

ELISA

Langzeit-Stabilisierung von Assay-Komponenten

Dr. Tobias Polifke, Dr. Peter Rauch, CANDOR Bioscience GmbH, Weissensberg

Die zuverlässige Langzeit-Stabilisierung der einzelnen Komponenten eines Immunoassays ist bei vielen Anwendungen wünschenswert. Unabhängig davon, ob sehr kleine, mittlere oder auch große Stückzahlen von ELISAs durchgeführt werden, ist die Stabilisierung und Lagerung von Komponenten eine sinnvolle und zum Teil zwingend notwendige Voraussetzung für einfaches und zeitsparendes Arbeiten. In diesem Artikel wird der Stand der Technik – insbesondere im Hinblick auf die klinische Diagnostik – diskutiert. Für die klinische Immundiagnostik ist die ausreichende Stabilität von Assay-Komponenten Voraussetzung für die Markteinführung von Produkten gemäß EU In-Vitro-Diagnostika-Richtlinie (IVDD 98/79/EC).

Wer nur einzelne ELISA im Rahmen der Grundlagenforschung durchführt, tut gut daran, nicht für jede Messung alle Komponenten neu anzusetzen. Es ist einfacher und zeitsparender in einem Ansatz den Bedarf eines halben Jahres oder Jahres zu erstellen und dann sukzessive aufzubrauchen. Ergebnisse auch in der Grundlagenforschung werden so besser vergleichbar, weil Messungen immer mit identischen Materialien durchgeführt werden können. Im Rahmen umfangreicherer Studien, wie in der Lebensmittelanalytik, der medizinischen Forschung oder pharmazeutischer Fragestellungen, werden häufig mittlere Stückzahlen von zehn bis einigen hundert ELISA-Platten vermessen und dies mitunter parallel in mehreren Laboratorien von ko-

operierenden Arbeitsgruppen. Hier ist also nicht nur die zentrale Erstellung von ELISAs in gleichbleibender Qualität nötig. Die ELISAs müssen auch gelagert und versendet werden, ohne dass es zur Verschlechterung der Komponenten kommt. Im Bereich der Immundiagnostika – zum Beispiel für die klinische Anwendung – ist es seit Jahrzehnten das allgemeine Vorgehen, dass ELISA als Produkte von einzelnen Firmen gefertigt, an Kunden versandt und nach entsprechender Lagerung verbraucht werden. Die Anforderungen an die Stabilität sind im Bereich der immundiagnostischen Produkte zweifellos am höchsten, doch auch die anderen Bereiche können sich an den etablierten Verfahren in der Diagnostika-Produktion gut und einfach orientieren.

Zentraler Bestandteil eines jeden ELISA ist die mit Antikörpern oder Antigenen beschichtete ELISA-Platte. Im Falle eines Sandwich-ELISA werden Fänger-Antikörper immobilisiert. Dies geschieht in der Regel durch einfache Adsorption in einem Coating-Buffer. Die Auswahl des Coating-Buffers orientiert sich an der Menge der funktional immobilisierten Antikörper. Zu beobachten ist hierbei, dass meist kaum mehr als 2 bis 8% aller auf eine ELISA-Platte aufgetragenen Antikörper überhaupt funktionell sind,

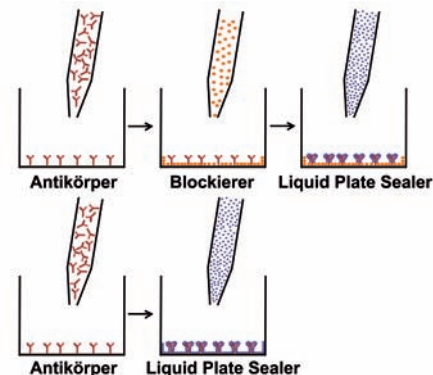


Abb. 1: Beschichten (Coaten), Blockieren und Stabilisieren von ELISA-Platten im Dreischritt- und im Zweischritt-Verfahren. Die jeweiligen Lösungen werden zugegeben, inkubiert und wieder entfernt, bevor die Platten für die Langzeit-Lagerung getrocknet und eingeschweißt werden.

