



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320170

G 01 N 33/546, 33/58, 33/50

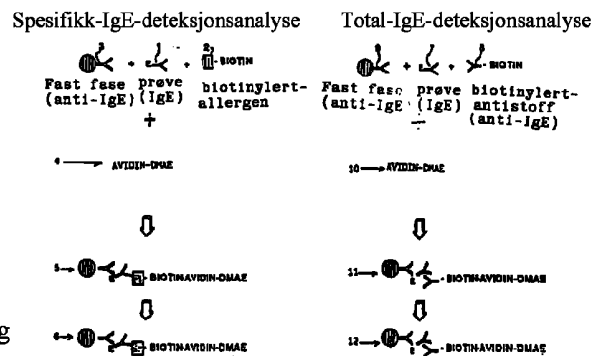
(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19951875	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.11.15 PCT/DK93/00373
(22)	Inng.dag	1995.05.11	(85)	Videreføringsdag	1995.05.11
(24)	Løpedag	1993.11.15	(30)	Prioritet	1992.11.13, DK, 1379/92
(41)	Alm.tilgj	1995.05.11			
(45)	Meddelt	2005.11.07			
(73)	Innehaver	ALK AS, Bøge Allé 10-12, DK-2970 Hørsholm, DK			
(72)	Oppfinner	Niels Johansen, Allerød, DK Hans Henrik Ipsen, Hillerød, DK			
(74)	Fullmektig	Ellen Holm - Bryns Zacco AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å måle konsentrasjonen og/eller det relative innholdet av et spesifikt antistoff i en prøve og anvendelser derav.
(56)	Anførte publikasjoner	Clinical and Experimental Allergy, Vol. 22, 1992, J. KLEINE-TEBBE et al., s. 475 - 484, se s. 476 og ref. 5, 6 and 15. Methods in Enzymology, Vol. 73, 1981, J.L. GUESDON et al., s. 471. National Library of Medicine, File Medline, NLM Accession nr. 87281685, HART, R.C., J. Immunol. Methods juli 1987; 101(1), 91-6.
(57)	Sammendrag	

Fremgangsmåte for detektering av et antistoff i en prøve ved anvendelse av en markør og som omfatter trinnene av å blande et ligand antigen, antistoff eller hapten bundet til biotin med en prøve, et antistoff rettet mot antistoffet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler og en kjemiluminescerende akridiniumforbindelse bundet til avidin eller streptavidin for å danne et fast fase kompleks, separering av den faste fasen fra den flytende fasen og analysering av den separerte faste fasen for tilstedeværelse av kjemiluminescenskompleks.



Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å detektere et antistoff i en prøve ved anvendelse av en kjemiluminescens merkende forbindelse. Oppfinnelsen vedrører spesielt anvendelse av en kjemiluminescens akridinium esterforbindelse koblet til avidin eller streptavidin, og en ligand koblet til biotin i en 2-sete immunoanalyse hvor

5 affinitetskomplekset blir oppfanget på paramagnetiske partikler som muliggjør en hurtig deteksjon og/eller kvantifisering av de immunologiske aktive forbindelsene, så som antistoffer i prøven så som biologiske fluider og vevsprøver, melk, matvareprøver, forfriskninger, vann eller industrielt avløp.

10

En fremgangsmåte for detektering og kvantifisering av immunoglobulin E-antistoffer i serum er beskrevet i brosjyren "Specific IgE, Magic Lite SQ™", publisert av Ciba Corning Diagnostic Corp. og ALK Laboratories i september 1990. I nevnte fremgangsmåte er et spesifikt allergen kovalentlig bundet til paramagnetiske partikler og reagerer med det

15 allergen-spesifikke IgE-antistoffet i en serum eller plasma prøve. Etter den første inkubasjonsperiode og bortvasking av ubundet uspesifikt IgE blir et kjemiluminescens akridinium ester-merket monoklonalt antistoff mot IgE tilsatt. Etter en ytterligere inkubasjonsperiode blir fast fase bundet og merket antistoff målt i en Magic Lite Analyzer (Cat. No. 472733 eller Cat. No. 472270) som automatisk injiserer reagenser, som initierer

20 kjemiluminescensreaksjonen. Ved anvendelse av nevnte fremgangsmåte kan bare det endelige trinnet som omfatter initiering og måling av kjemiluminescensen bli automatisert. Kjemiluminescens akridiniumestermerkende forbindelse er beskrevet i US-PS 4.745.181.

US-PS 4.946.958 beskriver en kjemiluminescens acridiniumester koblet til en N-succinimidyl del som kan bli ytterligere koblet til et protein eller polypeptid for å

25 tilveiebringe et immunologisk reaktivt luminescensreagens. Nevnte reagens kan bli anvendt i immunoanalyse som innbefatter samtidig binding av et fast fase antistoff, et antigen molekyl og et merket anti-antistoff, separering og vasking av den faste fasen og kvantifisering av luminescensen til den faste fasen.

30

Strasburger et al., beskriver i *Methods in Enzymology*, 184(1990), s 481-496 anvendelse av to-sete kjemiluminescens immunoanalyse hvor hGH og hCG hormoner blir oppfanget av antistoffer immobilisert på mikrotiterskåler og merket med et kjemiluminescensmiddel koblet til avidin gjennom et biotin merket andre antistoff. Antigeniske analyter, så som

35 proteinhormoner, kan bli analysert direkte fra serumprøvene og sammenlignet med standardkurvene. Konsentrasjonen av immunoglobuliner, så som IgE, er derimot meget pasientavhengig og en analyse av et spesifikt IgE må bli sammenlignet med pasientens

individuelle nivå av total IgE og krever derfor en analyse som har et høyere dynamisk område enn det som er oppnåelig i analysen beskrevet av Strasburger et al.

EP-A-0 425 217 beskriver en hybridiseringsanalyse hvor et kjemiluminescenskompleks blir
5 dannet som omfatter en nukleinsyre hybridisert med en første merket nukleotidprobe koblet
til paramagnetiske partikler og en andre nukleotidprobe koblet til biotin og koblet til en
avidin-acridiniumester. Fagfolk innenfor dette området, som blir konfrontert med
problemet med å unngå en fullstendig automatisert fremgangsmåte for detektering av
antistoffer, vil søke etter en fremgangsmåte som kan bli utført i en reaksjonsbeholder og
10 fortrinnsvis under omgivende reaksjonsbetingelser. Analysen representert heri er
fundamentalt forskjellig på grunn av at den anvender deteksjon av spesifikke
nukleotidsekvenser, som ikke er antigener som det kan bli dannet spesifikke antistoffer
mot. Det er spesielt nødvendig i nevnte analyse å anvende forhøyede temperaturer for
hybridisering og en haptent-oligonukleotidprobe som ikke er nødvendig eller ønskelig i
15 immunoanalysene.

Frem til nå har immunoanalyser for kvantifisering av immunologiske aktive molekyler, så
som immunoglobuliner (for eksempel spesifikt immunoglobulin-E), i biologiske væsker, så
som serum, vært manuelle, for eksempel enzytbundet immunosorbent analyse (ELISA)
20 eller semi-automatiske. Den vanlige varigheten av en semiautomatisert immunoanalyse, så
som Magic Lite SQTM spesifikk IgE analyse referert til ovenfor, er på omtrent 2 timer.

Kommersielle spesifikke IgE analyser (CAP, RAST, fra Pharmacia, Uppsala) og Magic
Lite SQTM spesifikk IgE analyse anvender en total-IgE referanseanalyse som har en
25 ikke-identisk protokoll som resulterer i unøyaktige data. Bare analyser som anvender
samme oppfangning og deteksjonsprosedyrer er direkte sammenlignbare. For eksempel må
alle spesifikke IgE nær responskurver være parallelle med totale IgE responskurver.
Grunnen for dette er at det nødvendige dynamiske området for en spesifikk (eller total
spørsmålstegn) IgE analyse er to dekadere og det nødvendige dynamiske området for en
30 total IgE analyse er fra 2 til 7 dekadere, og eksisterende immunoanalyser muliggjør ikke
konsentrasjonsmålinger over hele området. Frem til nå har det vært nødvendig å anvende
forskjellige protokoller for spesifikke og totale immunoglobulinanalyser som har
forskjellige reagenser.

35 På grunn av den økende interessen for trygge laboratorieprosedyrer er det et behov for en
fullstendig automatisert fremgangsmåte for å detektere forbindelser, så som antistoffer, i
biologiske fluider, så som humant serum, plasma, blod, melk, urin eller spytt, og

fremgangsmåtene bør tilveiebringe en minimalisert risiko for kontakt med skadelige fluider. Den økende bruken av laboratorietester i diagnostiske tilfeller for metoder med kort varighet, fortrinnsvis bare noen få minutter.

- 5 Det er derfor en hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for å detektere et antistoff i en prøve og fremgangsmåten er trygg, hurtig og fullstendig automatiserbar.

