



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(21) Patentansøgning nr.: 3434/87

(22) Indleveringsdag: 03 jul 1987

(41) Alm. tilgængelig: 04 jan 1989

(44) Fremlagt: 05 feb 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: A/S De *Danske Sukkerfabrikker; Langebrogade 5; 1411 København K., DK

(72) Opfinder: Landis *Henry; DK, Elsebeth Vang *Hansen; DK

(51) Int.Cl.⁵

G 01 N 1/28

G 01 N 33/543

C 07 K 3/18

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Fremgangsmåde til prøveekstraktion, oprensning, opkoncentrering og kvantitativ bestemmelse af lavmolekylære organiske forbindelser samt analysesæt til udførelse af nævnte fremgangsmåde, og anvendelse af dette sæt ved fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer

WO off.g.skrift nr. 83/03678

DE pat. nr. 2910707

NO freml.skrift nr. 146747

Andre publikationer. Handbook of experimental Immunology (Weir, D.M. ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986, Bind 1, side 3.3

(57) Sammen drag:

3 4 3 4 - 8 7

Fremgangsmåde til prøveekstraktion, oprensning, opkoncentrering og kvantitativ bestemmelse af lavmolekylære organiske forbindelser fra biologiske kilder, såsom planter, navnlig hormonerne cytokininer eller auxiner, hvilken fremgangsmåde omfatter prøvens underkastelse i form af en isoleret ekstrakt fra biologisk materiale påsat via en præ-immuno-forkolonne eller direkte til et immuno-affinitetsoprensningstrin under anvendelse af et selektivt antistof, efterfulgt af en enzymbundet immunosorptionsanalyse under anvendelse af nævnte eller andet antistof, der er stabiliseret ved hjælp af sukker, hvori det selektive antistof, der udviser gruppespecificitet, anvendes i oprensningstrinnet; antistoffet er kovalent bundet til en matrix uden tab af bindingskapacitet overfor det passende antigen; de lavmolekylære organiske forbindelser er reversibelt bundet til en immuno-affinitetskolonne under anvendelse af vandige reagenser og elueret under anvendelse af organiske eller vandige opløsningsmidler. Fremgangsmåden udføres fortrinsvis ved hjælp af et hidtil ukendt sæt, som omfatter i. bestanddele, der kræves til prøveekstraktion og oprensning, og ii. bestanddele, der er nødvendige til anvendelse ved en enzymbundet immunosorptionsanalyse.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til prøveekstraktion, oprensning, opkoncentrering og kvantitativ bestemmelse af lavmolekylære organiske forbindelser (LMWOC'er) fra biologiske kilder, såsom planter, navnlig plantehormonerne cytokininer, såsom zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin, og auxiner, såsom indol-3-eddikesyre, og et analysesæt til udførelse af nævnte fremgangsmåde og anvendelse af dette sæt ved fremgangsmåden.

- 10 Interessen i den kvantitative bestemmelse af LMWOC'er stammer fra den forudsætning, at forandringer i deres koncentration indvirker på det fysiologiske stadium af plantematerialet. Det er imidlertid almindeligt anerkendt, at koncentrationen og/eller aktiviteten af LMWOC'er er mere udpræget i planternes meristematiske regioner.

Uanset arten af vekselvirkning mellem plantevækstsubstanterne og morfogenesen er det indlysende, at antallet af involverede celler er ringe i sammenligning med hovedmassen af vævet. Således vil man ikke opnå betydningsfulde forskelle ved at analysere hele planten eller store dele af væv/organ fra planten.

Bestående fremgangsmåder til kvantitativ bestemmelse af LMWOC'er er ikke helt tilfredsstillende idet:

25

1. De forbruger en stor mængde biologisk materiale, idet de kendte metoder kræver adskillige forskellige kromatografiske procedurer, jfr. I.M. Scott og R. Horgan: Quantification of cytokinins by selected ion monitoring using ^{15}N -labelled internal standard. Biomed. Mass Spectrometry, bind 7, nr. 10, side 446-449, 1980.

30

2. De kræver en udstrakt laboratorietid og arbejdsmæssig færdighed.

35

I DE-patentskrift nr. 29 10 707 (Abbott Laboratories) beskrives anvendelsen af sukker til opretholdelsen af immunoreagensernes biologiske aktivitet i tørret form.

WO 86/04096 anfører et tørt præparat af enzymatisk aktivt reagensmateriale, f.eks. reagenser, der er egnet til enzymbundet specifik bindingsanalyser, såsom ELISA, og reagenssæt, der indbefatter sådanne tørrede præparater. Et præparat, hvori den enzymatiske aktivitet bevares, er således tilvejebragt. I nærværende opfindelse tilvejebringes en konservering af antistofaktivitet ved hjælp af en sukkerbelægningsprocedure.

I NO patentskrift nr. 146.747 beskrives isolering og yderligere oprensning af placenta-specifikt protein PP₅ ved hjælp af affinitetskromatografi, hvor proteinet er reversibelt bundet i et vandigt medium. Proteinet elueres efterfølgende med en vandig opløsning med en pH-værdi på 2-4. Denne metode er imidlertid kompliceret, da det er nødvendigt at udfælde uønskede forbindelser med diaminoethoxyacridinlactat under oprensningen og derefter isolere PP₅ ved udfældning med ammoniumsulfat. Desuden er denne kendte fremgangsmåde specielt tilpasset til det store molekyle PP₅ og vil ikke kunne anvendes til lavmolekylære organiske forbindelser, såsom plantehormonerne cytokininer og auxiner.

Der er for tiden et sæt på markedet, som alene koncentrerer sig om den kvantitative bestemmelse af LMWOC'er. Det markedsføres af Idetek, Inc. USA under varemærket PHYTODETEK®. Brugere af dette kendte sæt er imidlertid henvist til isolering og oprensning af LMWOC'erne enten ved metoden ifølge E.M.S. MacDonald, D.E. Akiyoshi og R.O. Morris: Combined highperformance liquid radioimmunoassay for cytokinins. Journal of Chromatography, bind 214, side 101-109, 1981, eller under anvendelse af særlig dyrt og kompliceret udstyr (se f.eks. I.M. Scott og R. Horgan: Mass spectrometric quantification of cytokinin nucleotides and glycosides in tobacco crown-gall tissue. Planta, bind 161, side 345-354, 1984). Prøveoprensning på traditionel måde nødvendiggør anvendelsen af et antal kromatografiske trin. Dette er uensigtsmæssigt på grund af et dermed forbundet tab ved hvert trin. For at kompensere for dette tab isolerer en forsker ofte LMWOC'erne fra en relativ stor prøvemængde. Anvendelsen af en stor prøvemængde er ufordelag-

tig, idet meningen med analysen af plantevækstregulatorer ligger i de lokale forskelle i koncentration, som er afgørende med henblik på differentiering. Jo større prøvemængde desto større er prøvetagningsfejlen derfor.

5

Fremstilling af antistoffer mod LMWOC'er er beskrevet (oversigtsartikel overblik, se E.W. Weiler: Immunoassay of plant growth regulators. Ann. Rev. Plant Physiol., bind 35, side 85-95, 1984). Disse antistoffer er blevet anvendt til fremstilling af immuno-affinitetskolonner med det nævnte formål at oprense de tilsvarende lavmolekylære organiske stoffer af interesse, f.eks. et plantehormon. Hidtil angik anvendelsen af sådanne kolonner brugen af organiske opløsningsmidler, der vides at være toksiske og om muligt bør udelades i analysesæt, der skal forsendes og opbevares sikkert. I de offentliggjorte eksempler, hvori immuno-affinitetskolonner anvendes til prøveoprensning, gøres der endvidere brug af polyklonale antistoffer.