also ihren Analyten tatsächlich noch binden können^{2,3}. Die Gründe für diese überaus geringe Ausbeute liegen vornehmlich in der räumlichen Orientierung sowie in Konformationsänderungen durch Oberflächeneffekte während der Immobilisierung. Im nächsten Schritt ist eine Blockierung aufzubringen, die die noch freien Bindungsstellen der ELISA-Platte absättigen muss. Dadurch wird verhindert, dass Bestandteile der zu vermessenden Probe oder Detektor-Antikörper direkt an die Platte binden und falsche, unspezifische Signale hervorrufen können. Die nötige Qualität der Blockierung hängt in starkem Maße von den zu vermessenden Analyten, den zu vermessenden Proben-Matrices sowie der geforderten Ergebniszuverlässigkeit ab⁴. Es stehen viele verschiedene Blockierer, angefangen bei den weniger effektiven synthetischen, über die etablierten Protein-Blockierer wie BSA oder Casein, bis hin zu den in der Literatur seit Jahrzehnten als höchsteffektiv beschriebenen, chemisch gespaltenen Casein-Blockierern zur Verfügung. Letztere stehen erst seit wenigen Jahren als Produkte zur Verfügung, da die Reproduzierbarkeit der Produktion ein früher ungelöstes Problem darstellte. Diese Hürde ist mittlerweile genommen. Der dritte Schritt ist die Stabilisierung der gecoateten Antikörper. Dazu wird die Blockierungslösung entfernt, eine

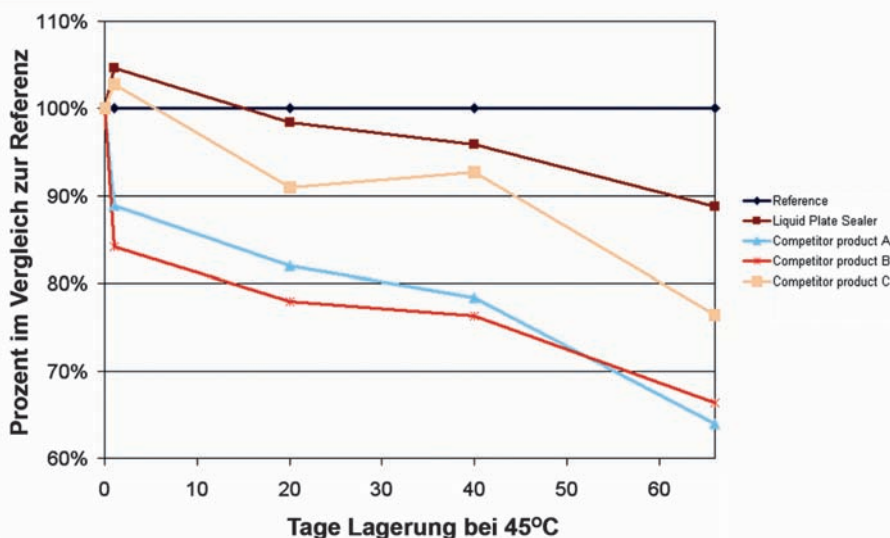


Abb. 2: Stresstest bei 45°C mit einem monoklonalen Antikörper, der bei Stabilisierung mit zuckerhaltigen Lösungen der ersten Generationen schon nach 24 Stunden keine messbare Bindung mehr zeigt (Daten nicht gezeigt). Die Stabilisierer der zweiten Generation A, B und C zeigen akzeptable Ergebnisse. Mit dem Stabilisierer der dritten Generation Liquid Plate Sealer® zeigt dieser instabile Antikörper selbst nach 66 Tagen Inkubation bei 45°C mehr als 85% seiner Aktivität und damit eine deutlich bessere Stabilität.

