

Die Technik des Radioimmunoassays

Von Hans Georg Eckert^[*]

Biologisch aktive Substanzen sind oft bereits in Nanogramm- oder noch kleineren Mengen wirksam. Kenntnisse über ihre Wirkungsweise setzen daher hochempfindliche mikroanalytische Nachweismethoden voraus. Chemische, chromatographische oder spektrometrische Verfahren erwiesen sich häufig als zu unempfindlich; erst durch die Entdeckung des Radioimmunoassays (RIA) gelang die quantitative Bestimmung kleinster Substanzmengen in Gegenwart eines millionsfachen Überschusses an Fremdstoffen. Der Radioimmunoassay verbindet die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen. Wegen ihrer Empfindlichkeit, Spezifität, einfachen Handhabung und insbesondere aufgrund der generellen Anwendbarkeit sind radioimmunologische Methoden anderen Analysenverfahren überlegen.

1. Einleitung und Bedeutung

Die ersten auf die radioimmunologische Methode hinweisenden Befunde ergaben sich aus Untersuchungen, die Yalow und Berson^[1] in den fünfziger Jahren durchführten. Bei in-vivo-Versuchen zur Aufklärung des Metabolismus von [¹³¹I]-Insulin machten sie die überraschende Entdeckung, daß alle mit Insulin behandelten Diabetiker Insulin-bindende Antikörper gebildet hatten. In weiterführenden Arbeiten konnten sie zeigen, daß einerseits ein Überschuß von Insulin die Antikörper-Bindungsplätze absättigt und andererseits durch Zugabe von nicht-markiertem Insulin radioaktiv markiertes [¹³¹I]-Insulin aus dem Gammaglobulin-Komplex verdrängt wird. Damit waren die grundlegenden Voraussetzungen für die Entwicklung des Radioimmunoassays gefunden.

Die Weiterentwicklung dieser mikroanalytischen in-vitro-Technik führte dann zum ersten Radioimmunoassay für Insulin^[2,3], bei welchem ein Insulin-spezifischer Antikörper das Schlüsselreagens war. Fast gleichzeitig teilte Ekins^[4] ein sehr ähnliches Prinzip zur Bestimmung des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T4) mit. Als spezifisches Bindungsreagens diente jedoch anstelle des Antikörpers ein natürlich vorkommendes Transportprotein, das Thyroxin-bindende Globulin (TBG). Auf der Basis dieser Arbeiten sind bis heute zahlreiche Radioimmunoassays für die verschiedensten Substanzen sowie durch Variation der Techniken eine Reihe ähnlicher Methodiken entwickelt worden, die in mehreren Büchern und Übersichtsartikeln^[5-11] beschrieben und als Sättigungsanalyse, Radio-Liganden-Assay oder kompetitive Proteinbindungsanalyse bezeichnet werden.

Die weitreichende Bedeutung und das große Interesse, das diesen empfindlichen Bestimmungsmethoden entgegengebracht wird, äußert sich u. a. in bisher mehr als 200 Radioimmunoassays. Mit diesen Verfahren können in biologischen Flüssigkeiten, z. B. in Plasma, Serum oder Urin, ohne vorherige Abtrennung oder Anreicherung die verschiedensten Substanzen in Nanogramm- bis Picogramm- und zum Teil sogar in noch kleineren Konzentrationen nachgewiesen werden. Tabelle 1 enthält eine Auswahl von wichtigen, biologisch aktiven Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, die sich radioimmunologisch bestimmen lassen. Viele der bisher entwickelten Radioimmunoassays sind bereits in Form

Tabelle 1. Auswahl einiger Radioimmunoassays für Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen.

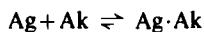
Bezeichnung der Substanz	Molekulargewicht (abgerundete Werte)
1. Peptid-Hormone	
Vasopressin	1084
Gastrin	2096
Glucagon	3483
Calcitonin (CT)	3700
Adrenocorticotropin (ACTH)	4576
Insulin	5734
Prolactin (PH)	20000
Wachstumshormon (GH)	21500
Placenta-Lactogen (PL)	22000
Thyreotropin (TSH)	25000
Luteinisierungshormon (LH)	26000
Follikel-stimulierendes Hormon (FSH)	30000
2. Nicht-Peptid-Hormone	
Serotonin	176
Östrogene, Androgene, Gestagene	300
Prostaglandine	300
Triiodthyronin (T3)	651
Thyroxin (T4)	776
3. Enzyme	
Trypsin	23800
Carboxypeptidase A	34000
Pepsinogen	42000
4. Serumproteine	
Thyroxin-bindendes Globulin (TBG)	65000
Albumin	69000
Immunglobuline (Ig)	150000
5. Vitamine	
Vitamin D ₃	385
Vitamin B ₁₂	1355
6. Tumor-assoziierte Antigene	
Chorion-Gonadotropin (CG)	46000
Alphafetoprotein (AFP)	65000
Carcino-embryonales Antigen (CEA)	200000
7. Arzneimittel	
Barbiturate	100-200
Morphin	285
Lysergsäurediethylamid (LSD)	323
Penicillin G	334
Digoxin/Digitoxin	780
8. Andere biologisch aktive Substanzen	
cyclisches Adenosinmonophosphat (c-AMP)	347
Folsäure	441
Desoxyribonucleinsäure (DNA)	10 ⁶
Hepatitis-assoziiertes Antigen (HBsAg)	—

vollständiger Analysensätze als Radioimmunbestecke (Kurzbezeichnung Kit) im Handel erhältlich.

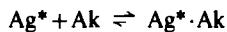
[*] Dr. H. G. Eckert
Hoechst AG
6230 Frankfurt (Main) 80

2. Prinzip

Radioimmunologische Methoden verbinden die hohe Nachweisempfindlichkeit isotopen-markierter Verbindungen (Isotopenverdünnungsanalyse) mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen. So ist bei Verwendung von Radioisotopen die Nachweisgrenze bis zu 10⁷-mal besser als bei anderen physikalisch-chemischen Analysenverfahren. Die in vivo und in vitro ablaufende immunologische Reaktion beruht auf der Paßform von Antigen (Ag) und Antikörper (Ak), die beide korrespondieren „wie Schlüssel und Schloß“ (*Emil Fischer*). Bei hinreichend großer Bindungsaaffinität des Antikörpers stellt sich im Laufe der Reaktion zwischen den Reaktionspartnern und dem gebildeten wasserlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex (Ag·Ak) ein charakteristischer Gleichgewichtszustand ein:



Wird das unmarkierte Antigen (Ag) durch radioaktiv markiertes Antigen (Ag*) ersetzt, das sich chemisch nicht oder nur geringfügig, immunologisch jedoch keinesfalls von diesem unterscheidet, so gilt analog



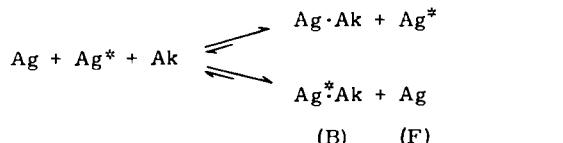
Radioimmunologische Meßsysteme auf der Basis dieser beiden Reaktionsgleichungen erlauben die Bestimmung kleinsten Substanzmengen des Antigens (Ag), wenn drei Voraussetzungen erfüllt sind:

1. Der Antikörper (Ak) kann zwischen radioaktiv markierter Substanz (Ag*) und der zu bestimmenden unmarkierten Verbindung (Ag) nicht unterscheiden, d.h. die Bindungskonstante K ist für die Komplexe Ag·Ak und Ag*·Ak gleich.

2. Es müssen mehr radioaktiv markierte Antigenmoleküle (Ag*) als Bindungsplätze des Antikörpers vorhanden sein, d.h. die Menge Antikörper (Ak) ist so zu begrenzen, daß neben den gebildeten Komplexen Ag*·Ak immer (auch bei Abwesenheit der unmarkierten Substanz) noch freies markiertes Antigen (Ag*) vorliegt.

3. Innerhalb eines Meßsystems werden die Konzentration der radioaktiven Verbindung und die eingesetzte Menge des Antikörpers in allen Testansätzen konstant gehalten. Die Konzentration des unmarkierten, zu bestimmenden Antigens ist demnach die einzige Variable in diesem System.

Unter den genannten Voraussetzungen läßt sich der Radioimmunoassay sehr einfach als kompetitive Proteinbindungsanalyse verstehen. Eine variable Menge einer Substanz (Ag) und eine konstante Menge derselben, radioaktiv markierten Verbindung (Ag*) konkurrieren um eine begrenzte und ebenfalls konstante Zahl von Bindungsplätzen des Antikörpers (Ak).



