

Chimia 44 (1990) 79-89
 © Schweizerischer Chemiker-Verband; ISSN 0009-4293

Enzym-immunologische Tests: Analytische Methoden im Baukastensystem

Harald Gallati*

Abstract. Using an enzyme-immunoassay (EIA), virtually all organic substances can be simply, specifically, and sensitively determined as well as quantitatively evaluated. For these reasons, this assay method may be of interest as an analytic tool for chemists. This report describes the individual components of an 'EIA Building Block System'. A wide variety of assay combinations can be readily developed, but only after several basic concepts have been mastered. These concepts include: what an *immunological reaction* is; the meaning of *antigen*, *antibody*, and *enzyme*; how these three components interact with the help of *covalent bonds*; and finally, what effects may be obtained by immobilizing an antigen or an antibody onto a *solid phase*. The most important EIA versions are systematically presented and discussed in order to examine unique reagent combinations. For readers who intend to further pursue the use of EIA technology, several review articles are indicated as an appendix.

1. Sind diese analytischen Methoden auch für Chemiker von Interesse?

Die enzym-immunologischen Tests (EIA) haben seit ihrer Einführung vor 20 Jahren eine rasante Entwicklung erlebt. Wegen ihrer Einfachheit und Schnelligkeit in der Testdurchführung, ihrer Sensitivität und Spezifität, und vor allem auch wegen des ausserordentlich breiten Anwendungsbereichs haben diese Tests eine grosse Bedeutung erlangt. Fast alle organischen Substanzen lassen sich enzym-immunologisch nachweisen und quantitativ bestimmen: So können Organezellen (z. B. Lymphozyten) auf Grund ihrer Oberflächenantigene differenziert werden. Mikroorganismen (Viren, Pilze, Bakterien) lassen sich nachweisen und identifizieren. Makromolekulare Substanzen wie Proteine (Antikörper, Trägerproteine, Strukturproteine), Lipoproteine, Glycoproteine, komplexe Lipide, Glycolipide, Nukleinsäuren, bioaktive Substanzen (Enzyme, Zytokine, Lymphokine, Hormone, etc.), Tumorentantigene (Canceroembryonales Antigen, alpha-Foetoprotein...) und Peptide können ebenso mit dem EIA bestimmt werden wie die niedermolekularen Substanzen (Vitamine, Drogen, Toxine, etc.). Und nicht nur pflanzliche und tierische Naturprodukte, sondern – und da sollten die Chemiker hellhörig werden – auch synthetische Moleküle können enzym-immunologisch analysiert werden.

Diese Tests haben in der medizinisch-biologischen Forschung (Gentechnologie, Biotechnologie, Immunologie, Pharmakologie, etc.) eine zentrale Bedeutung als

analytische Hilfsmittel erlangt und sie nehmen einen festen Platz ein in der human- und der veterinärmedizinischen Diagnostik (Virologie, Mykologie, Bakteriologie, Histologie, Serologie, etc.). Erwartungsgemäss hat die EIA-Analytik in den letzten Jahren auch Einzug gehalten in Disziplinen, die ausserhalb der eigentlichen Biologie liegen: forensische Chemie, Qualitätskontrolle bei der Nahrungs- und Futtermittelproduktion, Lebensmittelkontrolle, Umweltanalytik, etc.

Auch der Chemiker kann also durchaus entweder als Testanwender oder aber als 'Probeneinweiser' mit den EIA konfrontiert werden. Dabei wird ein vertieftes Verständnis dieser Technologie die Anwendung der Tests wie auch die Interpretation der Testergebnisse erleichtern.

Im Unterschied zu den bisherigen EIA-Übersichtsarbeiten sollen in diesem Aufsatz vor allem die einzelnen Bauelemente des 'EIA-Baukastensystems' (Kap. 2) möglichst eingehend erklärt werden, so dass der Leser anschliessend selbstständig einige EIA-Testkombinationen kreieren kann. Zur Überprüfung dieser 'Eigenreaktionen' sowie zur Ergänzung werden sodann im Kap. 3 und 4 die wichtigsten EIA-Testkombinationen graphisch dargestellt und kurz erläutert. Im Kap. 5 werden in einer zusammenfassenden Übersicht all jene Arbeitsschritte aufgeführt, die für die Entwicklung eines EIA notwendig sind. Auf ein eigentliches Literaturverzeichnis wird bewusst verzichtet. Dafür wird im Kap. 6 mit ein paar Literaturhinweisen auf jene Übersichtsarbeiten hingewiesen, die den weiteren Einstieg in die EIA-Technologie erleichtern.



Harald Gallati: Geboren 1938 in Näfels, Kanton Glarus (Schweiz). Nach Abschluss des humanistischen Gymnasiums 1958 Studium der Philosophie bis 1964 und anschliessend Studium der Naturwissenschaft an der Universität in Fribourg (Schweiz) mit den Hauptfächern Chemie, Biochemie, Zoologie und Botanik. 1970 Doktorat in Biochemie. Seither in der Forschungsabteilung der Firma F. Hoffmann-La Roche AG verantwortlich für die Etablierung von klinisch-chemischen, enzymatischen, immunologischen und enzymimmunologischen Analysemethoden. Teile dieser Arbeiten sind in zahlreichen Publikationen erschienen.

2. Bauelemente des EIA-Baukastensystems

2.1. Bauprinzip des EIA

Beim EIA wird generell die *immunologische Reaktion* von Antigenen und Antikörper zum Immunkomplex mit Hilfe einer zugeschalteten Indikator-Enzym-Reaktion sichtbar und messbar gemacht. Zum Aufbau eines konkreten Testsystems müssen durch entsprechende Bindungen einzelne Bauelemente untereinander verknüpft und für die heterogenen EIA einer der Reaktionspartner an eine *Festphase* gebunden werden. Prinzipiell kann im EIA das Antigen, der Antikörper und – in speziellen Fällen – auch das Enzym als Analyt bestimmt werden.

2.2. Immunologische Reaktion

Die immunologische Reaktion zwischen einem Antigen und einem Antikörper ist eine 'Erfindung' der Natur. Diese Abwehrreaktion wurde im Kampf um die Erhaltung der individuellen und der genetischen Integrität der einzelnen Organismen im Laufe der Stammesgeschichte entwickelt.

Seit der Entstehung von Leben mussten die Organismen zum Schutze ihres 'Selbst' das Nützliche (z. B. Nahrung) suchen und das Schädliche (z. B. Infekte) bekämpfen. Diese Fähigkeit der 'Selbst'-Verteidigung hat während der phylogenetischen Entwicklung im Immunsystem der Vertebraten ihren Höhepunkt erreicht. Dringt eine körperfremde, hochmolekulare Substanz in den Organismus eines Wirbeltieres ein,

* Korrespondenz: Dr. H. Gallati
 Zentrale Forschungseinheiten
 F. Hoffmann-La Roche AG
 CH-4002 Basel

so wird diese von den zirkulierenden Fresszellen (Makrophagen) nicht nur erkannt, aufgenommen und abgebaut, sondern es werden charakteristische Bruchstücke dieser Substanz – gleichsam als 'Trophäen des erlegten Feindes' – auf der Zelloberfläche dieser – als 'Antigen präsentierende Zellen' bezeichneten – Makrophagen ausgestellt. Diese präsentierten Bruchstücke des zerhackten Antigens (Epitop) werden von den ebenfalls zirkulierenden, Antikörperproduzierenden B-Zellen 'begutachtet'. Jede dieser B-Zellen trägt auf ihrer Oberfläche einen individuellen 'Antikörper-Prototyp'. Wenn nun bei der Begegnung des Makrophagen mit einer B-Zelle das präsentierte Antigen-Epitop von dem 'Antikörper-Prototyp' als 'sein Reaktionspartner' erkannt und gebunden wird, so aktiviert diese Bindungsreaktion die betreffende B-Zelle und regt sie zur raschen Vermehrung an. (Die Population der B-Zellen ist zu vergleichen mit einem Schlüsselgeschäft, das über alle möglichen Schlüsselkombinationen verfügt. Wird nun für ein fremdes Schloss ein passender Schlüssel gefunden, so werden davon – auf Vorrat – eine grosse Anzahl von Kopien angefertigt.) Die Zellen dieses B-Zellklons produzieren dann laufend eine riesige Menge von Kopien des 'Antikörper-Prototyps', die während Jahren und zum Teil lebenslang im Blut zirkulieren. Wird nun der Körper zu irgend einem Zeitpunkt von der gleichen Substanz erneut infiziert, so reagieren die Antikörper blitzschnell mit dem entsprechenden Epitop und führen diese Fremdschubstanz als Immunkomplex der Metabolisierung zu. Die Bildung von Antikörpern gegen Fremdschubstanzen durch das zelluläre Immunsystem ermöglicht also eine äusserst effiziente, spezifische und langandauernde Abwehrreaktion.

Die immunologische Reaktion ist die reversible, nicht-kovalente Bindung eines Antigens mit dem entsprechenden, vom Immunsystem gebildeten Antikörper zu einem Immunkomplex. Diese Bindung basiert auf C-Brücken, elektrostatischen Kräften, hydrophoben Bindungen und Van-der-Waals-Kräften, sie unterliegt dem Massenwirkungsgesetz und zeigt Bindungskonstanten von 5×10^4 – 10^{12} l/mol.

2.3. Antigene: Was stempelt diese Substanzen zum 'Anti'?

Antigene sind organische Substanzen, die mit entsprechenden Antikörpern reagieren und Immunkomplexe bilden können. Aber nicht alle Antigene sind in der Lage, das Immunsystem eines Organismus 'anzusprechen' und zur Produktion von Antikörpern zu aktivieren. Um den scheinbaren Widerspruch zwischen diesen beiden Aussagen zu eliminieren, müssen die Begriffe *Immunogen*, *Epitop* und *Hapten* erläutert werden.

Immunogene sind organische, hochmolekulare ($M_r > 10000$) Substanzen, die als artfremde Agenzien vom zellulären Im-

munsystem des Organismus erkannt und zu deren Bekämpfung auch entsprechende Antikörper gebildet werden. Nur hochmolekulare Antigene haben immunogene Eigenschaften, und nur diese Substanzen werden von den Makrophagen erkannt und 'behandelt', so dass die entsprechenden Informationen an die B-Zellen zur Antikörperbildung weitergegeben werden können.