10 Foreliggende oppfinnelse omfatter således anvendelse av en kjemiluminescensmerkingsforbindelse for å detektere et antistoff i en prøve, valgt blant: N-hydrokso-succinimidmetylacridiniumester, luminol, lucigenin, lofin, eller andre luminiscensmerkede forbindelser som kan bli bundet til avidin eller streptavidin eller et funksjonelt derivat derav, utført ved å

- 15 a) blande et ligand antigen, antistoff eller haptent bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff rettet mot antistoffet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler og en kjemiluminescensakridiniumforbindelse bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et fast fase bundet kompleks,
- 20 b) magnetisk separering av den faste fasen fra den flytende fasen,
- c) initiering av kjemiluminescensreaksjonen og analysering av den separerte faste fasen for tilstedeværelse av kjemiluminescenskompleks, hvor tilstedeværelse av kjemiluminescensen er en indikasjon på tilstedeværelse av nevnte antistoff i nevnte prøve.

25 Til tross for at anvendelsen ifølge oppfinnelsen kan bli utført ifølge ovennevnte definerte trinn (a), (b) og (c) er det foretrukket å tilsette merkingsforbindelsen i et separat trinn og fremgangsmåten blir fortrinnsvis utført ifølge følgende trinn:

- 30 i) blanding av ligand antigen, antistoff eller haptent bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav med prøven og antistoffet rettet mot antistoffet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler for å danne et første fastfasekompleks,
- ii) tilsetning av en kjemiluminescens acridiniumforbindelse kovalent bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav, for å danne et andre fast fasekompleks,
- 35 ii) magnetisk separering av den faste fasen fra den flytende fasen;
- iv) initiere kjemiluminescensreaksjonen og analysere den separerte faste fasen for

tilstedeværelse av kjemiluminescens kompleks.

En spesiell hensikt ifølge oppfinnelsen er å tilveiebringe en fullstendig automatiserbar immunoanalyse for kvantifisering av spesifikke antistoffer, så som immunoglobuliner, hvor
5 en sann parallell referanse immunoanalyse ved anvendelse av en identisk protokoll blir anvendt som referanse.

Hensikten med å kvantifisere spesifikke antistoffer ved anvendelse av en sann parallell referanse immunoanalyse blir oppnådd ifølge en fremgangsmåte for måling av
10 konsentrasjonen og/eller de relative innholdene av et spesifikt antistoff i en flytende prøve.

Foreliggende oppfinnelse omfatter således en fremgangsmåte for å måle konsentrasjonen og/eller det relative innholdet av et spesifikt antistoff i en prøve, i det den målte lysemisjonen til en separert fast fase omfattende et oppfanget spesifikt antistoff koblet til en
15 kjemiluminescensmarkør blir sammenlignet med den målte lysemisjonen oppnådd i en parallell referanse immunoanalyse hvor det totale innholdet av klassen av antistoffer i prøven som nevnte spesifikke antistoff hører til blir målt, kjennetegnet ved følgende trinn:

- a) blanding av et ligand antigen eller haptent overfor hvilket det spesifikke antistoffet som
20 skal bli målt er direkte bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff rettet mot den konstante delen av antistoffet som skal bli målt bundet til paramagnetiske partikler; og en kjemiluminescensakridinium forbindelse bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et første fast fase kompleks,
- 25 b) magnetisk separering av nevnte første faste fase fra den flytende fasen,
- c) initiering av en kjemiluminescens reaksjon og måling av lysemisjonen til den separerte første faste fasen,
- d) blanding av et ligand antistoff rettet mot klassen av antistoffer som skal bli målt bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff rettet mot kontrastdelen av
30 klassen av antistoffer som skal bli målt bundet til paramagnetiske partikler; og en kjemiluminescens akridiniumforbindelse bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et andre fast fase kompleks,
- e) magnetisk separering av nevnte andre faste fase fra den flytende fasen,
- f) initiering av kjemiluminescensreaksjonen og måling av lysemisjonen til den separerte
35 andre faste fasen og
- g) sammenligning av lysemisjonen til den separerte første faste fasen med den til den separerte andre faste fasen.

I en foretrukket utførelsesform av fremgangsmåten beskrevet ovenfor i trinn a) blir utført ved

- 5 (i) blanding av ligand antigen eller hepten bundet til bioten eller et funksjonelt derivat derav med prøvene og antistoffet bundet til paramagnetiske partikler for å danne et fast fase kompleks og
- (ii) tilsetning av kjemiluminescens acridinium forbindelse bundet til avidin, streptavidin
10 eller et funksjonelt derivat derav for å danne nevnte første faste fase kompleks, og trinn d) blir utført ved
- (i) blanding av ligand antistoff bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav med prøven og antistoff bundet til paramagnetiske partikler for å danne et fast fase kompleks og
15 (ii) tilsetning av kjemiluminescens acridin forbindelse kovalentlig bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav for å danne nevnte andre faste fase kompleks.

Spesifikt antistoff som skal bli målt i prøven er fortrinnsvis et spesifikt immunoglobulin valgt fra gruppen bestående av IgA, IgD, IgE, IgG, IgM og isotyper derav, og lignand
20 antigen, antistoff eller haptent rettet mot den variable delen av nevnte antistoff er et alleregen, og klassen av antistoffer er fortrinnsvis en klasse av immunoglobuliner valgt fra gruppen bestående av total IgA, total IgD, total IgE, total IgG, total IgM og isotyper derav, og ligand antigen, antistoffer eller haptent er et antistoff rettet mot nevnte klasse av immunoglobuliner.

25 Det spesifikke immunoglobulinet er fortrinnsvis et spesifikt IgE, og klassen av antistoffer er total IgE.

30 Antistoffet rettet mot antistoffet som skal bli målt bundet til paramagnetiske partikler blir fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer inkludert rekombinante antistoffer, fragmenterte antistoffer, fortrinnsvis et monoklonalt muse anti-immunoglobulin.

Fordelene ifølge oppfinnelsen er:

- 35
- alle reagensene kan bli blandet samtidig i en reaksjonsbeholder som minimaliserer risikoen for kontaminering, feil og driftstrinn, reduserer betraktelig varigheten av

immunoanalysen, og letter betraktelig automatisering av prosessen og presisjonen blir forbedret, jfr. eksempel 6;

- kvantifisering av spesifikke antistoffer i for eksempel en serumprøve kan bli utført med referanse til en sann parallell total antistoff analyse ved anvendelse av en identisk protokoll, jfr. eksempel 3;
 - den oppnådde høyere kapasiteten og sensitiviteten letter det at selv meget lave konsentrasjoner av immunoglobuliner og lave konsentrasjoner av spesifikke immunoglobuliner kan bli detektert, jfr. eksemplene 1, 2 og 7.
- 10 En foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en immunoanalyse for deteksjon av antistoffer, så som spesifikke immunoglobuliner (IgA, IgE, IgG, IgM og isotyper derav) i en prøve, så som serum eller spytt.

Oppfinnelsen kan spesielt bli anvendt i en analyse for deteksjon og kvantifisering av spesifikt IgE i en prøve. Når prøven er flytende, for eksempel serum eller plasma, kan den bli tilsatt direkte til en reaksjonsbeholder som omfatter fortrinnsvis et monoklonalt muse anti-IgE antistoff bundet til suspenderte paramagnetiske partikler og et spesifikt allergen (ligand) bundet til biotin i et vandig medium. Biotin er fortrinnsvis biotin amidocaproat N-hydroksysuccinimidester (Sigma Catalog No. B2643). Når prøven er ikke-flytende, for eksempel en vevsprøve, blir den fortrinnsvis homogenisert og suspendert i en vandig væske. En samtidig reaksjon mellom spesifikt IgE i prøven, allergen og monoklonalt anti-IgE antistoff i det vandige mediet resulterer i dannelsen av et konjugat. En kjemiluminescensmerkende forbindelse, fortrinnsvis en acridiniumester koblet til streptavidin (Sigma Catalog No. S4762) (avidin-DMAE) blir tilsatt til reaksjonsbeholderen og en bindingsreaksjon mellom avidin-DMAE og biotin bundet til konjugat og ukonjugert allergenbundet biotin foregår. Den konjugatbundne markøren blir separert fra det ubundne DMAE-merkede antistoffet ved magnetisk separering av reaksjonsblandingen og dekantering av supernatanten. Kjemiluminescensen til det separerte konjugatet blir målt som beskrevet i Pazzagli, M. et al. (eds.). Studier og anvendelser i "Biology & Medicine", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 4(1), 1-646, 1989.

Som en referanse blir en som parallell total-IgE immunoanalyse som bare er forskjellig ved at et foretrukket polyklonalt anti-IgE antistoff bundet til biotin blir anvendt som ligand utført samtidig.

Figur 1 er en diagramatisk representasjon av en spesifikk IgE analyse ifølge oppfinnelsen og omfatter en parallell total IgE referanseanalyse. I figuren representerer (1) det spesifikke

IgE-antistoffet som skal bli detektert, (2) er et spesifikt allergen bundet til biotin, (3) er et monoklonalt muse anti-IgE bundet til paramagnetiske partikler (4) er en avidin-acridinium ester og (5) representerer fast fase merket kompleks dannet mellom (1), (2), (3) og (4) og innbefatter eventuell inkubasjon, separering og eventuelle vasketrinn, og (6) representerer et sluttrinn for initiering av kjemiluminescensreaksjonen og måling av lysemisjonen.