Entsprechend dieser Beziehung werden vom Antikörper um so weniger radioaktiv markierte Moleküle (Ag*) komplexiert ge-

bunden (B), je mehr unmarkierte (Ag) vorhanden sind. Damit ist der Anteil der Bindung zwischen radioaktiven Molekülen und Antikörper ein Maß für die Konzentration der zu bestimmenden Verbindung.

Schematisch wird der hier besprochene Sachverhalt sehr vereinfacht in Abbildung 1 wiedergegeben. In allen drei Beispielen sind die genannten Forderungen erfüllt. Durch steigende Substanz-Konzentration in der ersten senkrechten Reihe (0,2 und 6 Moleküle) wird bei konstanten Mengen an radioaktiver Substanz und Antikörper die Zahl der radioaktiven Ag*·Ak-Komplexe kleiner (Bilanz). Wegen der fehlenden Spezifität können Fremdstoff-Moleküle und Antikörper nicht miteinander reagieren. Um quantitativ festzustellen, welcher Anteil der markierten Verbindung nach Einstellung des Gleichgewichtes gebunden ist (B), sind aus dem Inkubationsgemisch alle Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag*·Ak, Ag·Ak) vom freien, nicht gebundenen Antigen (Ag*, Ag) abzutrennen. Die wichtigsten Trennverfahren werden hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile in Abschnitt 5 diskutiert. Nach der Trennung und der Messung der Radioaktivität der gebundenen (B) oder freien Phase (F) kann aus einer Eichkurve, die mit der standardisierten Substanz erstellt wird, der Gehalt einer Probe direkt abgelesen werden.

Nach dem Vermischen des Reaktionsansatzes und einer entsprechend langen Inkubation der Reaktionspartner stellt sich im einfachsten Fall ein reversibler Gleichgewichtszustand ein, der sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben läßt. Die graphische Darstellung der daraus abgeleiteten Beziehung

$$\frac{[Ag \cdot Ak]}{[Ag]} = K([Ak]_0 - [Ag \cdot Ak])$$

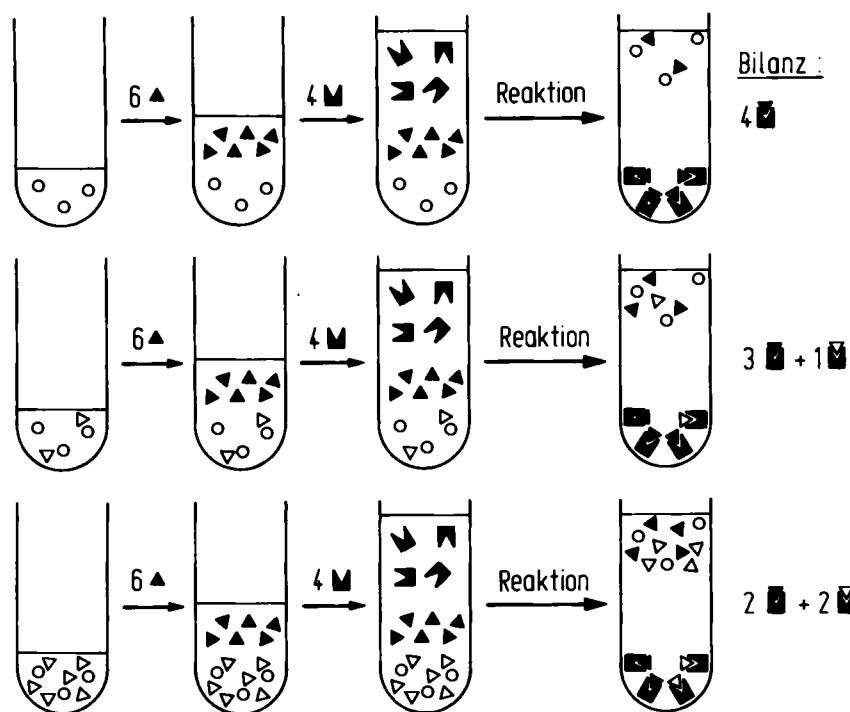
[Ak]₀ = Anfangskonzentration des Antikörpers

oder ausgedrückt durch die gebundene Phase (B) und die freie Phase (F)

$$\frac{[B]}{[F]} = K([Ak]_0 - [B])$$

liefert eine Gerade mit der Steilheit K. Das Verfahren ist als „Scatchard-Plot“^[1,2] bekannt und ermöglicht eine Abschätzung der Bindungskonstanten.

Diese Betrachtungsweise ist jedoch sehr vereinfacht und nur dann einigermaßen zuverlässig, wenn Antigen und Antikörper chemisch einheitlich und univalent sind und bis zur Gleichgewichtseinstellung reagieren^[1,3]. Ferner darf dieses Gleichgewicht nicht bei der Abtrennung der Antikörpergebundenen von der freien Substanz gestört werden. Außerdem muß eine Reaktion 1. Ordnung vorliegen. Tatsächlich sind diese Bedingungen jedoch nicht erfüllt. Fast immer enthalten Antiseren mehrere Populationen mit verschieden stark bindenden Antikörpern, so daß sich schon wegen dieser Heterogenität keine linearen Scatchard-Kurven^[1,4] ergeben und sich daher nur „mittlere“ Bindungskonstanten bestimmen lassen. Die wirklichen Verhältnisse werden noch komplizierter, wenn man berücksichtigt, daß Kreuzreaktionen mit chemisch ähnlichen oder strukturell verwandten Molekülen ablaufen können. Zur genaueren Beschreibung der realen Verhältnisse und zur Abschätzung ihrer Einflüsse auf Standardkurven sind mehrere Modelle entwickelt worden, so u.a. auch für das unterschied-



△ Substanz Ag (Probe oder Standard)

▲ radioaktiv markierte Substanz Ag*

■ radioaktiver Antigen-Antikörper-Komplex

▽ inaktiver Antigen-Antikörper-Komplex

■ spez. Antikörper Ak

○ Fremdstoffe

[A126.1]

Abb. 1. Funktionsprinzip des Radioimmunoassays. Eine variable Menge des Antigens (Ag) und eine konstante Menge des markierten Antigens (Ag*) konkurrieren um eine begrenzte Zahl von Bindungsplätzen des Antikörpers (AK).

liche Bindungsverhalten von markierter Substanz, Standardsubstanz und zu bestimmender Substanz in einer biologischen Flüssigkeit⁽¹⁵⁾.

Zur Entwicklung eines Radioimmunoassays und zum Aufbau eines Meßsystems muß zunächst die zu bestimmende Substanz, z. B. ein Hormon, in ausreichender Menge aus biologischem Material isoliert und gereinigt oder durch chemische Synthese gewonnen werden. Ein Teil des in möglichst großer Reinheit vorliegenden Hormons wird dann radioaktiv markiert, ein anderer Teil für die Immunisierung zur Gewinnung von Antiseren verwendet, während das unveränderte Hormon als Bezugsstandard zur Erstellung der Eichkurve dient. Außerdem wird ein geeignetes Reagens zur Abtrennung des Antikörper gebundenen Hormons vom freien Hormon benötigt.

3. Isotope und Verfahren zur radioaktiven Markierung

Die Auswahl des Radioisotops und damit meistens auch das chemische Verfahren, mit dem sich eine Substanz markieren lässt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. So spielen neben Molekülgröße, Struktur, Stabilität und Zugänglichkeit der Verbindung ihre Reinheit, die Erhaltung der Immunreakтивität, die in manchen Fällen, z. B. bei Hormonen, nur begrenzt verfügbare Menge, und vor allem die erreichbare spezifische Radioaktivität eine wesentliche Rolle. Da die zu bestimmende Substanz in den Meßproben im allgemeinen in Nano- bis

Picogramm-Mengen vorkommt, ist radioimmunologisch nur dann eine genaue Gehaltsbestimmung möglich, wenn die Menge an markierter Substanz (Tracer) selbst sehr klein gehalten wird. Um bei vertretbarer Meßzeit eine befriedigende Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, ist deshalb ein Tracer mit ausreichend hoher spezifischer Radioaktivität erforderlich. Für die meisten Radioimmunoassays genügt ein Tracer mit einer Aktivität zwischen 100 und 200 mCi/mg. Hierzu werden jedem Reaktionsansatz etwa 10 nCi (ca. 22000 radioaktive Zerfälle pro Minute) entsprechend rd. 60 pg markierter Substanz und gelegentlich auch noch weniger zugesetzt.

Von den in Frage kommenden Radioisotopen wäre zur Markierung organischer Substanzen das Kohlenstoff-Isotop ¹⁴C allen anderen vorzuziehen, weil die ¹⁴C-markierte Verbindung vollständig mit der Ausgangsverbindung übereinstimmt. Wie Tabelle 2 zeigt, ist jedoch die mit ¹⁴C erreichbare spezi-

Tabelle 2. Theoretisch erreichbare maximale spezifische Radioaktivität einer Verbindung, wenn 1 Atom des Isotops in das Molekül eingebaut wird.