20 Fra den europæiske patentansøgning nr. EP 153 875/A2 kendes det at afbøde vanskeligheder med ikke-specifik binding, en sideeffekt i ELISA, ved at underkaste en prøve en enzym-bundet immunoabsorbent analyse i nærværelse af en virksom mængde sukker. Sukkeret er således til stede under antigen-antistofreaktionen. Som nævnt anvendes sukkeret for at undgå ikke-specifikke bindingsreagenser og for at mindske sideeffekter. Formålet med den foreliggende opfindelse, hvad angår tilsætning af en sukkerart, er et helt andet, nemlig stabilisering af antistoffets biologiske aktivitet under frysetørningsprocessen samt under opbevaringsperioden senere hen.

Helt overraskende blev der imidlertid udviklet en fremgangsmåde, som er meget mere anvendelig i et sæt, idet anvendelsen af organiske opløsningsmidler erstattes af et vandigt system. Ved anvendelse af denne metode kan LMWOC'er, f.eks. som beskrevet i eksempel 1, zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin isoleres, oprenses og bestemmes kvantitativt ved en meget følsom, pålidelig, reproducerbar og hurtig undersøgelse, som også nemt kan automatiseres.

Udviklingen af en analytisk undersøgelse for LMWOC er baseret på en simpel ekstraktionsprocedure, som involverer nogle få enkle trin. Dermed undgås behovet for stor prøvestørrelse til ekstraktionen.

5

Det er formålet med den foreliggende opfindelse at anvise en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af LMWOC baseret på et vandigt system og hvor analysen er meget følsom, pålidelig, reproducerbar og hurtig, og kan automatiseres samt et analysesæt til brug ved udøvelse af fremgangsmåden.

10

Dette opnås ifølge opfindelsen, som tilvejebringer en fremgangsmåde til prøveekstraktion, oprensning, opkoncentrering og kvantitativ bestemmelse af lavmolekylære organiske forbindelser fra biologiske kilder, såsom planter, navnlig hormonerne cytokininer eller auxiner, hvilken fremgangsmåde omfatter at prøven underkastes i form af en isoleret ekstrakt af biologisk materiale, påført via en præ-immun-forkolonne eller direkte, at et immuno-oprensningstrin under anvendelse af selektivt første antistof, efterfulgt af en enzytbundet immunsorptionsanalyse (ELISA) under anvendelse af et antistof, der er stabiliseret ved hjælp af sukker, idet nævnte fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man som det selektive, første antistof i oprensningstrinnet anvender et antistof med gruppespecificitet; at det første antistof er kovalent bundet til en matrix uden tab af bindingskapacitet for det pågældende antigen; at man binder de lavmolekylære organiske forbindelser reversibelt til en immuno-affinitetskolonne under anvendelse af vandige reagenser; at man eluerer ved hjælp af et opløsningsmiddel valgt blandt organiske eller vandige opløsningsmidler; og at man anvender et andet antistof, der er forskellig fra det første antistof, som antistoffet ved ELISA.

20

25

30

De vigtigste egenskaber ved den foreliggende opfindelse er:

35

1. Der anvendes et første selektivt antistof med gruppespecificitet, fortrinsvis et monoklonalt antistof, til immunaffinitetsoprensningen. Ved at anvende dette antistof opnås en se-

lektiv binding af en gruppe af nært beslægtede forbindelser, såsom zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin.

2. Der anvendes et andet antistof, fortrinsvis et polyklonalt antistof, til den kvantitative bestemmelse ved hjælp af ELISA. Det anvendte antistof indbefatter antistoffer med en yderst høj affinitet (høj K_a -værdi), men med en lav affinitet til krydsreagerende forbindelser. Dette er en afgørende faktor for opnåelsen af en lav påvisningsgrænse og samtidigt opnå en meget specifik analyse.

Kombinationen af to forskellige antistoffer sikrer en god udvinding og en høj renhed under oprensningen, ligesom der opnås høj specificitet og følsomhed under alle kvantitative bestemmelser.

Disse fordele opnås især, når der anvendes et monoklonalt antistof, som det første antistof til oprensning; og et polyklonalt antistof som det andet antistof ved ELISA.

Ved en yderligere foretrukken udførelsesform er antistoffet covalent bundet til matrix'en via en amidbinding, fortrinsvis opnået ved anvendelse af en succinylaktiveret carbonylgel. Således kan milde betingelser anvendes til fremstilling af immunoaffinitetsmaterialet.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen foretrækkes det især, at der ved immunoaffinitetsoprensningstrinnet undgås enhver ikke-specifik adsorption til immunoaffinitetskolonnen ved at belægge den med adenosin eller lignende organiske molekyler, som ikke udviser signifikant krydsreaktivitet med det selektive antistof og/eller andre reagenser, som anvendes til ekstraktionen, oprensningen, opkoncentreringen og den kvantitative bestemmelse af LMWOC'er, navnlig cytokininer eller auxiner. Nærmere bestemt sikrer den opnåede specificitet ved begrænsningen af bindingen til nævnte monoklonale antistoffer, at de eluerede LMWOC'er vil være af høj renhed. I alt væsentligt undgås ikke-specifik adsorption til kolonnen.

I henhold til den foreliggende opfindelse viste de følgende elueringssystemer sig som særligt effektive ved elueringen af det affinitetsoprensede antigen:

5 (i) 0,1 M glycin-HCl, pH 2,2, 20 mM magnesiumacetat, 50 mM KCl

(ii) 0,1 M propionsyre, 10% vol/vol dioxan, pH 2,5

(iii) 0,1 M glycin-HCl, pH 2,5, 25% vol/vol ethylenglycol

10

(iv) 0,1 M phosphorsyre, pH 2,5

Ved en yderligere foretrukken udførelsesform elueres LMWOC'erne specifikt under anvendelse af et vandigt opløsningsmiddel.

15 Navnlig foretrækkes anvendelse af 0,1 M phosphorsyre, pH 2,5, idet dette system ikke forstyrrer den efterfølgende ELISA kvantitative bestemmelse. Således opnås en specifik eluering af LMWOC'er ved afbrydelse af antistof-antigen-vekselvirkningen.

20

En vellykket gennemførelse af den foreliggende fremgangsmåde afhænger derfor af et hidtil ukendt analysesæt's anvendelse ved udførelse af nævnte fremgangsmåde under anvendelse af en kromatografisk matrix, hvortil er immobiliseret monoklonale
25 antistoffer, og et ELISA påvisningssystem, som baserer sig på anvendelsen af mikrotiterbrønde. For at fremstille et sæt med de ønskede holdbarhedskaraktetika indbefattes et sukker ved fremstillingen af ELISA-pladerne.

30 Som egnede sukkerarter kan nævnes fructose, saccharose, sorbitol og inositol, fortrinsvis saccharose, idet nævnte sukkerarter besidder en fremragende stabiliseringsvirkning på native antistoffer.

35 Dette hidtil ukendte analysesæt ifølge den foreliggende opfindelse har to adskilte funktioner. For det første enkle og effektive isolerings- og oprensningstrin. For det andet kvantitativ bestemmelse af de ekstraherede bestanddele.