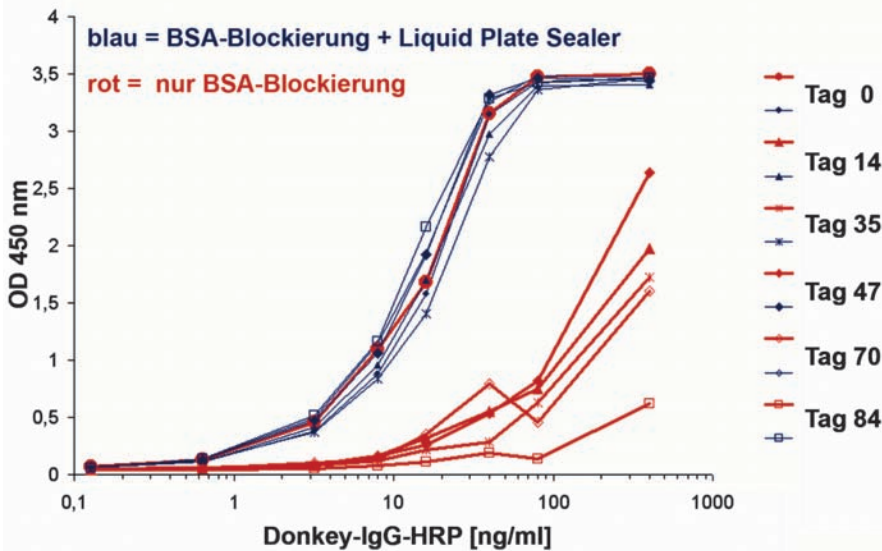


Abb. 3: Die Kalibrationskurven eines Sandwich-ELISA, der mit BSA blockiert wurde (rot) oder alternativ dazu zusätzlich mit Liquid Plate Sealer® stabilisiert wurde (blau), sind aufgetragen. Die Kalibrationskurven am Tag Null sind identisch, die Sensitivität des Assays ohne Stabilisierung nimmt jedoch rapide ab bei Lagerung bei 37°C. Dieser Stresstest bei 37°C zeigt jedoch, daß dieser ELISA nach Stabilisierung keinen Einbruch der Sensitivität über die Versuchsdauer von 84 Tagen zeigt.

Stabilisierungslösung aufgebracht und nach Inkubation wieder entfernt. Im Anschluss wird die Platte getrocknet, eingeschweißt und bis zur Messung gelagert. Abbildung 1 zeigt die Vorgehensweise bei der Produktion von gecoateten ELISA-Platten im Dreischritt- und im Zweischrittverfahren schematisch. Im Wesentlichen sind die genannten Schritte identisch, egal ob Fänger-Antikörper oder aber Antigene immobilisiert werden. Über Jahrzehnte erfolgreich etablierte Praxis in der diagnostischen Fertigung ist es, dass die oben genannte Stabilisierung mit Kohlenhydrat-haltigen Lösungen – häufig eigene Formulierungen der jeweiligen Produzenten – durchgeführt werden. Dies war die erste Generation von Stabilisierungslösungen. Sie führte bei vielen Antikörpern und vielen Assays zu ausreichenden Lagerstabilitäten – zumal man sich auf kontinuierliche Kühlung in Kühlketten verlassen konnte. Neben diesen „homemade“-Stabilisierungslösungen sind auch seit vielen Jahren sogenannte Coating-Stabilizer – meist aus amerikanischer Herstellung – im Markt, die vor allem zwei neue Vorteile bieten. Erstens konnte durch diese kommerziellen Stabilisierungslösungen der zweiten Generation erstmalig aus den zwei Produktionsschritten, also der Blockierung und der Stabilisierung, ein einziger Produktionsschritt gestaltet werden, ohne dass wesentliche messbare Verluste der Zuverlässigkeit aufgrund zu stark schwankender Blockierung auftraten. Zweitens wurden durch diese kommerziellen Stabilisierungslösungen im Vergleich zu den bis dahin etablierten Zucker-Lösungen wesentlich bessere und längere Haltbarkeiten erzielt. Dies ist vor allem dann von Interesse,

wenn relativ instabile Antikörper verwendet werden. Insbesondere monoklonale gereinigte Antikörper zeigen häufig schwache Stabilität auf Oberflächen. Aber auch polyclonale Seren können von sehr kurzen Halbwertszeiten betroffen sein. Die Auswahl der für ein Produkt geeigneten Blockierungs- und/oder Stabilisierungslösung erfolgt im Rahmen der Produktentwicklung und Validierung eines klinischen Diagnostikums. Die EU-Richtlinie zu In-Vitro-Diagnostika (IVDD 98/79/EC)¹ schreibt vor, dass sich die Merkmale und Leistungen von Diagnostika während der „Lebensdauer“ nicht derart verändern dürfen, dass die Sicherheit der Patienten gefährdet wird. Faktisch bedeutet dies, dass sich Produktmerkmale überhaupt nicht verändern dürfen, da jede Fehldiagnose eines klinischen Diagnostikum immer ein potentielles Sicherheitsrisiko für Patienten darstellt. Ohne ausreichende Stabilität darf also kein Diagnostikum im europäischen Markt verkauft werden – für wesentliche internationale Märkte gibt es ebenfalls entsprechende Anforderungen.