Isotop	Radioaktivität [Ci/mmol]	Halbwertszeit	Strahlung
¹⁴ C	0.062	5568 a	β^-
³ H	29	12.3 a	β^-
⁷⁵ Se	1080	120.4 d	γ
³⁵ S	1488	87 d	β^-
¹²⁵ I	2200	59.7 d	γ
¹³¹ I	16100	8.1 d	β^-, γ

sche Radioaktivität so gering, daß sich damit allenfalls noch 0.1 µg einer Substanz bestimmen lassen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die ^{14}C -Markierung einer Verbindung meistens mehrere Synthesestufen erfordert und häufig nur mit kleinen Ausbeuten gelingt. Hinzu kommt, daß bei vielen komplizierter aufgebauten oder hochmolekularen Naturstoffen, z. B. Polypeptiden, Proteinen und Glykoproteinen, die bisher chemisch noch nicht synthetisiert werden können und von denen oft nur kleinste Substanzmengen zur Verfügung stehen, eine ^{14}C -Markierung überhaupt nicht möglich ist.

Wegen der Nachteile von ^{14}C markiert man relativ „kleine“ Moleküle wie Steroide, Prostaglandine oder Arzneimittel mit Tritium. Die Radioaktivität wird entweder durch katalytische Tritiierung von Doppelbindungen, durch Wilzbach-Tritiierung oder über eine Austauschreaktion eingeführt, z. B. Halogen gegen Tritium. Aber auch tritierte Verbindungen weisen eine Reihe von Nachteilen auf, die einer breiteren Anwendung entgegenstehen. So ist vielfach die spezifische Radioaktivität zu niedrig, während Tritiumverbindungen mit höherer Aktivität relativ unbeständig sind. Außerdem erfordert die Messung der β -Strahlung im Flüssigkeits-Szintillationszähler eine aufwendige und kostspielige Probenvorbereitung (Szintillations-Cocktail).

Am häufigsten wird zur radioaktiven Kennzeichnung einer Substanz die Fremdmarkierung oder bei Verbindungen, die wie die Schilddrüsenhormone Iod enthalten, eine Austauschmarkierung mit dem Radioisotop ^{125}I durchgeführt. Dieser γ -Strahler ermöglicht die nachträgliche Markierung des intakten Moleküls in einem Syntheseschritt und liefert ein Produkt mit hoher spezifischer Radioaktivität (Tabelle 2). Wegen seiner längeren Halbwertszeit von 60 Tagen hat ^{125}I bei Radioimmunoassays das Isotop ^{131}I , welches heute überwiegend nur noch bei in-vivo-Untersuchungen eingesetzt wird, fast vollständig verdrängt.

Die Iodierung ist zunächst auf solche Verbindungen beschränkt, die – wie fast alle Peptide und Proteine – die Aminosäuren Tyrosin oder Histidin enthalten. Es muß außerdem berücksichtigt werden, daß der Einbau von Iod das Molekül je nach seiner Größe mehr oder weniger stark u. a. auch konformativ verändert, so daß es infolge Änderung seiner immunologischen Eigenschaften vom Antikörper nicht oder nur weniger fest gebunden werden kann. Das unterschiedliche Bindungsverhalten läßt sich direkt aus dem Vergleich der Immunreakтивität von Tracer und unmarkierter Verbindung erkennen.

Die Iodmarkierung beruht auf der elektrophilen Substitution im aktivierten aromatischen Ring, z. B. im Tyrosin α -ständig zur Hydroxylgruppe. Fast alle hierzu entwickelten Verfahren unterscheiden sich wesentlich nur im Oxidationsmittel, mit welchem aus dem ^{125}I -Anion radioaktives Iod gebildet wird. Bei dieser Reaktion ist bereits die zu markierende Substanz zugegen, so daß auch sie dem Oxidationsmittel ausgesetzt ist. Dies macht sich besonders bei oxidationsempfindlichen SH-Gruppen und Aminosäuren störend bemerkbar und führt zu unerwünschten Veränderungen des Moleküls. Durch außerordentlich milde Oxidationsmittel und sehr kurze Reaktionszeiten zwischen 5 und 60 Sekunden läßt sich jedoch der Anteil an Zersetzungprodukten meist sehr klein halten oder bei der Reinigung des Reaktionsgemisches abtrennen. Die Reaktion wird im allgemeinen durch ein Reduktionsmittel wie Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) oder durch Verdünnen mit Pufferlösung gestoppt.

Von allen Verfahren hat die Chloramin-T-Methode^[16, 17] zur Iodierung von wenigen Mikrogramm Substanz die größte Verbreitung gefunden. Demgegenüber ist die Zahl der Beispiele, bei denen bei der Markierung mit Iodmonochlorid^[18, 19], mit gasförmigem Chlor^[20], mit Natriumhypochlorit^[21] oder elektrolytisch^[22] iodiert wird, von untergeordneter Bedeutung. Dagegen werden in ständig wachsendem Maße enzymatische Iodierungen mit Lacto-^[23] oder Meerrettich-(Horse-Radish)-Peroxidase^[24, 25] durchgeführt. Sehr mild und schonend sind Verfahren mit chemisch aktivierten Estern^[26, 27]. In einer der Acylierung vorgeschalteten Reaktion wird hierbei zunächst z. B. 4-[2-(Succinimidooxycarbonyl)ethyl]phenol [„3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure-(N-hydroxysuccinimidester)“] mit der Chloramin-T-Methode radioaktiv iodiert, die iodierte Verbindung gereinigt und anschließend mit freien Aminogruppen des Peptids oder Proteins umgesetzt. Das Verfahren hat den Vorteil, daß empfindliche Substanzen weder mit ^{125}I noch mit den zur Iodierung benötigten Reagentien in Berührung kommen. Außerdem lassen sich hiermit auch solche Verbindungen radioaktiv markieren, die kein Tyrosin oder Histidin enthalten.

Um die Vorteile – hohe spezifische Radioaktivität und einfache Messung – iodmarkierter Verbindungen auch bei niedermolekularen Stoffen ausnutzen zu können, koppelt man an diese Haptene (siehe Abschnitt 4) über ein Brückenglied iodierbare Hilfsverbindungen wie Tyrosinester, Tyramin oder Histamin^[28, 29]. Dabei ist jedoch zu beachten, daß sich die neuen Verbindungen immunologisch oft ganz anders verhalten als die Ausgangsverbindung, was im Extremfall zu einem vollständigen Verlust an Bindungsfähigkeit mit dem Antikörper führt. Besondere Beachtung verdient deshalb die Verknüpfungsstelle zwischen Substanz und Hilfsverbindung.

Anstelle dieser Konjugate, welche Größe und Struktur des Moleküls doch erheblich verändern, ist es neuerdings auch möglich, Steroide direkt mit ^{75}Se (Tabelle 2) radioaktiv zu markieren^[30].

Nach der Markierung mit ^{125}I muß möglichst sofort die radioaktive Verbindung aus dem Reaktionsgemisch von nicht umgesetztem ^{125}I , von radioaktiven Zersetzungprodukten

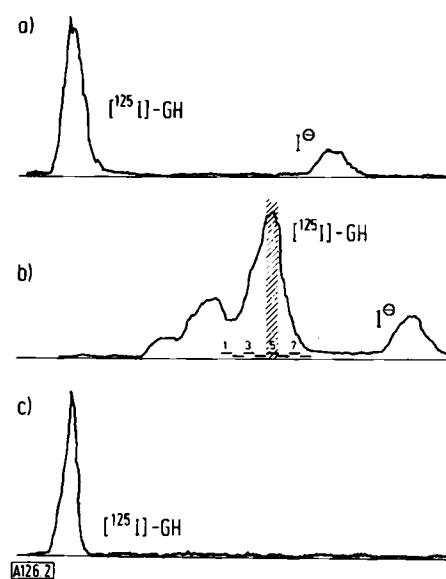


Abb. 2. Reinigung und Qualitätsprüfung von ^{125}I -markiertem Wachstumshormon $[^{125}\text{I}]\text{-GH}$. a) Elektrophorese des Reaktionsgemisches, b) Reinigung durch Gelfiltration, c) Elektrophorese der Fraktion 5.

(„damage“) sowie von inaktiven Reaktionskomponenten abgetrennt werden. Da es sich meistens um sehr kleine Substanzmengen zwischen 10 bis 50 µg handelt, läßt sich die Reinigung nur mit leistungsfähigen Trennsystemen, z. B. durch Gelfiltration, Gelelektrophorese, Chromatographie oder über selektive Adsorption durchführen. Nach der Reinigung wird dann chromatographisch oder durch Elektrophorese geprüft, ob die Substanz radiochemisch einheitlich ist (Abb. 2).

