

Project 505.0740

Ontwikkeling van biotechnologische methoden van onderzoek.

Projectleider: drs. R.J.A. Paulussen.

Rapport 89.50

Oktober 1989

Onderzoek naar de toepassing van selenium-
solen bij de ontwikkeling van een snelle
test voor het aantonen van biologisch
actieve verbindingen en milieucontaminanten
op ppb-nivo.

M.E. Ploum, W. Haasnoot,
R.J.A. Paulussen en R. Schilt

Afdeling Biofarmaceutische Analyse (BFA)

Goedgekeurd door: dr. F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

8950

Copyright 1989, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Niets uit deze uitgave mag worden gereproduceerd en/of openbaar gemaakt worden door middel van fotocopie, microfilm, offset, of welke andere methode dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de directeur.

VERZENDLIJST.

INTERN:

Directeur
Hoofd hoofdafdeling produktveiligheid
Programmabeheer en informatievoorziening
Afdeling Biofarmaceutische Analyse (5x)

EXTERN:

Holland biotechnology (Hbt):
Drs. P.N.M. Koning
Dr. A.W.J. van Doorn
Dr. G.D. Keizer
Drs. R.M. van Es

INHOUD.

SAMENVATTING	3
1. INLEIDING	5
2. KOPPELING VAN MACROMOLECULEN AAN DE SELEENSOL	6
2.1. Bepaling van de MPA	7
2.2. Bepaling van de optimale koppelings pH	8
2.3. Koppeling van eiwit aan de sol	9
3. EXPERIMENTEN	10
3.1. Koppeling van nortestosteron-BSA conjugaten	10
3.1.1. Bepaling van de MPA	10
3.1.2. Bepaling van de optimale pH	11
3.1.3. Koppeling van NT-17HS-BSA aan de sol	11
3.2. Nortestosteron-BSA aan de drager gekoppeld	11
3.3. Geïmmobiliseerd anti-nortestosteron	14
3.3.1. Nortestosteron-BSA - seleensolen	14
3.3.2. Het effect van een lagere belading van de sol met nortestosteron-17HS-BSA	15
3.3.3. Invloed van de antilichaam concentratie	15
3.3.4. Invloed van de concentratie van het sol-conjugaat complex	16
3.3.5. Verdringing van NT-BSA sol door vrij nortestosteron	16
3.3.6. Verlenging van de preïncubatie met nortestosteron	16
4. CONCLUSIES	17
5. AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK	17
BIJLAGE I. LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN	18

()

()

SAMENVATTING.

Tussen Holland biotechnology bv (Hbt) en het RIKILT is overeengekomen een gemeenschappelijk onderzoek op te zetten naar de mogelijke toepassing van seleniumsolen in eenvoudige screeningstests voor de analyse van stoffen op het (sub)ppb-nivo. Een seleniumsol, gekoppeld aan antilichamen of eiwitconjugaten, wordt gebruikt als specifiek kleurlabel. Bij de tot nu toe uitgevoerde experimenten is nortestosteron (NT) als teststof gebruikt, omdat hiervoor voldoende antiserum en NT-eiwitconjugaten, alsmede monstermateriaal en analysemethoden beschikbaar zijn om een test op te zetten en te valideren.

In eerste instantie werd gekozen voor het ontwikkelen van een strip-test met nitrocellulose als drager. Uit de verrichtte experimenten bleek dat met een geringe hoeveelheid NT-eiwitconjugaat op de nitrocellulosestrip (overeenkomend met 0,3 ng NT) al een kleuring werd verkregen met antilichamen gelabeld met sol. Ook is een geringe hoeveelheid antistof op de strip (4,7 pmol IgG, dat theoretisch maximaal 2,6 ng NT kan binden) voldoende om een kleuring te geven met NT-eiwitconjugaat dat aan de sol gekoppeld is. Het laagste nivo toegevoegd vrij NT, waarbij tot nu toe een (visueel) kleurverschil werd waargenomen bedroeg 60 ng/ml. Vermoedelijk heeft het antilichaam een grotere aviditeit voor het NT-eiwitconjugaat dan voor het vrije NT, hetgeen de test nadelig beïnvloed. Door een ander NT-eiwitconjugaat of zelfs een conjugaat van een ander steroid te kiezen, kan mogelijk een veel gevoeliger test worden verkregen.

De tot nu verkregen resultaten zijn hoopgevend en bieden voldoende perspectief om het samenwerkingsproject voor langere termijn te continueren.