Således tilvejebringer sættet ifølge opfindelsen et hurtigt og virksomt isolerings- og kvantificeringssystem for LMWOC'er, såsom zeatin og N-9-substituerede zeatinderivater. Immunoaffinitetskolonner, der består af monoklonale anti-zeatinri-

5 bosidantistoffer, som er bundet til en agarosegel, anvendes til prøvefremstilling. Kolonnematerialet har en høj selektiv adsorption for zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin kombineret med en lav ikke-specifik bindingskapacitet.

- 10 De fra kolonnen eluerede fraktioner er af høj renhed, og udbyttet er ligeledes højt.

Kolonnematrixens stabilitet og de monoklonale antistoffer tillader gentagne anvendelser.

15

Kvantitativ bestemmelse af LMWOC'er, såsom zeatin og N-9-substituerede derivater deraf, er baseret på et enzymbunden immunosorptionsanalyse (ELISA) -system. ELISA-bestanddelen af sættet benytter monoklonale eller polyklonale antistoffer. I

20 begge tilfælde er følsomheden særlig høj, f.eks. giver et polyklonalt antistof med en høj associationskonstant femtomolær følsomhed.

- Et væsentligt træk ved det foreliggende analysesæt er, at det
- 25 tillader en selektiv isolering og oprensning af LMWOC'er, såsom plantehormoner, f.eks. cytokininer, såsom zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin, eller auxiner, såsom indol-3-eddikesyre. I tilfælde af et cytokinin, f.eks. zeatin, er det ønskeligt at kunne isolere den fuldstændige stofgruppe
- 30 (det vil sige zeatin plus N-9-substituerede derivater af zeatin) i ét enkelt trin. For tiden er de indbyrdes forhold af disse substanser ikke fuldt fastlagt. Adskillelse af de forskellige cytokininer kan opnås ved hjælp af HPLC. Det foreliggende sæt er således af speciel interesse, idet det nu er mu-
- 35 ligt at oprense og isolere zeatin og N-9-substituerede derivater som en enkelt hovedgruppe af cytokininer, hvor sidstnævnte er en vigtig klasse af biologisk aktive substanser. Heri gennemføres oprensningen og/eller opkoncentreringen ved

hjælp af immuno-affinitetsadsorption af vævsekstrakten under anvendelse af en immuno-affinitetskolonne, hvori et specifikt monoklonalt antistof covalent er bundet til en uopløselig bærer. Formålet med de monoklonale antistoffer under oprensningstrinnet er at frembringe en immuno-affinitetsadsorbent karakteriseret ved kun én associationskonstant, som er udvalgt til at give fuldstændig og reproducerbar eluering af den bundne prøve. Ved andre anvendelser af fremgangsmåden er et monoklonalt antistof, som anvendes på kolonnen, ikke nødvendigvis det samme som det, der anvendes på ELISA mikrotiterpladen.

Binding af de lavmolekylære organiske forbindelser af interesse er herved specifik og reversibel. Eluering af de bundne molekyler opnås ved forandring af eluenten, så den specifikke vekselvirkning, der involverer det immobiliserede antistof og bestanddelene af interesse, er mindre stabil og afbrydes. Efter reækvilibrering af immuno-affinitetsmatrixen kan systemet genanvendes mange gange.

20

Udvikling af en virksom fremgangsmåde til prøveoprensning baseret på ovennævnte princip indbefatter:

1. En effektiv ekstraktionsprocedure med en kvantitativ genfinding af alle bestanddele af interesse.

2. Den korrekte udvælgelse af det monoklonale antistof.

3. Den korrekte udvælgelse af den uopløselige matrix.

30

4. Passende betingelser til den kovalente kobling af det monoklonale antistof til matrixen.

5. Passende betingelser til adsorptionen og elueringen af bestanddelene af interesse.

35

6. Kort ekspeditionstid med henblik på genanvendelsen af immunoaffinitetsmatrixen, det vil sige matrixens regenerering kræver kun et enkelt vasketrin.

Fremgangsmåderne ifølge opfindelsen til ekstraktion, oprensning, opkoncentrering og kvantitativ bestemmelse af LMWOC'er omfatter som ovenfor beskrevet de følgende hovedtrin, som til illustrative formål specifikt forklares i forbindelse med isoleringen af zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin:

Trin I: Ekstraktion af væv for at opnå en råekstrakt af væv/materiale, som indeholder lavmolekylære organiske forbindelser som beskrevet ovenfor.

Trin II: Eventuelt forbehandling af råekstrakter. Dette trin er kun nødvendigt i forbindelse med særlgt kontaminerede prøver. Sådanne prøver ekstraheres med n-pentan før anbringelse på forkolonnen i trin III.

Trin III: Oprensning af LMWOC'er ved hjælp af en præimmunoforkolonne, hvorved ikke-bundne fraktioner opsamles (se P. Ulvskov, J. Marcussen, R. Rajagopal, E. Prinsen, P. Rüdelsheim og H. van Onckelen: Immuno-affinity purification of indole-3-acetamide using monoclonal antibodies. Plant Cell Physiol., bind 28, nr. 5, side 937-945, 1987).

Trin IV: Oprensning af LMWOC'erne af interesse ved hjælp af en immuno-affinitetskolonne under anvendelse af højt specifikke og velkarakteriserede monoklonale antistoffer for nævnte LMWOC(er), samt opsamling af eluatet.

Trin V: Kvantitativ bestemmelse af eluerede forbindelser ved hjælp af ELISA. Hvis der ikke anvendes en HPLC-fraktionering før trin V, opnås en kvantitativ bestemmelse af stofgruppen, mod hvilken det specifikke antistof blev dannet. Hvis man imidlertid anvender en sådan HPLC-fraktionering, er det muligt at adskille og kvantificere hver af de isolerede bestanddele, nemlig zeatin, zeatinribosid, zeatinglucosid, 9-alanyl-zeatin og zeatin-9-ribosid-5'-monophosphat.

Ad. Trin I: Til ekstraktion af vævsmaterialet, der skal analyseres, kan man anvende en mekanisk sønderdeling af vævet i

flydende nitrogen, efterfulgt af ekstraktion af det sønderdelte væv ved stuetemperatur med et overskud af et methanol- eller ethanolbaseret ekstraktionssystem. Ekstraktionssystemet bør fortrinsvis fremstilles lige før anvendelsen. Det organiske opløsningsmiddel fjernes almindeligvis ved hjælp af af-

5 dampning under reduceret tryk.

Ad. Trin II: Vævsekstrakten fra trin I blandes med en passende mængde (almindeligvis 1/3 volumen) n-pentan. Efter henstand

10 ved stuetemperatur forekommer faseadskillelsen. Forbindelserne af interesse befinder sig i den nedre vandige fase, og de fleste af urenhederne, f.eks. pigmenter, befinder sig i den øvre organiske fase. Den vandige fase anvendes i trin III.

15 Ad. Trin III: Yderligere oprensning af råekstrakten, der stammer fra trin I og/eller II foretages på en præ-immunoforkolonne. Den ovennævnte fraktion sættes på forkolonnen ved en passende gennemstrømningshastighed. Effluentet indeholder LMWOC'er og opsamles. Forkolonnen kan bortkastes efter brugen.

20 Formålet med forkolonnen er at fjerne forbindelser, som bindes ikke-specifikt enten til matrixen eller til antistoffet. Ad denne vej indføres et oprensningstrin før immuno-affinitetskromatografien. Dette beskytter ydeevnen af immuno-affinitetskolonnen og forøger det antal gange, matrixen kan genanvendes.

25 Forkolonnen indeholder immobiliserede immunoglobulinproteiner, som er kovalent bundet til en matrix med en høj ikke-specifik sorption, f.eks. agarosegel, cellulosebaserede derivater, nyloner, dextraner eller glas.