Die radiochemische Reinheit der markierten Verbindung nimmt durch Autoradiolyse, d. h. Veränderung durch Strahlung und Abspaltung von Iodatomen, bei längerer Lagerung ständig ab. Insbesondere durch Herabsetzung der Aktivitätskonzentration, aber auch durch Zusätze von Albumin und Puffer kann der Zersetzung entgegengewirkt und die Haltbarkeit verbessert werden. Eine weitere Verbesserung der Stabilität wird durch Lagerung bei niedriger Temperatur (-20°C) und durch Gefriertrocknung des Produktes erzielt.

4. Bildung und Eigenschaften von Antikörpern

Antikörper sind körpereigene Glykoproteine und gelten als Träger des Infektionsschutzes. Sie werden beim Eindringen eines körperfremden Stoffes, des Antigens, in den immunkompetenten lymphoiden Zellen (Plasmazellen) des Organismus gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert. Durch Komplexbildung mit dem Antikörper wird das Antigen unschädlich gemacht.

Antikörper wandern bei der Elektrophorese des Serums in der γ -Globulinfraktion. Sie werden wegen ihrer weitgehenden funktionellen und strukturellen Übereinstimmung mit γ -Globulinen als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Diese haben Molekulargewichte zwischen 150 000 (IgG) und 900 000 (IgM) und bestehen in der Regel aus zwei langen und zwei kurzen Ketten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden^[31-33].

Ein wesentliches Kennzeichen der Antikörper ist ihre spezifische Bindung mit dem Antigen, das ihre Entstehung bewirkt hat. Die Ursache dieser Spezifität besteht darin, daß determinante Gruppen des Antigen-Moleküls und Bindungsgruppen auf dem Immunglobulin-Molekül räumlich ineinander passende, komplementäre Konfigurationen besitzen. Wird nun das Serum, welches die Antikörper enthält und daher als Antiserum bezeichnet wird, isoliert, so läßt sich die *in vivo* ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktion auch *in vitro* für Gehaltsbestimmungen nutzen.

Die Antikörperbildung hängt von mehreren Faktoren ab, von denen die Natur und die angebotene Form des Antigens sowie die zur Immunisierung ausgewählte Tierspezies die größte Bedeutung haben. Artfremde Proteine mit einem Molekulargewicht über 5000 wirken im allgemeinen als Antigene. So genügt bereits ein kleiner Unterschied in der Aminosäuresequenz oder eine ausgewechselte Aminosäure, z. B. im Insulin, um antigene Eigenschaften zu erzeugen. Kleinere Moleküle, wie die Polypeptide Gastrin oder Vasopressin, Steroide, Schilddrüsenhormone sowie Arzneimittel haben dagegen nur geringe oder überhaupt keine antigene Wirkung. Gegen diese Haptene lassen sich jedoch ebenfalls Antikörper erzeugen, wenn man sie kovalent an hochmolekulare Träger bindet. Hierzu werden diese Verbindungen über kurze Brückenglieder (vier bis sechs CH_2 -Gruppen) an natürliche oder synthetische Proteine oder Polymere wie Albumine^[34], Polylysin^[35] oder Polyethylengly-

kol angekoppelt. Die determinante Gruppe bestimmt dabei die Spezifität des Antikörpers, d. h. dieser reagiert nicht mit dem vollständigen Antigen-Molekül, sondern nur mit einem kleinen Teil davon, dem Hapten. Von erheblicher Bedeutung für die Spezifität eines Antiserums ist jedoch die Position, an der das Hapten-Molekül mit dem Trägerprotein verknüpft ist^[36]. Positionen mit funktionellen Gruppen sowie deren unmittelbare Umgebung, z. B. bei Steroiden die Ringe A und D, sollten bei der Konjugatbildung nicht verändert werden.

Zur Immunisierung eignen sich gut Kaninchen, aber auch Meerschweinchen, Schafe und Ziegen. Im allgemeinen werden mehrere Tiere gleichzeitig immunisiert, wobei die eingesetzte Menge Immunogen (Antigen) oder Haptenkonjugat von der Substanz und vom Tier abhängt. Substanz und Tier bestimmen auch die Art der Injektion (z. B. intravenös, subcutan, intramuskulär), die Zusätze (komplettes oder inkomplettes Freud'sches Adjuvans) sowie die Zeitintervalle zwischen mehreren Injektionen („boostern“)^[37, 38].

Zwischen den Injektionen muß den Tieren immer wieder Serum abgenommen und geprüft werden, ob sich bereits Antikörper gebildet haben und welche Qualität diese besitzen. Da Antikörper schon während der Immunisierung unterschiedlich schnell abgebaut werden, läßt sich nur durch ständige Austestung der geeignete Zeitpunkt für eine größere Blutentnahme feststellen. Die den Tieren entnommenen Seren können nach entsprechender Verdünnung direkt ohne besondere Vorbehandlung eingesetzt werden.

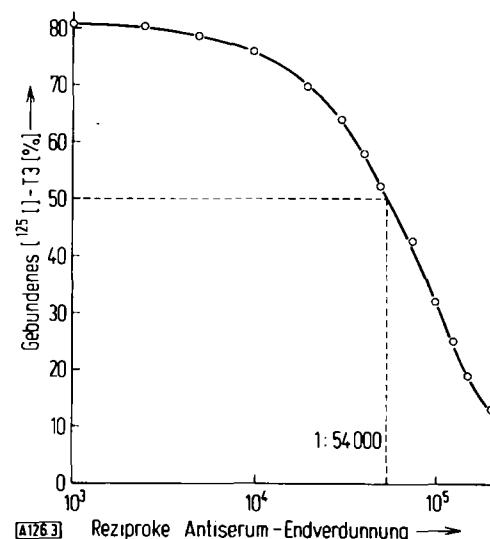
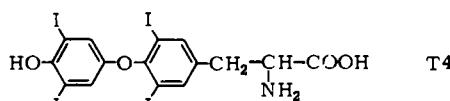
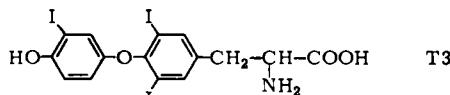


Abb. 3. Antiserum-Verdünnungskurve zur Festlegung der Arbeitskonzentration (Titer) bei z. B. 50 % Anfangsbindung.

Die wichtigsten Kriterien für die Beurteilung und die Auswahl eines Antiseraums für den Radioimmunoassay sind der Titer sowie die Spezifität. Als Titer wird vereinbarungsgemäß diejenige Antiserumverdünnung bezeichnet, bei der 50 % des angebotenen Tracers unter standardisierten Bedingungen gebunden werden. Abbildung 3 zeigt eine Verdünnungskurve für ein Anti-T3-Serum, das durch Immunisierung eines Kaninchens mit T3-BSA-Konjugat (3,3',5-Triiodthyronin-Rinderseum-Albumin) erhalten wurde.

Obwohl die Antigen-Antikörper-Reaktion außerordentlich spezifisch ist, muß stets mit Störungen durch Fremdmoleküle gerechnet werden. Diese Kreuzreaktionen werden von ähnlich



strukturierten und verwandten Molekülen verursacht. So reagiert z. B. ein Antikörper, der gegen das Wachstumshormon (GH, Peptidkette mit 190 Aminosäuren) gebildet wurde, auch mit dem Placenta-Lactogen (PL, Peptidkette mit 191 Aminosäuren) oder ein Anti-T3-Serum auch mit dem Schilddrüsenhormon Thyroxin (T4) (Abb. 4).

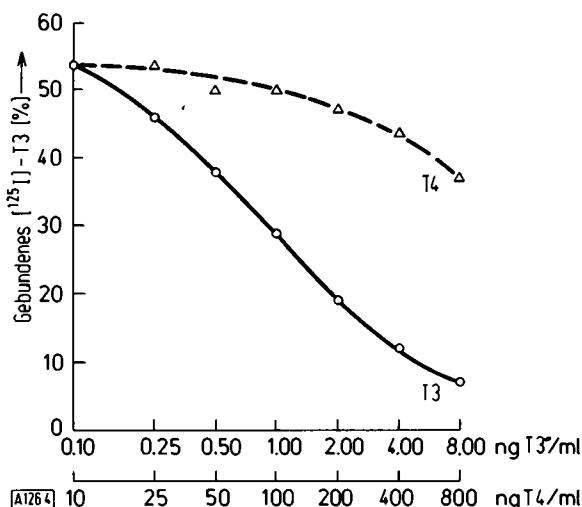


Abb. 4. Bestimmung der Spezifität eines Antikörpers. Kreuzreaktion eines Anti-T3-Serums gegen das strukturell verwandte T4.