Epitope. Die artfremden, hochmolekularen Antigene werden von den Makrophagen zerhackt und Bruchstücke davon den Antikörperproduzierenden B-Zellen präsentiert. Diese für ein bestimmtes Antigen charakteristischen Bruchstücke werden 'Epitope' oder auch 'Antigen-Determinanten' genannt. Die Kriterien, welche Bruchstücke eines Immunogens vom Makrophagen als besonders charakteristisch und 'ausstellungswürdig' betrachtet und für die Antikörperproduktion ausgesucht werden, sind nicht bekannt und können individuell und von Tierspezies zu Tierspezies unterschiedlich sein. Die Antikörper sind demnach nicht gegen das gesamte Antigen, sondern nur gegen seine Epitope gerichtet. So ist im Beispiel *Fig. 2* für die Immunisierung ein immunogenes Antigen mit drei Epitopen (A, B, C) dargestellt, gegen die vom Maus-Immunsystem auch drei verschiedene Antikörper produziert werden.

Haptene (z.B. Toxine, Drogen, etc.) sind niedermolekulare ($M_r < 10000$) Antigene, die zwar mit Antikörpern reagieren können, die aber keine immunogene Aktivität besitzen. Diese kleinen Substanzen fallen durch die 'Maschen' des Immunsystems, zu ihrer Eliminierung werden sie zum Teil in der Leber metabolisiert und mit der Galle oder durch die Niere ausgeschieden. Um den Haptenen immunogene Eigenschaften zu verleihen, müssen sie entweder durch Polymerisation entsprechend vergrössert oder aber einem 'Träger-Immunogen' als zusätzliches Epitop 'aufge-

pflropft' werden. Damit besteht die Möglichkeit, dass von den Makrophagen bei der Metabolisierung dieses 'Träger-Immunogens' auch das Bruchstück mit dem gebundenen Hapten den Antikörperproduzierenden B-Zellen präsentiert wird. Dass neben dem 'aufgepfropften' Hapten auch die nativen Epitope des 'Träger-Immunogens' von den Makrophagen präsentiert werden und zur Produktion von entsprechenden Antikörpern aktivieren, ist nach dem Gesagten selbstverständlich.

Die Antigene sind Grundbausteine im EIA-Baukastensystem. Sie werden nicht nur für die Immunisierung von geeigneten Tieren im Hinblick auf die Antikörperbildung benötigt, sondern sie müssen im EIA auch als Testreagenzien zum Nachweis der entsprechenden Antikörper und als Standard oder Kontrolle bei den Antigentests eingesetzt werden. Zur Gewinnung der Antigene stehen die bekannten Extraktions- und physikalisch-chemischen Reinigungsmethoden zur Verfügung. Zudem können heute grössere Mengen dieser Substanzen biotechnologisch und gentechnologisch hergestellt werden.

2.4. Antikörper: individuell angefertigte 'Handschellen' in bester Massarbeit

Struktur. Die Antikörper sind Globuline, die zwei (IgG) oder mehrere (IgM) identische Antigen-bindende Stellen besitzen, so dass sie mit dem entsprechenden Antigen zusammen einen Immunkomplex bilden können. In *Fig. 1* ist schematisch die Antikörperstruktur des IgG dargestellt. Das Molekül, das die Form eines 'Y' aufweist, ist aufgebaut aus zwei 'leichten' ('L', $M_r = 25000$) und zwei 'schweren' ('H', $M_r = 50000$) Ketten, die mit Hilfe von Disulfidbrücken verbunden und stabilisiert sind. Der Stamm wird als F_c -Fragment be-

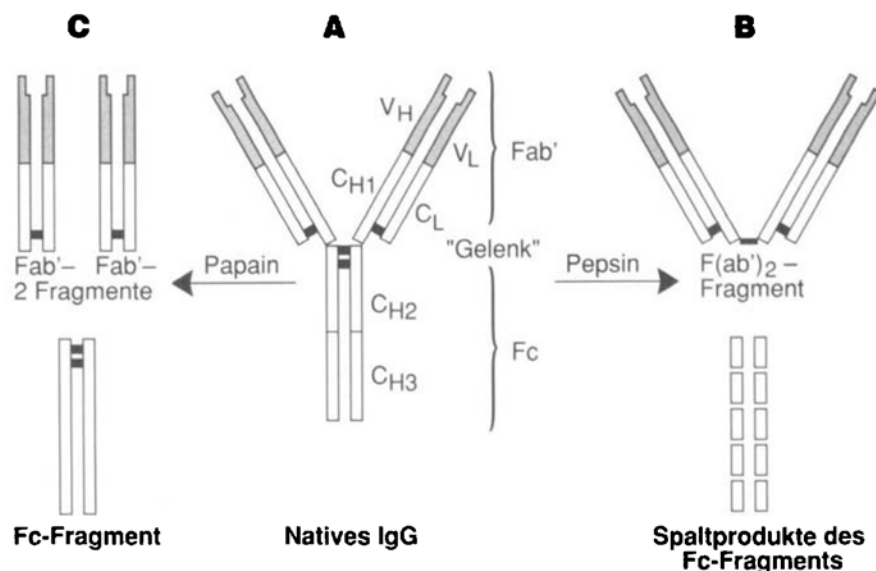


Fig. 1. Schematische Darstellung der Antikörperstruktur des IgG sowie der enzymatische Abbau zu den beiden monovalenten F_{ab} -Fragmenten (Papain) resp. dem bivalenten $F_{(ab)2}$ -Fragment (Pepsin)

zeichnet und besteht aus zwei konstanten Regionen (C_{H2} und C_{H3}), während die beiden Schenkel (F_{ab} -Fragment) aus je einer konstanten (C_{H1} resp. C_{L1}) und einer für die Antigenbindung verantwortlichen variablen (V_{H1} resp. V_{L1}) Domäne aufgebaut sind. Durch enzymatische Einwirkung kann vom Antikörper das oft im EIA störende F_c -Fragment abgetrennt werden, ohne dass die immunologische Aktivität des bivalenten $F_{(ab)2}$ -Fragments (Pepsin-Abbau) oder der beiden monovalenten F_{ab} -Fragmente (Papain-Abbau) beeinträchtigt wird.

Polyklonale Antikörper. Zur Herstellung von Antikörpern (Fig. 2) wird das immunogene Antigen, das in diesem Beispiel drei Epitope (A, B, C) aufweist, einem Tier (z. B. einer Maus) eingespritzt. Durch die Vermittlung der Makrophagen binden drei B-Zellen mit ihren 'Antikörper-Prototypen' an die entsprechenden, auf der Zelloberfläche präsentierten Epitope. Durch diesen Kontakt wird der Reifungsprozess für diese drei B-Zellen ausgelöst, sie vermehren sich und produzieren eine grosse Anzahl von Kopien ihrer 'Antikörper-Prototypen', die sie ins Blut abgeben. Zur Gewinnung dieser polyklonalen (resp. triklonalen) Antikörper werden nach der Blutentnahme die Zellen entfernt, aus dem Antiserum die Globulin-Fraktion ausgefällt und mit Hilfe von immobilisiertem Antigen affinitätschromatographisch die spezifischen Antikörper isoliert.

Monoklonale Antikörper. Die reifen, Antikörper-produzierenden B-Zellen können aus der Milz der Maus entnommen und mit Maus-Myelomzellen fusioniert werden. In diesen Hybridzellen ist die Fähigkeit zur Antikörperproduktion (B-Zelle) und die endlose Teilbarkeit (Krebszelle) vereinigt. Nach Selektion und Klonierung lassen sich anschliessend in Zellsuspension oder *in vivo* (z. B. Bauchhöhle der Maus) diese B-Zellen vermehren und grosse Mengen von monoklonalen Antikörpern kostengünstig herstellen. Diese sind – im Unterschied zu den polyklonalen Antikörpern – homogen bezüglich den physikalischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften, und sie können zeitunabhängig in gleichbleibender Qualität produziert werden. Zudem können gezielt jene Antikörper ausgewählt werden, die mit einem gewünschten Epitop des betreffenden Antigens reagieren, wodurch zum Beispiel die Aktivität eines Enzyms gehemmt oder die biologische Funktion eines Cytokins neutralisiert werden kann.

Die Antikörper selber haben als Globuline auch antigene und immunogene Eigenschaften, so dass sie als artfremde Proteine das zelluläre Immunsystem des betroffenen Organismus zur Bildung von Antikörpern gegen diese Globuline anregen können. Auf diese Weise ist es möglich, dass ein Antigen mit seinem Antikörper reagiert, und dass dieser Antikörper seinerseits von einem zweiten Antikörper gebunden wird, wie dies in Fig. 11 und 12 dargestellt ist. Dadurch werden die Kombina-

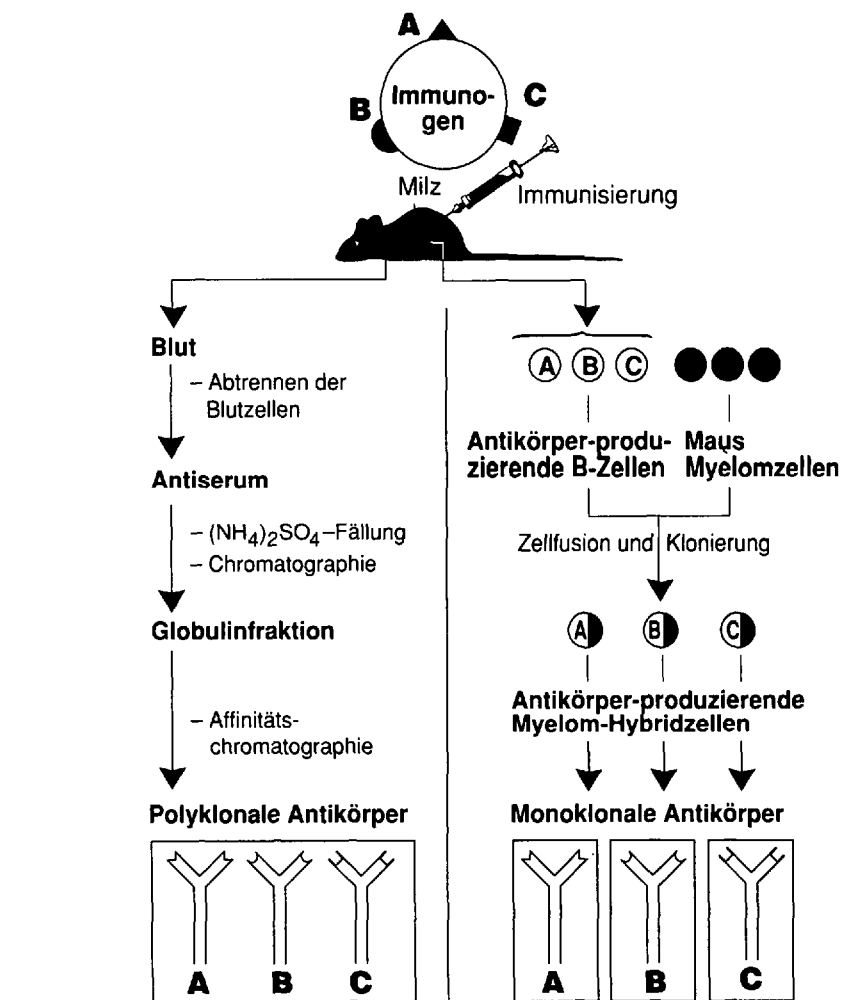


Fig. 2. Schematische Darstellung für die Produktion und Reinigung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern, ausgehend von einem Immunogen mit den drei verschiedenen Antigen-Determinanten (Epitope) A, B, C

tionsmöglichkeiten des EIA-Baukastensystems erheblich erweitert.

