

## Einführung in die PolyHRP Technologie

### EINSATZBEREICH

PolyHRP Produkte sind supermolekulare Enzymkomplexe, die bis zu 400 Enzymmoleküle enthalten und mit verschiedenen Liganden und Rezeptoren (Antikörpern, Antigenen, Streptavidin, DNA) konjugiert werden können. Diese Konjugate sind bei Assayverfahren wie ELISA, Immunoblot, Immunofiltration, DNA /RNA Hybridisierung breit einsetzbar und konventionellen Konjugaten in ihrer spezifischen Aktivität um Größenordnungen überlegen. Mit ihnen ist es möglich die Sensitivität von Assays zu verbessern, die Assayzeiten zu verkürzen und den spezifischen Reagenzienverbrauch zu senken. Sie sind besonders für mikrostrukturierte Analysechips und Schnelltests geeignet.

### DIE STRUKTUREN VON POLYHRP

Bei der Herstellung von PolyHRP werden die Enzymmoleküle mittels bifunktionaler Linker zu oligomeren Einheiten bestehend aus 20, 40 oder 80 Molekülen vernetzt. In einem nachfolgenden Schritt werden fünf dieser als Homoblockpolymere bezeichneten Untereinheiten zu einem supermolekularen Komplex zusammengefügt. Anschließend kann dieser mit weiteren biologisch aktiven Molekülen konjugiert werden. Die Struktur eines typischen PolyHRP Konjugates ist in Abb. 1 dargestellt.

SENOVA bietet derzeit 3 Standardgrößen: PolyHRP20, PolyHRP40, PolyHRP80 an. Sie sind im Vergleich zu konventionellen Standardkonjugaten in Abb.2 illustriert.

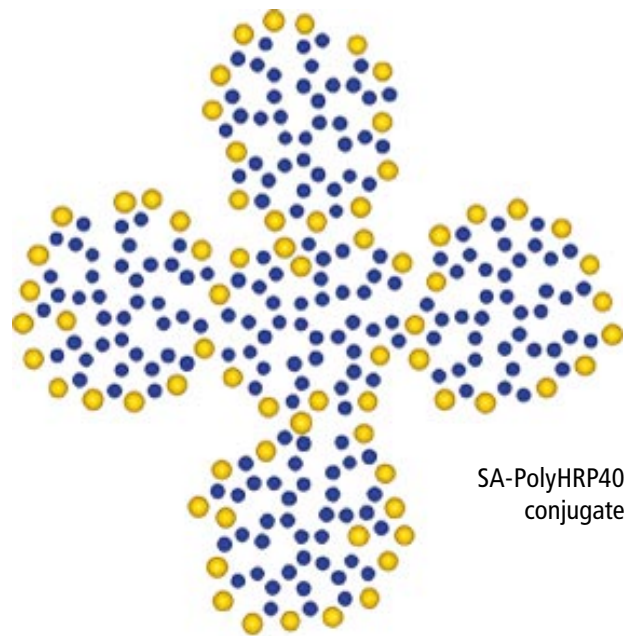
PolyHRP kann mit einer breiten Vielzahl von Liganden und Rezeptoren konjugiert werden.

Erhältlich sind:

- Streptavidin-PolyHRP
- ProteinA-PolyHRP
- anti-Maus-PolyHRP
- spezifische Konjugate

PolyHRP Konjugates	
Cat. No.	Produkt
201 00 001 CJG	SA-PolyHRP20
201 00 002 CJG	SA-PolyHRP40
201 00 003 CJG	SA-PolyHRP80
201 01 001 CJG	PrA-PolyHRP20
201 01 002 CJG	PrA-PolyHRP40
201 01 003 CJG	PrA-PolyHRP80
201 02 001 CJG	Goat anti-Mouse IgG(H+L)-Poly HRP 40
201 02 002 CJG	Rabbit a-Mouse IgG (H+L)-Poly HRP 40
201 02 003 CJG	Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-Poly HRP 40
210 02 004 CJG	Mouse monoclonal anti Human IgG (H, $\gamma$ -chain specific)-Poly HRP 40
201 03 001 CJG	monocl. anti-Y.Pestis-F1-Poly HRP 40
201 03 002 CJG	monocl. anti-F.Tularensis-Poly HRP 40
201 03 003 CJG	monocl. anti-Ebola Virus-Poly HRP 40

(siehe auch Produkt- und Preisliste)



