

# Lumineszenzmarker – mehr als nur eine Alternative zu Radioisotopen?

Andreas Mayer\* und Stephan Neuenhofer\*

Chemische, chromatographische oder spektrometrische Verfahren sind für den Nachweis von Molekülen im Nano- und Subnanogramm-Bereich meist ungeeignet, da ihre Empfindlichkeit zu gering ist. Der 1959 von Yalow und Berson entwickelte Radioimmunoassay (RIA) verband erstmals die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen. Dadurch war es möglich, geringste Spuren von Substanzen in Gegenwart eines Überschusses an teilweise sehr ähnlichen Fremdstoffen ohne vorherige Anreicherung quantitativ nachzuweisen. Immunoas-

says entwickelten sich zum wohl wertvollsten analytischen Instrument der In-vitro-Diagnostik und werden heute routinemäßig zum Nachweis körpereigener und körperfremder Stoffe (z.B. Hormone, tumorassoziierte Proteine, Bakterien, Viren, Toxine und Arzneimittel) eingesetzt. Die vielfältigen Nachteile der Radioaktivität wie erforderliche Umgangsgenehmigungen, Entsorgungskosten, Vorkehrungen zur Vermeidung gesundheitlicher Risiken, kurze Haltbarkeit und begrenzte Sensitivität führten schon früh zur Suche nach anderen, nichtradioaktiven Markierungsmöglichkeiten. Begünstigt durch die

Entwicklung der Lichtmeßtechnik und der kommerziellen Verfügbarkeit von hochempfindlichen Meßgeräten verdrängen heute Enzyme, Fluorophore und Luminophore als Marker zunehmend die radioaktiven Isotope. Einige der neuen Lumineszenzmarker ermöglichen aber nicht nur einen Ersatz von Radioisotopen, sondern auch einen Vorstoß in bisher unerreichte Empfindlichkeitsregionen. Der folgende Artikel soll eine Übersicht über die Möglichkeiten der Lumineszenzmarkierung und ihre Anwendungen vorwiegend im Bereich der Immunoassays geben.

## 1. Einleitung

Der Nachweis von Substanzen mit Reagentien, die mit der zu bestimmenden Substanz (dem Analyten) eine Bindung eingehen, ist im wesentlichen an drei Voraussetzungen geknüpft, wenn eine untere Nachweisgrenze im pico- bis femtomolaren Bereich erzielt und strukturell ähnliche Stoffe nicht mitgemessen werden sollen. Erstens muß das Nachweisreagens eine hohe Affinität zum Analyten aufweisen, damit auch ein in Spuren vorliegender Analyt erfaßt wird. Zweitens sollte die Bindung des Nachweisreagens an den Analyten hochspezifisch sein, denn nur so ist gewährleistet, daß analytähnliche Substanzen keine höhere Analytkonzentration vortäuschen oder eine vorherige zeit- und arbeitsintensive Aufreinigung erforderlich machen. Drittens muß sich das Reaktionsprodukt aus Analyt und Nachweisreagens empfindlich nachweisen lassen, d. h. ein Signal aussenden, das mit geeigneten Meßinstrumenten exakt quantifizierbar ist.

Die Forderungen an die Affinität und Spezifität werden in idealer Weise von Antikörpern erfüllt. Hierbei handelt es sich um körpereigene Glycoproteine, denen im Organismus höherer Lebewesen innerhalb des Immunsystems eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung körperfremder Schadstoffe (Bakterien, Viren, Toxine etc.) zukommt. Ihre Affinitätskonstanten liegen in der Regel zwischen  $10^{10}$  und  $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup>. Sie sind in der Lage, geringste Strukturunterschiede auf molekularer Ebene zu erkennen, denn nur so können sie zuverlässig zwischen körperfremden und körpereigenen Stoffen unterscheiden; eine Verwechslung hätte für den Wirtsorganismus fatale Folgen. Bei den ersten Methoden, Nachweisreagentien zu markieren und sie damit exakt quantifizierbar zu machen, wurden radioaktive Isotope verwendet, von denen insbesondere das <sup>125</sup>I-Isotop auch heute noch oftmals eingesetzt wird. Die Vorteile dieses  $\gamma$ -Strahlers sind seine geringe Größe (Minimierung sterischer Störeinflüsse), sein „hartes“ und demzufolge wenig störanfälliges Signal und seine untere Nachweisgrenze von etwa 10 amol (1 amol =  $10^{-18}$  mol).

Die Kombination Antikörper/radioaktive Markierung führte Ende der fünfziger Jahre zu den Radioimmunoassays<sup>[1]</sup>, die sich bis heute zum wichtigsten Instrument der medizinischen In-vitro-Diagnostik entwickelt haben<sup>[2]</sup>. Mit ihnen werden routinemäßig alle nur denkbaren körpereigenen und körperfremden Substanzen in einer dem Patienten zuvor entnommenen Körperflüssigkeit (z.B. Blut oder Serum) quantitativ erfaßt. Für die

[\*] Dr. A. Mayer  
Hoechst AG, Zentralforschung G 830  
D-65926 Frankfurt am Main  
Telefax: Int. + 69/331320

Dr. S. Neuenhofer<sup>[+]</sup>  
Hoechst AG, Radiochemisches Laboratorium  
D-65926 Frankfurt am Main

[+] Neue Adresse: Behringwerke AG, Neue Systeme und Gerinnungsdiagnostika  
D-35001 Marburg  
Telefax: Int. + 6421/39-4680

routinemäßige Anwendbarkeit ist dabei von wesentlicher Bedeutung, daß trotz der komplexen Zusammensetzung des Untersuchungsmediums Serum aufgrund der hohen Spezifität des Nachweisreagens Antikörper in der Regel keine weiteren Aufreinigungsschritte erforderlich sind.

Den Vorteilen einer radioaktiven Markierung stehen aber auch eine Reihe von Nachteilen gegenüber: Der Umgang mit radioaktiven Materialien ist reglementiert (behördliche Umgangsgenehmigung) und somit eingeschränkt. Die Halbwertszeit des  $^{125}\text{I}$ -Isotops ist mit 60 Tagen zu kurz, um längere Haltbarkeiten der markierten Reagentien zu gewährleisten. Die während der Messung aufgrund der natürlichen Halbwertszeit begrenzte Signalabgabe verhindert extreme Nachweismöglichkeiten, wie sie in einigen Bereichen gefordert werden.

Um diesen Nachteilen zu entgehen, begann bereits frühzeitig die Suche nach Methoden der nichtradioaktiven Markierung (nonisotopic methods) in der Immundiagnostik<sup>[3]</sup>. Anfang der siebziger Jahre wurde die Verwendung von Enzymen als Marker beschrieben<sup>[4]</sup>, und inzwischen steht eine Vielzahl stabiler Enzymmarker zur Verfügung. In Kombination mit chromogenen oder luminogenen Substraten wird die Detektion des Signals auf Lichtmessungen als Absorption oder Emission zurückgeführt. Emittiertes Licht anstelle von radioaktiver Strahlung wird auch bei der luminogenen Direktmarkierung zur Quantifizierung der Analytkonzentration herangezogen. Da die Zahl der Photonen aus Proben lumineszent-markierter Moleküle höher sein kann als die Anzahl der Strahlungsquanten bei Verwendung von Radioisotopen<sup>[5]</sup>, wurden zunächst der Fluoreszenzdetektion gute Chancen für eine breite Anwendung bei der nichtradioaktiven Markierung eingeräumt<sup>[5, 6]</sup>. So gelang beispielsweise der Nachweis eines einzelnen fluoreszent-markierten Proteinmoleküls<sup>[7, 8]</sup>. Dennoch konnten die ersten Fluoreszenzmarker wegen gewisser Nachteile die radioaktiven Marker nicht nennenswert verdrängen. Dies gelang erst mit weiterentwickelten Lumineszenzmarkern und luminogenen Enzymsubstraten<sup>[9–15]</sup>. Lumineszenzmarker ermöglichen aber nicht nur den Verzicht auf den Umgang mit Radioaktivität, sondern durch gesteigerte

Sensitivität häufig präzisere diagnostische Aussagen, und sie erschließen neue Anwendungsgebiete.

Noch 1985 dominierte auf dem deutschen Immunoassay-Markt in den umsatzstärksten Indikationsbereichen Endokrinologie (Schilddrüse, Fertilität) und Tumordiagnostik der Radioimmunoassay (RIA) mit einem Anteil von 83% (Abb. 1). Die Tendenz zum Einsatz von Methoden mit nicht-isotopenmarkierten Verbindungen zeigt sich in den Zahlen für 1991. Der Anteil der RIAs ist deutlich auf 55% gesunken<sup>[16]</sup>. Der Marktanteil der nichtradioaktiven Methoden setzt sich aus Lumineszenztechniken (z.B. Fluoreszenzimmunoassay (FIA), Chemilumineszenzimmunoassay (CIA)), Enzymimmunoassay (EIA) und anderen Methoden wie der Nephelometrie zusammen. Für die Zukunft ist eine weitere Zunahme der Methoden, die ohne isotope markierte Verbindungen arbeiten, zu erwarten.

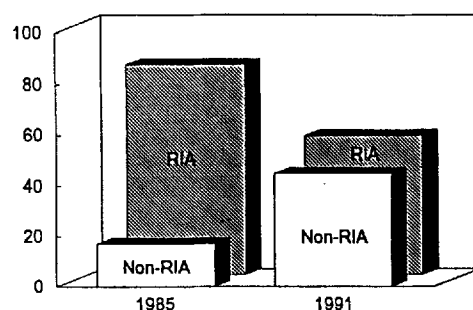


Abb. 1. Marktanteil radioaktiver (RIA) und nichtradioaktiver Immunoassays (Non-RIA).

Der vorliegende Beitrag befaßt sich mit Lumineszenzmarkern im weiteren Sinne und ihrer Anwendung. Nach einer Definition des Begriffs Marker in Abschnitt 2 werden in Abschnitt 3 die Lumineszenzprozesse in einem vereinfachten Termschema dargestellt. Abschnitt 4 beschreibt Enzymmarker in Kombination mit chromogenen und luminogenen Substraten. In Abschnitt 5 wird auf Marker zur lumineszenten Direktmarkierung einge-

*Andreas Mayer, geboren 1960 in Aschaffenburg, studierte Chemie an der Universität Würzburg und promovierte bei H. Quast über Dicyansemibullvalene. 1989 trat er in das Hauptlabor der Hoechst AG ein und verstärkte das Team zur Entwicklung von Chemilumineszenzmarkern für diagnostische Anwendungen. Der Schwerpunkt seiner bisherigen Arbeiten liegt in der Synthese funktioneller Farbstoffe für Anwendungen im Bereich der Diagnostik und der Informationstechnik. Er erhielt den Preis der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg für sein Vordiplom und Diplom sowie den Preis der Unterfränkischen Gedenkjahrstiftung für Wissenschaft für seine Dissertation.*



A. Mayer



S. Neuenhofer

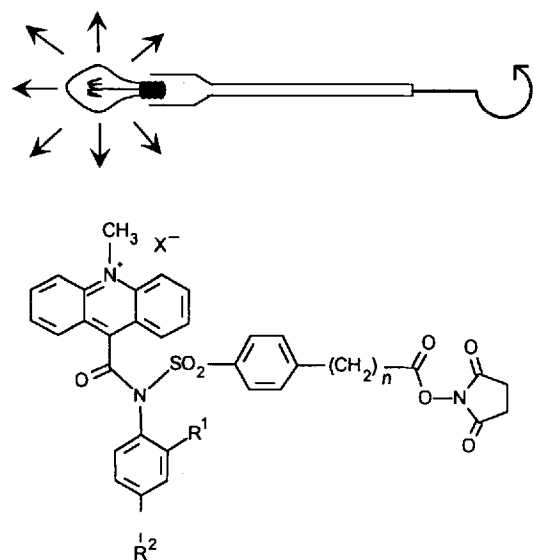
*Stephan Neuenhofer, geboren 1955 in Mayen/Eifel, studierte Chemie und Pharmazie in Bonn. Nach dem Diplom in Chemie (1982) promovierte er 1985 in der Biochemie bei K. Sandhoff über Ganglioside (Lysoganglioside – Synthese, Nachweis in pathologischem Hirngewebe und Anwendungen in biochemischen Studien). Die Approbation als Apotheker erhielt er 1987. Seit 1987 ist er als Mitarbeiter bei der Hoechst AG in der Forschung und Entwicklung tätig, seit 1993 bei den Behringwerken. Sein Arbeitsgebiet umfaßt luminogene Markierungssubstanzen, Immunoassays und diagnostische Systeme sowie deren Überführung in die Produktion. Für seine Dissertation erhielt er den Edmund-ter-Meer-Preis.*

gangen, unter besonderer Berücksichtigung der zugrunde liegenden Mechanismen bei der Chemilumineszenzmarkierung. Abschnitt 6 präsentiert einige Anwendungsbeispiele aus dem medizinischen Bereich; weitere wichtige Anwendungsgebiete sind die Umwelt- und Lebensmittelanalytik<sup>[17g–h, 18k–p]</sup>. Zum Thema Lumineszenzmarker, nichtradioaktive Immunoassays und Gensonden sei neben der bereits erwähnten Literatur noch auf einige neuere Bücher<sup>[17]</sup> und Übersichtsartikel<sup>[18]</sup> hingewiesen.

## 2. Der Marker

### 2.1. Definition und allgemeine Struktur

Ein Marker, auch Label (engl.: to label = markieren) genannt, ist ein zur Signalausendung befähigtes Molekül, das zur Markierung von Proteinen und anderen Molekülen verwendet wird. Es enthält neben dem signalgebenden Molekülteil (Marker im engeren Sinne) noch eine Reaktivgruppe (Ankergruppe), die die kovalente Bindung an das zu markierende Molekül ermöglicht. Zwischen diesen beiden Gruppen befindet sich meistens noch ein Abstandshalter (Spacer), der eine unerwünschte sterische Wechselwirkung zwischen signalgebendem Molekülteil und markierter Substanz verhindern oder zumindest erschweren soll. Dadurch soll eine Beeinflussung der immunologischen Reaktion möglichst ausgeschlossen werden. Die schematische Struktur eines Markers sowie zur Verdeutlichung die chemische Formel eines Chemilumineszenzmarkers aus der



Schema 1. Schematische Darstellung eines Lumineszenzmarkers (oben) mit den drei Baugruppen signalgebende Einheit, Spacer und Ankergruppe sowie ein konkretes Beispiel aus der Klasse der *N*-Methylacridinium-9-(*N*-sulfonyl)carbonsäureamide (unten).

Klasse der *N*-Methylacridinium-9-(*N*-sulfonyl)carbonsäureamide ist in Schema 1 gezeigt. Eine so markierte Substanz wird als Tracer (engl.: to trace = aufspüren) bezeichnet.

### 2.2. Lumineszenzmarker

#### 2.2.1. Begriffsdefinitionen

Die Bezeichnung Lumineszenz<sup>[19]</sup> dient als Oberbegriff für die meisten Lichtemissionsprozesse wie Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Elektrolumineszenz usw.; Ausnahmen sind z.B. Glühemission und kohärente Streuprozesse. Häufig wird in der Praxis nur zwischen Lumineszenz, Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden, wobei die Lumineszenz nur als Oberbegriff für Chemi- und Biolumineszenz dient.

#### 2.2.2. Voraussetzungen für die Eignung als Lumineszenzmarker

Die Eignung einer Verbindung als Lumineszenzmarker ist an einige Voraussetzungen geknüpft<sup>[20]</sup>:

- Die Kupplung an die zu analysierende Verbindung muß einfach und schonend möglich sein. Für diesen Zweck steht eine große Palette von Reaktivgruppen zur Verfügung.
- Die Lumineszenzeigenschaften des Markers sollten sich nach der Kupplung nicht signifikant verändern.
- Die Eigenschaften der markierten Substanz dürfen durch die Markierung nicht wesentlich verändert werden. Zu berücksichtigen ist das gesamte Eigenschaftsspektrum, z.B. physikalisch-chemische Eigenschaften wie Löslichkeit und immunologische Eigenschaften. Für die Durchführung eines Immunoassays muß besonders die Immunreaktivität ausreichend hoch bleiben.

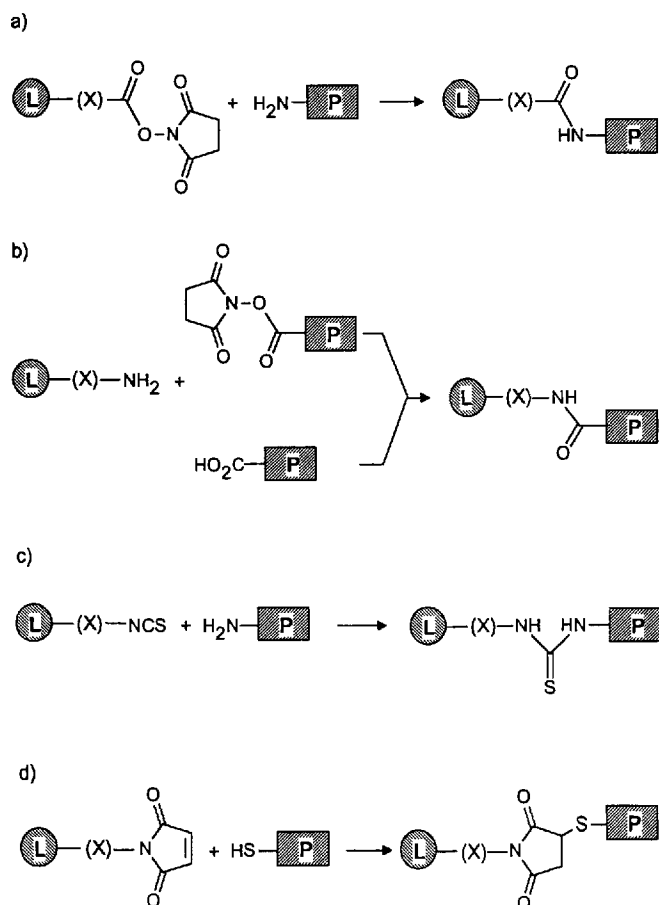
Natürlich gelten diese allgemeinen Anforderungen mit Ausnahme des zweiten Punkts auch für andere Marker. Inwieweit diese Punkte erfüllt sind, hängt stark von den Einzelheiten des jeweiligen Systems ab und ist von Fall zu Fall unterschiedlich. Beispielsweise werden kleine Moleküle (Molekulargewicht < 2 kD) durch die Markierung mit einem Marker vergleichbarer Größe stärker verändert als große Proteine. Proteine sind jedoch häufig empfindlicher gegenüber den Markierungsbedingungen, da beispielsweise keine Synthesen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden können. Meist lassen sich dennoch durch chemische Modifizierung des signalgebenden Molekülteils und/oder des Spacers und durch Wahl der optimalen Reaktivgruppe Bedingungen finden, die geeignete Konjugate liefern.

#### 2.2.3. Der signalgebende Molekülteil

Als signalgebende Komponenten kommen grundsätzlich alle lumineszenten Verbindungen in Frage, die eine ausreichende Quantenausbeute in wässrigen Lösungen aufweisen, unter den Anwendungsbedingungen genügend stabil und synthetisch so funktionalisierbar sind, daß sowohl eine Reaktivgruppe als auch eigenschaftsverändernde Substituenten, beispielsweise zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit oder zur Veränderung der Emissionscharakteristika wie Wellenlänge und Abklingzeit, gebunden werden können. Die Variabilität ist Voraussetzung für eine möglichst breite Einsetzbarkeit der Marker. Die wichtigsten fluoreszenten und chemilumineszenten Marker werden in Abschnitt 5 näher behandelt<sup>[7a, 21]</sup>.

## 2.2.4. Die Reaktivgruppe

Wie bereits erwähnt, dient die Reaktiv- oder Ankergruppe zur Bindung des Markers an die zu markierende Substanz. Da häufig eine Verknüpfung mit Biomolekülen wie Proteinen, Antikörpern, Hormonen erforderlich ist, bietet sich die Bildung einer Säureamidbindung zwischen aktivierten Carboxygruppen und Aminogruppen an. Aus der Peptidchemie sind viele Verfahren bekannt, die in wässrigem Medium unter schonenden Bedingungen ablaufen<sup>[22, 23]</sup>. Praktische Bedeutung für Markierungsprozesse haben jedoch nur wenige Reaktionen erlangt. Einige der wichtigsten Kupplungsreaktionen sind in Schema 2 zusammengefaßt. Bevorzugt haben viele Lumineszenzmarker *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-ester als Reaktivgruppe (Schema 2a)<sup>[21, 25]</sup>. Diese Reaktivgruppe weist mehrere Vorteile auf<sup>[22, 24]</sup>: Sie kann einfach aus Carbonsäurederivaten hergestellt werden<sup>[26]</sup>; entsprechende Marker können, z.B. mit HPLC, hochgereinigt werden, wodurch Markierungen definiert und reproduzierbar durchgeführt werden können. Unter Feuchtigkeitsausschluß ist eine Lagerung der Marker längere Zeit ohne Rückgang der Kupplungsaktivität möglich<sup>[24, 27, 28]</sup>. Die Kupplungsreaktion des Succinimids mit Aminogruppen verläuft unter milden Bedingungen (Raumtemperatur) in wässrigen Lösungen; Alkohole reagieren dagegen bei diesen Bedingungen nicht mit NHS-Estern<sup>[27]</sup>. Als Variante dieser Reaktion kann auch der Marker eine primäre Aminofunktion als Reaktivgruppe zur Kupplung mit einer NHS-Esterfunktion am Protein enthalten (Sche-

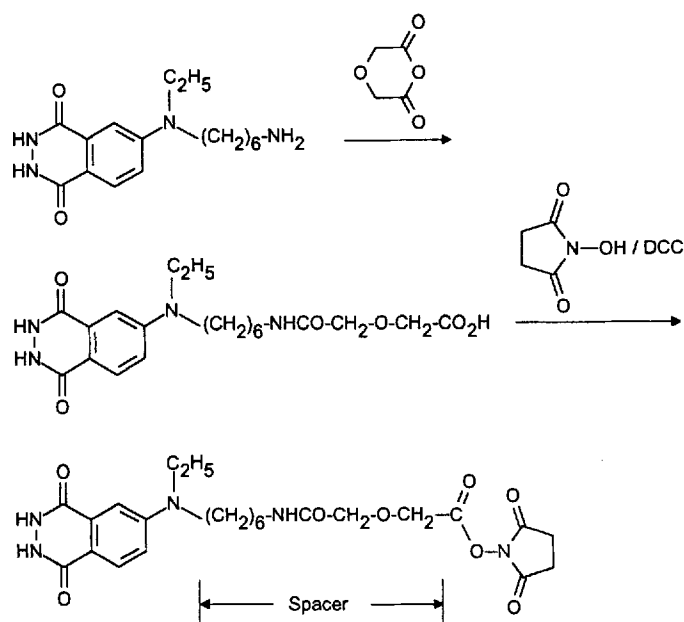


Schema 2. Wichtige Markierungsprozesse; L = Label (Marker), P = Protein, X = Spacer.

ma 2b). Die Umsetzung kann auch mit freien Carboxygruppen, z.B. von Proteinen, nach dem Carbodiimid- oder nach dem „Gemischten-Anhydrid“-Verfahren erfolgen<sup>[22, 23, 25]</sup>. Kürzlich wurden auch Acridiniumestermarker mit Imidoester-Reaktivgruppen beschrieben<sup>[29]</sup>. Besonders bei Fluoreszenzmarkern wird neben den schon erwähnten Methoden häufig die Isothiocyanatgruppe zur Kupplung mit Aminofunktionen von Proteinen unter Bildung von Thioharnstoffen verwendet (Schema 2c)<sup>[30]</sup>. Die in Schema 2d dargestellte Methode zur Kupplung durch Thioladdition an Maleinimidgruppen, die aus der Peptidchemie ebenfalls hinreichend bekannt ist<sup>[24]</sup>, wird auch für lumineszente Marker verwendet<sup>[21]</sup>, spielt aber besonders für die Verknüpfung von Enzymmarkern mit Proteinen eine große Rolle<sup>[31]</sup>.

## 2.2.5. Der Spacer

Meistens werden einfache kurze Alkylketten oder Reste, die aromatische und aliphatische Gruppen enthalten (vgl. Schema 1), als Spacer verwendet. Ein Beispiel der Umwandlung einer Aminogruppe eines Isoluminolmarkers zu einem NHS-Ester ist in Schema 3 dargestellt<sup>[32]</sup>. Durch Spacer des gezeigten

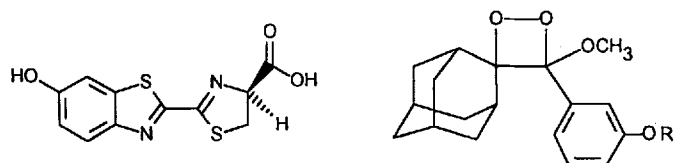


Schema 3. Möglichkeit zum Aufbau eines Spacers mit einer NHS-Reaktivgruppe, verdeutlicht am Beispiel eines Isoluminolmarkers; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid.

Typs, die als hydrophile Einheiten mehrere Säureamidgruppen und Etherbrücken aufweisen, kann auch die Wasserlöslichkeit von Immunokonjugaten positiv beeinflusst werden<sup>[33]</sup>.

## 2.3. Enzymmarker

Wegen ihrer praktischen Bedeutung werden in dieser Arbeit auch Chromogene und Luminogene behandelt, die als Substrate für Enzymmarker Verwendung finden (Abschnitt 4). Die Umsetzung von Luciferinderivaten (natürlich vorkommende biolu-



Schema 4. Firefly-Luciferin (links) und ein stabiles Dioxetanderivat (rechts).

mineszente Verbindungen) mit ihrer jeweiligen Luciferase (Enzym, das die biolumineszente Reaktion katalysiert) führen zu Lumineszenzreaktionen mit den höchsten bekannten Quantenausbeuten. Den Spitzenreiter bildet das Luciferin (Schema 4)/Luciferase-System des nordamerikanischen Leuchtkäfers (Firefly; *Photinus Pyralis*) mit Quantenausbeuten von ca.  $0.9 \text{ Einstein mol}^{-1}$  [11, 15]. Seit Ende der achtziger Jahre können wichtige biogene Luciferasen auf gentechnologischem Wege gewonnen werden und kommen daher auch für routinemäßige Anwendungen in Betracht [15]. Hohe Quantenausbeuten liefert auch die Kombination von Enzymmarkern mit stabilen Dioxetanen (Schema 4) als luminogenen Substraten. Als Enzym wird vor allem alkalische Phosphatase und  $\beta$ -Galactosidase verwendet (der Rest R ist dementsprechend Phosphat oder  $\beta$ -Galactose). Solche enzymatischen Systeme werden in Abschnitt 4 näher behandelt.

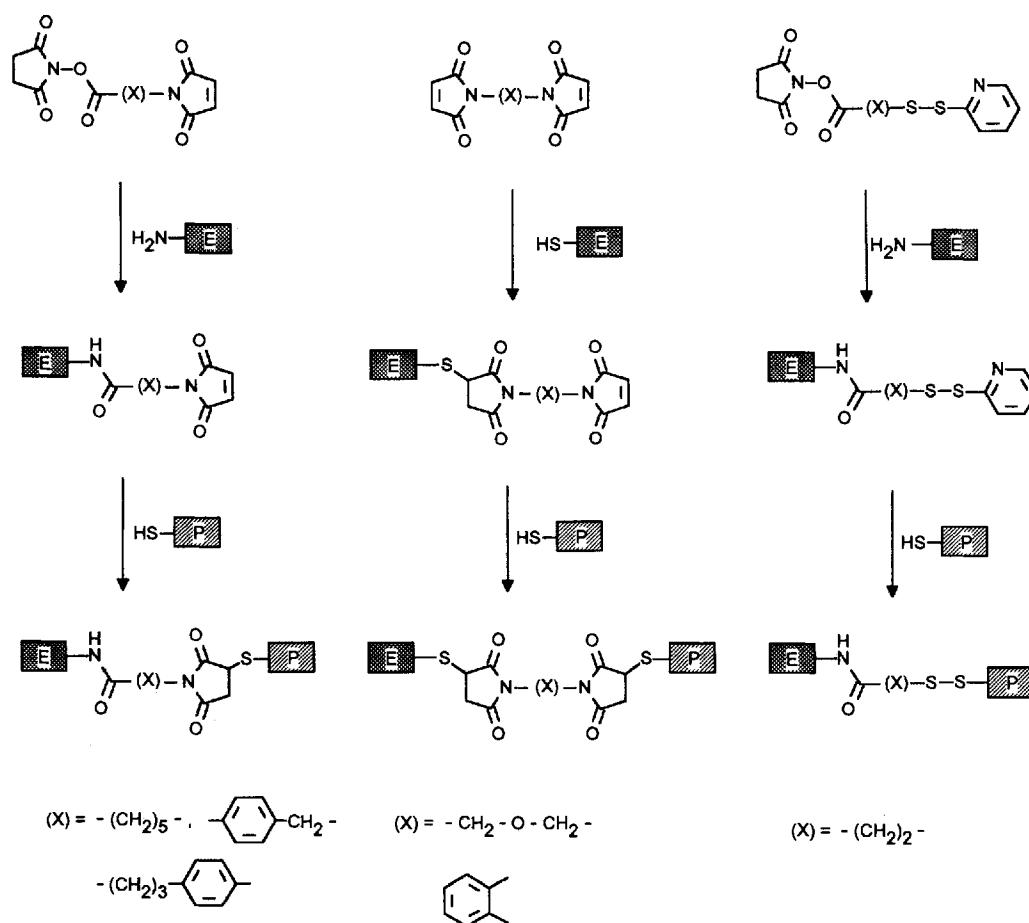
Da Enzymmarker in aller Regel nicht als stabile universell verwendbare Marker erhältlich sind, sollen hier einige Methoden zur Enzymmarkierung angesprochen werden. Die Kupplung von Enzymen an Antikörper oder Antikörperfragmente

erfolgt häufig mit difunktionellen Kupplungsreagentien. Einige Beispiele sind in Schema 5 gezeigt. Die Reaktionen sind den bereits unter Abschnitt 2.2.4 erwähnten Methoden analog. Einzelheiten können der weiterführenden Literatur entnommen werden [24, 31]. Auf Kupplungsmöglichkeiten unter Nutzung der starken nichtkovalenten Bindungsfähigkeit des Biotin/(Strept)-Avidin-Systems kann hier nur hingewiesen werden [34].