()

()

1. INLEIDING.

Voor residu-analysen van biologisch actieve stoffen of (milieu) contaminanten in voor humane consumptie geschikte produkten of hun grondstoffen, worden in het algemeen chemisch-analytische methoden toegepast die tijdrovend en duur zijn. Met betrekking tot het aantal te analyseren monsters is de capaciteit van dergelijke methoden in het algemeen beperkt. Door het toepassen van immunochemische technieken zoals enzym immunoassays (EIA) of radio immunoassays (RIA) kan de capaciteit aanzienlijk worden vergroot. Vanwege het risico dat andere stoffen meebepaald worden, als gevolg van kruisreacties van de toegepaste antilichamen, worden immunochemische technieken alleen geschikt geacht als screeningsmethoden. In het algemeen zijn deze methoden alleen geschikt voor de uitvoering in een laboratorium.

Voor een effectieve controle op het oneigenlijk gebruik van verboden middelen zoals anabole steroïden of β -agonisten, of voor het vaststellen van de concentratie van een contaminant als aflatoxine M₁ in melk, is het gewenst te kunnen beschikken over eenvoudige screeningstests, die op de plek van monsternamen kunnen worden toegepast. Met zulke tests kan de controle worden uitgebreid en worden binnen het laboratorium alleen de verdacht positieve monsters geanalyseerd, hetgeen de keuringsprocedure versnelt en kostenbesparend werkt.

Aangezien dit soort methoden niet commercieel verkrijgbaar is en in de literatuur geen direct toepasbare methoden (zeker niet op het gewenste lage detectieniveau) zijn beschreven, wordt op de afdeling Biofarmaceutische Analyse (BFA) van het RIKILT, in het kader van het project "Biotechnologische methoden van onderzoek", onder andere gewerkt aan de ontwikkeling van dit type tests voor analyse op het (sub)ppb-nivo. Om de uitvoering van de test eenvoudig te houden is een directe specifieke kleuring interessant. De firma Holland biotechnology bv (Hbt) beschikt over zo'n kleuring, bestaande uit een oranje/rood gekleurde seleniumsol. Aan deze sol kunnen eiwitten en andere macromoleculen worden gekoppeld. Door bijvoorbeeld antilichamen aan de sol te koppelen wordt een specifiek kleurlabel verkregen.

Vanwege de wederzijdse interesse is het RIKILT met Hbt overeengekomen om de mogelijke toepassing van de sol in een screeningsassay voor de analyse van stoffen op het (sub)ppb-nivo te onderzoeken. Ten behoeve van dit onderzoek is aan de afdeling BFA een extra arbeidsplaats (op HLO-nivo) toegevoegd, voorlopig voor de duur van een half jaar met een optie op verlenging. Hbt levert de benodigde sol en stelt de aldaar beschikbare "know-how" ter beschikking.

In de eerste fase van het onderzoek is gekozen voor nortestosteron als

modelstof, omdat voldoende antiserum aanwezig is alsmede procedures voor de bereiding van eiwitconjugaten en op grond van de beschikbaarheid van monstermateriaal en analysemethoden om de test te vergelijken.

In deze eerste, uitgebreide tussenrapportage wordt het tot nu toe uitgevoerde onderzoek beschreven en worden mogelijke vervolggexperimenten genoemd. Volgende tussenrapportages zullen om de ca. 4-6 weken plaatsvinden.

2. KOPPELING VAN MACROMOLECULEN AAN DE SELEENSOL.

Door onder gecontroleerde omstandigheden aan seleniumoxide (SeO_2) een reductor toe te voegen wordt een seleniumsol verkregen. De sol wordt gezuiverd door middel van dialyse. De procedure voor de bereiding van de seleniumsol is gepatenteerd door Hbt. Om een constante kwaliteit van de sol te waarborgen is afgesproken dat Hbt de tijdens het onderzoek benodigde sol zal leveren.