I total IgE referanseanalyse i figur 1 representerer (7) IgE (WHO 75/502 IU/ml), (8) er polyklonalt anti-IgE bundet til biotin, (9) er monoklonalt muse anti-IgE bundet til suspenderte paramagnetiske partikler, (10) er en avidin-acridinium ester og (11) representerer fast fase merket kompleks dannet mellom (7), (8), (9) og (10) og innbefatter eventuell inkubasjon, separering og eventuelle vasketrinn, og (12) er sluttrinnet for initiering av kjemiluminescensreaksjonen og måling av lysemisjonen.

Immunoanalysen som anvender fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan bli utført i ACS:180 fullstendig automatisk analysator produsert av Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, Mass., U.S.A. I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er den immunologiske aktive forbindelsen som skal bli detektert et antistoff, for eksempel mot penicillin eller derivater derav, så som benzyl penicillin, penicilloyl, osv. og liganden bundet til biotin er et haptent, så som penicillin eller derivater derav.

20

Definisjoner

I fremgangsmåten eller anvendelsen ifølge oppfinnelsen er antistoffet som skal bli detektert et spesifikt immunoglobulin, fortrinnsvis et spesifikt IgA, IgD, IgE, IgG, IgM og isotyper derav, og fortrinnsvis et spesifikt IgE, eller en klasse av antistoffer, så som immunoglobuliner, fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av total IgA, total IgD, total IgE, total IgG, total IgM og isotyper derav, fortrinnsvis total IgE.

Med prøve menes en hvilken som helst væske eller flytende prøve, inkludert oppløsninger, emulsjoner, dispersjoner og suspensjoner.

30

Ligand antigen, antistoff eller haptent bundet til biotin kan være en hvilken som helst immunologisk aktiv forbindelse, så som et allergen, antistoffer, så som polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer inkludert rekombinante antistoffer eller fragmenterte antistoffer, fortrinnsvis et allergen og/eller et polyklonalt anti-immunoglobulin, så som geite anti-humant polyklonalt serum oppnådd fra Ventrex Laboratories, Inc., Portland, Maine, Catalog No. 77660. I referanse immunoanalysen er nevnte antistoff fortrinnsvis rettet mot den konstante delen av klassen av antistoffer som skal bli målt, dvs. et antistoff

35

rettet mot IgE-antistoffer.

Med biologisk fluid menes en hvilken som helst klinisk prøve, så som blod, plasma, serum, urin eller spytt, som også innbefatter et hvilket som helst biologisk fluid som blir utskilt eller transportert inne i en organisme.

Med paramagnetiske partikler (PMP) menes partikler som kan bli dispergert eller suspendert i et flytende medium. I eksemplene blir det anvendt BioMag partikler (jernoksid partikler belagt med aminterminerte grupper) solgt av Magnetics Inc., Cambridge, Massachusetts. Antistoffer koblet til PMP er fortrinnsvis rettet mot den konstante delen av antistoffene som skal bli detektert eller målt og kan være polyklonale eller monoklonale med antistoffer inkludert rekombinante eller fragmenterte antistoffer, fortrinnsvis et monoklonalt antistoff MAb A 5697-1A3(920325) fra BioInvent International AB, lund, Sverige.

Kjemiluminescens acridiniumforbindelsen er fortrinnsvis N-hydrokxy-succinimidmetylacridiniumester kovalentlig bundet til avidin eller streptavidin (avidin-DMAE). Avidin og DMAE blir ifølge fremgangsmåten til Weeks et al., Clin. Chem. 29/8, 1474-1479 (1983). Andre luminescensmerkende forbindelser som kan bli bundet til avidin eller streptavidin, kan bli anvendt i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. For eksempel luminol, lucigenin eller lofin.

Fremstilling av biotinylerte antistoffer

25 Biotinylerte anti-IgE og Phleum pratense:

Geite anti-humant polyklonalt serum (Ventrex laboratories, Inc. MA, USA) blir rensset ved affinitetskromatografi på CNBr-aktivert sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sverige) med myeloma IgE (OEM concepts, USA) som en ligand. Anti-IgE blir biotinylert med forholdet mol biotin:mol anti-IgE = 41:1.

9 µl biotin (Biotin amidocaproat N-hydroksysuccinimidester (Sigma) 25 mg/ml i dimetylformamid (Merck) blir tilsatt til 0.4 ml abti-IgE 4.5 mg/ml i 0.1 M NaHCO₃ (Merck). Reagensene blir inkubert i en "ende over ende" blander i 2 timer ved 25°C. 0,9 ml lysin (Sigma) oppløsning 20 mg/ml NaHCO₃ blir tilsatt. Oppløsningen blir filtrert og biotinylert antistoff blir rensset ved størrelseskromatografi på superdex 75 Hiloal 16/60 (Pharmacia, Uppsala, Sverige). Sammenslåtte fraksjoner blir fortynnet i fosfatbuffret

saltvann PBS, pH 7.2, inneholdende 0,1% humant serumalbumin (Sigma) 0,1% NaN₃ (Sigma).

- Phleum pratense ekstrakt (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) blir biotinyllert i det molare forholdet 10:1 0,65 ml biotin 10 mg/ml blir tilsatt til 0.43 ml 10 mg/ml Phleum pratense i 0.1 M NaHCO₃. Reagensene blir inkubert i 2 timer ved 25°C i "end over end" blander, etter inkubasjonen blir 40 µl lysin (Sigma) oppløsning 50 mg/ml blir tilsatt. Opp-løsningen blir filtrert og biotinyllert antistoff blir renset fra overskudd biotin ved størrelses eksklusjonskromatografi på superdex 75 Hiload 16/60 (Pharmacia). Fraksjoner inne-
- 10 holdende allergenene blir slått sammen. Biotinyllert Phleum pratense blir fortynnet med PBS pH 7.2, inneholdende 0,1% humant serum albumin (Sigma) og 0,1% NaN₃ (Sigma).

Fremstilling av streptavidin-acridiniumestermarkøren

- Streptavidin ble konjugert med DMAE-NHS, [2',6'-dimetyl-4'-(N-succinimidyloksykarbonyl)fenyl-10-metylacridinium-9-karboksylatmetosulfat] ved anvendelse av fremgangsmåten til Weeks et al., Clin.Chem. 29/8, 1774-1479 (1983).
- 15

Fremstilling av streptavidin-acridiniumester markør:

- 0,96 mg N-hydroksysuccinimidimetylacridiniumester DMAE (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA, USA) blir fortynnet i 1,92 ml dimetylformamid. 250 µl av denne oppløsningen blir pipettert til 2,5 ml 1 mg/ml streptavidin (Sigma) i 0.1 M natriumdihydrogenfosfat, 0,15 M NaCl pH 8.15.
- 20

- Luften over oppløsningen i beholderen blir utskiftet med nitrogen, (AGA). Reagensene blir inkubert i 30 min. ved 25°C under omrøring, etter inkubasjon blir 2250 µl 10 mg/ml lysin 0,1 M natrium dihydrogenfosfat (Merck), 0,15 M NaCl (merck) pH 8.15 tilsatt. For å fjerne ubundet DMAE blir oppløsningen applisert på en PD-10 kolonne (Pharmacia, Uppsala, Sverige). Eluatet blir samlet og renset ved ultrafiltrering ved anvendelse av et cellulose Minitan-S filterark 10.000 NMWL (Millipore). Filtreringen blir utført med 1,5 l fosfatbuffret saltvann, PBS pH 7.2. Resten blir konsentrert til 25 ml og 25 ml PBS pH 7.2 inneholdende 0.5% HSA (Sigma) og 0.1% NaN₃ (Sigma) blir tilsatt.
- 25
- 30

Oppfinnelsen vil bli beskrevet i detalj i følgende eksempler.