### 3. Elektromagnetische Strahlung als Meßsignal

#### 3.1. Vergleich von Licht und radioaktiver Strahlung

Ein großer Nachteil bei der Nutzung radioaktiver Isotope besteht in der Notwendigkeit, umfangreiche Schutzvorkehrungen vor der hochenergetischen  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Strahlung (bis zu  $10^{18} \text{ kJ mol}^{-1}$ ) zu treffen. Da Lumineszenzmarker als Meßsignal unschädliches Licht – meist im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums ( $E \approx 200 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) – nutzen, entfallen jegliche Maßnahmen zum Schutz vor energiereicher Strahlung. Desweiteren ist die mit Radioisotopen erreichbare spezifische Aktivität durch radiolytische Zersetzung des markierten Materials nach oben hin limitiert. Die Markierung mit dem Isotop  $^{125}\text{I}$  ist üblicherweise auf ein Atom pro Molekül markierter Substanz begrenzt [21, 35]. Zusätzlich schränkt die Halbwertszeit des Radioisotops, die beispielsweise für das häufig eingesetzte  $^{125}\text{I}$ -Isotop nur 59.7 Tage beträgt, sowohl die Lagerfähigkeit des markierten Materials als auch die Nachweis-



Schema 5. Difunktionelle Kupplungsreagentien für die Markierung mit Enzymen; E = Enzym, P = Protein (z.B. Antikörper), X = Spacer.

grenze ein. Außerdem emittieren Radioisotope ständig Strahlung, auch dann, wenn kein Meßsignal benötigt wird. Für die tatsächliche Messung von meist einer Minute kann daher nur ein winziger Bruchteil des prinzipiell verfügbaren Signals genutzt werden. Als Vorteil ist jedoch jederzeit eine Wiederholung einer Messung möglich. Lumineszenzmarker, die eine wesentlich höhere Lebensdauer aufweisen, senden nach Auslösung der Lichtreaktion das gesamte verfügbare Licht meist in sehr kurzer Zeit aus. Zusätzlich kann die Aktivität des Tracers meist durch Mehrfachmarkierungen weiter erhöht werden, wodurch ein sehr empfindlicher Nachweis möglich wird. Wiederholungsmessungen der gleichen Probe können jedoch, zumindest bei der Verwendung von Chemilumineszenzmarkern mit schneller Lichtemission, nicht durchgeführt werden.

### 3.2. Photophysikalische Prozesse

In dem vereinfachten Termschema in Abbildung 2 sind die wichtigsten photophysikalischen Vorgänge mit ihren typischen Lebensdauern  $\tau$  [s] zusammengefaßt<sup>[36]</sup>. Die dargestellten strahl-

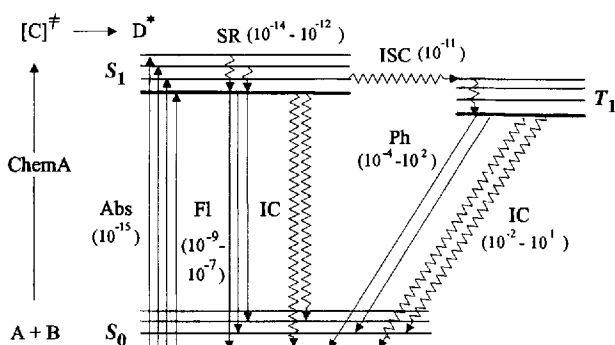


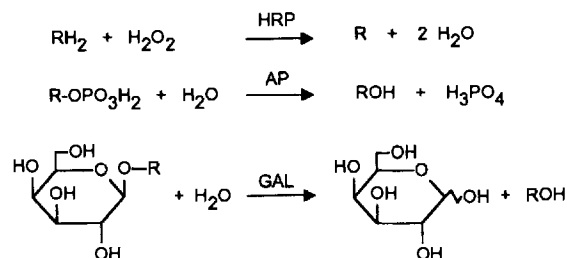
Abb. 2. Vereinfachtes Termschema mit einigen photophysikalischen Prozessen. Lebensdauer  $\tau$  [s] ist in Klammern angegeben; Abs = Absorption, Fl = Fluoreszenz, Ph = Phosphoreszenz, SR = Schwingungsrelaxation, ChemA = Chemische Anregung, IC = internal conversion, ISC = intersystem crossing; durchgezogene Linien entsprechen strahlenden Übergängen, Wellenlinien strahlungslosen Übergängen.

henden Übergänge können zur Erzeugung von Detektionssignalen genutzt werden. Da speziell bei den langlebigen Phosphoreszenzprozessen in Lösung strahlungslose Desaktivierung zu geringer Effizienz führt, spielt Phosphoreszenzdetektion nur eine untergeordnete Rolle für Lumineszenzmarker. Auf Absorptionsmessungen wird letztendlich die Quantifizierung in Enzymsystemen mit chromogenen Substraten zurückgeführt (vgl. Abschnitt 4). Photoanregung und Auswertung der Fluoreszenz sind die Basis der Fluoreszenzmarkierung (vgl. Abschnitt 5.1). Für Chemilumineszenzdetektion ist die Erzeugung von angeregten Singulettzuständen ( $S_1$ ) durch chemische Reaktionen erforderlich. Die Energiedifferenz zwischen  $S_1$ - und  $S_0$ -Zustand liegt für Emissionen im sichtbaren Bereich zwischen 167 (rotes Licht) und 293 kJ mol<sup>-1</sup> (violett Licht)<sup>[11, 37]</sup>. Zur effizienten Nutzung der genannten Prinzipien sind natürlich jeweils auch ausreichende Quantenausbeuten erforderlich. Näheres ist jeweils bei Behandlung der einzelnen Luminophore (siehe Abschnitt 5) angegeben.

### 4. Enzymmarker

Die Verwendung von Enzymen als Marker war die erste Alternative zur radioaktiven Markierung<sup>[38]</sup>. Sie ist von der Grundidee her recht vielversprechend, da ja nicht wie sonst signalgebende Komponenten eingeführt werden, sondern Moleküle, von denen jedes eine Vielzahl von speziellen chemischen Reaktionen zur Erzeugung detektierbarer Spezies katalysiert. Auf diese Weise ist bereits von vornherein ein effektiver Signalverstärkungsmechanismus eingebaut.

Die drei wichtigsten Enzyme, die als Marker Verwendung finden, sind die Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase, HRP), die alkalische Phosphatase (AP) und die  $\beta$ -D-Galactosidase (GAL). Schema 6 faßt die von ihnen katalysier-

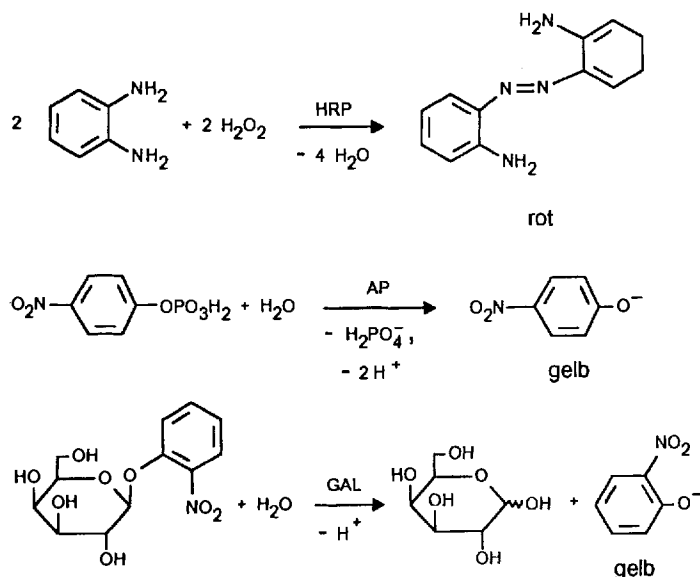


Schema 6. Allgemeine Darstellung der von den drei wichtigsten Enzymmarkern HRP, AP und GAL katalysierten Reaktionen.

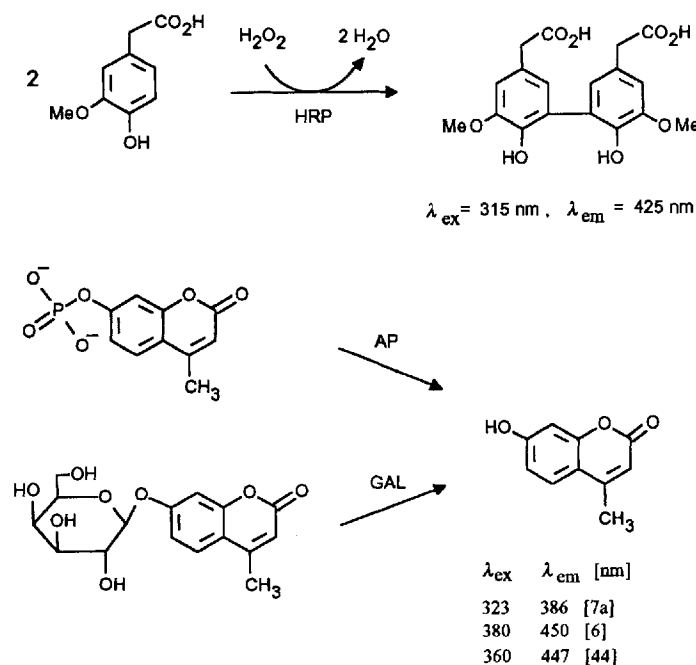
ten Reaktionen zusammen. Die HRP ist mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kD das kleinste Enzym unter den dreien (AP ca. 100 kD, GAL ca. 500 kD) und sorgt demzufolge auch am wenigsten für sterische Probleme. Sie ist jedoch empfindlich gegenüber häufig eingesetzten antimikrobiellen Agentien (Azid, Thiomersal). Die AP hat die höchste katalytische Aktivität, wird jedoch durch Phosphat (Produkthemmung) und Ethylen-diamintetraessigsäure (edta; Entzug der für die katalytische Aktivität notwendigen  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen) negativ beeinflusst.

Die ältesten Enzymsubstrate, die in der Analytik eingesetzt werden, sind die Chromogene. Sie sind farblos und werden erst durch eine enzymatische Reaktion in farbige Produkte umgewandelt, die photometrisch quantifiziert werden können; Schema 7 zeigt Beispiele. Die wichtigsten fluorogenen Substrate der Peroxidasen weisen das gemeinsame Strukturelement<sup>[39, 40, 43]</sup>  $p\text{-HO-C}_6\text{H}_4\text{-C-}$  auf, während 4-Methylumbelliferyl-Verbindungen im Falle der AP und GAL bevorzugt werden<sup>[41-43]</sup> (Schema 8).

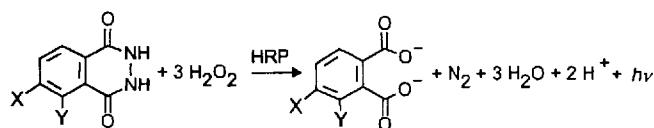
Die chemilumineszenten Arylhydrazide Luminol und Isoluminol<sup>[45]</sup> (Schema 9) sind bekannte Substrate der HRP. Die Quantenausbeute der Oxidation dieser Arylhydrazide, d. h. der Prozentsatz der Ausgangsmoleküle, die letzten Endes ein Photon emittierendes Endprodukt liefern, liegt bei ca. 1%. Die Lichtintensität kann durch sogenannte Enhancer, beispielsweise 6-Hydroxybenzothiazolderivate oder *para*-substituierte Phenole, im Vergleich zur nichtverstärkten Reaktion drastisch erhöht werden (bis zum Faktor 1000!)<sup>[46]</sup>. Der Mechanismus, der dieser Verstärkung (engl.: enhanced chemiluminescence) zugrunde liegt, ist noch weitgehend ungeklärt. Als am wahrscheinlichsten gilt, daß einer oder mehrere Oxidationsschritte zur Erzeugung



Schema 7. Beispiele chromogener Substrate. Neben *o*-Phenyldiamin werden auch häufig 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet. Anstelle von 4-Nitrophenylphosphat werden auch öfters 1-Naphthylphosphat und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat eingesetzt. Neben 2- oder 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid kommen auch häufig Chlorphenolrot- $\beta$ -D-galactopyranosid und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid zum Einsatz.



Schema 8. Beispiele fluorogener Substrate.  $\lambda_{\text{ex}}$  = Anregungswellenlänge,  $\lambda_{\text{em}}$  = Emissionswellenlänge.

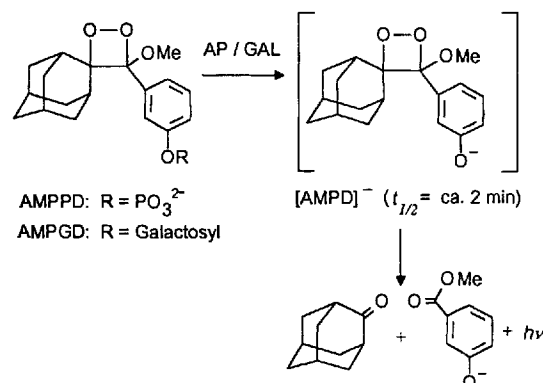


Luminol: X = H, Y = NH<sub>2</sub>  
Isoluminol: X = NH<sub>2</sub>, Y = H

Schema 9. HRP-katalysierte Oxidation von Luminol und Isoluminol.

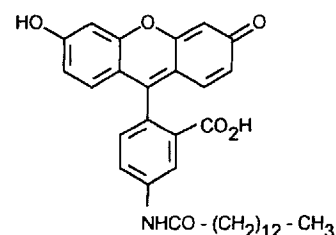
von Luminolradikalen in dem komplexen Reaktionsablauf der enzymatischen Oxidation beschleunigt werden<sup>[46k]</sup>.

Dioxytanderivate sind die wichtigsten chemiluminogenen Substrate der AP und der GAL<sup>[47]</sup> (Schema 10). Auch bei den



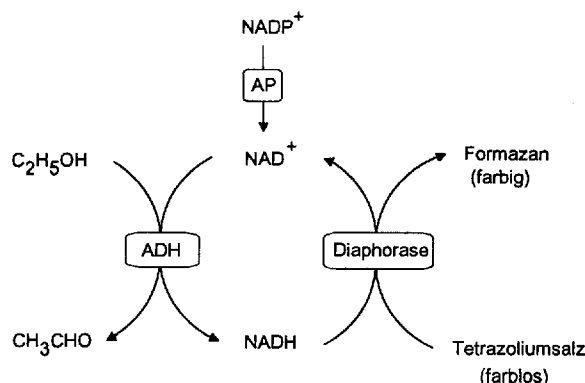
Schema 10. Adamantylmethoxy(phosphoryloxyphenyl)dioxetan (AMPPD) und Adamantylmethoxy(galactopyranosyloxyphenyl)dioxetan (AMPGD) als Enzymsubstrate.

von AP und GAL katalysierten Reaktionen kann die Chemilumineszenz verstärkt werden. Besonders effektiv ist hierbei der Einsatz fluoreszierender Tenside (Schema 11). Zusammen mit normalen Tensidmolekülen (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid) bilden sie Micellen, in die das Substrat unmittelbar nach der enzymatischen Abspaltung des Phosphat- oder Galactosidrests hineindiffundiert. Der Zerfall des Dioxetanderivats in der Micelle führt zu einem effektiven Energietransfer auf die Fluorophorgruppen der Tensidmoleküle. Daraus resultiert eine beträchtliche Erhöhung der Quantenausbeute<sup>[47j]</sup> ( $\phi_{\text{CL}} = \text{ca. } 0.005$  Einstein pro Mol; zum Vergleich:  $\phi_{\text{CL}}$  in tensidfreier wässriger Pufferlösung beträgt ca.  $10^{-5}$  Einstein pro Mol). Laut Literaturangaben lassen sich mit den Dioxetanderivaten noch 600 Enzymmoleküle nachweisen<sup>[47e]</sup>.



Schema 11. Beispiel eines fluoreszierenden Tensids, 5-(*N*-Tetradecanoylamino)fluorescein).

Bei den bisher beschriebenen Detektionssystemen entsteht die signalgebende Komponente unmittelbar in der vom Enzymmarker katalysierten Reaktion. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Detektionssystemen, bei denen die signalgebende Komponente erst in einer nachgeschalteten Reaktion gebildet wird. Durch derartige Kupplungsreaktionen lassen sich, analog enzymkatalysierter Reaktionen, häufig beträchtliche Empfindlichkeitssteigerungen erzielen. Im Nachweissystem von Self<sup>[48a]</sup> katalysiert der Enzymmarker AP die Bildung von NAD<sup>+</sup> aus NADP<sup>+</sup>. Das gebildete NAD<sup>+</sup> aktiviert seinerseits katalytisch einen spezifischen Redoxcyclus, aus dem eine farbige Substanz hervorgeht (Schema 12). Als untere Nachweisgrenze für den Enzymmarker AP werden mit dieser Methode 0.01 amol<sup>[48b]</sup> und in einer neueren Publikation<sup>[48c]</sup> sogar 0.6 zmol (1 zeptomol =  $10^{-21}$  mol) angegeben; Werte, die im Falle einer direkten Farbstoffbildung undenkbar wären.



Schema 12. Beispiel einer Signalverstärkung: Das von der AP gebildete  $\text{NAD}^+$  wirkt seinerseits als Katalysator in einem nachgeschalteten Redoxcyclus. ADH = Alkoholdehydrogenase.

Ein anderes Verfahren zum hochempfindlichen Nachweis von AP wird von Christopoulos und Diamandis beschrieben<sup>[49]</sup>. Der von der AP katalysierte Schritt besteht in der Bildung von 5-Fluorsalicylsäure aus 5-Fluorsalicylphosphat. In einer anschließenden Reaktion bildet 5-Fluorsalicylsäure mit  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen und edta einen stark fluoreszierenden ternären Komplex, dessen Konzentration über zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung (vgl. Abschnitt 5.1.4) quantifiziert wird. Als untere Nachweisgrenze werden 0,6 amol AP pro 50  $\mu\text{L}$  Probenvolumen genannt. Im Detektionssystem von A. Baret et al.<sup>[50]</sup> wird als Enzymmarker Xanthinoxidase eingesetzt. In Gegenwart von Sauerstoff oxidiert sie Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure unter Bildung von Superoxid-Radikalanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). In Folgereaktionen entstehen weitere reaktive Sauerstoffverbindungen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ), die zur chemilumineszenten Luminoloxidation geeignet sind.

## 5. Lumineszenzmarker

### 5.1. Fluoreszenzmarkierung

Fluoreszenzmarker finden bereits seit langer Zeit vielfältige Anwendungen in der Biologie, Biomedizin und Analytik<sup>[30]</sup>. Erwähnenswerte Einsatzgebiete sind die Fluoreszenzdetektion in der HPLC nach Vorsäulen- oder Nachsäulenderivatisierung<sup>[51]</sup>, die Flußzytometrie<sup>[52]</sup>, die Fluoreszenzmikroskopie<sup>[53]</sup>, die DNA-Analytik<sup>[54]</sup> und die Anwendung als Marker in Immunoassays, auf die hier näher eingegangen wird. Meist erfolgt die Markierung unter Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Markern – wie in Abschnitt 2 allgemein beschrieben – und der Zielsubstanz. Für manche Zwecke können auch Fluoreszenzfarbstoffe ohne Reaktivgruppe verwendet werden, die nur assoziativ gebunden werden und sich dadurch, beispielsweise in Zellen, anreichern. Eine Übersicht von Fluorochromen, die in der Medizin und der Biologie eingesetzt werden, sowie von ihren spektralen Daten findet man in Lit.<sup>[36]</sup>

#### 5.1.1. Spezielle Anforderungen an Fluoreszenzmarker für Immunoassays

Neben den bereits genannten allgemeinen Anforderungen an Lumineszenzmarker sollten Fluoreszenzmarker für die Anwen-

dung in Immunoassays noch einige zusätzliche Bedingungen erfüllen, die unmittelbar aus dem Test- und Meßprinzip ableitbar sind. Grundsätzlich sind Fluoreszenzmessungen zwar mit höchster Empfindlichkeit möglich<sup>[6, 7, 55]</sup>, in der Praxis ist die Sensitivität bei Fluoreszenzimmunoassays (FIAs) aber durch Untergrundfluoreszenz (background fluorescence), Lichtstreuung und Löscheffekte drastisch eingeschränkt. Das Untergrundsignal resultiert hauptsächlich aus der Eigenfluoreszenz von Serumbestandteilen<sup>[6, 7]</sup>, die einen breiten Wellenlängenbereich überdeckt. Serumproteine werden beispielsweise bei 280 nm angeregt und emittieren von 320–350 nm. Andere Bestandteile wie NADH und Bilirubin werden zwischen 330 und 360 nm bzw. 450–465 nm angeregt und fluoreszieren im Bereich von 430–470 nm bzw. bei 515 nm<sup>[7c]</sup>. Die Nachweisgrenze für Immunkongulate eines Fluoreszenzmarkers mit Rinderserumalbumin oder Immunglobulin G (IgG) ist im Schnitt in Serum 10- bis 50mal höher als in Pufferlösung<sup>[6a]</sup>. Viele Festphasenmaterialien wie Polystyrol tragen ebenfalls zum Leerwert bei. Die Lichtstreuung ist besonders bei Lösungen, die Proteine oder kolloidal gelöste Substanzen enthalten, ein Problem. Neben der Rayleigh- und Tyndall-Streuung, die die gleiche Frequenz wie der Anregungsstrahl aufweist, tritt auch Raman-Streuung mit einer um meist 50 nm verschobenen Frequenz auf. Die Fluoreszenzlöschung kann oft Folge geringster Änderungen in der Umgebung des Fluorophors sein (pH-Wert, Polarität, Oxidationsstufe, Nähe von Schweratomen oder anderen absorbierenden Gruppen). Wird z.B. ein Protein mehrfach markiert, können sich zwei Fluorophore so nahe kommen, daß es zur Selbstlöschung der Signale kommt, wenn das Absorptions- und Emissionsspektrum überlappt.

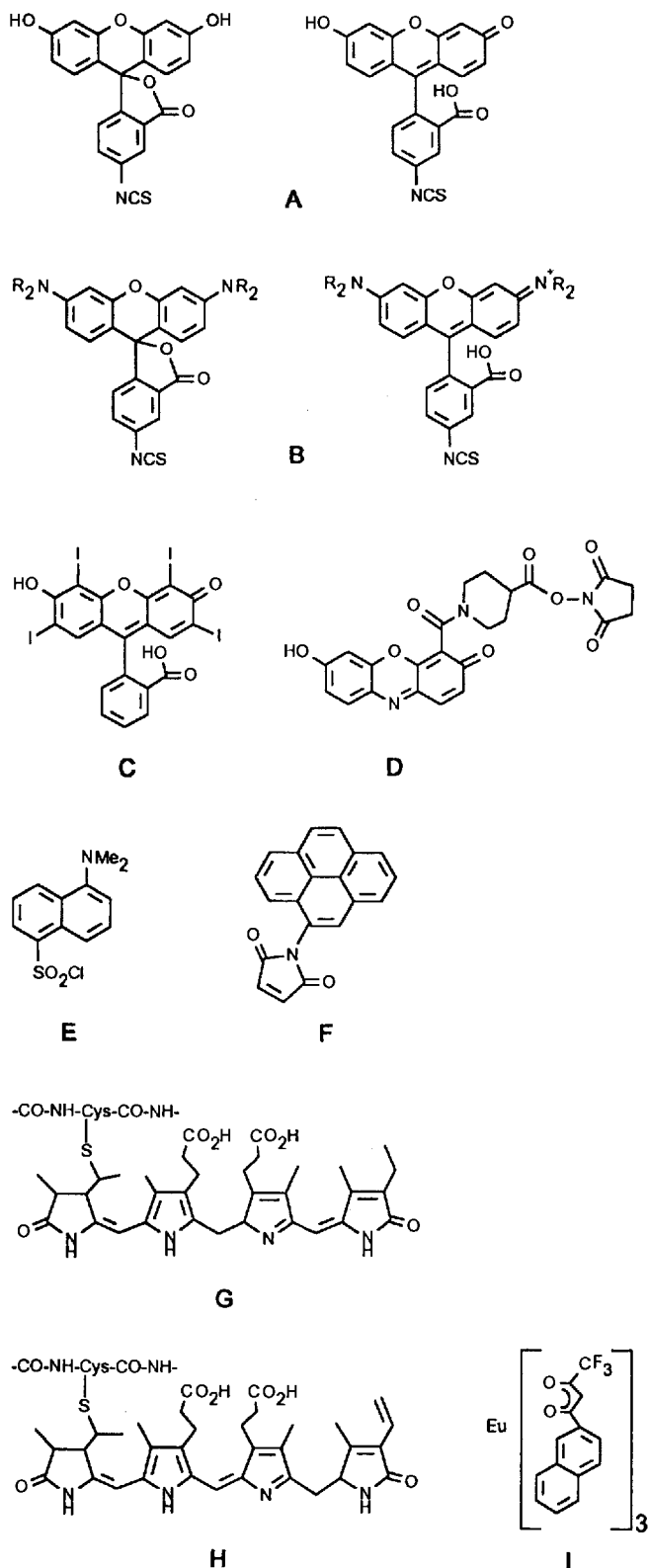
Um die genannten Einflüsse zu minimieren, sind folgende Eigenschaften bei Fluoreszenzmarkern wünschenswert<sup>[56]</sup>: a) möglichst langwellige Emission (500–700 nm), b) große Stokesche Verschiebung von  $> 50$  nm, c) lange Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau > 20$  ns.

Eine ausreichend lange Lebensdauer ist besonders für die Nutzung des Prinzips des Fluoreszenzpolarisationstransfers von Bedeutung (vgl. Abschnitt 5.1.3). Fluoreszenzlebensdauern  $\tau > 100$  ns ermöglichen eine deutliche Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und damit der Sensitivität, da die Messung erst nach dem Abklingen der Untergrundfluoreszenz und der Lichtstreuung erfolgen kann. Dieses Prinzip findet Anwendung bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen, die unter Abschnitt 5.1.4 näher erläutert werden.

#### 5.1.2. Marker zur direkten Fluoreszenzmarkierung

Als erste Verbindung zur fluoreszenten Markierung von biologischem Material verwendeten Coons et al. bereits 1941 Anthracenisocyanat zum Markieren von Bakterienproteinen<sup>[57]</sup>. Die gleiche Arbeitsgruppe führte wenig später Fluoresceinisothiocyanat (FITC, A, Schema 13) als effektiveren Marker ein<sup>[58]</sup>. Obwohl dieser Xanthenfarbstoff aufgrund seiner spektralen Daten (Tabelle 1) die oben genannten Anforderungen an einen Fluoreszenzmarker nur bedingt erfüllt, entwickelte sich FITC zum Fluorochrom der Wahl für die meisten Anwendungen<sup>[5, 10]</sup>. Trotz der großen Zahl später entwickelter Fluoreszenzmarker wird FITC immer noch am häufigsten in Fluoreszenzimmunoassays verwendet, möglicherweise wegen der hohen





Schema 13. Ausgewählte Fluoreszenzmarker A–I. Siehe Tabelle 1.

Quantenausbeute und der Stabilität. Ähnliche Eigenschaften zeigen die der gleichen Farbstoffklasse zugehörigen Rhodamine **B**. Beide Farbstoffe können in den gezeigten zwei isomeren Formen, einer Spirolacton- und einer chinoiden Struktur, vorliegen.

Bemühungen, Fluoreszenzmarker zu erhalten, die im längerwelligen Bereich angeregt werden und auch emittieren, zeigten

Tabelle 1. Spektrale Daten ausgewählter Fluoreszenzmarker A–I.

