



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats	
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5	
G 01N 33/58, 33/544	
(21) Patenttihakemus - Patentansökning	844508
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.11.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.11.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.05.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
25.11.83 GB 8331514	

(71) Hakija - Sökande

1. Janssen Pharmaceutica N.V., Turnhoutsebaan 30, Beerse, Belgium, (BE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Moeremans, Marc Karel Julia Jozef, Donk 90, Mol, Belgium, (BE)
2. Daneels, Guido Franciscus Theophilis, Doolstraat 57, Gierle, Belgium, (BE)
3. De Mey, Jan Raoul, Collegestraat 56, bus J, Turnhout, Belgium, (BE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Visualisointimenetelmä spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi suoraan tai epäsuorasti blot overlay-määrittämissä sekä näissä määrittämissä käyttökelpoinen testipakkaus
Visualiseringsförfarande för direkt eller indirekt detektering av ett agglomerat bildat av ett specifikt bindande ämne och en motsvarande acceptorsubstans vid blot overlay-bestämmningar och i dessa bestämmningar användbar testförpackning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 7654 (G 01 N 33/58)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on visualisointimenetelmä spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen välisen reaktion toteamiseksi suoraan tai epäsuorasti blot overlay-määrittämissä sekä menetelmään liittyvä testipakkaus.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen välisessä reaktiossa muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi ja/tai määrittämiseksi blot overlay-tekniikkaa käyttävien yleismenetelmien avulla, joissa käytetään merkittyjä komponentteja, on tunnusomaista, että merkityt komponentit, jotka on saatu kytkemällä haluttu, mainitusta reaktiosta saatu komponentti kolloidisiin metallihiukkasiin tai kytkemällä mainitulle komponentille spesifinen sitoja-aine kolloidisiin metallihiukkasiin, visualisoidaan värisignaalina, joka sijaitsee reaktiokohdassa blottausväliaineen pinnalla tai määritetään kvantitatiivisesti tässä kohdassa sinänsä tunnetulla spektrofotometrisellä menetelmällä.

Föremål för uppfinningen är ett förfaringssätt för visualisering av en reaktion mellan ett specifikt bindande ämne och motsvarande acceptorsubstans direkt eller indirekt i blot overlay-bestämningar samt en testförpackning, som ansluter sig till förfaringssättet. Förfaringssättet enligt uppfinningen, som genom allmänna förfaranden med tillhjälp av blot overlay-teknik, i vilka används märkta komponenter, upptäcker och/eller bestämmer ett agglomerat, som har uppkommit genom reaktion mellan ett specifikt bindande ämne och motsvarande acceptorsubstans, kännetecknas av att de märkta komponenterna, vilka har erhållits genom att koppla den önskade, från nämnda reaktionen erhållna komponenten med kolloida metallpartiklar eller genom att koppla ett för den nämnda komponenten specifikt bindande ämne med kolloida metallpartiklar, visualiseras som en färgsignal, som befinner sig på reaktionsstället på blotmediets yta eller bestäms kvantitativt på detta ställe medels i och för sig känd spektrofotometrisk metod.

Visualisointimenetelmä spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi suoraan tai epäsuorasti blot overlay-määrityksissä sekä näissä määrityksissä käyttökelpoinen testipakkaus

Käsiteltävänä oleva keksintö koskee menetelmää spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi tai määrittämiseksi blot overlay-tekniikkaa käyttävien yleismenetelmien avulla, joissa käytetään merkittyjä komponentteja. Lisäksi keksintö koskee testipakkausta, jolla todetaan tai määritetään yksi spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen välisessä reaktiossa muodostuvan agglomeraatin komponenteista yleisellä blot overlay-määritysmenetelmällä.

Akseptoriaine on tavallisesti vesipitoisessa testinäytteessä ja määrityksen myöhemmässä vaiheessa se adsorboidaan ja/tai sidotaan kovalenttisesti immobilisoivaan matriisiin. Esimerkkejä immobilisoivista matriiseista ovat nitroselluloosa (NC)-kalvo (ohut, tunnetun huokoisuuden omaava, typpihapolla esteröidystä selluloosasta valmistettu kalvo), diatsobentsyylioksimetyylillä (DBM) ja diatsofenyyliitioetterillä (DPT) modifioitu selluloosapaperi, syaanibromidilla aktivoitu paperi tai selluloosa-asetatti sekä nailonista valmistetut kalvot kuten Gene Screen ja Zetabind. Jälkimmäinen on nailonmatriisi (polyheksametyleeniadipamiini, josta käytetään nimeä nailon 66), joka valmistuksen yhteydessä on modifioitu liittämällä siihen useita tertiäärisiä aminoryhmiä. Mainittuja immobilisoivia matriiseja kutsutaan usein blottausväliaineiksi (ks. esim. J.M. Gershoni ja G.E. Pallade, Analytical Biochemistry 131, 1-15 (1983)).

Blot overlay-määritysmenetelmät jaetaan yleensä kahteen ryhmään:

A. Sandwich overlay-määrityksessä puhdistettu tai konsentroitunut spesifinen sitoja-aine liitetään immobilisoivaan matriisiin jäljempänä esitettävän kohdan B mukaisesti, edullisesti pienenä täplänä, ja akseptoriaineen annetaan sitoutua siihen, jolloin matriisi immobilisoi akseptoriaineen, joka voidaan tämän jälkeen todeta. Spesifisen sitoja-aineen spesifisyyden ansiosta on mahdollista eristää akseptoriaine monimutkaisesta testinäytteestä, esim. virtsasta, plasmasta, seerumista, muista kehon nesteistä, soluttomista siirtosysteemeistä, solu- ja kudoslusateista jne, ja käyttää tätä kykyä hyväksi puolikvantitatiivisissa ja/tai -kvalitatiivisissa (diagnostisissa) määrityksissä eli ns. sandwich blot overlay-määrityksessä (SBOA). Tähän saakka SBOA:n käyttöarvo on ollut olematon, koska tähän saakka on ollut tarjolla vain suhteellisen monimutkaisia toteutamis menetelmiä. Tämän keksinnön toteuttamismuodon ansiosta toteaminen on erittäin yksinkertaista ja näin ollen SBOA:n diagnostinen käyttö saattaa kasvaa.

B. Suorassa blot overlay-määrityksessä akseptoriaine sidotaan suoraan blottausväliaineeseen menettelyn avulla, jota kutsutaan "transferoinniksi" tai "blottaukseksi". Kirjallisuudesta löytyy erilaisia tunnettuja tapoja tämän toteuttamiseksi. Voidaan esim. siirtää pieniä pisaroita, joiden tilavuus on suunnilleen 1 μ l (tilavuus voi olla muukin) ja jotka sisältävät vesipitoisessa liuoksessa tunnetun tai tuntemattoman määrän akseptoriainetta (puhdistettuna tai puhdistamattomana), blottausväliaineeseen. Tällaisia täpläblottauksia voidaan mahdollisesti käyttää diagnostisesti, kun erilaisista kehon nesteistä halutaan todeta immobilisoituun akseptoriaineeseen liittyneiden spesifisten sitoja-aineiden läsnäolo. Jos akseptoriaine muodostaa osan monimutkaisesta seoksesta, seos voidaan akseptoriaineen tunnistamiseksi ensin erottaa komponenteikseen erilaisin kromatografisin tekniikoin, esim.

ohutkerroskromatografialla tai elektroforeesitekniikoilla esim. polyakryyliamidigeeleissä, joista tekniikoista esimerkiksi natriumdodekyylisulfaatti (SDS)-elektroforeesi, isoelektrinen fokusointi, kaksiulotteinen geelielektroforeesi, gradienttigeeli- ja happo-ureageelielektroforeesi ja denaturoimaton geelielektroforeesi. Joissakin tapauksissa esim. nukleiinihapoille, voidaan myös käyttää agar-geelejä. Sitten toisistaan elektroforeettisesti erotetut komponentit (esim. proteiinit, peptidit ja nukleiinihapot) siirretään immobilisoivaan matriisiin menettelyin, jotka tunnetaan kapillaari-, vakuumi- tai elektroosiirtona (eli -blottauksena). Sitten komponentit immobilisoidaan blottausväliaineelle, jolloin niiden alkuperäinen elektroforeettinen kuvio säilyy suurelta osin. Tämä kuvio voidaan kokonaisuudessaan visualisoida tunnetuin värjäystekniikoin esim. amidomustalla ja coomassiesinisellä ja näin tutkittava komponentti (akseptoriaine) voidaan määrittää (ks. alla) ja sen sijainti voidaan paikallistaa kokonaiselektroforeesi kuviossa.