SA-PolyHRP40 conjugate



PolyHRP40 homopolymer

- streptavidin molecule
- HRP monomer molecule

Abb. 1: Struktur des PolyHRP Konjugates

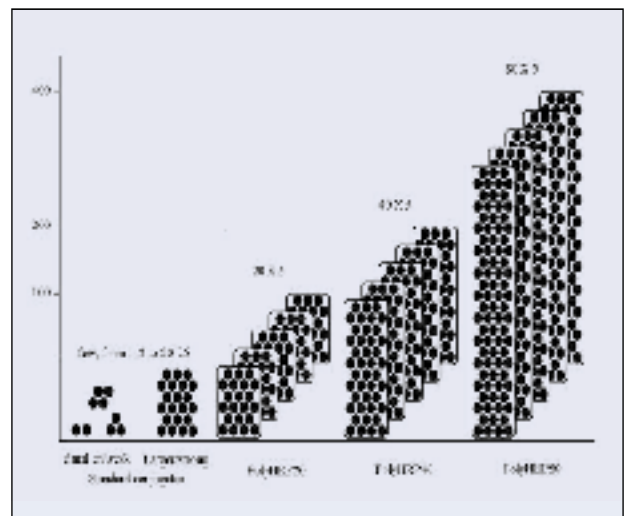


Abb. 2: Struktur der verfügbaren PolyHRP Moleküle im Vergleich zu konventionellen Konjugaten und Zudem ist zu sagen

### KONJUGATIONSSERVICE

Darüber hinaus bietet SENOVA die Konjugation von Kundenmaterialien an. Die Kopplung von PolyHRP erfolgt ausgehend von einer reaktiven Zwischenstufe des Polymerkomplexes durch Kopplung mit nukleophilen Gruppen des zu kopplenden Moleküls.

Typischerweise erfolgt die Bindung an Amino-Gruppen, Auftragsynthesen beginnen i.d.R. mit einer einfachen Pilot- oder Machbarkeitsstudie zum Bindungsverhalten des kundenspezifischen Rezeptors.

Nachfolgend können beliebige Bulkmen gen des gewünschten Konjugates bereitgestellt werden.

### ULTRASENSITIVE ELISAs

Streptavidin-PolyHRP ist ein universelles Konjugat, das in Kombination mit biotinierten Reagenzien einfach einsetzbar ist. Die Substitution eines konventionellen Konjugates durch Streptavidin-PolyHRP ist technisch relativ unaufwendig und erlaubt Sensitivitätssteigerungen um mehr als 2 Größenordnungen. Zwei typische Beispiele zeigt die nebenstehende Abbildung 3.

Kundenservice (siehe auch Produkt- und Presiliste)	
201 04 001 SEV	PolyHRP ELISA study (feasibility)
201 04 002 SEV	PolyHRP – pilot conjugation
201 04 003 SEV	PolyHRP – conjugation

Streptavidin-PolyHRP Konjugate werden eingesetzt um ohne großen Entwicklungs- und Syntheseaufwand ELISAs mit Nachweisgrenzen

im unteren pg/ml oder fg/ml zu realisieren. Für Routineassays ist es günstig Direktkonjugate von PolyHRP mit Sekundärantikörpern zu verwenden. Für beide Fälle sind in der nachstehenden Tabelle einige ausgewählte Beispiele gegeben.

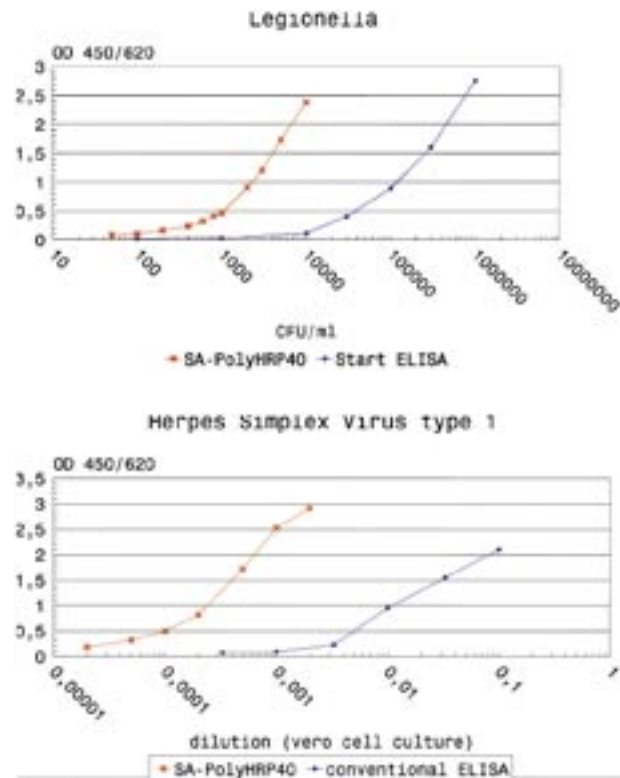


Abb. 3: Kalibrationskurven konventioneller ELISAs im Vergleich zu entsprechenden ELISAs mit PolyHRP-Konjugat