Eiwitten en andere macromoleculen, geadsorbeerd aan de sol, stabiliseren de sol tegen een door electrolyten geïnduceerde flocculatie. De koppeling van eiwitten aan de sol is gebaseerd op de fysische eigenschappen van de sol en wordt beïnvloed door de afmetingen van de deeltjes, de ionconcentratie (die tijdens de adsorptie zo laag mogelijk moet zijn) en door het type, de hoeveelheid, en het molecuulgewicht van het te koppelen eiwit. De belangrijkste parameter is echter de pH, welke een directe invloed heeft op de "overall" lading van het eiwit. De adsorptie van eiwitten aan soldeeltjes is optimaal onder condities die een maximaal "multi-point contact" tussen eiwitten enerzijds en deeltjesoppervlak anderzijds mogelijk maken, resulterend in een irreversibele binding. Deze optimale condities worden bereikt door de minimale beschermende (= stabiliserende) hoeveelheid van het eiwit (aangegeven met de afkorting MPA: minimal protecting amount) tijdens het adsorptieproces te gebruiken, bij de optimale (empirisch vastgesteld) koppelings-pH. De procedures worden hieronder nader toegelicht, geïllustreerd met enkele voorbeelden.

2.1. Bepaling van de MPA.

Voor het bepalen van de minimale beschermende hoeveelheid eiwit worden aan 1 ml van een sol-oplossing (met een absorptie bij 540 nm van 0.5), bij een pH in de buurt van het isoelektrisch punt van het eiwit, verschillende hoeveelheden van het te koppelen eiwit (in een buffer met lage zoutconcentratie, b.v. 10 maal verdunde PBS) toegevoegd. Na 5 min wordt hieraan 200 μ l NaCl (10%) toegevoegd en 5 min later wordt de absorptie gemeten bij 540 nm. Een door eiwit voldoende gestabiliseerde sol flokkuleert niet onder invloed van het toegevoegde zout. Een geflokkuleerde sol heeft een hogere absorptie bij 540 nm dan de stabiele sol (Figuur 1). Als de eiwitconcentratie wordt uitgezet tegen de gemeten absorptie wordt een curve verkregen zoals getoond in Figuur 2. De minimale beschermende hoeveelheid eiwit wordt bepaald als de eiwitconcentratie waarbij de curve evenwijdig aan de X-as gaat lopen.

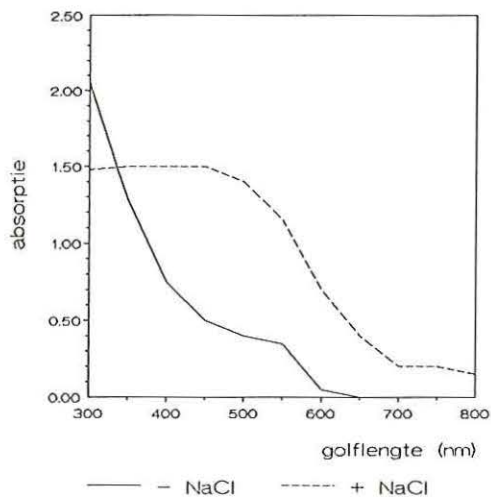


Fig. 1. Absorptiespectra van een sol voor en na toevoeging van NaCl.

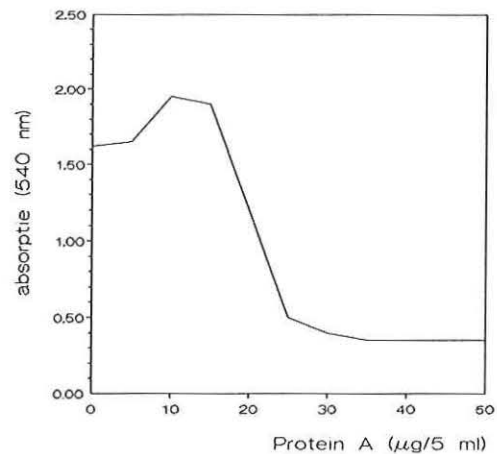


Fig. 2. Concentratie-afhankelijke adsorptie-isotherm van een eiwit-seleensol.

2.2. Bepaling van de optimale koppelings pH.

De bij 2.1 gevonden minimale beschermende hoeveelheid eiwit wordt gebruikt om de relatie tussen pH en stabiliteit van de sol te bepalen. Hiervoor wordt een aantal eiwitoplossingen, waarvan de concentratie gelijk is aan die van de MPA-waarde, met variërende pH (4-10, in stappen van 0,5 pH eenheden) toegevoegd aan 1 ml van de sol die op overeenkomstige pH is gebracht. Na 10 min wordt 200 μ l NaCl (10%) toegevoegd en 5 min later wordt de absorptie bij 540 nm gemeten. De pH wordt uitgezet tegen de gemeten absorptie-waarden (Figuur 3).

