



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44245 (13) C2

(51) 6 G01N21/69

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИМІРЮВАННЯ ЕЛЕКТРОХЕМИЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ ЯВИЩ, СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЧОВИНИ, ЩО АНАЛІЗУЮТЬ, ТА РЕАКТИВ

1

2

(21) 95114765
(22) 27 04 1994
(24) 15 02 2002
(46) 15 02 2002, Бюл. № 2, 2002 р.
(86) PCT/EP94/01328, 27 04 1994
(31) P4314547 7
(32) 03 05 1993
(33) DE
(31) P4332697 8
(32) 25 09 1993
(33) DE
(31) P4401577 1
(32) 20 01 1994
(33) DE
(72) Фолькер Клемт, DE, Гюнтер Мюллер, DE, Ульрих Нойманн, DE, Урсула Гизен, DE, Ніколас Хойль, DE
(73) РОШЕ ДІАГНОСТИКС ГМБХ, DE
(56) EP, 0096749, 1983 WO, 90/05302, 1990 WO, 90/05296, 1990 US, 497769, 1990
(57) 1 Способ измерения электрохемилюминесцентных явлений в растворе или на твердой фазе, граничащей с раствором, в результате приведения в контакт способного к электрохемилюминесценции компонента с окисляемым амином и подачи электрического напряжения для индукции электрохемилюминесценции и обнаружения электромагнитного излучения, отличающийся тем, что раствор содержит детергент (моющее средство), выбранный из группы этоксилатов спирта жирного ряда, плантарена и октилглюкозида или их смеси
2 Способ по пункту 1, отличающийся тем, что в качестве этоксилата спирта жирного ряда применяется полидоканол, C14-E09, генапол или C8-

E09

3 Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что раствор содержит один или несколько щелочных или щелочноземельных галогенидов

4 Способ по любому из пунктов 1-3, отличающийся тем, что величина pH раствора находится между 6,5 и 9,0

5 Способ по любому из пунктов 1-4, отличающийся тем, что электрохемилюминесценция возбуждается в результате подачи напряжения прямоугольной формы максимально 2,2 вольта или максимальное напряжение ramпы 3,0 вольта

6 Способ определения анализируемого вещества по одному из пунктов 1-5, отличающийся тем, что способный к электрохемилюминесценции компонент - это маркировка анализируемого вещества, аналога анализируемого вещества или специфического для анализа вещества, причем обнаруживаемое излучение представляет собой критерий для присутствия анализируемого вещества

7 Реактив, представляющий собой раствор для измерения электрохимических явлений, содержащий окисляемый электрохимическим способом амин, который в окисленном состоянии представляет собой сильный восстановитель, отличающийся тем, что содержится детергент, выбранный из группы этоксилата спирта жирного ряда, плантарена и октилглюкозида или их смеси

8 Реактив по п. 1, отличающийся тем, что детергент содержится в концентрации от 0,001 до 1%

9 Реактив по п. 7 или 8, отличающийся тем, что дополнительно содержится щелочной хлорид в концентрации от 0,05 ммоль/л до 0,5 ммоль/л

10 Реактив по любому из пунктов 7-9, отличающийся тем, что он имеет pH между 6,5 и 9,0

Предмет данного изобретения - это способы для измерения электрохемилюминесцентных явлений, способов определения анализируемого вещества посредством таких способов, реактивы в виде растворов, которые могут быть использованы в этих способах, и аппарат, особенно пригодный для осуществления такого способа

Способы измерения электрохемилюминесцентных явлений известны в течение нескольких лет. В таких способах используется способность специальных комплексов металлов попадать в результате окисления в такое состояние, из которого они при выделении электромагнитного излучения снова впадают в нормальное (основное)

(13) C2

(11) 44245

(19) UA

состояние. Такие способы и пригодные для этого комплексы металлов описаны, например, в WO 86/ 02734