Ultrasensitive Assays von SENOVA			
Analyt	PolyHRP Typ	Messbereich	Bemerkung
TNF alpha	PolyHRP 80	0,5 - 32 pg/ml	
IFN gamma	PolyHRP 80	2 - 125 pg/ml	
h-IL1 beta	PolyHRP 80	0,16 - 10 pg/ml	
h-IL4	PolyHRP80	0,39 – 25 pg/ml	
h-IL6	PolyHRP80	0,156 – 10 pg/ml	
h-IL10	PolyHRP 80	0,6 – 80 pg/ml	
h-IL13	PolyHRP 80	0,5 – 125 pg/ml	
F. tularensis	PolyHRP 40	0,3x10 <sup>2</sup> – 3x10 <sup>4</sup> CFU/ml	LPS Extrakt
F. tularensis	Direktkonjugat –HRP40	0,8x10 <sup>2</sup> – 10 <sup>5</sup> CFU/ml	LPS Extrakt
Ebola-Virus	PolyHRP 40	ca. 200 – 7000 PFU/ml	Zellkultur
Legionella	PolyHRP 40	300 – 10000 CFU /ml	LPS
PSA*	PolyHRP 40	2 – 200 pg/ml	
PSA*	Direktkonjugat HRP40	6 – 600 pg/ml	

\* Prostata spezifisches Antigen

Die ELISA Protokolle von PolyHRP Assays entsprechen weitgehend denen von normalen ELISA Systemen. Nachfolgend ist ein Beispielprotokoll mit einigen Performancedaten wiedergegeben:

Standardprotokoll	
Coaten der Mikrotiterplatten (z.B. Costar, high binding ELISA plate)	
	100 µl Antikörper 1 µg/ml in 0,1 M Na-carbonatpuffer pH= 9,5 12-18 h bei 4°C 200 µl Casein Diluent/Blocker (Cat No. 201 04 001 CAB) 3 x 350 µl PBS, 0,05% Tween 20
Assay	
	200 µl Probe in Casein Diluent /Blocker (Cat No. P-CAS-1007); 1-3h bei RT
	3 x 350 µl PBS, 0,05% Tween 20
	100 µl Detektionsantikörper biotinyliert 0,1 - 1 µg/ml; 1 h bei RT, Schüttler
	3 x 350 µl PBS, 0,05% Tween 20
	100 µl SA- PolyHRP40 0,2 µg/ml (ca. 1/5000); 30 Minuten bei RT
	4 bis 6 x 350 µl PBS, 0,05% Tween 20
	optional: 350 ul Substratpuffer (Cat. No 201 04 004 BUF)
	100 µl Substrat: sTMB (Cat. No 201 03 001 SUB); 15 Minuten bei RT
	50 µl Stopplösung H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8%
	Messung OD bei 450 nm mit Referenz z.B. bei 620 nm

Typische Standardkurve am Beispiel humanes Interleukin 6		
Standard pg/ml	OD 405 nm Doppelbestimmung ohne Abzug des Blanks	
0,000	0,127	0,130
0,156	0,182	0,184
0,312	0,206	0,208
0,625	0,309	0,280
1,250	0,425	0,483
2,500	0,631	0,746
5,000	1,229	1,266
10,000	2,337	2,436

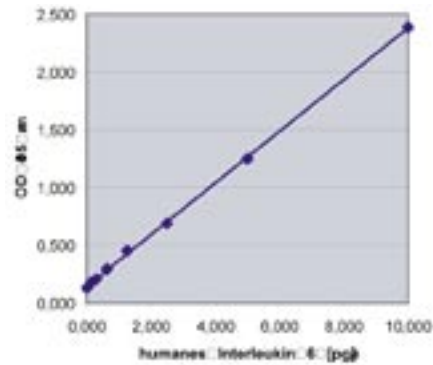


Abb. 4: Typische Standardkurve am Beispiel von humanem Interleukin 6

Präzision am Beispiel humanes Interleukin 6				
Jeweils zehnmal wiederholt in ein und der selben Charge (Intra-Assay-Varianz); jeweils zwanzigmal wiederholt in 3 unterschiedlichen Chargen (Inter-Assay-Varianz)				
	Mittelwert [pg/ml]	Intra-Assay-VK [%]	Mittelwert [pg/ml]	Inter-Assay-VK [%]
Probe 1	1,92	8,33	2,00	10,00
Probe 2	5,17	6,12	7,29	6,72
Probe 3	9,19	4,71	8,81	6,70

### SCHNELLTESTS AUF BASIS VON POLYHRP

PolyHRP Konjugate werden zur Herstellung von immunologischen Schnelltests auf Basis von Mikrosäulen eingesetzt. Diese Assays basieren auf dem 3D-Immunofiltrationsprinzip ABICAP® Assay und erlauben eine quantitative Bestimmung von Analyten in 5-15 Minuten. Bei Einsatz von PolyHRP-Konjugaten können damit ähnlich wie bei ultrasensitiven ELISAs unter 1 pg/ml und erreicht werden.

