandet i pa-
tentkrav 12 eller patentkrav 13.



61335

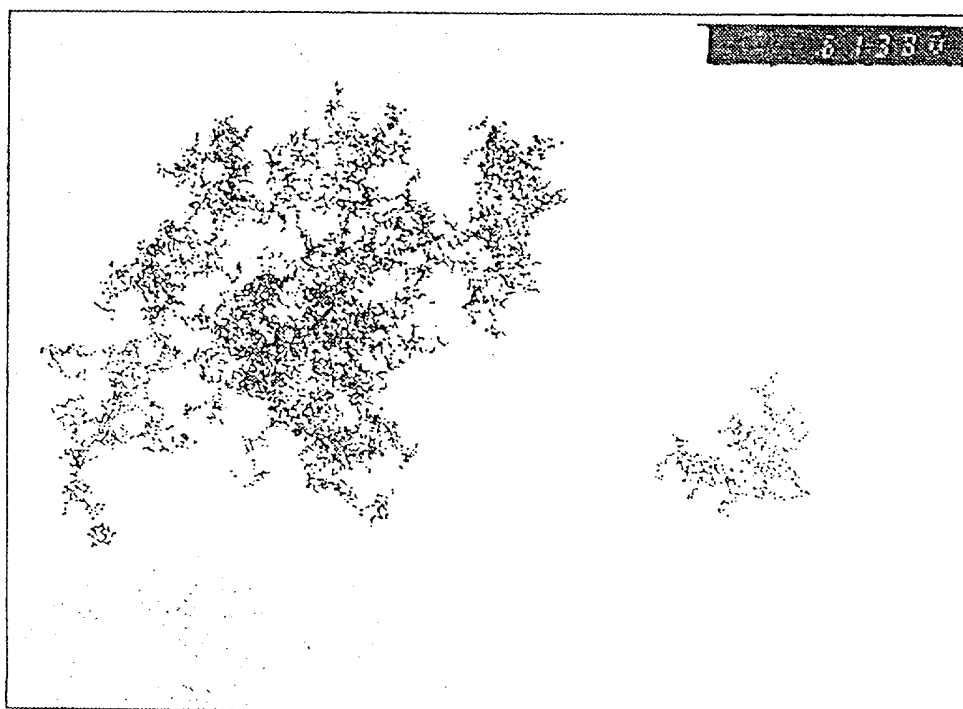
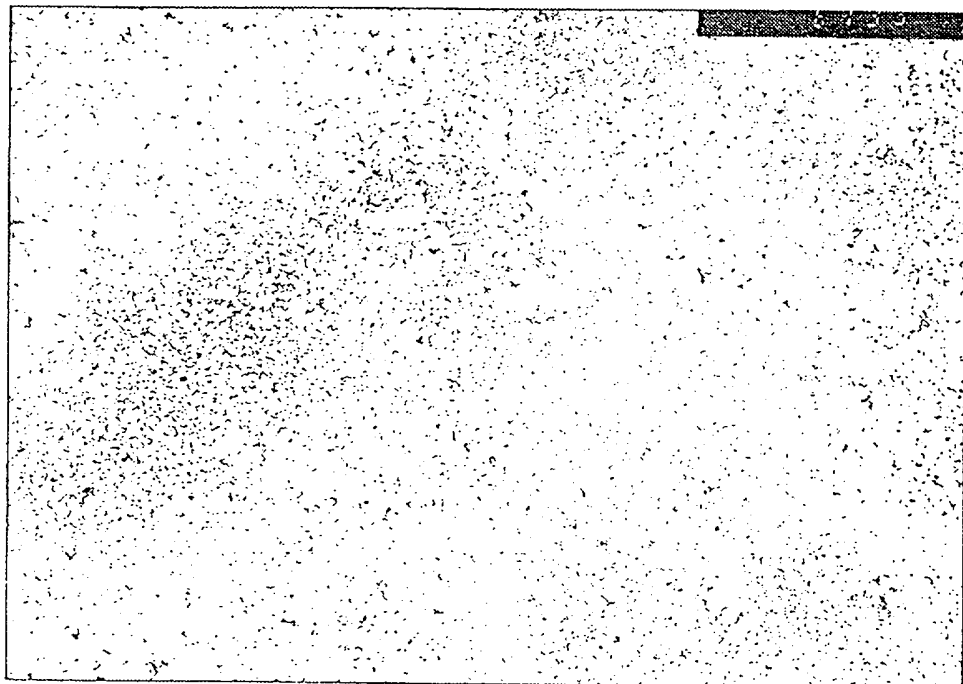