De optimale pH is die pH (of het pH gebied) waarbij het sol-eiwit mengsel de laagste absorptiewaarde heeft.

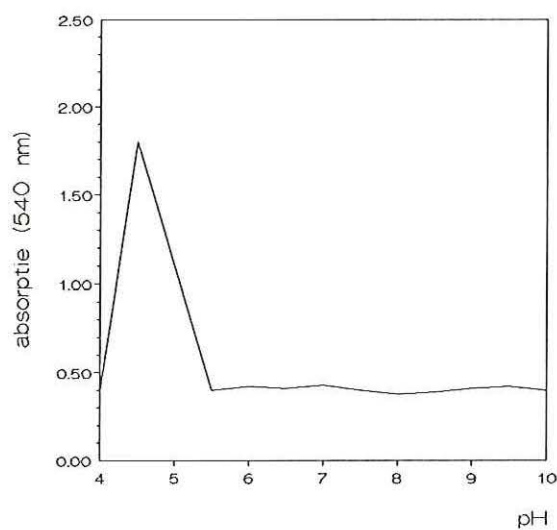


Fig. 3.
pH-afhankelijke adsorptie-isotherm. (Protein A,
7 μ g/ml seleensol).

2.3. Koppeling van eiwit aan de sol.

Onder experimentele omstandigheden wordt uitgegaan van 50 ml selenium-sol (absorptie bij 540 nm = 0,5) die op de optimale koppelings pH wordt gebracht. Hieraan wordt bij kamertemperatuur (KT) een hoeveelheid eiwit (10% meer dan de optimale stabiliserende eiwitconcentratie) toegevoegd onder snel roeren van de sol-oplossing (magneetroerder). Na 15 min roeren bij KT wordt de sol verdund met een gelijke hoeveelheid 2% BSA in PBS (met een pH zoals gebruikt is bij de koppeling). Na 5 min roeren wordt 10 min gecentrifugeerd bij 4500 x g, bij 4°C.

Het supernatant wordt overgebracht in een andere centrifugebuis en de pellet opgenomen in 1 ml 1% BSA in PBS. De centrifugestap wordt herhaald bij 8000 x g en vervolgens bij 18000 x g en, als het supernatant een rode kleur blijft behouden, bij een nog hogere g-waarde. De pellets worden elk in 1 ml 1% BSA in PBS opgenomen, gecombineerd, en bewaard bij 4°C.

3. EXPERIMENTEN.

In dit hoofdstuk worden de experimenten beschreven die uitgevoerd zijn met 17 β ,19-nortestosteron. De experimenten zijn gericht op de ontwikkeling van een test waarbij antilichamen of nortestosteron-eiwitconjugaten aan een vaste drager (nitrocellulose) worden gekoppeld.

3.1. Koppeling van nortestosteron-BSA conjugaten.

3.1.1. Bepaling van de MPA.

Aan 1 ml sol (pH 7,5) werd 40 μ l NT-17HS-BSA in PBS in verschillende concentraties toegevoegd en na 5 min werd 200 μ l 10% NaCl toegevoegd. 5 minuten later werd de absorptie gemeten bij 540 nm. Uit Figuur 4 blijkt dat minimaal 60 μ g NT-17HS-BSA per ml sol moet worden toegevoegd om een stabiele sol te verkrijgen.

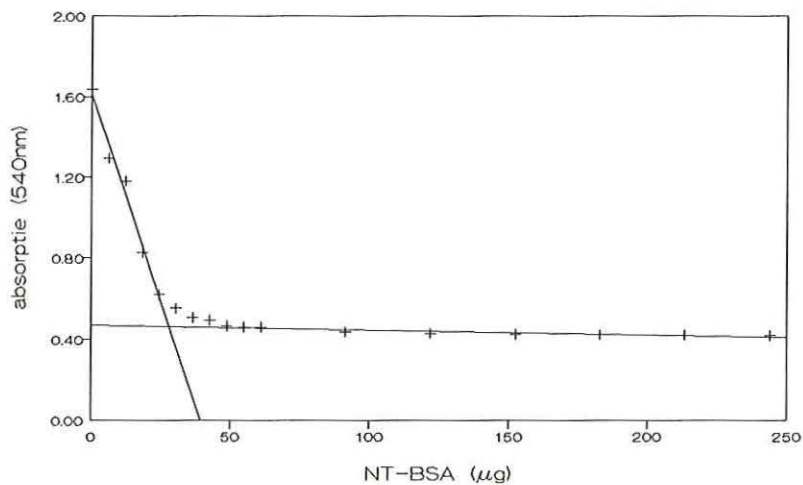


Fig. 4.
Concentratie-afhankelijke adsorptie-isotherm van NT-17HS-BSA (1mol NT/mol BSA) aan de seleniumsol.