Inwieweit die Kreuzreaktion vernachlässigt werden kann, muß von Fall zu Fall entschieden werden und hängt nicht zuletzt von der physiologischen Konzentration ab. Im gesunden Organismus liegen die Schilddrüsenhormone T3 und T4 im Verhältnis 1:50 bis 1:100 vor, d. h. eine Kreuzreaktion des Anti-T3-Serums mit T4 von nur 1 % würde die T3-Bestimmung bereits erheblich verfälschen. Nur ein Antikörper mit extrem kleiner Kreuzreaktion gegen T4 (<0.1 %), wie aus Abbildung 4 hervorgeht, liefert hier genaue T3-Werte.

Antiseren werden entweder unverdünnt oder mit Puffer verdünnt bei -20°C eingefroren aufbewahrt. Um ein wiederholtes Aufstauen und Einfrieren zu vermeiden, sollte das wertvolle Antiserum in so kleinen Portionen vereinzelt werden, daß die Menge für eine Probenserie gerade ausreicht. Besonders haltbar sind Antiseren, wenn sie in einer für die Durchführung des Assays geeigneten Vorverdünnung lyophilisiert vorliegen. Sie können dann bei 2 bis 8°C gelagert werden und sind lange Zeit verwendungsfähig.

5. Methoden zur Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Antigen

Nachdem sich im Inkubationsgemisch zwischen den Reaktionspartnern Ag, Ag* und Ak ein Gleichgewichtszustand einge-

stellt hat, d. h. nachdem der Antikörper größtenteils abgesättigt ist, muß festgestellt werden, wieviel Prozent der eingesetzten radioaktiven Verbindung komplexbunden sind. Hierzu wird der Antikörper-gebundene Anteil (B) vom freien, nichtgebundenen Antigen (F) abgetrennt (siehe Abschnitt 2). In der Methode und der Durchführung dieses Trennschrittes bestehen zwischen den bisher bekannten Radioimmunoassays die stärksten Unterschiede. Dies äußert sich nicht zuletzt in einer Vielzahl von Trennmethoden, von denen die wichtigsten nach ihrer Trennwirkung geordnet in Tabelle 3 zusammengefaßt sind.

Tabelle 3. Methoden und Materialien zur Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Antigen.

Trennwirkung	Methode/Material
Verteilung der Komponenten aufgrund unterschiedlicher Beweglichkeit und Molekülgröße	Chromatographie Elektrophorese Gelfiltration Ultrazentrifugation
Fällung des Ag-Ak-Komplexes	Ammoniumsulfat Natriumhydrogensulfat Zirconylphosphat Ethanol 2-Propanol Dioxan Polyethylenglykol (PEG)
Adsorption des Antigens	Aktivkohle (auch an Dextran oder Albumin gebunden) Cellulose Silicate Ionenaustauscher-Harze
Bindung des Antikörpers an eine feste Phase	Antikörper chemisch an polymeren Träger gebunden (ASP) Mit Antikörper adsorptiv beschichtete Teströhrchen („coated tubes“) oder Kugelchen
Immunologische Komplexbildung mit einem zweiten Antikörper	Doppelantikörper-Methode (DA) Zweiter Antikörper chemisch gebunden, z. B. an aktivierte Cellulose (Immunosorbens, DASP)

Zur Trennung werden hauptsächlich die Eigenschaften des Komplexes herangezogen, die jedoch weitgehend mit denen des Antikörpers übereinstimmen. So lassen sich die Antigen-Antikörper-Komplexe aufgrund der Molekülgröße oder der begrenzten Löslichkeit bei bestimmten pH-Werten, über die verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit, durch Denaturierung und Ausfällung mit Salzlösungen oder mit organischen Flüssigkeiten vom nichtgebundenen Antigen sehr einfach abtrennen. Eine Trennung ist jedoch auch über eine nachgeschaltete weitere immunologische Reaktion möglich. Hierbei reagiert ein zweiter Antikörper, der seinerseits gegen den ersten Antikörper und damit auch gegen den Antigen-Antikörper-Komplex gerichtet ist, unter Bildung eines sehr viel größeren, hochmolekularen Komplexes. Immer mehr an Bedeutung gewinnen schließlich auch Trennmethoden, bei denen der zweite Antikörper und zum Teil sogar bereits der erste Antikörper physikalisch oder chemisch an eine feste Phase gebunden ist.

Eine vergleichende Beurteilung der Trennverfahren ist schwierig. Im allgemeinen liegt es im Ermessen des Anwenders, welcher von nahezu gleichen Methoden er den Vorzug gibt.

Grundsätzlich müssen bei der Auswahl eines Verfahrens oder bei Austestung eines neuen Trennmittels unbedingt zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Das Trennmittel darf den Gleichgewichtszustand der abgelaufenen Reaktion nicht verändern, d. h. während der Trennung müssen die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe erhalten bleiben.

2. Die Antikörper-gebundenen Moleküle und die freien, nichtgebundenen Moleküle müssen quantitativ voneinander abgetrennt werden.

Um beide Forderungen zu erfüllen, müssen das Trennreagens und die Trennreaktion sehr spezifisch sein. Auch bei langerer Einwirkungs- oder Reaktionszeit und ebenso bei unterschiedlichen Temperaturen sollte die zum Stillstand gekommene immunologische Gleichgewichts- oder Sättigungsreaktion nicht beeinflusst werden. Am besten für die Trennung sind daher solche Reagentien geeignet, die mit der radioaktiv markierten Verbindung keine unspezifische Bindung eingehen und durch ein Fällungsmittel nicht mitgerissen werden. Außerdem sollten die beiden Phasen zuverlässig, möglichst schnell, einfach und ohne großen Arbeitsaufwand voneinander abtrennen sein. Neben den genannten Effekten spielen auch andere Faktoren, z. B. die Zusammensetzung und Konzentration des Puffers, der pH-Wert, Zusätze an Albumin sowie die Beschaffenheit des Serums eine wesentliche Rolle. Alle diese Einflüsse sind insbesondere im Hinblick auf die Menge des Trennreagens und auf die Reaktionszeit sorgfältig auszutesten.

Abbildung 5 zeigt schematisch die Trennwirkung einiger häufig angewandter Trennmethoden (siehe hierzu auch Tabelle 3). Neben bekannten Eiweißfällungsmitteln wie Ethanol, 2-Propanol, Ammoniumsulfatlösung und neuerdings Polyethylenglykol sind ebenfalls Adsorptionsmittel von Bedeutung, bei denen die Trennwirkung auf der Adsorption des freien Antigens beruht. Insbesondere sind aus dieser Gruppe Aktivkohle und an Träger gebundene Aktivkohle hervorzuheben, die wegen ihrer großen Adsorptionswirkung weite Verbreitung gefunden haben, aber oft auch den unerwünschten Effekt zeigen, das Antigen aus dem Komplex zu lösen und zu adsorbieren. Bei Verwendung von Aktivkohle-Suspensionen müssen daher meistens niedrige Temperaturen (4°C) und kurze, gleichlange Reaktionszeiten eingehalten werden, um diesen Effekt kleinzuhalten.

Bei der Doppelantikörper-Technik wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch Zugabe eines zweiten Antikörpers vollständig ausgefällt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieses Verfahren ist jedoch häufig kritisch, setzt Zentrifugieren mit hoher g-Zahl und außerdem einige Übung voraus. Sicherer und einfacher in der Handhabung ist dagegen eine Trennmethode, bei welcher der zweite Antikörper kovalent an eine feste Phase, z. B. an Cellulose, gebunden ist^[39]. Diese Immunosorbentien sind sehr stabil und lassen sich gegen alle Antikörper einer Tierspezies einsetzen. Sie werden dem Reaktionsansatz als Suspension zugefügt, liefern gut sichtbare Niederschläge und zeichnen sich durch extrem niedrige unspezifische Bindungen aus.

Einfach in der Durchführung ist auch die Trennmethode, bei welcher die Innenwand eines Polystyrol-Tröpfchen, kleine Kunststoff-Kugeln oder -Scheibchen mit dem Antikörper adsorptiv beschichtet sind. Hierbei gelingt die Abtrennung durch einfaches Ausgießen des Reaktionsgemisches. Zur Beschichtung werden jedoch, abgesehen von einigen Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Herstellung, größere Mengen und höhere Konzentrationen des häufig sehr wertvollen Antiserums benötigt. Schließlich sind auch einige Radioimmunoassays

says bekannt, bei denen bereits der erste Antikörper chemisch an aktivierte Polymere gebunden ist. Damit ist es nach Ablauf der Reaktion möglich, die freie von der gebundenen Substanz ohne jedes weitere Reagens direkt abzutrennen.