30 Ad. Trin IV: Den fra trin III resulterende vævsekstrakt oprenses på en immuno-affinitetskolonne. Immuno-affinitetskolonnen anvender monoclonale antistoffer dannet mod antigenet, f.eks. plantehormonbærer eller plantehormon-proteinkonjugater. Ad denne vej bindes antistoffet, der er dannet mod et sådant antigenkonjugat, kovalent til matrixen via antistoffernes ikke-

35 essentielle aminosyregrupper. Matrixen, en agarosegel eller en hvilken som helst matrix med lignende karakteristika udviser almindeligvis en særlig lav ikke-specifik adsorption og har

idelle fysiske karakteristika og strømningskarakteristika. (Se P. Cuatrecasas, J. Parikh: "A sorbent for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinamide esters of agarose", Biochemistry, bind 11, nr. 12, side 2291-2298, 1972.) LMWOC'erne elu-
5 eres ved at forandre omgivelsen, så vekselvirkningen mellem de lavmolekylære organiske stoffer og antistoffet bliver ustabil (f.eks. ved tilsætning af et organiske opløsningsmiddel, såsom methanol, eller ved at ændre pH-værdien i mediet, ideelt ved at sænke mediets pH-værdi). Eluatet opsamles som én eller
10 flere fraktioner.

Ad. Trin V: Hvis de bundne fraktioner elueredes ved pH-forandring, neutraliseres eluatet før videre analyser. ELISA anvendes til kvantitativ bestemmelse. Alternativt kan undersøge-
15 ren ønske fraktionering af de ovenfor eluerede fraktioner, som indeholder en blanding af zeatin og N-9-substituerede derivater. Mikrotiterbrønde belægges med polyklonalt antistof dannet mod LMWOC-bærere, f.eks. proteinkonjugat. Formålet med det polyklonale antistof på mikrotiterpladerne er at få de størst
20 mulige associationskonstanter til pålidelig kvantitativ bestemmelse af de oprensede bestanddele. Antiserum, der er passende fortyndet i en basisk puffer, sættes til hver brønd på mikrotiterpladen og pladerne inkuberes i en passende tid for at tillade antistoffets adsorption på pladen. Efter pladerne
25 er belagt med et antistof tilsættes en sukkeropløsning, f.eks. 5% (vol/vol) saccharose, til hver brønd på mikrotiterpladen, som derefter frysetørres. Før anvendelse vaskes pladerne flere gange med pufret saltopløsning. Til bestemmelse af LMWOC-koncentrationen i prøven fremstilles en standardkurve. Der sættes
30 således en række standard-LMWOC-opløsninger til nogle af brøndene. De overskydende brønde anvendes til tilsætning af en testprøve i forskellige fortyndinger. Herefter tilsættes et LMWOC-enzymkonjugat (f.eks. zeatin-alkalisk phosphatase). Idet der anvendes en "kompetitiv ELISA", som er velkendt for fag-
35 folk på området (se E.V. Weiler: "Immunoassays of plant growth regulators", Ann. Rev. of Plant Physiol., bind 35, side 85-95, 1980), konkurrerer dette konjugat og den lavmolekylære organiske forbindelse (f.eks. zeatin) i undersøgelsesprøven her-

efter om et begrænset antal antistof-bindingssteder. Pladerne inkuberes herefter i 3 timer ved stuetemperatur eller natten over ved 4°C og vaskes derefter. Et enzymsubstrat, f.eks. p-nitrophenylphosphat, sættes herefter til hver brønd og mikro-
5 titerpladen inkuberes for at muliggøre enzym-substratreaktionen. Til sidst måles extinktionen spektrofotometrisk. Standardkurven kurve anvendes til bestemmelse af koncentrationen i prøven.

- 10 Et analysesæt omfatter almindeligvis reagenser og materialer til gennemførelse af LMWOC-bestemmelsen ved hjælp af ELISA, der er baseret på anvendelse af mikrotiterbrønde, som er belagt med polyklonale eller monoklonale antistoffer, der er dannet mod bestemte forbindelser.

15

Det hidtil ukendte analysesæt ifølge opfindelsen er nyttig til udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og består af

- 20 i) bestanddele A, B og C i tabel 1 (se nedenfor), som er nødvendige til ekstraktion af de ønskede lavmolekylære organiske forbindelser (LMWOC),

- ii) en præ-immun forkolonne til for-oprensning af vævseks-
trakt, bestanddel D fra tabel 1, som indeholder immobiliserede
25 præimmunoglobulin, der er kovalent bundet til en matrix med en høj ikke-specifik binding, plus bestanddel G fra tabel 1,

- iii) bestanddel E i tabel 1, der indeholder monoklonalt antistof rettet mod den ønskede LMWOC, elueringspuffer, F i
30 tabel 1, ækvilibreringspuffer, G i tabel 1, og vaskepuffer, H i tabel 1,

- iv) tørre ELISA-plader, bestanddel J i tabel 1, belagt med polyklonalt antistof, dannet mod LMWOC-bærerkonjugat og kon-
35 serveret med en sukkeropløsning, enzymkonjugat, K i tabel 1, enzymsubstrat, P i tabel 1, plus neutraliseringspuffer, I i tabel 1, fortyndingsmiddel til enzymkonjugat, L i tabel 1, fosfatpuffret saltopløsning, M i tabel 1, Tween®-20, N i tabel 1, og enzym-substratfortyndingsmiddel, O i tabel 1.

Tabel 1

Reagenser/materialer

- 5 A: homogeniseringspuffer
- B: en antioxidant
- C: saltindstillingspuffer
- D: et hætteglas med materiale til en præ-immuno forkolonne
 (konserveret med f.eks. natriumbenzoat eller natriumazid)
- 10 E: et hætteglas med materiale til en immuno-affinitetskolonne
 (konserveret med f.eks. natriumbenzoat eller natriumazid)
- F: elueringspuffer
- G: ækvilibreringspuffer
- H: vaskepuffer
- 15 I: neutraliseringspuffer (indeholdende f.eks. NH_4OH)
- J: ELISA-plader, låg til en ELISA-plade, pladeforsegling til
 en ELISA-plade
- K: et hætteglas med LMWOC-enzymkonjugat
- L: fortyndingsmiddel til enzymkonjugat
- 20 M: phophatpufret eller TRIS-pufret saltopløsning
- N: Tween®-20
- O: substratfortyndingsmiddel (indeholdende f.eks. diethanolamin
 eller TRIS-puffer)
- P: substrat, p-nitrophenylphosphat
- 25 Q: blokeringspuffer

Et hidtil ukendt og særdeles værdifuldt træk ved det ovenfor nævnte sæt er, at det omfatter en specifik præ-immuno-forkolonne til anvendelse før immuno-affinitetsoprensningstrinnet v.h.a. immuno-affinitetskolonnen (E). Indbefatningen af

30 nævnte prækolonne i sættet ifølge opfindelsen gør det muligt at oprense vævsekstrakterne på en sådan måde, at de fleste af de komponenter, der ville forstyrre det efterfølgende immuno-affinitetsoprensningstrin og/eller ELISA-trinnet, holdes

35 tilbage på kolonnen. De forbindelser af interesse, der skal analyseres, tilbageholdes ikke på kolonnen, hvilket sikrer opnåelse af kvantitativt pålidelige måleresultater.

Indbefatningen af forkolonnen i nævnte sæt resulterer i en bedre ydelse af immuno-affinitetskolonnen, som skyldes fjernelsen af forstyrrende substanser, der kunne indvirke på bindingen til antigenet og/eller det antal gange, hvor kolonnen
5 kan genanvendes.