2.5. Enzyme: 'Gute Verstärker machen die halbe Musik!'

Die immunologische Reaktion zwischen einem Antigen und den entsprechenden Antikörpern kann mit verschiedenen und zum Teil sehr einfachen Methoden sichtbar und messbar gemacht werden. Mit einer gekoppelten Enzym-Reaktion aber wird das Meßsignal auf Grund der katalytischen Aktivität wesentlich verstärkt.

Enzyme sind Proteine mit katalytischer Aktivität. Sie ermöglichen die biochemischen Reaktionen in allen pflanzlichen und tierischen Zellen, wo sie dementsprechend in grosser Vielfalt vorkommen. Aus diesem biologischen Material können die verschiedenen Enzyme durch physikalisch-chemische sowie immunologische Extraktions- und Reinigungsmethoden isoliert werden. Die schematische Darstellung der Enzym-Struktur (Fig. 3) zeigt, dass nur das Holoenzym katalytisch aktiv ist und das zugesetzte Substrat zu spalten vermag. Diese Aktivität kann durch Enzym-spezifische Inhibitoren reversibel oder irreversi-

bel gehemmt werden. Das Holoenzym kann in die beiden katalytisch inaktiven Untereinheiten Apoenzym und Coenzym zerlegt werden.

Damit ein Enzym als Indikator bei den EIA eingesetzt werden kann, sollte es folgende Bedingungen erfüllen: Das Enzym muss in hoher Reinheit, gleichbleibender Qualität, in genügender Menge und preisgünstig jederzeit verfügbar sein. Durch die kovalente Bindung des Enzyms mit einem Antigen oder einem Antikörper darf die enzymatische als auch die immunologische Aktivität der Reaktionspartner keine wesentliche Veränderung erfahren. Neben einer guten Lagerstabilität sollte das Enzym eine möglichst hohe katalytische Aktivität aufweisen. Und für die Aktivitätsmessung sollten Substrate zur Verfügung stehen, die in der notwendigen Reinheit leicht und preisgünstig erhältlich sind, die keine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellen und eine gute Praktikabilität besitzen. Zudem sollten durch die enzymatische Umsetzung der eingesetzten Substrate stabile Produkte entstehen, die möglichst hohe Meßsignale aufweisen und die mit den herkömmlichen Messgeräten kolorimetrisch, fluorimetrisch, lumionometrisch oder auch kalorimetrisch bestimmt werden

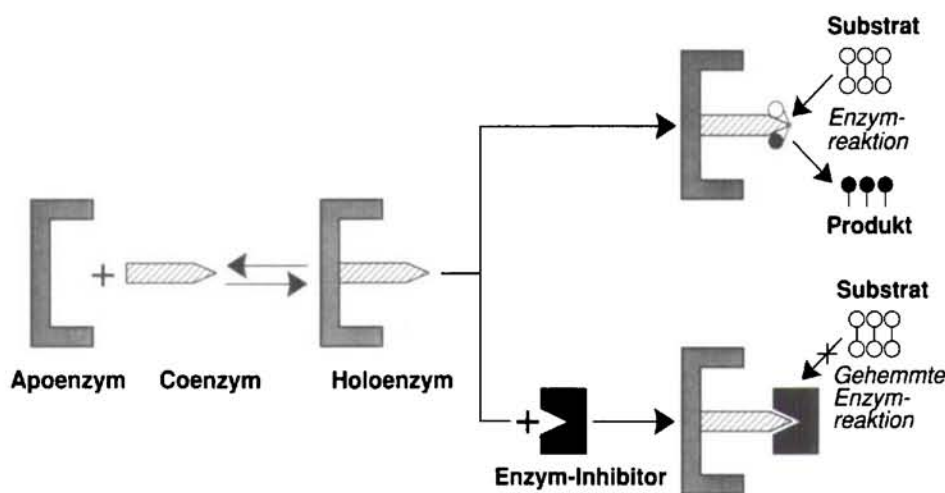


Fig. 3. Schematische Darstellung der Enzym-Struktur. Das katalytisch aktive Holoenzym ist zusammengesetzt aus dem Apoenzym und dem Coenzym. Durch Zugabe eines Enzym-spezifischen Inhibitors kann die Umsetzung des Substrats gehemmt werden.

können. In der Tabelle sind jene Enzyme aufgelistet, die in den bisherigen EIA vorwiegend eingesetzt wurden.

2.6. Feste Phasen oder Trägersysteme: 'Baukasten für Fortgeschrittene'

Die drei Bausteine Antigen, Antikörper und Enzym bilden gleichsam den 'EIA-Baukasten 1', mit dem die verschiedenen Testkombinationen des 'homogenen EIA' (Kap. 3) möglich sind. Bei diesen Tests wird durch die immunologische Reaktion des Antigens mit seinem Antikörper zugleich die mit dem Testsystem gekoppelte Enzym-Aktivität verstärkt oder vermindert, so dass diese EIA in einer homogenen Testphase ohne Trennschritt durchgeführt werden können. Die gemessene Enzym-Aktivität ist ein Mass für die erfolgte immunologische Reaktion und diese ist wiederum ein Mass für das Vorhandensein von Antigen und Antikörper im Testmilieu.

Andere Testkombinationen basieren auf dem Prinzip der 'heterogenen EIA'-Testtechnik (Kap. 4). Ein Reaktionspartner (Antigen oder Antikörper) wird vor, während oder nach der immunologischen Reaktion an eine feste Phase gebunden, so dass anschliessend der gebildete Immunkomplex vom nicht gebundenen Material abgetrennt werden kann. Mit der festen Phase als zusätzliches Bauelement wird ein

'EIA-Baukasten 2' mit wesentlich erweiterten Testkombinationen erhalten.

Als Trägersystem für diese feste Phase können Glas, Kunststoff (Polystyrol, PVC, Nylon, etc.) organische Substanzen (Cellulose, Agarose, etc.) oder auch anorganische Substanzen (Kieselgel, etc.) in jeder beliebigen Form (Kugel, Röhrchen, Küvetten, Plättchen, Stäbchen, Folien, Mikrotiterplatten, etc.) verwendet werden.

Die Bindung des Antigens oder der Antikörper an die Festphase kann adsorptiver, kovalenter oder auch biologischer (Biotin-Avidin) Art sein. Bei der Immobilisierung eines Reaktionspartners sind vor allem zwei Aspekte zu berücksichtigen: Erstens darf die immunologische Aktivität des gebundenen Antigens oder des Antikörpers nicht wesentlich verändert werden, und zweitens muss der Reaktionspartner so fest an das Trägersystem gebunden sein, dass er durch die Bildung des Immunkomplexes nicht weggerissen wird. Fig. 12 zeigt, dass dieser Immunkomplex sehr grosse Ausmasse annehmen kann und entsprechende Anforderungen an die Haftfestigkeit des Antigens an die Festphase stellt.

2.7. Kovalente und nicht-kovalente Bindungen

Erst durch die Verbindung der einzelnen Bauelemente miteinander und an die Festphase wird das 'EIA-Baukastensystem'

funktionsfähig. Die verschiedenen Arten von Bindungsreaktionen sollen aufgelistet und kurz erläutert werden.

Die immunologische Bindungsreaktion zwischen einem Antigen und einem Antikörper ist die Basis der EIA. Sie ist abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner, vom Puffersystem und der Ionenstärke, vom pH-Wert und der Inkubationstemperatur sowie den diversen Zusätzen, die gewollt oder ungewollt zusammen mit der Analysenprobe dem Reaktionsmilieu beigemischt werden.

Die physikalische Adsorption eines Antigens oder eines Antikörpers an eine Festphase ist dann erfolgreich, wenn einerseits die immunologische Bindungskapazität des immobilisierten Reaktionspartners erhalten bleibt und andererseits nach der Bildung des Immunkomplexes dieser Reaktionspartner nicht von der Festphase weggerissen wird. Diese adsorptive Bindung wird wesentlich beeinflusst vom Ladungsverhältnis der Antigene oder der Antikörper sowie vom verwendeten Trägermaterial.

Kovalente Bindungen werden benötigt, um Antigene oder Antikörper mit einem Enzym zu konjugieren, um Haptene als zusätzliches Epitop auf ein 'Träger-Immogen' 'aufzupfropfen' oder um Antigene (besonders Haptene) an eine Festphase zu binden. Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um diese kovalenten Bindungen herzustellen: Erstens kann ein Reaktionspartner direkt aktiviert und anschliessend mit dem zweiten Partner konjugiert werden. Fig. 4 zeigt schematisch diese einfachste Bindungsmethode am Beispiel der Konjugatbildung der Peroxidase mit einem Antikörper. Natriumperodat oxidiert Zuckerreste des Enzyms zu reaktiven Aldehyd-Gruppen, die anschliessend mit freien Amino-Gruppen des Antikörpers eine kovalente Bindung eingehen. In gleicher Weise kann die Peroxidase oder ein anderes zuckerhaltiges Enzym auch mit einem Antigen konjugiert werden. Zweitens können mit homobifunktionellen Bindungsreagenzien (z. B. Glutardialdehyd) die gewünschten Konjugate hergestellt werden. Bei der Umsetzung von zwei Proteinen (Enzym mit einem Antigen oder Enzym mit einem Antikörper) entstehen bei dieser Bindungsmethode die unterschiedlichsten Polymere, indem die beiden Reaktionspartner miteinander und jeder mit sich selber reagieren und dabei grössere oder kleinere, heterogene Komplexe bil-

Tabelle. Enzyme, die im heterogenen und im homogenen EIA als Indikator eingesetzt werden

Enzyme	Extrahiert aus	Substrat
Peroxidase (EC 1.11.1)	Meerrettich	H ₂ O ₂ /Chromogen
Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	Kälberdarm <i>E. coli</i>	4-Nitrophenol 4-Methylumbelliferyl-phosphat
β-D-Galactosidase (EC 3.2.1.23)	<i>E. coli</i>	2-Nitrophenol-β-D-galactopyranoside 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside
Glucose oxidase (EC 1.1.3.4)	<i>Aspergillus niger</i>	Glucose
Glucoamylase (EC 3.2.1.3)	<i>Rhizopus niveus</i>	Glycogen
Lysozyme (EC 3.2.1.17)	Hühner-Eiweiss	<i>Micrococcus luteus</i>
Malat-dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	Schweineherz-Mitochondrien	Apfelsäure/NAD
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	D-Glucose-6-phosphat/NAD(P)