Useimmat tähän saakka käytetyistä sitoja-aineista ovat olleet proteiineja, jotka sitoutuvat tarkoin tunnetuihin kohtiin akseptoriaineessa. Glykoproteiinien toteamiseksi on käytetty lektiinejä. Polyklonaalisia ja monoklonaalisia vasta-aineita on käytetty niitä vastaavien antigeenien tai hapteenien toteamiseksi (esim. biotiini tai biotinyloitu DNA reagoi antibiotiinin kanssa, dinitrofenyloiduissa proteiineissa oleva DNP anti-DNP:n kanssa). Blot overlay-määrittäystä käytetään jo yleisesti vasta-aineiden spesifisyyden testaamiseksi ja monoklonaalisten vasta-aineiden seulontatutkimuksissa. Näiden laajasti käytettyjen systeemien ohella voidaan analysoida monien muiden proteiinien (esim. kalmoduliinia tai aktiinia sitovien proteiinien) välisiä tai proteiinin ja ligandin (esim. avidiinin ja biotiinin) välisiä vuorovaikutuksia, joista komponenteista jokin immobilisoidaan. Näihin kuuluvat DNA-

proteiini- ja RNA-proteiinivuorovaikutukset, reseptori-ligandivuorovaikutukset ja yleensä kaikki riittävän spesifiset ja affiinisiet makromolekyyli-makromolekyyli-vuorovaikutukset.

5 Blot overlay-määrittysten olennainen osa muodostuu menetelmästä immobilisoidun akseptoriaineen visualisoimiseksi. On olemassa suoria ja epäsuoria menettelyjä. Visualisoinnissa käytetään merkkiaineita: radioaktiivisia isotooppeja (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S tai ^{125}I), jonka jälkeen kehi-
10 tetään autoradiografisesti; entsyymejä, jotka pystyvät muodostamaan liukenemattomia, värillisiä tuotteita ja fluorikromeja. Suorissa menettelyissä merkkiaine sidotaan spesifiseen sitoja-aineeseen. Epäsuorassa menettelyssä se sidotaan makromolekyyliin, joka spesifisesti pystyy sitou-
15 tumaan ensimmäiseen spesifiseen sitoja-aineeseen. Jos jälkimmäisenä on vasta-aine, makromolekyylinä voi olla proteiini A tai toinen vasta-aine. Vasta-aineille voidaan myös käyttää monivaihetekniikkoja, esim. avidiinin ja biotinyloidun piparjuuriperoksidaasin muodostamaa kompleksia
20 (ABC) käyttävää menettelyä ja merkitsemättömän peroksidaasin ja anti-peroksidaasin välistä reaktiota (PAP) käyttävää menettelyä.

Käsiteltävänä olevan keksinnön olennaisena kohtana on käyttää blot overlay-tekniikoissa visualisointi- ja/tai
25 toteamiskeinona dispersiota, joka sisältää metallia tai metalliyhdistettä tai metallilla tai metalliyhdisteellä pinnoitettuja ytimiä. Tässä tekstissä käytetyllä sanonnalla "kolloidiset metallihiukkaset" tarkoitetaan hiukkasia sisältäviä dispersioita, valinnaisesti soolia, jotka hiuk-
30 kaset muodostuvat metallista, metalliyhdisteestä tai metallilla tai metalliyhdisteellä pinnoitetuista ytimistä.

Kolloidiset metallihiukkaset voidaan valmistaa tekniikan tason tuntemin menetelmin, esim. menetelmin kolloidisen kullan, hopean tai rautaoksidin ym. valmistamiseksi.
35 Kolloidiset metallihiukkaset voidaan suoraan tai epäsuor-

rasti liittää spesifiseen sitojaproteiiniin tai akseptori-
aineeseen tai makromolekyyliin, joka sitoutuu spesifisesti
ensimmäiseen spesifiseen sitoja-aineeseen, esim. proteiini
A:han, toiseen vasta-aineeseen (kun määritetään ensimmäi-
nen vasta-aine) tai streptavidiniin ja avidiiniin (kun
5 jokin komponenteista on biotinyloitu), jolloin alkuperäi-
nen sitoutumisaktiivisuus säilyy suurimmaksi osaksi. Liit-
täminen suoritetaan tekniikan tason tuntemin menetelmin.
Liittämisellä tarkoitetaan kaikkia kemiallisia tai fysi-
10 kaalisia sitoutumistapoja kuten sitoutumista kovalenttisi-
dosten välityksellä, vetysiltojen välityksellä, poolisen
vetovoiman avulla ja adsorption avulla.

Nyt on havaittu, että kun blottausväliainetta ja
siihen joko epäsuorasti (ks. A) tai suoraan (ks. B) sidot-
15 tua akseptoriainetta inkuboidaan asiamukaisen määrän kans-
sa spesifistä sitoja-ainetta, joka on merkitty kolloidi-
silla metallihiukkasilla, (suora toteamismenetelmä) tai
sitä inkuboidaan ensin merkitsemättömän spesifisen sitoja-
aineen kanssa ja sitten kolloidisilla metallihiukkasilla
20 merkityn makromolekyylin kanssa, joka pystyy spesifisesti
sitoutumaan ensimmäiseen spesifiseen sitoja-aineeseen,
(epäsuora toteamismenetelmä), kolloidiset metallihiukkaset
akkumuloituvat spesifisiin sitoutumiskohtiin ja tulevat
yllättäen näkyviksi värinä, joka on tunnusomainen käyte-
25 tyille kolloidisille metallihiukkasille. Esimerkiksi käy-
tettäessä metallina kultaa saadaan väri, joka on vaalean-
punaisesta tummanpunaiseen, ja hopeaa käytettäessä saadaan
väri, joka on keltaisesta ruskeaan mustaan. Tämä väri on
signaali, joka on kvalitatiivisesti luettavissa paljaalla
30 silmällä tai valinnaisesti mitattavissa tekniikan tason
tuntemin spektrofotometrisin menetelmin, esim. densitomet-
risesti.

Kolloidisten metallihiukkasten hiukkaskoko on mie-
luiten 3-100 nm ja erityisesti 5-50 nm.

35 Esimerkkeinä kolloidisista metallihiukkasieta, jot-
ka voidaan liittää spesifisiin sitoja-aineisiin, on kuvat-

tu metallit platina, kulta, hopea ja kupari ja metalliyhdisteet hopeajodidi, hopeabromidi, kidevesipitoinen kuparioksidi, rautaoksidi, rautahydroksidi tai vesipitoinen rautaoksidi, alumiinihydroksi tai vesipitoinen alumiinioksidi, kromihydroksidi tai vesipitoinen kromioksidi, vana-
5 diinioksidi, arseenisulfidi, mangaanihydroksidi, lyijysulfidi, elohopeasulfidi, bariumsulfaatti ja titaanidioksidi. Tunnetusti voidaan myös käyttää kolloideja, jotka sisältävät ytimiä, jotka on pinnoitettu yllä mainituilla metalleilla tai metalliyhdisteillä. Nämä hiukkaset vastaavat ominaisuuksiltaan metalli- tai metalliyhdistekolloideja, mutta niiden koko, tiheys ja metallipitoisuus voidaan yhdistää optimaalisella tavalla. Yleensä voidaan käyttää
10 kaikkia kolloidisia metallihiukkasia tai metalliyhdisteitä, jotka voidaan liittää spesifisiin sitoja-aineisiin näiden sitomisaktiivisuutta vahingoittamatta ja jotka blot overlay-määrityksissä muodostavat paljaalla silmällä havaittavan väri-intensiteetin. Herkkyys on edullisesti yhtä hyvä tai parempi kuin kullalla ja hopealla saavutettava
20 herkkyys.

Menettelyt, joissa käytetään kolloidisia metallihiukkasia ja erityisesti kultasoolihiukkasia, jotka pysyvät pinnoittamaan spesifisiä sitoja-aineita kuten vasta-
25 aineita, lektiinejä, proteiini A:ta, avidiinia ja monia muita tai jopa akseptoriproteiineja kuten antigeenejä, ovat nykyään vakiinnuttaneet paikkansa monissa sytokemiallisissa merkitsemistekniikoissa läpivalaisu- ja pyyhkäisy-elektronimikroskopiassa. Esimerkki kolloidisen metallihiukkasen käytöstä, joka on metallilla pinnoitetun polymerin muodossa, on raudalla pinnoitettu dekstraani, joka
30 liittyneenä vasta-aineisiin on erittäin käyttökelpoinen merkkiaine läpivalaisuelektronimikroskopiassa. Tällaisessa käytössä käytetään kuitenkin hyväksi tämän tyyppisille merkkiaineille tyypillistä elektroniläpäisemättömyyttä
35 (läpivalaisuelektronimikroskopia) tai niiden kykyä emitoida sekundäärielektroneja tai takaeroittuvia primääri-

elektroneja (pyyhkäisyelektronimikroskopia).

Kolloidisia metallihiukkasia, erityisesti kullasta ja hopeasta valmistettuja, on myös käytetty merkkiaineina valomikroskooppisissa sytokemiallisissa merkintätekniikoissa, kun oli osoitettu, että tällaisten kolloidisten metallihiukkasten akkumuloituminen sitoutumiskohtiin objektilasilla olevassa kudოსvalmistuksessa tai solun pintaan voitiin havaita valomikroskoopilla.