Эта технология постоянно совершенствовалась в публикации WO 90/ 05296 к составу пробы добавляют амин, предпочтительно трипропиламин, который в окисленной форме представляет собой сильный восстановитель. Электрохимическая реакция происходит в электролите, в котором остаток электрохемилюминесценции (ECL), т.е. комплекс металлов, способный к электромагнитному излучению, и амин могут окисляться. Как соответствующий электролит в водном растворе описывается фосфатный буфер при pH-величине 6 - 9, преимущественно 7 - 7,5

В WO 90/ 05302 к этому составу пробы для повышения электромагнитного излучения добавляют моющее средство (детергент) тритон X - 100 или тритон № 401. В WO 90/ 05411 описано усовершенствование аппарата для измерения электрохемилюминесценции

Далее удалось использовать технологию определения (обнаружения) анализируемого вещества в результате того, что маркировки электрохемилюминесценции на анализируемых веществах, аналогах анализируемых веществ или на веществах, специфических для анализа, были соединены. Электрохемилюминесценцию применяли для определения количества присутствующего испытуемого вещества. В частности были описаны такие иммуно-анализы, в которых обычные маркировки заменены на электрохемилюминесцентные маркировки

Дальнейшие усовершенствования и случаи применения этой технологии описаны в публикациях WO 87/ 06706, WO 89/ 04392, WO 89/ 10552, WO 89/ 10551, WO 90/ 05301 и WO 90/ 11511. Раскрытия в названных публикациях имеют предпосылку в нижеследующем изложении

Задача настоящего изобретения заключалась в том, чтобы усовершенствовать предварительно известные способы, особенно относительно чувствительности определений анализируемых веществ, которые возможны с помощью технологии электрохемилюминесценции

Предметом данного изобретения является способ измерения электрохимических явлений в растворе или на твердой фазе, граничащей с раствором. При этом такой раствор содержит моющее средство (детергент), выбранный из группы этоксиплатов спирта жирного ряда, "плантарена" и октилглюкозида или смеси из этих веществ

Далее предмет данного изобретения - это способ определения анализируемого вещества с помощью этих способов, а также соответствующие реактивы для осуществления названного способа

В предмете изобретения речь идет о техническом решении, созданном на вышеназванном уровне техники. Общие основы электрохимических люминесцентных способов подробно описаны в этом уровне техники. Приборы для осуществления измерений электрохемилюминесценции содержат измерительный узел с емкостью для раствора реактивов, по меньшей мере, два электрода (один рабочий и один противоположный

электрод), которые во время измерения находятся в контакте с раствором реактивов, и один детектор для измерения производимого посредством электрохемилюминесценции света. В общем, в этих способах сначала к раствору подается выходное напряжение (преполяризация /подготовительная поляризация). После этого это напряжение повышается через окислительно-восстановительный потенциал содержащегося в растворе вещества, например, амина. Посредством окисляемого в результате этого вещества материал, способный к хемилюминесценции, например, определенные рутениевые комплексы, возбуждаются для излучения света. Свет, улавливаемый детектором в течение определенного времени, - это и есть мера (критерий) для присутствия определенного количества электрохемилюминесцентного материала. Поскольку при наличии электрохемилюминесцентного материала речь идет о маркировке для анализируемого вещества, аналога анализируемого вещества или специфического для анализа вещества, например, в иммуно-анализе, то принимаемый свет - это критерий для присутствия, анализируемого вещества

Оказалось, что известное из публикации WO 90/ 05302 и обычно добавляемое до настоящего времени моющее средство тритон X - 100, которое на практике в большинстве случаев использовалось в сочетании с моющим средством "твин" (Tween) - 20, не является оптимальным. С одной стороны, тритон X - 100 плохо расщепляется и, следовательно, неблагоприятно переносится окружающей средой. С другой стороны, неожиданным образом выяснилось, что совершенно определенные другие моющие средства (детергенты) по сравнению с тритон X - 100 способствуют усовершенствованию электрохемилюминесцентного способа. С помощью этих специальных моющих средств обеспечивается повышенный выход сигналов, лучшее соотношение сигнал/шум и, таким образом, повышенная чувствительность способа определения и понижение нижнего предела обнаружения, а также лучшая точность