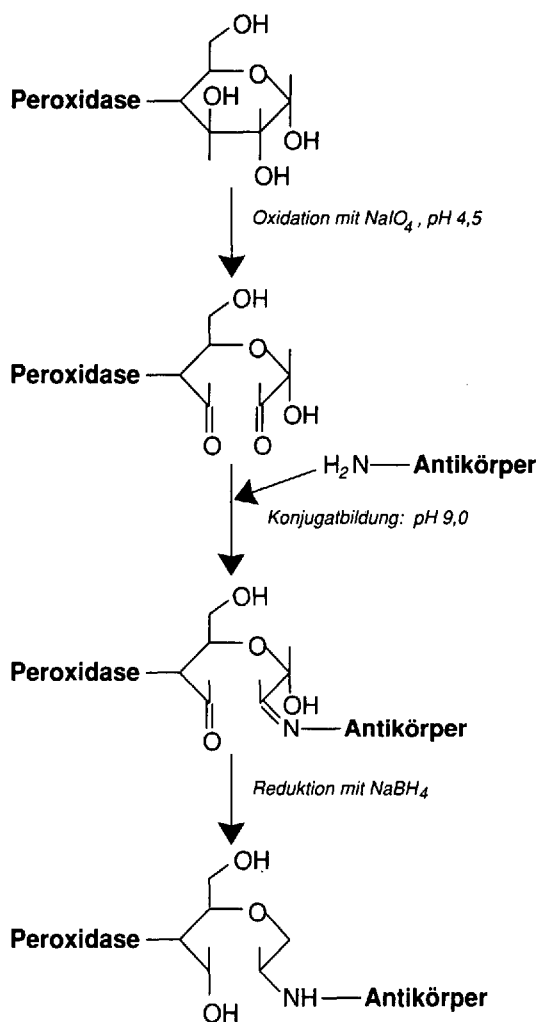


Fig. 4. Kovalente Bindung der Peroxidase mit dem Antikörper durch NaIO_4 -Aktivierung des Enzyms: schematische Darstellung

den. Drittens stehen heute auch heterobifunktionelle Bindungsreagenzien (z. B. *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP)) zur Verfügung, mit denen homogene Konjugate hergestellt werden können, die ausschliesslich aus dem ersten und dem zweiten Reaktionspartner in einem gewünschten Mengenverhältnis bestehen. Wesentliche Bedingung für all diese Bindungsmethoden ist die Erhaltung der immunologischen und der enzymatischen Aktivität im gebildeten Konjugat.

Haptene als niedermolekulare Substanzen (z. B. Amphetamin, Barbiturat, etc.) müssen meistens vorerst derivatisiert werden, damit sie über die eingebauten funktionellen Gruppen (Carboxyl- oder Amino-Gruppe) an ein Trägerprotein gebunden werden können. Dabei ist im Hinblick auf die Antikörper-Bildung bei der Immunisierung wie auch für die immunologische Reaktion im EIA auf eine gute Exposition der Hapten-Molekularstruktur zu achten. In den meisten Fällen ist nach der Bindungsreaktion ein Abtrennen der für den EIA geeigneten Konjugate von den übrigen Komponenten durch physikalische, chemische oder immunologische Reinigungsmethoden notwendig.

3. Homogene EIA

3.1. Generelles Testprinzip

Bei all diesen homogenen EIA-Testkombinationen wird durch die immunologische Reaktion eines Antigens mit seinem Antikörper unmittelbar auch die mit dem System gekoppelte Enzym-Aktivität modifiziert. Diese Enzym-Modifikation kann in einer Reaktivierung oder aber einer Hemmung der katalytischen Reaktion bestehen. Sie ist ein Mass für die Stärke der immunologischen Reaktion und daher auch ein Mass für die im Testmilieu vorhandene Konzentration des Antigens oder der Antikörper. Da eine Abtrennung des gebildeten Immunkomplexes nicht erforderlich ist, können diese EIA in einer homogenen Phase wie einfache Tests zur Bestimmung von Enzymen durchgeführt werden. Die immunologischen Reaktionszeiten sind kurz und die resultierende Enzym-Aktivität wird meistens kinetisch gemessen, so dass sich eine vollautomatische Testdurchführung (z. B. Zentrifugal-Analysator) förmlich anbietet.

Diese homogenen EIA sind genau und gut reproduzierbar, sie weisen aber gene-

rell auf Grund der kurzen Reaktionszeiten und des begrenzten Signalbereichs der Enzym-Modifikation eher eine geringe Sensitivität auf. Zudem können sie leicht beeinflusst werden durch den 'Matrix-Effekt', durch endogene Enzym-Aktivitäten sowie durch Aktivatoren oder Inhibitoren der immunologischen und der enzymatischen Aktivität, welche zusammen mit der Analysenprobe ins Testmilieu eingeschleppt werden.

3.2. Immunologischer Enzymhemmtest

Testprinzip. In Fig. 5 ist schematisch der 'Immunologische Enzymhemmtest' dargestellt. Die Analysenprobe mit zwei verschiedenen Isoenzymen (A, B) wird mit einem - vorzugsweise monoklonalen - Antikörper zusammengegeben, der spezifisch mit dem Isoenzym B reagiert und dadurch die enzymatische Aktivität neutralisiert. Das nachträglich zugegebene Substrat kann ausschliesslich vom freien und aktiven Isoenzym A umgesetzt werden. Durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität vor und nach der Zugabe dieser neutralisierenden Antikörper kann neben der Gesamtaktivität der Isoenzyme auch die Einzelaktivität der beiden individuellen Isoenzyme (A, B) berechnet werden.

Bemerkungen. In den verschiedenen Körperzellen und Organen werden Enzyme hergestellt, die eine gleiche katalytische Aktivität aufweisen, die sich aber in der molekularen Struktur unterscheiden. Da die Bestimmung von organspezifischen Isoenzymen von grosser diagnostischer Bedeutung ist, hat man schon früh versucht, diese mit physikalisch-chemischen Methoden aufzutrennen oder sie mit Hilfe von speziellen Inhibitoren zu unterscheiden. Diese schwierige und oft erfolglose Aufgabe kann heute durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gelöst werden. Bei diesem einfachsten EIA ist das Antigen zugleich auch das 'Indikator-Enzym'.

3.3. Enzym-modifizierender Immuntest

Testprinzip. Dieses allgemein als EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) bezeichnete Testprinzip ist in der Fig. 6 schematisch zusammengefasst.

A) Durch die kovalente Bindung eines Antigens - vorzugsweise eines Haptens - an ein für diese Testtechnik geeignetes Enzym (Lysozym, Malat-Dehydrogenase, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) wird die katalytische Aktivität dieses Enzyms modifiziert oder modifizierbar. Diese Veränderung der Enzym-Aktivität kann verursacht sein durch eine sterische Hinderung, durch molekulare Konformationsänderung oder durch Immobilisierung der Enzym-Struktur.

B) Im Beispiel der Fig. 6 wird durch die Konjugatbildung des Haptens mit dem Enzym die katalytische Aktivität gehemmt. Wird dieses Hapten-Enzym-Kon-

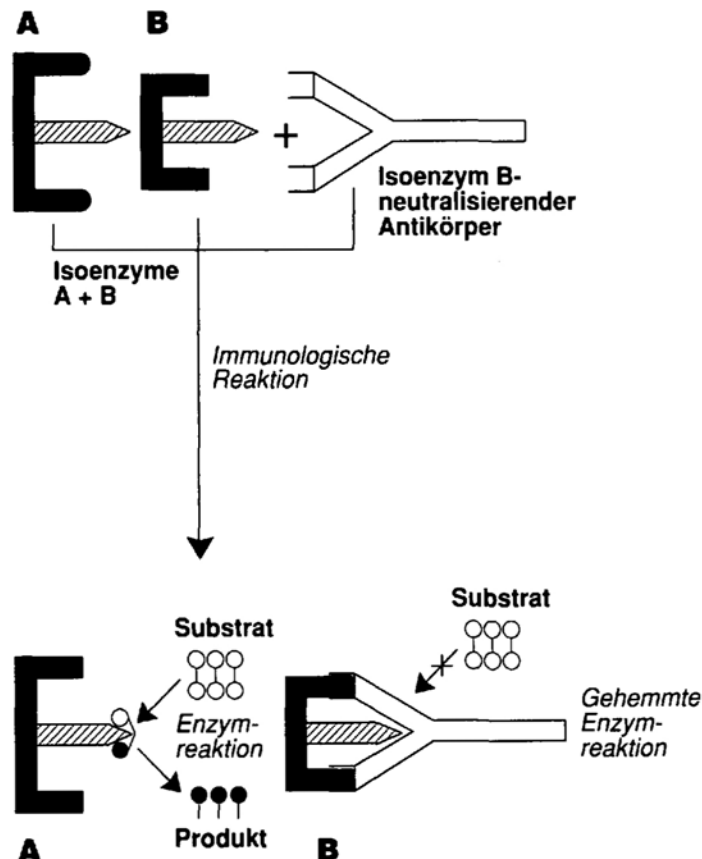


Fig. 5. Schematische Darstellung des 'Immunologischen Enzymhemmtests'. Das Testprinzip ist im Kap. 3.2 beschrieben.

jugat mit entsprechenden Hapten-Antikörpern zur Umsetzung gebracht, so wird durch die Bildung des Immunkomplexes zugleich das Enzym reaktiviert und das anschliessend zugegebene Substrat kann gespalten werden. Wird aber mit der Analysenprobe eine grosse Menge von freiem Hapten mit den in genau definierter und begrenzter Menge vorhandenen Hapten-Antikörpern vorinkubiert, so werden diese Antikörper vollständig abgesättigt und für die Reaktivierung des nachträglich zugeetzten Hapten-Enzym-Konjugats stehen keine Antikörper mehr zur Verfügung. Demnach ist die im Testsystem gemessene Enzym-Aktivität indirekt proportional der Hapten-Konzentration in der Analysenprobe.

Umgekehrte Verhältnisse liegen vor, wenn das Hapten-Enzym-Konjugat katalytisch aktiv ist und erst durch die Komplexbildung mit dem Hapten-Antikörper inaktiviert wird. (Diese Testvariante ist in Fig. 6 nicht dargestellt.) Werden die vorhandenen Hapten-Antikörper vom freien Hapten aus der Analysenprobe abgesättigt, so stehen keine Antikörper mehr zur Verfügung, um mit dem anschliessend zugefügten Hapten-Enzym-Konjugat einen Immunkomplex zu bilden, durch den die Enzym-Aktivität gehemmt würde. Die in diesem Testsystem gemessene Enzym-Aktivität ist demnach direkt proportional der

Hapten-Konzentration in der Analysenprobe.