	$\lambda_{\text{abs/exc}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	$\epsilon$ [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\tau$ [ns]	$\theta$
Fluoresceinisothiocyanat <b>A</b>	492	520	$7 \times 10^4$	4.5	0.85
Rhodamin-B-isothiocyanat <b>B</b> (R = Et)	550	585	[a]	3.0	0.7
TM-Rhodaminisothiocyanat <b>B</b> (R = Me)	550	580	$5 \times 10^4$	2.0	
Erythrosin <b>C</b>	530	558 fl [b] 690 ph [b]	$1 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	0.002
Resorufinderivate <b>D</b>	575	590			
Dansylchlorid <b>E</b>	340	480–520	$3.4 \times 10^3$	14.0	0.3
Pyrenmaleimid <b>F</b>	340	375, 392	$3.8 \times 10^4$	100	
Phycocyanobilin, proteingebunden <b>G</b>	614	643	$5.8 \times 10^5$	2.2	0.52 [c]
Phycoerythrobilin, proteingebunden <b>H</b>	546	576	$2.4 \times 10^6$	3.2	0.59 [c]
Europiumtris[2-naphthyl-trifluoracetat] <b>I</b>	340	590, 613	$3.6 \times 10^4$	$7 \times 10^5$	0.8

[a] Unklare Literaturangaben: 12300 [6a, b]; 103000 [7a]. [b] fl = Fluoreszenz; ph = Phosphoreszenz. [c] Manche Phycobiliproteine liefern  $\theta$ -Werte bis 0.98.

beispielsweise in Derivaten des Phenoxazinfarbstoffs Resorufin gewisse Erfolge. Zur Herstellung von Fluoreszenzmarkern geeignet funktionalisierte Resorufine erhält man unter anderem aus Nitrosoresorcin und 2,6-Dihydroxybenzoesäure nach Reduktion der zunächst gebildeten Resazurine (Resorufin-*N*-oxide). Außer dem in Schema 13 gezeigten Derivat **D** mit einem Succinimidylester als Reaktivgruppe sind auch Marker auf Resorufinbasis mit anderen Reaktivgruppen bekannt. Im Vergleich zu Fluorescein wirkt sich bei Resorufin die Serumeigenfluoreszenz weniger störend aus<sup>[59]</sup>. Eine langwellige Verschiebung von Anregungs- und Emissionswellenlänge ist auch mit Phycobiliproteinen<sup>[60]</sup>, die aus verschiedenen Rot- und Grünalgen erhalten werden, möglich. Die Struktur von zwei prosthetischen Gruppen ist in Schema 13 (**G**, **H**) wiedergegeben. Die Verbindungen zeigen sehr hohe molare Extinktionskoeffizienten und hohe Quantenausbeuten ( $>0.8$ )<sup>[61]</sup>. Die Verknüpfung mit dem Protein erfolgt nicht bei allen Phycobiliproteinen über den A-Ring. Die Substanzen, die inzwischen auch kommerziell erhältlich sind, wurden zuerst in der Fluoreszenzmikroskopie und Flußcytometrie eingesetzt, danach auch als Marker in Immunoassays. Wurde beispielsweise Fluorescein in einem Sandwichimmunoassay durch Phycoerythrin ersetzt, so konnte zwar eine signifikante Erhöhung der Sensitivität (Faktor 2–10) erzielt werden, die jedoch unter den Erwartungen aus den spektralen Daten lag<sup>[61, 62]</sup>. Ungünstig wirkt sich die Größe der Marker und die aufwendige Kupplung aus. Da die Phycobiliproteine ein breites Anregungs- und Emissionsband aufweisen, ist durch die Verwendung unterschiedlicher Marker, deren Emissionsbanden sich nicht überlappen, auch eine Parallelbestimmung mehrerer Parameter denkbar, was in ersten Experimenten auch bestätigt wurde.

### 5.1.3. Fluoreszenzpolarisation

Das bereits lange bekannte Prinzip der Fluoreszenzpolarisation<sup>[63]</sup> wurde 1961 erstmals auf die Antigen-Antikörper-Reaktion angewendet<sup>[64]</sup>. Ein Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay

say basiert auf folgendem Prinzip: Wird eine fluoreszierende Verbindung in Lösung mit polarisiertem Licht angeregt, so ist auch die beobachtete Emission polarisiert. Der Grad dieser Polarisation hängt von der Rotationsrelaxationszeit und damit von der Größe des Moleküls ab. Wird ein kleines ( $M$ : 1–10 kD) fluoreszent-markiertes Molekül mit schneller Rotationsbewegung von einem Antikörper ( $M \approx 160$  kD) gebunden, so nimmt die Rotationsrelaxationszeit des langsam rotierenden Immunkomplexes zu und damit auch die Polarisation der Fluoreszenz. Mit diesem Prinzip kann zwischen freiem markierten Antigen und Immunkomplex unterschieden werden. Die Methode ist allerdings nicht für große Antigene geeignet, da sich die Rotation bei der Immunkomplexbildung kaum verändert. Eine genauere Ableitung des Meßprinzips findet man in Lit.<sup>[63]</sup>. Als Marker können die bereits genannten Fluorophore verwendet werden, obwohl Substanzen mit längerer Fluoreszenzlebensdauer vorteilhafter wären. Am häufigsten wird auch hier Fluoresceinisothiocyanat A eingesetzt. Die Sensitivität ist natürlich durch die bereits genannten Faktoren begrenzt.

Da bei diesem Meßprinzip kein Trennschritt erforderlich ist (homogener Immunoassay), können Bestimmungen relativ einfach durchgeführt werden, sofern keine Empfindlichkeit im picomolaren Bereich gefordert wird. Besonders auf dem Gebiet der Arzneimittelanalytik findet der Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay breitere Anwendung<sup>[59, 63]</sup>. Auch für die Umweltanalytik, etwa die Bestimmung von polychlorierten Biphenylen (PCBs), kann die Methode genutzt werden. Als Marker werden Fluoresceinderivate eingesetzt<sup>[65]</sup>.

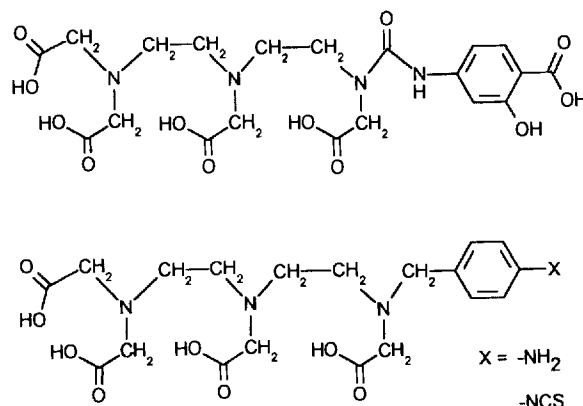
#### 5.1.4. Zeitaufgelöste Fluoreszenz

Es wurde bereits erwähnt, daß die limitierende Untergrundfluoreszenz und die Streulichte effekte ausgeschaltet werden können, wenn man Marker mit sehr langer Fluoreszenzlebensdauer einsetzt und erst zu messen beginnt, wenn kein Untergrundsignal mehr vorhanden ist. Die Lebensdauer der unspezifischen Untergrundsignale beträgt im allgemeinen weniger als 10 ns. Für eine störungsfreie Messung des spezifischen Signals werden Marker benötigt, deren Lebensdauer mindestens das zehnfache der Abklingzeit des Untergrundsignals beträgt<sup>[6a]</sup>. Geeignete organische Fluorophore mit Lebensdauern  $\tau > 50$  ns sind jedoch sehr rar. Pyrenderivate wie F in Schema 13 zeigen zwar Lebensdauern von ca. 100 ns, die sich aber als nicht ausreichend erwiesen haben<sup>[66]</sup>. Wesentlich länger sind die Lebensdauern von Phosphoreszenzprozessen. Die prinzipielle Verwendbarkeit von phosphoreszenten Markern wie Erythrosinderivaten in sauerstofffreier Lösung konnte zwar gezeigt werden<sup>[67]</sup>, doch werden derzeit bei der Nutzung der Phosphoreszenz wegen sehr geringer Quantenausbeuten und des hohen Aufwands keine Fortschritte erzielt.

Erst die Verwendung von Komplexen mit Ionen von Seltenen Erden, zunächst vornehmlich Europium(III), als Marker eröffnete die Aussichten zur drastischen Verbesserung der Empfindlichkeit von Fluoreszenzimmunoassays mit zeitaufgelöster Meßtechnik und zur Entwicklung von fluoreszenten Alternativen zum RIA mit höherer Empfindlichkeit<sup>[6, 66]</sup>. Die Verwendung von Europiumtrisdiketonaten wurde von Wieder<sup>[7b]</sup> bereits 1978 vorgeschlagen und von anderen Arbeitsgruppen weiterentwickelt<sup>[68]</sup>.

Die Chelatkomplexe von Europium(III), Terbium(III), Samarium(III) und Dysprosium(III) zeichnen sich durch einzigartige Fluoreszenzeigenschaften aus (vgl. I in Schema 13 und Tabelle 1). Außer extrem langen Lebensdauern von ca. 1  $\mu$ s bis zu 1 ms, einer sehr großen Stokeschen Verschiebung ( $> 200$  nm) und scharfen Emissionslinien ermöglichen die Komplexe eine hohe Nachweisempfindlichkeit ( $< 10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup>)<sup>[6, 66]</sup>. Der Grund für die beobachtete Lebensdauer liegt im Anregungs-/Emissionsmechanismus. Nach Anregung des Liganden in den  $S_1$ -Zustand und intersystem crossing in ein energetisch passendes Triplett-niveau des Liganden erfolgt ein effektiver Energietransfer in Resonanzniveaus des Metall-Ions, aus denen dann die für Metall-Ionen typische scharfe Emission erfolgt<sup>[6, 66, 69]</sup>.

Die Fluoreszenzeigenschaften der Chelate von Seltenen Erden alleine machen jedoch noch keinen leistungsfähigen Marker für Immunoassays aus. Wesentlich ist eine, auch in wäßrigen Pufferlösungen stabile Bindung an Antigene und Antikörper. Wegen ihrer hohen Stabilität und Wasserlöslichkeit werden für die meisten Anwendungen Polyaminopolycarboxylatchelate, meist Derivate der Ethylendiamintetraessigsäure (edta) oder Diethylentriaminpentaessigsäure, eingesetzt. Beschrieben wurde die Verwendung von Diazo- und Isothiocyanatophenylethylendiamintriacetat zur Koordination von Europium(III) und Terbium(III)<sup>[66, 70]</sup>. Zur Markierung wurden ebenfalls Mischungen von Ethylendiamintriessigsäuren, Terbium(III) und 5-Sulfosalicylsäure<sup>[7b, 71]</sup>, Mischungen eines edta-Derivats, Europium(III) und eines  $\beta$ -Diketons<sup>[7b, 72]</sup> sowie Diethylentriamin-tetraessigsäurederivate mit verschiedenen dreiwertigen Lanthanoiden<sup>[7b, 66, 70, 73]</sup> verwendet (Schema 14).



Schema 14. Liganden zur Koordination von Lanthanoid-Ionen.

Da manche der sehr stabilen Lanthanoid-Chelatkomplexe mit diesen Liganden nicht fluoreszieren, muß vor der Detektion noch ein Dissoziationsschritt durchgeführt werden<sup>[74]</sup>. Dazu wird nach Beendigung der Immunreaktion und der Waschschritte eine sogenannte Enhancement-Lösung zugegeben, die zur Dissoziation des Chelatkomplexes und zur Bildung von fluoreszenten Komplexen führt [System DELFIA (Dissoziation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immuno-Assay)]. Gebräuchlich sind die 1,3-Diketone  $\beta$ -Naphthoyl- und Pivaloyltrifluoracetone.

Die Verwendung von Chelatkomplexen der dreiwertigen Lanthanoid-Ionen ermöglichte durch Anwendung zeitaufgelö-

ster Meßtechnik nicht nur die Entwicklung hochempfindlicher Immunoassays, sondern auch die Simultanbestimmung mehrerer Parameter, da die  $\text{Eu}^{\text{III}}$ -,  $\text{Tb}^{\text{III}}$ -,  $\text{Sm}^{\text{III}}$ - und  $\text{Dy}^{\text{III}}$ -Komplexe bei deutlich unterschiedlichen Wellenzahlen emittieren und andere Fluoreszenzlebensdauern haben. Mehrere Zweifachbestimmungen wurden beschrieben<sup>[73, 75]</sup>, wobei  $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{Tb}^{\text{III}}$ -Chelate<sup>[76]</sup> und  $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{Sm}^{\text{III}}$ -Komplexe<sup>[77]</sup> als Markerpaaire zum Einsatz kamen. Bei den Simultanbestimmungen von je zwei Parametern wurde das Dissoziations-/Verstärkungs-Prinzip genutzt. Die simultane Bestimmung von mehr als zwei Lanthanoidmarkern mit höchster Sensitivität ist jedoch mit den einfachen Verstärkungslösungen nicht möglich.

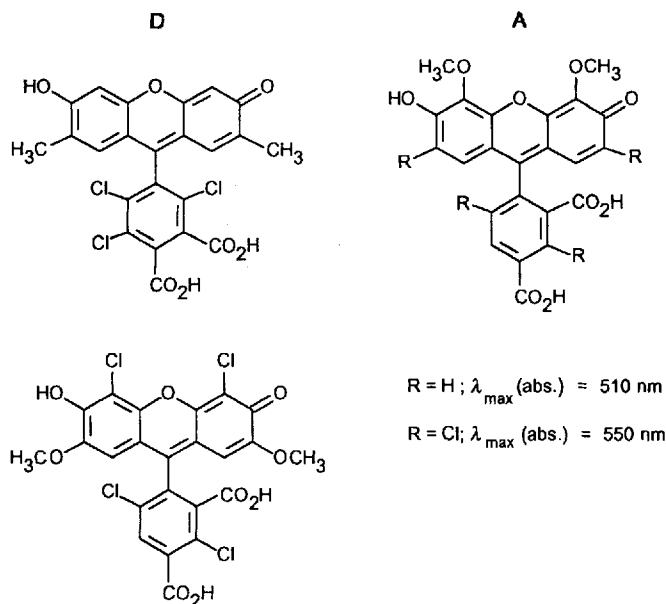
Das Interesse an simultanen Multianalytbestimmungen nimmt zu<sup>[78]</sup>, denn mit den genannten vier Lanthanoid-Ionen und speziell entwickelten Verstärkungslösungen, sogenannten Co/fluorescence-based enhancement solutions (CFES)<sup>[79]</sup>, konnten vier Parameter gleichzeitig durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bestimmt werden<sup>[73]</sup>. Die Verstärkungslösungen bestanden dabei aus einem Anteil, der Pivaloyltrifluoracetone und  $\text{Y}^{\text{III}}$  enthält und die Dissoziation bewirkt, sowie einem Anteil mit 1,10-Phenanthrolin, der die Fluoreszenz verstärkt. Europium(III)- und Terbium(III)-Chelate mit makrobicyclischen Liganden, die  $\alpha, \alpha'$ -Bipyridin- oder 1,10-Phenanthrolineinheiten enthielten, wurden bereits früher als effiziente Luminophore, die als molekulare Lichtwandler fungieren, beschrieben<sup>[79d]</sup>.

### 5.1.5. Fluoreszenzenergietransfer

Bei der Verwendung von Fluoreszenzmarkern für Immunoassays wurde bereits das Prinzip der Fluoreszenzpolarisation erwähnt, das die Entwicklung homogener Immunoassays ermöglicht. Ein weiteres Verfahren, bei dem keine Trennung der freien markierten Moleküle von den Immunkomplexen notwendig ist, nutzt den Fluoreszenzenergietransfer<sup>[6b, 80]</sup>. Dabei findet durch Dipol-Dipol-Kopplung eine Energieübertragung von einem elektronisch angeregten Fluorophor (Donor) auf einen nahe benachbarten Acceptorfarbstoff (Quencher) statt. Nach Förster<sup>[81]</sup> ist die Effizienz der Energieübertragung indirekt proportional zur 6. Potenz des Abstands. Mit der Theorie von Förster können beispielsweise Abstandsmessungen in Molekülen erfolgen<sup>[82]</sup>, und für einen effizienten Energietransfer dürfen die Abstände nicht größer als 10 nm sein. Diese Bedingung ist in vielen Antigen-Antikörper-Komplexen erfüllt. Ist beispielsweise das Antigen mit dem Donor und die spezifischen Antikörper mit dem Acceptor markiert, so erfolgt im Immunkomplex Löschung der Fluoreszenz (des Donors). Bei Vorliegen einer Mischung aus markiertem und unmarkiertem Antigen, steigt das Fluoreszenzsignal mit der Menge an zu bestimmendem unmarkierten Analyten.

An die Fluoreszenzmarker (Donoren), die in Energietransfer-Immunoassays verwendet werden sollen, sind die gleichen Anforderungen zu stellen wie die für Fluoreszenzmarker bereits genannten. Außerdem muß das Donor-Acceptor-Paar so gewählt werden, daß das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Acceptors gut überlappen. Anfangs wurde die Verwendung des Donor-Acceptor-Paars Fluoresceinisothiocyanat/Tetramethylrhodaminisothiocyanat beschrieben<sup>[80b]</sup>. Da bei homogener Immunoassay-Durchführung die Störeinflüsse durch Untergrundsignale wie Serumeigenfluores-

zenz besonders groß sind, haben allerdings die Standardmarker wie Fluoresceinisothiocyanat, Umbelliferone oder Dansylchlorid nur geringere Bedeutung. Bei letzterem ist zusätzlich die hohe Empfindlichkeit für Umgebungseinflüsse nachteilig. Das gleiche gilt für Rhodamine wie Tetramethylrhodamin. Wegen höherer Absorptions- und Emissionswellenzahlen sind Phycobiliproteine und Lanthanoidchelate als Donoren besser geeignet. Mit letzteren ist besonders in Kombination mit zeitaufgelösten Messungen die Entwicklung sensitiver Fluoreszenzenergietransfer-Immunoassays möglich. Auch substituierte Fluoresceine mit Absorptions- und Emissionswellenlängen größer 500 nm (Schema 15) fanden Verwendung als Donoren<sup>[80, 83]</sup>. Die Energieacceptoren (Quencher-Marker) sollten im Idealfall folgende Voraussetzungen erfüllen<sup>[80a]</sup>: a) hoher Extinktionskoeffizient bei den Emissionswellenlängen des Donors; b) keine Fluoreszenz bei Anregung im Absorptionsmaximum des Donors; c) gute Wasserlöslichkeit, damit Mehrfachmarkierungen mit dem Quencher möglich sind (effektiverer Löscheffekt); d) möglichst geringe Umgebungseinflüsse auf das Absorptionsspektrum. Da häufig verwendete Acceptoren wie Tetramethylrhodamine diese Anforderungen nicht erfüllen, wurden neue, nicht fluoreszente Fluoresceinderivate beschrieben, die mit den Donoren in Schema 15 effektive Paare bilden<sup>[80, 84]</sup>.



Schema 15. Fluoresceinderivate für Fluoreszenzenergietransfer-Anwendungen; D = Donormoleküle, A = Acceptor-moleküle.

Die Fluoreszenzmarkierung und das Prinzip des Fluoreszenzenergietransfers finden in letzter Zeit auch Anwendung bei der Entwicklung von Biosensoren<sup>[85]</sup>. Die Detektion kann dabei auf der Löschung der Emission des Donors, auf der neuen Emission des Acceptors oder auf dem Verhältnis beider Emissionswellenlängen beruhen. Ein Biosensor-Prinzip basierend auf Langmuir-Blodgett-Filmen und Fluoreszenzenergietransfer unter Verwendung eines Cumarinderivats als Donor und Tetramethylrhodamin als Acceptor wurde kürzlich beschrieben<sup>[86]</sup>.

## 5.2. Chemilumineszenzmarkierung

Als wesentlicher Unterschied im Vergleich zu Fluoreszenzmarkern entfällt bei der Verwendung von chemilumineszenten Detektionssystemen die Einstrahlung des Anregungslichtes. Dadurch werden, besonders beim Arbeiten mit Serum, die Probleme mit hohen Untergrundsignalen, die hauptverantwortlich für die begrenzte Sensitivität vieler Methoden mit Fluoreszenzdetektion sind, vermieden. Allerdings können bei manchen Chemilumineszenzmarkern komplexe Systeme aus Oxidationsreagentien, Additiven zur Signalverstärkung und Katalysatoren ebenfalls zu einem unakzeptabel hohen Untergrundsignal führen, was natürlich die Empfindlichkeit negativ beeinflusst<sup>[87]</sup>. Zur Chemilumineszenzdetektion in Analysensystemen, die vor allem in der medizinischen Diagnostik Verwendung finden, werden hauptsächlich Verbindungen aus folgenden Substanzklassen eingesetzt<sup>[9, 10–15, 17]</sup>: Luciferine in Kombination mit den entsprechenden Luciferasen, cyclische Arylhydrazide, Acridiniumderivate, stabile Dioxetane und Oxalsäurederivate.

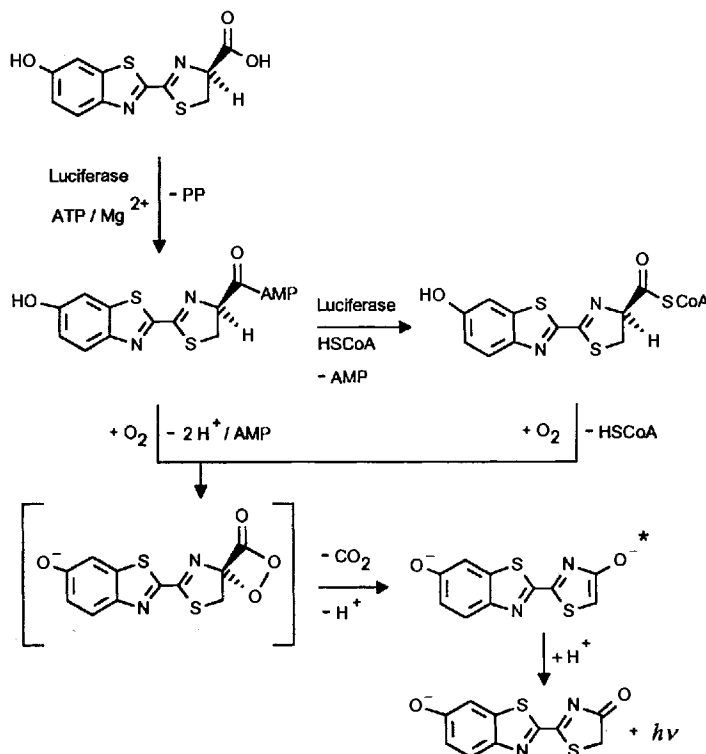
### 5.2.1. Biolumineszenz

#### Das Luciferin/Luciferase-System des nordamerikanischen Leuchtkäfers

Eines der bekanntesten und am meisten untersuchten natürlichen Leuchtsysteme „arbeitet“ im nordamerikanischen Leuchtkäfer (Firefly, *Photinus Pyralis*). Obwohl bereits seit mehr als 30 Jahren der Biolumineszenzmechanismus untersucht wird, und das Benzothiazolderivat Luciferin bereits Anfang der sechziger Jahre strukturell aufgeklärt und synthetisch zugänglich wurde, sind noch nicht alle Einzelheiten der Biolumineszenzreaktion geklärt. Da die genaue Darstellung aller Einzelheiten dieses wie auch anderer Biolumineszenzsysteme den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen würde, soll nur der letzte Kenntnisstand kurz wiedergegeben werden.

Wie schon lange vermutet<sup>[88a, b]</sup> und Ende der siebziger Jahre weitgehend gesichert wurde<sup>[88c]</sup>, katalysiert die spezifische Luciferase des Leuchtkäfers in Gegenwart von ATP und Magnesium-Ionen die Oxidation des Luciferins (Schema 16). Zunächst wird ein Komplex aus der Acyl-AMP-Verbindung des Luciferins und der Luciferase gebildet. In Gegenwart von Sauerstoff erfolgt die Oxidation zum angeregten Oxyluciferin, das unter Emission eines Photons in den Grundzustand übergeht<sup>[15, 89, 90]</sup>. In vivo wird die gelbgrüne Emission ( $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$ ) des Dianions, in vitro in Abhängigkeit vom pH-Wert zusätzlich noch eine rote Emission des Monoanions ( $\lambda_{\max} = 615 \text{ nm}$ ) beobachtet<sup>[88b, 90, 91]</sup>. Die Oxidation verläuft vermutlich über ein Dioxetanon<sup>[11, 87, 92]</sup>, das nach Decarboxylierung angeregtes Oxyluciferin liefert.

Inwieweit das häufig formulierte Dioxetanon tatsächlich als Intermediat oder aber eher als Übergangszustand durchlaufen wird, ist, ähnlich wie bei anderen lumineszenten Systemen, nach wie vor ungeklärt. Anstelle der Dioxetanon-Intermediate bei der Oxidation von Luciferinen, Acridiniumcarbonsäurederivaten und Oxalsäureestern kann auch die direkte Bildung angeregter Produkte durch Ladungstransfer beim Zerfall von Peroxidzwischenstufen angenommen werden<sup>[93]</sup>. Die mechanistischen Betrachtungen können in diesem Rahmen nicht weiter vertieft

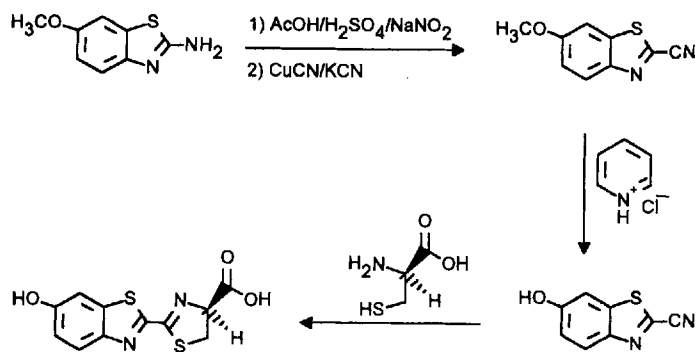


Schema 16. Chemie der Lichtreaktion des Leuchtkäfers; PP = Pyrophosphat, ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, CoASH = Coenzym A.

werden. Interessierte Leser seien auf die Literatur verwiesen<sup>[11, 87, 92, 93]</sup>.

Insgesamt betrachtet schien die Lichtreaktion des Leuchtkäfers aufgeklärt. Doch in den letzten Jahren bestätigte sich die bereits Ende der fünfziger Jahre geäußerte Vermutung<sup>[94]</sup>, daß auch das Coenzym A eine Rolle in der Lichtreaktion spielt<sup>[89, 95]</sup>. Der Zusatz des Coenzym dürfte die Einsatzmöglichkeiten des Firefly-Luciferin/Luciferase-Systems in nächster Zeit weiter verbessern, da die Intensität und die Dauer der Lichtemission erhöht werden können. Einschränkend für Anwendungen war bisher neben der begrenzten Hydrolysestabilität des Luciferins und der Empfindlichkeit der Luciferase vor allem die mangelnde Verfügbarkeit des Enzyms, das aus Leuchtkäfern extrahiert wurde. Inzwischen hat sich die Situation grundlegend geändert, da die *Photinus-Pyralis*-Luciferase, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kD, mit gentechnologischen Methoden in Bakterien, z.B. *E. coli*, exprimiert werden kann<sup>[15, 89, 96, 97]</sup>. Die Verfügbarkeit von gentechnologisch hergestellter Luciferase und synthetischem Luciferin lassen für dieses System, das mit einer Quantenausbeute von 0.88 Einstein pro mol das effizienteste aller bekannten Bio- und Chemilumineszenzsysteme ist, eine breitere Anwendung als bisher erwarten.

In den letzten 30 Jahren wurden im wesentlichen drei Synthesewege zum Aufbau von Firefly-Luciferin beschrieben, die alle über die Schlüsselverbindung 6-Methoxybenzothiazol-2-carbonitril (Schema 17) verlaufen<sup>[91, 98]</sup>. Die Routen unterscheiden sich im Aufbau des Intermediats. Kürzlich wurde eine neue Synthese publiziert<sup>[99]</sup>, in der 6-Methoxybenzothiazol-2-carbonitril in einer Stufe aus dem kommerziell erhältlichen 2-



Schema 17. Schlüsselschritte der Synthese des Firefly-Luciferins.

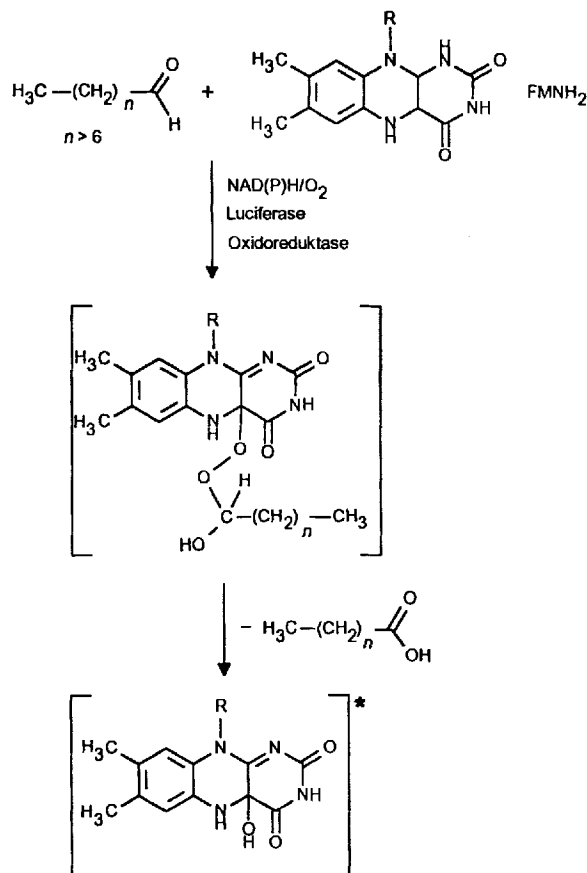
Amino-6-methoxybenzothiazol durch Sandmeyer-Cyanierung erhalten wird (Schema 17). Der weitere Aufbau von Luciferin folgte den bereits bekannten Wegen: Die Spaltung des Methyl-ethers und die Kondensation mit D-Cystein lieferten das Endprodukt. In Lit.<sup>[99]</sup> sind auch die früheren Synthesen zusammengefaßt.