3.1.2. Bepaling van de optimale pH.

Aan 1 ml sol-oplossing werd 50 μ l 0.01 M fosfaatbuffer toegevoegd met verschillende pH's (4-10). Na controle van de pH werd 10 μ l

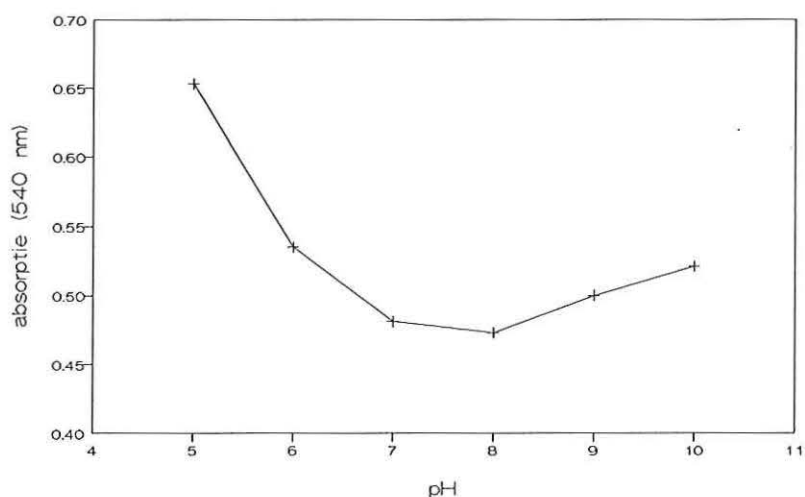


Fig. 5.
pH-afhankelijke adsorptie-isotherm van 61 μ g NT-17HS-BSA (1 mol NT/mol BSA) per ml seleensol.

NT-17HS-BSA-oplossing (6,1 μ g/ μ l) toegevoegd en na 5 minuten werd 200 μ l 10% NaCl toegevoegd. 5 min later werd de absorptie gemeten bij 540 nm. De optimale pH werd bepaald op 7,5 (Fig. 5).

3.1.3. Koppeling van NT-17HS-BSA aan de sol.

Aan 50 ml sol (pH 7,5) werd 3 mg NT-17HS-BSA toegevoegd. Na 15 min roeren werd 50 ml 2% BSA in PBS (pH 7,5) toegevoegd. 5 min na de toevoeging werd 15 min gecentrifugeerd bij 8000 x g. Het supernatant werd gecentrifugeerd bij 10000 x g en beide pellet werden opgenomen in 2 ml 1% BSA in PBS. Beide oplossingen werden gecombineerd en bewaard bij 4°C.

3.2. Nortestosteron-BSA aan de drager gekoppeld.

Bij Hbt werd in juli 1989 het volgende experiment uitgevoerd: op een nitrocellulosestrip werden 1 μ l stippen gebracht met verschillende hoeveelheden NT-17HS-BSA (Tabel I). De overige bindingsplaatsen op de

strip werden geblokkeerd met 1% BSA in PBS. Antiserum was op de volgende wijze aan de sol gekoppeld: 450 μ l anti-NT IgG (7,5 mg eiwit per ml) werd toegevoegd aan 50 ml sol bij pH 7,0. Na 15 min werd een gelijk volume 2% BSA in PBS toegevoegd en 5 min later werd gecentrifugeerd (achtereenvolgens 10 min bij 4500, 8000 en 18000 x g, bij 4°C). De verkregen pellets werden elk opgenomen in 1 ml 1% BSA in PBS en gecombineerd. Vanwege de in de pellet aanwezige vloeistof bedroeg het eindvolume van de sol ca. 5 ml.

Aan een strip werd 100 μ l sol-oplossing in 2 ml PBS toegevoegd. Aan een tweede strip werd tevens 10 μ g vrij nortestosteron toegevoegd. Dit experiment werd op het RIKILT herhaald met 100, 200 en 400 μ l sol, waarbij het totaal volume telkens op 2 ml werd gebracht met PBS.