Trends in der Diagnostik und neue Herausforderungen

Diverse Trends beeinflussen die Entwicklung moderner Immundiagnostika. Einige werden beispielhaft genannt und ihre Auswirkungen auf die Anforderung an die Stabilisierung von Immundiagnostika beschrieben. Trend 1: Es gibt einen steigenden Kostendruck in der diagnostischen Industrie in den Industrienationen. Dieser wird zum einen getrieben durch die politisch gewünschte Kostenreduktion im gesamten Gesundheits-

sektor, zum anderen durch die steigende Konkurrenz bei sinkender Unterscheidung der Anbieter von Diagnostika. Dies führt zu Preisdruck, dem letztlich vor allem durch Anpassungen in der Produktion begegnet werden kann. Dieser Trend wirkt sich auch auf etablierte Diagnostika aus, wobei die Qualität im Markt etablierter Diagnostika sich nicht negativ entwickeln darf und dies bei Produkt-Veränderungen auch nachzuweisen ist. Trend 2: Die Diagnostik-Märkte in den sogenannten Schwellenländern wachsen kontinuierlich aufgrund des dort steigenden Lebensstandards. Gleichzeitig sind die Marktteilnehmer aber noch mit Lücken in der Infrastruktur konfrontiert. Für Diagnostika bedeutet dies häufig, dass mit Lücken in Kühlketten zu rechnen ist – eine besondere technische Herausforderung. Trend 3: Die medizinische Forschung entdeckt immer neue Moleküle, die sich als Diagnostika eignen. Die Gründe für die Entdeckung neuer Biomarker liegen vor allem in der technischen Entwicklung der Analytik und auch der Probenaufbereitung. Die modernen Biomarker werden erst seit einigen Jahren und nicht schon früher gefunden, wie etwa das C-reaktive Protein (CRP) als der wohl etablierteste alte Biomarker, weil sie entweder in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen oder aber von geringer Stabilität sind. Viele moderne diagnostische Biomarker zeigen sogar eine Kombination von beidem, also niedrige Konzentrationen bei kurzen Halbwertszeiten.

Anforderungen aufgrund der genannten Trends

Kostenreduktionen bei Kit-Bestandteilen sind wünschenswert. Dies gilt natürlich auch für die kommerziellen Stabilisierungslösungen. Neue Technologien zur Stabilisierung müssen gesteigerte Wirtschaftlichkeit bieten. Trend 2: Die Sicherheitsreserven in der Produkt-Stabilität werden in Zukunft größer sein müssen, sofern man sich nicht ausschließlich auf die schwach wachsenden Märkte der Industrienationen beschränken möchte, sondern auch die rasant wachsenden Märkte der Schwellenländer beliefern möchte. Trend 3: Niedrige Konzentrationen von Analyten erfordern eine bislang unbekannte Anforderung an die Präzision von Immundiagnostika. Schleichender Qualitätsverlust im Laufe der Lagerung, wie etwa ein Absinken des funktionellen Anteils von gecoateten Antikörpern von wenigen Prozent führt damit – anders als früher – häufig schon zu einer messbaren Abnahme der Präzision des ELISA, da die Nachweisgrenzen bis ans technisch mögliche Maß ausgereizt werden müssen. Außerdem gewinnt die Stabilisierung von Standards in einem ebenfalls bislang nicht gekannten Maß Bedeutung für die Produktentwicklung. Alles in allem stehen die Anforderung an die dritte

Generation von Stabilisierungslösungen klar und eindeutig fest: Bessere Stabilisierung muss bei gleichzeitig günstigeren Preisen ermöglicht werden.