FIG. 2

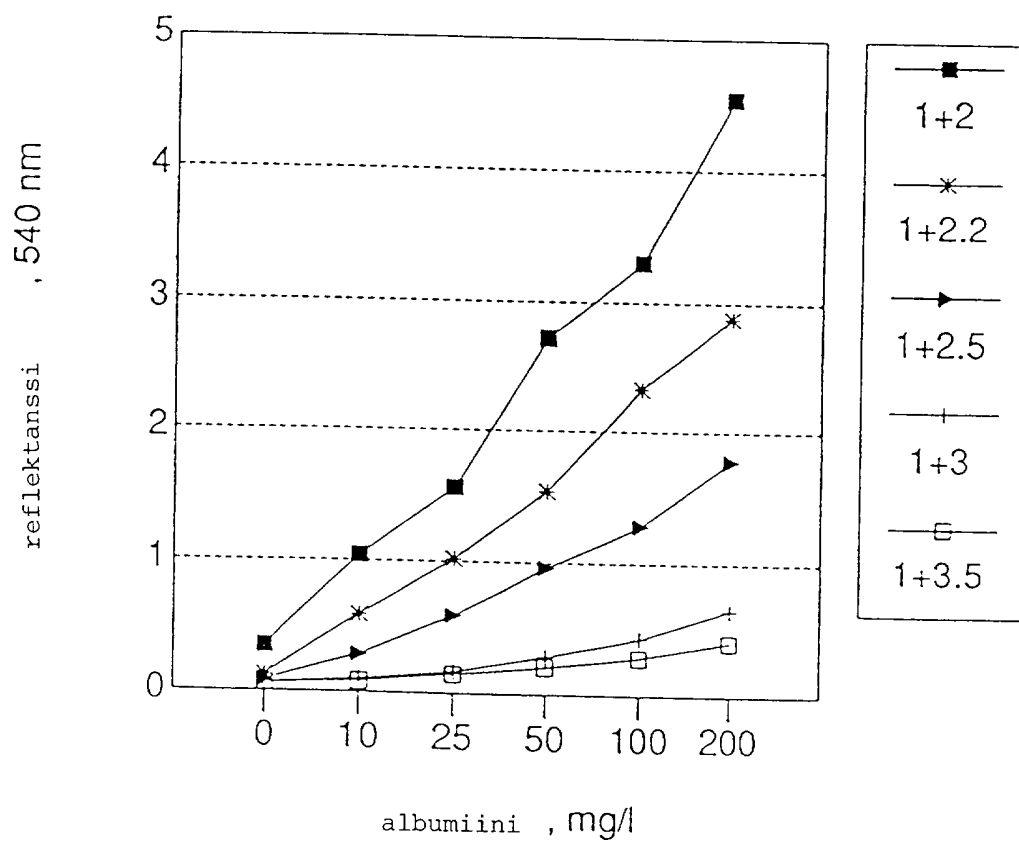


11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
22

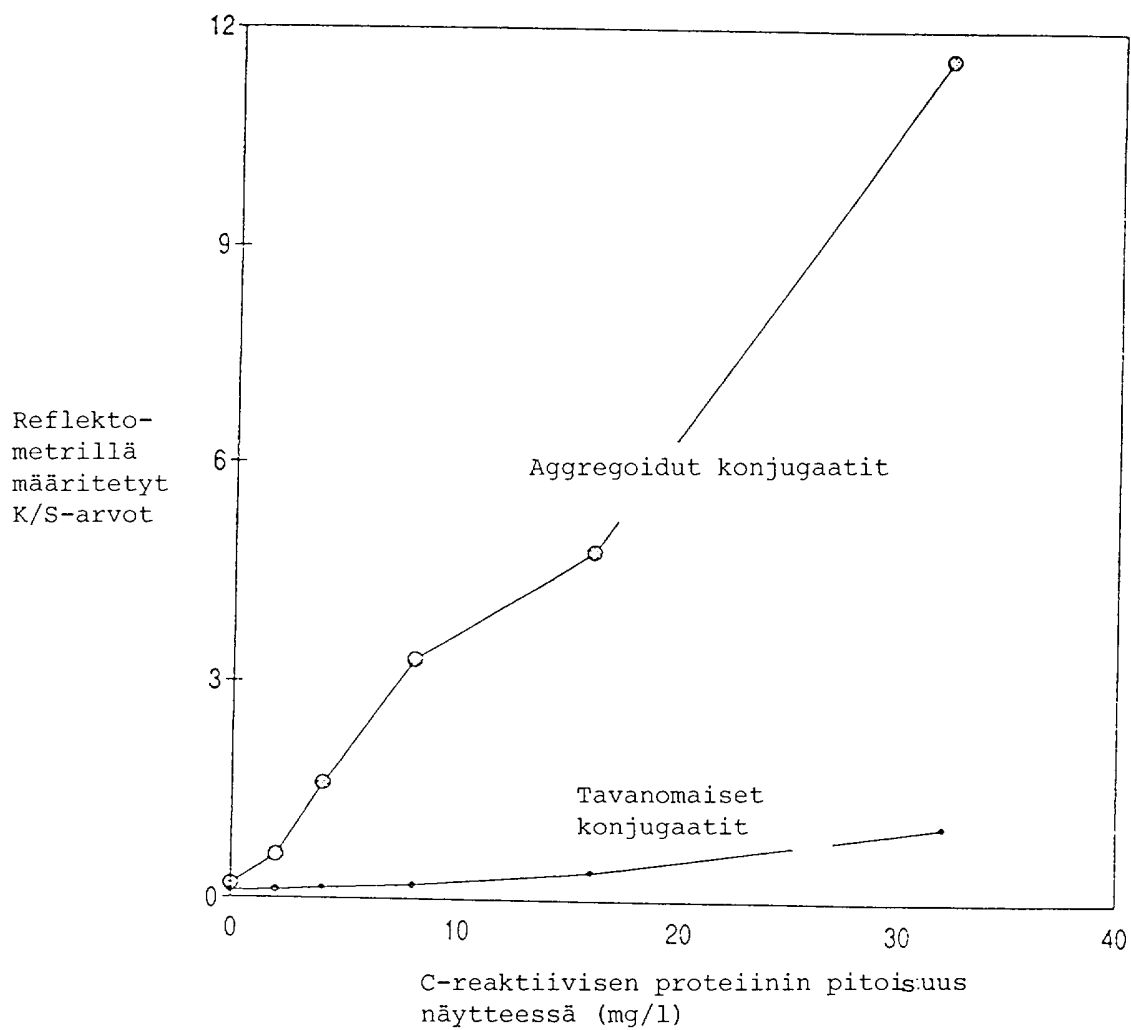
Fig 3

Albumiinitutkimuksen annos-vastekäyrät

Eri konjugaattien vaikutus



Läpivirtauslaitteessa analysoitu C-reaktiivinen proteiini tavanomaisia ja aggregoituja kultakolloideja ja C-reaktiivista proteiinia vastaan valmistettua vasta-ainetta käyttäen



Kaniinin anti-muriini-IgG-alkalinen fosfataasi -kultakonju-
gaatista saatavat havaitsemismahdollisuudet määrittämällä
kultaväri tai käyttämällä hyväksi entsyymin inkubointia
BCIP-substraatin kanssa, mistä muodostuu värillinen saostunut
tuote