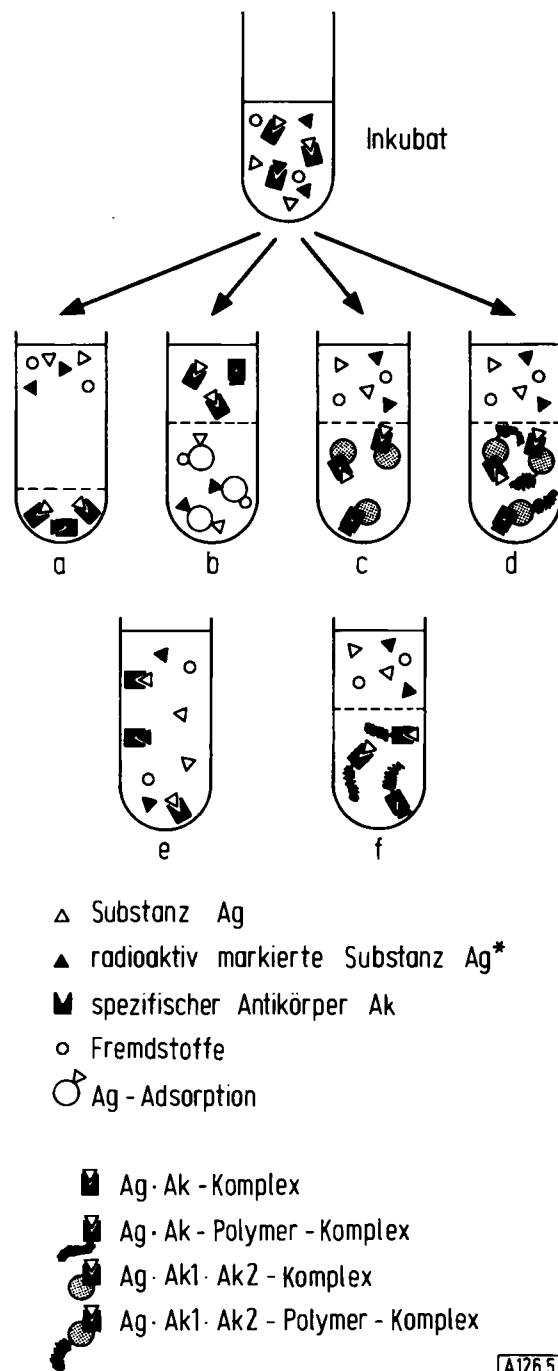


Abb. 5. Schematische Darstellung der Trennwirkung bei Radioimmunoassays zur Bestimmung von Antikörper-gebundener und freier Substanz. a) Eiweißfällung, b) Adsorptionsmittel, c) Doppelantikörper (DA), d) Immunosorbens (DASP), e) Antikörper adsorptiv an die Oberfläche gebunden, f) Antikörper chemisch an Polymer gebunden.

Bei allen Trennoperationen wird nach inniger Durchmischung des Trennreagens mit dem Inkubat und Beendigung der Reaktion, die Minuten bis Stunden dauern kann, zentrifugiert und die überstehende Lösung vom Rückstand abgetrennt. Im letzten Arbeitsschritt wird dann die Radioaktivität von einer der beiden Phasen – Sediment oder Überstand – gemessen.

6. Durchführung von Bestimmungen und Bewertung der Ergebnisse

Bisher ist es bei jeder radioimmunologischen Bestimmung erforderlich, mit den zu untersuchenden Proben auch eine Eichkurve aufzunehmen. Für die Richtigkeitskontrolle, z. B. bei einer Hormonbestimmung im Serum, ist es ferner notwendig, eine Probe mit bekanntem Gehalt mitzuführen.

Zur Durchführung eines Radioimmunoassays sind genau gleiche Volumina – im allgemeinen 100 µl – der Standardlösungen mit verschiedener Konzentration und der Proben in ca. 2 bis 4 ml fassende Reaktionsgefäße zu pipettieren. Die Reaktionsgefäße bestehen meistens aus Polystyrol oder Polypropylen und werden nur einmal verwendet. In jeden Reaktionsansatz werden dann exakt gleiche Mengen, z. B. 100 oder 200 µl, einer Lösung mit radioaktiv markierter Substanz sowie die verdünnte Antikörper-Lösung gegeben. Um eine Adsorption der Reaktionskomponenten auf der Innenfläche der Teströhrenchen und damit fehlerhafte Bestimmungen zu vermeiden, sind alle Lösungen gepuffert und enthalten als Trägerprotein häufig Albuminzusätze.

Im allgemeinen werden alle Testansätze doppelt, in einigen Fällen, insbesondere zur Aufnahme der Eichkurve, sogar dreifach angesetzt. Durch Einsatz von Dosierpumpen, Verdünnungsgeräten und automatisch arbeitenden Pipettierstationen lassen sich die meisten Arbeitsschritte rationalisieren. Für die routinemäßige Bestimmung größerer Probenserien sind in den letzten Jahren teil- und vollautomatisierte Analysensysteme entwickelt worden, die sich insbesondere für Radioimmunoassays mit gleicher Trenntechnik, z. B. der Doppelantikörper-Methode oder Gelfiltration, eignen^[40, 41].

Unter den günstigsten Reaktionsbedingungen, die bei der Ausarbeitung eines Assays ermittelt werden müssen, sind die Testansätze einige Stunden bis einige Tage zu inkubieren. Anschließend muß nach den beschriebenen Methoden die freie von der Antikörper-gebundenen Substanz abgetrennt und die Radioaktivität einer Phase im „γ-Bohrloch“ oder bei mit ³H-markierten Verbindungen im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen werden. Mit den Meßwerten läßt sich die Eichkurve konstruieren und aus dieser der Gehalt der Probe ablesen.

Je nach Art der Auftragung nehmen Eichkurven verschiedene Gestalt an (Gerade, Hyperbel, sigmoide Form). So können zur Auswertung u. a. die Anzahl der beim radioaktiven Zerfall gemessenen Impulse, Prozent absolute oder Prozent relative Bindung gegen die Konzentration oder den Logarithmus der Konzentration aufgetragen werden. Außer den manuellen Methoden sind auch mechanische Verfahren zur Auswertung geeignet, von denen sich die logit-log-Transformation, bei der die Kurve mehr oder weniger linearisiert wird, und insbesondere die Glättung durch Spline-Funktion gut bewährt haben^[42, 43]. Welche der vielen Methoden zur Auswertung herangezogen wird, hängt vom einzelnen Radioimmunoassay und nicht zuletzt von der Zahl der auszuwertenden Proben ab. Es ist jedoch notwendig, daß auch bei mechanisierter Auswertung stets die Eichkurve gezeichnet und ihr Verlauf kritisch beurteilt wird.

Um die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse und damit letztlich die Qualität eines Radioimmunoassays sicherzustellen, müssen einige charakteristische Größen bekannt sein. Hierzu gehören neben Spezifität und Empfindlichkeit vor allem die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit eines Assays.

Wie bereits vorher erwähnt, wird die Spezifität eines Radioimmunoassays im wesentlichen durch den Antikörper bestimmt. Sie kann durch Kreuzreaktionen mit ähnlich aufgebaute Substanzen sowie mit Bruchstücken davon, aber auch durch den Trennschritt beeinträchtigt werden. Auch Serumfaktoren, pH-Wert, Zusätze wie Albumin, Puffer, Heparin oder Konservierungsmittel können die Spezifität verringern.

Ein weiteres Merkmal zur Beurteilung eines Radioimmunoassays ist seine Empfindlichkeit. Darunter versteht man die kleinste, noch signifikant nachweisbare Konzentration einer Substanz. Die Empfindlichkeit ist abhängig von der Spezifität des Antikörpers und wird um so höher, je stärker der Tracer radioaktiv markiert ist oder je weniger hiervon dem Testansatz zugesetzt wird. Die Empfindlichkeit kann als Spezialfall der Genauigkeit bei der Konzentration Null angesehen werden. Praktisch läßt sich die untere Nachweisgrenze z. B. dadurch ermitteln, daß vom Anfangsbindungswert die 3s-Abweichung seiner Streuung abgezogen und die zugehörige Konzentration aus der Eichkurve abgelesen wird. Gelegentlich kann die Empfindlichkeit von Assays, bei denen die immunologische Reaktion irreversibel ist oder im Nichtgleichgewicht gemessen wird, durch verzögerte Zugabe der radioaktiv markierten Substanz („kalte“ Vorinkubation) gesteigert werden^[44].