Tabel I.
De hoeveelheid nortestosteron-BSA conjugaat op de strips.

strip	NT-17HS-BSA (ng)	NT (ng)
1	1400	154
2	700	77
3	350	38,5
4	175	19,2
5	87,5	9,6
6	44	4,8
7	22	2,4
8	11	1,2
9	5,5	0,6
10	2,7	0,3

Ratio NT-17HS-BSA = 31 mol/mol
Mol. gewichten: NT = 274,4 Da; NT-17HS = 374 Da;
BSA = 68 kDa; NT-17HS-BSA = 79,6 kDa

Resultaten en discussie.

Experimenten uitgevoerd bij Hbt - Er was een duidelijk verschil waarneembaar tussen de strips met en zonder toevoeging van vrij nortestosteron. Zonder toevoeging van vrij NT kleurde de strip snel (na ca. 10 min) en zelfs de stip met 0,3 ng NT (2,7 ng NT-BSA) was zichtbaar na zilverversterking van de kleuring.

Experimenten uitgevoerd op het RIKILT - Bij 5 maal verdunning van de sol begon de kleuring, zonder toevoeging van vrij NT, na 4 min, bij 10 maal verdunning na ca. 8 min en bij 20 maal verdunning na ca. 20 min. Het zichtbaar zijn van 0,3 ng NT op een stip is een goed resultaat. Het gaat echter om het effect van het aan de strip toegevoegde vrije NT op de kleuring. In dit experiment werd een effect waargenomen bij toevoegen van 10 μg vrij NT. Dit effect moet echter waarneembaar zijn op nanogram-nivo. Dit vereist in ieder geval afstemming van de aan de test toe te voegen hoeveelheid antilichaam.

In dit experiment werd 100 μl sol-oplossing, met geadsorbeerde antilichamen, aan de strip toegevoegd. Op basis van het eiwitgehalte van de IgG-oplossing en aannemende dat alle IgG anti-NT zou zijn (het gebruikte IgG is gezuiverd over een BSA-kolom) met 2 antigeenbindingsplaatsen per molecuul, bevat deze hoeveelheid sol 67 μg anti-NT = 0,42 nmol IgG ($M_r = 160$ kDa) dat maximaal 0,84 nmol NT = 230 ng zou kunnen binden.

De 10 μg vrij NT is dus een duidelijke overmaat ten opzichte van de beschikbare bindingsplaatsen aan de antilichamen en ook de totale hoeveelheid NT op de strip (307 ng) is meer dan de aanwezige antilichamen theoretisch maximaal zouden kunnen binden. In werkelijkheid zal slechts een klein percentage van het IgG gericht zijn tegen NT, zodat de overmaat nog vele malen groter is. Onder deze condities zou een kleinere hoeveelheid vrij NT toegevoegd aan de strip eveneens een effect moeten kunnen uitoefenen op de kleuring.

Indien gebruik wordt gemaakt van een preïncubatie van het monster met antilichamen aan de sol, mag de hoeveelheid NT op de strip in principe in overmaat aanwezig zijn om de kleuringssnelheid positief te beïnvloeden. Een verlaging van de hoeveelheid antilichamen aan de sol zou de test meer gevoelig kunnen maken. In principe moet het aantal bindingplaatsen aan de sol kleiner zijn dan het aantal NT-moleculen dat dient te worden gedetecteerd. Stel het gewenste detectienivo op 10 ng/ml en dat er wordt uitgegaan van 1 ml monstermateriaal = 10 ng NT = 0,04 nmol NT. Om deze hoeveelheid NT te binden is (theoretisch, op basis van bovengenoemde aannamen) 0,02 nmol = 3,2 μg IgG nodig. Verge-

leken met het eerder uitgevoerde experiment zou de hoeveelheid IgG in de test minimaal een factor 20 omlaag moeten. Of er bij deze hoeveelheid nog een kleuring optreedt moet nog worden onderzocht.

3.3. Geïmmobiliseerd anti-nortestosteron.

Op het RIKILT werden verscheidene experimenten uitgevoerd waarbij de antilichamen aan de strip werden gekoppeld en NT-17HS-BSA aan de sol werd geadsorbeerd. Om de invloed van de belading van het BSA met nortestosteron te kunnen beoordelen werden twee conjugaten gebruikt. Conjugaat I, met 1 mol NT/mol BSA en conjugaat II, met 31 mol NT/mol BSA.

3.3.1. Nortestosteron-BSA - seleensolen.

De bovenstaande conjugaten werden aan de sol geadsorbeerd, waarbij uitgegaan werd van 50 ml sol (pH 7,5) en respectievelijk 3 mg conjugaat I en 4,2 mg conjugaat II.