Die älteste und bisher wichtigste Anwendung des Firefly-Luciferin/Luciferase-Systems leitet sich aus der ATP-Abhängigkeit der Biolumineszenzreaktion ab. Durch diese Abhängigkeit kann mit diesem System eine empfindliche ATP-Bestimmung durchgeführt werden. ATP-Assays<sup>[100]</sup> sind vor allem zum Screening auf Mikroorganismen in der klinischen Mikrobiologie, im Hygiene- und im Nahrungsmittelbereich von Interesse<sup>[101]</sup>. Eine neuere Anwendung mit stark zunehmender Bedeutung ist die Nutzung des Firefly-Luciferase-Gens als Reportergen für die Quantifizierung der Genexpression in Zellen<sup>[89, 102]</sup>, wobei die Messung der Lichtemission nach Luciferinzugabe erfolgt.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten bietet die Nutzung von Luciferinderivaten<sup>[103]</sup>, die selbst keine Substrate der Luciferase sind, als Substrate in Enzymimmunoassays. Nach Freisetzung von Luciferin läßt sich in Gegenwart von Luciferase die Lichtemission bestimmen<sup>[103]</sup>. Dabei können Derivate, die an der phenolischen Hydroxygruppe funktionalisiert sind, wie D-Luciferin-O-sulfat und -O-phosphat, durch Sulfatasen bzw. Phosphatasen gespalten werden. Erfolgt die Funktionalisierung von Luciferin an der Carboxygruppe, beschrieben wurden der Methyl-ester sowie Phenylalanin- und Argininamid, dann erfolgt die Freisetzung von Luciferin durch Carboxyesterasen bzw. Carboxypeptidasen<sup>[103]</sup>. Das Luciferin-O-phosphat als Substrat für alkalische Phosphatase ermöglicht im Vergleich zum chromogenen Substrat *p*-Nitrophenylphosphat eine 60fach höhere Empfindlichkeit<sup>[103a]</sup>. Auch D-Luciferin-β-D-galactopyranosid als Substrat für β-Galactosidase wurde beschrieben<sup>[104]</sup>.

#### Bakterielle Luciferinderivate/Luciferasen

In Leuchtbakterien wie *Photobakterium fischeri* und *Photobakterium phosphoreum* erfolgt die Lichterzeugung durch Oxidation langkettiger Aldehyde in Gegenwart von reduziertem Flavinmononucleotid (FMNH<sub>2</sub>), Oxidoreduktase und bakterieller Luciferase<sup>[15, 90, 97, 105]</sup>. Als Intermediat wird ein Peroxid aus Fettsäurealdehyd und dem Flavinbaustein angenommen (Schema 18). Die Lichtemission erfolgt je nach Bakterium im blaugrünen bis gelben Bereich des Spektrums mit Quantenaus-



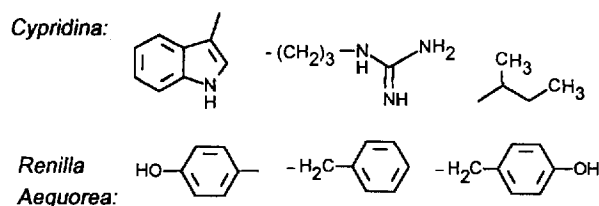
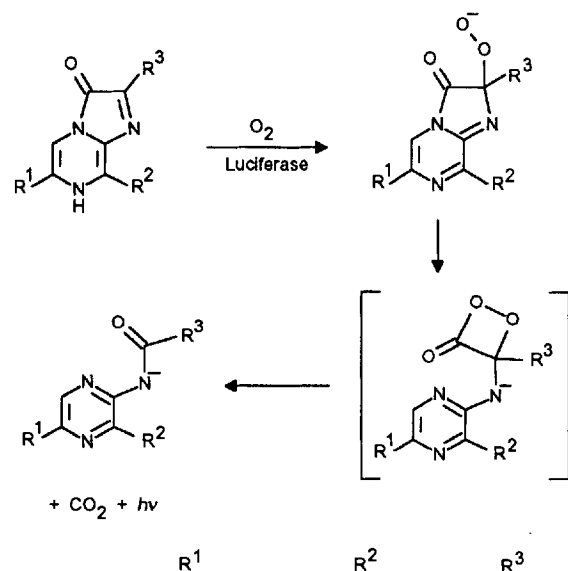
Schema 18. Bakterielle Leuchtsysteme.

beuten bis zu 0.3. Emitter ist vermutlich ein Hydroxyderivat von FMN<sup>[11, 15, 105]</sup>. In vitro wird blaues Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 492 \text{ nm}$ )<sup>[15, 105d]</sup> emittiert. Wie die Firefly-Luciferase, sind auch manche Bakterienluciferasen gentechnologisch zugänglich<sup>[97]</sup>.

Die Biolumineszenz bakterieller Luciferasen kann prinzipiell zur Bestimmung aller Komponenten, die an der Lumineszenzreaktion beteiligt sind, d.h. NADH, NADPH, FMN, FMNH<sub>2</sub>, langkettiger Aldehyde und Sauerstoff, genutzt werden<sup>[97]</sup>. Dabei ist die Möglichkeit, die Konzentration des äußerst instabilen FMNH<sub>2</sub> zu bestimmen, theoretisch. Die Nutzung bakterieller Luciferasen ist noch recht wenig verbreitet. Eine gewisse Bedeutung kommt der biolumineszenten Erfassung von langkettigen Aldehyden<sup>[106]</sup> und der Sauerstoffbestimmung im Spurenbereich<sup>[105c]</sup> zu. Ein weiteres Anwendungsfeld findet sich in homogenen DNA-Hybridisierungsassays<sup>[15, 107]</sup>. Als Beispiel soll auf ein System zur biolumineszenten Bestimmung von Papillomviren hingewiesen werden<sup>[107]</sup>.

#### Luciferinderivate mit Imidazolopyrazinbaustein und Photoproteine

Biolumineszenz tritt besonders häufig in Meereslebewesen wie Krebsen, Quallen, Muscheln, Schwämmen, Pilzen und vielen Fischen auf<sup>[9, 92b, 108]</sup>. Die Luciferine des Muschelkrebsses *Cypridina hilgendorfii*, des Meeresstiefmütterchens *Renilla reniformis* und der Qualle *Aequorea aequorea* sind strukturell verwandt (Schema 19), was auf gemeinsame Biosynthesewege schließen läßt<sup>[92b]</sup>. Zum Lumineszenzmechanismus wird eine

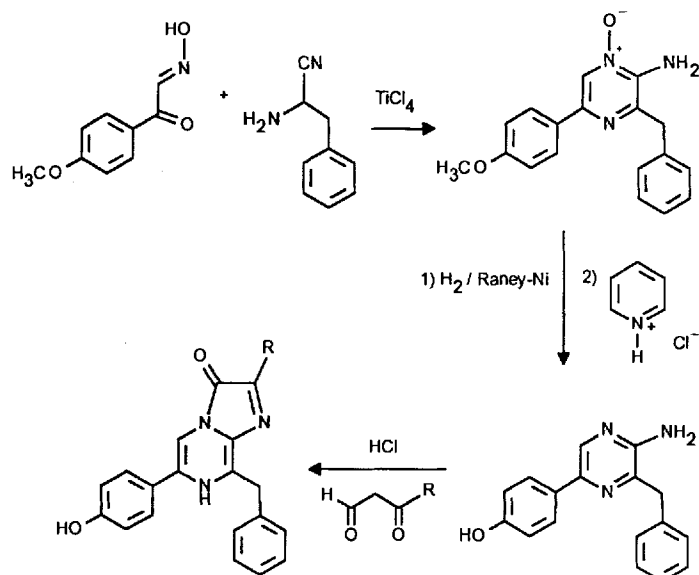


Schema 19. Struktur einiger Imidazopyrazin-Luciferinderivate und Skizzierung des Peroxylactonmechanismus.

katalysierte Oxygenierung mit anschließendem Ringschluß zu einem  $\alpha$ -Peroxylacton angenommen. Diese Zwischenstufe zerfällt unter Bildung des Emitters und Kohlendioxid (Schema 19). Zu weiteren mechanistischen Interpretationen sei auf die bereits bei der Diskussion des Lumineszenzmechanismus des Leuchtkäfers erwähnte Spezialliteratur verwiesen.

Besonderes Interesse fand in den letzten Jahren das Photoprotein Aequorin, das bereits 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* erhalten wurde<sup>[109]</sup>. Es besteht aus einem Komplex von Apoaquorin, Coelenterazin (vgl. Schema 19) und molekularem Sauerstoff. Die Zugabe von Calcium- oder Strontium-Ionen zum Komplex bewirkt die Auslösung der Lichtemission<sup>[110a]</sup>. Man nimmt an, daß durch die Bindung der Calcium-Ionen an das Protein der Zerfall des bereits vorgebildeten oxygenierten Chromophors eingeleitet wird. Eine zusätzliche Luciferase ist nicht erforderlich. Als Emittierender wird das proteingebundene Anion des Chromophors postuliert<sup>[110b]</sup>. Das funktionsfähige Photoprotein wird durch Inkubation des Apoproteins mit dem Coelenterazin in Gegenwart von Sauerstoff, Ethylendiamintetraacetat und Mercaptoethanol regeneriert<sup>[110c]</sup>. Inzwischen ist das Apoprotein durch Expression in *E. coli* zugänglich<sup>[111]</sup>. Die Synthese des Coelenterazins wurde bereits vor längerer Zeit beschrieben<sup>[112a, b]</sup>, und auch über den Aufbau einiger Verbindungen mit modifizierter Struktur wurde berichtet<sup>[112c]</sup>. Die Synthesesequenz ist in Schema 20 zusammengefaßt.

Aequorin kann nach Biotinylierung als biolumineszenter Marker verwendet werden. Die Auslösung der Lichtemission erfolgt durch Zugabe von Calciumchlorid-Lösung. Der Marker kann noch im attomol-Bereich nachgewiesen werden. Dieser Marker ermöglichte beispielsweise die Entwicklung eines hoch-



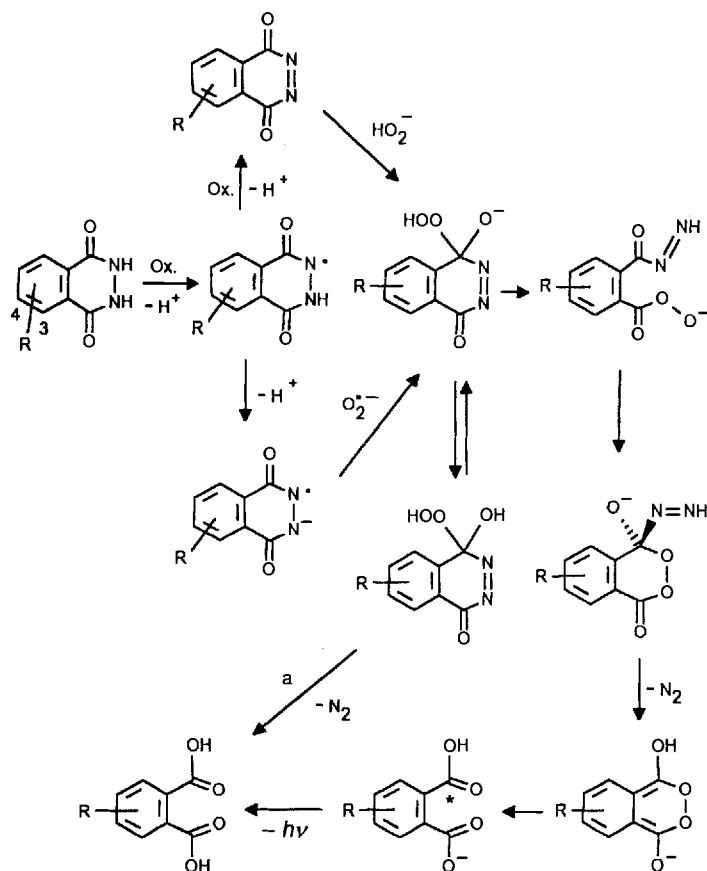
Schema 20. Synthesesequenz zum Aufbau von Coelenterazinen. R = CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (n = 1–3), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH.

empfindlichen Assays zur Salmonellenbestimmung. In der Sensitivität zeigte sich dieser Test anderen ELISA-Tests (siehe Abschnitt 3.1.2), auch solchen mit alkalischer Phosphatase als Marker und dem chemilumineszenten Dioxetan AMPPD als Substrat, deutlich überlegen<sup>[113a, b]</sup>. Auch die Verwendung von Aequorin in der DNA- und Proteindiagnostik<sup>[113c]</sup> und zur Bestimmung von Serumglycoproteinen wurde beschrieben<sup>[113d]</sup>.

## 5.2.2. Cyclische Arylhydrazide

Bereits 1928 wurde die Chemilumineszenz von Luminol-(3-Aminophthalsäurehydrazid) in Form der Emission blauen Lichts bei der Oxidation mit alkalischer Lösung von Hexacyanoferrat(III) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid beobachtet<sup>[114]</sup>. Luminol und die Verbindungsklasse der Carbonsäurehydrazide sind seitdem intensiv untersucht worden. Eine Vielzahl von Reagentien und Katalysatoren sind für die Oxidationen von Luminol und seinen Derivaten verwendbar. In organischen, aprotischen Lösungsmitteln kann die Chemilumineszenzreaktion durch Sauerstoff in Gegenwart einer starken Base ausgelöst werden. In wässrigen Lösungen wird meist Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Katalysatoren wie Peroxidasen, Hämin, Cobalt(II)-salzen verwendet<sup>[105]</sup>. Besonders häufig wird Meerrettichperoxidase (HRP)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingesetzt.

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Reaktionsmechanismen diskutiert<sup>[45v]</sup>. Ein vereinfachter Reaktionsmechanismus, der nur für Einelektronenoxidationsmittel, die das freie Luminolradikal liefern, gilt, ist in Schema 21 wiedergegeben. Nach einer neueren Zusammenfassung<sup>[45v]</sup> empfiehlt sich die Unterteilung in die Bildung der Schlüsselzwischenstufe, eines  $\alpha$ -Hydroxyhydroperoxids, und dessen Zerfall zum angeregten Emittierenden. Während die Bildung des Hydroperoxids stark von den genauen Reaktionsbedingungen abhängt, wird der Zerfall des Schlüsselintermediats nur vom pH-Wert beeinflusst. Als Emittierender wird bei diesen Bedingungen das Monoanion der Aminophthalsäure angesehen. Mit anderen Reagentien, z.B. DMSO/Base, fungiert das Dianion der Aminophthalsäure als Emittierender. Als

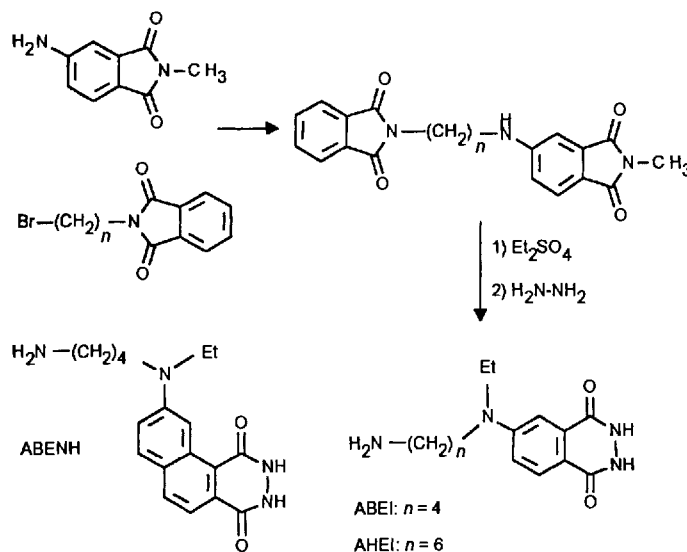


Schema 21. Vereinfachter Mechanismus der Chemilumineszenzreaktion von Phthalsäurehydraziden. Ox = Oxidationsmittel, das freie Luminolradikale liefert, z.B. HRP. R = 3-NH<sub>2</sub>: Luminol; R = 4-NH<sub>2</sub>: Isoluminol. Da die Regiochemie der meisten Prozesse unklar ist, bleibt die Position des Restes R offen. a = dunkel.

Zwischenstufen in anderen mechanistischen Vorschlägen treten Azachinone, Endoperoxide und andere peroxidische Zwischenstufen auf<sup>[115b]</sup>.

Eine der ältesten Anwendungen von Luminol, die auch heute noch Bedeutung hat, ist der forensische Blutnachweis<sup>[116]</sup>; die Verwendung von Luminol als Substrat für Peroxidasen in Enzymimmunoassays wurde bereits erwähnt. Zum Aufbau von Markern zur chemilumineszenten Direktmarkierung werden Kupplungsgruppen benötigt. Die Untersuchung der Chemilumineszenzeigenschaften von Luminol- und Isoluminolderivaten<sup>[117]</sup> hatte ergeben, daß Isoluminol nur ca. 10% der Quantenausbeute von Luminol zeigt. Da aber die Chemilumineszenzquantenausbeute von Luminol deutlich sinkt<sup>[25, 37, 115, 117]</sup>, wenn die primäre 3-Aminogruppe substituiert wird, so werden für Arylhydrazidmarker in der Regel Isoluminolderivate, die bezüglich der Substitution an der Aminogruppe unempfindlich sind oder die noch vorteilhafteren Naphthalindicarbonsäurehydrazide, die höhere Lichtausbeuten liefern<sup>[21, 117b]</sup>, verwendet. Der erste Marker auf Luminolbasis, Diazoluminol<sup>[118]</sup>, wies die geschilderten Nachteile auf, und die Quantenausbeute sank auf 1% der des Luminols. Wesentliche Verbesserungen brachten Isoluminolderivate, bei denen die Kupplungsgruppe über die Aminofunktion eingeführt wurde<sup>[117b]</sup>. Die Struktur und die Synthese einiger wichtiger Arylhydrazidmarker ist in Schema 22 zusammengefaßt. Als Edukt diente 4-Amino-*N*-methylphthalsäureimid, das sukzessive mit *N*-(Bromalkyl)-

phthalsäureimiden und Diethylsulfat alkyliert wurde. Die anschließende Hydrazinolyse des Bisphthalsäureimids lieferte die häufig eingesetzten Phthalsäurehydrazidmarker ABEI und AHEI (*N*-Aminobutyl- bzw. *N*-Aminohexyl-*N*-ethylisoluminol), die als Kupplungsgruppe eine Aminofunktion enthalten. Ähnlich wurde der Phthalsäurehydrazidmarker ABENH (*N*-Aminobutyl-*N*-ethylnaphthylhydrazid) erhalten. Als Edukt diente 7-Amino-1,2-naphthalindicarbonsäuredimethylester<sup>[117b]</sup>. Derivate dieser drei Marker sind auch mit anderen Reaktivgruppen (Isothiocyanat, *N*-Hydroxysuccinimidester) bekannt. Die Umwandlung von AHEI zu einem Derivat mit *N*-Hydroxysuccinimidreaktiverester wurde bereits in Schema 3 gezeigt.

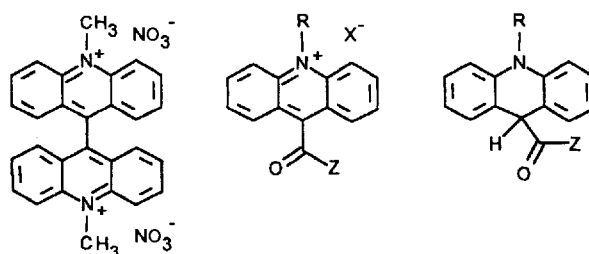


Schema 22. Synthese und Struktur einiger Arylhydrazidmarker.

Arylhydrazidmarker werden nach wie vor häufig in Immunoassays zur Chemilumineszenzmarkierung kleiner und großer Moleküle eingesetzt<sup>[119]</sup>. Ein erheblicher Nachteil sind die deutlichen Verluste in der Lumineszenzquantenausbeute des Markers nach der Konjugation. Des weiteren sind diese Marker störanfällig, da viele Komponenten die Lumineszenzreaktion katalysieren. Die Reagentien zur Lichtauslösung führen zusätzlich zu einem hohen Untergrundsignal, wodurch die Empfindlichkeit verringert wird<sup>[25]</sup>.

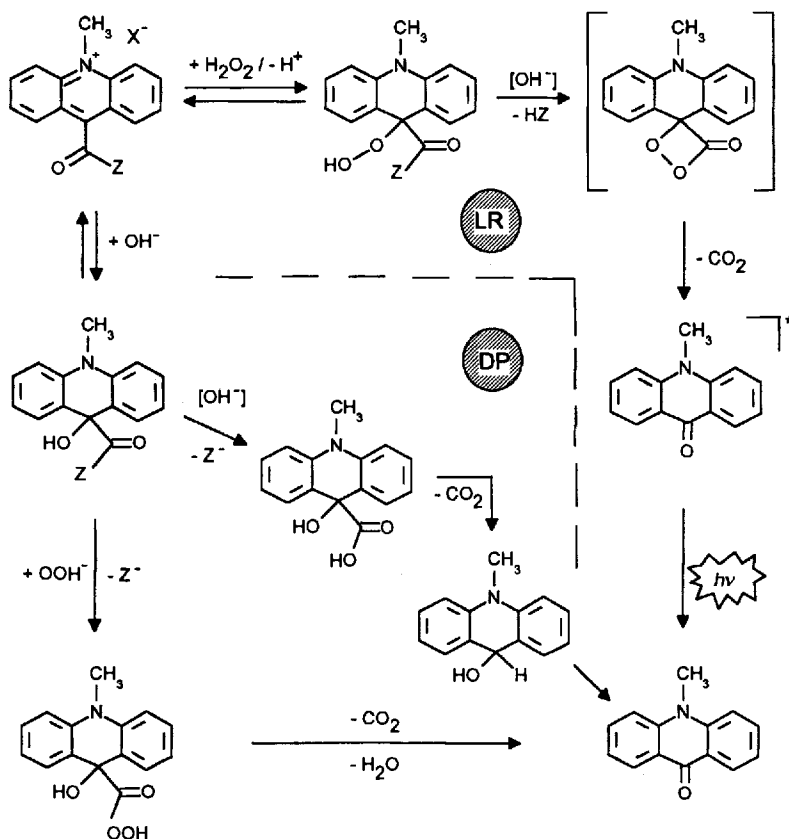
### 5.2.3. Acridiniumverbindungen

Bereits 1935 wurde über die Chemilumineszenz von Lucigenin [9,9'-Bis(*N*-methylacridiniumnitrat), Schema 23] berich-



Schema 23. Beispiele chemilumineszenter Acridiniumverbindungen und Acridane; Z = Abgangsgruppe.

tet<sup>[120]</sup>. Erst rund 30 Jahre später folgten Studien zu anderen chemilumineszenten Acridiniumverbindungen. Im einzelnen handelte es sich um Acridinium-9-carbonsäurechlorid-Hydrochlorid<sup>[121]</sup>, 10-Methylacridinium-9-carbonsäurechlorid<sup>[121]</sup> und 10-Methylacridinium-9-carbonitrilnitrat<sup>[122]</sup>. Heute sind Acridinium-9-carbonsäurederivate und Acridane mit die am besten untersuchten chemilumineszenten Verbindungen. Zur Chemilumineszenz von Acridiniumcarbonsäurederivaten wird außer Wasserstoffperoxid und Base kein weiteres Reagens benötigt. Mit Arylestern können Quantenausbeuten bis ca. 0.05 erzielt werden<sup>[11]</sup>; noch etwas höher sind die mit Acridan-arylestern erreichbaren Lichtausbeuten. Letztere zeigen effiziente Chemilumineszenz nach Behandeln mit einer Base in Gegenwart von Sauerstoff<sup>[123]</sup>. Im folgenden wird nur noch auf die für die Entwicklung von Lumineszenzmarkern wichtigeren Acridiniumcarbonsäurederivate näher eingegangen. Der Mechanismus ihrer Chemilumineszenz, der in Schema 24 dargestellt ist, kann als weitestgehend geklärt betrachtet werden.



Schema 24. Chemilumineszenzmechanismus und Pseudo-Base-Gleichgewicht von Acridinium-9-carbonsäurederivaten; DP = Dunkelprozesse, LR = Lichtreaktion.

Zunächst erfolgt die Addition von Wasserstoffperoxid an die elektrophile C9-Position der Acridiniumeinheit. Im Falle von Arylestern – die Abgangsgruppe Z steht dann für Phenolat – konnten die entsprechenden Hydroperoxide isoliert und charakterisiert werden<sup>[123]</sup>. Nach Zugabe von Hydroxid erfolgt spontane Chemilumineszenz, meist in Form eines kurzen, intensiven Lichtblitzes. Häufig wird als Intermediat ein Dioxetanon formuliert, das zu Kohlendioxid und elektronisch angeregtem *N*-Methylacridon, dem Emitter, zerfällt. Der Übergang in den

Grundzustand erfolgt durch Emission eines Photons mit einer Wellenlänge von ca. 430 nm. Nach neueren Arbeiten<sup>[93b]</sup> soll jedoch kein Dioxetanon als diskrete Zwischenstufe auftreten. Das Endprodukt der Lichtreaktion, *N*-Methylacridon, entsteht auch noch auf anderen Wegen in Dunkelreaktionen. Wichtige Voraussetzung für den Dunkelabbau ist das altbekannte<sup>[124]</sup>, pH-abhängige Pseudo-Base-Gleichgewicht von Acridiniumverbindungen<sup>[125]</sup>. Die Reaktionen, die am Beispiel des Phenylesters in einem Flußsystem genauer studiert wurden<sup>[126]</sup>, sind in Schema 24 integriert. Es wird unmittelbar deutlich, daß sowohl die Licht- als auch die Dunkelreaktion unter anderem von den Eigenschaften der Abgangsgruppe Z abhängen. Andere wichtige Faktoren sind natürlich die Peroxidkonzentration und der pH-Wert<sup>[126, 127]</sup>. McCapra et al. zeigten, daß für eine effektive Chemilumineszenz der p*K*-Wert der konjugierten Säure der Abgangsgruppe kleiner 12 – dem p*K*-Wert von Wasserstoffperoxid – sein sollte<sup>[108c]</sup>. Da ein guter Marker neben einer hohen Chemilumineszenzausbeute auch eine hohe Stabilität im markierten

Reagens aufweisen sollte, gleicht die Auffindung geeigneter Verbindungen einer Gratwanderung, die nur mit einem Kompromiß bezüglich Lichtausbeute und Stabilität enden kann.

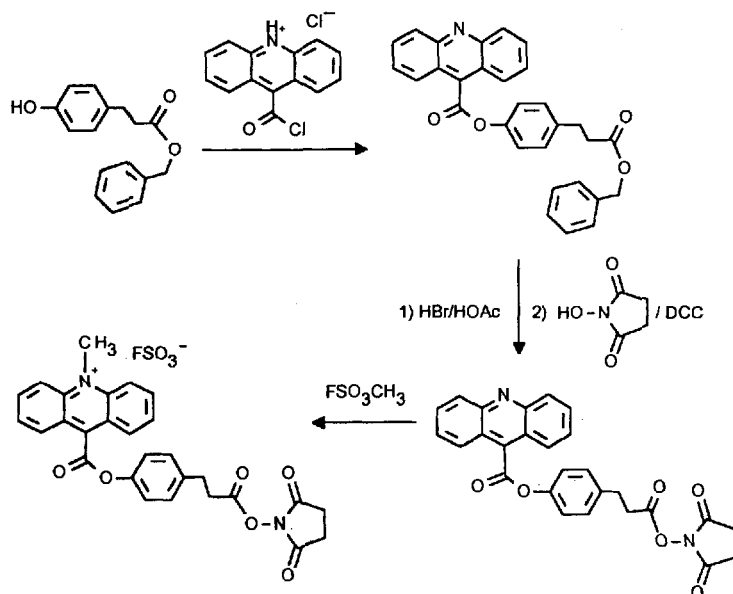
Über erste Versuche, Acridinium-9-carbonsäureester als Marker in Immunoassays zu nutzen, wurde Anfang der achtziger Jahre berichtet. Dabei wurde versucht, Arylester, die freie Carboxygruppen enthielten, nach Aktivierung letzterer an Proteine zu binden. Diese Markierungsversuche hatten nur geringen Erfolg<sup>[128]</sup>. Erst mit einem *N*-Methylacridinium-9-carbonsäurephenylester, der am Phenylrest einen Hydroxysuccinimidester als Reaktivgruppe zur Kupplung an Proteine enthielt, konnten erfolgreich Markierungen durchgeführt werden<sup>[126, 129]</sup>. Die Synthese dieses Prototyps eines Chemilumineszenzmarkers auf Basis von Acridinium-9-carbonsäurederivaten<sup>[125, 126, 128–130]</sup>, des sogenannten Woodhead-Markers, ist in Schema 25 zusammengefaßt.