Die Genauigkeit, mit der eine Bestimmung durchgeführt werden kann, hängt von drei verschiedenen großen Fehlern ab. Neben den experimentellen Fehlern, die durch mehrere Pipettierschritte sowie Störungen der Reaktion (z. B. unterschiedlich große Wandadsorption) hervorgerufen werden, treten auch Fehler beim Messen der Radioaktivität (u. a. statistischer Fehler des radioaktiven Zerfalls) und bei der Auswertung der einzelnen Proben auf. Aufgrund dieser verschiedenartigen Fehler ist es verständlich, daß die Genauigkeit nicht in jedem Kurvenabschnitt gleich gut sein kann. Durch Mehrfachbestimmungen und lange Zählzeit ist es jedoch möglich, die zufälligen Fehler zu verringern und damit ein genauereres Ergebnis zu erzielen.

Ein weiteres Qualitätsmerkmal ist die Reproduzierbarkeit. Aus Doppel- oder Mehrfachbestimmungen von Proben eines Assays und der dabei gefundenen Abweichung vom jeweiligen Mittelwert wird die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit berechnet. Sie liegt normalerweise unter 5 Prozent. Unter Inter-Assay-Reproduzierbarkeit wird der Variationskoeffizient verstanden, der sich aus der Bestimmung derselben Probe in mehreren verschiedenen Assayansätzen unter Verwendung verschiedener Reagenzien ergibt. Bei genauen und gut reproduzierbaren Radioimmunoassays liegt dieser Wert unter 10 Prozent^[45].

Besonders schwierig ist die Beurteilung, ob der radioimmunologisch gefundene Wert richtig ist, d. h. möglichst identisch ist mit dem unbekannten wahren Wert. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß sich mit Radioimmunoassays nur die Menge der immunologisch wirksamen Substanz bestimmen läßt. Diese ist nicht zwangsläufig mit der Menge der biologisch aktiven Substanz identisch. Zum Vergleich von normalen und abnormalen Werten aus verschiedenen Laboratorien ist es unerlässlich, den eigenen Standard mit einem internationalen Referenzstandard einzustellen^[46].

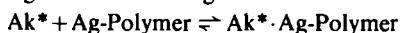
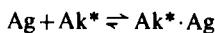
Für die Richtigkeitskontrolle eignen sich außerdem Testserien, die in mehreren Verdünnungen bestimmt werden, sowie Wiederfindungsmessungen („recoveries“), bei denen einer Probe bekannte Mengen der Substanz zugesetzt werden. Die Bestimmung der Probe mit und ohne zugesetzte Substanz gibt

Aufschluß darüber, ob Probeneinflüsse das Ergebnis verfälschen.

7. Radioassay und Immunoradiometrischer Assay

Eng verwandt mit dem Radioimmunoassay sind die Radioassays sowie Varianten des Immunoradiometrischen Assays (IRMA)^[4,7]. Bei Radioassays wird anstelle eines Antikörpers ein im Organismus bereits vorhandenes Träger- oder Transportprotein als Bindungspartner benutzt. Von großer praktischer Bedeutung sind zwei Radioassays für die Schilddrüsendiagnostik, bei denen das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) das Bindungsreagens ist.

Nach der Sekretion aus der Schilddrüse werden die beiden Hormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) (siehe Abschnitt 4) nahezu vollständig von Serumproteinen, insbesondere von TBG gebunden. Ein indirektes Maß für die Schilddrüsenaktivität ist daher die TBG-Bindungskapazität, die sich mit dem radioaktiven Indikator [¹²⁵I]-T3 ermitteln läßt. Hierzu muß nach Absättigung der freien Bindungsstellen ebenso wie beim Radioimmunoassay das gebundene [¹²⁵I]-T3 vom freien abgetrennt und gemessen werden. Die Bestimmung von T4 basiert auf der Tatsache, daß dieses entsprechend seiner aktuellen Konzentration radioaktives [¹²⁵I]-T4 aus einem markierten [¹²⁵I]-T4-TBG-Komplex verdrängen kann. Nach Einstellung des Gleichgewichts wird auch hier das freigesetzte [¹²⁵I]-T4 vom Komplex z. B. mit einem Ionenaustauscher abgetrennt und die Radioaktivität gemessen.



Im Gegensatz zum Radioimmunoassay wird beim immunoradiometrischen Assay anstelle des Antigens der Antikörper radioaktiv markiert und im Überschuß dem Testansatz zugesetzt. Bedingt durch diesen Überschuß sind am Ende der Reaktion alle Antigen-Moleküle vom Antikörper gebunden, so daß eine Trennung zwischen Antigen-Antikörper-Komplex und überschüssigem Antikörper notwendig ist. Neben einer Reihe von Vorteilen, z. B. der größeren Stabilität des iodierten Antikörpers im Vergleich zum markierten Antigen, der erreichbaren hohen spezifischen Radioaktivität (ohne Verlust an Immunreakтивität) und der hohen Empfindlichkeit bei Assays für hochmolekulare Verbindungen hat diese Methode auch einige Nachteile. So ist wegen der geringen Größenunterschiede zwischen Antikörper und Antigen-Antikörper-Komplex die Trennung oft schwierig. Sie wird deshalb mit einem Immunsorbens durchgeführt, bei dem das Antigen an einen polymeren Träger gebunden ist. Auch zur Iodierung müssen die Antikörper zunächst an dieses Immunsorbens gebunden und anschließend davon wieder abgelöst werden. Meist treten hierbei Verluste auf, so daß man relativ große Mengen des wertvollen Antiserums benötigt.

Kann das Antigen zwei Antikörper-Moleküle binden, so läßt sich auch die Sandwich-Technik (Zwei-Seiten-Assay) durchführen. Das zu bestimmende Antigen wird hierbei zuerst mit einem trägerfixierten Antikörper umgesetzt, der gebildete Komplex gewaschen und dann in einer zweiten Reaktion mit dem radioaktiv markierten Antikörper inkubiert. Dabei bildet sich ein markierter Antikörper*-Antigen-Antikörper-Polymer-Komplex.

Auf dieser Sandwich-Technik basiert die Austestung von Humanseren auf Hepatitis-B-Virus-Antigen (HB·Ag), eine der am häufigsten durchgeführten immunoradiometrischen Bestimmungen.

8. Zusammenfassung

Radioimmunologische Bestimmungsmethoden haben in den letzten Jahren zu einem wesentlich besseren Verständnis der endokrinologischen Physiologie beigetragen. Sowohl in der Diagnostik als auch bei der Überwachung der Therapie sind diese Verfahren hinsichtlich der Empfindlichkeit, Spezifität, generellen Anwendbarkeit und einfachen Handhabung den meisten anderen Analysenverfahren überlegen. Außer in der Biochemie und klinischen Chemie wird der Radioimmunoassay in der Mikrobiologie, Toxikologie und Virologie sowie zur Unterstützung des Metabolismus von Arzneimitteln routinemäßig eingesetzt. Es ist ebenfalls abzusehen, daß diese Methoden auch in der Krebsvorsorge sowie für die Verlaufskontrolle bei Tumorerkrankungen nach therapeutischen Maßnahmen Bedeutung erlangen werden.

Eingegangen am 26. März 1976 [A 126]