**Die dritte Generation:
Liquid Plate Sealer®**

CANDOR Bioscience ist Zulieferer der diagnostischen Industrie und Entwickler moderner Werkzeuge für Immunoassays. CANDOR kann die genannten Anforderungen mit dem neuen Produkt Liquid Plate Sealer® erfüllen. Liquid Plate Sealer® zeigt herausragende Stabilisierung von Antikörpern und Antigenen, messbare Reaktivierung von Antikörpern nach der Immobilisierung, sehr gute und vor allem reproduzierbare Blockierung und zusätzlich noch eine verbesserte Wirtschaftlichkeit im Vergleich zu den bisherigen marktbestimmenden Stabilisierern der zweiten Generation. Liquid Plate Sealer® wird in der Produktion von Immundiagnostika identisch zu bekannten Stabilisierern eingesetzt, also nach dem Coaten zugegeben, inkubiert, entfernt, und die Platten werden getrocknet und eingeschweißt. Haltbarkeiten von mehreren Jahren sind selbst bei sehr instabilen Antikörpern möglich, ablesbar an Stresstest und konservativer Korrelation angelehnt an die Arrhenius-Gleichung. Zusätzlich bietet Liquid Plate Sealer® für viele Life-Sciences-Laboratorien aber auch die Option, dass Platten nach dem Absaugen oder Ausklopfen unter feuchten Bedingungen im Kühlschrank gelagert werden können, ohne sie Einschweißen zu müssen. Hierbei werden Haltbarkeiten (in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern) von mehreren Wochen bis hin zu einigen Monaten erreicht. Dies ist eine deutliche Arbeitserleichterung in Forschungsanwendungen, in denen sich die klassische Produktion von ELISAs aufgrund niedriger Stückzahlen häufig nicht rechnet und keine geeigneten Geräte zum Trocknen und Einschweißen zur Verfügung stehen. Die Steigerung der Stabilität im Vergleich zu den drei Stabilisierern des bisherigen Marktführers quantifiziert worden. Obgleich die zweite Generation von Stabilisierern bekanntermaßen ebenfalls schon sehr gute Ergebnisse erzielte, konnte CANDOR dies in der dritten Generation noch steigern. Die Kosten für Liquid Plate Sealer® sind dabei nicht höher als bei den marktbestimmenden Konkurrenz-Produkten. Liquid Plate Sealer® ist „Made in Germany“ und OEM-Ware ist für Produzenten von Immundiagnostika erhältlich.

Funktionsweise

Liquid Plate Sealer® bildet eine extrem dichte, aber dennoch leicht lösliche Schutzschicht um gecoatete Biomoleküle. Während der

Inkubation werden gecoatete Antikörper derartig mit einer Schutzschicht umhüllt, dass in messbarer Weise selbst inaktive nicht-bindende Antikörper wieder ihre Binde-Fähigkeit zurück erlangen und zum Messsignal des ELISA beitragen können. In vielen Fällen nimmt die Menge funktioneller Fänger-Antikörper aufgrund der Behandlung mit Liquid Plate Sealer® also zu, weil Reaktivierung stattfindet. Einmal aktivierte Antikörper bleiben unter der Schutzschicht über sehr lange Zeiträume stabil und diese Stabilität bleibt auch unter Temperaturstress lange erhalten.

Dies ermöglicht die Produktion von ELISAs, die selbst Lücken in der Kühlkette leichter verkraften, als dies früher der Fall war. Die Aktivierung erfolgt durch Bestandteile, die die Protein-Konformation günstig beeinflussen und die negative Wirkung der Kunststoff-Oberfläche auf ELISA-Platten auf Proteine abmildern oder beheben. Die nach Inkubation entstandene dichte Schutzschicht bewirkt, dass erneute Entfaltung in inaktive Konformationen selbst bei Temperaturstress reduziert wird. Insgesamt bildet Liquid Plate Sealer® somit einen aktiven (Reaktivierung) sowie einen passiven (Konformationsstabilisierung) Schutz für die gecoateten Moleküle. Wenn die Platte im ELISA eingesetzt wird, kann die Probe ohne weitere Waschschritte in die Wells gegeben werden. Die etablierte Arbeitsweise ändert sich nicht. Der Benutzer des ELISA bemerkt nur an der längeren Haltbarkeit der Platten, dass ein Produkt mit Liquid Plate Sealer® behandelt wurde. Der Austausch von kommerziellen Stabilisierungslösungen der zweiten Generation gegen die dritte Generation ist also meist

ohne Produktions- oder Produktumstellungen machbar. Vergleichende Stabilitätstest – obligatorisch in der klinischen Diagnostik – zeigen die erzielbare Veränderung der Haltbarkeiten durch Liquid Plate Sealer® an.