Kolloidisia metallihiukkasia käytetään myös joissakin kvalitatiivisissa ja kvantitatiivisissa määrityksissä, joissa määritetään in vitro immunologisia komponentteja kuten hapteneja, antigeenejä ja vasta-aineita vesiväliaineessa. Näitä tekniikkoja on kutsuttu soolihiuksasimmunomäärityksiksi ja passiiviseksi kulta-agglutinaatioksi (Geoghegan).

Passiivisessa kulta-agglutinaatiotekniikassa agglutinoidaan kullalla merkitty antigeeni (kultahiukkaset 18-20 nm) merkitsemättömällä vasta-aineella. Käytetään standardimikrotitterilaitteistoa, jossa aggregoitumaton kulta valuu syvennysten seinämää pitkin alaspäin muodostaen punaisen raidan. Tämä tekniikka on analoginen klassilliselle passiiviselle hemagglutinaatiolle ja on yhtä herkkä kuin tämä. On väitetty tällä tekniikalla pystyttävän käänteisagglutinaatioon, jolloin vasta-aine merkitään kullalla.

Soolihiuksasimmunomääritykset jakaantuvat kahdeksi ryhmäksi. Ensimmäinen on ns. homogeeninen soolihiuksasimmunomääritys, jossa kolloidisilla hiukkasilla merkitty vasta-aine agglutinoidaan immunokemiallisesti kaksi- tai moniarvoisilla antigeeneillä tai hapteneilla, jotka on sidottu kantajaproteiiniin. Agglutinaatiosta johtuva värin heikkeneminen mitataan kolorimetrisesti käyttäen puskuria nollanäytteenä. Näytteestä peräisin olevat vapaat hapteenimolekyylit voivat sitten estää kolloidisten metallihiukkasten agglutinoitumisen. Tällaisia menetelmiä on kuvattu EP-patenttijulkaisussa nro 0 007 654.

Soolihiuksasimmunomäärityksen toinen tyyppi perus-

tuu vapaiden/sitoutuneiden kolloidisten metallihiukkasten muodostaman konjugaatin erotusmeentelmiin, jotka ovat analogisia radioimmunomääritykselle ja entsyymi-immunomääritykselle. Tällaisia menetelmiä on kuvattu EP-patenttijulkaisussa nro 0 007 654. Yhtä tällaista menetelmää kutsutaan sandwichsoolihiukkasimmunomääritykseksi (SSPIA) ja se on analoginen sandwich-ELISA eli kiintofaasisandwich-radioimmunomääritykselle. SSPIA:ssa toimitaan tyypillisesti siten, että määritettävän antigeenin vasta-aine adsorboidaan ensin esim. polystyreeniä olevan mikrotitrauslevyn pinnalle. Näyte (antigeenistandardi tai nollanäyte), joka on liuotettu asianmukaiseen puskuriin, pipetoidaan vasta-aineella peitettyihin syvennyksiin ja inkuboidaan asianmukaisella tavalla. Lisätään kullalla merkittyä vasta-ainetta ja reaktioseoksen inkubointia jatketaan. Syvennykset imetään ja pestään sitoutumattoman konjugaatin poistamiseksi. Lopuksi sidottu immuunikompleksi ja homogenoidut kolloidiset metallihiukkaset irroitetaan toisistaan. Joko tarkastellaan saadun dispersion väri-intensiteettiä visuaalisesti tai mitataan metallin konsentraatio kolorimetrisesti. Visuaalista (esim. dispergoidun kullan värin) tarkastelua voidaan käyttää vain suurilla antigenikonsentraatioilla.

On huomattava, että soolihiukkasmäärityksiä on myös kuvattu käyttökelpoisiksi ei-immunologisiksi määrityksiksi ja yleensä, "kun todetaan ja/tai määritetään yksi tai useampi komponentti spesifisen sitojaproteiinin ja vastaavan sitoutuvan aineen välisessä reaktiossa vesipitoisessa testinäytteestä siten, että käytetään hyväksi tällaisten komponenttien tunnettua molemminpuolista sitomisaffiniteettiä, jolloin käytetään yhtä tai useampaa merkittyä komponenttia, jotka saadaan kytkemällä mainitun reaktion haluttu komponentti suoraan tai epäsuorasti veteen dispergoituihin hiukkasiin, jotka ovat metallista, metalliyhdisteestä tai metallilla tai metalliyhdisteellä pinnoitettuja polymeeriytimistä muodostuvia hiukkasia, joiden hiuk-

kaskoko on vähintään 5 nm, jolloin reaktion aikana tai asianmukaisen reaktioajan jälkeen ja valinnaisesti sitoutuneiden ja vapaiden merkittyjen komponenttien toisistaan erottamisen jälkeen määritetään tekniikan tason tuntemin
5 menetelmin testinäytteestä tai yhdestä siitä saadusta fraktioista metallin ja/tai muodostuneen metallipitoisen agglomeraatin fysikaaliset ominaisuudet ja/tai määrä, joka määrittäminen ilmaisee kvalitatiivisesti ja/tai kvantitatiivisesti todettavan ja/tai määritettävän komponentin tai komponentit".
10

Käsiteltävänä olevassa keksinnössä käytetään kolloidista metallihiukkasia merkkiaineina blot overlay-määrittämissä, mikä käyttö on täysin uutta ja minkä toteuttaminen on yllättäen mahdollista.

15 Kolloidisiin metallihiukkasiin katsotaan kuuluvan metallista, metalliyhdisteestä tai metallilla tai metalliyhdisteellä pinnoitetuista ytimistä muodostuva dispersio.

Kolloidisten metallihiukkasten käyttö merkkiaineina
20 on sovellettavissa kaikkiin blot overlay-määrittämuotoihin ja niiden käytön etuna on, että blottausväliaineen pinnan sitoutumiskohtiin akkumuloituvat kolloidiset metallihiukaset voidaan nähdä pelkällä silmällä herkkyydellä, joka on vähintään yhtä hyvä kuin nykyisten tekniikkojen esim. entsyymeihin perustuvien blot overlay-määrittästen erittäin
25 suuri herkkyys. On erityisesti tähdennettävä, että keksintö olisi arvoton ilman tätä viimeistä näkökohtaa. Keksinnön tärkeänä etuna on, että tulos on luettavissa ilman toista entsyymaattista reaktiota, autoradiografiaa tai
30 fluoresoivien värien havaitsemissysteemiä, ja että sitoutuneita kolloidisia metallihiukkasia ei tarvitse irroittaa seuraavaa määrittäystä varten paljaalla silmällä (pieni herkkyys), kolorimetrisesti tai CRAAS:llä (suurempi herkkyys) kuten sandwichsoolihiukkassimmunomäärittäyksissä. Keksinnön suurimpana etuna on sen yksinkertaisuus, koska väri
35 kehittyy reaktion aikana. Tämä mahdollistaa reaktion kes-

keyttämisen halutun signaalin muodostumisen jälkeen tai systeemin kalibroinnin ennalta määritellyn tuloksen saavuttamiseksi vakioaika-rajoiissa.

5 Kullalla merkittyjen vasta-aineiden käyttö on paljon yksinkertaisempi ja yhtä herkkä menettely kuin tunnetusti hyvin herkkä immunoperoksidaasimenetelmä. Tämä yksinkertainen määrittäminen voidaan suorittaa testipakkauksella, jolla voidaan epäsuorasti todeta spesifisten sitoja-aineiden läsnäolo, jotka sitoutuvat blottausväliaineeseen si-
10 dottuun akseptoriaineeseen, ja ensimmäisen spesifisen sitoja-aineen kolloidisilla metallihiukkasilla merkityn spesifisen sitoja-aineen läsnäolo. Jos spesifisenä sitoja-aineena on vasta-aine, tänä toisena sitoja-aineena voi olla kolloidisilla metallihiukkasilla merkitty toinen vas-
15 ta-aine tai proteiini A. Toteaminen voi tapahtua hyvin yksinkertaisena kastoliuskatestinä, esim. täpläblot overlay-immunomäärityksenä, jolla voidaan nopeasti seuloa valitun antigeenin vasta-aineiden läsnäolo vesipitoisesta testinäytteestä kuten seerumista.

20 Keksinnön mukaiselle menetelmälle spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi tai määrittämiseksi blot overlay-tekniikkaa käyttävien yleismenetelmien avulla, joissa käytetään merkittyjä komponentteja, on tunnusomaista, että merkityt komponentit, jotka on saatu kytkemällä
25 kolloidisiin metallihiukkasiin agglomeraatin haluttu komponentti, joka agglomeraatti on muodostunut spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta, tai kytkemällä kolloidisella metallilla merkittyyn sitoja-aineeseen agglomeraatin haluttu komponentti, joka agglomeraatti
30 on muodostunut spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta, visualisoidaan värisignaalinä, joka sijaitsee spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen välisen reaktion reaktiokohdassa blottausväliaineen
35 pinnalla, tai määritetään kvantitatiivisesti tässä kohdas-

sa sinänsä tunnetuilla spektrofotomertrisillä menetelmillä.