Op nitrocellulosestrips werden stippen van 1 μ l IgG-oplossing gebracht, oplopend van 0,93 μ g tot 3,75 μ g IgG. Na een postcoating van de strips met 2 % BSA in PBS werden de strips 1 uur geïncubeerd in 1,6 ml PBS met daarin het vrije nortestosteron. Na de preïncubatie werd per strip 400 μ l sol toegevoegd.

Resultaten en discussie:

Er was geen kleurverschil te zien tussen de strip waarbij 1 μ g NT per ml was toegevoegd en de strip geïncubeerd zonder vrij NT. Aan de strip werd 400 μ l sol toegevoegd (= 0,24 mg eiwit voor conjugaat I en 0,34 mg eiwit voor conjugaat II, ofwel 3,5 nmol NT-HS-BSA voor conjugaat I en 4,3 nmol NT-HS-BSA voor conjugaat II). Voor conjugaat I komt dit overeen met ca. 1 μ g NT en voor conjugaat II met 36 μ g NT.

Vergeleken met het aantal bindingsplaatsen op de stip (max. 3,75 μ g IgG/ μ l = 23 pmol IgG, dat theoretisch maximaal ca. 12 ng NT kan binden) is, zeker bij conjugaat II, te veel NT (gekoppeld aan de sol) toegevoegd waardoor veel meer vrij NT dan 1 μ g moet worden geïntroduceerd om een kleurverschil te verkrijgen.

3.3.2. Het effect van een lagere belading van de sol met nortestosteron-17HS-BSA.

Om de hoeveelheid NT aan de sol te verminderen werden de conjugaten 10 en 100 keer verdund met BSA (op gewichtsbasis) en aan de sol gekoppeld. Tevens werd een blanco sol gemaakt, waarbij alleen BSA gekoppeld werd.

Er werd uitgegaan van dezelfde hoeveelheden antiserum op de strip als beschreven onder 3.3.1.

Resultaten en discussie:

Bij een 10 maal verdunning van conjugaat I (waarmee ca. 100 ng NT aan de sol toegevoegd werd aan de test) werd een kleurverschil waargenomen in aanwezigheid van 1 $\mu\text{g/ml}$ NT. Bij een 10 maal verdunning van conjugaat II (ca. 3600 ng NT aan de sol toegevoegd aan de test) werd geen kleurverschil waargenomen in aanwezigheid van 1 μg NT per ml.

Bij een 100-voudige verdunning van beide conjugaten (resp. 10 en 360 ng NT aan de sol) werd in beide gevallen een kleurverschil waargenomen in aanwezigheid van 1 μg NT per ml, waarbij de sol met het hoogbeladen BSA conjugaat een intensere kleur van de stip gaf. Met het blanco sol (BSA-sol) werd geen kleuring waargenomen, wat bekend dat de kleuring specifiek voor NT (of het NT-conjugaat) is.

3.3.3. Invloed van de antilichaam concentratie.

Door het IgG te verdunnen met PBS en vervolgens op een nitrocellulose strip te brengen werden de stippen steeds kleiner. Door het IgG met een gelijke (gewichts)hoeveelheid BSA (7,5 mg/ml in PBS) te verdunnen werden stippen van vergelijkbare grootte verkregen. Bij een 50 maal verdunning met BSA (150 ng IgG/ μl = 0,94 pmol IgG, hetgeen theoretisch 0,52 ng NT kan binden) was de stip, na incubatie met 50 maal verdund conjugaat II aan de sol niet meer duidelijk. Bij 10 maal verdunning van het IgG (zou 2,6 ng NT kunnen binden) werd een goed waarneembare kleuring verkregen.

3.3.4. Invloed van de concentratie van het sol-conjugaat complex.

Van het 100 maal verdunde conjugaat II aan de sol werden verschillende verdunningen aan een strip (met 10 maal met BSA verdunde IgG-oplossing) toegevoegd. Een 20 maal verdunde sol (met ca. 6 ng NT) aan de strip toegevoegd bleek het meest gunstig te zijn, bij een hogere verdunning duurde het veel langer voor er een stip werd gevormd en was de stip niet meer goed waarneembaar.

Het verschil tussen het wel en niet toevoegen van 60 ng vrij NT/ml (absoluut 10 ng) was onder deze condities redelijk waarneembaar.