Bemerkungen. Dieses vor allem für automatisierte Durchführung geeignete Testprinzip hat eine breite Anwendung gefunden im Bereich der Drogen-, Toxin-, Hormon- und Medikamentenanalytik. Diese Tests sind äusserst praktikabel, genau und reproduzierbar und weisen eine für diese Anwendungsbereiche genügende Test-Sensitivität auf. Generell muss aber darauf geachtet werden, dass diese Tests nicht in störender Weise durch Faktoren aus der Analysenprobe beeinflusst werden wie etwa durch endogene Enzyme oder durch Aktivatoren und Inhibitoren, welche die immunologische oder enzymatische Aktivität verändern.

3.4. Enzym-Inhibitor-Immuntest

Testprinzip. In Fig. 7 ist der 'Enzym-Inhibitor-Immuntest' schematisch dargestellt. Das Antigen, vorzugsweise ein Hapten, wird kovalent an den Enzym-Inhibitor gebunden. Durch die Komplexbildung mit dem entsprechenden Hapten-Antikörper

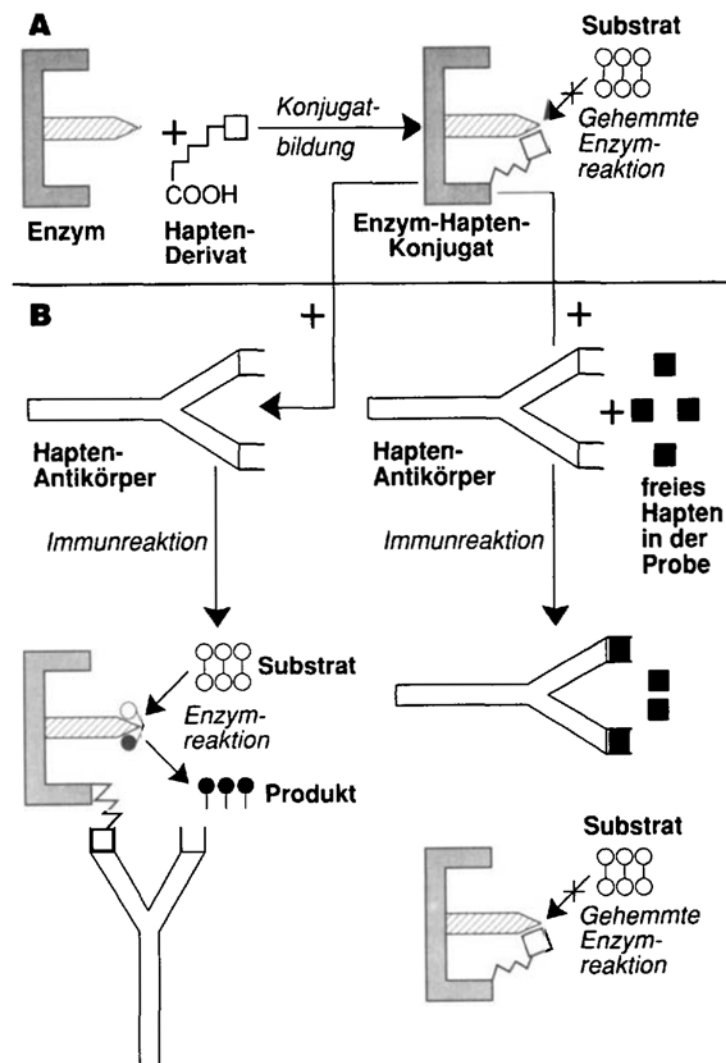


Fig. 6. Schematische Darstellung des 'Enzym-modifizierenden Immuntests'. Das Testprinzip ist im Kap. 3.3 beschrieben.

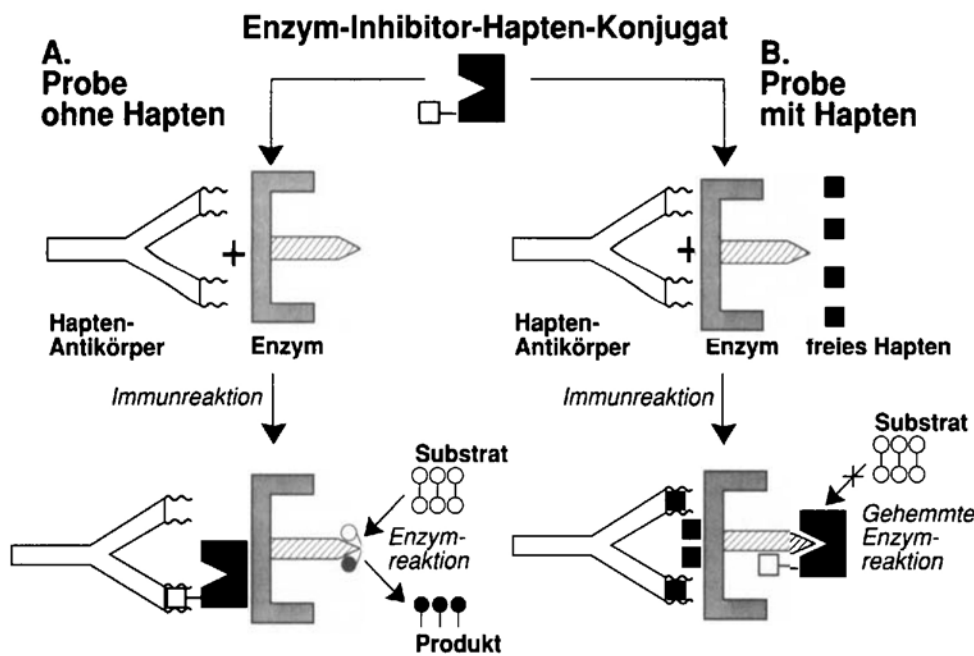


Fig. 7. Schematische Darstellung des 'Enzyminhibitor-Immuntests'. Das Testprinzip ist im Kap. 3.4 beschrieben.

wird zugleich der Inhibitor neutralisiert, so dass das nachfolgend zugegebene Enzym ungehemmt das Substrat umsetzen kann. Wird aber mit der Analysenprobe freies Hapten mit den in einer genau bestimmten und begrenzten Menge vorhandenen Antikörpern vorinkubiert, so werden diese Antikörper vollständig abgesättigt, so dass sie mit dem Hapten des Inhibitors nicht mehr reagieren können. Der Inhibitor bleibt frei und kann das nachfolgend zugesetzte Enzym entsprechend hemmen. Mit zunehmender Hapten-Konzentration in der Analysenprobe bleibt eine entsprechend grössere Menge des Inhibitors frei, so dass eine geringere Enzym-Aktivität gemessen wird. Die Enzym-Aktivität ist der Hapten-

Konzentration in der Analysenprobe indirekt proportional.

Bemerkungen. Diese Testkombination wurde bis heute eher selten angewendet, so dass gesicherte Daten bezüglich der Praktikabilität, der Sensitivität, der Genauigkeit und der Reproduzierbarkeit für dieses Testsystem noch fehlen.

3.5. Coenzym-Immuntest

Testprinzip. Bei dieser Testkombination (Fig. 8) wird das Coenzym mit einem Antigen, vorzugsweise einem Hapten, konjugiert. Durch die Komplexbildung des Hapten-Antikörpers mit diesem gebundenen

Hapten wird zugleich auch das Coenzym neutralisiert, so dass es nicht mehr ins nachträglich zugefügte Apoenzym eingebaut und zum katalytisch aktiven Holoenzym rekonstituiert werden kann. Wird aber eine Analysenprobe mit einer hohen Konzentration an freiem Hapten mit den in genau definierter und begrenzter Menge vorhandenen Antikörpern vorinkubiert, so werden diese Antikörper vollständig abgesättigt und können mit dem nachträglich zugesetzten Hapten-Coenzym-Konjugat nicht mehr reagieren. Das Coenzym bleibt frei und kann mit dem Apoenzym zusammen das katalytisch aktive Holoenzym bilden. Die gemessene Enzym-Aktivität ist direkt proportional der Hapten-Konzentration in der Analysenprobe.

Bemerkung. Auch diese Testkombination hat bis heute keine breite Anwendung erfahren, so dass bezüglich den Testeigenschaften (Sensitivität, Praktikabilität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit) keine fundierten Angaben gemacht werden können.

4. Heterogene EIA (ELISA)

4.1. Generelles Testprinzip der ELISA

Bei den ELISA ('Enzyme-Linked Immunosorbent Assay')-Testkombinationen wird vor, während oder nach der immunologischen Reaktion einer der Reaktionspartner adsorptiv, kovalent oder auch biologisch an eine feste Phase gebunden. Ein anderer Reaktionspartner, der mit einem Enzym konjugiert ist, wird mit der Testlösung zugegeben und bildet mit dem an die Festphase gebundenen Reaktionspartner direkt oder indirekt einen Immunkomplex. In einem Waschschritt wird das nicht gebundene Material abgetrennt und anschliessend durch Zugabe von entsprechendem Substrat die katalytische Aktivität des immunologisch an die Festphase gebundenen Enzyms gemessen.

Der erforderliche Trennschritt verschlechtert die Praktikabilität dieser 'heterogenen EIA' und erschwert die Automatisierung dieser Tests. Andererseits werden die einzelnen Reaktionsschritte übersichtlicher und lassen sich leichter unter optimalen Reaktionsbedingungen durchführen. Zudem kann die Dauer der immunologischen und der enzymatischen Reaktion so verlängert werden, dass die maximal mögliche Test-Sensitivität erreicht werden kann. Mit diesen Testmethoden können niedermolekulare (z.B. Haptene) und hochmolekulare Antigene wie auch Antikörper nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

4.2. Kompetitiver ELISA mit immobilisiertem Antigen

Testprinzip. In Fig. 9 (1) ist schematisch der 'Kompetitive ELISA mit immobilisiertem Antigen' dargestellt. Das an eine feste

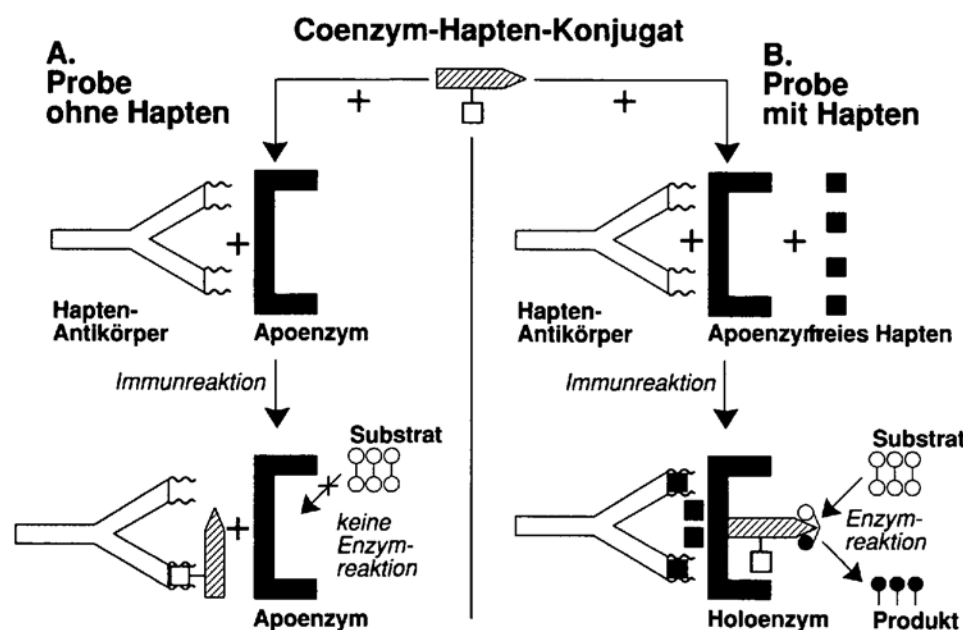


Fig. 8. Schematische Darstellung des 'Coenzym-Immuntests'. Das Testprinzip ist im Kap. 3.5 beschrieben.