Stresstest

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse eines Stresstests mit einem sehr labilen Antikörper bei 45 °C gezeigt. Dieser Antikörper bricht im Messsignal des ELISA schon nach einem Tag Lagerung vollständig ein, selbst wenn er mit Zucker-Lösungen der ersten Generation stabilisiert wird. Er eignet sich daher besonders zur schnellen Verdeutlichung der qualitativen Unterschiede der drei Stabilisierergenerationen. Gezeigt sind die Ergebnisse nach Stabilisierung mit drei Produkten der zweiten Generation sowie dem Liquid Plate Sealer®. Die Anwendung der Produkte und die Vorgehensweise beim Beschichten und Vermessen sind in allen Fällen identisch. Bei bisheriger Anwendung von Produkten der zweiten Generation ist eine Umstellung also einfach realisierbar.

Für Anwendungen, bei denen die bisherige sehr effiziente Blockierung beibehalten werden soll, ist der Liquid Plate Sealer® ebenso geeignet, da er in der oben dargestellten Dreischritt-Produktion optimal einsetzbar ist. Mit allen bislang getesteten Blockierern ist er gut kompatibel. Beispielhaft ist in Abbildung 3 die Stabilisierung bei Kombination mit der sehr verbreiteten BSA-Blockierung gezeigt. Deutlich ist das Wegdriften der Kalibrationskurve im Verlauf der Lagerung zu sehen, sofern nicht stabilisiert wurde. Mit Stabilisierung bleibt über den gesamten Versuchszeitraum

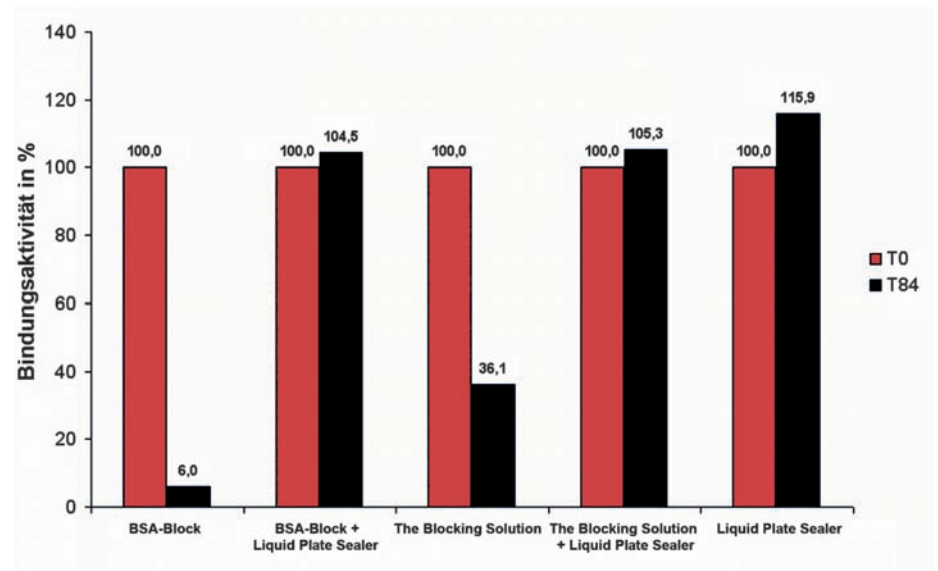


Abb. 4: Die Bindungsaktivität eines ELISA am Tag 0 sowie am Tag 84 nach Lagerung bei 37°C ist gezeigt. Es handelt sich um die Messungen innerhalb der Kalibrationskurve bei 40 ng/ml aus den in Abbildung 3 gezeigten Kalibrationskurven (in Abb. 3 nur BSA-Blockierung gezeigt). Deutlich ist die Stabilisierung sowie die Aktivierung von Bindungsaktivität durch Beschichtung mit Liquid Plate Sealer® zu sehen. Zusätzlich ist zu erkennen, dass problemlose Kompatibilität mit diesen zwei handelsüblichen Blockierern gegeben ist.

Still using HAMA blocker???

LowCross-Buffer®

minimises

- > HAMA problems
- > matrix effects
- > cross reactivities



Reliable results with economical solutions! Bulk available, please contact us for details!

Liquid Plate Sealer®

- > for long-term stability
- > economically priced
- > Made in Germany



Your coated ELISA plates are stable for years.