Et yderligere særlig værdifuldt træk ved det hidtil ukendte sæt er indbefatningen af sukkerkonserverede og stabiliserede ELISA-plader belagt med polyklonale antistoffer. Dette sikrer
10 en lang holdbarhed for de immobiliserede antistoffer. Sættet ifølge opfindelsen løser således de kendte problemer med bibeholdelse af et sæts aktivitet, selv efter forsendelse og opbevaring i et forlænget tidsrum.

15 Som en yderligere forbedring, der opnås med det nye sæt bør nævnes, at nævnte sæt kan anvendes uden brug af toksiske organiske væsker til elueringsformål.

Udover de helbredsmæssige og sikkerhedsmæssige fordele opnået med den beskrevne fremgangsmåde, bør nævnes en yderligere fordel, nemlig at eluering ved hjælp af vandige opløsninger overvinder de fysiske og praktiske problemer, der skyldes anvendelsen af kendte organiske opløsningsmidler, såsom kvældning og skrumpning af kolonnematerialet på en sådan måde, at pålideligheden og stabiliteten af kolonnerne forlænges betragteligt.
25

Som en yderligere forbedring, der opnås ved hjælp af det hidtil ukendte sæt er anvendelsen af et vandigt elueringsmiddel, der afbryder antigen/antistof-vekselvirkningen, som sikrer, at
30 kun de LMWOC'er, der er specifikt bundet til de immobiliserede monoklonale antistoffer, elueres. En yderligere forbedring opnået med det hidtil ukendte sæt er fravær af forstyrrelse ved den kvantitative bestemmelse i den efterfølgende ELISA.

35

Under udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og/eller under anvendelse af sættet ifølge opfindelsen kan der opstå nogle problemer for de, der ikke er øvet eller specielt fagud-

dannet på området. Vejledning i sådanne tilfælde kan findes i det følgende, hvor zeatin anvendes som ikke-begrænsende eksempel.

5 Forstyrrelse og præcision i immunoanalyse

Kvantificeringssignalet i kompetitive immunoanalyser er en markørfortrængning (enten radioaktiv, fluorescerende eller enzymatisk) fra antistoffet (se skema 1 nedenfor). Signalet tilvejebringer ikke information om kilden til fortrængning. To typer forstyrrelser mødes ved kompetitive immunoanalyser: Forstyrrelser hidrørende fra forbindelser, som er strukturelt beslægtet med analytten, og forstyrrelser, der skyldes opløsningsmiddeleffekt.

15

Hansen et al. har demonstreret, at zeatin-ELISA ikke vil give overensstemmende kvantitativ bestemmelse af cytokininer i råekstrakter fra stængelsegmenter af Zea majs (C.E. Hansen, H. Wenzler og F. Meins jr.: Concentration gradients of trans-zeatin riboside og trans-zeatin in the maize stem. Measurement by a specific enzyme immunoassay. Plant Physiol., bind 75, side 959-963, 1984). Tilstrækkelig oprensning opnåedes ved indførelsen af et butanol-ekstraktionstrin. Prøvefortynding nedsætter forstyrrelser, når opløsningsmiddeleffekter er den fremherskende kilde til forstyrrelse, og også når tilstedeværelsen af krydsreaktive forbindelser er problemet, idet fortynding af prøven ofte nedsætter koncentrationen af de forstyrrende stoffer til under analysens detektionsgrænse (som er høj på grund af den ringe reaktivitet med de fleste potentielle krydsreaktanter), mens koncentrationerne af zeatin og zeatinribosid stadigvæk ligger indenfor måleområdet. Forstyrrelser detekteres som en ulinearitet af analyserespons efter prøvefortynding eller som en mangel på parallellitet med standardkurven. Prøver med højt indhold af cytokininer kan fortyndes yderligere før en analyse udføres ved hjælp af en metode med given følsomhed.

Skema 1:

-< = antistof

<> = zeatin-N9-ribosid

5 <>E = enzymkonjugat

Antistoffer i en ELISA-brønd

10

Zeatinforbindelse i prøven konkurrerer
med enzymkonjugatet om det begrænsede
15 antal tilstedeværende antistoffer

20 Ikke-bundet enzymkonjugat fjernes ved skylning

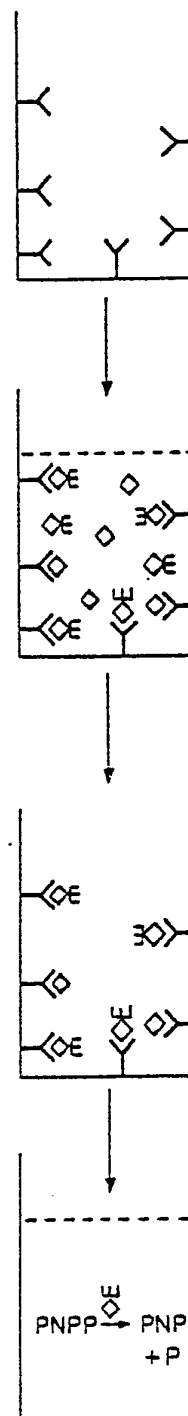
25

Bundet enzymkonjugat omsættes med substratet
(p-nitrophenylphosphat). Produktet er p-nitro-
phenol og måles phenolationen ved 405 nm.

30

Kvantitativ bestemmelse udføres ved hjælp af
en zeatin-N9-ribosid-standard.

35



Validering ved hjælp af successiv approksimation

Forstyrrelse ved immunoanalyser fører til overvurdering af hormonniveauet i planteekstrakter. Sådanne forstyrrelser kan fjernes ved successiv oprensning af prøven, indtil den sidste bestemmelse af plantehormonindholdet ikke er lavere end den foregående. Udtrykket "successiv approksimation" er blevet indført til denne strategi af Reeve og Crozier i Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (J. MacMilland ed.), bind 9, side 203, 1980 og er med held blevet anvendt til analysen af IAA i cambiumvæv af *Pinus sylvestris* (B. Sundberg, G. Sandberg og A. Crozier: Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immuaffinity chromatography. *Phytochemistry*, bind 25, nr. 2, side 295-298, 1986) og til analysen af indol-3-acetamid i tobakkrone galæblevæv (eng: crown galltissue) (P. Ulvskov, J. Marcussen, R. Rajagopal, E. Prinsen, P. Rüdelsheim og H. van Onckelen: Immunoaffinity purification of indole-3-acetamide using monoclonal antibodies. *Plant Cell Physiol.*, bind 28, nr. 5, side 1-9), i begge tilfælde kombineret med immuno-affinitetsoprensning.

Nogle plantematerialer kan analyseres i ELISA i en relativt rå tilstand. Callus- og suspensionsdyrkede celler af gulerødder er materialer af nævnte type.

Opfindelsen belyses yderligere i de følgende eksempler:

Eksempel 1

Ekstraktion, isolering og oprensning af zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin ved hjælp af nævnte fremgangsmåde

Trin I: En ekstraktionspuffer fremstilledes umiddelbart før anvendelsen ved opløsning af 10 mg antioxidant, butyleret hydroxytoluen (bestanddel B i sættet) i 1 ml 96% ethanol. 100 µl af denne opløsning sættes herefter til 48,9 ml 96% ethanol efterfulgt af 250 µl homogeniseringspuffer (1,0 M Hepes, pH 7,5, bestanddel A i sættet). Volumenet indstilledes til 50 ml med vand.