Menetelmä muodostuu seuraavista vaiheista:

5 I. Akseptoriaaine immobilisoidaan immobilisoivaan matriisiin, jota myös kutsutaan blottausväliaineeksi.

10 I.I Joko adsorboidaan suoraan ja/tai sidotaan kovalenttisesti menettelyn avulla, jonka yleisnimi on blottaus, mahdollisesti sen jälkeen kun on erotettu elektroforeettisesti ja siirretty tai blotattu elektroforeesiväliaineesta blottausväliaineeseen, ja tekemällä sitten jäljellä olevat proteiinin sitoutumiskohdat tehottomiksi tekniikan tason tuntemin menettelyin esimerkiksi BSA:n, gelatiinin, PEG:n tai Tween 20:n avulla,

15 I.II tai annetaan akseptoriaaineen sitoutua spesifiseen sitoja-aineeseen, joka on immobilisoitu blottausväliaineeseen, saattamalla mainittu blottausväline kosketukseen akseptoriainetta sisältävän vesiliuoksen kanssa.

II. Saatetaan kohdan I) blottausväliaine ennen pesua ja ilmakuivausta määrääjäksi kosketukseen:

20 II.I joko kolloidisilla metallihiukkasilla merkittyjen spesifisten sitoja-aineiden kanssa, jotka konsetraatioiltaan ovat sopivia,

25 II.II tai ensin merkitsemättömän spesifisen sitoja-aineen kanssa, jonka konsentraatio on sopiva, ja sitten kolloidisella metallilla merkityn proteiinin kanssa, joka on spesifinen merkitsemättömän spesifisen sitoja-aineen suhteen.

30 III. Luetaan muodostunut värisignaali, joka on tunnusomainen blottausväliaineen pinnalle sidotuille kolloidisille metallihiukkasille, paljaalla silmällä tai tekniikan tason tuntemin spektrofotometrisin menetelmin, esim. densitometrisesti.

35 Tämä keksintö koskee myös testipakkauksia, joilla määritetään suoraan tai epäsuorasti yksi komponenteista, joka syntyy spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan aksep-

toriaineen reaktiossa, blot overlay-määrityksessä. Näille testipakkauksille on tunnusomaista, että

5 a) kolloidisilla metallihiukkasilla merkittyjä komponentteja, jotka aiheuttavat värisignaalin mainitun spesifisen sitoja-aineen ja mainitun akseptoriaineen välisen reaktion reaktiokohdalla, immobilisoivan matriisin pinnalla;

b) fysikaalisen kehitteen komponentteja ja

c) muita reagensseja.

10 Kolloidisilla metallihiukkasilla merkityt komponentit on saatu kytkemällä yllä kuvatusta reaktiosta saatu komponentti tai komponentti, jolla tämä reaktio voidaan todeta epäsuorasti, yllä määriteltäisiin kolloidisiin metallihiukkasiin. Jos reaktio on immunologista tyyppiä,
15 testipakkausta voidaan käyttää sandwich blot overlay-määrityksissä (ks. esimerkki III) ja vasta-aineiden läsnäolon toteamiseksi seerumista valikoitujen antigeenien avulla (ks. esimerkki I).

20 Käsiteltävänä olevan keksinnön eräänä piirteenä on se seikka, että blot overlay-määrityksessä voidaan blottausväliaineen pintaan sidotut kolloidiset metallihiukkaset todeta visualisoimalla ne epäsuorasti ja/tai parantaa toteamista käyttämällä fysikaalista kehitettä, joka voidaan pelkistää vastaaviksi metalleiksi. Sopivia fysikaalisia kehitteitä ovat esim. hopealaktaatti, hopeanitraatti
25 ja vastaavat. Kun fysikaalisena kehitteenä käytetään esim. hopeaa, reaktio tapahtuu aluksi metallihiukkasten pinnalla, jotka katalysoivat pelkistymisen, ja tämän jälkeen nämä ympyhiukkaset autokatalysoivat reaktion. Tällä tavoin muodostuu musta, erittäin kontrastoiva signaali, joka
30 johtuu akkumuloituneesta hopeametallista. Tämä merkitsee herkkyyden huomattavaa paranemista. Olemme myös havainneet, että valolle epäherkän hopeasaostuman saamiseksi on blotit kiinnitettävä mikrovalokuvauksessa käytettävällä
35 kiinnitteellä.

Fysikaalisia kehitteitä on jo useita vuosia käytetty veteen liukenemattomien metallien, erityisesti metallisulfidien visualisoimiseksi kudoksissa (ks. Danscher, Histochemistry 71, 1-16, 1981). Metallisulfidit ja metallinen hopea katalysoivat hopeaionien pelkistymistä. Kudoksessa oleva kolloidinen metallinen kulta voidaan myös osoittaa fysikaalisella kehitteellä, jota havaintoa Holgate et al. (J. Histochem. Cytochem. 31, 938-944 (1983)) ovat käyttäneet hyväksi esittämässään immunokulta/hopea-värjäysmenetelmässään, jonka herkkyys on paljon parempi kuin alkuperäisessä immunokultavärjäysmenetelmässä.

Tämän keksinnön lisätunnusmerkin tärkeimpänä etuna on sen suunnaton herkkyys, joka on suurempi kuin missään nykyisessä blot overlay-määrityksessä. Se on käyttökelpoinen, kun käyttäjä haluaa tehdä reagenssien käytön taloudellisemmaksi tai kun käytettävissä on äärimmäisen pieniä määriä akseptoriainetta ja/tai spesifistä sitoja-ainetta.

Käsiteltävänä olevan keksinnön toisena lisätunnusmerkkinä on valokuvauksessa käytettävän kiinnitteen käyttö, joka vähentää taustahäiriötä ja parantaa fysikaalisella kehitteellä saadun reaktiotuotteen pysyvyyttä.

Seuraavat esimerkit valaisevat käsiteltävänä olevan keksinnön piiriä.

Esimerkki I

Yksinkertainen täplä-blot overlay-immunomääritys koiran aivoista saadun tubuliinin ja kalmoduliinin vasta-aineiden osoittamiseksi epäsuorasti kullalla merkityillä sekundäärisillä vasta-aineilla immunisoitujen kaniinien seerumista.

I.1 Antiseerumien valmistus

1.1 Antiseerumien kehittäminen

Sekoitettiin 1 mg koiran aivoista saatua tubuliinia (uutettu SDS-polyakryyliamidigeeleistä) 1,0 ml:ssa puskuria (0,1-m PIPES, pH 6,9) tai 1 mg elektroforeettisesti puhdasta, koiran aivoista saatua kalmoduliinia (vedessä)

ja 1,0 ml Freundin täydellistä apuainetta (Difco). Homogenoinnin jälkeen antigeeni ruiskutettiin intradermaalisti viiteen kohtaan valkoisen kaniinin selkärankaa. Neljän viikon välein annettiin tehosteruiskeita. Antigeeni valmistettiin muuten samalla tavoin, mutta käytettiin Freundin epätäydellistä apuainetta. Viikko jokaisen tehosteruiskeen jälkeen kaniineista otettiin verta (n. 60 ml) ja valmistettiin seerumi, jota varastoitiin ennen käyttöä pienempinä erinä -20°C :ssa.

10 1.2 Kolloidisella kullalla merkityt sekundääriset vasta-aineet

Näiden toimittajana oli Janssen Life Sciences Products, 2340, Beerse, Belgia, koodi GAR G20. Nämä vasta-aineet ovat vuohesta saatuja kaniini-IgG:n affiniteettipuhdistettuja vasta-aineita, jotka on merkitty 20 nm:n kolloidisilla kultahiukkasilla.

Antigeeniä sisältävien täplien muodostaminen nitroselluloosaliuskoihin

20 Kymmenen 1 μl tippaa puhtaan tubuliinin nelinkertaisia sarjalaimennuksia (lähtien määrästä 250 ng/ μl) 0,1 moolisessa PIPES:issä, 1 millimoolisessa EGTA:ssa ja 1 millimoolisessa MgCl_2 :ssa, pH 6,75, tai puhdasta kalmoduliinia vedessä, siirrettiin täplärivinä kuiville nitroselluloosaliuskoille (6 cm x 0,6 cm). Täplien kuivuttua (noin 25 viiden minuutin kuluttua) liuskoilla olevien proteiinitäplien jäljellä olevat sitoutumiskohdat tehtiin tehottomiksi inkuboimalla niitä liuoksen kera, jossa oli 5 % naudanseerumialbumiinia (BSA) 20 millimoolisessa tris-puskuroidussa keittosuolaliuoksessa, pH 8,2, 30 minuuttia 37°C :ssa.