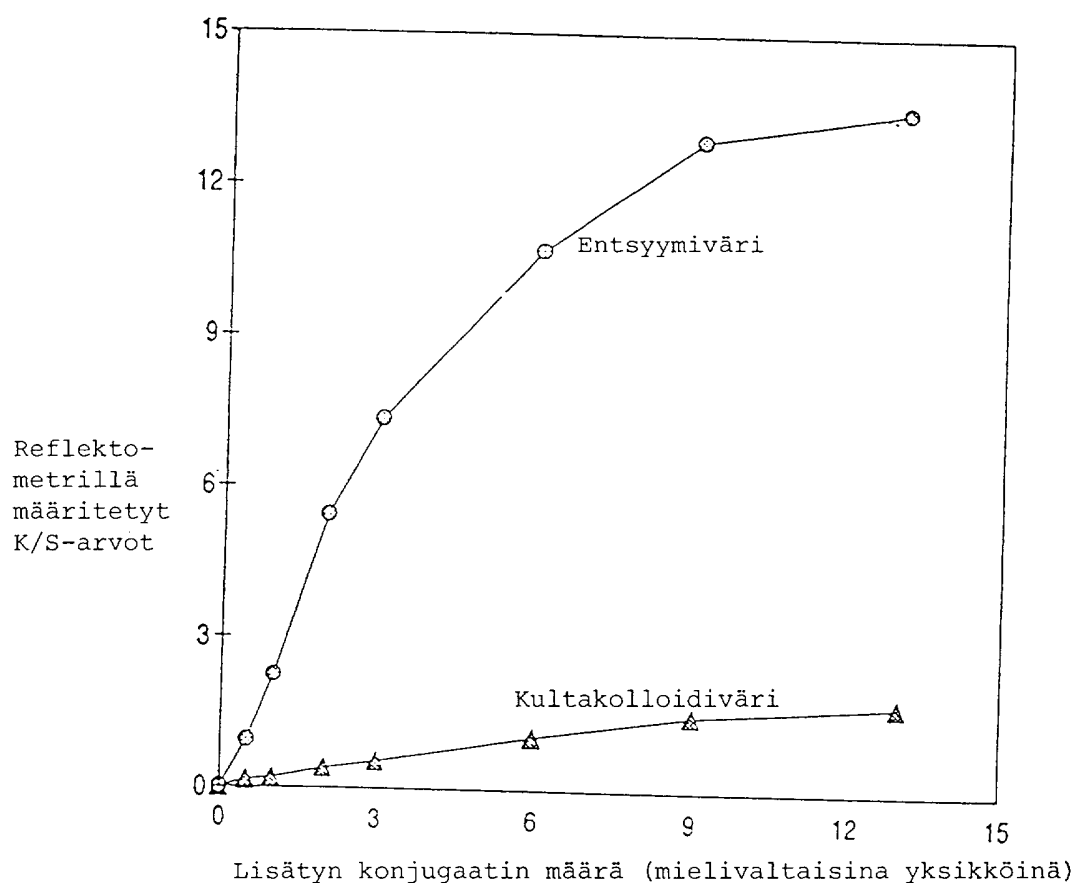
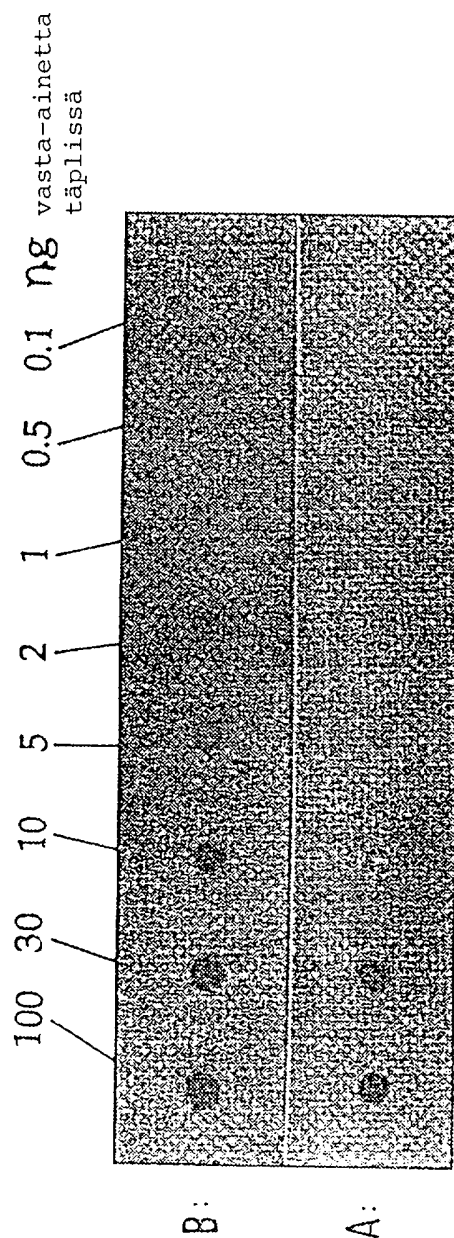


FIG. 6

Nitroselluloosalle täpliksi lisätyn hiiren IgG:n havaitseminen.
Lisätyt täplät sisälsivät 0,1 - 100 ng IgG:tä ja ne havaittiin:

A: Kultavärillä

B: Alkalisen fosfataasin välityksellä muodostuneella värillä



Annos-vastekäyrät, jotka on saatu lisäämällä superaggregoituja kulta-proteiinikomplekseja kahdessa vaiheessa, joissa toinen aggregaatti reagoi sitoutumalla ensimmäiseen aggregaattiin