Immobilisering av antistoff til paramagnetiske partikler

6,5 g paramagnetiske partikler (Ciba Corning Diagnostics Corp., MA, USA) blir vasket i 650 ml metanol (Merck) 3 ganger ved anvendelse av magnetisk separering. En vasking med 650 ml 0,01 M acetatbuffer pH 5.5 blir utført to ganger. Partiklene blir aktivert i

5 6,25% glutaraldehyd (Merck), 0.01 M acetatbuffer pH 5.5 i 3 timer ved 25°C. Partiklene blir vasket tre ganger i 650 ml 0,01 M acetatbuffer pH 5.5. Partiklene blir koblet med 1083 mg monoklonalt anti-IgE antistoff (ALK Laboratories, Hørsholm, Danmark) spesifikt mot IgE Fc domenen, i 24 timer ved 25°C. Partiklene blir vasket to ganger i 0,01 M acetatbuffer

10 pH 5.5. Blokkering av overskudd av aktive grupper blir utført med 200 ml 10% IgE strippet serum (ALK Laboratories, Hørsholm, Danmark) i 24 timer ved 25°C. Partiklene blir vasket i 650 ml 0.01 M fosfatbuffer (Merck) etterfulgt av tre vaskinger i 650 ml 1 M NaCl (Merck). Partiklene blir vasket tre ganger i 0,01 M fosfatbuffer. Partiklene blir resuspendert i 650 ml PBS pH 7.2, 0.1% v/v bovint serumalbumin (Sigma), 0,001% bovint gamma-

15 globulin (Sigma) og varmebehandlet i 18 timer ved 50°C. Partiklene blir vasket tre ganger i 650 ml PBS pH 7.2, 0.1% v/v bovint serumalbumin (Sigma). 0,001% bovint gamma globulin (Sigma). Partiklene blir varmebehandlet i 7 dager ved 37°C. Partiklene blir vasket i 0.01 M fosfatbuffer to ganger. Partiklene blir fortynnet til 0,5 g pr l i PBS pH 7.2, 0,5% humant serumalbumin (Sigma).

20 Eksempel 1

Deteksjon og kvantifisering av antigen (total IgE)

Bestemmelse av totale IgE antistoffer, ifølge oppfinnelsen, ble utført på Ciba Corning ACS:180 Benchtop Immunoassay analyser beskrevet i *Clinical Chemistry*, 36/9, 1598-1602 (1990), ved anvendelse av følgende protokoll:

25

50 µl prøve og 50 µl biotinyllert anti-IgE blir overført av prøveproben inn i kuvetten. Kuvetten når den første reagensproben R1, i det 100 µl paramagnetiske partikler med immobilisert monoklonalt anti-IgE antistoff (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) spesifikt mot IgE Fc domenen blir dispergert sammen med 200 µl streptavidin-acridinium-

30 estermarkør (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark). Kuvetten flytter seg nedover linjen til magnetene og vasker stasjonen. Vasking med 750 µl deionisert vann blir utført to ganger. Etter fullført vaskesyklus blir partiklene resuspendert i 300 µl 0,5 g/l H₂O₂ i 0,1 M HNO₃. Kuvetten går inn i luminometerrommet og foran fotomultiplier blir 300 µl 25 mM NaOH oppløsning tilsatt og protonene av lys som blir immitert blir målt og kvantifisert og

35 uttrykt som relative lysenheter (RLU). Mengden av RLU er direkte proporsjonal med mengden av IgE i prøven. Tidspunkt fra prøvedispensjon til første resultat er 15 min. og et nytt resultat fremkommer hvert 20. sekund. Resultatene ble uttrykt som RLU

eksperiment/RLU bakgrunn, mens RLU bakgrunn var kjemiluminescens reaksjon observert i fravær av total IgE.

- 5 Ni totale IgE standarder, beregnet i Magic Lite Total IgE Kit (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) mot WHO andre IRP uten 75/502 for humant serum IgE, ble analysert ved anvendelse av protokollen beskrevet ovenfor og det er vist at 0,1 IU/ml total serum IgE kunne bli detektert (som målt ifølge bakgrunn x 10 standard avvik), se figur 2.

Eksempel 2

- 10 Deteksjon og kvantifisering av spesifikt antistoff (spesifikt IgE)
Bestemmelse av Phleum pratense spesifikke IgE antistoffer (timotei spesifikt IgE, ifølge oppfinnelsen, ble utført på Ciba Corning ACS:180 Benchtop Immunoassay analysator beskrevet i Clinical Chemistry, 36/9, 1598-1602 (1990), ved anvendelse av følgende protokoll:
- 15 50 µl prøve og 50 µl biotinyleret Phleum pratense blir overført av prøveproben inn i kuvetten. Kuvetten når første reagensprobe R1, hvor 100 µl paramagnetiske partikler med immobilisert monoklonalt anti-IgE antistoff (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) spesifikt overfører IgE Fc domenen blir overført sammen med 200 µl streptavidin-acridinium
- 20 ester markør (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark). Kuvetten flytter seg nedover sporet til magnetene og vaskestasjonen. Vasking med 750 µl deionisert vann blir utført to ganger. Etter fullført vaskesyklus blir partiklene resuspendert i 300 µl 0,5 g/l H₂O₂ i 0,1 M HNO₃. Kuvetten går inn i luminometer rommet og foran fotomultiplier blir 300 µl 25 mM NaOH oppløsning tilsatt og fotonene av lys som blir emittert blir målt og kvantifisert og
- 25 uttrykt som relative lysenheter (RLU). Mengden av RLU er direkte proporsjonal med mengden av IgE i prøven. Tidspunkt fra prøvedispensjon til første resultat er 15 min. og et nytt resultat følger hvert 20. sekund. Resultatene ble uttrykt som RLU eksperiment/RLU bakgrunn, mens RLU bakgrunn var kjemiluminescens reaksjonen observert i fravær av total IgE.
- 30 Ti Phleum pratense spesifikke IgE standarder, kalibrert i Magic Lite SQ Spesific IgE Kit (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) overfører kliniske karakterisert Phleum pratense allergiske pasientprøver og uttrykt som SU/ml (standardiserte enheter), ble analysert ved anvendelse av protokollen beskrevet ovenfor og det er vist at mellom 1,43 og
- 35 800 SU/ml flere pratense spesifikt IgE kan bli målt som i Magic Lite SQ Specific IgE analyse, se figur 3.

Eksempel 3

Kvantifisering av spesifikt IgE overfor WHO total IgE referanse

Kvantifisering av spesifikke IgE antistoffer i serumprøver ble utført med referanse til totalt IgE antistoff eller spesifikt IgE antistoff ved anvendelse av identiske analyseprotokoller som beskrevet i henholdsvis eksempel 1 og 2.

35 pasientprøver ble analysert for Phleum pratense spesifikt IgE sammen med 120 Phleum pratense spesifikke IgE standarder, kalibrert i Magic Lite SQ Specific IgE Kit (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark) overfor kliniske karakteriserte Phleum pratense allergiske pasientprøver og uttrykt som SU/ml (protokoll beskrevet i eksempel 2)-

Ni standarder av IgE WHO 2dn IRP No. 75/502 (National biological standard board) ble analysert i samme omgang overfor totalt IgE (protokoll beskrevet i eksempel 1).

Figur 4 tilveiebringer en sammenligning av to doseresponskurver av total IgE analyse og Phleum pratense spesifikk IgE analyse. Parallelle linjer testet viser ingen signifikant forskjell i stigninger mellom de to doseresponskurvene og dette indikerer at spesifikt IgE i pasientprøver kan bli kalibrert overfor WHO total IgE standard og uttrykt IU/ml.

Figur 5 angir en sammenligning av resultatene fra 35 pasientprøver beregnet overfor WHO totale IgE standarder (uttrykt IU/ml) eller Phleum pratense spesifikke IgE standarder (uttrykt i SU/ml) og viser meget god korrelasjon mellom de to enhetene.

Konsentrasjonen (dose) av ukjent prøve ble beregnet ved anvendelse av kubikkfri spline interpolasjon etter en log vs. log transformasjon av signal/bakgrunn og konsentrasjon (dose).

Det ble beregnet ut fra den lineære regresjonslinjen at en SU (standardisert enhet) tilsvarer 0,14 internasjonal enhet (IU).

Det kan konkluderes med at allergenspesifikt IgE kan bli målt ved anvendelse av utførelsesformen ifølge foreliggende oppfinnelse og kalibrert direkte ut fra den totale IgE analysen av en WHO IgE kalibrert standardkurve.

Eksempel 4Total IgE metode sammenligning

- 5 33 pasientprøver ble målt for totalt serum IgE i Magic Lite Total IgE kit (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark). Analysen ble utført ifølge forhandlerens instruksjoner. De samme prøvene ble målt for total serum IgE på ACS:180 ifølge protokollen beskrevet i eksempel 1.
- 10 Figur 6 tilveiebringer et "scatterplot" for fremgangsmåte sammenligningen for måling av total serum IgE. En korrelasjon med $r = 0,90$ ble oppdaget.

Eksempel 5

- 15 Spesifikk IgE fremgangsmåtesammenligning
35 pasientprøver ble målt for Phleum pratense spesifikt IgE i Magic Lite SQ Specific IgE kit (ALK Laboratories A/S, Hørsholm, Danmark). Analysen ble utført ifølge forhandlerens instruksjoner. De samme prøvene ble målt for Phleum pratense spesifikt IgE på ACS:180 ifølge protokollen beskrevet i eksempel 2. Figur 7 tilveiebringer et scatterplot for
- 20 fremgangsmåte sammenligning for måling av Phleum pratense spesifikt IgE. En korrelasjon med $r = 0,80$ ble oppdaget.