- [1] W. D. Odell u. W. H. Daughaday: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Lippincott, Philadelphia 1971, S. 1 ff.
- [2] R. S. Yalow u. S. A. Berson, J. Clin. Invest. 38, 1996 (1959).
- [3] R. S. Yalow u. S. A. Berson, J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960).
- [4] R. P. Ekins, Clin. Chim. Acta 5, 453 (1960).
- [5] K. E. Kirkham u. W. H. Hunter: Radioimmunoassay Methods. Churchill Livingstone, London 1971.
- [6] J. A. Loraine u. E. T. Bell: Hormone Assays. Churchill Livingstone, London 1971.
- [7] D. S. Skelly, L. P. Brown u. P. K. Besch, Clin. Chem. 19, 146 (1973).
- [8] P. H. Sönksen, Br. Med. Bull. 30, 1 (1974).
- [9] Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Vol. I and II. IAEA, Wien 1974.
- [10] B. M. Jaffe u. H. R. Behrman: Methods of Hormone Radioimmunoassay. Academic Press, New York 1974.
- [11] H. Breuer, D. Hamel u. H. L. Kruskemper: Methoden der Hormonbestimmung. Thieme, Stuttgart 1975.
- [12] G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949).
- [13] H. Feldman u. D. Rodbard in [1], S. 158.
- [14] H. J. G. Hollmanns u. R. M. Bertina, Clin. Chem. 21, 1769 (1975).
- [15] R. P. Ekins, G. B. Newman u. J. L. H. O'Riordan in: Radioisotope in Medicine. In Vitro Studies. U.S.A.E.C., Oak Ridge 1968, S. 59.
- [16] W. M. Hunter u. F. C. Greenwood, Nature 194, 495 (1962).
- [17] F. C. Greenwood, W. M. Hunter u. J. S. Glover, Biochem. J. 89, 114 (1963).
- [18] A. S. McFarlane, Nature 182, 53 (1958).
- [19] A. N. Glazer u. F. Sanger, Biochem. J. 90, 92 (1964).
- [20] W. R. Butt, J. Endocrinol. 55, 453 (1972).
- [21] M. R. Redshaw u. S. S. Lynch, J. Endocrinol. 60, 527 (1974).
- [22] U. Rosa, G. A. Scassellati, F. Pennisi, N. Riccioni, P. Giagnoni u. R. Giordani, Biochim. Biophys. Acta 84, 519 (1964).
- [23] J. I. Thorell u. B. G. Johansson, Biochim. Biophys. Acta 251, 363 (1971).
- [24] J. Pommier, L. Sokoloff u. J. Nunez, Eur. J. Biochem. 38, 497 (1973).
- [25] B. Lambert u. C. Jacquemin, Biochimie 56, 1191 (1974).
- [26] A. E. Bolton u. W. M. Hunter, Biochem. J. 133, 529 (1973).
- [27] P. A. Halban u. R. E. Offord, Biochem. J. 151, 219 (1975).
- [28] G. C. Oliver, B. M. Parker, D. L. Brasfield u. C. W. Parker, J. Clin. Invest. 47, 1035 (1968).
- [29] P. W. Nars u. W. M. Hunter, J. Endocrinol. 57, XL vii (1973).
- [30] V. E. M. Chambers, R. Tudor u. A. L. M. Riley, J. Steroid Biochem. 5, 298 (1974).
- [31] G. M. Edelman, Angew. Chem. 85, 1083 (1973).
- [32] R. R. Porter, Angew. Chem. 85, 1097 (1973).
- [33] J. H. Humphrey u. R. G. White: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme, Stuttgart 1972.
- [34] V. Likhitte u. A. Schon in C. A. Williams u. M. W. Chase: Methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press, New York 1967, S. 150.
- [35] E. Haber, L. B. Page u. G. A. Jacoby, Biochemistry 4, 693 (1965).

- [36] E. H. D. Cameron, S. G. Hillier u. K. Griffiths: Steroid Immunoassay. Fifth Tenovus Workshop, Cardiff 1975. Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff 1975, S. 61.
- [37] W. D. Odell, G. A. Abraham, W. R. Skowsky, M. A. Hescox u. D. A. Fisher in [1], S. 57.
- [38] E. Nieschlag: Immunisation with Hormones in Reproduction Research. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1975.
- [39] L. Wide, Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 142, 207 (1969).
- [40] I. Marschner, F. Erhardt, J. Henner u. P. C. Scriba, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 481 (1975).
- [41] G. Ertengshausen, S. I. Shapiro, G. Green u. G. Zborowski, Clin. Chem. 21, 1305 (1975).
- [42] D. Rodbard in [1], S. 204ff.
- [43] I. Marschner, F. Erhardt u. P. C. Scriba in: Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Clinical Medicine and Research, Istanbul 1973. IAEA-SM-177/71, 1973, Vol. I, S. 111.
- [44] D. Rodbard, H. J. Ruder, J. Vaitukaitis u. H. S. Jacobs, J. Clin. Endocrinol. 33, 343 (1971).
- [45] D. Rodbard, Clin. Chem. 20, 1255 (1974).
- [46] WHO Expert Committee on Biological Standardization, Twenty-sixth Report. Technical Report Series Nr. 565. World Health Organization, Genf 1975.
- [47] J. S. Woodhead, G. M. Addison u. C. N. Hales in [8], S. 44ff.

ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vordringliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

weniger gehindert geltende äquatoriale Position einnimmt^[2]. Wir haben versucht, die ¹³C-NMR-Tief temperaturspektroskopie auch auf die Inversion am Stickstoff anzuwenden; der Austausch zwischen äquatorialen und axialen N—H-Bindungen erwies sich jedoch bei Piperidin als zu schnell. Dagegen gelingt es, durch Einführung der C6—C7-Brücke die Inversion so zu verlangsamen, daß in den ¹³C-NMR-Spektren der resultierenden Tropanverbindungen (1) bei tiefen Temperaturen zwei Konformere mit getrennten Signalpaaren für alle C-Atome außer C3 sichtbar werden. e-(1) ist das Konformer mit äquatorialem, a-(1) dasjenige mit axialem N-Substituenten (bezogen auf das Piperidinsystem).

Die aus den Intensitätsverhältnissen berechnete Grundzustandsenergiedifferenz (Tabelle 1) für (1a) stimmt mit dem Wert aus einer ¹H-NMR-spektroskopischen Bestimmung (0.90 kcal/mol) überein, welche hier durch Aufspaltung des CH₃-Signals bei -100°C möglich ist. Während demnach die Methylgruppe eine starke konformativ Präferenz aufweist, finden wir durch die ¹³C-NMR-Messung des Nortropans (1e) unter den gleichen Bedingungen eine nahezu gleiche Population von e-(1e) und a-(1e). Damit ist für eine bestimmte Molekülgeometrie die fast gleiche Wirkungsgröße von einsa-

Konformationen und N-Inversionsbarrieren in Tropanverbindungen^[1]

Von Hans-Jörg Schneider und Lothar Sturm^[*]

Im Mittelpunkt der Kontroverse um die Konformation des Piperidins steht die Frage, ob das freie Elektronenpaar oder ein Substituent wie Wasserstoff am Stickstoff die als

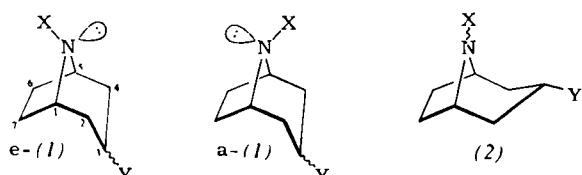


Tabelle 1. ¹³C-NMR-Verschiebungen, Grundzustandsenergiedifferenzen (ΔG^0) und Inversionsbarrieren (ΔG^* , ΔH^* , ΔS^*) bei Tropankonformeren (1). Die Verschiebungen [ppm] sind auf TMS bezogen. Ein Sternchen bedeutet vertauschbare Zuordnungen; die Energieparameter (in kcal/mol bzw. cal K⁻¹ mol⁻¹) sind Bestwerte aus Messungen von jeweils vier Signalpaaren [drei bei (1e)], die Fehler sind die aus der Regressionsanalyse erhaltenen mittleren Abweichungen (ohne systematische Fehler). ΔG^* wurde durch vollständige Linienformanalysen über einen Bereich von etwa 50° ermittelt.

X	Y	C1,5		C2,4		C6,7		$N\text{-CH}_3$	C3 (1)	$\Delta G^0 \cong \Delta H^0$ [e]	ΔG_{133}	ΔH^*	ΔS^*
		e-(1)	a-(1)	e-(1)	a-(1)	e-(1)	a-(1)						
a	CH ₃ , H [a]	61.85	57.04	32.35	22.15	25.53	28.77	42.10	32.71	16.37	0.91	9.17 ± 0.03	13.2 ± 1.1 + 18 ± 5
b	CH ₃ , endo-OH [b]	60.74	56.36	39.50	29.87*	25.34	28.54*	41.13	32.64	63.41	1.20	11.05 ± 0.09	14.3 ± 0.6 + 14 ± 3
c	CH ₃ , exo-OH [b]	61.85	58.16	41.58	32.61	26.25	29.17	40.80	32.82	63.08	0.71	11.3 ± 0.3	
d	CH ₃ , endo-CH ₃ [a]	61.26	56.65	38.27	28.07*	25.60	28.85*	41.64	33.00	22.48 [c]	0.62	9.26 ± 0.02	12.3 ± 0.5 + 14 ± 3
d	CH ₃ , endo-CH ₃ [b]	61.59	57.18	37.87	28.41*	25.53	28.68*	40.99	32.70	22.41 [d]	0.99	10.73 ± 0.04	14.7 ± 0.4 + 17 ± 2
e	H, H [a]	55.25	53.43	31.59	33.93	30.29	27.95	—	—	17.55	-0.08	7.79 [f] ± 0.02	6.3 ± 0.3 - 9 ± 2

[a] 6% in CFCl₃; -100°C [-133°C bei (1e)]. [b] 6% in CFCl₃/CH₃OH (2:1), -70°C. [c] (C3)-CH₃: 25.40. [d] (C3)-CH₃: 25.53. [e] $\Delta G^0 = \Delta G_{\text{e},-1} - \Delta G_{\text{a},-1}$; $\Delta S^0 = 0 \pm 2$. [f] Bei -100°C gemessen.

[*] Prof. Dr. H.-J. Schneider und Dipl.-Chem. L. Sturm
Fachbereich 14 der Universität, Fachrichtung Organische Chemie
6600 Saarbrücken 11

mem Elektronenpaar und Wasserstoff experimentell nachweisbar geworden.