Для указанной задачи пригодными оказались моющие средства, выбранные из группы этоксиплатов спирта жирного ряда, среди которых, например, следует понимать полидоканол (додецилполи-(этиленгликольэфир)_n), C 14 E09 (поли(этиленгликоль-эфир)_n), генапол (изотридецил-поли (этиленгликольэфир)_n), C 8 - E09 (окта-нол-поли (этиленгликольэфир)_n), плантарен® (алкилполиглюкозид) и октилглюкозид (октил-бета-D-глюкопиранозид) или смесь из них. Моющие средства используются в концентрациях от 0,001 до 1,0%. Наиболее пригодная концентрация может быть легко определена для каждого моющего средства. Концентрации от 0,1 до 0,5% оказались наиболее пригодными

Для консервации до сих пор к составу пробы добавляли азид натрия обычно в концентрации 5 - 10мм. Оказалось, что этот вредный для окружающей среды реагент можно заменить биобаном, или оксабаном, которые в значительной мере благоприятнее для окружающей среды, чем азид

Неожиданным образом обнаружилось, что эти консерванты оказывают дальнейший положитель-

ный эффект на электрохемилюминесцентный способ. По сравнению с азидом наблюдается повышение измерительного сигнала. Оксабан и биобан используются при этом в концентрациях от 0,01 до 1%, предпочтительно 0,1 до 0,5%.

Предложенный способ измерения электрохимических явлений в растворе или на граничащей с раствором твердой фазе может быть осуществлен при температурах, находящихся выше точки заморзания раствора, но ниже чем 40°C.

Дальнейшее улучшение чувствительности может быть достигнуто в ходе того, что на измерительный узел подается напряжение, прохождение которого по времени - прямоугольно. Это означает, что исходя из напряжения, на выходе осуществляется непосредственный подъем напряжения (в течение максимально 0,4 секунд) до напряжения на конце. Для времени возбуждения это напряжение поддерживается в основном постоянным. Спустя это время, напряжение снова возвращается непосредственно до напряжения ниже окислительно-восстановительного потенциала системы. В результате этих мер получается, кроме того, расширение динамического диапазона измерения, то есть того диапазона, в пределах которого могут быть измерены концентрации анализируемого вещества определенной иммуно-пробы. На случай низких температур предпочтительна солевая добавка.

Оказалось, что предпочтительным концевое выгодным напряжение прямоугольной формы по сравнению с Ag (AgCl), подаваемое на рабочий электрод, ограничиться до максимальной величины между окислительно-восстановительным потенциалом окисляемого вещества и 2,2 вольт. Особенно предпочтительным является напряжение в пределах между 1,2 - 2,2 вольт. Особенно предпочтительны 1,4 вольт. Эти величины действительны для применения платиновой или золотой пары электродов.

В случае если подается обычное до сих пор напряжение лампы, например, напряжение между фазами (или линейное напряжение при соединении треугольником), то концевое напряжение (по сравнению с Ag/AgCl) ограничивается до максимальной величины 3,0 вольт.

Неожиданным образом можно было достичь также повышения сигнала в ходе того, что напряжение на выходе перед возбуждением электрохемилюминесценции составляло на рабочем электроде между + 400 и - 400 мВ/мВ, по сравнению с Ag/AgCl - электродом. Особенно предпочтительной является величина в пределах между + 0 мВ и + 200 мВ. Также и здесь действительны величины для применения пары платиновых или золотых электродов. Потенциалы для других материалов электродов могут быть легко рассчитаны.

Точно также и повышение сигнала можно рассчитать в результате регулирования pH - величины между 6,5 - 9,0, предпочтительно 6,5 - 7,5, особенно предпочтительно 6,8. Это происходит надлежащим образом благодаря применению pH - буфера, пригодного для этого диапазона. Дополнительно могут содержаться еще один или несколько щелочных или щелочноземельных гапо-

генидов в концентрации от 0,05 ммоль/л до 0,5 ммоль/л в растворе. Предпочтительно используется хлорид натрия.

Вышеназванные меры сами по себе приводят уже к значительным усовершенствованиям известного способа. Помимо этого, однако, в особенно значительной степени может быть повышена чувствительность и/или динамический диапазон измерения определения анализируемого вещества в результате комбинации этих мер.