30 1.3 Testiprotokolla tubuliini- ja kalmoduliinivasta-aineiden toteamiseksi. Kullalla merkittyjen vasta-aineiden käytön ja ABC-peroksidaasitoteamismenetelmän vertailu

35 Jollei muuta mainita, menettelyn ainoana puskurina oli 0,1 % BSA-tris (0,1 % BSA 20 millimoolisessa tris-HCl:ssä, 0,9 % NaCl, pH 8,2, 20 mmol NaN_3).

a. Inkubointi primäärisen antiseerumin kera

Kaksi liuskaa inkuboitiin kaksi tuntia huoneen lämpötilassa 5 ml:n tulpitetuissa muoviputkissa 1 ml:n kera kaniinin antitubuliiniseerumia, 1:1000 laimennos 0,1 %:isessa BSA-trispuksurissa.

Kaksi liuskaa inkuboitiin kuten yllä sama antiseerumi absorboituna tubuliiniin, joka oli kovalenttisesti sidottu Sepharose-4B:hen. Liuskat toimivat antigeenispesifisyyskontrollina.

Kaksi liuskaa inkuboitiin kuten yllä kaksi tuntia huoneen lämpötilassa 1 ml:n kera kaniinin antikalmoduleiniseerumia, 1:1000-laimennos 0,1 %:isessa BSA-trispuksurissa.

Kaksi liuskaa inkuboitiin kuten yllä sama antiseerumi absorboituna kalmoduliiniin, joka oli kovalenttisesti sidottu Sepharose-4B:hen.

Absorboituneiden ja absorboitumattomien primääristen antiseerumien inkuboinnin päätyttyä liuskoja pestiin 3 x 10 minuuttia 0,1 %:isessa BSA-trispuksurissa. Toinen liuska kustakin parista inkuboitiin edelleen GAR G20:n kera (ks. 1.3.b).

Toinen liuska inkuboitiin käyttäen hyvin herkkää Vectastain ABC-immunoperoksidaasipakkausta, valmistaja Vector Laboratories, valmistajan ohjeiden mukaan (ks. 1.3.c).

b. Inkubointi kullalla merkityn sekundaarisen vasta-aineen kera: GAR G20

Pestyjä liuskoja (ks. 1.3.a) inkuboitiin kaksi tuntia GAR G20:n kera laimennettuna absorbanssiarvoon 1 cm/520 nm = 0,21 0,1 %:isessa BSA-trispuksurissa + 0,4 %:isessa gelatiinissa. Inkuboinnin päätyttyä liuskat pestiin 0,1 %:isessa BSA-trispuksurissa 2 x 10 minuuttia ja kuivattiin ilmassa.

c. Inkubointi Vectastain-pakkauksen avulla

Pestyjä liuskoja (ks. 1.3.a) inkuboitiin tunti sekundäärisen biotinyloidun vasta-aineliuoksen kera (1:200

0,1 %:ista BASA-trispuiskuria 3 x 10 minuuttia ja inkuboi-
tiin sitten tunti avidiini-biotinyyliperoksidaasikomplek-
sin kera. Kompleksi valmistettiin valmistajan ohjeiden
mukaan: 100 µl reagenssi A:ta (avidini DH) lisättiin 10
5 ml:aan PBS:ää (Belbecco, ei Mg^{2+} - ja Ca^{2+} -ioneja). Lisät-
tiin jatkuvasti sekoittaen 100 µl reagenssi B:ta (biotiny-
loitu piparjuuriperoksidaasi). Kompleksi käytettiin viiden
minuutin kuluttua. Liuskat pestiin 0,1 %:isessa BSA-tris-
puiskurissa (2 x 10 minuuttia) ja sitten 100 millimoolises-
sa tris-HCl-puiskurissa, pH 7,6. Sitten immobilisoitu per-
oksidaasi visualisoitiin 4-kloori-l-naftoli substraattina:
10 20 mg 4-kloori-1-naftolia liuotettiin 1 ml:aan etanolia
ja laimennettiin edelleen 20 ml:lla 100 millimoolista
tris-HCl-puiskuria, pH 7,6, lämmitettiin n. 50°C:een, li-
sättiin 200 µl 1 %:ista vetyperoksidia ja substraattiliuos
15 lisättiin liuskoihin ruiskulla mikrosuodattimen (0,2 µ,
Millipore) läpi, joka oli kiinnitetty ruiskuun. Reaktion
annettiin jatkua viisi minuuttia ja sitten reaktio keskey-
tettiin pesemällä liuskat vedellä. Liuskat kuvattiin il-
20 massa.

1.4 Arviointi

ABC-menettelyssä sininen väri merkitsee positiivis-
ta tulosta. Käytettäessä kolloidista kultaa positiivinen
tulos näkyy värinä, joka on vaaleanpunaista punertavaan,
25 käytetyn kullan hiukkaskoosta riippuen (suurehkot kulta-
hiukkaset, esim. 40 nm, antavat purppuranpunertavan vä-
rin). Molemmat menetelmät ovat herkkyydeltään täysin ver-
tailukelpoisia eli herkkyys on tubuliinille n. 5 ng/µl ja
kalmoduliinille n. 30 ng/µl käytetyissä olosuhteissa. Ne-
30 gatiivinen reaktio on merkinä spesifisyydestä, kun anti-
seerumit adsorboituvat niitä vastaavan antigeenin kera.

Esimerkki II

Mikrotubulusproteiineihin reagoivien hiiren mono-
klonaalisten vasta-aineiden läsnäolon seulontatutkimus
35 kasvavien hybridoomien viljelysupernatanteista käyttäen

vuohesta saatuja, kullalla merkittyjä hiiren IgG:n vasta-aineita.

2.1. Hiirien immunisointi

Hiiriin (Balb/C) ruiskutettiin homogenoitu seos (ks. esimerkki 1.1), joka muodostui rotan aivojen mikrotubulusproteiineista (100 µg/hiiri), (valmistettu kahden lämpötilasta riippuvan polymerointi-depolymerointisyklin avulla) ja Freundin täydellisestä apuaineesta. Ruiskeet annettiin selkään ihon alle viiteen kohtaan. Annettiin kolme kertaa kahden viikon välein tehosteruiskeita, jotka sisälsivät 100 µg antigeeniä valmistettuna Freundin epätäydellisen apuaineen avulla. Kolme päivää ennen pernasolujen ja myeloomasolulinjan fuusioimista hiirille annettiin tehosteruiskeena laskimoon 50 µg antigeeniä/hiiri 100 µl:ssa PBS-puskuria.

2.2 Pernasolujen ja NS-1 myeloomasolujen fuusioiminen

NS-1- solut fuusioitiin kahden immunisoidun hiiren pernasoluihin tekniikan tason tuntemin menetelmin ja muodostuneita hybridomeja viljeltiin viidellä 96:lla syvennyksellä varustetulla levyllä (Nunc) 37°C:ssa vedellä kylästetyssä ilmakehässä, joka sisälsi 7 % hiilidioksidia. Kun kasvu oli jatkunut noin kaksi viikkoa, syvennyksistä otettiin 100 µl kasvavia hybridomeja sisältävää viljelysupernatanttia, josta testattiin erittyneiden monoklonaalisten vasta-aineiden läsnäolo (ks. 2.4).

2.3 Nitroselluloosapaperiliuskojen valmistus, joihin on elektroblottaamalla muodostettu täplä proteiineja sisältävällä SDS-polyakryyliamidigeelillä

Antigeenin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (kaksi kertaa polymeroituja mikrotubulusproteiineja) suoritettiin Laemmlin mukaan 7,5 %:isella geelillä. Antigeeni, joka oli liuotettu näytepuskuriin ja keitetty siinä, panostettiin yhtenäisenä kerroksena koholla olevan geelin

yläpinnalle, 300 µg geeliä kohti. Kun väririntama oli tun-
keutunut 3 cm erotusgeeliin, elektroforeesi lopetettiin.
Geelistä leikattiin irti pieni vaakasuora liuska värjäystä
varten coomassiesinisellä ja loput geelistä käytettiin
5 elektroblottaukseen nitroselluloosapaperille. Geeliä tasa-
painotettiin 30 minuuttia huoneen lämpötilassa siirtopu-
skurissa (25 mmol tris-192 mmol glysiini/20 t/t-% metanoli,
pH 8,3). Geeli asetettiin nitroselluloosaarkille (esikos-
tutettu puskurissa) välttämällä ilmakuplia ja poistaen sul-
10 keuksiin jääneet ilmakuplat. Tämä yhdistelmä asetettiin
kahden esikostutetun suodatinpaperin ja kahden nailonverk-
kotuen väliin. Näin syntynyt yhdistelmä sopi tiukasti EC-
elektroblottauslaitteen suljettuun elektrodiverkkopiti-
meen. Elektroblotattiin yli yön huoneen lämpötilassa vir-
15 ralla 400 mA. Elektroforeettisen siirron jälkeen nitrosel-
luloosapaperiin jääneet proteiinin sitoutumiskohdat teh-
tiin tehottomiksi inkuboimalla arkkeja liuoksessa, jossa
oli 5 % BSA:ta 20 mmol tris:illä puskuroidussa keittosuo-
laliuoksessa, pH 8,2, 30 minuuttia 37°C:ssa. Sitten nitro-
20 selluloosa-arkki leikattiin 3 mm leveiksi liuskoiksi, jot-
ka olivat yhdensuuntaisia elektroforeesin kulun kanssa.
Näitä liuskoja käytettiin hydridoomasolujen seulomiseksi
supernatanteista.