3.3.5. Verdringing van NT-BSA sol door vrij nortestosteron.

Bij voorgaande experimenten had de vloeistof na de incubatie nog steeds een duidelijk rode kleur, waaruit blijkt dat uiteindelijk slechts een deel van de NT-BSA-sol aan de stip gebonden is. Hierdoor ontstond het idee om de strip met anti-NT eerst met de NT-BSA-sol te incuberen tot de vorming van een rode stip, vervolgens de strip uit de sol-oplossing te halen en te incuberen met vrij-NT (verdringing).

Dit experiment werd uitgevoerd met 1 μ l van een 10 maal met BSA verdund antiserum op de strip (theoretische capaciteit ca. 2,6 ng NT). Hieraan werd 7 μ l sol toegevoegd (met conjugaat II, 100x verdund met BSA voor de koppeling = ca. 6 ng NT) en 140 μ l PBS per strip. Na vorming van de rode stippen (na ca. 60 min), werden de strips uit de oplossingen gehaald en in oplossingen met 60 ng NT/ml (absoluut 10 ng) of met 6 μ g NT/ml (absoluut 1 μ g) geplaatst. De kleur van de stip veranderde, zelfs na incubatie gedurende enkele dagen, niet.

3.3.6. Verlenging van de preïncubatie met nortestosteron.

Uit het experiment beschreven onder 3.3.5. blijkt dat de NT-sol zeer goed bindt aan de antilichamen. Mogelijk kan dit effect ook andersom gebruikt worden. In de eerdere experimenten werd een preïncubatie van 1 uur (bij kamertemperatuur) gebruikt. Onderzocht werd of een verlenging van deze stap tot een hogere bezettingsgraad van de op de stip aanwezige antilichamen met NT leidt, voordat de NT-BSA-sol toegevoegd wordt. Dit complex zou dan, overeenkomstig de bevindingen onder 3.3.5., het gebonden NT slechts moeilijk kunnen verdringen.

De preïncubatie werd verlengd tot 2 uur bij 37°C. Dit bleek niet veel invloed te hebben op het kleurverschil tussen wel en niet aanwezig vrij NT. De preïncubatie werd vervolgens verlengd tot 3 dagen bij 37°C, maar dit had tot gevolg dat er veel specifieke binding van de NT-BSA-

sol aan de gehele strip werd waargenomen, mogelijk door het losweken van het BSA van de strip, zodat de stip nauwelijks meer zichtbaar was.

4. CONCLUSIES.

Uit de beschreven experimenten blijkt dat weinig NT-17HS-BSA (2,7 ng, overeenkomend met 0,3 ng NT) op een nitrocellulosestrip nodig is om een kleuring te geven met IgG gelabeld met de seleniumsol. Ook is een geringe hoeveelheid antilichaam (4,7 pmol IgG, dat theoretisch maximaal 2,6 ng NT zou kunnen binden) op de strip voldoende om een kleuring te geven met het NT-BSA aan de sol.

De striptest zou dus, theoretisch, op een veel lager nivo dan het tot nu toe best verkregen resultaat van 60 ng vrij NT per ml moeten kunnen werken.

De bevindingen duiden op een grotere aviditeit van het gebruikte IgG voor het NT-17HS-BSA dan voor het vrije NT.

5. AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK.

Dat het IgG een grotere aviditeit heeft voor NT-17HS-BSA dan voor vrij NT kan mogelijk worden bewezen door een aantal experimenten te herhalen met toevoeging van NT-17HS-BSA in plaats van vrij NT. Ook kunnen andere NT-eiwit-conjugaten in de test uitgeprobeerd worden, alsmede andere steroid-eiwitconjugaten zoals bijvoorbeeld testosteron-BSA (de kruisreactiviteit voor testosteron, bepaald in een competitieve EIA, van de antilichamen bedraagt < 1%).

Daarnaast worden experimenten gepland met antiserum aan de strip en preconcentratie van vrij NT alvorens de NT-sol toegevoegd wordt.

Bijlage I.

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN.

BSA	Bovine Serum Albumine
HS	Hemisuccinaat
IgG	Immunoglobuline G
KT	kamertemperatuur
MPA	Minimal Protecting Amount
NT	17 β ,19-nortestosteron
NT-BSA en	
NT-17HS-BSA	17 β ,19-nortestosteron-17 hemisuccinaat-BSA
PBS	Phosphate Buffered Saline