Повышение чувствительности определения анализируемых веществ, например, в иммуно-пробах, как по сэндвичевому или по конкурентному способу, позволяет дальнейшие упрощения способа или применяемых аппаратов. Например, теперь возможно как детектор применять фотодиод, упрощать калибровку системы, из-за незначительного времени измерения при повышенном сигнале увеличивать число проведенных тестов за единицу времени или уменьшать объемы проб.

Точно также предметом данного изобретения является раствор реактивов для измерения электрохимических явлений и в частности для определения анализируемого вещества, содержащего окисляемый электрохимическим способом амин, который в окисленном состоянии представляет собой сильный восстановитель, который содержит моющее средство, выбранное из группы этоксилов спирта жирного ряда, "плантарена" и "октилглюкозида" или смесь из них. Дополнительно может содержаться еще щелочной хлорид в концентрации от 0,1 ммоль/л до 0,5 ммоль/л, и/или pH - величина может находиться в пределах между 6,8 - 8,0. Далее могут содержаться еще обычные добавки, как, например, буферные вещества, стабилизаторы и консерванты.

Раствор реактивов подлежит консервации посредством биобана или оксабана.

Аппарат для осуществления определения посредством электрохемилюминесценции подробно описан, например, в примере 1 публикации WO 90/05302. Аппарат, помимо этого, может содержать средство для охлаждения измерительного узла и/или емкости для жидкости до температур в пределах между 0 - 25°C, если способ должен быть осуществлен при этих низких температурах. Как измерительный узел здесь следует понимать ячейку, в которой осуществляется измерение электролюминесценции. Под емкостью для жидкости можно понимать сборник или однако ввод, например, шланг, для раствора реактивов, имеющегося во время измерения в измерительном узле.

Также предметом изобретения является способ определения анализируемого вещества посредством электрохемилюминесцентной маркировки. При этом применяется один из вышеназванных способов измерения электрохемилюминесцентных явлений.

Следующие примеры должны пояснить данное изобретение более подробно.

Пример 1

В (одной) серии опытов был установлен эффект используемых согласно изобретению моющих средств (детергентов). Для того чтобы можно было определить влияние моющих средств на

образование сигналов по возможности независимо от отдельных параметров теста, т.е. к определенным анализируемым веществам, использовались покрытые стрептавидиновой оболочкой магнитные частицы, на которых было соединено биотинилированное и одновременно рутенированное антитело (HSAP "hot-Streptavidin-Partikel" горячие частицы стрептавидина)

Для измерения использовали аппарат, каким он описан в примере 1 публикации WO 90/ 05302, который далее в измерительной ячейке содержал постоянный магнит (Ongen 1,0 от IJEN, Rockville, USA или Magnalyber) (магнитный анализатор). Этот инструмент содержит далее фотоэлектронный умножитель, стабилизатор напряжения, электрохимическую расходную ячейку, средство для передачи жидкости и пробный (испытательный) ротор для 50 туб

Для определения соединяли в одной тубе

HSAP (лиофилизированные HSAP растворяли в трис / полидоканол-буфере (10mM, 0,1%) pH 9,0, так что получался рабочий раствор в количестве 600rg/мл) 50rl

PBS - буфер (50mM KH_2PO_4 , 100mM NaCl, 0,1% RSA, pH 7,0) 200rl

Раствор реактивов (200ntM KH_2PO_4 - буфер, 100mM TPA, pH 7,5, соответственно испытанный реактив)

Эту смесь добавляли пипеткой в измерительную тубу, а затем переводили в измерительную ячейку HSAP промывали буфером (AB) и в этом буфере измеряли выход сигналов

Применяемое антитело биотинилировали посредством биотин-DDS (биотинил-амино-3,6-диоксооктаноил-аминокарбонил-гептановая кислота-N-оксисукцинимид-эфира) (Трис) (2',2'-бипиридил) рутенийхлоридгексагидрат связывали

с помощью DSS/0615⁷ (дисукцинилсуберат) с антителом

Магнитные частицы, покрытые стрептавидиновой оболочкой, были получены от фирмы "Deretsche Dynal GMBH" ("Дойче Динал ГмбХ"), Германия (Dynabeads M-280 Streptavidin)