2.4 Monoklonaalisten vasta-aineiden toteaminen

25 100 µl jokaista hybrididoomaviljelysupernatanttia
otettiin 3,5 cm pitkiin 0,5 ml:n Eppendorf-kärkiin ja lai-
mennettiin suhteessa 1:5 0,4 ml:lla 0,1 %:ista BSA-tris-
puskuria. Kärjet ja liuskat varustettiin koodinumerolla.
Jokaiseen kärkeen liitettiin yksi liuska ja tätä yhdistel-
30 mää inkuboitettiin kaksi tuntia. Liuskat pestiin panoksittain
ylimäärällä 0,1 %:ista BSA-trispuskuria ja inkuboitettiin
myös panoksittain GAM G20:n kera (vuohesta saatu anti-hii-
ri IgG, merkitty 20 nm:n kolloidisilla kultahiukkasilla),
Janssen Life Sciences Products, 2340 Beerse, Belgia. GAM
35 G20 laimennettiin 0,1 %:isella BSA-trispuskurilla + 0,4

%:isella gelatiinilla absorbanssiin 1 cm/520 nm = 0,1 ja annettiin reagoida yli yön. Liuskat pestiin 0,1 %:isella BSA-trispuuskurilla ja vedellä ja kuivattiin ilmassa.

Positiivinen reaktio näkyi selvästi väriltään vaaleanpunaisesta punertavaan vaihtelevina vyöhykkeinä, jotka vastasivat proteiinivyöhykkeitä määrättyllä molekyyli-alueella. Tällä erittäin yksinkertaisella seulontamenettelyllä ei voida vain tunnistaa vasta-ainetta erittäviä hybridioomeja, vaan sillä saadaan myös välittömästi tietoja ko. vasta-aineen spesifisyydestä ja siten menettelystä on suuri apu valittaessa mielenkiintoisia vasta-ainetta erittäviä hybridioomeja.

Esimerkki III

Sandwich immuno-blot overlay-määritysmenetelmä antigeenien toteamiseksi vesipitoisesta testinäytteestä: IgG-antigeenien toteaminen vesipitoisesta testinäytteestä.

3.1 Määrityksen periaate

Pieni pisara (n. 1 µl) puhdistettua tai väkevöityä vasta-ainetta, joka on monospesifinen määritettävälle antigeenille, blotattiin nitroselluloosapaperiliuskalle (tai muulle sopivalle blottausväliaineelle), kuivattiin ja proteiinin vapaat sitoutumiskohdat tehtiin tehottomiksi (ks. esimerkki 1.3). Valinnaisesti nämä vasta-ainetta sisältävät, sitoutumiskohdiltaan tehottomiksi tehdyt liuskat voidaan pestä vedessä, kuivata ilmassa ja varastoida. Sitten tällainen liuska inkuboidaan määrätyn tilavuuden kera antigeeniä sisältävää testiliuosta määrätyn pituisen ajan. Kun sitoutumattomat aineet on pesty pois, liuskojen inkubointia jatketaan asianmukaisesti laimennetun, kolloidisilla metallihiukkasilla (esim. kulta- tai hopeasoolilla) merkityn monospesifisen vasta-aineen kera, joka on samanlainen kuin blottausväliaineelle adsorboitu vasta-aine. Valinnaisesti voidaan käyttää kahta monoklonaalista vasta-ainetta, joista kumpikin tunnistaa erilaisen antigeeniepitopin. Toinen on sidottu blottausväliaineeseen ja toinen

on sidottu kolloidisiin metallihiukkasiin. Vakio-olosuhteissa menetelmällä voidaan todeta antigeeninen ennalta määritetty minimikonsentraatio ja sitä voidaan käyttää kvalitatiivisena diagnostisena testinä edellyttäen, että
5 sillä voidaan tunnetusta testiliuoksesta todeta vaadittava minimikonsentraatio.

3.2 Periaatteen sovellutusesimerkki: kaniinin IgG-antigeenien toteaminen puskuroidusta liuoksesta, joka sisältää kaniinin konsentraatioltaan tunnettua IgG:tä

10 Tämän uuden sanwichtekniikan toimivuuden testaamiseksi suoritettiin seuraava koe:

Kuusi nitroselluloosapaperiliuskaa (6 x 0,6 cm) blotattiin pisaroilla (1 µl), jotka sisälsivät kasvavia määriä (puolilaimennussarja, lähtöarvona 125 ng/µl) vuosta
15 hesta saatuja affiniteettipuhdistettuja kaniinin IgG:n (GAR IgG) vasta-aineita kuten kuvattiin esimerkissä 1.2.

Proteiinin jäljellä olevat sitoutumiskohdat tehtiin tehottomiksi esimerkissä 1.2 kuvatulla tavalla. Yksi liuska (n:o 6) pestiin 20 mmol trispuskuri-keittosuolaliuoksessa,
20 blotattiin kuivana suodatinpaperille, kuivattiin ilmassa ja käytettiin yli yön huoneen lämpötilassa kuivana varastoinnin jälkeen.

Muut viisi liuskaa inkuboitiin tulpitetuissa muoviputkissa 30 minuuttia huoneen lämpötilassa seuraavalla
25 tavalla:

- nro 1: RIGG:n kera, 1 ml, 1/µg/ml
- nro 2: RIGG:n kera, 1 ml, 0,25 µg/ml
- nro 3: RIGG:n kera, 1 ml, 0,063 µg/ml
- nro 4: RIGG:n kera, 1 ml, 0,015 µg/ml
- 30 nro 5: RIGG:n kera, 1 ml, 0 µg/ml

Kaniinin IgG laimennettiin 0,1 %:isella BSA-trispuskurilla. Liuska nro 6 inkuboitiin 0,25 µg/ml kera RIGG:tä.

Liuskat pestiin (2 x 10 minuuttia) 0,1 %:isessä
35 BSA-trispuskurissa.

Kaikkia liuskoja inkuboitiin tasan yksi tunti huoneen lämpötilassa GAR G20:ssä (vuohesta saatuja kaniinin IgG:n vasta-aineita, merkitty kolloidisilla kultahiukkasilla, halkaisija 20 nm), Janssen Life Sciences Products, B-2340 Beerse, Belgia. GAR G20 laimennettiin absorbenssiarvoon $1 \text{ cm}/520 \text{ nm} = 0,2 \text{ O},1 \text{ \%}$:isella BSA-trispuksurilla + $0,4\%$:isella gelatiinilla.

Liuskat pestiin $0,1 \text{ \%}$:isella BSA-trispuksurilla ja sitten vedellä ja kuivattiin ilmassa.

10 3.3 Arviointi

Täplät, joissa oli niinkin vähän kuin 15 ng adsorboitunutta GAR IgG:tä tulivat näkyviin vaaleanpunaisina pilkkuina, kun oli inkuboitu vain 30 minuuttia 1 ml:ssa liuosta, jossa oli 15 ng/ml RIgG:tä, jonka jälkeen inkuboi-
15 tiin tunti 1 ml:n kera GAR G20:tä, $0,0520 \text{ nm} = 0,2$. Liuosten, joissa oli vähintään tämä määrä RIgG:tä, katsottiin reagoivan positiivisesti. Liuskojen nro 6 ja nro 2 tulokset olivat indenttiset. Tämä osoittaa, että liuskat voidaan kuivata tehottomaksi tekemisvaiheen jälkeen ilman
20 vasta-aineaktiivisuuden menettämistä.

Esimerkki IV

Nitroselluloosapaperiin sidotun antigeenin suora toteaminen kolloidisella hopealla merkityllä primäärisellä vasta-aineella: hiiren IgG-antigeenejä sisältävien täplien
25 toteaminen hiiren IgG:n kolloidisella hopealla merkityillä, vuohesta saaduilla vasta-aineilla.

Nitroselluloosapaperisuikaleet (6 cm x 0,6 cm) blo-
tattiin hiiren IgG:tä (1 μl) sisältävillä täplillä, jotka saatiin kaksinkertaisella laimennussarjalla 250-0,4 ng/ μl ,
30 esimerkissä 1.2 kuvatulla tavalla.

Proteiinin jäljellä olevat sitoutumiskohdat tehtiin tehottomiksi kuten esimerkissä 1.2.

Liuskat inkuboitiin hiiren IgG:n kolloidisella hopealla merkittyjen, vuohesta saatujen vasta-aineiden kera
35 (valmistaja E.Y. Laboratories, SP-0011) laimennoksena

1:100 0,1 %:isessa BSA-trispukskurissa yksi tunti kolmekymmentä minuuttia huoneen lämpötilassa.