Als wichtige Ausgangskomponente für diesen und andere anschließend zu behandelnde Marker dient Acridin-9-carbonsäure, deren Synthese in Schema 26 dargestellt ist. Ein Reaktionsweg geht von Acridin aus und führt über 9-Cyanacridin zur Carbonsäure<sup>[131]</sup>. Eine andere Herstellungsmethode führt von Diphenylamin, das mit Oxalylchlorid acyliert und mit Aluminiumtrichlorid zum *N*-Phenylisatin cyclisiert wird, zur Acridin-9-carbonsäure<sup>[132]</sup>. Aus substituierten *N*-Arylisatinen wurde auch die Synthese substituierter Acridincarbonsäuren beschrieben<sup>[133]</sup>, die jedoch nur für den

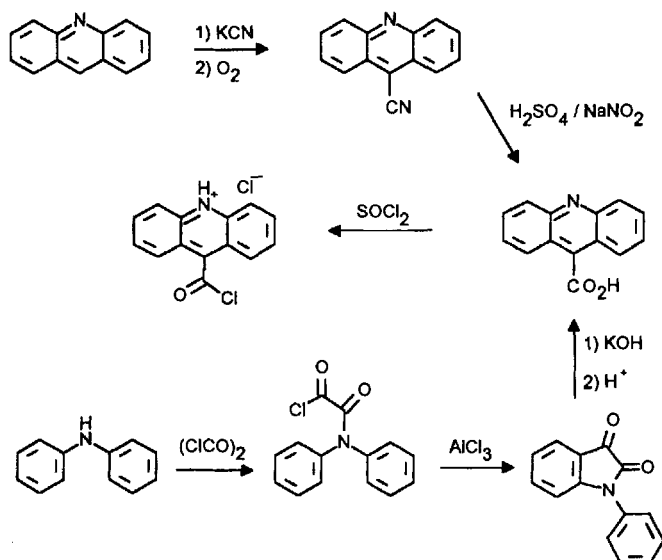
Kleinstmaßstab geeignet zu sein scheint.

Da der genannte Acridiniumestermarker für die Entwicklung kommerzieller Chemilumineszenzimmunoassays nicht ausreichend stabil war<sup>[134, 135]</sup> – durch Hydrolyse der Esterbindung (vgl. Dunkelabbau in Schema 24) erfolgte in Konjugaten ein zu schneller Abbau der Aktivität –, wurde in mehreren Arbeitsgruppen nach beständigen Markern auf Acridiniumcarbonsäurebasis gesucht. Eine Lösung wurde in der sterischen Abschirmung der Esterbindung und der C9-Position der Acridineinheit,





Schema 25. Synthese eines Acridiniumester-Markers.



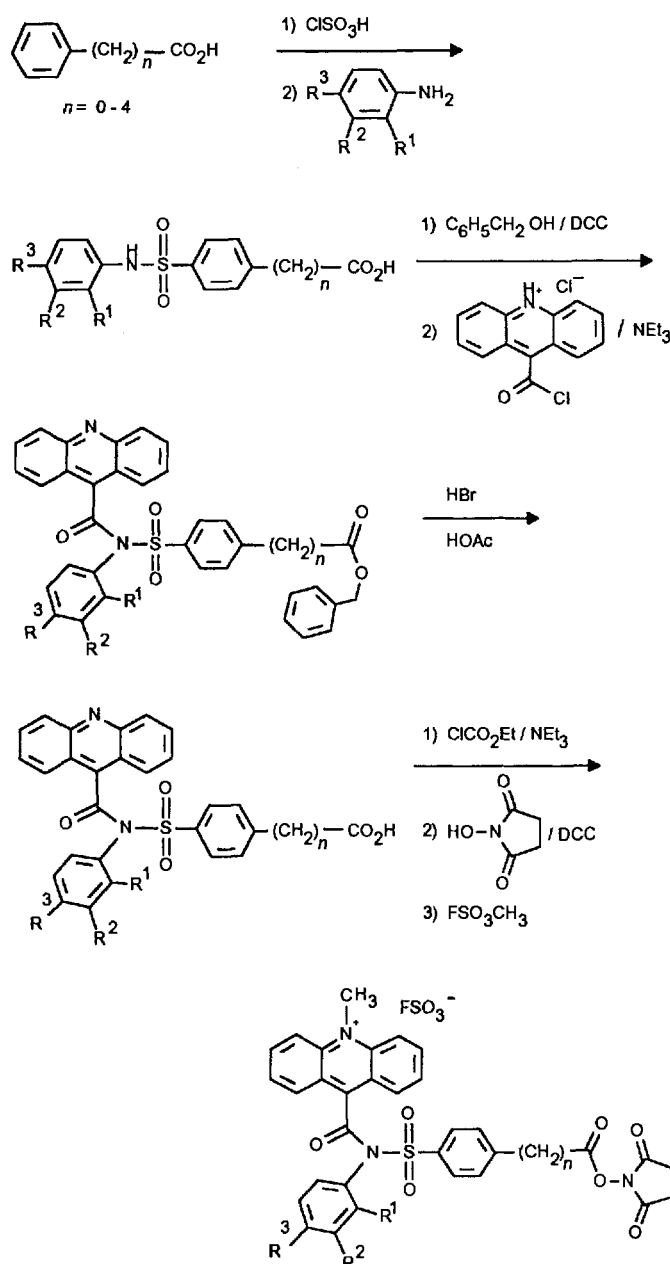
Schema 26. Synthesemöglichkeiten für Acridin-9-carbonsäure.

z.B. durch Methylgruppen in 2,6-Position des Arylrings, gefunden<sup>[134]</sup>. Auch andere Acridinium-9-carbonsäure-(2,6-substituierte)arylester wurden beschrieben<sup>[136]</sup>. Dabei kann die Reaktivgruppe auch über einen Spacer am Acridinringsystem gebunden sein. Der Vollständigkeit halber soll nicht unerwähnt bleiben, daß auch *N*-Methylphenanthridinium-6-carbonsäure-arylester als Chemilumineszenzmarker beschrieben wurden<sup>[136, 137]</sup>.

Andere Forschungsgruppen versuchten, durch Variation der Abgangsgruppen der Acridiniumcarbonsäurederivate verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu denen der Arylester zu erreichen. Thiolester brachten zwar Fortschritte in puncto Lichtausbeute, nicht jedoch bei der Hydrolysestabilität<sup>[138]</sup>. Deutlich erhöhte Stabilität bei gleichzeitig sehr guten Chemilumineszenzquantenausbeuten wurde mit *N*-Sulfonylamid-Anionen anstelle von Phenoxid als Abgangsgruppen erzielt<sup>[138–141]</sup>. Bei dieser

Verbindungsklasse kann durch maßgeschneiderte Strukturvariationen viel besser gezielt Einfluß auf das Eigenschaftsspektrum genommen werden als bei Acridiniumestermarkern. Beispielsweise kann durch die Einführung geeigneter Substituenten der wichtige Parameter Wasserlöslichkeit deutlich verbessert werden<sup>[139, 142]</sup>. In Schema 27 ist die Synthese von *N*-Methylacridinium-9-(*N*-sulfonyl)carbonsäureamid-Markern zusammengefaßt.

Auch das Hydrolyseverhalten und die Emissionskinetik können in gewissen Grenzen variiert werden<sup>[142, 143]</sup>. Obwohl Phenole und Sulfonamide ähnliche *pK*-Werte haben, sind Marker mit letzteren meistens wesentlich stabiler. Dies dürfte auf eine Kombination aus sterischen Abschirmeffekten und elektronischer Stabilisierung zurückzuführen sein<sup>[127, 143]</sup>, wodurch die beschriebenen Reaktionswege der Dunkelreaktion minimiert werden. Für *N*-Sulfonylcarbonsäureamide wird eine im Vergleich zur Ester-C-

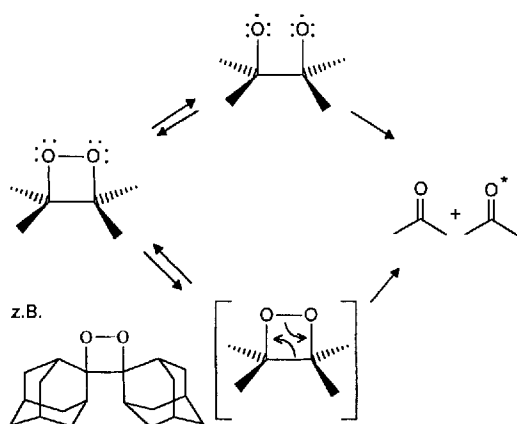
Schema 27. Synthese von Acridinium-9-(*N*-sulfonyl)carboxamid-Markern.

O-Bindung erhöhte Bindungsordnung der C-N-Bindung angenommen, was auch aus den Frequenzen der Carbonylstreckschwingung im IR-Spektrum sichtbar wird<sup>[143]</sup>.

Marker auf Basis von Acridinium-9-carbonsäureestern und Acridinium-9-(N-sulfonyl)carbonsäureamiden finden inzwischen breiten Einsatz in kommerziellen Immunoassays<sup>[113, 119c, 144]</sup> (siehe Abschnitt 6). Für andere Acridiniumderivate wurden bisher nur wenige mögliche Anwendungen beschrieben. Beispielsweise kann Lucigenin in micellaren Chemilumineszenzassays zur Bestimmung von Reduktionsmitteln (Ascorbinsäure, Harnsäure, Glucose, Fructose) eingesetzt werden<sup>[145]</sup>. Die Micellen sind notwendig, um die Löslichkeit von Lucigenin zu verbessern.

#### 5.2.4. Dioxetane

Dioxetane waren lange eher eine Laborkuriosität. An einen Einsatz der meist äußerst instabilen Verbindungen in Reagenzien für Diagnostika war nicht zu denken. Erst nachdem das aufgrund sterischer Abschirmung äußerst stabile Adamantylidenadamantan-1,2-dioxetan<sup>[146]</sup> bekannt war (W. Adam et al., 1972), kam die Entwicklung von Dioxetanmarkern in Gang. Die Lichtemission konnte bei den stabilen Dioxetanen des genannten Typs, die bei Raumtemperatur Halbwertszeiten größer 20 Jahren aufweisen, nur thermisch ausgelöst werden. Bei der Thermolyse entstehen zwei Moleküle Adamanton zum Teil im  $S_1$ - und zum Teil im  $T_1$ -Zustand (Schema 28). Prinzipiell kann

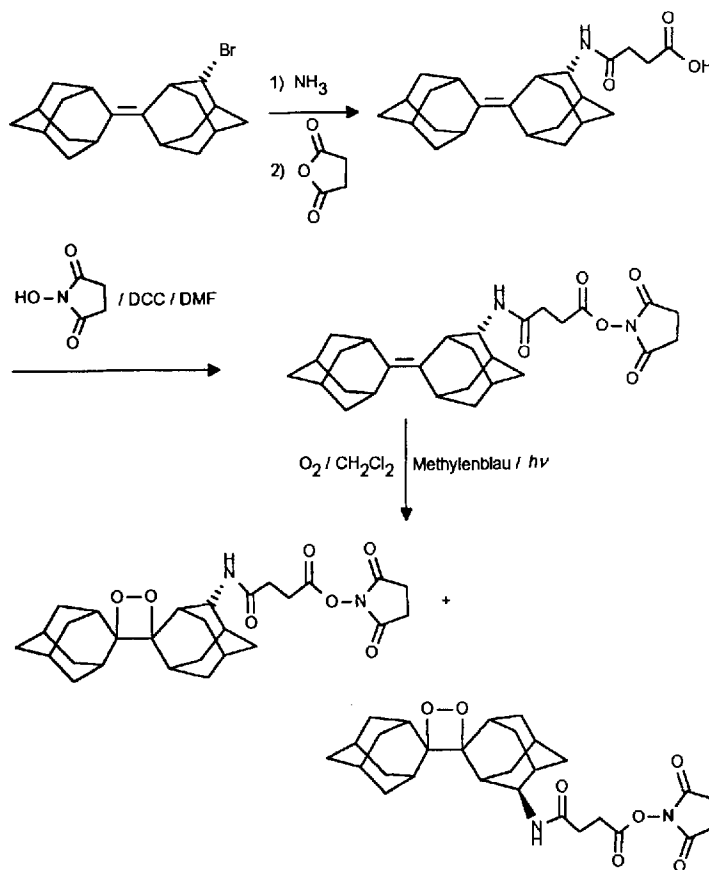


Schema 28. Vereinfachte Darstellung des Zerfalls von Dioxetanen.

die Spaltung nach einem Diradikal- oder einem konzertierten Mechanismus erfolgen<sup>[87]</sup>. Der schrittweise Weg unter Homolyse der O-O-Bindung und Bildung eines Diradikals wurde für den Zerfall der stabilen Dioxetane vorgeschlagen<sup>[147]</sup>. Die Lichtemission erfolgt bei der Desaktivierung der  $S_1$ -angeregten Spezies. Anders ist der Zerfallsmechanismus von Dioxetanen, die neben der sterischen Stabilisierung durch nur einen Adamantylrest, noch einen Substituenten mit niedrigem Oxidationspotential, meist Aryloxy, enthalten. Bei diesem Zerfallsweg wird der Bruch der O-O-Bindung durch einen Elektronentransfer von der oxidierbaren Gruppe ins antibindende Orbital der Peroxidbindung ausgelöst (CIEEL-Mechanismus, chemically initiated electron exchange luminescence)<sup>[92e, 148–155]</sup>. Dieser Mecha-

nismus wird für die bereits in Abschnitt 4 genannten Dioxetane diskutiert, die als Substrate für Enzymmarker Verwendung finden.

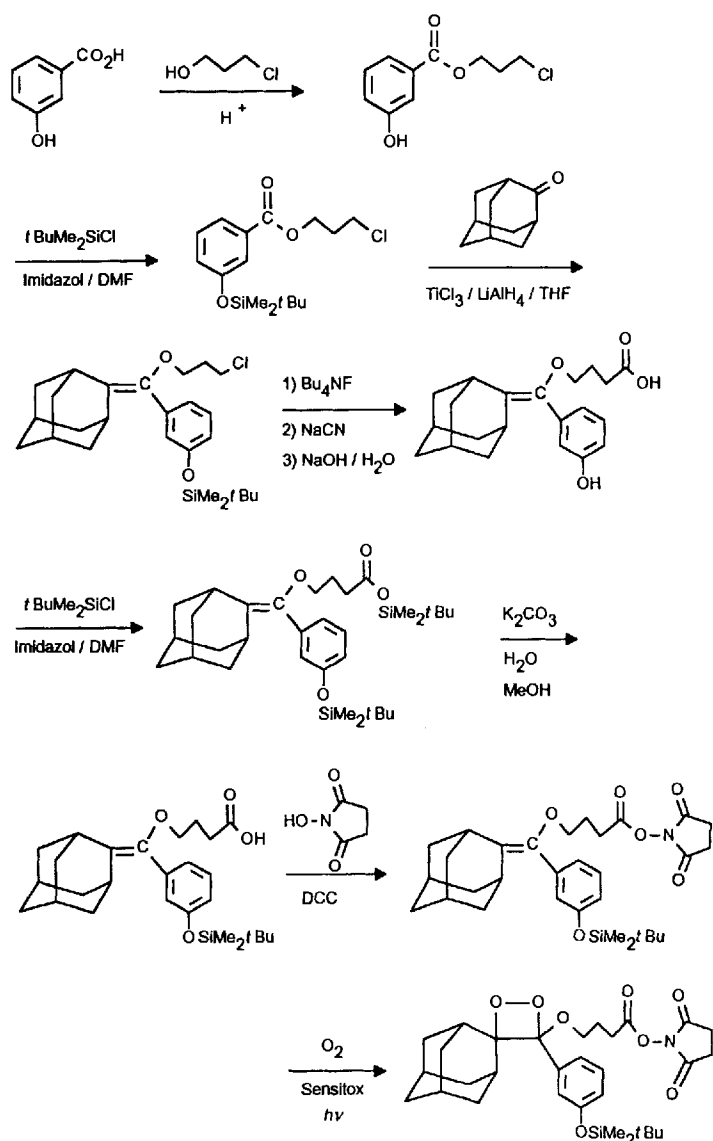
Funktionalisierte Adamantylidenadamantane, die eine über einen Spacer gebundene Reaktivgruppe enthalten, wurden als Marker für thermochemilumineszente Immunoassays beschrieben<sup>[156]</sup> (Hummelen et al., 1986). Die Synthese eines solchen Markers ist in Schema 29 wiedergegeben. Als Edukt dient Ada-



Schema 29. Synthese eines thermochemilumineszenten Dioxetanmarkers. DMF = Dimethylformamid.

mantylidenadamantan, das in zwei Stufen aus Adamantan zugänglich ist<sup>[157]</sup>. Im letzten Syntheseschritt, der sensibilisierten (Methylenblau) Photooxygenierung, entsteht ein Gemisch (ca. 1:1) zweier Dioxetanisomere, die in dieser Form für Markierungsexperimente verwendet wurden. Die Gesamtausbeute der siebenstufigen Synthesesequenz, ausgehend von Adamantanon, beträgt 50%. Die Auslösung der Lumineszenz erfolgt durch kurzzeitiges Erhitzen der auf Aluminiumoxid adsorbierten Probe auf 240 °C. Ein Meßgerät für Thermochemilumineszenz wurde ebenfalls beschrieben<sup>[156]</sup>. Da die Effizienz der direkten Chemilumineszenz von Adamantylidenadamantan-1,2-dioxetan mit  $1 \times 10^{-4}$  ( $6 \times 10^{19}$  Photonen pro mol)<sup>[158]</sup> nur ca. 1% der von Luminol bei optimalen Bedingungen beträgt, ist eine Erhöhung durch Energietransfer auf einen guten Fluoreszenzfarbstoff notwendig. Beschrieben wurden Rinder Serumalbuminkonjugate mit dem Dioxetanmarker und 9,10-Diphenylanthracen, die wiederum als Marker in Fluoreszenzverstärkten Thermochemilumineszenz-Immunoassays [FATIMA

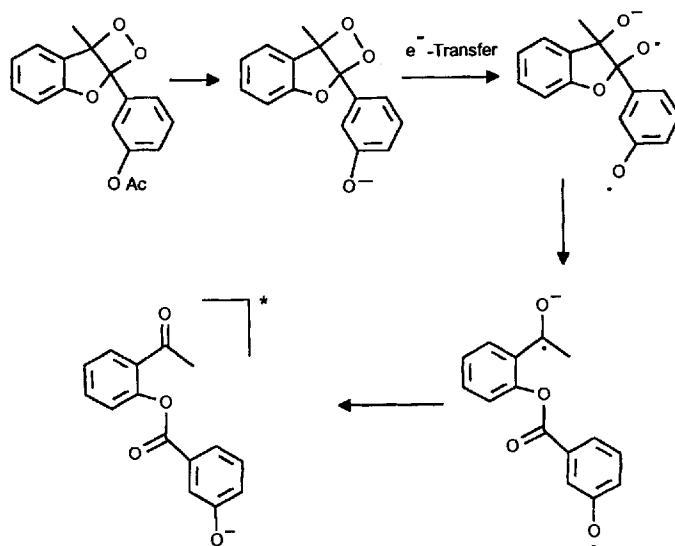
(fluorescence amplified thermochemiluminescence immunoassay) eingesetzt wurden. Erste Assays, z.B. für den Tumormarker CEA, wurden zwar beschrieben, doch erscheint das Prinzip der Thermochemilumineszenz insgesamt für breitere kommerzielle Anwendungen zu aufwendig. Es setzte die Suche nach Modellverbindungen für thermisch etwas instabilere Dioxetanmarker, die bereits bei ca. 150 °C aktivierbar sind, ein<sup>[159]</sup>. Beispielsweise zerfällt 9-Xanthenyldenadamantan bereits bei ca. 100 °C (Hummelen et al. 1988). Das dabei emittierte Licht entspricht der Emission von Adamanton. Andere enzymatische und chemisch triggerbare Monoadamantylidioxetanderivate der Xanthen-, Naphthalin- und Phenylreihe, die am olefinischen Edukt einen Methoxysubstituenten zur Erleichterung der Dioxetansynthese enthalten, wurden kurz vorher beschrieben (Schaap et al., 1987)<sup>[47c, 47d]</sup>. Kurz danach wurde das bereits in Abschnitt 4 erwähnte AMPPD beschrieben. Im Gegensatz zum oben erwähnten thermischen Zerfall ist der Emittor beim CIEEL-Zerfall von Adamantylidenaryloxy-1,2-dioxetanen, der enzymatisch oder chemisch ausgelöst werden kann (vgl. Schema 10), zum größten Teil angeregtes Aryloxy-Anion.



Schema 30. Chemisch triggerbare Dioxetanmarker zur chemilumineszenten Direktmarkierung. Sensitox = polymerfixiertes Rose bengal.

Somit haben sich in weniger als zwanzig Jahren seit der Entdeckung der stabilen Dioxetane die Laborkuriositäten zu weltweit in der immunologischen und biochemischen Analytik eingesetzten Derivaten entwickelt. Das Ende der Weiterentwicklung ist aber noch nicht erreicht. Waren bis vor kurzem die enzymatisch oder chemisch triggerbaren 1,2-Dioxetane nicht als klassische Marker mit einer Reaktivgruppe zur Kupplung an zu markierende Moleküle bekannt, so wurden kürzlich auch solche Dioxetanmarker zur Direktmarkierung vorgestellt<sup>[14, 47p, 160]</sup>. Die Synthese eines ausgewählten Markers ist in Schema 30 skizziert. Neben der gezeigten Silyloxygruppe als spaltbare Einheit zur Lumineszenzauslösung können auch andere Substituenten eingesetzt werden, z.B. Phosphat- und Galactosylgruppen. Als Reaktivgruppen kommen neben dem gezeigten Hydroxysuccinimidester auch die anderen gängigen Reaktivgruppen in Frage. Beschrieben wurden auch Marker mit einem Biotinanker<sup>[47p]</sup> und solche, die zur Markierung von Proteinen und Antikörpern eingesetzt wurden<sup>[47p]</sup>. Weitere Anwendungen dieser relativ neuen Marker sind bisher noch nicht bekannt, lassen jedoch schon aufgrund der hohen Quantenausbeuten (0.20–0.25 in DMSO)<sup>[14]</sup> vermutlich nicht lange auf sich warten.

Zum Abschluß des Abschnitts über Dioxetane sei noch eine neue Klasse relativ stabiler Dioxetane erwähnt, die ähnliche Quantenausbeuten wie die früher beschriebenen Enzymsubstrate liefert (bis  $4 \times 10^{-6}$ ). Dabei handelt es sich um phenylsubstituierte Benzofuran-1,2-dioxetane<sup>[14, 92e, f]</sup>. Die in Schema 31 ge-



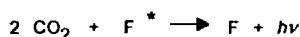
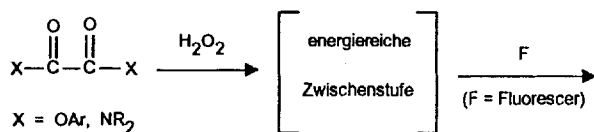
Schema 31. Struktur und Zerfall eines Benzofurandioxetans.

zeigte acetoxy-substituierte Verbindung zerfällt vermutlich baseninduziert nach dem CIEEL-Mechanismus. Bei analogen siloxysubstituierten Verbindungen kann der Zerfall, wie bei den ähnlichen Adamantylverbindungen, mit Fluorid-Ionen getriggert werden<sup>[92f]</sup>.

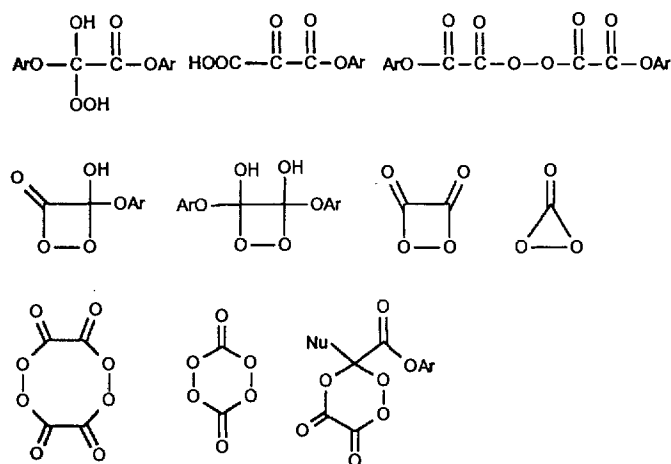
### 5.2.5. Oxalsäurederivate

Oxalsäurederivate wie Oxalylchlorid<sup>[161, 162]</sup>, bestimmte Oxalsäureanhydride<sup>[163]</sup>, Diarylester<sup>[164]</sup> und Oxamide<sup>[165]</sup> gehören zu den synthetischen Molekülen mit der höchsten Chemi-

lumineszenzquantenausbeute, die bis zu 0.5 betragen kann<sup>[11]</sup>. Die starke Lumineszenz wird in Gegenwart von Fluoreszenzfarbstoffen bei der Oxidation der Oxalsäurederivate mit Wasserstoffperoxid beobachtet. Trotz intensiver Studien ist der Mechanismus der Peroxyoxalat-Chemilumineszenz nicht in allen Einzelheiten geklärt. Häufig wurde als energiereiche Zwischenstufe, die aus dem Oxalsäurederivat durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid entsteht, Dioxetandion formuliert (Schema 32).



Auswahl postulierter energiereicher Zwischenstufen:



Schema 32. Mechanismus der Chemilumineszenz von Oxalsäurederivaten.

Dieses hochgespannte Intermediat entsteht aber nach den Ergebnissen neuerer Arbeiten nicht<sup>[93b]</sup>; eine Vielzahl von möglichen Intermediaten ist in Schema 32 gezeigt<sup>[14, 166–169]</sup>. Wie bereits bei anderen mechanistischen Diskussionen, werden auch hier Reaktionswege mit Elektronen- und Energietransfer diskutiert<sup>[14]</sup>. Letztendlich wird entweder angeregtes Kohlendioxid gebildet, das durch Energietransfer den Fluoreszenzfarbstoff anregt, oder es entsteht ein Charge-Transfer-Komplex, der zu  $\text{CO}_2$  und einem Fluoreszenzfarbstoffmolekül im angeregten Zustand zerfällt. Die Lumineszenz dieser Systeme ist relativ lange andauernd und die Emissionsfarbe durch die Wahl des Farbstoffes einstellbar. Die bekannteste Anwendung ist die der Cyalume-Lichtstäbe<sup>[170]</sup>.

Für die Entwicklung von Lumineszenzmarkern für diagnostische Zwecke kommen Oxalsäureester oder Oxamide nicht in Betracht, da die Löslichkeit der Oxalate und der Fluoreszenzfarbstoffe organische Lösungsmittel erfordert. In wässrigen Lösungen werden die Verbindungen schnell hydrolysiert<sup>[11]</sup>. Jedoch finden Oxalate Verwendung in Chemilumineszenzdetektoren bei der HPLC- oder Flow-Injections-Analyse<sup>[14, 171]</sup>. Ent-

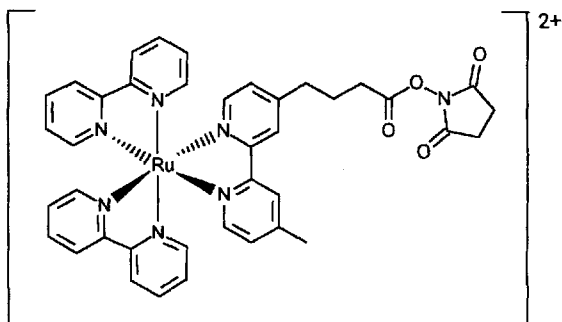
sprechende Systeme ermöglichen unter anderem die Analytik von Umweltschadstoffen, Arzneimitteln, Aminosäuren, Fettsäuren, Aminen mit Nachweisempfindlichkeiten bis in den Attomol-Bereich. Ein weiterer interessanter Anwendungsbe- reich der Oxalatchemilumineszenz in der Diagnostik ist die quantitative Oxalsäurebestimmung im Urin mit einem Nachweisbereich bis  $10 \text{ nmol L}^{-1}$ . Dazu wird die vorhandene Oxalsäure mit Carbodiimid in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und einem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt. Die gemessene Lichtemission ist der Oxalsäurekonzentration proportional<sup>[172, 173]</sup>. Auch die Bestimmung von Porphyrinen im Urin ist nach dieser Methode möglich. Dazu wird kein Fluoreszenzfarbstoff benötigt, sondern die Porphyrine wirken selbst als Sensibilisator<sup>[174]</sup>.