Буфер (AB), который применяли при измерении, имел следующий состав

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2M
KOH	0,076M
NaCl	0,05mM
TPA (трипропиламин)	0,1M

Моющее средство в концентрациях, указанных в таблице

Оксабан/биобан	0,1 / 0,3%
pH	7,5

Как контроль использовали обычные до сих пор моющие средства Tween 20 (твин 20) и тритон X - 100 соответственно в концентрации 0,05%. Для сравнения в таблице 1 выход сигнала, полученный посредством этого моющего средства, рассматривали как 100%. Как следующую величину измерения определяли неспецифический выход сигнала в буфере (AB) и таким образом устанавливали отношение выхода сигнала HSAB / AB. Это отношение между выходом сигнала с HSAP и без HSAP представляет собой хороший признак для чувствительности теста. Из результатов таблицы 1 ясно можно увидеть, что предложенные моющие средства (детергенты) являются наиболее подходящими.

Полидоканол и C8 - E09 показывают наилучшее влияние на отношение HSAP/ AB. Другие моющие средства по сравнению с твин/тритон X - 100 вызывают ухудшение выхода сигнала

Таблица 1

Испытанные моющие средства для электрохемилюминесцентного (ECL) испытания - буфер электрод BPT 3 PMT 700v

Детергент в буфере		HSAP (%)	HSAP / AB(%)
0,05%	твин	100	100
0,05%	тритон		
0,1%	полидоканол	295,1	414,5
0,4%	C14 - E09	289,2	292,8
0,2%	C14 - E09	346,2	308,2
0,1%	C14 - E09	382	343,4
0,05%	C14 - E09	402,5	342,4
0,4%	генапол	360,1	117,8
0,2%	генапол	377,2	129,6
0,1%	генапол	386,5	126
0,05%	генапол	361,5	140,1
0,4%	C8 - E09	481,4	530,3
0,2%	C8 - E09	402	394,7
0,1%	плантарен	219,1	200,7
0,05%	плантарен	270,6	276,3
0,025%	плантарен	295,3	292,1
0,2%	октилглюкозид	286,8	390,8
Не пригодные для использования детергенты			
0,2%	твин 20	106,9	176,3
0,1%	твин 20	114,9	184,5
0,05%	твин 20	124,8	213,2
0,2%	тритон X - 100	62,6	68,8

0,1%	тритон X - 100	83	154,3
0,05%	тритон X - 100	115,6	195,4
0,2%	C16 - E09	17,3	36,8
0,05%	C16 - E09	50	98
0,2%	додецил-мальтозид	17,7	50
0,1%	додецил-мальтозид	46,9	112,5
0,2%	SDS	4,1	5,6
0,1%	SDS	22,9	32,9
0,2%	ралуфон 3 - 14	27,3	29
0,1%	ралуфон 3 - 14	27,8	31,3

Обозначение использованных детергентов

C8 - E09	октанополи (этиленгликолевый эфир) _n
C14 - E09	поли (этиленгликолевый эфир) _n
C16 - E09	цетилполи (этиленгликолевый эфир) _n
Додецилмальтозид	додецил-β-D-глюкопиранозил (1 - > 4) - α -D - глюкопиранозид
Генапол	изотридецилполи (этиленгликолевый эфир) _n
Октилглюкозид	октил-β-D-глюкопиранозид
Плантарен	алкилполиглюкозиды (C14 – C16)
Ралуфон 3 – 14	n-тетрадецил-n, n-диметил-3-амино-1-пропансульфонат
SDS	содийлаурилсульфат
Полидоканол	додецилполи (этиленгликолевый эфир) _n
Тритон X – 100	октилфенолполи (этиленгликолевый эфир) _n
Твин (Tween)	поли (окскэтипен) _n -сорбитан-моноаурат

Пример 2

На примере не зависящего от параметров теста (HSAP) воспроизводится действие температуры ячейки на нахождение сигнала и динамику на случаи напряжения рампы при 28 - 35°C в измерительной ячейке в зависимости от NaCl

Этот тест был осуществлен, как показано в Примере 1. Вместо буфера (AB) применяли буфер BMJ 2 со следующим составом,

H ₃ PO ₄	0,2M
Полидоканол	0,1%
Оксабан	0,1%
Трипропиламин	0,16M
KOH	0,12M

pH

6,8

NaCl

концентрация, указанная в таблице

Результаты представлены в таблице 2. В результате повышения температуры и концентрации соли увеличиваются электрохемилюминесцентные (ECL) сигналы, которые были получены с помощью буфера (BMJ 2) только лишь и с помощью HSAP.