Liuskat pestiin 2 x 10 minuuttia 0,1 %:isella BSA-trispukskurilla ja vedellä ja kuivattiin ilmassa.

- 5 Positiiviset täplät tunnistettiin keltaisen värin avulla. Näissä olosuhteissa voitiin todeta n. 30 ng 1 µl:n täplässä.

Esimerkki V

- 10 Kananpojan kuvusta saadun aktiinin affiniteettipuhdistetun, kaniinista saadun vasta-aineen spesifisyyden testaaminen aktiinin suhteen, joka esiintyy kananpojan keuhkojen epiteelisolujen sekundääriviljelmistä saadussa kokonaissolulysaatissa, käyttäen blot overlay-immunomääritystä ja kullalla merkittyä sekundääristä vasta-ainetta ja tämän jälkeistä hopealla voimistamista.

5.1 Anti-aktiinin antiseerumin valmistus

- 20 Elektroforeettisesti puhdas kananpojan kuvun aktiini homogenoitiin ja ruiskutettiin kaniineihin kuten on kuvattu tubuliinin ja kalmoduliinin yhteydessä esimerkissä 1.1. Seerumi valmistettiin ja varastoitiin kuten esimerkissä 1.1 on kuvattu.

5.2 Aktiinin vasta-aineen affiniteettipuhdistus

- 25 Aktiini kytkettiin Sepharose-4-B-CNBr:ään (Pharmacia) valmistajan ohjeiden mukaan. Vasta-aine puhdistettiin suoraan seerumista. Jälkimmäistä inkuboitiin antigeeniä sisältävän geelin kera. Käytettiin 20 ml seerumia 10:tä milligrammaa kohti kytkettyä antigeeniä. Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen geeli kaadettiin pylvääseen ja pestiin 10 millimoolisella tris-puskuroidulla keittosuolaliuoksella (TBS), kunnes absorbanssi aallonpituudella 280 nm oli olennaisesti nolla. Ei-spesifinen adsorboiva aines eluoi-
30 tiin TBS:llä, jossa oli 1 moolista NaCl:ää ja sitten pestiin TBS:llä. Spesifinen vasta-aine eluoi-
35 ttiin TBS:llä. Spesifinen vasta-aine eluoi-
35 ttiin glysiini-HCl-puksurilla pH-arvossa 2,8. Yhden millilitran fraktiot neutraloitiin välittömästi 100 µl:lla 1

moolista tris-HCl-puskuria, pH 8,5. Vasta-aineen konsentraatio mitattiin aallonpituudella 280 nm käyttäen $E_1 \%$ = 14,3. Eluoitujen vasta-aineiden määräosia varastoitiin lisäkäsittelemättä -20°C :ssa.

5 5.3 Kananpoikasikiön keuhkoista saatujen epiteeli-
solujen viljely

 Kananpoikasikiön keuhkoepiteelisolut eristettiin 14 vrk vanhojen kananpoikasikiöiden keuhkoista. Kudos hienonnettiin käsin ja sitä trypsinoitiin 20 minuuttia
10 37°C :ssa 0,25 %:isessa trypsiinissä Hanksin tasapainotetussa suolaliuoksessa, jossa ei ollut Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -ioneja. Reaktio keskeytettiin elatusalustalla ja 10 %:isella FCS:llä. Sentrifugoinnin ja uudelleensuspendoimisen jälkeen solut siirrettiin 75 cm^2 T-kolveihin ja annettiin
15 kiinnittyä 12-24 tuntia ennen elatusalustan vaihtamista. Kun oli viljelty 3-5 vuorokautta solut trypsinoitiin nopeasti (2-3 minuuttia) (0,25 %:isessa trypsiiniliuoksessa) ja soluista valmistettiin maljaviljelmiä petrimaljoissa, joiden halkaisija oli 9 cm, ja käytettiin 3-5 vuorokauden
20 kasvun jälkeen eli solujen kasvettua yhteen. Soluja viljeltiin Eaglen minimum essential medium'issa, johon oli lisätty ei-välttämättömiä aminohappoja ja 10 % naudansi-
kiöseerumia, kostutetussa 5 % CO_2 /ilmakehässä 37°C :ssa.

25 5.4 Kananpoikasikiön keuhkoista saatujen epiteeli-
solujen kokonaissolu-SDS-lysaatin valmistus

 Petrimaljoissa (halkaisija 9 cm) kasvaneet solut pestiin Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -ioneja sisältämättömässä PBS:ssä (Dulbecco) ja otettiin talteen kumilastalla ja upotettiin Eppendorf-kärjessä (1,5 ml) absoluuttiseen asetoniin
30 -20°C :ssa. Asetoni haihdutettiin ja kuiva solujäännös liuotettiin kiehuvaan SDS-näytepuskuriin, jossa oli 1 millimoolista TAME (proteaaasin estoaaine). Sentrifugoinnin jälkeen saatu liukenematon aines hylättiin. Tästä lysaatista saadut SDS-geelit (Laemmliin mukaan) ajettiin sarjalaimennettuina näytepuskurilla ja värjättyinä coomassiesi-
35 nisellä sopivimman näytelaimennuksen arvioimiseksi. Siir-

rettäessä sitten elektroforeettisesti geenin seulontamembraaniin (valmistaja NEN) käytettiin laimennussuhdetta 1:16. Yksi siirtoyksikkö muodostui yhdestä kaistasta tätä
5 lysaattilaimennosta ja yhdestä kaistasta seosta, jossa oli puhdistettuja vertailuproteiineja Ch. g. filamiini, Ch. g. myosiini (H- + L-ketju), Ch. g. α -aktiini, BSA, rotan-aivotubuliini ja sianmahatropomyosiini, jokaista 0,06 μ g kaistaa kohti.

Tämän jälkeen annettiin puskuririntaman laskeutua
10 geelin alapäähän ja elektroforeettinen siirto geenin seulontamembraaniin tapahtui samoin kuten esimerkissä 2.3. Blottausyksikkö leikattiin irti ja proteiinin jäljelle jääneet sitoutumiskohdat tehtiin tehottomiksi kuten esimerkeissä 1.2 ja 2.3 on kuvattu. Inkubointi aktiinin vasta-aineen (0,5 μ g/ml) ja GAR G20:n (absorptiivisarvo 520
15 nm = 0,2) kera ja GAR G20:n laimentaminen 0,1 %:isella BSA-trispuskurilla ja 0,4 %:isella gelatiinilla suoritettiin suljetuissa muovipusseissa, joiden koko vastasi suunnilleen arkin kokoa, kumpikin toimenpide kesti kaksi tuntia
20 kuten esimerkissä 2.4 on kuvattu.

Kun oli kaksi tuntia inkuboitu GAR G20:n kera, arkit pestiin 0,1 %:isella BSA-trispuskurilla ja preparoitiin hopealla voimistamista varten. Tänä aikana tulivat
25 jo näkyviin aktiinin liikkuesssa väriltään vaaleanpunaisesta punertavaan vaihteleva vyöhyke lysaatissa, joka vyöhyke vastasi aktiinia proteiiniseoksessa.

5.5 Hopealla voimistaminen

Arkit pestiin kaksi minuuttia sitraattiperuspuskuriin 1:10-laimennoksessa. Tämä puskurisi sisälsi 100 ml:ssa
30 25,5 g trinitraattisitraattia ja 23,5 g sitruunahappoa, pH 4.

Sitten arkkeja inkuboitiin 15 minuuttia, huolellisesti valolta suojattuna, fysikaalisessa kehitteessä, joka sisälsi:

60 ml deionoitua vettä

0,85 g hydrokinonia 15,0 ml:ssa deionoitua vettä

10 ml sitraattipuskuria, pH 4

0,11 g hopealaktaattia 15,0 ml:ssa deionoitua vettä

5 Hopealaktaatti suojattiin huolellisesti valolta ja lisättiin muihin komponentteihin juuri ennen käyttöä.

Reaktioajan päätyttyä arkit pestiin runsaalla vesimäärällä ja käsiteltiin Agefixilla (1:4 vedessä), joka on valokuvauskiinnite.

10 Arkit pestiin uudelleen runsaalla vesimäärällä ja kuivattiin ilmassa.

5.6 Tulokset

Aikaisemmin vaaleanpunaisen-punertavaksi värjäytynyt vyöhyke näkyi nyt intensiivisen mustana. Aktiinin vasta-ainetta voidaan pitää äärimmäisen spesifisenä ja vasta-aineella on saatu hyviä tuloksia värjättäessä immunosytokemiallisesti soluviljelmien aktiinipitoisia rakenteita.