### 5.2.6. Elektrochemilumineszenz

Die Auslösung von Chemilumineszenz durch elektrochemische Prozesse ist zwar schon lange bekannt, hat aber erst in den letzten Jahren praktische Bedeutung erlangt<sup>[175]</sup>. Eine wesentliche Rolle spielen dabei elektrochemisch erzeugte Radikale. Näher untersucht wurde die elektrochemische Anregung von Luminol/Wasserstoffperoxid-Gemischen<sup>[176]</sup>. Lumineszenz wird bei Potentialen größer 0.5 V beobachtet und bis zu Potentialen von 0.7 V wird ein ähnlicher Mechanismus wie in Schema 21 dargestellt angenommen. Elektrochemisch erzeugtes Diazachinon reagiert mit Wasserstoffperoxid. Bei höheren Potentialen (1.2 V) wird die Reaktion wesentlich komplexer, da Oxidationsprozesse der Aminogruppe von Luminol auftreten<sup>[176]</sup>. Ein elektrochemischer Detektor, der auf diesem System basiert, kann zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid eingesetzt werden<sup>[176]</sup>.

Auch Acridiniumverbindungen wurden elektrochemisch untersucht<sup>[177]</sup>. Während Lucigenin zunächst bei  $-0.3 \text{ V}$  reduziert wird und die Weiterreaktion des Radikals zur Lumineszenz führt, zeigen Acridiniumester im Bereich  $+1 \text{ V}$  bis  $-1 \text{ V}$  keine Aktivität. Allerdings kann die Lumineszenzreaktion der Acridiniumester durch elektrochemisch aus Sauerstoff erzeugtes Wasserstoffperoxid initiiert werden. Dieses Prinzip ermöglicht die Entwicklung von Detektoren für markierte Analyte, die ohne zusätzliche Reagentien auskommen. Mit dem früher beschriebenen ersten Acridiniumester-Label markiertes Lysin konnte mit einer Nachweisgrenze von  $10 \text{ fmol}$  detektiert werden<sup>[177]</sup>.

Die Chemilumineszenz von Ruthenium(III)-Chelatkomplexen ist bereits länger bekannt<sup>[178a, 175a]</sup>, ebenso die elektrochemische Lumineszenzgenerierung aus Trisbipyridinruthenium(II)-Chelaten<sup>[178b]</sup>. Aber erst kürzlich wurde die Markierung von Haptenen, Proteinen und Nucleinsäuren mit Ruthenium(II)-Chelaten beschrieben<sup>[179a]</sup>. Der Rutheniumkomplex, der in Schema 33 dargestellt ist, verfügt über einen Hydroxysuccinimidestersubstituenten als Reaktivgruppe. Als Vorteile des Markers wird die hohe Stabilität, das relativ geringe Molekulargewicht, die hohe Wasserlöslichkeit und die hohe Empfindlichkeit – die Nachweisgrenze des Markers liegt bei  $200 \text{ fmol L}^{-1}$  – angeführt. Mehrfachmarkierungen von Proteinen und Oligonucleotiden sind möglich, ohne die Immunreaktivität, Löslichkeit oder Hybridisierungsfähigkeit des Konjugats negativ zu beeinflussen. Bei der elektrochemischen Reaktion wird zunächst  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (bpy = Bipyridin) an der Elektrodenoberfläche zu



Schema 33. Struktur eines elektrochemilumineszenten Markers auf Basis eines Tris(bipyridin)ruthenium-Chelates.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$  oxidiert. Gleichzeitig wird in großem Überschuß vorhandenes Tripropylamin (TPA) ebenfalls zu einem Radikalkation  $\text{TPA}^{+\bullet}$  oxidiert, das spontan ein Proton abspaltet. Bei der Reaktion des starken Oxidationsmittels  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$  mit dem Radikal  $\text{TPA}^{\bullet}$ , einem starken Reduktionsmittel, entsteht der Komplex  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  im elektronisch angeregten Zustand, der durch Emission eines Photons von 620 nm in den Grundzustand übergeht. Der Ruthenium(II)-Komplex kann wieder in den Kreisprozeß eintreten, was eine automatische Signalverstärkung bewirkt.

Neben einem Elektrochemilumineszenzanalysator<sup>[179b]</sup> wurden auch Immunoassays<sup>[179a]</sup> und Gensondentests<sup>[179a, 180]</sup> mit dem inzwischen kommerziell erhältlichen Rutheniummarker beschrieben. Für eine Beurteilung der Eignung der Elektrochemilumineszenzdetektion in der diagnostischen Praxis reichen die verfügbaren Daten noch nicht aus.

## 6. Anwendungen

### 6.1. Immunoassays

#### 6.1.1. Einleitung

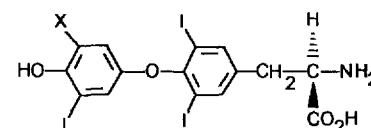
Als Yalow und Berson im Jahre 1959 den ersten Radioimmunoassay zur In-vitro-Bestimmung von Insulin entwickelten<sup>[1]</sup>, ahnten sie mit Sicherheit nicht, daß ihre Bestimmungsmethode in dieser oder in abgewandelter Form heute das bedeutendste analytische Instrument der medizinischen In-vitro-Diagnostik sein würde. Kaum noch zu überschauen ist die Vielzahl der Substanzen, deren Konzentrationen heute in den klinischen Labors mit Immunoassays routinemäßig bestimmt werden. In Tabelle 2 ist ein Teil dieser Analyte, geordnet nach Indikationsgebieten, aufgelistet.

Ihren Erfolg verdanken die immunologischen Bestimmungsmethoden in erster Linie ihrer hohen Spezifität und Sensitivität: Antikörper, die in den Immunoassays als Nachweisreagentien eingesetzt werden, sind in der Lage, geringste Strukturunterschiede auf molekularer Ebene zu erkennen (viel zitiertes Schlüssel-Schloß-Prinzip): Beispielsweise bindet ein gegen das Schilddrüsenhormon Thyroxin erzeugter Antikörper dieses mit hoher Affinität (die üblichen Gleichgewichtskonstanten liegen in der Größenordnung von  $10^{10}$ – $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup>), während der Antikörper das sich nur um ein Iodatom unterscheidende Triiodthyronin nicht erkennt (Schema 34).

Tabelle 2. Analyte einiger Indikationsgebiete, die routinemäßig mit Immunoassays bestimmt werden.

<b>Schilddrüsenerkrankungen</b>	<b>Gastrointestinaltrakt</b>
TSH (Thyreidea stimulierendes Hormon, Thyrotropin)	Calcitonin
T3 (Triiodthyronin)	C-Peptid
FT3 (nicht an Bindungsproteine gebundenes T3)	Gastrin
T4 (Tetraiodthyronin, Thyroxin)	Insulin
FT4 (nicht an Bindungsproteine gebundenes T4)	Anti-Insulin-Antikörper
TBG (Thyroxin bindendes Globulin)	Pepsinogen
Tg (Thyreoglobulin)	Trypsin
Anti-Tg (Autoantikörper gegen Tg)	Trypsin neonatal
TPO (Thyreoidale Peroxidase)	Vitamin D
Anti-TPO (Autoantikörper gegen TPO)	
TRAK (Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor)	<b>Hypertonie und Nephrologie</b>
	Aldosteron
<b>Tumorverlaufskontrolle</b>	Androstendion
AFP ( $\alpha_1$ -Fetoprotein)	Angiotensin I (Renin)
CA 50 (CA = Cancer Antigen)	Cortisol
CA 125	DHEA (Dehydroepiandrosteron)
CA 15-3	17 $\alpha$ -OH-Progesteron
CA 19-9	<b>Cardiologie</b>
CA 72-4	Digoxin
CA 754	Myoglobin
Calcitonin	
CEA (Carcinoembryonales Antigen)	<b>Bindegewbserkrankungen</b>
Cyfra 21-1	Laminin
Ferritin	NC1 (N-terminales Collagen 1)
HCG (Humanes Choriongonadotropin)	PIIIP (Procollagen-III-Peptid)
$\beta_2$ -Mikroglobulin	7S-Collagen
NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule)	<b>Infektionskrankheiten</b>
NSE (Neuronenspezifische Enolase)	HBsAg (Hepatitis B surface antigen)
Osteocalcin	HSV-Antigene
PAP (prostatic acid phosphatase)	p24-Antigen (HIV-Antigen)
Prolactin	Rotavirus-Antigene
PSA (Prostata-spezifisches Antigen)	Antikörper gegen:
SCC (squamous cell carcinoma antigen)	– FSME-Virus
TATI (Tumor-associated trypsin inhibitor)	– HBsAg
Tg (Thyreoglobulin)	– HIV 1
TPA (tissue polypeptide antigen)	– HIV 2
	– HSV
	– Masernvirus
<b>Schwangerschaft</b>	– Rotavirus
AFP ( $\alpha_1$ -Fetoprotein)	– Rubellavirus
Estriol	– Toxoplasma gondii
HCG (Humanes Choriongonadotropin)	– Varicella Zoster
Progesteron	<b>Entzündungsprozesse</b>
	$\alpha_1$ -Antitrypsin
<b>Sexualfunktionen</b>	CRP (C-reaktives Protein)
FSH (Follikelstimulierendes Hormon, Folitropin)	$\alpha_2$ -Makroglobulin
LH (Luteinisierungshormon, Lutropin)	$\alpha_1$ -saures Glycoprotein (Orosomukoid)
Progesteron	
17 $\alpha$ -OH-Progesteron	
Prolactin	
Testosteron	

Aufgrund dieser beeindruckenden Spezifität lassen sich nahezu alle Substanzen mit einem Molekulargewicht größer ca. 100 D selbst in so kompliziert zusammengesetzten Flüssigkeiten wie Serum ohne vorherige Abtrennung ähnlicher Stoffe exakt ermitteln. Moderne Marker können noch bis in den attomolaren Bereich ( $1 \text{ amol} = 10^{-18} \text{ mol}$ ) aufgespürt werden, so daß mit markierten Antikörpern die nachzuweisenden Substanzen bis in den femtomolaren Bereich ( $1 \text{ fmol} = 10^{-15} \text{ mol}$ ) exakt zu quantifizieren sind. Eine aktuelle Auflistung von fast 500 Literatur-



Schema 34. Struktur der Schilddrüsenhormone T3 (X = H; 3,3',5'-Triiod-L-thyronin) und T4 (X = I; 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin, L-Thyroxin).

stellen findet sich unter dem Titel „Bioluminescence and Chemiluminescence Literature – Immunoassays and Blotting Assays“ von O. Nozaki et al.<sup>[181]</sup>.

### 6.1.2. Einteilung

Immunoassays lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen.

**Gruppe I** – kompetitive Immunoassays mit Analyttracer:

Hierbei handelt es sich um Assays, in denen ein spezifisch gegen die zu bestimmende Substanz gerichteter Antikörper und ein den Marker tragendes Analytderivat (Analytderivattracer, meist kurz Analyttracer genannt) die Nachweisreagentien sind. Der Analyttracer darf durch seine Strukturunterschiede in bezug auf den Analyten (die unter Umständen nur im Vorhandensein des Markers bestehen) nicht soweit verändert sein, daß er vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Ferner handelt es sich um kompetitive Assays, d. h. in einer Gleichgewichtsreaktion konkurrieren Analyt und Analyttracer um die im Unterschuß vorliegenden Bindungsstellen der Antikörper (Abb. 3 a). Je ge-

**Gruppe II** – kompetitive Immunoassays mit Antikörpertracer: Wie in Gruppe I handelt es sich auch hier um ein kompetitives Verfahren. Der einzige Unterschied besteht darin, daß von den beiden Nachweisreagentien (Antikörper, Analytderivat) nicht das Analytderivat, sondern der Antikörper markiert ist (der dann als Antikörpertracer oder Tracerantikörper bezeichnet wird). Wie aus Abbildung 3 c ersichtlich, korreliert auch hier die zu bestimmende Konzentration des Analyten mit der Konzentration des Antikörpertracer-Analytderivat-Komplexes (Abb. 3 d). Zu der auch hier notwendigen Trennung der beiden markierten Komplexe siehe Abschnitt 6.1.3.

**Gruppe III** – Sandwichassays:

An die Stelle des Analytderivats bei den kompetitiven Assays tritt hier als Nachweisreagens ein zweiter Antikörper. Der Marker befindet sich an einem der beiden Antikörper. Beide Antikörper binden am Analyten an verschiedenen Stellen (Epitopen) und bilden so mit diesem einen Sandwichkomplex. Beide Antikörper werden hier im Überschuß eingesetzt, um damit das Gleichgewicht auf die Seite des Sandwichkomplexes zu verschieben (Abb. 3 e). Die günstige Gleichgewichtslage aufgrund der Reagensüberschußauslegung dieses Assayprinzips führt zu einer deutlich höheren Nachweisempfindlichkeit. Während beispielsweise mit einem kompetitiven Assay zur Bestimmung des Schilddrüsenhormons Thyrotropin eine Analytkonzentration von ca.  $1\text{--}2\text{ fmol mL}^{-1}$  nachweisbar ist, liegt die untere Nachweisgrenze im Falle eines vergleichbaren Sandwichassays bei ca.  $0.1\text{--}0.2\text{ fmol mL}^{-1}$ . Die Sandwichstrategie erlangte ihren Durchbruch mit der Möglichkeit, einheitliche Antikörper in reiner Form und in quasi beliebiger Menge zu gewinnen (monoklonale Antikörper, Nobelpreis 1984 für Köhler und Milstein)<sup>[182, 183]</sup>.

Der nahezu einzige Nachteil liegt in der eingeschränkten Anwendbarkeit dieses Assayprinzips: kleine Analyte ( $M < \text{ca. } 5\text{ kD}$ ) scheiden aus, da aus sterischen Gründen nicht gleichzeitig zwei Antikörper an sie binden können. Falls es sich beim Analyten um einen Antikörper handelt (vgl. Auflistung in Abschnitt 6.1.1; Indikation: Infektionskrankheiten), so wird der Sandwichassay in leicht modifizierter Form angewendet: Anstelle eines der beiden Nachweisantikörper tritt dann das Antigen, also z. B. ein Viruspartikel, gegen das der nachzuweisende Antikörper gerichtet ist. Der sich bildende Sandwichkomplex besteht in diesem Falle aus Antigen, Analytantikörper und Nachweisantikörper. Dabei bindet das Antigen entsprechend seiner komplementären Struktur an die Erkennungsregion des Analytantikörpers und ist somit für die Spezifität des Nachweises verantwortlich. Im Falle des Nachweisantikörpers reicht es aus, wenn dieser gegen das Strukturelement des Analytantikörpers gerichtet ist, das bei allen Antikörpern der gleichen Tierspezies (hier des Menschen) einheitlich ist (Fc-Teil). Letzteres setzt natürlich voraus, daß die im Blut des Patienten vorhandenen Antikörper, die gegen völlig andere Antigene gerichtet sind, nicht einen bedeutsamen Anteil des Nachweisantikörpers „abfangen“. In der Praxis können derartige Komplikationen jedoch durch Wahl einer entsprechend hohen Konzentration des Nachweisantikörpers oder durch eine sogenannte Zwei-Schritt-Durchführung des Assays leicht umgangen werden. Die auch hier vor der Messung erforderliche Trennung von Sandwichkomplex und überschüssigem Tracer wird in Abschnitt 6.1.3 behandelt.

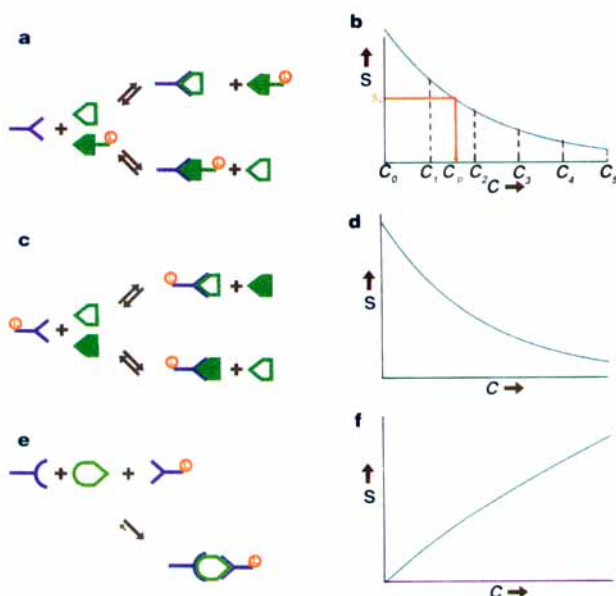


Abb. 3. Prinzip der drei wichtigsten Immunoassay-Methoden (links) mit den dazugehörigen Standardkurven (rechts). Links: blau = Antikörper, grün = Analyt (offen) bzw. Analytderivat (geschlossen), rot = Label. Rechts:  $c$  = Analytkonzentration,  $P$  = unbekannte Probe,  $S$  = Signal, das vom Antikörper-Analyt-tracer-Komplex (a, b), vom Antikörpertracer-Analytderivat-Komplex (c, d) bzw. vom Sandwichkomplex (e, f) abgegeben wird. Die hier und im folgenden gewählte schematische Darstellung eines Antikörpers berücksichtigt nicht die Existenz mehrerer (im Falle der Antikörperklasse IgG: zwei) Bindungsstellen.

ringer die Konzentration des Analyts in der zu untersuchenden Probe ist, umso mehr Antikörper-Analyttracer-Komplexe können sich bilden. Mit Hilfe einer Eichkurve, erstellt mit Proben bekannter Analytkonzentrationen, läßt sich die Analytkonzentration einer unbekannten Probe exakt ermitteln (Abb. 3 b). Wie aus Abbildung 3 a ersichtlich ist, erfordert die selektive Messung des vom Antikörper-Analyttracer-Komplex ausgesandten Signals eine vorherige Abtrennung des frei vorliegenden Analyttracers. Derartige Trennmethoden werden in Abschnitt 6.1.3 behandelt.

Auf die einzelnen Varianten innerhalb dieser Gruppen (kalte und heiße Vorinkubation, Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Durchführung, Doppelantikörpermethode), sowie auf Immunoassays, die ohne Tracer arbeiten<sup>[18a]</sup>, kann hier nicht eingegangen werden.

#### Begriffsdefinitionen:

In kaum einem anderen Bereich herrscht ein derartiges Wirrwarr an Begriffen und Abkürzungen wie auf dem Gebiet der Immunoassays. Der wohl bekannteste Ausdruck ist der Radioimmunoassay (RIA). Leider wird er häufig für zwei verschiedene Sachverhalte verwendet. Zum einen steht er für die kompetitiven Immunoassays mit radioaktivem Analyttracer, also für den in Gruppe I beschriebenen Assaytyp, zum anderen wird er auch häufig als Oberbegriff für sämtliche Immunoassays mit radioaktivem Marker verwendet. Gleiches gilt für den Enzymimmunoassay (EIA), den Fluoreszenzimmunoassay (FIA) und den Lumineszenz- und Chemilumineszenzimmunoassay (LIA bzw. CIA), die sich vom RIA nur in der Art des Markers unterscheiden. Eine ähnliche Mehrdeutigkeit liegt beim sehr häufig verwendeten Akronym ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) vor. Es wird von einigen Autoren für die Reagensüberschußassays (Gruppe III) mit Enzymmarker reserviert, von anderen ganz allgemein für sämtliche Immunoassays mit Enzymmarker verwendet.

So wie XIA (RIA, EIA, FIA, LIA, CIA) im engeren Sinne Assays der Gruppe I bezeichnet, hat Gruppe II kein allgemein akzeptiertes Kürzel. Jedoch findet man hier sehr häufig den Ausdruck SPALT (solid phase antigen luminescence technique). Er beschreibt einen Assay der Gruppe II mit luminogenem Marker, bei dem eine ganz bestimmte, aber sehr häufig eingesetzte Technik zur Abtrennung des überschüssigen Antikörpertracers eingesetzt wird (siehe Abschnitt 6.1.3).

Ein Synonym für den Sandwichassay (Gruppe III) ist der Ausdruck 2-site IXMA; er steht für Immuno-x...metrischer Assay (Beispiel: IRMA: Immunoradiometrischer Assay; ILMA: Immunoluminometrischer Assay). Die Bezeichnung immunometrisch will zum Ausdruck bringen, daß es sich im Gegensatz zu den kompetitiven Assays um einen Reagensüberschußassay handelt. Leider ist auch hier die Bezeichnung nicht einheitlich. So wird die Gruppe II trotz ihres kompetitiven Charakters von einigen Autoren mit dem Ausdruck 1-site IXMA belegt. Streng genommen handelt es sich jedoch beim 1-site IXMA um einen sehr seltenen Assaytyp, der zwar die gleichen Nachweisreagentien benutzt wie Gruppe II (Analytderivat und Antikörpertracer), den Antikörpertracer jedoch im Überschuß einsetzt und nicht den Komplex aus Analytderivat und Antikörpertracer mißt, sondern den Komplex aus Analyt und Antikörpertracer.

#### 6.1.3. Trennmethoden

Wie bereits erwähnt, erfordert die selektive Messung des markierten Immunkomplexes eine vorherige Abtrennung des frei vorliegenden Analyttracers (im Falle der Gruppe I), des nicht am Analytderivat gebundenen Antikörpertracers (Gruppe II) oder des frei vorliegenden Antikörpertracers (Gruppe III).

Die ersten Trennmethoden beinhalteten noch recht aufwendige Arbeitsschritte, z.B. chromatographische oder elektrophoretische Verfahren. Wesentlich handhabungsfreundlicher, aber

aus heutiger Sicht ebenfalls antiquiert erweisen sich die Methoden, bei denen der Immunkomplex durch Zusatz von Salzen oder organischen Lösungsmitteln ausgefällt oder freier Analyttracer durch Zugabe von Aktivkohle oder Ionenaustauscherharz adsorbiert wird. Der hierbei noch erforderliche Zentrifugationsschritt macht diese Methoden heute nicht mehr konkurrenzfähig.

Die modernen Verfahren bedienen sich meist einer Festphase. Im einfachsten Falle handelt es sich dabei um Kunststoffröhrchen, deren Innenwand bereits mit einem der Nachweisreagentien beschichtet ist (coated tubes). Diese Röhrchen dienen gleichzeitig als Reaktionsgefäß für die immunologische Nachweisreaktion. Die Trennung unmittelbar vor der Messung reduziert sich hier auf ein Ausgießen oder Absaugen der Reaktionslösung (Abb. 4).

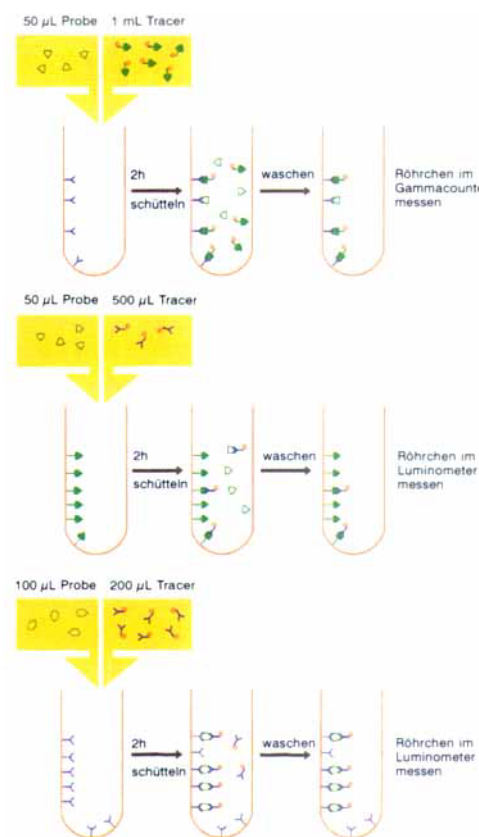


Abb. 4. Beispiele zur Durchführung kommerzieller Immunoassays auf Coated-tube-Basis: RIA-gnost T3 (oben), ein RIA und BerLux T3 (Mitte), ein SPALT-Assay zur Bestimmung von Triiodthyronin (T3), sowie BerLux TSH (unten), ein 2-site-ILMA zur Bestimmung des Thyreoidea stimulierenden Hormons (TSH) in Serum.

Die Beschichtung der Festphase erfolgt im einfachsten Falle durch direkte Adsorption des Nachweisreagens, indem die Festphase mehrere Stunden mit einer Lösung des Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird. Unter geeigneten Bedingungen ist die adsorptive Bindung so fest, daß sie durch Waschen der Festphase nicht gelöst wird. Die Bindung kann auch über ein besonders gut auf der Festphase adsorbierendes Ankerprotein erfolgen, an das das Nachweisreagens mit difunktionellen Reagentien kovalent gebunden wird<sup>[24]</sup>. Häufig wird auch ein Antikörper an die



Festphase fixiert, der einen Molekülteil erkennt, der in allen Antikörpern einer anderen Tierart vorkommt, beispielsweise ein aus Kaninchen gewonnener Antikörper, der gegen den Fc-Teil von Maus-Antikörpern gerichtet ist. Auf diese Weise lassen sich auch Antikörper mit einer Festphase verankern, die für eine direkte Adsorption weniger gut geeignet sind. Weitere derartige universelle Festphasen beruhen auf den hochaffinen Bindungen zwischen Biotin und Avidin (Streptavidin)<sup>[34]</sup> sowie zwischen Fluorescein und Anti-Fluorescein-Antikörpern<sup>[184]</sup> (Abb. 5).

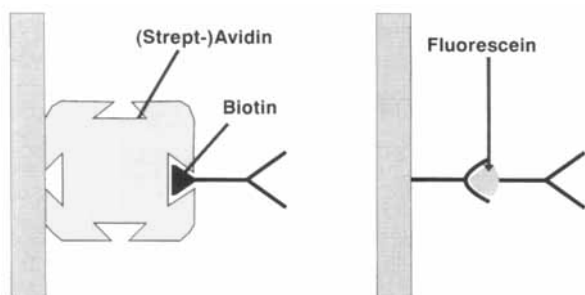


Abb. 5. Die Bindung eines Nachweisreagens (hier eines Antikörpers) an eine Festphase kann mit Hilfe des (Strept-)Avidin/Biotin-Systems erfolgen (links): Der zuvor biotinylierte Antikörper wird durch das an der Festphase adsorbierte (Strept-)Avidin fixiert. Eine ähnliche Verankerungsmethode beruht auf der festen Bindung zwischen Fluoresceingruppen und gegen sie gerichtete Antikörper (rechts).

Anstelle beschichteter Röhrchen sind auch andere beschichtete Festphasen (Kunststoffkügelchen, Magnetpartikel, Membranen) gebräuchlich. Auch diese können, analog Abbildung 4, unmittelbar an der Immunreaktion beteiligt sein oder auch nur eine reine Trennfunktion erfüllen. Im letzteren Fall findet die Immunreaktion in homogener flüssiger Phase statt (was gewisse Vorteile hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich bringt), und die Trennfunktion der Festphase wird erst nach Ablauf der Reaktion „eingeschaltet“ (Abb. 6).

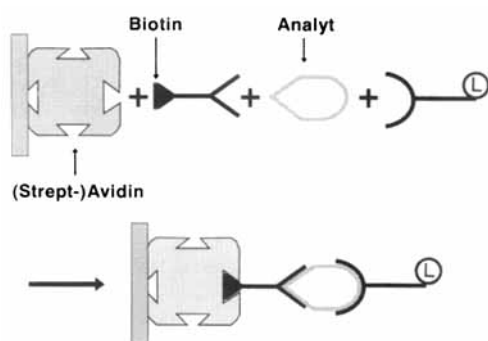


Abb. 6. Nach Ablauf der Reaktion zwischen biotinyliertem oder mit FITC markiertem Antikörper, Analyt und Antikörpertracer in flüssiger Phase wird die mit (Strept-)Avidin bzw. Anti-Fluorescein-Antikörper beschichtete Festphase zugegeben und damit der Sandwichkomplex an die Festphase fixiert.

Beim OPUS-System<sup>[185]</sup> erfolgt die Trennung von selbst. Die gesamte Immunreaktion spielt sich in einem Testmodul ab, das etwa die Größe von zwei Würfelzuckerstücken hat. Wesentlicher Bestandteil ist ein lichtdurchlässiger Polyesterfilm, auf dessen Oberfläche sich drei Agaroseschichten befinden. In der unteren

ren, 1 µm dicken Schicht sind Komplexe aus Antikörper und fluoreszenzmarkierten Analytderivat eingebettet. Die Serumprobe wird auf die oberste, 10 µm dicke Schicht aufgetragen. Die in der Probe enthaltenen Analytmoleküle diffundieren bis in die unterste Schicht, wo sie – je nach Konzentration – mehr oder weniger viele Tracermoleküle aus den Antikörperbindungsstellen verdrängen. Zusätzliche Reagentien wie wässrige Lösungsmittel sind hier nicht erforderlich. Während die Antikörper aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind, die untere Schicht zu verlassen, können die freigesetzten Tracermoleküle in die beiden oberen Schichten diffundieren. Die in der untersten Schicht verbliebenen Antikörper-Tracer-Komplexe werden über Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Lichtquelle und Detektor befinden sich unterhalb des Testmoduls. Die mittlere, 10 µm dicke Agaroseschicht wirkt aufgrund ihres Eisenoxidgehaltes als optischer Filter und verhindert, daß die freigesetzten Tracermoleküle, die die untere Schicht verlassen haben, mitgemessen werden.