Отношения HSAP / AB, HSAP / FC и FC / AB почти независимы от температуры, но зависят от концентрации соли.

Таблица 2

а) Температурно / солевая зависимость ECL – сигнала

Температура, °C	28	30	35
Концентрация соли	NaCl 0%	NaCl 0%	NaCl 0%
BMJ 2	2479	2111	3165
FC	4378	3426	6856
HSAP	3160000	2550000	3610000
HSAP / BMJ 2	1257	1208	1141
HSAP / FC	722	744	626
FC / BMJ 2	1,77	1,62	2,17
Концентрация соли	NaCl 0,2%	NaCl 0,2%	NaCl 0,2%
BMJ 2	1963	2169	2930
FC	5072	4281	4137
HSAP	3940000	4030000	4450000
HSAP / BMJ 2	2007	1858	1519
HSAP / FC	777	941	1076
FC / BMJ 2	2,58	1,97	1,41
Концентрация соли	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%
BMJ 2	2208	2367	3610
FC	5280	4954	7487
HSAP	5130000	5940000	6940000

11	44245	12	
HSAP / BMJ 2	2323	2510	1927
HSAP / FC	972	1199	927
FC / BMJ 2	2,39	2,09	2,06
Концентрация соли	NaCl 1,8%	NaCl 1,8%	NaCl 1,8%
BMJ 2	2691	2970	4453
FC	5805	6129	6507
HSAP	4200000	4750000	5830000
HSAP / BMJ 2	1561	1599	1309
HSAP / FC	724	775	896
FC / BMJ 2	2,16	2,06	1,46
в) Оценка в % в расчете на 28°C, 0% NaCl			
Температура, °C	28	30	35
Концентрация соли	NaCl 0%	NaCl 0%	NaCl 0%
BMJ 2	100,0	85,2	127,7
FC	100,0	78,3	156,6
HSAP	100,0	80,7	114,2
HSAP / BMJ 2	100,0	94,8	89,5
HSAP / FC	100,0	103,1	72,9
FC / BMJ 2	100,0	91,9	122,7
Концентрация соли	NaCl 0,2%	NaCl 0,2%	NaCl 0,2%
BMJ 2	79,2	87,5	118,2
FC	115,9	97,8	94,5
HSAP	124,7	127,5	140,8
HSAP / BMJ 2	157,5	145,8	119,1
HSAP / FC	107,6	130,4	149,0
FC / BMJ 2	146,3	111,8	80,0
Концентрация соли	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%
BMJ 2	89,1	95,5	145,3
FC	120,6	113,2	171,0
HSAP	162,3	188,0	219,6
HSAP / BMJ 2	182,3	196,9	151,2
HSAP / FC	134,6	166,1	128,4
FC / BMJ 2	135,4	118,5	117,7
Концентрация соли	NaCl 1,8%	NaCl 1,8%	NaCl 1,8%
BMJ 2	108,6	119,6	179,6
FC	132,6	140,0	148,6
HSAP	132,9	150,3	184,5
HSAP / BMJ 2	122,4	125,5	102,7
HSAP / FC	100,2	107,4	124,1
FC / BMJ 2	122,1	116,9	82,7

BMJ 2 контроль посредством буфера
пробы BMJ 2

FC контроль посредством свобод-
ного конъюгата (связи) (биоти-
низированный и рутенилиро-
ванное антитело)

HSAP горячие частицы стрептавиди-
на

Понижение температуры ниже 20°C требует
добавки щелочного хлорида и pH-величины

предпочтительно 7,25 - 7,75

Пример 3

Определение T₃

На примере иммуно-анализа для определе-
ния трийодтиронина (T₃) предложенный состав
теста BMJ 1 сравнивается с составом теста
уровня техники (BMJ 0)