Details sind in der Technologiebeschreibung: „Immunofiltrationassay“ dargestellt.

### AUFTRAGSENTWICKLUNGEN

SENOVA entwickelt seit über 10 Jahren ultrasensitive Immunoassays auf Basis von PolyHRP Konjugaten und verfügt über effiziente Optimierungsstrategien. SENOVA bietet seinen Kunden Auftragsentwicklungen an.

Dies kann sowohl ausgehend von einem bereits existierenden Kunden ELISA erfolgen oder die Reagenzienentwicklung einschließen. SENOVA kann dabei auf ein breites Portfolio von Antikörpern, Antigenen und Standards zurückgreifen, aber auch neuartige Antigene und Antikörper im Kundenauftrag entwickeln.

Diese Entwicklungen erfolgen entsprechend dem in Abb. 5 dargestellten Projektschema. In Abhängigkeit von der Ausgangssituation, den technischen Anforderungen und dem gewünschten Projektergebnis erstellen wir Ihnen darauf aufbauend gerne ein individuelles Angebot.

### POLYHRP ZUSATZREAGENZIEREN

Für den Einsatz von PolyHRP wurde ein caseinhaltiger Block- und Verdünnungspuffer entwickelt, mit dem unspezifische Backgroundeffekte effizient unterdrückt werden können. Er ist universell bei allen PolyHRP Anwendungen einsetzbar und kann sowohl als Konzentrat als auch in gebrauchsfertiger Form geliefert werden.

Darüber hinaus steht für die langzeitstabile Lagerung von PolyHRP Produkten ein Stabilisator zur Verfügung, mit dem gebrauchsfertige Konjugatlösungen hergestellt werden können.

Zusätzlich bietet SENOVA einen PolyHRP Substratpuffer und gebrauchsfertige TMB- Lösungen (Tetramethylbenzidin) in zwei Varianten- als lösliches TMB und als präzipitierendes TMB für 3D-IF Anwendungen an.

PolyHRP Zusatzreagenzien	
Cat. Nr.	Produkt
201 04 001 CAS	Casein Diluent / Blocker, ready-to-use
201 04 002 CAS	Casein Buffer Concentrate
201 04 003 BUF	PolyHRP Conjugate Stabilizer, ready-to-use
201 04 004 BUF	Substrate buffer
201 03 001 SUB	sTMB substrate solution, soluble, for ELISA Applications; ready-to-use
201 03 002 SUB	pTMB substrate solution, precipitating, for flow trough immunoassay in rapid test applications; ready-to-use
201 03 003 SUB	pTMB substrate solution, precipitating, for biochip applications; ready-to-use

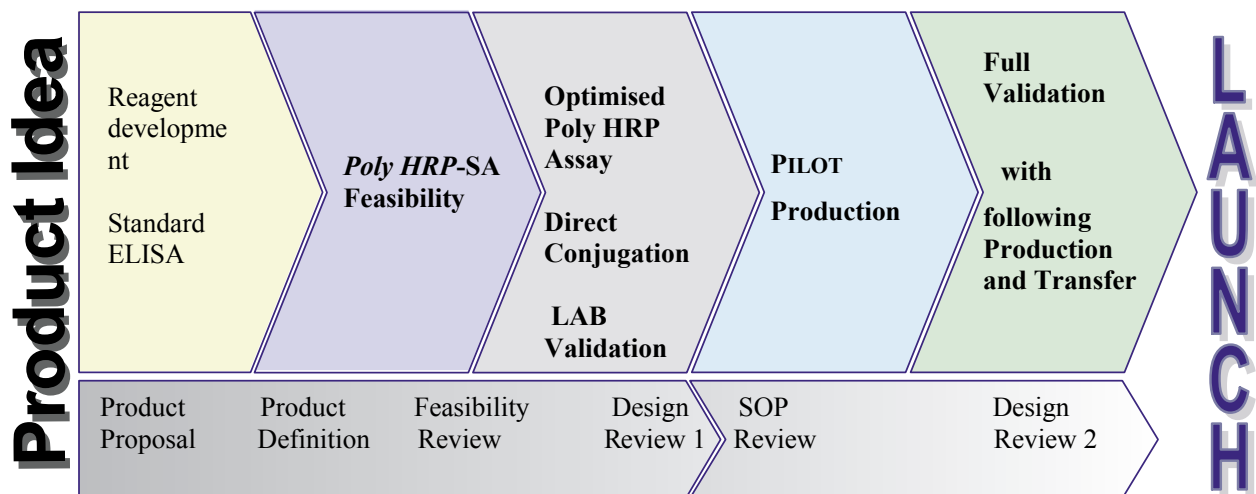


Abb. 5: Projektschema zur Entwicklung Kunden-spezifischer ELISAs