Eksempel 6Sammenligning av analysenøyaktigheter

- 25 "Whithin-run" unøyaktigheter for ACS totalt IgE ved anvendelse av protokollen beskrevet i eksempel 1 ble sammenlignet med en til Magic Lite Total IgE. Pasientprøvene ble kjørt i replikater på tre i analysene beskrevet i eksempel 4. Sammenslåtte "within-run" koeffisienten for variasjon (CVpwr) ble beregnet ifølge Krouwer og Rabinowitz, Clinical Chemistry, 30, 290 (1984). Følgende resultater ble oppnådd:

30

	<u>Magic Lite</u>	<u>ACS</u>
%CVpwr	4,69	2,75
Min %CV	0,80	0,70
Max %CV	11,70	8,40

35

Som det fremgår av resultatene fører automatisering og minimalisering av driftstrinnene til betraktelige forbedringer av analysepresisjonen (ifølge F-test: $F=1,71$, $p=0,049$).

Eksempel 7Sammenligning av total og spesifikk IgE i pasientprøver:

- Prøver målt for Phleum pratense spesifikt IgE på ACS:180 ifølge protokollen beskrevet i eksempel 2 og beregnet overfor totalt IgE referanse (WHO 75/502) som beskrevet i eksempel 3, ble også analysert for total IgE, som beskrevet i eksempel 1. Forholdet mellom målt spesifikt IgE og total IgE ble beregnet på hver prøve og uttrykt som prosent forhold (Spes. IU/total IU*100).

- 10 Følgende resultater ble oppnådd:

Phleum pratense			
Nr.	spesifikt IgE IU/ml	Total IgE IU/ml	% forhold
	0,973	208,300	0,467
	0,000	153,330	0,000
15	0,000	25,119	0,000
	0,000	43,980	0,000
	0,082	51,997	0,158
	0,586	30,807	1,902
	9,130	20,796	43,903
20	2,125	168,771	1,259
	1,545	321,553	0,480
	0,000	299,105	0,000
	1,664	248,660	0,669
	8,553	46,635	18,340
25	19,427	234,858	8,272
	0,000	178,304	0,000
	2,380	428,987	0,555
	4,342	112,457	3,861
	3,975	173,793	2,287
30	0,220	206,580	0,106
	0,158	298,630	0,053
	4,936	17,116	28,839
	0,376	146,939	0,256
	4,865	23,521	20,684
35	3,115	281,804	1,105
	0,017	17,937	0,095
	3,446	160,651	2,145

	26	1,485	167,427	0,887
	27	2,763	124,309	2,223
	28	3,705	247,679	1,496
	29	1,289	196,314	0,657
5	30	8,967	416,528	2,153
	31	0,355	29,784	1,192
	32	15.173	290,670	5,220
	33	2.141	63,847	3,353
	34	3.929	96,951	4,053
10	35	0.154	> 620	ND

Eksempel 7 (fortsettelse)

Som det fremgår av resultatene kunne Phleum pratense spesifikk IgE analyse bli målt så
 15 lavt som 0,05% av Phleum pratense spesifikt IgE av totalt IgE. Lave relative mengder av
 Phleum pratense spesifikt IgE indikerer at andre allergen spesifisiteter er til stede i prøvene.
 Opp til 44% av total IgE ble funnet i en pasientprøve å være spesifikk overfor Phleum
 pratense. Ingen korrelasjon ble oppdaget mellom total IgE konsentrasjon og Phelum
 pratense spesifikk IgE konsentrasjon som det fremgår i figur 8.

20

Eksempel 8

Bestemmelse av serum totale IgA antistoffer ved anvendelse av paramagnetiske partikler
 og avidin-akridinium estermarkør.

25

Bestemmelse av totale IgE antistoffer ble analysert ved anvendelse av følgende protokoll:

25 µl pasientprøve eller kalibrator ble pipettert inn i et 12x75 mm testrør. Til hvert rør ble
 det tilsatt 50 µl biotinyllert polyklonalt anti-IgA antistoff DAKO E484 (tilført av DAKO,
 30 Glostrup, Danmark) i 0.05 M fosfatbuffer, pH 7.4, inneholdende 0,1% antriumazid, 0,01%
 Tween 20 og 0,1% humant serumalbumin og omsatt i 15 minutter ved romtemperatur. 400
 µl oppslemming av paramagnetiske partikler med immobilisert polyklonalt anti-IgA
 antistoff DAKO A 262, (tilført av DAKO, Glostrup, Danmark) ble tilsatt til hvert rør og
 inkubert i 5 minutter. Etter denne andre inkubasjonen ble 50 µl streptavidin-akridinium
 35 estermarkør fortynnet i samme buffer som beskrevet ovenfor tilsatt til hvert rør og inkubert
 i ytterligere 5 minutter ved romtemperatur. Paramagnetiske partikler ble vasket to ganger
 med en 0,2 M fosfatbuffer, pH 7.4, inneholdende 0,1% Tween 20, etter separering av de

magnetiske partiklene fra væsken ved hjelp av en magnetisk baseseparator og vortex behandling av de separerte partiklene med vaskebuffer som beskrevet ovenfor. Inneholdet av rørene ble til slutt målt i luminometeret hvor lys emittert ved 426 nm ble kvantifisert og uttrykt som relative lysenheter (RLU).

5

Totale IgA standarder beregnet overfor WHO nr. 67/86 for humant serum IgA DAKO X908 (tilført av DAKO, Glostrup, Danmark) ble analysert ved anvendelse av protokollen angitt ovenfor.

10 Standarder:

	<u>Konsentrasjon</u>	<u>RLU</u>
	0	370937
	0.02	417000
15	0.23	557563
	2.32	1252260
	23.2	1872357

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for å måle konsentrasjonen og/eller det relative innholdet av et spesifikt
 5 antistoff i en prøve, i det den målte lysemmissjonen til en separert fast fase omfattende et
 oppfanget spesifikt antistoff koblet til en kjemiluminescensmarkør blir sammenlignet med
 den målte lysemmissjonen oppnådd i en parallell referanse immunoanalyse hvor det totale
 innholdet av klassen av antistoffer i prøven som nevnte spesifikke antistoff hører til blir
 målt, k a r a k t e r i s e r t v e d følgende trinn:

10

- a) blanding av et ligand antigen eller haptent overfor hvilket det spesifikke antistoffet som
 skal bli målt er direkte bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff
 rettet mot den konstante delen av antistoffet som skal bli målt bundet til
 paramagnetiske partikler; og en kjemiluminescensakridinium forbindelse bundet til
 15 avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et første
 fast fase kompleks,
- b) magnetisk separering av nevnte første faste fase fra den flytende fasen,
- c) initiering av en kjemiluminescens reaksjon og måling av lysemmissjonen til den separerte
 første faste fasen,
- 20 d) blanding av et ligand antistoff rettet mot klassen av antistoffer som skal bli målt bundet
 til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff rettet mot kontrastdelen av
 klassen av antistoffer som skal bli målt bundet til paramagnetiske partikler; og en
 kjemiluminescens akridiniumforbindelse bundet til avidin, streptavidin eller et
 funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et andre fast fase kompleks,
- 25 e) magnetisk separering av nevnte andre faste fase fra den flytende fasen,
- f) initiering av kjemiluminescensreaksjonen og måling av lysemmissjonen til den separerte
 andre faste fasen og
- g) sammenligning av lysemmissjonen til den separerte første faste fasen med den til den
 separerte andre faste fasen.

30

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinn

a) utføres ved

- (i) blanding av ligandantigen eller hepten bundet til biotin eller et funksjonelt derivat
 35 derav med prøven og antistoffet bundet til paramagnetiske partikler for å danne et
 fast fase kompleks og
- (ii) tilsetning av kjemiluminescens akridiniumforbindelsen bundet til avidin,

streptavidin eller et funksjonelt derivat derav for å danne nevnte første faste fase kompleks, og hvori trinn d) blir utført ved

- (i) blanding av ligand antistoff bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav med prøven og antistoffet bundet til paramagnetiske partikler for å danne et fast fase kompleks og
- (ii) tilsetning av kjemiluminescens akridiniumforbindelsen kovalentlig bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav for å danne nevnte andre faste fase kompleks.

10 3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikke antistoffet som skal bli målt i prøven er et spesifikt immunoglobulin valgt fra gruppen bestående av IgA, IgD, IgE, IgG, IgM og isotyper derav, og ligand antigen, antistoff eller haptent rettet mot den variable delen av nevnte antistoff er et allergen, og

15 klassen av antistoffer er en klasse av immunoglobuliner valgt fra gruppen bestående av total IgA, total IgD, total IgE, total IgG, total IgM og isotyper derav, og ligand antigen, antistoff eller haptent er et antistoff rettet mot nevnte klasse av immunoglobuliner.

4.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikke immunoglobulinet er et spesifikt IgE, og klassen av antistoffer er total IgE.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet er rettet mot antistoffet som skal bli målt bundet til paramagnetiske partikler velges fra gruppen bestående av polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer inkludert rekombinante antistoffer, fragmenterte antistoffer, fortrinnsvis et monoklonalt muse anti-immunoglobulin.

30 6.