Phase gebundene Antigen wird mit einer genau definierten und begrenzten Menge von entsprechenden, Enzym-markierten Antikörpern zur Umsetzung gebracht (Version A). Nach der Ausbildung der Immunkomplexe wird das nicht gebundene Material (besonders überschüssiges Enzym-Antikörper-Konjugat) mit einem Waschschrift abgetrennt und anschliessend durch Zugabe von Substrat die

zuerst das freie Antigen der Analysenprobe mit den Enzym-markierten Antikörpern zur Umsetzung gebracht und anschliessend diese Reaktionsmischung mit dem an die Festphase immobilisierten Antigen inkubiert werden.

Bemerkung. Für diese Testkombination wird eine relativ grosse Menge Antigen benötigt, die nicht immer leicht beschafft werden kann. Und das Antigen muss ad-

Je mehr freies Antigen mit der Analysenprobe ins Test-System eingeführt wird, um so geringer ist die Möglichkeit des Enzym-markierten Antigens, mit den nur in beschränkter Menge vorhandenen, immobilisierten Antikörpern zu reagieren (Version B). Nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Materials wird die über das Antigen immunologisch an die Festphase gebundene Enzym-Menge durch Inkubation mit dem betreffenden Substrat bestimmt. Die dabei gemessene Enzym-Aktivität ist indirekt proportional der Antigen-Konzentration in der Analysenprobe.

Auch diese Testkombination kann *simultan* (gleichzeitige Inkubation des zu bestimmenden Antigens der Analysenprobe, dem Enzym-markierten Antigen und den an die Festphase gebundenen Antikörpern) oder *sequentiell* (Vorinkubation des zu bestimmenden Antigens mit den immobilisierten Antikörpern und anschliessende Zugabe des Enzym-konjugierten Antigens) durchgeführt werden.

Bemerkungen. Auch diese Test-Version wird sehr häufig angewendet und eignet sich als 'Screening', 'Feld'- und 'Home'-Test. Diese Bestimmungsmethode ist bei quantitativer Test-Durchführung genau, reproduzierbar und sehr sensitiv. Voraussetzung für diese Test-Kombination ist die Bindung einer genau definierten Menge von Antikörpern an die Festphase sowie die Konjugation des Antigens mit dem betreffenden Enzym.

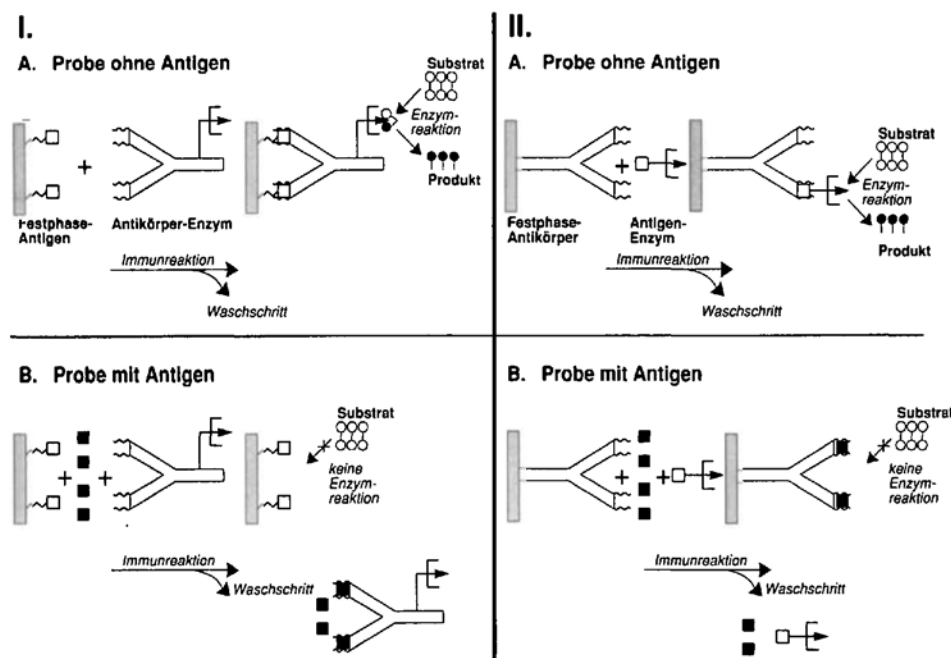


Fig. 9. Schematische Darstellung des 'kompetitiven ELISA mit immobilisiertem Antigen' sowie des 'kompetitiven ELISA mit immobilisiertem Antikörper'. Die Testprinzipien dieser beiden Testkombinationen sind im Kap. 4.2 und 4.3 beschrieben.

Menge des immunologisch an die Festphase gebundenen Enzyms bestimmt.

Werden nun die Enzym-markierten Antikörper mit einer Analysenprobe vorinkubiert, die das nachzuweisende Antigen in hoher Konzentration enthält, so reagieren die Antikörper mit dem freien Antigen und bilden lösliche Immunkomplexe (Version B). Bei der anschliessenden Inkubation mit den an die Festphase gebundenen Antigenen können die schon abgesättigten, Enzym-markierten Antikörper keine Reaktion mehr eingehen. Sie bleiben in Lösung und werden beim nachfolgenden Waschschrift als 'nicht gebundenes Material' abgetrennt. Da unter diesen Bedingungen kein Enzym an die Festphase gebunden wird, kann das anschliessend zugesetzte Substrat katalytisch nicht umgesetzt werden. Die bei diesem Test-System gemessene Enzym-Aktivität auf der Festphase ist indirekt proportional der Antigen-Konzentration in der eingesetzten Analysenprobe.

Bei der Durchführung dieser Tests kann entweder *simultan* die Analysenprobe mit dem zu bestimmenden Antigen, dem Enzym-markierten Antikörper und dem an die Festphase immobilisierten Antigen inkubiert werden, oder es kann *sequentiell*

sorptiv, kovalent oder biologisch an die entsprechende Festphase gebunden werden, was auch nicht immer ohne Verlust an immunologischer Aktivität zu realisieren ist.

Diese Version der kompetitiven Tests wird häufig angewendet und sie eignet sich wegen der Einfachheit der Testdurchführung besonders auch für 'Screening', 'Feld'- und 'Home'-Tests. Diese ELISA sind dann so einfach aufgebaut, dass sie von ungeschultem Personal durchgeführt werden können und eine eindeutige Ja/Nein-Antwort geben.

4.3. Kompetitiver ELISA mit immobilisierten Antikörpern

Testprinzip. Bei dieser Testversion, die in Fig. 9 (II) schematisch dargestellt ist, sind die Antikörper an die Festphase gebunden. Durch die immunologische Reaktion bindet das mit einem Enzym konjugierte Antigen mit den immobilisierten Antikörpern. Nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Materials wird das immunologisch an die Festphase gebundene Enzym durch Inkubation mit dem betreffenden Substrat bestimmt (Version A).

4.4. 'Sandwich-ELISA' zur Bestimmung von Antigen mit der 'Ein-Schritt'-Testtechnik

Testprinzip. Fig. 10 zeigt schematisch das Prinzip dieser Test-Kombination. Das zu bestimmende Antigen, das für diese Test-Methoden zwei oder mehrere Epitope besitzen muss, wird gleichzeitig und gemeinsam mit den an die Festphase gebundenen Antikörpern und den mit der Testlösung zugesetzten Enzym-markierten Antikörpern inkubiert. Diese beiden Antikörper müssen gegen verschiedene Determinanten des Antigens ausgerichtet sein. Daher werden polyklonale Antikörper von zwei verschiedenen Tierspezies oder aber monoklonale Antikörper von zwei unterschiedlichen Klonen verwendet. Während der beiden gleichzeitig ablaufenden immunologischen Reaktionen bindet das Antigen einerseits an die immobilisierten Antikörper und andererseits bindet es aus der Testlösung eingefangenen Enzym-markierten Antikörper. Nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Materials wird durch Zugabe eines entsprechenden Substrats die Menge des immunologisch an die Festphase gebundenen Enzyms bestimmt. Die

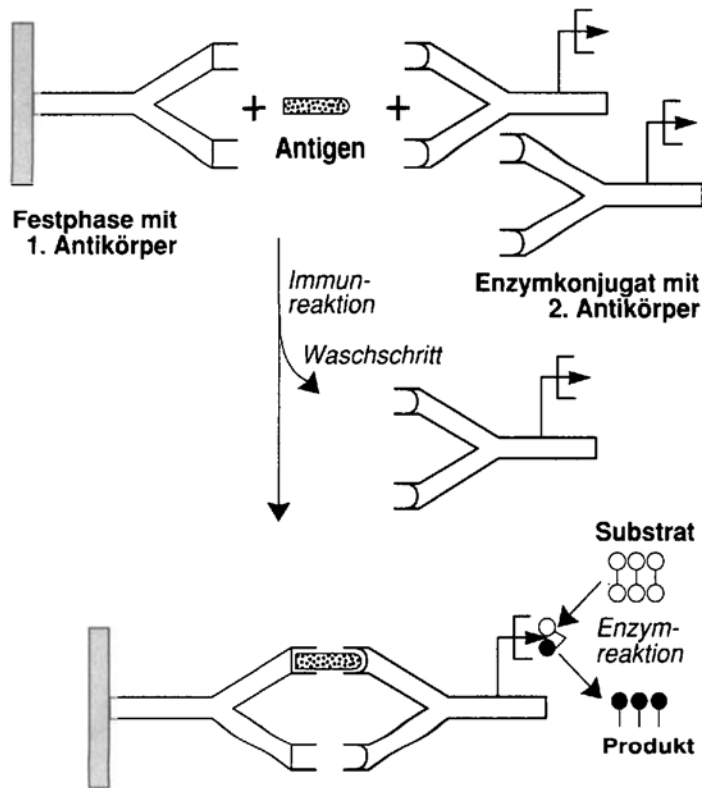


Fig. 10. Schematische Darstellung des 'Sandwich-ELISA zur Bestimmung von Antigenen mit der 'Ein-Schritt'-Testmethode'. Testprinzip ist im Kap. 4.4 beschrieben.

phase gebundene (Antikörper-Antigen-Antikörper)-Sandwich wird in einem zweiten Waschschrift vom nicht gebundenen Material isoliert. War der zweite Antikörper mit einem Enzym konjugiert, so kann durch Zugabe des entsprechenden Substrats die katalytische Aktivität des immunologisch an die Festphase gebundenen Enzyms bestimmt werden. War der zweite Antikörper nicht mit einem Enzym markiert (Beispiel in Fig. 11), so wird der an die Festphase gebundene Sandwich mit einem dritten Antikörper inkubiert, der nicht gegen das Antigen, sondern gegen den zweiten Antikörper gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Anschliessend an einen weiteren Waschschrift kann die Aktivität des gebundenen Enzyms gemessen werden. Je nach Bindungsstärke der einzelnen Reaktionspartner untereinander könnte diese Testkombination mit einem vierten und einem fünften Antikörper erweitert werden. Die am Ende gemessene Enzym-Aktivität ist direkt proportional der Antigen-Konzentration in der Analysenprobe.