Völlig ohne Trennschritt kommen die reinen homogenen Assays aus. Grundlage hier ist ein sich durch die Bildung des Immunkomplexes veränderndes Signal. Der erste Assay dieser Art wurde 1971 von Rubenstein und Ullman vorgestellt<sup>[186a]</sup>. Bei diesem EMIT-Verfahren (enzyme-modulated immunoassay technology) handelt es sich um einen EIA, bei dem die enzymatische Aktivität des Enzymlabels durch Bindung an den Antikörper gestört wird (Abb. 7). Ein anderes Beispiel eines homogenen Assays unter Nutzung des Chemilumineszenzenergietransfers zeigt Abbildung 8. Nachteile der auf den ersten Blick

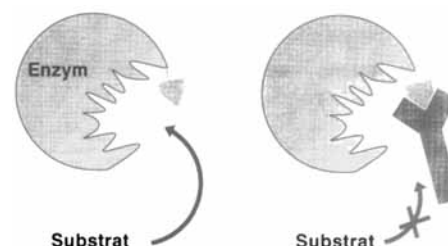


Abb. 7. Beim EMIT-Verfahren verhindert ein am Analyttracer (mit Enzym markiertes Analytderivat) gebundener Antikörper die katalytische Umsetzung des Substrats (z.B. eines Chromogens) durch das Enzym, z.B. durch sterische Blockade des katalytischen Zentrums.

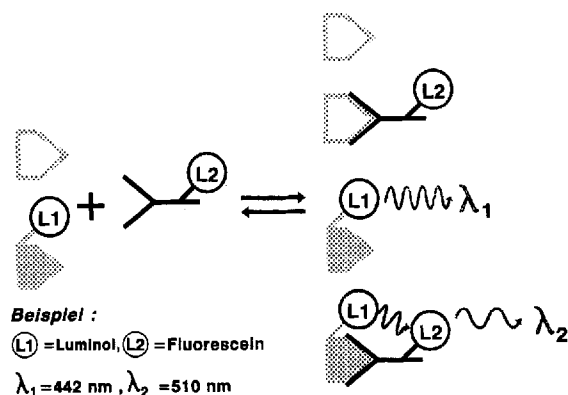


Abb. 8. Beispiel eines homogenen LIA: Der durch den geringen Abstand beider Marker L1 und L2 ermöglichte Energietransfer führt zur elektronischen Anregung von L2. Somit korreliert die Intensität des von L2 emittierten Lichts mit der Analytkonzentration.



besonders eleganten homogenen Assays sind eine geringere Nachweisempfindlichkeit und eine stärker ausgeprägte Störanfälligkeit.

## 6.2. Gensondentests

Während die Analyte immunologischer Bestimmungsmethoden letzten Endes Produkte einer genetischen Information sind, stellen Nucleinsäuresequenzen die Information selbst dar. Die qualitative und quantitative Bestimmung auf dieser ersten Stufe gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Die derzeit wichtigste Anwendung ist der Nachweis pathogener Organismen (Bakterien, Viren)<sup>[187]</sup>. Ein besonders großer Vorteil besteht darin, daß durch die Detektion der Nucleinsäuresequenzen nicht nur aktive virale Infektionen erfaßbar sind, sondern auch latente. So lassen sich beispielsweise Infektionen mit dem AIDS-Virus bereits in der Inkubationsphase seronegativer Patienten nachweisen. Auch die Kontrolle von Blutkonserven auf HIV, HTLV-I, Hepatitis B etc. ist über den Nachweis der entsprechenden Nucleinsäuresequenzen sicherer als mit einem immunologischen Test.

Eine Reihe von Erbkrankheiten wie Diabetes mellitus, Lesch-Nyhan-Syndrom, Phenylketonurie und Sichelzell-Anämie lassen sich durch das Aufspüren der mutierten Gene zuverlässig nachweisen<sup>[188]</sup>, ebenso wie die Aktivierung verschiedener Onkogene, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind<sup>[189]</sup>. In der Gerichtsmedizin dient der Nachweis von Nucleinsäuresequenzen der Aufklärung von Sexualverbrechen und zum Vaterschaftstest<sup>[190]</sup>.

Anders als bei den Immunoassays werden hier keine Antikörper als direkte Nachweisreagentien eingesetzt, sondern relativ kurze, meist synthetische Nucleinsäuresequenzen (sogenannte Gensonden, engl.: gene probes), die komplementär zu einem Teilstück des Analyten (der sogenannten Zielsequenz, engl.: target) sind (Abb. 9). Diese hybridisieren mit der Zielsequenz, d. h. sie verbinden sich mit ihr zu einem Doppelstrang, der über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten wird.

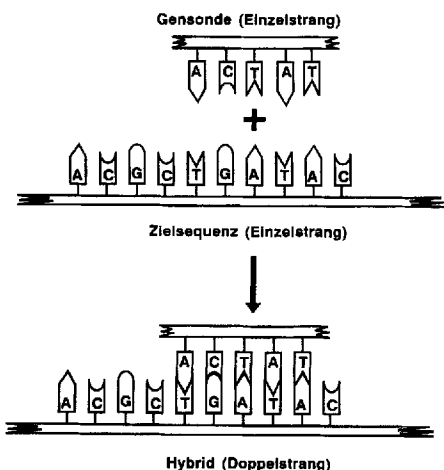


Abb. 9. Die Affinität zweier Nucleinsäureketten zueinander beruht auf komplementären Basenpaaren: Adenin (A) bindet an Thymin (T) oder Uracil (U), Cytosin (C) bindet an Guanin (G). Die Bindung erfolgt über Wasserstoffbrücken. Die verwendeten Gensonden sind in der Regel 15–30 Nucleotide lang.

Bei dem nach seinem Erfinder benannten Southern-Blot-Verfahren<sup>[191]</sup> wird die DNA, auf der die nachzuweisende Sequenz vermutet wird, zunächst mit Restriktionsenzymen in definierte Bruchstücke zerschnitten. Diese werden elektrophoretisch getrennt und die Banden vom Elektrophoresegel auf einen geeigneten Träger (z.B. Nitrocellulose) transferiert, ohne daß dabei deren relative Lage zueinander verändert wird. Durch Erhitzen werden die einzelnen als Doppelstrang vorliegenden DNA-Fragmente denaturiert, d. h. in ihre Einzelstränge aufgespalten, um sie somit einer Hybridisierung mit der markierten Sonde zugänglich zu machen. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht unter anderem darin, daß durch den Einsatz unterschiedlicher Sonden gleichzeitig mehrere Nucleinsäuresequenzen aufgespürt werden können.

Die Sichtbarmachung der mit den Sonden hybridisierten Fragmente kann beispielsweise durch Auflegen eines fotografischen Films geschehen. Die Belichtungszeit hängt dabei stark von dem verwendeten Marker ab. Bei den früher fast ausschließlich eingesetzten <sup>32</sup>P-Isotopen waren Wartezeiten von mehreren Wochen keine Seltenheit. Durch den Einsatz moderner luminogener Marker können diese Belichtungszeiten drastisch verkürzt werden. Ohne fotografischen Film kommen Methoden aus, die fluoreszierende Marker verwenden. Zudem bieten sie den Vorteil, durch den gleichzeitigen Einsatz unterschiedlicher Marker verschiedenfarbige Lichtsignale empfangen zu können. Dies kann die Unterscheidung sich elektrophoretisch ähnlich verhaltender DNA-Fragmente erheblich erleichtern.

In Analogie zu den Immunoassays existieren auch entsprechende Gensondentests. Das Pendant eines 2-site IXMA<sup>[192]</sup> zeigt Abbildung 10. Ein Analogon zum kompetitiven Immu-

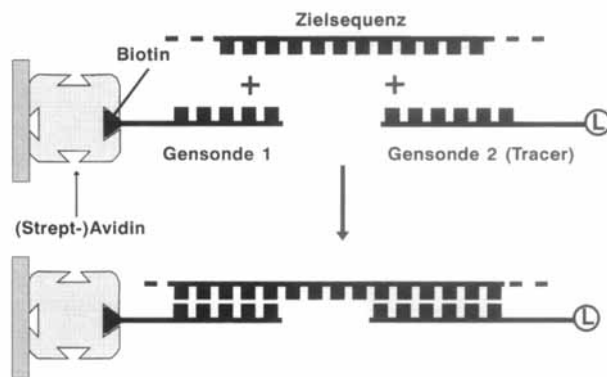


Abb. 10. Das dem 2-site IXMA entsprechende Pendant auf dem Gensonden-Gebiet.

noassay stellt der Strand-Displacement-Assay<sup>[193]</sup> (Abb. 11) dar. Der einzige prinzipielle Unterschied zu dem in Abschnitt 6.1.2 (Gruppe I) vorgestellten XIA besteht darin, daß die markierte Gensonde (entspricht dem Analytderivattracer beim XIA) und die Zielsequenz (Analyt) nicht gleichzeitig um die festphasengebundene Sonde (entspricht dem Antikörper beim XIA) konkurrieren, sondern daß dem Tracer ein zeitlicher Vorsprung gewährt wird (Prinzip der heißen Vorinkubation; eine auch beim XIA nicht unübliche Durchführungsvariante).

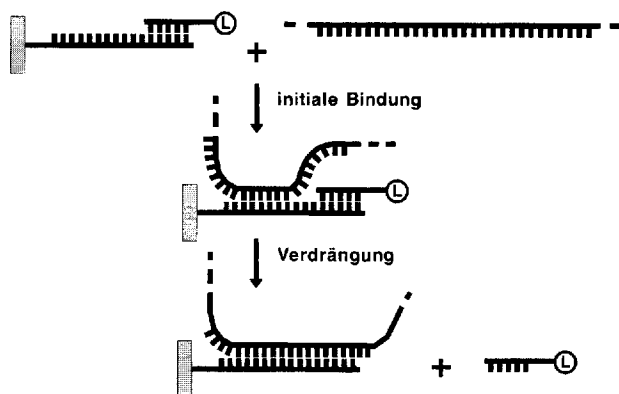


Abb. 11. Prinzip des Strand-displacement-Assays.

Die Übertragung von Techniken aus dem Bereich der Immunoassays hat auch zu homogenen Gensondentests geführt. Bei den kissing probes (Abb. 12) binden zwei markierte Sonden an der Zielsequenz so nahe aneinander, daß ihre Label in Wechselwirkung treten können. Die nur auf diese Weise eintretende Signaländerung kann daher als äußerst spezifisch angesehen werden.

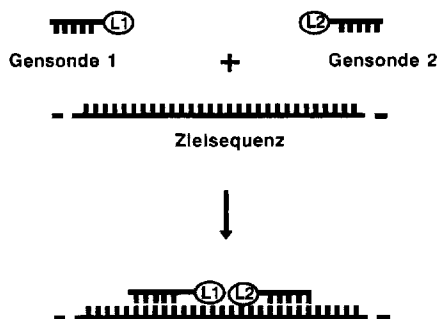


Abb. 12. Prinzip der „kissing probes“.

Die Eigenschaft der Acridiniumlabel, in einen Nucleinsäuredoppelstrang zu interkalieren und dadurch vor dem Angriff nucleophiler Reagentien geschützt zu sein, ermöglicht die Unterscheidung zwischen einzelstrang- und doppelstranggebundenem Marker. Dies macht man sich im hybridization protection assay<sup>[194]</sup> zunutze.

Ein revolutionärer Fortschritt in der Empfindlichkeitssteigerung der Gensondenteste gelang mit der PCR-Methode (Polymerase Chain Reaction)<sup>[195]</sup>, deren Entwicklung mit der Verleihung des Nobelpreises an K. B. Mullis im Jahre 1993 gewürdigt wurde. Die Grundidee ist originell und einfach zugleich. Während fast alle Versuche zur Verbesserung der unteren Nachweisgrenze auf eine Erhöhung der Signalintensität und eine Verringerung des Untergrundsignals ausgerichtet sind, also den Tracer im Visier haben, wird bei der PCR-Methode die Zielsequenz vor ihrer Bestimmung selektiv vervielfältigt (!), und dies zudem auf einfache Weise: Zunächst wird die als DNA-Doppelstrang vorliegende Zielsequenz durch Hitzedenaturierung in ihre beiden Einzelstränge zerlegt. Beide werden nun mit komplementären Oligonucleotiden hybridisiert und diese anschließend enzymatisch am 3'-Ende mit Desoxynucleotidtriphosphaten

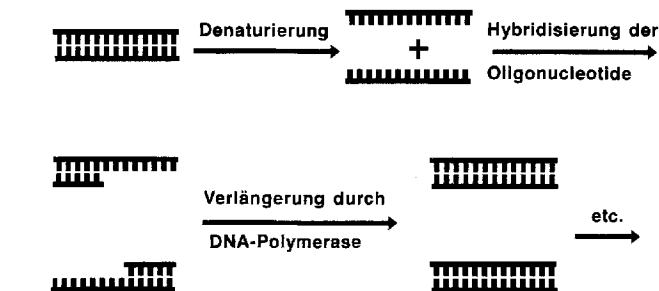


Abb. 13. PCR-Methode.

verlängert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt (Abb. 13). Bereits nach 20 Cyclen hat man die Zielsequenz 100 000fach amplifiziert.

## 7. Ausblick

Auch wenn eine über Monate hinweg strahlende  $\gamma$ -Quelle zur Aussendung eines häufig nur für Sekunden benötigten Signals wohl alles andere als zeitgemäß ist (es drängt sich einem unwillkürlich das viel zitierte „mit Kanonen auf Spatzen schießen“ auf), so sprechen doch nicht nur ökologische Argumente für einen Ersatz radioaktiver Marker. Mit den heute zur Verfügung stehenden Markierungsalternativen werden nämlich die radioaktiven Marker in puncto Nachweisempfindlichkeit zum Teil deutlich übertroffen. Warum ist dann aber der RIA nicht schon längst tot? Ein wesentlicher Vorteil des RIA ist untrennbar mit einem seiner – aus ökologischer Sicht – größten Nachteile verknüpft, der Emission energiereicher Strahlung: Zusammen mit der etwa 30jährigen Erfahrung, die auf dem RIA-Gebiet vorliegt, führt sie zu einer außerordentlichen „Robustheit“ dieser Methode. So ist beispielsweise eine Beeinflussung des Tracers durch seine unmittelbare Umgebung (Matrixeffekte) im Falle radioaktiver Marker in den seltensten Fällen erkennbar. Ferner wird das Signal weder in seinem Absolutbetrag noch in seiner Konstanz von den meisten äußeren Faktoren beeinflusst. Auch die Markierung kleiner Analytderivate durch ein Isotop wird zwangsläufig dessen Eigenschaften weniger verändern als die Einführung eines sterisch anspruchsvollen Labels. Es ist somit verständlich, daß die Verdrängung der radioaktiven Methoden kein abrupter Vorgang ist, sondern eher ein schleichernder Prozeß, der durch stetigen Zugewinn an Erfahrung im Umgang mit nichtradioaktiven Markern und mit der Synthese noch effektiverer Marker in Gang gehalten wird. Da die leistungsfähigsten Lumineszenzmarker und luminogenen Enzymsubstrate erst seit wenigen Jahren zur Verfügung stehen, ist wohl erst für die kommenden Jahre mit einer Beschleunigung des bisher langsamen Substitutionsprozesses von Radioisotopen zu rechnen.

*Wir danken allen Kolleginnen und Kollegen für hilfreiche Diskussionen bei der Abfassung und Korrektur des Manuskripts sowie Herrn R. Kaske für die Übermittlung von Marktdaten, Frau J. Bruchmann und Frau N. Laloi für die Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts. Unser besonderer Dank gilt Herrn A. Kraft für die Anfertigung der Abbildungen in Kapitel 6.*

Eingegangen am 23. Juli 1993 [A 10]

- [1] R. S. Yalow, S. A. Berson, *J. Clin. Invest.* **1959**, 38, 1996; *ibid.* **1960**, 39, 1157.
- [2] H. G. Eckert, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 565; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 525.
- [3] *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**.
- [4] a) B. J. Gould, V. Marks in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 3–26; b) E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, 8, 871; *J. Immunol. Methods* **1971**, 10, 161.
- [5] M. E. Jolley, C. J. Wang, S. J. Ekenberg, M. S. Zuelke, D. M. Kelso, *J. Immunol. Methods* **1984**, 67, 21.
- [6] a) E. Soini, I. Hemmälä, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1979**, 25, 353; b) I. Hemmälä, *ibid.* **1985**, 31, 359.
- [7] a) I. A. Hemmälä, *App. Fluoresc. Technol.* **1989**, 1 (4), 1; b) I. Wieder in *Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Proceedings of the VIth International Conference on Immunofluorescence and Related Staining Techniques* (Hrsg.: W. Knapp, K. Holubar, G. Wick), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, **1978**, S. 67–80; c) A. A. Lamola, J. Flores, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2530; G. L. Landen, Y.-T. Tark, D. A. Lightner, *Tetrahedron* **1983**, 39, 1893.
- [8] R. A. Mathies, L. Stryer in *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences* (Hrsg.: D. L. Taylor, A. S. Waggoner, R. F. Murphy, F. Lanni, A. S. Birge), Alan R. Liss, New York, **1988**, S. 129–140.
- [9] A. K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, 1. Aufl., VCH/Horwood, Weinheim/Chichester, **1988**.
- [10] I. Weeks in *Comprehensive Analytical Chemistry, Chemiluminescence Immunoassay* (Hrsg.: G. Svehla), Elsevier, New York, **1992**, S. 87.
- [11] S. Albrecht, H. Brandl, W. Adam, *Chem. Unserer Zeit* **1990**, 24, 227.
- [12] H. R. Schroeder in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 547.
- [13] L. J. Kricka, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1991**, 37, 1472.
- [14] S. Albrecht, H. Brandl, W. Adam, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, 40, 547.
- [15] S. Albrecht, H. Brandl, C. Schönfels, W. Adam, *Chem. Unserer Zeit* **1992**, 26, 63.
- [16] Daten der Marktforschung der Behringwerke AG, Marburg.
- [17] a) *Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules* (Hrsg.: C. Kessler), Springer, Berlin, **1992**; b) *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis* (Hrsg.: W. R. G. Baeyens, D. De Keukeleire, K. Korkidis), Dekker, New York, **1991**; c) K.-D. Gundermann, F. McCapra, *Chemiluminescence in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1987**; d) *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. 1* (Hrsg.: K. Van Dyke), CRC, Boca Raton, FL, **1985**; e) *Chemiluminescence* (Hrsg.: J. G. Burr) (*Methods Enzymol.* **1978**, 57), f) S. Bogdanov, *Clinica – New Horizons in Immunoassay*, PJB Publications, Richmond, UK, **1990**; g) *Immunoassays for Trace Chemical Analysis – Monitoring Toxic Chemicals in Humans, Food and the Environment* (ACS Symp. Ser. **1990**, 451); h) *Immunochemical Methods for Environmental Analysis* (ACS Symp. Ser. **1991**, 442).
- [18] a) J. P. Gosling, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1990**, 36, 1408; b) P. E. Stanley, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1992**, 7, 77; c) *ibid.* **1992**, 7, 157; d) *ibid.* **1993**, 8, 51; (Übersicht zu kommerziellen Luminometern; Photographien der Geräte; Übersicht zu kommerziellen Bio- und Chemilumineszenz-Diagnostik-Kits und Reagentien); e) W. Adam in *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A15* (Hrsg.: B. Elvers, S. Hawkins, G. Schulz), 5. Aufl., VCH, Weinheim, **1990**, S. 548; f) J. W. Freytag, *J. Clin. Immunoassay* **1991**, 14, 239; g) K. Miyai, *Adv. Clin. Chem.* **1985**, 24, 61; h) B. S. Reckmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1989**, 37, 692; i) E. Wieland, E. Wilder-Smith, H. Kather, *Aerzil. Lab.* **1985**, 31, 203; j) W. G. Wood, *Laboratoriumsmedizin* **1989**, 13, 345; k) S. Baudner, R. M. Dreher, *Lebensmittelchem. Gerichth. Chem.* **1991**, 45, 53; l) U. Obst, *GIT Fachz. Lab.* **1991**, 35, 1202; m) J. Sherma, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 118R; n) L. Weil, R. Nießner, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1991**, 39, 1277; o) C. Wittmann, B. Hock, *ibid.* **1991**, 39, M1; p) J. M. Van Emon, V. Lopez-Avila, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 79.
- [19] a) *Römp-Chemie-Lexikon* (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1990**; b) *McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology*, 6. Aufl., McGraw-Hill, New York, **1987**.
- [20] A. K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, 1. Aufl., VCH/Horwood, Weinheim/Chichester, **1988**, S. 429.
- [21] G. Zomer, J. F. C. Stavenhuter, *Anal. Chim. Acta* **1989**, 227, 11.
- [22] E. Wünsch, *Synthese von Peptiden, Teil I* (*Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl) 4th ed. 1952–*, Bd. XV/1, **1974**, S. 28).
- [23] Y. S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* **1972**, 453.
- [24] H. Ji. Tae, *Enzyme Structure (Methods Enzymol.)* **1983**, 91, 580).
- [25] A. K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, 1. Aufl., VCH/Horwood, Weinheim/Chichester, **1988**, S. 439.
- [26] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1839.
- [27] G. Wendtberger, P. Stelzel, *Synthese von Peptiden, Teil II (Methoden Org. Chem.) (Houben-Weyl) 4th ed. 1952–*, Bd. XV/2, **1974**.
- [28] Hoechst AG, unveröffentlicht.
- [29] S. Batmanghelich, R. C. Brown, J. S. Woodhead, I. Weeks, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, 12, 193.
- [30] E. Koller, *Appl. Fluoresc. Technol.* **1989**, 1 (2), 1.
- [31] E. Ishikawa, S. Hashida, T. Kohno, K. Tanaka in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 27.
- [32] H. R. Schroeder, C. M. Hines, P. O. Vogelhut in *Bioluminescence and Chemiluminescence – Basic Chemistry and Analytical Applications* (Hrsg.: M. De Luca, W. D. McElroy), Academic Press, New York, **1981**, S. 55.
- [33] T. Kinkel, A. Mayer, S. Neuenhofer, R. Oekonomopoulos (Hoechst AG), EP-A 0442372, **1991**.
- [34] a) J.-L. Guesdon, *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, 27, 1131; b) R. Zahradnik, G. Brennan, J. S. Hutchison, W. D. Odell, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1989**, 35, 804; c) E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *ibid.* **1991**, 37, 625.
- [35] A. K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, Horwood, Chichester, **1988**, S. 261.
- [36] B. M. Krasovitskii, B. M. Bolotin, *Organic Luminescent Materials*, VCH, Weinheim, **1988**, S. 251.
- [37] K.-D. Gundermann, *Top. Curr. Chem.* **1974**, 46, 61.
- [38] a) B. K. van Weeman, A. H. W. M. Schuurs, *FEBS Lett.* **1971**, 15, 232; b) A. H. W. M. Schuurs, B. K. van Weeman (Akzona), US-A 3791932 **1974**; c) M. Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1984**, 22, 895.
- [39] G. G. Guilbault, P. J. Brignac, Jr., M. Juneau, *Anal. Chem.* **1968**, 40, 1256.
- [40] K. Zaitzu, Y. Ohkura, *Anal. Biochem.* **1980**, 109, 109.
- [41] E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, *Dev. Immunol.* **1983**, 18, 219.
- [42] M. Imagawa, S. Hashida, Y. Ohta, E. Ishikawa, *Ann. Clin. Biochem.* **1984**, 21, 3107.
- [43] E. Ishikawa, *Clin. Biochem.* **1987**, 20, 375.
- [44] L. K. Pyare in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 219.
- [45] a) M. J. Cormier, P. M. Prichard, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 4706; b) L. Ewetz, A. Thore, *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 546; c) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji, *ibid.* **1979**, 248; d) A. D. Pronovost, A. Baumgarten, *Experientia* **1982**, 38, 304; e) K.-D. Gundermann, K. Wulff, R. Linke, F. Strahler in *Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry* (Hrsg.: M. Serio, M. Pazzagli), Raven, New York, **1982**, S. 157; f) J. H. Baxendale, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1973**, 69, 1665; g) G. Merenyi, J. Lind, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5830; h) T. E. Eriksen, J. Lind, G. Merenyi, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1981**, 77, 2125; i) *ibid.* **1981**, 77, 2137; j) *ibid.* **1983**, 79, 1493; k) *ibid.* **1983**, 79, 1503; l) J. Lind, G. Merenyi, T. E. Eriksen, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7655; m) S. Ljunggren, G. Merenyi, J. Lind, *ibid.* **1983**, 105, 7622; n) G. Merenyi, J. Lind in *5th Symposium on Radiation Chemistry* (Hrsg.: J. Dobo, R. Schiller, P. Hedvig), Akademiai Kiado, Budapest, **1983**, S. 103; o) G. Merenyi, J. Lind in *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* (Hrsg.: L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead), Academic Press, Orlando, FL, **1984**, S. 569; p) G. Merenyi, J. Lind, T. E. Eriksen, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 2320; q) *Photochem. Photobiol.* **1985**, 41, 203; r) *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7716; s) in *6th Symposium on Radiation Chemistry* (Hrsg.: J. Dobo, R. Schiller, P. Hedvig), Akademiai Kiado, Budapest, **1986**, S. 143; t) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, *Methods Enzymol.* **1986**, 133, 331; u) G. Messeri, A. Orlandini, M. Pazzagli, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 154; v) G. Merenyi, J. Lind, T. E. Eriksen, *ibid.* **1990**, 5, 53.
- [46] a) T. J. N. Carter, C. J. Groucutt, R. A. W. Stott, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead (National Institutes of Health), EP-A 0087959, **1982**; b) L. S. Kricka, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead (National Institutes of Health), EP-A 0116454, **1983**; c) G. H. G. Thorpe, E. Gillespie, R. Haggart, L. J. Kricka, T. P. Whitehead in *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* (Hrsg.: L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead), Academic, Orlando, FL, **1984**, S. 243; d) G. H. G. Thorpe, R. Haggart, L. J. Kricka, T. P. Whitehead, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 119, 481; e) G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead, R. Penn, L. J. Kricka, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1984**, 30, 806; f) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, E. Gillespie, S. Moseley, R. Amess, N. Baggett, T. P. Whitehead, *Anal. Biochem.* **1985**, 145, 96; g) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, S. B. Moseley, T. P. Whitehead, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1985**, 31, 1335; h) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, *Methods Enzymol.* **1986**, 133, 331; i) C. van Dyke, K. van Dyke, B. Caterson, C. Szustkiewicz, A. Reich, *Fed. Proc.* **1986**, 45, 732; j) *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives* (Hrsg.: J. Schölmacher, R. Andreesen, A. Kapp, M. Ernst, W. G. Woods), Wiley, Chichester, **1987**; k) G. H. G. Thorpe, R. A. W. Stott, G. M. Sankolli, D. Catty, C. Raykundalia, A. Roda, L. J. Kricka in [46], S. 209; l) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka in [46], S. 199; m) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 3, 97; n) S. B. Vlasenko, A. A. Arefyev, A. D. Klimov, B. B. Kim, E. L. Gorovits, A. P. Osipov, E. M. Gavrilova, A. M. Yegorov, *ibid.* **1989**, 4, 164.
- [47] a) A. P. Schaap (Wayne State University, Detroit), US-A 887139, **1986**; b) A. P. Schaap, R. S. Handley, B. P. Giri, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 935; c) A. P. Schaap, T. S. Chen, R. S. Handley, R. De Silva, B. P. Giri, *ibid.* **1987**, 28, 1155; d) A. P. Schaap, M. P. Sandison, R. S. Handley, *ibid.* **1987**, 28, 1159; e) I. Bronstein, Tropix Inc., „Method of detecting a substance using enzymatically-induced decomposition of dioxetanes“, WO 88/00695, GO1N21/76, **1988**; „Synthesis of 1,2-Dioxetanes and Intermediates therefrom“ WO 89/06226, CO7C 41/01, **1989**; f) I. Bronstein, B. Edwards, J. C. Voyta, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 99; g) I. Bronstein, L. J. Kricka, *J.*