Anvendelse av en kjemiluminescensmerkingsforbindelse for å detektere et antistoff i en prøve, valgt blant: N-hydrokso-succinimidmetylacridiniumester, luminol, lucigenin, lofin, eller andre luminiscens merkede forbindelser som kan bli bundet til avidin eller streptavidin eller et funksjonelt derivat derav, utført ved å

- 35 a) blande et ligand antigen, antistoff eller haptent bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav; et antistoff rettet mot antistoffet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler og en kjemiluminescensakridiniumforbindelse bundet til

avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav med prøven for å danne et fast fase bundet kompleks,

- b) magnetisk separering av den faste fasen fra den flytende fasen,
 - c) initiering av kjemiluminescensreaksjonen og analysering av den separerte faste fasen
- 5 for tilstedeværelse av kjemiluminescenskompleks, hvor tilstedeværelse av kjemiluminescensen er en indikasjon på tilstedeværelse av nevnte antistoff i nevnte prøve.

7.

10 Anvendelse ifølge krav 6, utført ved å

- i) blande ligand antigen, antistoff eller haptent bundet til biotin eller et funksjonelt derivat derav med prøven og antistoffet rettet mot antigenet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler for å danne et første fase kompleks,
 - ii) tilsette en kjemiluminescensakridinium forbindelse kovalentlig bundet til avidin,
- 15 streptavidin eller et funksjonelt derivat derav for å danne et andre fast fase kompleks,
- iii) magnetisk separere den faste fasen fra den flytende fasen;
 - iv) initiere kjemiluminescens reaksjonen og analysere den separerte faste fasen for tilstedeværelse av kjemiluminescens kompleks.

20

8.

Anvendelse ifølge krav 6 eller 7, hvor antistoffet i prøven er et spesifikt immunoglobulin valgt fra gruppen bestående av spesifikt IgA, IgD, IgE, IgG, IgM og isotyper derav, og ligandantigen, antistoff eller haptent er et spesifikt allergen.

25

9.

Anvendelse ifølge krav 8, hvor det spesifikke immunoglobulinet er et spesifikt IgE.

10.

30 Anvendelse ifølge krav 6 eller 7, hvor antistoffet i prøven er en klasse av immunoglobuliner valgt fra gruppen bestående av total IgA, total IgD, total IgE, total IgG, total IgM og isotyper derav, og ligand antigen, antistoff eller haptent er et antistoff rettet mot nevnte klasse av immunoglobuliner.

35 11.

Anvendelse ifølge krav 10, hvor klassen av immunoglobuliner er total IgE.

12.

Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 11, hvor antistoffet rettet mot antistoffet som skal bli detektert bundet til paramagnetiske partikler blir valgt fra gruppen bestående av polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer inkludert rekombinante antistoffer, fragmenterte antistoffer; fortrinnsvis et monoklonalt muse anti-
5 immunoglobulin.

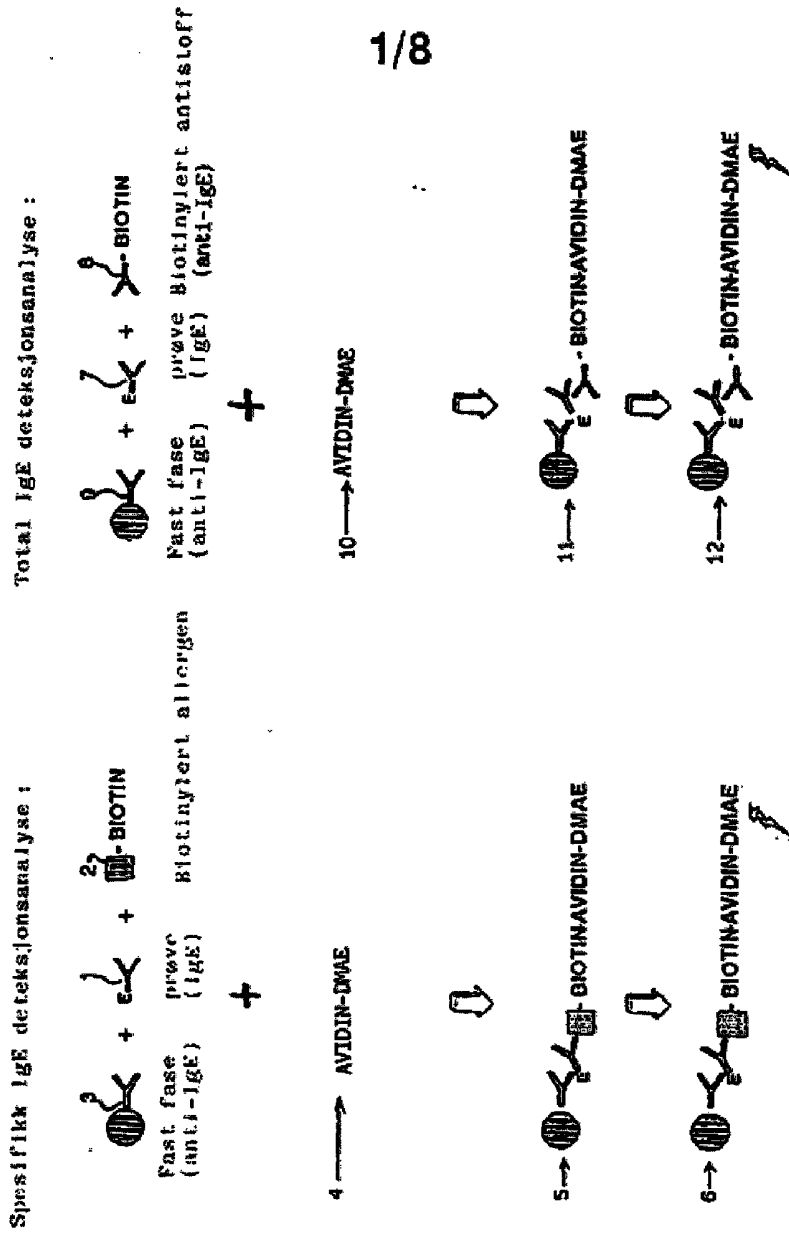
13.

Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 12, hvor
10 kjemiluminescens akridiniumforbindelsen er N-hydroksysuccinimiddimetylakridiniumester kovalentlig bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav.

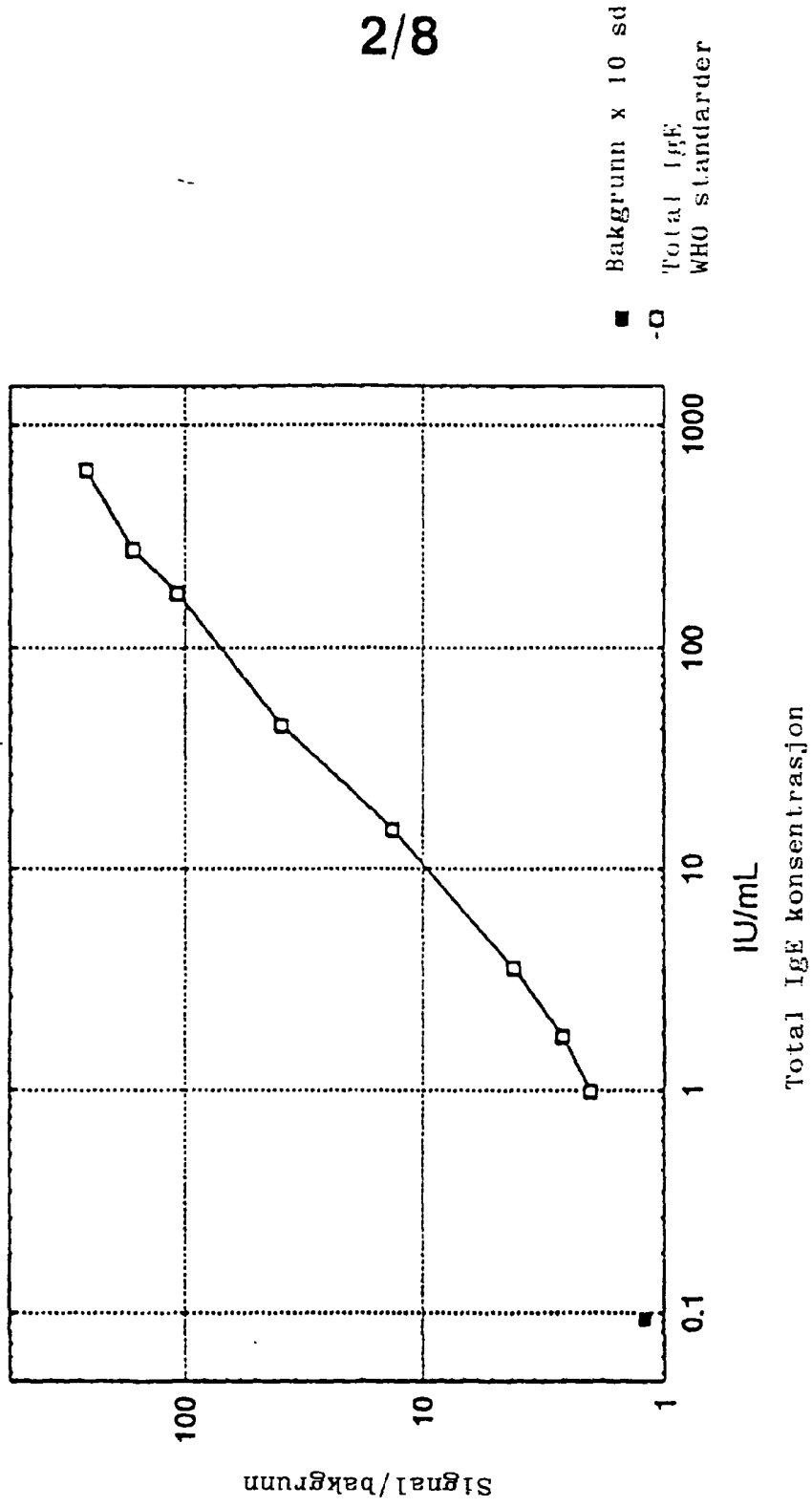
14.