Растворы реактивов имеют следующий со-
став

Реактив	BMJ 0	BMJ 1
KH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,2M	0,2M
H ₃ PO ₄	-	-
Детергент	тритон X – 100 0,005%	полидоканол 0,1%
	твин (Tween) 0,05%	
Консервант	NaN ₃ 7 8mM	оксабан 0,1%
Трипропиламин	0,1M	0,1M
KOH	0,076M	0,076M
pH	7,5	7,5

Следующие другие реагенты использовались

HEPES - буфер 7,0 HEPES - Na pH 7,0 0,1M
0,06% ANS

0,1% IgJ - крупного рогатого скота

0,5% Виско (бико)

50mM NaCl

PAK - RU (рутенилированное поликлональное антитело) (Трис) (2,2' -бипиридил) рутенийхлоридгексагидрат, связанный посредством DDS с PAK против T₃ в HEPES - буфере 7,0 100нг/мл

HP - BI (T₃-полигаптен биотинилированный)

PH PAK <-> K - IgJ (DE) BOC - T₃ - BI в HEPES - буфере 7,0 600нг/мл

Пробы стандарт а - е

концентрация T₃ а 0,24нг/мл

в 0,88нг/мл

с 1,90нг/мл

д 3,05нг/мл

е 6,65нг/мл

3 сыворотка человека

2 сыворотка человека без (с 500мг/дц гемоглобина (Hb))

Магнитные частицы, покрытые оболочкой из стрептавидина

Dynabeads M - 280 Streptavidin (Динабеадс М - 280 Стрептавидин (Deutsche Dynal GMBH, Германия) "Дойче Динал ГмбХ"

в HEPES - буфере 7,0 600мкг/мл

Для (проведения) определения были соединены

PAK - RU 50мкл (re)

Dynabeads M - 280 50мкл

Проба 30мкл

PH - BI 50мкл

BMJ 0 или 1 500мкл

Эту смесь инкубировали в течение 16 минут при температуре 28°C, после этого переводили в измерительную ячейку с поддерживаемой равномерной температурой до 28°C, а частицы промывали с помощью BMJ 0 или 1, в зависимости от композиции теста, и осуществляли в ней измерение. Было подано напряжение рамплы между фазами. Напряжение измерения составляло 0,565в, а PMT 720мв

Результаты представлены в таблице 3. Оказалось, что нарушение гемоглобина, которое можно наблюдать в BMJ 0, предотвращается в BMJ 1. Нижний предел обнаружения не испытывает никакого влияния

Таблица 3

	BMJ 0	BMJ 1
UNJ (2J)	0,3нг/мл	0,3нг/мл
человеческая сыворотка без гемоглобина	100%	100%
человеческая сыворотка с гемоглобином	307%	106%
UNJ (2J) = нижний предел обнаружения		

Пример 4

Определение HBJ Ag

Предложенный состав теста BMJ 1 испытывали по сравнению с BMJ 0 на примере сэндвичевого иммуно-анализа для обнаружения HBJ Ag. BMJ 0 и 1 имели составы, указанные в Примере 3

Следующие реактивы использовались

HEPES - буфер pH7,5 HEPES - Na 0,05M

сывороточный альбумин

крупного рогатого скота 1%

генапол X 080 0,1%

IgJ - крупного рогатого скота (R) 0,1%

IgM - мыши 10мкг/мл

CAM (хлорацетамид) 0,1%

MIT (метилизотиазолон) 0,01%

AK - BI (антитело, биотинилированное посредством биотин-DDS) MAK < HBJ > M5AIO - IgJ - BI (DDS) 1 7,5 в HEPES - буфере pH7,5 300нг/мл
TAJ (рутенилированное антитело) MAK < HBS > M5AIO - F (ав') 2 - BPR U (Трис) (2, 2'-бипиридил) рутенийхлоридгексагидрат, связанный посредством DDS с моноклональным антителом против HBJ 5J (F (ав'))-фрагмент) в HEPES - буфере pH7,5 500нг/мл