Trin II: 0,5 g bladvæv fra sukkerroer (*Beta vulgaris* L.) småplanter, dyrket under sterile forhold, homogeniseredes til et fint pulver i en morter under flydende nitrogen. Herefter tilsattes 30 ml af ekstraktionspufferen og den resulterende opslæmning fik lov til at opvarme til stuetemperatur. En portion af tritieret zeatin di-alkohol svarende til 17.000 cpm tilsattes herefter, og blandingen centrifugeredes ved 12.000 g i 15 minutter.

10 Trin III: Efter centrifugering overførtes supernatanten (fraktion 1) til en siliconebehandlet glasbeholder og pelleten ekstraheredes yderligere ved resuspendering i 10 ml ekstraktionspuffer. Efter kraftig blanding centrifugeredes blandingen ved 12.000 g i 15 minutter og den resulterende supernatant forenedes med fraktion 1. Pelleten ekstraheredes igen med yderligere 10 ml ekstraktionspuffer. Efter centrifugering ved 12.000 g i 15 minutter forenedes supernatanten igen med fraktion 1. Efter den tredje centrifugering fandtes ingen radioaktivitet i pelleten, hvorefter den bortkastedes.

20 Trin IV: De forenede supernatanter indampedes under reduceret tryk ved 40°C for at fjerne ethanol. Efter fjernelse af ethanol overførtes den tilbageblivende ekstrakt til et Minosorb®-plastikreagensglas. Glasbeholderen vaskedes to gange med 1 ml deioniseret, destilleret vand, og skyllevæskerne sattes til et Minosorb®-plastikreagensglas. Ekstrakten overførtes herefter til en skilletragt, og 3,3 ml n-pentan (1/3 volumen) tilsattes. Efter grundig blanding fik faserne lov til at skille ved stuetemperatur. Det øvre lag fjernedes og bortkastedes. Yderligere 3,3 ml n-pentan tilsattes og ekstraktionen gentoges.

35 Trin V: Den vandige fase overførtes herefter til et siliconebehandlet reagensglas og en enkelt frysning(-80°C)/optøningscyklus udførtes. Efter optøning centrifugeredes ekstrakten ved 12.000 g i 15 minutter. Spor af n-pentan, som forurener den vandige fase, koncentreredes nu på toppen af den vandige fase og fjernedes. Den vandige fase, som indeholder LMWOC'erne fjernedes herefter uden at berøre pelleten.

Trin VI: En præ-immuno-forkolonne (0,3 ml kolonnevolumen) fremstillet under anvendelse af sættets bestanddel D) ækvilibreredes med 1,5 ml bestanddel G (10 gange fortyndet). Immuno-affinitetskolonnen (0,3 ml kolonnevolumen fremstillet under anvendelse af sættets bestanddel E) ækvilibreredes ved anvendelse af 1,5 ml bestanddel F (10 gange fortyndet) efterfulgt af 4,5 ml bestanddel G (10 gange fortyndet).

Trin VII: Kolonnen vaskedes herefter i nævnte rækkefølge med:

10

- (i) 10 ml bestanddel G (10 gange fortyndet) indeholdende 1 nM adenosin, det vil sige sættets bestanddel Q
- (ii) 4,0 ml bestanddel G (10 gange fortyndet)
- (iii) 2,0 ml 1 M NaCl-opløsning
- 15 (iv) 2,0 ml H₂O
- (v) 4,0 ml bestanddel F (10 gange fortyndet)
- (vi) 4,5 ml bestanddel G (10 gange fortyndet)

Trin VIII: Den vandige ekstrakt indeholdende LMWOC'erne af interesse sættes herefter på præ-immuno-forkolonnen forbundet i serie med immuno-affinitetskolonnen. Den udstrømmende væske fra forkolonnen fik således lov til at passere direkte til immuno-affinitetskolonnen med en gennemstrømningshastighed, der ikke overstiger 0,5 ml/min. Præ-immuno-forkolonnen vaskedes herefter med 0,6 ml (2 gange kolonnevolumenet) med bestanddel G (10 gange fortyndet). Denne effluent førtes ligeledes langsomt (mindre end 0,5 ml/min.) til immuno-affinitetskolonnen.

30 Trin IX: Derefter vaskedes immuno-affinitetskolonnen med 1,5 ml bestanddel H (2 gange fortyndet) efterfulgt af 1,5 ml glasdestilleret vand. Begge eluenter bortkastedes.

Trin X: De bundne LMWOC'er elueredes herefter ved at vaske kolonnen 4 gange, hver gang med 1 ml bestanddel F (10 gange fortyndet), og eluatet opsamledes (fraktioner 1-4) og neutraliseredes ved tilsætning af bestanddel I (8 µl/100 µl eluat). Prøverne opbevarede herefter på is, indtil de blev videre

analyseret. Immuno-affinitetskolonnen ækvilibreredes herefter ved skylning med 3,0 ml bestanddel G (10 gange fortyndet).

	Radioaktivitet tilført i det sønderdelte væv	16.700 cpm
5	Radioaktivitet, der forblev i pelleten efter 3. ekstraktion	0 cpm
	Radioaktivitet, der indførtes i immuno-affinitetskolonnen	11.800 cpm
	Effluent	850 cpm
10	Radioaktivitet elueret med NaCl-opløsning	0 cpm
	Radioaktivitet elueret med H ₂ O	0 cpm
	Radioaktivitet elueret med phosphorsyre	
	fraktion 1	6.400 cpm
	fraktion 2	3.600 cpm
15	fraktion 3	750 cpm
	fraktion 4	450 cpm

Fraktion 1 og 2 forenedes og mængden af zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin bestemtes ved hjælp af ELISA.

20

En mikrotiterplade inkuberedes natten over med 200 µl polyklonalt anti-zeatin-ribosidantistof per brønd fortyndet 1:15.000 gange ved 4°C.

25

Herefter

1. vaskedes ELISA-pladen 4 gange med PBS/Tween® vaskepuffer. Mindst 225 µl per brønd per vask anvendtes. Overskydende vaskeopløsning fjernedes ved at duppe med tørt filterpapir.

30

2. sættes til nogle af brøndene prøver, mens standarder eller PBS (baggrund) sættes til de andre. I alle tilfælde anvendtes 100 µl. Alle prøver forefandtes tredobbelt. Mindst to fortyndinger af hver prøve anvendtes til opnåelse af resultater inden for det bedste område i standardkurven (0,05-2 pmol/100 µl).

35

8. Absorbansen ved 405 nm (620 nm som reference) aflæstes på et ELISA-spektrofotometer. Spektrofotometeret subtraherede "baggrunden" i række 1 (A-H).

- 5 Ud fra ELISA-målingerne bestemtes mængden af zeatin og N-9-substituerede derivater af zeatin til 20 pmol per gram frisk vægt af bladvæv.

Eksempel 2

10

Virkning af sukkerbelægning på holdbarhedskarakteristika i et sæt ifølge opfindelsen

15

I dette eksempel beskrives reagenser og materialer, der findes i et sæt ifølge opfindelsen.