Fremgangsmåte eller anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor
15 kjemiluminescens akridinium forbindelsen er N-hydroksysuccinimiddimetyl-akridiniumester kovalentlig bundet til avidin, streptavidin eller et funksjonelt derivat derav.

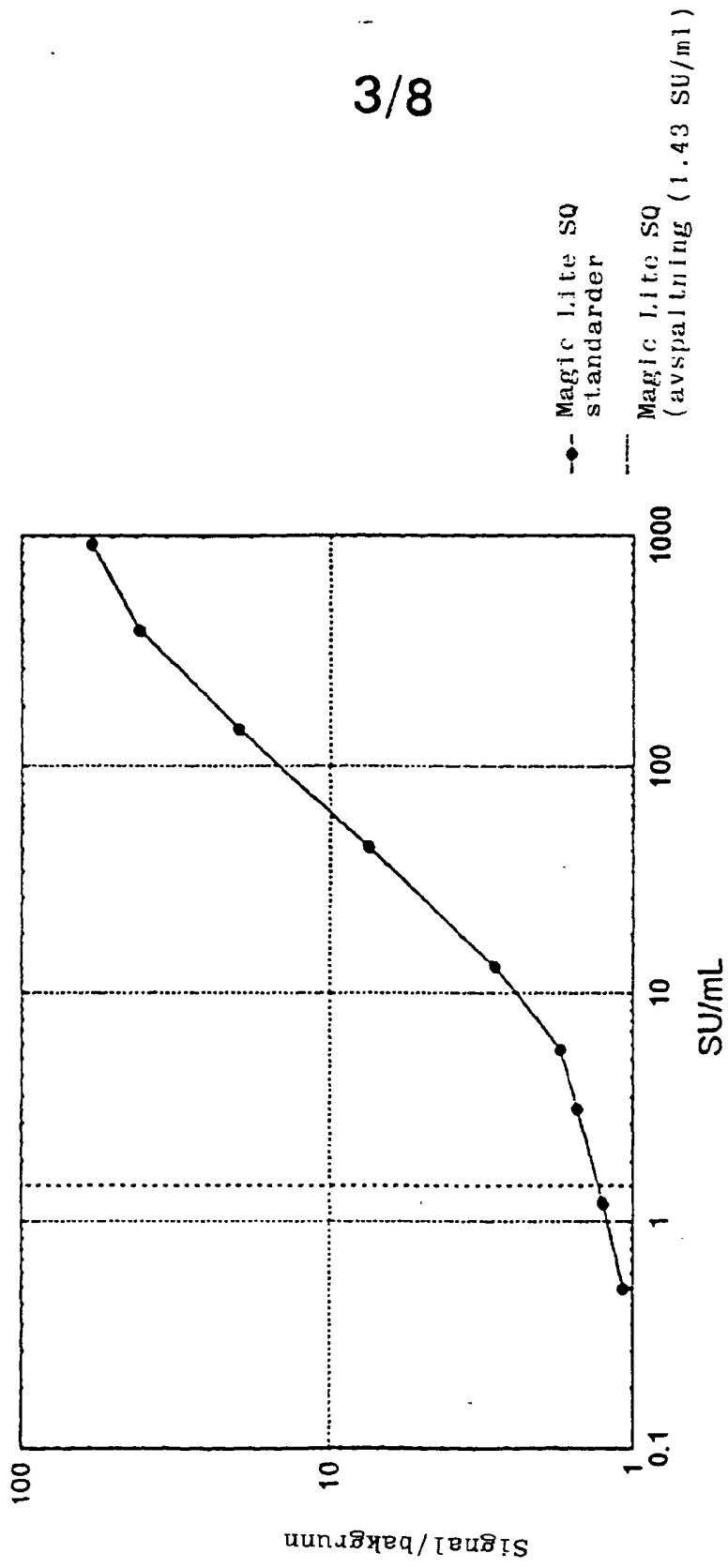
Figur 1



Figur 2

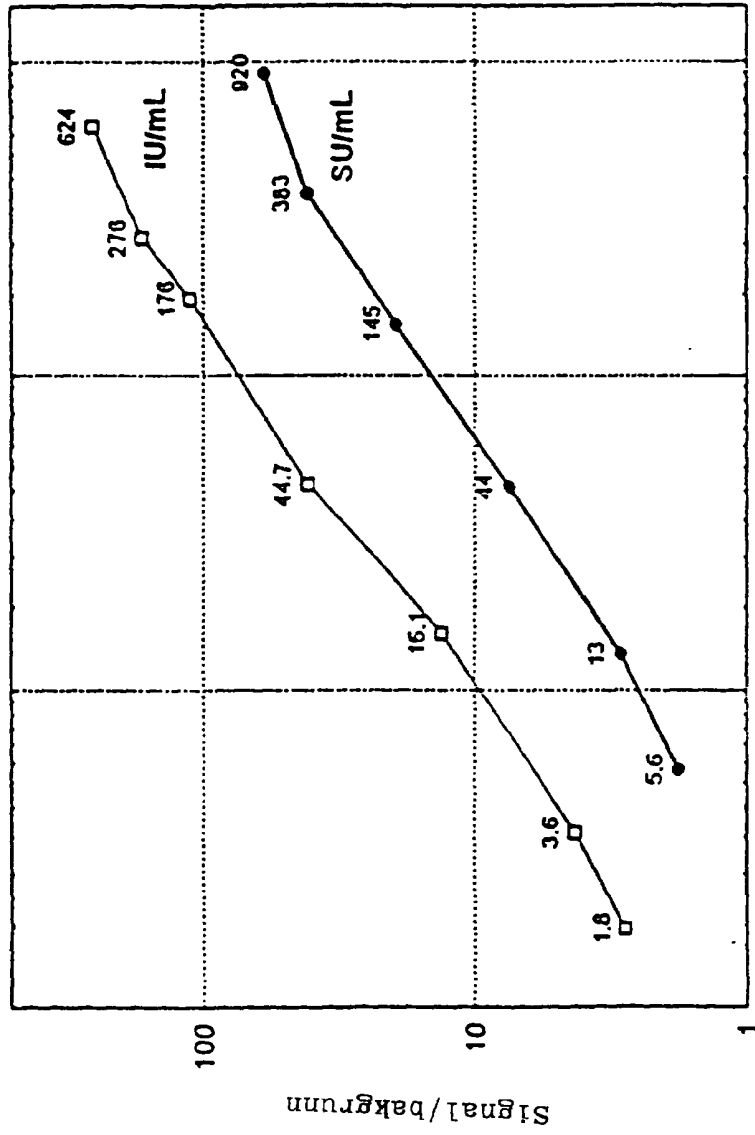


Figur 3



Placem pratense spesifik IgE konsentrasjon