Пробы стандарт а - h концентрация HBS Ag

а 0Е/мл

б 0,22Е/мл

с 0,52Е/мл

д 1,08Е/мл

е 2,30Е/мл

ф 4,50Е/мл

g 10,30Е/мл

h 22,20Е/мл

Магнитные частицы, покрытые оболочкой из стрептавидина

(Динабеадс) Dynabeads M - 280 стрептавидин в HEPES - буфере pH 7,5 600мкг/мл

Для определения были соединены

Dynabeads M - 280 50мкл (re)

AK - BI 50мкл

TAJ 40мкл

проба 50мкл

HEPES - буфер pH7,5 20мкл

BMJ 0 или 1 150мкл

Эту смесь инкубировали в течение 16 минут при температуре 28°C, после этого переводили в измерительную ячейку с установившимся температурным режимом до 28°C, а частицы промывали с помощью BMJ 0 или 1 и осуществляли в ней измерение

Результаты представлены в таблице 4. В результате применения BMJ 1 можно было заметно улучшить нижний предел обнаружения. Также по сравнению с BMJ 0 был понижен VK (коэффициент вариации). Отношение величин стандартных проб h к а калибровочной кривой повышено при BMJ 1, в результате чего достигается лучшее дифференцирование калибровочной кривой

Таблица 4

	BMJ 0	BMJ 1
UNJ (Е/мл)	0,21	0,06

Стандарт h/a	40	78
VK (%)	6,9	4,3

UNJ = нижний предел обнаружения

VK = коэффициент вариации

Пример 5

Определение TSH

На примере (сэндвичевого) многослойного иммуно-анализа для определения TSH (тироид-стимулируемый гормон) предложенные составы теста BMJ 1 и BMJ 1 без оксабана сравнивались по отношению к составу теста согласно уровню техники BMJ 0. BMJ 0 и 1 имели состав, описанный в примере 3

Стимулируемый тироидом гормон (TSH) определяли посредством сэндвичевого иммуно-анализа. Для осуществления (определения) использовали при этом аппарат, описанный в примере 1

Для определения были соединены инкубационный буфер (содержащий 6,06г/л (Трис) Tris x HCl 1г/л хлорацетамида, 0,1г/л метилизотиазолон, pH8,0, 50г/л сывороточный альбумин, 10г/л R - IgJ)

50мкл

Магнитные частицы, покрытые стрептавидиновой оболочкой (динал, 2,8мкм) в инкубационном буфере 600мкг/мл

40re

биотинилированное посредством DSS (дисукцинидил суберат) моноклональное антитело (МАК) против TSH в инкубаци-

40re

онном буфере 3,0мкг/мл

ТАJ

(Трис) (2,2'-бипиридил) рутенийхлоридгексагидрат, связанный посредством DSS с МАК против TSH в инкубационном буфере 1,2мкг/мл

40re

Жидкость для проб и/или стандарт

50мкл

Повторная суспензия / добавка состава реактивов (BMJ 1)

100мкл

Эту смесь инкубировали в течение 16 минут при комнатной температуре (21°C), а после этого переводили в измерительную ячейку, доведенные до желаемой температуры измерения, иммобилизующие частицы промывали раствором реактивов BMJ 1 и измеряли в BMJ 1

Как пробу применяли стандарты а – е с TSH - концентрациями

- a 0 rU/ml
- b 0,39rU/ml
- c 3,54rU/ml
- d 12,4rU/ml
- e 44,3rU/ml

Результаты отражены в таблице 5. Благодаря (использованию) BMJ 1 по сравнению с BMJ 0 достигается лучший предел обнаружения. В результате применения консерванта оксабана нижний предел обнаружения снижается еще. Однозначно в обоих примерах (BMJ 1 + / - оксабан) также улучшается вариационный коэффициент

Таблица 5

	BMJ 0	BMJ 1	BMJ 1 без оксабана
UNJ(2J) (mIU / ml)	0,049	0,028	0,041
VK (%)	3,35	2,28	2,38

Сокращения имеют названные в примере 4 значения