5.7 Päätelmät

20 Hopealla voimistaminen parantaa voimakkaasti toteamismenetelmän kontrastia ja herkkyyttä. Niinpä jatkettaessa esimerkiksi IV kehittämällä värjäytyneet, kolloidisella hopealla merkityt vasta-aineet saatiin toteamisrajaksi vain viiden minuutin reaktion jälkeen 3 ng 30 ng:n asemasta täplää kohti.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta muodostuneen agglomeraatin toteamiseksi tai määrittämiseksi blot overlay-tekniikkaa käyttävien yleismenetelmien avulla, joissa käytetään merkittyjä komponentteja, t u n n e t t u siitä, että merkityt komponentit, jotka on saatu kytkemällä kolloidisiin metallihiukkasiin agglomeraatin haluttu komponentti, joka agglomeraatti on muodostunut spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta, tai kytkemällä kolloidisella metallilla merkittyyn sitoja-aineeseen agglomeraatin haluttu komponentti, joka agglomeraatti on muodostunut spesifisestä sitoja-aineesta ja vastaavasta akseptoriaineesta, visualisoidaan värisignaalinä, joka sijaitsee spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen välisen reaktion reaktiokohdassa blottausväliaineen pinnalla, tai määritetään kvantitatiivisesti tässä kohdassa sinänsä tunnetuilla spektrofotometrisillä menetelmillä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että spesifinen sitoja-aine on spesifinen sitojaproteiini.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

I) immobilisoidaan akseptoriaine immobilisoivaan matriisiin,

II) saatetaan mainittu immobilisoiva matriisi kosketukseen kolloidisilla metallihiukkasilla merkityn spesifisen sitoja-aineen kanssa ja

III) todetaan värisignaali reaktiokohdassa immobilisoivan matriisin pinnalla.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

I) immobilisoidaan akseptoriaine immobilisoivaan matriisiin,

II) saatetaan mainittu immobilisoiva matriisi kosketukseen merkitsemättömän spesifisen sitoja-aineen kanssa
5 ja sitten kolloidisella metallilla merkityn proteiinin kanssa, joka on spesifinen merkitsemättömälle spesifiselle sitojaproteiinille, ja

III) todetaan värisignaali reaktiokohdassa immobilisoivan matriisin pinnalla.

10 5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisointivaihe suoritetaan adsorboimalla suoraan ja/tai sitomalla kovalenttisesti, mahdollisesti sen jälkeen, kun on erotettu elektroforeettisesti ja siirretty tai blotattu elektroforeesiväli-
15 aineesta blottausväliaineeseen, ja tekemällä sitten jäljellä olevat sitoja-aineelle spesifiset sitoutumiskohdat tehottomiksi sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

6. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immobilisointivaihe suoritetaan antamalla akseptoriaineen sitoutua spesifiseen sitojaproteiiniin, joka on immobilisoitu blottausväliaineeseen, saattamalla mainittu blottausväliaine kosketukseen akseptoriainetta sisältävän vesiliuoksen kanssa.

25 7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kolloidiset metallihiukkaset ovat kultaa, hopeaa tai platinaa tai näiden metallien tai raudan tai kuparin yhdisteitä, ja niiden hiukkaskoko on 3-100 nm.

30 8. Jonkin patenttivaatimuksista 1-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kolloidiset metallihiukkaset ovat kulta- ja/tai hopeahiukkasia, joiden hiukkaskoko on 3-100 nm.

35 9. Jonkin patenttivaatimuksista 1-8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kolloidisten metallihiukkasten lopullinen toteaminen suoritetaan fysikaalisen kehitteen käyttämisen jälkeen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että fysikaalinen kehite on hopea-
pitoinen yhdiste.

5 11. Testipakkaus, jolla todetaan tai määritetään
yksi spesifisen sitoja-aineen ja vastaavan akseptoriaineen
välisessä reaktiossa muodostuvan agglomeraatin komponent-
teista yleisellä blot overlay-määrittämenetelmällä,
t u n n e t t u siitä, että siinä on

10 a) kolloidisilla metallihiukkasilla merkittyjä kom-
ponentteja, jotka aiheuttavat värisignaalin mainitun spe-
sifisen sitoja-aineen ja mainitun akseptoriaineen välisen
reaktion reaktiokohdalla, immobilisoivan matriisin pinnal-
la;

15 b) fysikaalisen kehitteen komponentteja ja
c) muita reagensseja.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen testipakkaus,
t u n n e t t u siitä, että muut reagenssit on valittu
seuraavista aineista

20 (i) puskurit,
(ii) immunologista sitoutumista optimoivat aineet,
(iii) merkitsemätön sitoja-aine ja
(iv) kiinnitysaine.

25 13. Patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukainen testi-
pakkaus käytettäväksi jonkin patenttivaatimuksista 1-10
mukaisessa menetelmässä.

Patentkrav

1. Förfaringssätt för att upptäcka eller bestämma ett agglomerat bildat av ett specifikt bindande ämne och en motsvarande acceptorsubstans med tillhjälp av de allmänna metoderna av blot overlay-teknik med användning av märkta komponenter, k ä n n e t e c k n a t därav, att de märkta komponenterna, erhållna genom koppling av den önskade komponenten av agglomeratet bildat av det specifika bindande ämnet och av den motsvarande acceptorsubstansen till kolloida metallpartiklar eller genom koppling av den önskade komponenten av agglomeratet bildat av det specifika bindande ämnet och av den motsvarande acceptorsubstansen till ett med en kolloid metall märkt bindande ämne, blir visualiserade som en färgsignal, lokaliserad på reaktionsstället av reaktionen mellan det specifika bindande ämnet och den motsvarande acceptorsubstansen på blotmediets yta eller kvanitativt bestämd på detta ställe genom i och för sig kända spektrofotometriska metoder.

2. Förfaringssätt enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det specifika bindande ämnet är ett specifikt bindande protein.

3. Förfaringssätt enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar följande faser:

I) acceptorsubstansen immobiliseras till en immobiliserande matris,

II) nämnda immobiliserande matris bringas i kontakt med det specifika bindande ämnet, märkt med kolloida metallpartiklar och

III) färgsignalen upptäcks på reaktionsstället på den immobiliserande matrisens yta.

4. Förfaringssätt enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar följande faser:

I) acceptorsubstansen immobiliseras till en immobiliserande matris,

II) nämnda immobiliserande matris bringas i kontakt med ett omärkt specifikt bindande ämne, och därefter med
5 ett med en kolloid metall märkt protein, specifikt för det omärkta specifika bindande proteinet, och

III) färgsignalen upptäcks på reaktionssättillet på den immobiliserande matrisens yta.

5. Förfaringssätt enligt patentkravet 3 eller 4,
10 k ä n n e t e c k n a t därav, att immobilisationsfasen åstadkommes genom direkt adsorption och/eller kovalent bindning eventuellt efter applikation av elektroforetisk separation och en överföring eller blotning från det
15 elektroforetiska mediet till blotmediet med påföljande förkvävande av återstående, för det bindande ämnespecifika bindningsställena genom i och för sig kända metoderna.

6. Förfaringssätt enligt patentkravet 3 eller 4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att immobiliseringsfasen åstadkommes genom att acceptorsubstansen tillåts bli bunden
20 till ett specifikt bindande protein, som har blivit immobiliserat i blotmediet, genom att nämnda blotmedium bringas i kontakt med en vattenlösning, som innehåller acceptorsubstansen.

7. Förfaringssätt enligt något av patentkraven 1-
25 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att de kolloida metallpartiklarna är av guld, silver eller platina eller föreningar av dessa metaller eller järn eller koppar och har en partikelstorlek av 3-100 nm.

8. Förfaringssätt enligt något av patentkraven 1-
30 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att de kolloida metallpartiklarna är guld- och/eller silverpartiklar med partikelstorleken av 3-100 nm.

9. Förfaringssätt enligt något av patentkraven 1-
35 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att den slutliga upp-
täckten av de kolloida metallpartiklarna åstadkommes efter användning av en fysikalisk framkallare.

10. Förfaringssätt enligt patentkravet 9, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att den fysikaliska framkallaren
är en silverhaltig förening.

5 11. Testförpackning, varmed upptäcks eller bestäms
en komponent av ett agglomerat bildat genom reaktionen
mellan ett specifikt bindande ämne och en motsvarande ac-
ceptorsubstans med en allmän blot overlay-bestämningsme-
tod, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller

10 a) med kolloid metallpartiklar märkta komponenter,
som förorsakar en färgsignal på reaktionsstället av reak-
tionen mellan nämnda specifika bindande ämne och nämnda
acceptorsubstans på ytan av en immobiliserande matris;

b) komponenter av en fysikalisk framkallare och

c) övriga reagensser.

15 12. Testförpackning enligt patentkravet 11,
k ä n n e t e c k n a d därav, att de övriga reagensserna
har valts av följande substanser:

(i) buffertar,

20 (ii) substanser som optimerar immunologisk bind-
ning,

(iii) ett omärkt bindande ämne och

(iv) ett fixeringsmedel.

25 13. Testförpackning enligt patentkravet 11 eller
12 för användning vid förfaringssättet enligt något av
patentkraven 1-10.