CANDOR

Bioscience GmbH

The Technology Solution Provider
for Optimising your Immunoassays

www.candor-bioscience.de

LowCross-Buffer® and Liquid Plate Sealer® are registered trademarks of CANDOR Bioscience GmbH.

die Kalibrationskurve sinnvoll auswertbar. Dieser stabilisierte ELISA wäre auch nach 84 Tagen bei 37°C ohne Probleme einsetzbar und würde reproduzierbare Ergebnisse liefern. Zusätzlich ist in Abbildung 4 die Kombination von verschiedenen Blockierern mit Liquid Plate Sealer® im Vergleich zur Stabilisierung alleine gezeigt.

Die Kombination mit vielen bekannten Blockierern ist bei Bedarf also einfach möglich.

Ausblick

Liquid Plate Sealer® ist das erste Produkt einer neuen Serie von Stabilisierungslösungen für Immunoassays, die CANDOR in den Markt einführt. Bereits zur Medica 2007 wird mit LowCross-HRP™ ein Peroxidase-Stabilisierer präsentiert, der herausragende Stabilisierung von Peroxidase-Konjugaten zusammen mit dem LowCross-Buffer®-Effekt zur Vermeidung von Interferenzen, wie zum Beispiel Störungen durch Humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) und Kreuzreaktivitäten⁵, in einem Produkt kombiniert. Damit lassen sich Peroxidase-gekoppelte Detektorantikörper-Konjugate langfristig lagern und dies in nutzbarer Endkonzentration, so dass weitere Verdünnungsschritte durch den Anwender entfallen. Fortgesetzt wird die Stabilizer-

Serie von CANDOR auch durch Stabilizer für die Alkalische Phosphatase sowie für Protein-Standards in Lösung. Alle Produkte der CANDOR sind als Bulk-Ware sowie in gleicher Qualität für Endkunden erhältlich und stammen aus der gemäß DIN/EN ISO 9001:2000 zertifizierten Produktionsstätte.

Literatur

- [1] In Vitro Diagnostic Directive (IVDD) – Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices.
- [2] Esser, P. Activity of Adsorbed Antibodies. *Nunc Bulletin* No. 11, p349-352 (1997)
- [3] Butler, J.E., Ni, L., Nessler, R., Joshi, K.S., Suter, M., Rosenberg, B., Chang, J., Brown W.R. & Cantarero, L.A. The physical and functional behaviour of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J. Immunol. Methods* 150, 77-90.
- [4] Raem, A.M., & Rauch, P., eds: *Immunoassays Elsevier, Heidelberg* (2007)
- [5] Rauch, P., Zellmer, A., Dankbar, N., Specht, D. & Sperling, D., Assay-optimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden, *LABORWELT* 4, 33-39 (2005)

Korrespondenzadresse

CANDOR Bioscience GmbH
Dr. Peter Rauch
Eggenwatt 12
D-88138 Weissensberg
Tel.: +49-(0)8389-929399-2
Fax: +49-(0)8389-929399-9
eMail: p.rauch@candor-bioscience.de
www.candor-bioscience.de

Konjugat-Stabilisierung: LowCross-HRP®

Die Stabilisierung von Antikörper-Peroxidase-Konjugaten über Jahre ist eine der echten Herausforderungen bei der Erstellung robuster Immunoassays. LowCross-HRP® ist ein vollkommen neuartiger Stabilizer für Peroxidase-gekoppelte Detektorantikörper. LowCross-HRP® erreicht Haltbarkeiten über mehrere Jahre für HRP-Konjugate. Dabei bleibt sowohl die Aktivität der Peroxidase als auch die Bindefähigkeit der Antikörper langfristig erhalten – ermittelt in Stresstests mit konservativer Korrelation nach Arrhenius.

Die HRP-Antikörper-Konjugate können direkt in LowCross-HRP® in verdünnter Endkonzentration, also ready-to-use, gelagert werden. Das spart lästige Verdünnungen. Der zusätzliche LowCross-Buffer®-Effekt vermindert Interferenzen und Fehlbestimmungen zum Beispiel in Blut-, Serum- und Gewebeproben, und selbst HAMA-Störungen können wirksam verhindert werden. Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit sind so vorprogrammiert. Bulk-Ware ist auf Anfrage erhältlich.