- Clin. Lab. Anal.* **1989**, 3, 316; h) I. Bronstein, P. McGrath, *Nature* **1989**, 338, 599; i) I. Bronstein, J. C. Voyta, G. H. Thorpe, L. J. Kricka, G. Armstrong, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1989**, 35, 1441; j) A. P. Schaap, H. Akhavan, L. J. Romano, *ibid.* **1989**, 35, 1863; k) G. H. Thorpe, I. Bronstein, L. J. Kricka, B. Edwards, J. C. Voyta, *ibid.* **1989**, 35, 2319; l) I. Bronstein in *Luminescence Immunoassay and Molecular Applications* (Hrsg.: K. van Dyke, R. van Dyke), CRC, Boca Raton, **1990**, 255; m) I. Bronstein, P. Dimond, *Res. Diagn. Clin. Testing* **1990**, 28, 36; n) I. Bronstein, G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, B. Edwards, J. C. Voyta, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1990**, 36, 1087; o) S. Albrecht, H. Ehle, K. Schollberg, R. Bublit, A. Horn in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 115; p) A. P. Schaap, L. J. Romano, J. S. Goudar, „1,2-Dioxetane compounds as chemiluminescent labels for organic and biological molecules“ (Wayne State University, Detroit), EP-A 0473984, **1992**, US-A 579837, **1992**.
- [48] a) C. H. Self, *J. Immunol. Methods* **1985**, 76, 389; b) A. Johannsson, D. H. Ellis, D. L. Bates, A. M. Plumb, C. J. Stanley, *ibid.* **1986**, 87, 7; c) D. B. Cook, C. H. Self, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1993**, 39, 965.
- [49] T. K. Christopoulos, E. P. Diamandis, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 342.
- [50] A. Baret, V. Fert, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 149.
- [51] a) H. Lingeman, W. J. M. Underberg, A. Takdate, A. Hulshoff, *J. Liq. Chromatogr.* **1985**, 8, 789; b) K. Blau, G. S. King, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden & Sons, London, **1978**.
- [52] a) D. R. Parks, L. A. Herzenberg, *Methods Enzymol.* **1984**, 108, 197; b) D. R. Parks, L. L. Lanier, L. A. Herzenberg in *Handbook of Experimental Immunology* (Hrsg.: D. M. Weir, L. A. Herzenberg, C. C. Blackwell), 4. Aufl., Scientific Publications, Edinburgh, **1986**; c) D. R. Parks, R. R. Hardy, L. A. Herzenberg, *Cytometry* **1984**, 5, 159; d) *Flow Cytometry and Cell Sorting* (Hrsg.: A. Radbruch), Springer, Berlin, **1992**.
- [53] a) J. A. Steinkamp, *Rev. Sci. Instrum.* **1984**, 55, 1375; b) E. Gurr, *Encyclopaedia of Microscopic Stains*, Leonard Hall, London, **1960**; c) D. Kooy, H. Kuypers, *Science* **1979**, 204, 873.
- [54] a) L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L. E. Hodd, *Nature* **1986**, 321, 674; b) P. Heinrich, H. Domdey, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1988**, 36, 1196.
- [55] N. Ishibashi, T. Ogawa, T. Imasaka, M. Kunitake, *Anal. Chem.* **1979**, 51, 2096.
- [56] F. Watanabe, K. Miyai in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 202.
- [57] A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, *Proc. R. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* **1941**, 47, 200.
- [58] A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, E. Berliner, *J. Immunol. Methods* **1942**, 45, 159.
- [59] a) R. Herrmann, *Chimia* **1991**, 45, 317; b) R. Herrmann, C. Klein, M. Junius-Comer, H.-P. Josel, H. G. Batz in *Chemistry of Functional Dyes* (Hrsg.: Z. Yoshida, T. Kitao), Mita, Tokyo, **1988**, S. 87; c) C. Klein, H.-G. Batz, R. Herrmann (Boehringer Mannheim GmbH), EP-A 209875, **1990**.
- [60] M. N. Kronik in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 163.
- [61] V. T. Oi, A. N. Glazer, L. Stryer, *Cell Biol.* **1982**, 93, 981.
- [62] M. N. Kronick, P. D. Grossman, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1983**, 29, 1582.
- [63] F. Watanabe, K. Miyai in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 199.
- [64] W. B. Dandliker, G. A. Feigen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, 5, 299.
- [65] P. G. Mattingly, R. J. Brashear (Abbott Laboratories), EP-A 455058, **1991**.
- [66] M. P. Bailey, B. F. Rocks, C. Riley in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 187–197.
- [67] A. M. Sidki, J. Landon in *Alternative Immunoassays* (Hrsg.: W. P. Collins), Wiley, Chichester, **1985**, S. 185–201.
- [68] I. Hemmilä, S. Dakubu, V.-M. Mukkala, H. Siitari, T. Lövgren, *Anal. Biochem.* **1984**, 137, 335.
- [69] A. P. B. Sinha, *Spectrosc. Inorg. Chem.* **1971**, 2, 255.
- [70] M. W. Sundberg, C. F. Meares, D. A. Goodwin, C. I. Diamanti, *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 1304.
- [71] I. Wieder, R. H. Wollenberg (Radiation Corp.), DE-A 3033691, **1981**.
- [72] E. Soini, I. Hemmilä (Wallac Oy), SE-A 7902079-8, **1979**; US-A 4374120, **1983**.
- [73] Y.-Y. Xu, K. Petterson, K. Blomberg, I. Hemmilä, H. Mikola, T. Lövgren, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1992**, 38, 2038.
- [74] E. Soini, T. Lövgren in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 231.
- [75] I. Hemmilä, *Chem. Anal. NY* **1991**, 117, 244.
- [76] a) I. Hemmilä, S. Holttinen, K. Pettersson, T. Lövgren, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1987**, 33, 2281; b) H. Siitari, *J. Virol. Methods* **1990**, 28, 179.
- [77] M. Saarna, I. Järvelg, I. Hemmilä, H. Siitari, R. Sinijärvi, *J. Virol. Methods* **1989**, 23, 47.
- [78] a) L. J. Kricka, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1992**, 38, 327; b) S. E. Kakabakos, T. K. Christopoulos, E. P. Diamandis, *ibid.* **1992**, 38, 338; c) R. Ekins, F. Chu, E. Biggart, *Ann. Biol. Clin. Paris* **1990**, 48, 655.
- [79] a) Y.-Y. Xu, I. Hemmilä, *Anal. Chim. Acta* **1992**, 256, 9; b) Y.-Y. Xu, I. Hemmilä, T. Lövgren, *Analyst* **1992**, 117, 1061; c) Y.-Y. Xu, I. Hemmilä, *Talanta* **1992**, 39, 759; d) B. Alpha, J.-M. Lehn, G. Mathis, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 259; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 266.
- [80] a) P. L. Khanna in *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 211; b) E. F. Ullman, M. Schwarzbarg, K. E. Rubenstein, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 4172; US-A 3996345, **1976**; 4199559, **1980**; DE-A 2535574, (Syra Corp.), **1976**; GB-A 1560852, **1980**.
- [81] T. Förster, *Ann. Phys. Leipzig* **1948**, 2, 55.
- [82] a) L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819; b) Y. Kanaoka, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 142; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 137.
- [83] a) E. F. Ullman, P. L. Khanna, *Methods Enzymol.* **1981**, 7, 28; b) R. Rodgers, M. Schwarzbarg, P. L. Khanna, C. H. Chang, E. Ullman, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1978**, 24, 1033.
- [84] P. L. Khanna, E. F. Ullman, *Anal. Biochem.* **1980**, 108, 161.
- [85] R. D. Schmid, U. Bilitewski, *Chem. Unserer Zeit* **1992**, 26, 163.
- [86] H.-U. Siegmund, A. Becker, H. Ohst, K. Sommer, *Thin Solid Films* **1992**, 207, 480.
- [87] S. Beck, H. Köster, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2258.
- [88] a) W. C. Rhodes, W. D. McElroy, *J. Biol. Chem.* **1978**, 233, 1528; H. H. Seliger, W. D. McElroy, E. H. White, G. F. Field, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, 47, 1129; b) T. A. Hopkins, H. H. Seliger, E. H. White, M. W. Cass, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7148; c) J. Wannlund, M. DeLuca, K. Stempel, P. B. Boyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 81, 987.
- [89] A. Hartmann, *Biotech* **1991**, 40.
- [90] F. McCapra, *Endeavour* **1973**, 32, 139.
- [91] *Nonisotopic Immunoassay* (Hrsg.: T. T. Ngo), Plenum, New York, **1988**, S. 277.
- [92] a) F. McCapra, Y. C. Chang, V. P. Francois, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 22; b) W. Adam, *J. Chem. Educ.* **1975**, 52, 138; c) G. B. Schuster, K. A. Horn in *Chemical and Biological Generation of Excited States* (Hrsg.: W. Adam, G. Cilento), Academic Press, New York, **1982**, Kap. 7; d) J.-Y. Koo, S. P. Schmidt, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 30; e) W. Adam, M. H. Schulz, *Chem. Ber.* **1992**, 125, 2455; f) W. Adam, R. Fell, M. H. Schulz, *Tetrahedron* **1993**, 49, 2227.
- [93] a) K.-D. Gundermann, F. McCapra, *Chemiluminescence in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1987**, S. 60; b) F. McCapra, *J. Photochem. Photobiol. A* **1990**, 51, 21; c) *Organic Peroxides* (Hrsg.: W. Ando), Wiley, Chichester, **1992**; d) W. Adam, M. Heil, T. Mosandl, C. R. Saha-Möller in [93c], S. 521; e) K. Fujimori in [93c], S. 319.
- [94] R. L. Airth, W. C. Rhodes, W. D. McElroy, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, 27, 519.
- [95] K. V. Wood in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 11, 543.
- [96] a) J. R. de Wet, K. V. Wood, D. R. Helinski, M. Deluca, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7870; b) D. W. Ow, K. V. Wood, M. De Luca, J. R. de Wet, D. R. Helinski, S. H. Howell, *Science* **1986**, 234, 856–859.
- [97] E. A. Meighen in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 3.
- [98] a) E. H. White, F. McCapra, G. F. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 2402; *ibid.* **1963**, 85, 337; b) S. Seto, K. Ogura, Y. Nishiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1963**, 36, 331; c) E. H. White, H. Würther, G. F. Field, W. D. McElroy, *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 2344; d) L. J. Bowie, *Methods Enzymol.* **1978**, 57, 15.
- [99] Y. Toya, M. Takagi, H. Nakata, N. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 392.
- [100] a) E. Schram in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 407; b) P. E. Stanley, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 375; c) *ATP Luminescence, rapid methods in microbiology* (Hrsg.: P. E. Stanley, B. J. McCarthy, R. Smither), Blackwell, Oxford, **1989**.
- [101] a) *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**; b) L. Yu. Brovko, N. N. Ugarova, A. F. Dukhovich in [101a], S. 434; c) W. Gehle, R. Presswood, D. A. Stafford in [101a], S. 437.
- [102] D. W. Ow, K. V. Wood, M. Deluca, J. R. DeWet, D. R. Helinski, S. H. Howell, *Science* **1986**, 234, 856.
- [103] a) W. Miska, R. Geiger, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1987**, 25, 23, 30; b) *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 119.
- [104] N. N. Ugarova, Ya. V. Vozny, G. D. Kutuzova, E. I. Dementieva in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 511.
- [105] a) A. K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, Horwood, Chichester, **1988**; b) Kap. 3 in [105a], S. 127–239; c) Kap. 3 in [105a], S. 202; d) Kap. 3 in [105a], S. 291–302.
- [106] E. Wieland, A. David, H. Kather, V. W. Armstrong in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 455.
- [107] P. Balaguer, B. Tèrouanne, A. M. Boussieux, J. C. Nicolas in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 143.

- [108] a) W. Adam, *Chem. Unserer Zeit* **1973**, 7, 182; b) F. McCapra in *Progress in Organic Chemistry*, Bd. 8 (Hrsg.: E. Carruthers, J. K. Sutherland), Butterworth, London, **1973**, S. 231; c) F. McCapra, *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9, 201; d) F. McCapra, *Proc. R. Soc. London* **1982**, 215, 247.
- [109] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223.
- [110] a) O. Shimomura, T. Masugi, F. H. Johnson, Y. Haneda, *Biochem. J.* **1978**, 17, 994; b) O. Shimomura, F. H. Johnson, *Nature (London)* **1979**, 256, 236; c) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 2611.
- [111] a) S. Inouye, S. Aoyama, T. Miyata, F. I. Tsuji, Y. Sakaki, *Biochem. J.* **1989**, 105, 473; b) D. Prasher, R. O. McCann, M. J. Cormier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 126, 1259.
- [112] a) Y. Kishi, H. Tanino, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 2747; b) S. Inoue, S. Sugiura, H. Kakoi, K. Hazizume, T. Goto, H. Iio, *Chem. Lett.* **1975**, 141; c) C. F. Qi, Y. Gomi, T. Hirano, M. Ohashi, Y. Ohmiya, F. Tsuji, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 1608.
- [113] a) *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**; b) D. F. Smith, N. L. Stults, H. Rivera, W. D. Gehle, R. D. Cummings, M. J. Cormier in [113a], S. 530; c) N. L. Stults, N. A. Stocks, R. D. Cummings, M. J. Cormier, D. F. Smith in [113a], S. 533; d) P. F. Zatta, D. F. Smith, M. J. Cormier, R. D. Cummings in [113a], S. 537.
- [114] H. O. Albrecht, *J. Phys. Chem.* **1928**, 136, 321.
- [115] a) F. McCapra in *Progress in Organic Chemistry*, Bd. 8 (Hrsg.: E. Carruthers, J. K. Sutherland), Butterworth, London, **1973**, S. 248; b) U. Hantke, *Aerzt. Lab.* **1986**, 32, 1.
- [116] T. E. Yeshion in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 379.
- [117] a) R. B. Brundrett, D. F. Roswell, E. H. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 7536; b) H. R. Schroeder, R. C. Boguslaski, R. J. Carrico, R. T. Buckler, *Methods Enzymol.* **1978**, 57, 424; c) I. Weeks in *Comprehensive Analytical Chemistry, Chemiluminescence Immunoassay* (Hrsg.: G. Svehla), Elsevier, New York, **1992**, S. 29.
- [118] J. S. A. Simpson, A. K. Campbell, M. E. T. Ryall, J. S. Woodhead, *Nature (London)* **1979**, 279, 646.
- [119] a) I. Weeks in *Comprehensive Analytical Chemistry, Chemiluminescence Immunoassay* (Hrsg.: G. Svehla), Elsevier, New York, **1992**, Kap. 5, S. 153; b) R. C. Boguslaski, H. R. Schroeder in *Bioluminescence and Chemiluminescence – Basic Chemistry and Analytical Applications* (Hrsg.: M. De Luca, W. D. McElroy), Academic Press, New York, **1981**, S. 283; c) W. G. Wood, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 79; d) F. McCapra, I. Beheshti in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. 1* (Hrsg.: K. Van Dyke), CRC, Boca Raton, FL, **1985**, S. 23.
- [120] K. Gleu, W. Petsch, *Angew. Chem.* **1935**, 58, 57.
- [121] M. M. Rauhut, D. Sheehan, R. A. Clarke, A. M. Semsel, *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 3587.
- [122] F. McCapra, D. G. Richardson, *Tetrahedron Lett.* **1964**, 3167.
- [123] F. McCapra, I. Beheshti in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. 1* (Hrsg.: K. Van Dyke), CRC, Boca Raton, FL, **1985**, S. 15.
- [124] A. Hantzsch, M. Kalb, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, 32, 3109.
- [125] I. Weeks, M. Sturgess, R. C. Brown, J. S. Woodhead, *Methods Enzymol.* **1986**, 133, 366.
- [126] J. S. Littig, T. A. Nieman, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1993**, 8, 25.
- [127] M. L. Grayeski, T. J. Novak, A. G. Mohan in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 131.
- [128] J. S. Simpson, A. K. Campbell, J. S. Woodhead, A. Richardson, R. Hart, F. McCapra in *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Hrsg.: M. DeLuca, W. D. McElroy), Academic Press, New York, **1981**, S. 673.
- [129] a) I. Weeks, I. Beheshti, F. McCapra, A. K. Campbell, J. S. Woodhead, *Clin. Chem. Winston-Salem N. C.* **1983**, 29, 1474; b) A. K. Campbell, J. S. Woodhead, I. Weeks (The Welsh National School of Medicine), EP-A 0082636, **1983**.
- [130] I. Weeks in *Comprehensive Analytical Chemistry, Chemiluminescence Immunoassay* (Hrsg.: G. Svehla), Elsevier, New York, **1992**, S. 121.
- [131] K. Lehmstedt, E. Wirth, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1928**, 61, 2044.
- [132] a) R. Stolle, *J. Prakt. Chem.* **1922**, 105, 137; b) M. S. Newman, W. H. Powell, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 812.
- [133] J. E. Dombrowski, P. G. Mattingly (Abbott Laboratories), EP-A 0369344, **1990**.
- [134] a) S.-J. Law, T. Miller, U. Piran, C. Klukas, S. Chang, J. Unger, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 88; b) S. J. Law, S. A. Palmacci, S. C. S. Chang, R. S. Cubicciotti (Ciba Corning Diagnostics), EP-A 0263657, **1988**; US-A 4745181, **1981**; c) S. C.-S. Chang, C. K. Klukas, S.-J. Law, C. A. Vitkauskas (Ciba Corning Diagnostics), EP-A 0361817, **1990**.
- [135] R. C. Hart, L. R. Taaffe, *J. Immunol. Methods* **1987**, 101, 91.
- [136] F. McCapra, I. Beheshti, R. C. Hart, H. Koelling, A. Patel, K. Ramakrishnan (London Diagnostics), WO-A 89/06231, **1989**; EP-A 0322926, **1989**.
- [137] H. T. W. Lin (Mallinckrodt), EP-A 0170415, **1986**.
- [138] a) T. Kinkel, L. Lübbers, E. Schmidt, P. Molz, H. J. Skrzypczyk, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, 4, 136; b) P. Molz, H. J. Skrzypczyk, H. Lübbers, H. Streck, G. Schnorr, T. Kinkel (Hoechst AG), DE-A 3628573, **1986**; EP-A 0257541, **1987**.
- [139] T. Kinkel, P. Molz, E. Schmidt, G. Schnorr, H. J. Skrzypczyk (Hoechst AG) DE-A 3805318, **1988**; EP-A 0330050, **1989**.
- [140] P. G. Mattingly, L. G. Bennett (Abbott Laboratories), US-A 921979, **1986**; EP-A 0273115, **1987**.
- [141] G. Zomer, J. F. C. Stavenuiter (Staat der Niederlande), NL-A 8703075, **1987**; EP-B 0324202, **1988**.
- [142] A. Mayer, E. Schmidt, T. Kinkel, P. Molz, S. Neuenhofer, H. J. Skrzypczyk in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 99.
- [143] P. G. Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1991**, 6, 107.
- [144] a) I. Weeks, J. Woodhead in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 553; b) J. Woodhead, I. Weeks, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1991**, 37, 472; c) W. Klingler, G. Wiegand, R. Knuppen, *J. Steroid Biochem.* **1987**, 27, 41.
- [145] W. L. Hinze, T. E. Riehl, H. N. Singh, Y. Baba, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2180.
- [146] J. H. Wieringa, J. Strating, H. Wynberg, W. Adam, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 169.
- [147] W. H. Richardson, G. C. Montgomery, M. B. Yelvington, H. E. O'Neal, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7525.
- [148] J.-Y. Koo, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 6107.
- [149] G. B. Schuster, B. Dixon, J.-Y. Koo, S. P. Schmidt, J. P. Smith, *Photochem. Photobiol.* **1979**, 30, 17.
- [150] R. S. Handley, A. J. Stern, A. P. Schaap, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3183.
- [151] A. P. Schaap, S. D. Gagnon, K. A. Zaklika, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 2943.
- [152] C. Lee, L. A. Singer, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3823.
- [153] F. McCapra, I. Beheshti, A. Burford, R. A. Hann, K. A. Zaklika, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 944.
- [154] F. McCapra, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 155.
- [155] N. J. Turro, P. Lechtken, G. Schuster, J. Orell, H.-C. Steinmetz, W. Adam, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1627.
- [156] J. C. Hummelen, T. M. Luider, H. Wynberg, *Methods Enzymol.* **1986**, 133, 531.
- [157] a) E. W. Meijer, H. Wynberg, *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 1071; b) P. D. Bartlett, M. S. Ho, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 627.
- [158] G. B. Schuster, N. J. Turro, H.-C. Steinmetz, A. P. Schaap, G. Falter, W. Adam, J. C. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7110.
- [159] A. C. Brouwer, J. C. Hummelen, T. M. Luider, F. van Bolhuis, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3137.
- [160] A. P. Schaap, J. S. Goudar, L. J. Romano, 4. *Internationales Symposium für quantitative Lumineszenz-Spektrometrie in den biomedizinischen Wissenschaften*, Gent, Belgien, **1991**, Abstracts-Band S. 49.
- [161] E. A. Chandross, *Tetrahedron Lett.* **1963**, 761.
- [162] M. M. Rauhut, B. G. Roberts, A. M. Semsel, R. A. Clarke, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3604.
- [163] L. J. Bollyky, R. H. Whitman, B. G. Roberts, M. M. Rauhut, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6523.
- [164] M. M. Rauhut, L. J. Bollyky, B. G. Roberts, M. Loy, R. H. Whitman, A. V. Iannotta, A. M. Semsel, R. A. Clarke, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6515.
- [165] S.-S. Tseng, A. G. Mohan, L. G. Haines, L. S. Vizcarra, M. M. Rauhut, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 4113.
- [166] R. E. Milovsky, J. W. Birks, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9715.
- [167] F. J. Alvarez, N. J. Parekh, B. Matuszewski, R. S. Givens, T. Higuchi, R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6435.
- [168] M. F. D. Steinfatt, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1985**, 94, 85.
- [169] M. M. Rauhut, *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 80.
- [170] L. Y. Bollyky, M. M. Rauhut (American Cyanamid), US-A 3597367, **1971**.
- [171] K. W. Singvardson, J. W. Birks, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 432.
- [172] S. Albrecht, R. Becker, W.-D. Böhm, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1989**, 27, 451.
- [173] S. Albrecht, W.-D. Böhm, R. Beckert, H. Kroschwitz, V. Neumeister, W. Jaroß in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 463.
- [174] H. Brandl, S. Albrecht, R. Köstler in *Bioluminescence & Chemiluminescence, Current Status* (Hrsg.: P. E. Stanley, L. J. Kricka), Wiley, Chichester, **1991**, S. 459.
- [175] a) K.-D. Gundermann, *Top. Curr. Chem.* **1974**, 46, 116; b) L. R. Faulkner, A. J. Bard in *Electroanalytical Chemistry, Vol. 10* (Hrsg.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1976**, S. 1; c) B. M. Krasovitskii, B. M. Bolotin, *Organic Luminescent Materials*, VCH, Weinheim, **1988**, S. 229; d) H. Tachikawa, L. R. Falkner in *Photoelectrochemistry and Electrochemiluminescence* (Hrsg.: P. T. Kissinger, W. R. Heineman), Marcel Dekker, New York, **1984**, S. 637.
- [176] S. Sakura, *Anal. Chim. Acta* **1992**, 262, 49.
- [177] J. S. Littig, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1140.
- [178] a) F. E. Lytle, D. M. Hercules, *Photochem. Photobiol.* **1971**, 13, 123; b) N. E. Tokel, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2862.
- [179] a) G. F. Blackburn, H. P. Shah, J. H. Kenten, J. Leland, R. A. Kamin, J. Link, J. Peterman, M. J. Powell, A. Shah, D. B. Talley, S. K. Tyagi, E. Wilkins, T.-G. Wu, R. J. Massey, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1991**, 37, 1534; b) J. K. Leland, H. P. Shah, J. Kenten (IGEN), US-A 652427, **1991**.

- [180] J. H. Kanten, J. Casadei, J. Link, S. Lupold, J. Willey, M. Powell, A. Rees, R. Massey, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1991**, 37, 1626.
- [181] O. Nozaki, L. J. Kricka, P. E. Stanley, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1992**, 7, 263.
- [182] G. Köhler, C. Milstein, *Nature (London)* **1975**, 256, 495; C. Milstein, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 819; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 816; G. Köhler, *ibid.* **1985**, 97, 829 bzw. **1985**, 24, 827.
- [183] F. R. Seiler, P. Gronski, R. Kurre, G. Lüben, H.-P. Harthus, W. Ax, K. Bosslet, H.-G. Schwick, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 141; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 139.
- [184] J. Kang, P. Kaladas, C. Chang, S. Chen, R. Dondero, A. Frank, S. Huhn, P. Lisi, D. Mochmal, J. Nasser, W. Potter, E. Schutt, K. Utberg, H. Graham, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1986**, 32, 1682.
- [185] a) C. Olive, *J. Clin. Immunoassay* **1991**, 14, 126; b) F. R. Velazquez, *ibid.* **1992**, 15, 235.
- [186] a) K. E. Rubenstein, E. F. Ullman (Syva Corp.), US-A 3817837, **1974**; b) F. McCapra, *Chem. Br.* **1989**, 139.
- [187] a) D. H. Gilden, A. Vafai, Y. Shtram, Y. Becker, M. Devlin, M. Wellish, *Nature* **1983**, 306, 478; b) S. L. Moseley, J. W. Hardy, M. I. Huq, P. Echeverria, S. Falkow, *Infect. Immun.* **1983**, 39, 1167; c) L. Franzen, R. Shabo, L. Aslund, H. Pearlman, T. Persson, H. Wiggzell, U. Pettersson, *Lancet* **1984**, 525; d) R. Haas, T. F. Meyer, *Cell* **1986**, 44, 107; e) *DNA Probes - applications in genetic and infectious disease and cancer* (Hrsg.: L. S. Lerman), Cold Spring Harbor Laboratory, **1986**; f) L. S. Lerman in [187e], S. 1; g) F. C. Tenover in [187e], S. 149; h) J. A. Matthews, L. J. Kricka, *Anal. Biochem.* **1988**, 169, 1.
- [188] a) S. G. Fischer, L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 1579; b) F. S. Collins, S. M. Weissman, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1984**, 31, 317; c) V. J. Kidd, M. S. Golbus, R. B. Wallace, K. Itakura, S. L. C. Woo, *N. Engl. J. Med.* **1984**, 310, 639; d) S. H. Orkin, H. H. Kazazian, Jr., *Annu. Rev. Genet.* **1984**, 18, 131; e) J. A. Landgale, A. D. B. Malcolm, *Gene* **1985**, 36, 201; f) S. L. Thein, J. S. Wainscoat, J. M. Old, *Lancet* **1985**, 345; g) A. G. DiLella, J. Marvit, A. S. Lidsky, F. Guettler, S. L. C. Woo, *Nature* **1986**, 322, 799; h) V. A. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, 7. Aufl., Johns Hopkins University Press, Baltimore, **1986**; i) D. F. Novack, N. J. Casna, S. G. Fischer, J. P. Ford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 586; j) V. A. McKusick, *Molecular Defects in Mendelian Disorders, Newsletter*, 25.3.1988.
- [189] a) M. Durst, L. Gissmann, H. Ikenberg, H. zur Hausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 3812; b) B. Leder, J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart, R. Taub, *Science* **1983**, 222, 765; c) G. M. Brodeur, R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *ibid.* **1984**, 224, 1121; d) J. Groffen, J. R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C. R. Bartram, G. Grosveld, *Cell* **1984**, 36, 93; e) S. H. Friend, R. Bernard, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert, T. P. Dryja, *Nature* **1986**, 323, 643; f) J. M. Bishop, *Science* **1987**, 235, 305; g) J. L. Bos, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J. H. van Boom, A. J. van der Erb, B. Vogelstein, *Nature* **1987**, 327, 293; h) R. Rcid, M. Greenberg, A. B. Jensen, M. Husain, J. Willet, A. Daoud, G. F. Temple, C. R. Stanhope, A. Sherman, G. Phibbs, A. T. Lorincz, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1987**, 150, 212.
- [190] a) P. Gill, A. J. Jeffreys, D. J. Werett, *Nature* **1985**, 318, 577; b) A. J. Jeffreys, J. F. Y. Brookfield, R. Semeonoff, *ibid.* **1985**, 317, 818.
- [191] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* **1975**, 98, 503.
- [192] M. Ranki, A. Palva, M. Virtanen, M. Laaksonen, H. Söderlund, *Gene* **1983**, 21, 77.
- [193] a) M. S. Ellwood, M. Collins, E. F. Fritsch, J. I. Williams, S. E. Diamond, J. G. Brewen, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1986**, 32, 1631; b) C. P. H. Vary, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 6883.
- [194] L. J. Arnold, Jr., P. W. Hammond, W. A. Wiese, N. C. Nelson, *Clin. Chem. Winston-Salem NC* **1989**, 35, 1588.
- [195] a) R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, *Science* **1985**, 230, 1350; b) S. C. Kogan, A. B. M. Doherty, J. Gitschier, *N. Engl. J. Med.* **1987**, 317, 985; c) M. Crescenzi, M. Seto, G. P. Herzig, P. D. Weiss, R. C. Griffith, S. J. Korsmeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4869; d) A. J. Jeffreys, V. Wilson, R. Neumann, J. Keyte, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 10953; e) E. S. Kawasaki, S. S. Clark, M. Y. Coyne, S. D. Smith, R. Champlin, O. N. Witte, F. P. McCormick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5698; f) H. Li, U. B. Gyllenstein, X. Cui, R. K. Saiki, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Nature* **1988**, 335, 414; g) C.-H. Ou, S. Kwok, S. W. Mitchell, D. H. Mack, J. J. Sninsky, J. W. Krebs, P. Forino, D. Warfield, G. Schochetman, *Science* **1988**, 239, 295; h) R. K. Saiki, G. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487; K. B. Mullis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, Nr. 12; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, No. 12.

# Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für ca. Fünfundachtzig (DM 5.80!!) pro Heft druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als sechs Pfennige pro Seite!

## Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Geiß an (Tel. 06201/606-199) oder schicken Sie ihr ein Fax (06201/606-184). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

**VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim**