Bemerkungen. Diese – gegenüber der 'Ein-Schritt'-Technik – etwas aufwendigere Test-Kombination ist immer dann an-

Enzym-Aktivität ist direkt proportional der in der Analysenprobe vorhandenen Antigen-Konzentration.

Bemerkungen. Dieser Sandwich-ELISA nach der 'Ein-Schritt'-Technik ist äusserst einfach in der Durchführung, da er nur eine Inkubation für die Immunreaktion und einen Waschschrift zum Abtrennen des nicht gebundenen Materials benötigt. Er zeigt eine hohe Spezifität, da das zu bestimmende Antigen mit zwei verschiedenen Antikörpern reagieren muss, damit Enzym an die Festphase gebunden und bei der katalytischen Indikatorreaktion ein Meßsignal erhalten wird. Und er ist auch genau, reproduzierbar und sehr sensitiv. So kann zum Beispiel mit dieser Testtechnik 10^{-17} mol humanes Interleukin-I-alpha im Humanserum quantitativ bestimmt werden. Diese Testkombination hat eine breite Anwendung gefunden.

4.5. 'Sandwich-ELISA' zur Bestimmung von Antigenen mit zwei oder mehreren Inkubationsschritten

Testprinzip. Diese Testkombination ist in Fig. 11 schematisch dargestellt. Das zu bestimmende Antigen mit zwei oder mehreren Epitopen wird in einem ersten Reaktionsschritt mit den an die Festphase immobilisierten Antikörpern gebunden. Nach dem Abtrennen des nicht gebundenen Materials wird der gebildete Immunkomplex mit einem zweiten, ebenfalls gegen das Antigen gerichteten Antikörper inkubiert, der mit einem Enzym konjugiert oder unmarkiert ist. Der nun an die Fest-

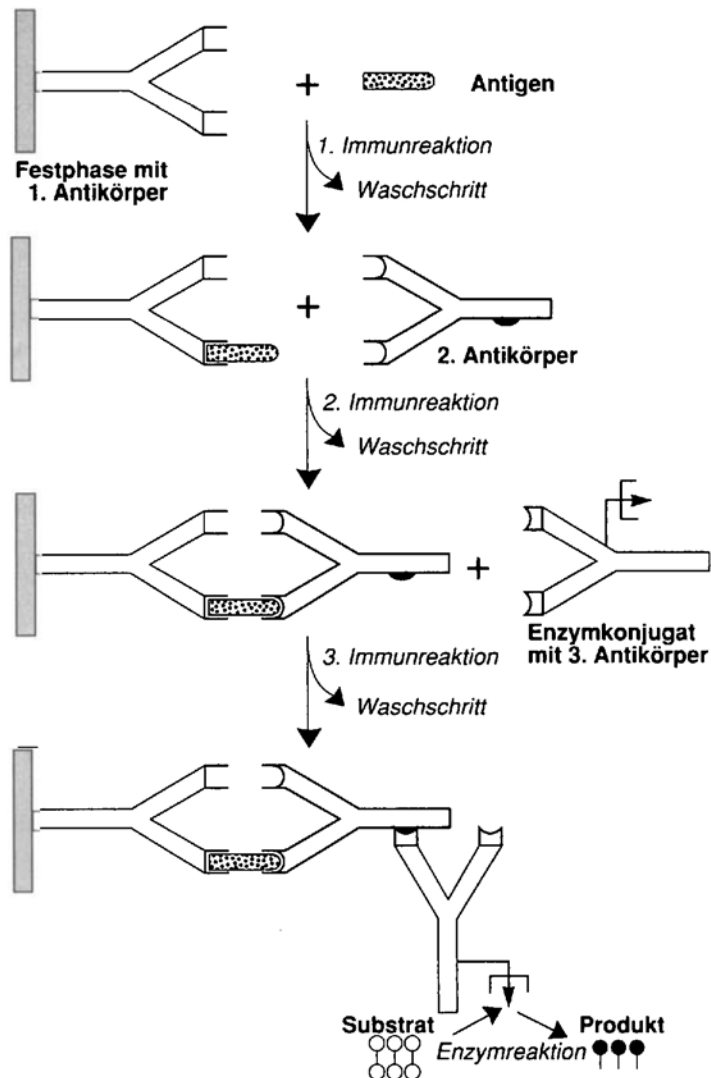


Fig. 11. Schematische Darstellung des 'Sandwich-ELISA zur Bestimmung von Antigenen mit zwei oder mehreren Inkubationsschritten'. Testprinzip ist im Kap. 4.5 beschrieben.

zuwenden, wenn erstens die Analysenprobe Substanzen enthält, welche das Enzym inaktivieren. Diese Substanzen werden beim ersten Waschschrift entfernt, so dass sie das nachfolgend zugesetzte Enzym-Konjugat nicht mehr beeinträchtigen können. Zweitens, wenn der zweite Antikörper nur als Antiserum zur Verfügung steht und eine Isolierung und eine Konjugation mit dem Enzym nicht möglich oder zu aufwendig ist.

4.6. 'Sandwich-ELISA' zur Bestimmung von Antikörpern: 'Antigen-Antikörper-Technik'

Testprinzip. Fig. 12 zeigt schematisch diese Test-Kombination zum spezifischen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern. Die Analysenprobe mit den zu bestimmenden Antikörpern wird mit dem entsprechenden, an die Festphase immobilisierten Antigen inkubiert. Nach Abtrennen des nicht gebundenen Materials wird der gebildete und an die Festphase gebundene Immunkomplex mit einem Enzym-markierten Antikörper, der gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, zur Umsetzung gebracht. Nach einem erneuten Waschschrift wird das immunologisch an die Festphase gebundene Enzym katalytisch bestimmt.

Bemerkungen. Die Antikörper sind gleichsam die sichtbaren Spuren, die von artfremden immunogenen Substanzen im Organismus hinterlassen werden und die nach Monaten und Jahren noch nachgewiesen werden können. Diese Testmethoden werden daher häufig in der human- und der veterinärmedizinischen Diagnostik zum Nachweis von viralen, mykotischen oder bakteriellen Infektionen verwendet. Zudem sind diese Tests analytische Hilfsmittel zur Antikörperbestimmung nach erfolgter Impfung und Immunisierung mit den gewünschten Antigenen sowie bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern zur Selektion der Antikörper-produzierenden Hybridzellen. Mit dieser Test-Kombination kann auch die Globulin-Klasse (IgG, IgM, IgA oder IgE) der vorhandenen Antikörper bestimmt werden.

4.7. 'Sandwich-ELISA' zur Bestimmung von Antikörpern: 'Doppel-Antigen-Technik'

Testprinzip. Bei der Betrachtung der schematisch dargestellten Testkombination zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern mit der 'Doppel-Antigen-Testtechnik' (Fig. 13) darf man nicht übersehen, dass mit der positiven Analysenprobe Millionen von Antikörper-Molekülen zum Test-System zugefügt werden. Es ist daher irrelevant, wenn ein Teil der Antikörper mit seinen beiden Bindungsstellen ausschliesslich mit dem an die Festphase immobilisierten Antigen und

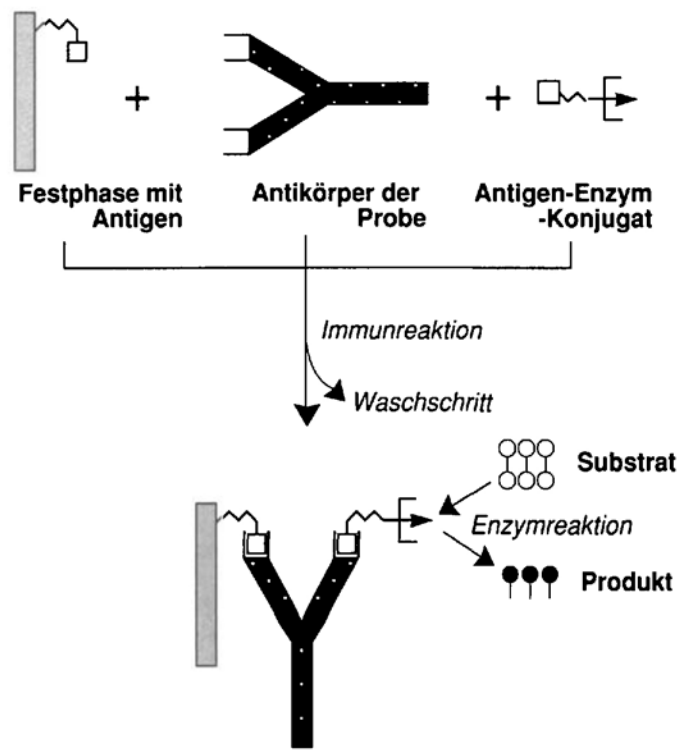


Fig. 12. Schematische Darstellung des 'Sandwich-ELISA zur Bestimmung von Antikörpern mit der 'Antigen-Antikörper-Technik'. Testprinzip ist im Kap. 4.6 beschrieben.