Figur 4

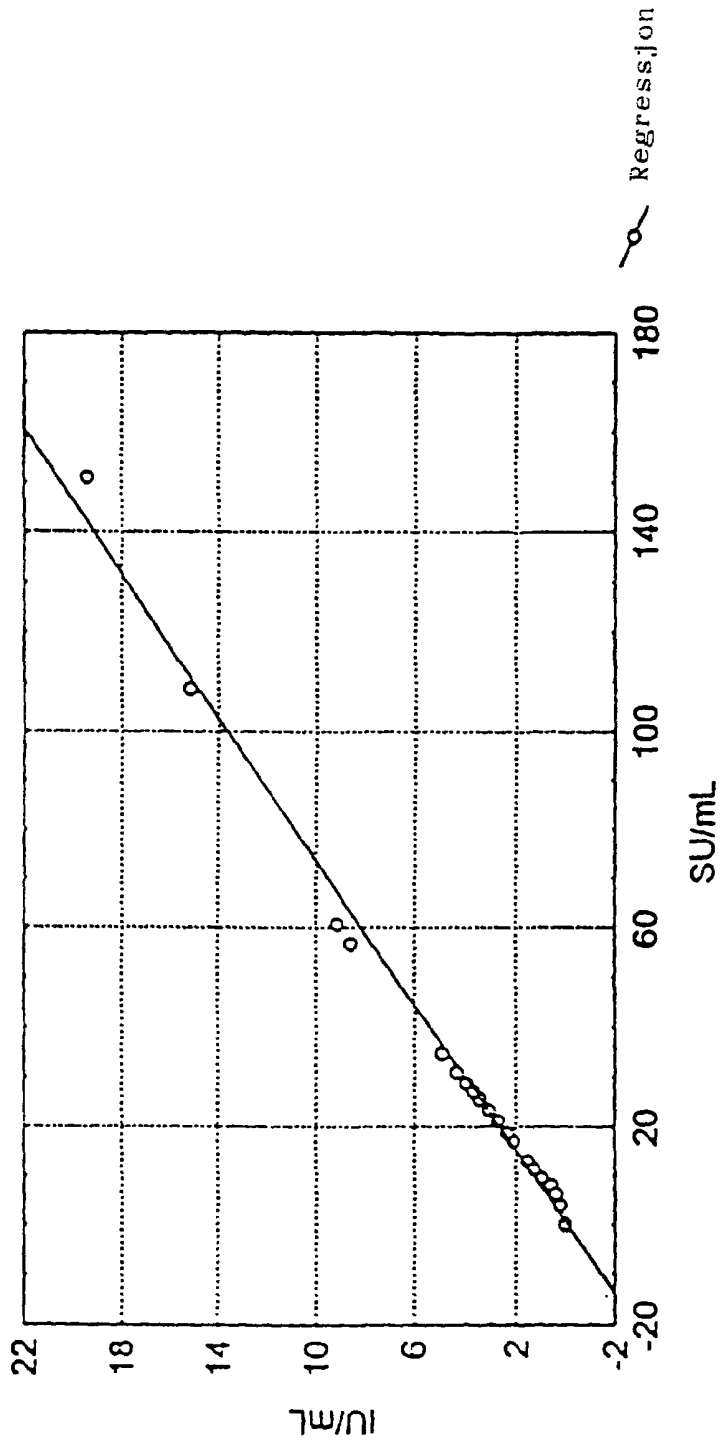


Relativ konsentrasjon

Signal/bakgrunn

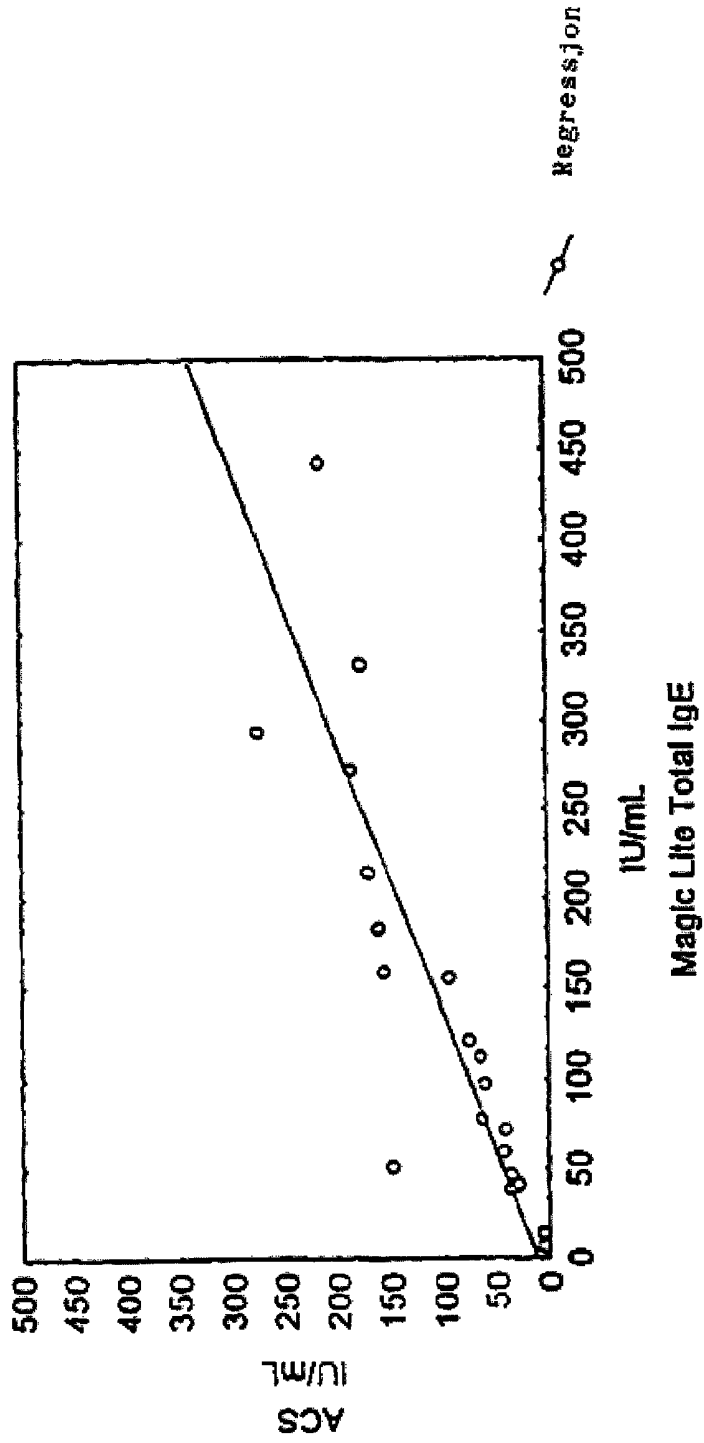
Figur 5
 $ACS_IU = -.0837 + .13752 \cdot ACS_SU$

Korrelasjon: $r = .99618$

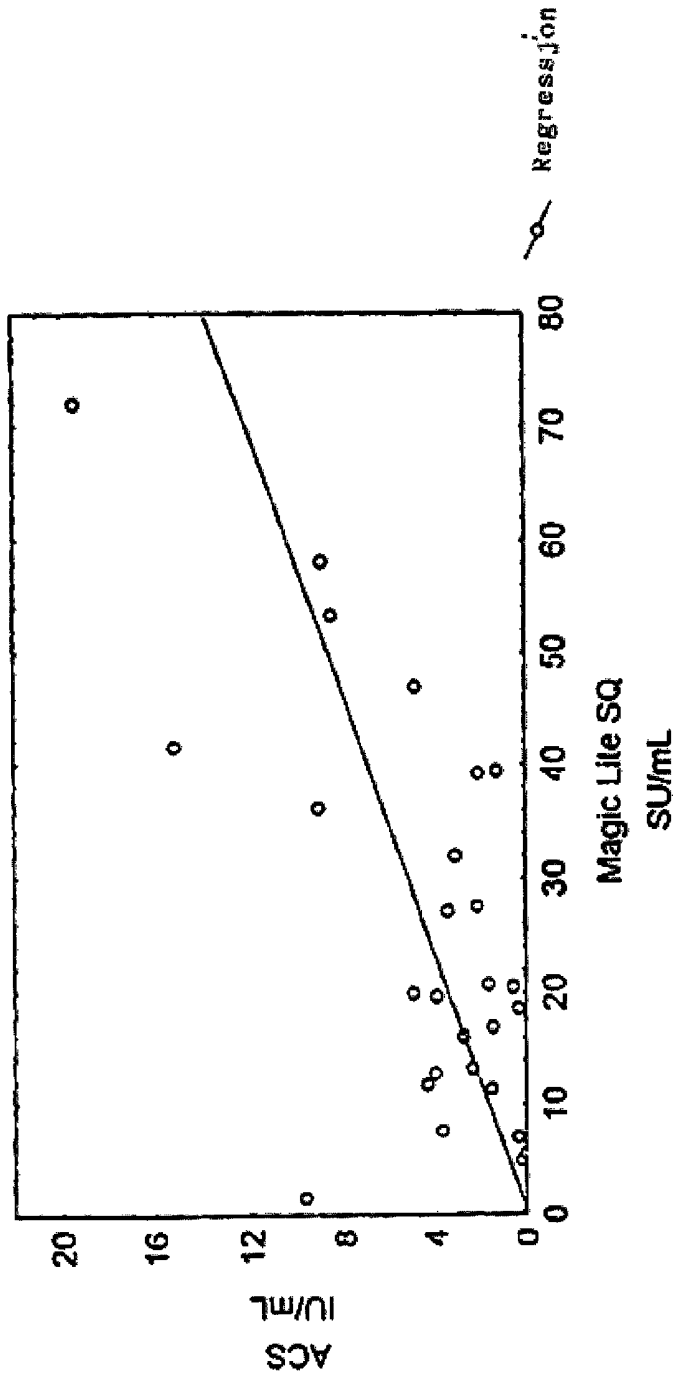


Figur 6
Total IgE

Korrelasjon: $r = .90221$



Figur 7
Phleum pratense spesifikk IgE
Korrelasjon: r = .79645



Figur 8

Korrelasjon: $r = .16940$, $p = 0.338$