A: homogeniseringspuffer: 1,0 M hepes, pH 7,5

B: antioxidant: butyleret hydroxytoluenpuffer

C: saltindstillingspuffer: 3 M NaCl, 0,75 M hepes, pH 7,5

20

D: præ-immuno forkolonne: immobiliseret immunoglobulin

E: immuno-affinitetskolonne: immobiliseret monoklonalt anti-stof

F: elueringspuffer: 1,0 M H₃PO₄, pH 2,5

G: ækvilibreringspuffer: 1,5 M NaCl, 500 mM hepes

25

H: vaskepuffer: 2,0 NaCl, 100 mM hepes

I: neutraliseringspuffer: 1,0 M NaOH

J: ELISA-plader, låg til en ELISA-plade, pladeforsegler til en ELISA-plade

30

K: enzymkonjugat: alikalisk phosphatase konjugeret zeatinribosid

L: fortyndingsmiddel til enzymkonjugat: phosphatpufret saltopløsning (PBS) eller TRIS-pufret saltopløsning (TBS) med 4% polyethylenglycol

M: pufferpulver (PBS eller TBS)

35

N: Tween®-20

O: substratfortyndingsmiddel: diethanolamin (40% (vol/vol)) med Mg, pH 9,8

P: substrat: p-nitrophenylphosphat

Q: blokeringspuffer: 1 nM adenosin opløst i bestanddel G (10 gange fortyndet)

De ovennævnte ELISA-plader fremstilles som følger:

5

Trin I: Transzeatin-N-9-glycosid konjugeres til okseserumalbumin (BSA). Kaniner immuniseres med disse antigene stoffer, og serum fra de immuniserede kaniner, der indeholder immunoglobuliner med høj affinitet til zeatin og zeatin-N-9-substituerede derivater opsamles.

Trin II: Det opnåede antiserum fortyndes 1:15.000 (vol/vol) med natriumcarbonatpuffer (pH 9,2). Proteinbestanddelene i dette serum adsorberes på den glatte overflade af brøndene (200 µl per brønd) på mikrotiter ELISA-pladerne ved inkubering under 4°C i 16 timer.

Trin III: Ikke adsorberede proteiner fjernes ved 4 gange vask med PBS, indeholdende 0,1% Tween®-20.

20

Trin IV: De adsorberede proteiner tørres. Før tørring sættes 200 µl af en 5% (vol/vol) sukkeropløsning i vand til hver brønd. Herefter får pladerne lov til at henstå i 1 time ved 4°C, hvorpå de eventuelt kan tømmes delvist.

25

Trin V: Pladerne nedkøles til -20°C og får lov til henstå i yderligere 1 time ved denne temperatur.

Trin VI: Herefter sænkes temperaturen til -80°C i yderligere 1 time og bagefter frysetørres pladerne i 16 timer.

30

For at vise den gunstige virkning af sukkerkonservering fremstilles til sammenligning også ELISA-plader uden sukkerbelægning.

35

Ubelagte plader og de sukkerkonserverede plader kontrolleredes over en periode på 16 uger under anvendelse af ELISA. 0 pmol zeatin (maksimal markørbinding, det vil sige kun enzymkonju-

gattet adsorberes til antistofferne) sættes til brøndene og resultaterne registreredes som beskrevet i eksempel 1.

Resultaterne er vist i tabel nedenfor.

5

Tabel 2:

Sammenligning af lagringsdygtighed af antistofbelagte ELISA-plader med og uden sukkerbehandling og opbevaret ved +4°C og
10 -20°C.

Antistofaktiviteten udtrykkes som en procentdel af aktiviteten på friske plader. Resultater er gennemsnitsværdier og der udføres tre uafhængige forsøg med det samme antistofpræparat

15

Behandling	saccharose-belagt før frysetørring		ingen behandling	
	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C
uger				
0	100%	100%	100%	100%
5	98%	90%	38%	61%
16	103%	95%	32%	45%

20

25 En tydelig fordel af sukkerbelægning før frysetørring fremgår af tabellen ved begge temperaturer. Næsten intet tab af aktivitet observeres efter 4 måneders opbevaring, hvorimod fravær af sukkerbelægning resulterer i tab på cirka 2/3 af aktiviteten ved +4°C, og cirka 1/2 af aktiviteten ved -20°C efter 4
30 måneders opbevaring.

Eksempel 3

35 Bindingsarten af tritieret zeatin-dialkohol til immunoaffinitetsmatrixen, der viser sig ved effektiviteten af to forskellige elueringssystemer

To immuno-affinitetskolonner, A og B (hver 0,2 ml kolonnevolumen), fremstilledes som beskrevet i eksempel 1, trin VI,

med den undtagelse, at kolonnerne ikke var ækvilibreret med blokeringspuffer (trin VII i eksempel 1). En stipuleret mængde radioaktivitet (se nedenfor) indførtes og bestemtes i efflu-
 enten. Hver kolonne skylledes herefter succesivt med 5 gange
 5 kolonnevolumenet af 1,0 M NaCl-opløsning efterfulgt af 5 gange kolonnevolumen vand. Derefter skylles kolonnerne med 10 gange kolonnevolumenet af 0,1 M phosphorsyre (pH 2,5) efterfulgt af 10 gange kolonnevolumen methanol.

	Kolonner	
	A	B
10		
	Radioaktivitet (cpm) påført immuno- affinitetskolonner	
	16.800	15.500
15		
	Effluent	
	250	200
	Radioaktivitet elueret med NaCl- opløsning	
	< 100	< 100
20		
	Radioaktivitet elueret med H ₂ O	
	< 100	< 100
	Radioaktivitet elueret med phosphor- syre (pH 2,5)	
	8.300	5,400
25		
	Radioaktivitet elueret med methanol	
	7.500	9,800

Som det kan ses, frigives en betragtelig del af radioaktivite-
 ten ved phosphorsyrebehandling. Yderligere skylning med phos-
 phorsyre, selv i en koncentration på 0,25 M (pH 2,5) eluerede
 30 ikke den resterende radioaktivitet.

Det bør understreges, at immobiliseringen af monoklonale anti-
 stoffer på kolonnen, der har den samme associationskonstant
 for substratet, skulle sikre en mere ensartet eluering. At der
 35 skal anvendes methanol til eluering af den resterende radioak-
 tivitet indikerer, at dette bidrag af radioaktiviteten tilba-
 geholdes på kolonnen på en anden måde end den, der kan elueres
 med phosphorsyre.

Eksempel 4

Specificitet af kolonne-bindingssteder

- 5 Virkningen af blokering af ikke-specifikke bindingssteder i immuno-affinitetskolonnen er vist ved dette eksempel. Her fremstilledes tre immuno-affinitetskolonner (0,2 ml kolonnevolumen) nøjagtigt som beskrevet i eksempel 1.

10		Kolonner		
		A	B	C
	Radioaktivitet (cpm) påført immuno-affinitetskolonner	10.500	9.900	9.800
15	Effluent	600	500	650
	Eluat (0,1 M phosphorsyre, pH 2,5)	8.500	9.300	9.150

- 20 Det kan ses, at ækvilibreringen af kolonnen med 1 nM adenosin (i 10 gange fortyndet ækvilibreringspuffer G) sikrer, at det meste, hvis ikke alt, af den indførte radioaktivitet specifikt er bundet til de immobiliserede monoklonale antistoffer og i overensstemmelse hermed elueret med phosphorsyren.

25

Eksempel 5

Anvendelse af zeatin-analysesæt

- 30 1 g cellesuspension ekstraheredes natten over ved -80°C med 9 ml methanol indeholdende 20 mg/l butyleret hydroxytoluen. En portion tritieret zeatin-di-alkohol svarende til ca. 13.000 cpm (tællinger per min.) sættes til ekstrakten.
- 35 Ekstrakten centrifugeredes ved $2.000 \times G$ i 10 min., og den ovenstående væske filtreredes og overførtes til en siliconiseret beholder. De opnåede pellets vaskedes med 10 ml kold methanol, centrifugeredes ved $2.000 \times G$ i 10 min. og den oven-

stående væske filtreredes og forenedes med ekstrakten fra den første centrifugering.