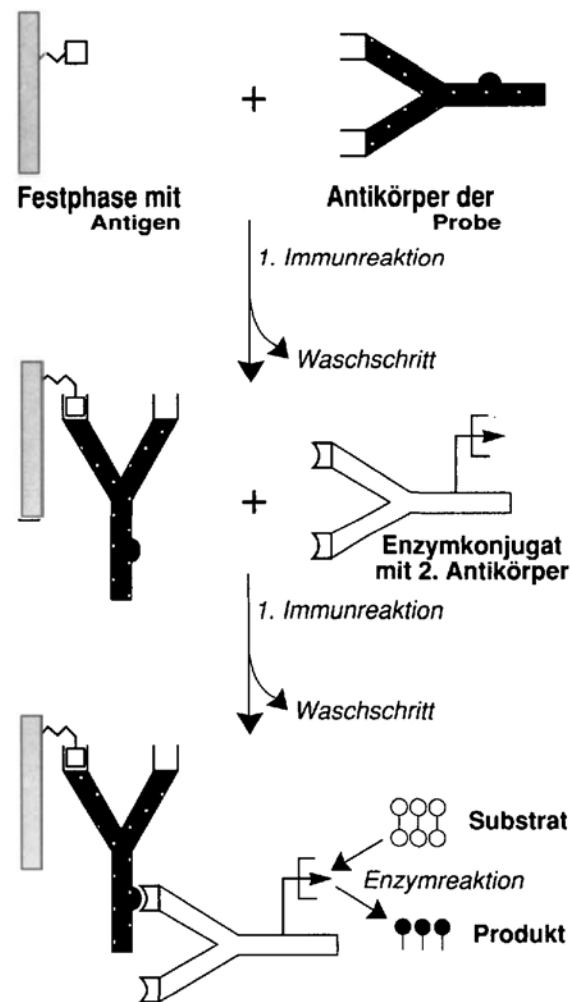


Fig. 13. Schematische Darstellung des 'Sandwich-ELISA zur Bestimmung von Antikörpern mit der 'Doppel-Antigen-Technik'. Testprinzip ist im Kap. 4.7 beschrieben.

ein anderer Teil nur mit dem Enzym-markierten Antigen in der Testlösung reagiert, so dass diese beiden Teile kein Enzym an die Festphase zu binden und daher auch kein Meßsignal zu produzieren vermögen. Ein dritter Teil der vorhandenen Antikörper wird mit einer Bindungsstelle an das immobilisierte und mit der anderen Bindungsstelle an das mit dem Enzym-markierte Antigen binden und auf diese Weise eine Brücke oder einen Sandwich bilden, so dass nach dem Waschschrift auf der Festphase Enzym-Aktivität nachgewiesen werden kann. Und dieser Anteil wird statistisch identisch sein für die Antikörper der Analysenprobe und der immer mitzuführenden Antikörper-Standardlösung.

Bemerkungen. Diese Test-Kombination zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern ist äusserst einfach, da nur *eine* Inkubation und *ein* Waschschrift erforderlich sind. Zudem sind die Probleme der unspezifischen Reaktion und somit der falsch-positiven Ergebnisse wesentlich kleiner als bei der 'Antigen-Antikörper-Technik' (Kap. 4.6). Mit der 'Doppel-Antigen-Technik' können mit denselben Test-Reagenzien die Antikörper aus den verschiedenen Tierspezies und der verschiedenen Globulin-Klassen nachgewiesen werden. Der Test basiert ausschliesslich auf der Reaktion der Antigenbindenden Stellen des Antikörpers mit dem entsprechenden Epitop des Antigens. Allerdings kann aus diesem Grund mit dieser Test-Methode die Art der Antikörper nicht näher spezifiziert werden.

5. Zusammenfassende Übersicht

Fig. 14 zeigt zusammenfassend die verschiedenen Arbeitsschritte, die zur Entwicklung eines enzym-immunologischen Schwangerschaftstests notwendig sind. Mit Beginn der Schwangerschaft wird Human Chorion Gonadotropin (HCG) gebildet und mit dem Urin ausgeschieden. Dieses HCG, das aus dem Harn schwangerer Frauen extrahiert und gereinigt wird, bildet als *Antigen* den ersten Baustein für den HCG-ELISA.

Mit diesem Antigen werden entsprechende Tiere, in unserem Beispiel Mäuse immunisiert, um polyklonale oder aber monoklonale *Antikörper*, den zweiten Baustein für den HCG-ELISA zu erhalten. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung dieser HCG-Antikörper während der verschiedenen Arbeitsschritte kann das HCG als Antigen mit der Test-Methode Nr. 4.6 oder Nr. 4.7 eingesetzt werden.

Das *Enzym* Peroxidase, das aus Meerrettich extrahiert und mit physikalisch-

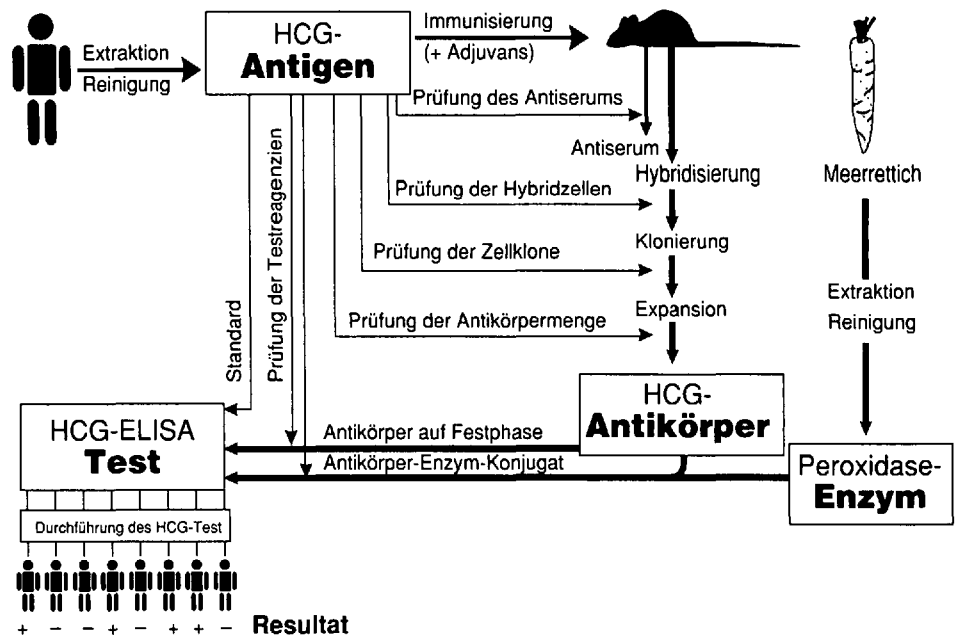


Fig. 14. Gesamtübersicht über die verschiedenen Arbeitsschritte, die für die Entwicklung eines EIA (im konkreten Beispiel eines HCG-ELISA (Schwangerschaftstest)) notwendig sind

chemischen Methoden gereinigt wird, kann von verschiedenen Herstellern käuflich erworben werden und bildet den dritten Baustein des HCG-ELISA.

Die polyklonalen HCG-Antikörper einer Tierspezies resp. die monoklonalen HCG-Antikörper von einem Klon werden an die gewünschte *Festphase* gebunden und die immunologische Bindungskapazität dieser immobilisierten Antikörper geprüft. Andererseits werden mit den polyklonalen HCG-Antikörpern einer zweiten Tierspezies resp. mit den monoklonalen HCG-Antikörpern von einem zweiten Klon durch *kovalente Bindung* Enzymkonjugate hergestellt.

Mit diesen Testreagenzien werden nun die optimalen Bedingungen für die *immunologische Reaktion* ausgearbeitet und der HCG-ELISA an Hand von positiven und negativen Urinproben geprüft.

Eingegangen am 9. Februar 1990

G. Feldmann, P. Druet, J. Bignon, S. Avrameas, Eds., 'Immunochemical Techniques', North Holland/American Elsevier, Amsterdam, 1976.
E. Engvall, A.J. Pesce, Eds., 'Quantitative Enzyme Immunoassay', Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
S. B. Pal, Ed., 'Enzyme-Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs', Walter de Gruyter, Berlin, 1978.
R. M. Nakamura, W. R. Pito, E. S. Tucker III, Eds., 'Immunoassays in the Clinical Laboratory', Alan R. Liss, New York, 1979.
E. T. Maggio, Ed., 'Enzyme Immunoassay', CRC Press, Boca Raton, Fl., 1980.

R. Malvano, Ed., 'Immunochemical Assay Techniques', Martinus Nijhoff, The Hague, 1980.
E. Ishikawa, T. Kawai, K. Miyai, Eds., 'Enzyme Immunoassay', Igaku Shoin, Tokyo, 1981.
A. Voller, A. Bartlett, D. Bidwell, Eds., 'Immunoassays for the 80s', MTP Press, Lancaster, UK, 1981.
R. C. Wardley, J. R. Crowther, Eds., 'The ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) in Veterinary Research and Diagnosis', Martinus Nijhoff, The Hague, 1982.
S. Avrameas, P. Druet, R. Masseyeff, G. Feldmann, Eds., 'Immunochemical Techniques', Elsevier, Amsterdam, 1983.
G. P. Talwar, Ed., 'Non Isotopic Immunoassays and Their Applications', Vikas Publishing House, New Delhi, 1983.
W. R. Butt, Ed., 'Practical Immunoassay', Marcel Dekker, New York, 1984.
J. J. Langone and H. van Vunatis, Eds., 'Immunochemical Techniques', Methods in Enzymology, Vol. 92, 1983.
P. Tijssen, 'Practice and Theory of Enzyme Immunoassays', Elsevier, Amsterdam, 1985.
D. W. Chan, Ed., 'Immunoassay, a practical Guide', Academic Press, Inc., New York, 1987.
M. Oellerich, 'Enzyme Immunoassays in Clinical Chemistry Present Status and Trends', J. Clin. Chem. Biochem. (1980) 18 197.
G. B. Wisdom, 'Enzyme Immunoassay', Clin. Chem. (1976) 22 1243.
A. H. W. M. Schuurs, B. K. van Weemen, 'Enzyme Immunoassay', Clin. Chem. Acta (1977) 81 1.
A. H. W. M. Schuurs, B. K. van Weemen, 'Enzyme Immunoassay: A Powerful Analytical Tool', Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V.-Mitteilungen (1979) 1 22.
C. Borrebaeck, B. Mattiasson, 'Recent Developments in Heterogeneous Enzyme Immunoassay', J. Solid-Phase Biochem. (1979) 4 57.
M. J. O'Sullivan, J. W. Bridges, V. Marks, 'Enzyme Immunoassay: A Review', Ann. Clin. Biochem. (1979) 16 221.
S. L. Scharpé, W. M. Cooreman, W. J. Blomme, G. M. Laekeman, 'Quantitative Enzyme Immunoassay: Current Status', Clin. Chem. (1976) 22 733.
T. T. Ngo, H. M. Lenhoff, 'Recent Advances in Homogeneous and Separation-free Enzyme Immunoassays', Appl. Biochem. Biotechnol. (1981) 6 53.