Methanolen afdampedes til næsten tørhed ved 35°C, og remanensen
5 overførtes i et minisorb-rør med 2,5 ml PPS. Prøven ekstrahe-
redes derefter to gange med 1 ml n-pentan.

Prøven blev derefter bragt til -80°C, optøedes og centrifuge-
redes ved 2.000 x G i 10 min. og resten af n-pentan-basen
10 fjernedes fuldstændigt. PBS tilsattes til mærket, dvs. 2,5 ml.

Ekstrakten blev derefter sat til 0,25 ml immunoaffinitetsko-
lonne, ækvilibreret med PBS.

15 Mængden af radioaktivitet i effluenten blev bestemt.

Kolonnen vaskedes derefter med 5 ml PBS og 2,5 ml vand. Der
gennemførtes eluering med 2 ml iskold 100% methanol. Eluatets
radioaktivitet bestemtes.

20

Methanolen afdampedes under en strøm af nitrogen, og prøven
genopløseliggjordes i 1 ml PBS, og prøven analyseredes ved
ELISA. Resultaterne blev givet i zeatin-ækvivalenter.

25 Resultaterne er givet med korrektion for portioner udtaget til
bestemmelse af radioaktiviteten.

Radioaktivitet påført cellesuspensionsprøve	13.020 cpm
Radioaktivitet tilført til kolonnen	10.321 cpm
30 Radioaktivitet fundet i effluenten	616 cpm
Radioaktivitet fundet i eluatet	8.889 cpm
Zeatin-ækvivalenter ved ELISA (korrigeret i overensstemmelse med en total genudvinding af 68%)	150 pmol

35

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til prøveekstraktion, oprensning, opkonc-
5 trering og kvantitativ bestemmelse af lavmolekylære organiske
forbindelser (LMWOC) fra biologiske kilder, såsom planter,
navnlig plantehormonerne cytokininer eller auxiner, hvilken
fremgangsmåde omfatter at underkaste prøven i form af en iso-
leret ekstrakt af biologisk materiale påsat via en præ-immuno-
10 forkolonne eller direkte et immuno-affinitetsoprensningstrin
under anvendelse af et selektivt første antistof, efterfulgt
af en enzym-bundet immunosorptionsanalyse (ELISA) under anven-
delse af et antistof stabiliseret ved hjælp af sukker, k e n -
d e t e g n e t ved, at man som det selektive, første anti-
15 stof i oprensningstrinnet anvender et antistof med gruppespe-
cificitet; at det første antistof er kovalent bundet til en
matrix uden tab af bindingskapacitet for det pågældende anti-
gen; at man binder de lavmolekylære organiske forbindelser
reversibelt til en immuno-affinitetskolonne under anvendelse
20 af vandige reagenser; at man eluerer ved hjælp af et opløs-
ningsmiddel valgt blandt organiske eller vandige opløsnings-
midler; og at man anvender et andet antistof, der er forskel-
lig fra det første antistof, som antistoffet ved ELISA.
- 25 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
man anvender et monoklonalt antistof som det første antistof
til oprensningen, og at man anvender et polyklonalt antistof
som det andet antistof ved ELISA.
- 30 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t
ved, at man som det første antistof til oprensningen anvender
et monoklonalt antistof, der er kovalent bundet til matrixen
over en amidbinding.
- 35 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at
amidbindingen indføres ved hjælp af en succinyl-aktiveret car-
boxylgel.

5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst at kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at de lavmolekylære organiske forbindelser specifikt elueres ved hjælp af et opløsningsmiddel valgt blandt vandige opløsningsmidler og organiske opløsningsmidler.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at der som opløsningsmiddel anvendes 0,1 M phosphorsyre med pH 2,5 eller methanol.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at forstyrrende stoffer fjernes ved at lede ekstrakten gennem en præ-immun-forkolonne bestående af en egnet matrix, hvortil en præ-immunoglobulinfraktion er immobiliseret kovalent.

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes ELISA-plader, hvorpå det polyklonale antistof er stabiliseret ved hjælp af en sukkerart.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte sukkerarter er fructose, saccharose, sorbitol eller inositol, fortrinsvis saccharose.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at der under immuno-affinitetsoprensningstrinnet undgås ikke-specifik adsorption til immuno-affinitetskolonnen ved at belægge resterende ikke-specifikke bindingssteder med adenosin eller lignende organiske molekyler, som ikke udviser signifikant krydsreaktivitet med det selektive antistof og/eller andre reagenser, der anvendes til ekstraktion, oprensning, opkoncentrering og den kvantitative bestemmelse af LMWOC'er, især cytokininer eller auxiner.

11. Analysesæt til udførelse af fremgangsmåden ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at består af i. bestanddele, der kræves til prøveekstraktion og oprensning,

og

ii. bestanddele, der kræves til anvendelse ved en enzymbundet immunosorptionsanalyse.

- 5 12. Analysesæt ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at det består af
- I. bestanddele, der kræves til prøveekstraktion, oprensning og opkoncentrering, og som omfatter bestanddele valgt blandt gruppen, der består af A, B, C, D, E, F, G, H, I, Q:
- 10 bestanddel A: homogeniseringspuffer (til anvendelse ved vævs-ekstraktion)
- bestanddel B: en antioxidant (til anvendelse ved vævsekstraktion)
- bestanddel C: saltindstillingspuffer (til anvendelse ved prø-
- 15 veekstraktion)
- bestanddel D: et hætteglas, der indeholder en passende matrix, til hvilken en præ-immunoglobulinfraktion kovalent er immobiliseret, idet nævnte matrix anvendes til fremstillingen af en præ-immunoforkolonne
- 20 bestanddel E: et hætteglas, der indeholder en passende matrix, til hvilken et selektivt antistof kovalent er immobiliseret, idet nævnte matrix anvendes til fremstilling af immuno-affinitetskolonnen
- bestanddel F: elueringspuffer (til anvendelse ved prøveeks-
- 25 traktion)
- bestanddel G: ækvilibreringspuffer (til anvendelse ved prøveekstraktion)
- bestanddel H: vaskepuffer (til anvendelse ved prøveekstraktion)
- 30 bestanddel I: neutraliseringspuffer (til anvendelse ved prøveekstraktion)
- bestanddel Q: blokeringspuffer (til anvendelse ved prøveekstraktion);
- II. bestanddele, der kræves til kvantitativ bestemmelse af prø-
- 35 ven, og som omfatter bestanddele valgt blandt gruppen bestående af J, K, L, M, N, O, P:
- bestanddel J: en egnet beholder belagt med et passende antistof til kvantitativ bestemmelse af prøven, låg til en ELISA-

plade, pladeforsegler til en ELISA-plade

bestanddel K: et hætteglas med LMWOC-enzymkonjugat

bestanddel L: fortyndingsmiddel til enzymkonjugat

bestanddel M: phosfatpufret eller TRIS-pufret saltopløsning

5 bestanddel N: Tween®-20

bestanddel O: substratfortyndingsmiddel

bestanddel P: substrat, p-nitrophenylphosphat.

10 13. Sæt ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddel K er et konjugat af zeatinribosid og alkalisk phosphatase.

14. Sæt ifølge krav 11-12, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddel J er en mikrotiterplade.

15

15. Anvendelse af et sæt ifølge krav 11-14 til udførelse af fremgangsmåden ifølge krav 1-10.

20

25

30

35