

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 159123 B

(21) Patentansøgning nr.: 2681/80

(51) Int.Cl.⁵ C 12 Q 1/00

(22) Indleveringsdag: 23 jun 1980

(24) Løbedag: 11 feb 1977

(41) Alm. tilgængelig: 23 jun 1980

(44) Fremlagt: 03 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 0610/77

(30) Prioritet: 13 feb 1976 US 657976 11 jan 1977 US 758518

(71) Ansøger: *Beckman Instruments Inc.; 2500 Harbor Boulevard; Fullerton; California, US

(72) Opfinder: Kenneth Jonas *Pierre; US, Ker-Kong *Tung; US, Henriette *Nadj; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde ved kinetisk analyse for beta-amylase og reagens til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Methods of Enzymatic Analysis vol 1, Academic Press, NY (1974) s 109-110 og 123-127
Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd. 1, a) S. 532-543, b) 826-829 und c) 923-927, Verlag Chemie, Weinheim/-Bergstrasse, 1974;
J. Biol. Chem. 199, 153-163, 1952
J. Biol. Chem. 236, 2186-2189, 1961
Anal. Biochem. 53, 108-114, 1973
J. Gen. Appl. Microbiol. 14, 359-371, 1968
Analytical Biochemistry 57, 1974, S. 303-305;
Arztl. Lap. 17, 1971, 340-343;
Agr. Biol. Chem. 37, 1973 S. 2813-2819;

(57) Sammendrag:

2681-80

1. Fremgangsmåde til analyse for β -amylase, kendetegnet ved,

(a) at der udføres samtidige reaktioner, som indbefatter:

- (i) omsætning af et polysaccharid, som har glycosomolekyler, der primært er sammenknyttet via α -1,4-bindinger i nærværelse af en β -amylaseprøve til dannelse af β -maltose,
- (ii) omsætning af β -maltose med mutarotase til dannelse af α -maltose,
- (iii) omsætning af α -maltose med phosphationer i nærværelse af maltosephosphorylase til dannelse af glycose og β -D-glycose-1-phosphat,
- (iv) omsætning af β -D-glycose-1-phosphat i nærværelse af β -D-phosphoglucomutase til dannelse af glycose-6-phosphat, og
- (v) omsætning af glycose-6-phosphat i nærværelse af glycose-6-phosphatdehydrogenase og et co-enzym udvalgt fra gruppen bestående af β -nicotinamidadeninucleotid, β -nicotinamid-adeninucleotidphosphat og blandinger heraf til dannelse af den reducerede form af co-enzymet og 6-phosphogluconat, og

(b) at dannelseshastigheden af det reducerede co-enzym måles, hvorhos den β -amylase, som måles, er hastighedsbegrænsende.

DK 159123 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde ved kinetisk analyse for β -amylase i vandig opløsning ved omsætning af et polysaccharid, som har glucoseenheder, der primært er sammenknyttet via α -1,4-bindinger, i nærvær af en β -amylaseholdig prøve og bestemmelse af nedbrydningsproduktet frembragt ved den enzymatiske reaktion.

I modsætning til α -amylase, der er et enzym, som forekommer i væsker, som blod, urin og spyt hos dyr og mennesker, forekommer enzymet β -amylase navnlig i planter.

10

Hittidige metoder til bestemmelse af β -amylase-koncentrationer har almindeligvis gjort brug af stivelse på grund af β -amylases katalytiske virkning på hydrolysen af 1,4-bindingerne i stivelsens amylose- og amylopektinfraktioner. Hvis denne hydrolyse får lov til at forløbe til ende, vil β -amylasen efterhånden nedbryde stivelsen til glucose, maltose og oligosaccharider. Faldet i turbiditet eller viskositet af en vandig stivelsesopløsning efter amylosehydrolyse er ved forskellige metoder forsøgt korreleret med den forekommende β -amylasekoncentration.

20

Ved andre metoder benyttes mængden af reducerende stoffer, der dannes ved β -amylase-stivelsesreaktionen, som mål for β -amylasekoncentrationen, eller hastigheden for farvestoffrigørelse fra en farvet stivelse ved hjælp af β -amylase benyttes som et mål for β -amylasekoncentrationen.

25

Der er også blevet udviklet enzymatiske metoder til måling af β -amylasekoncentrationen, hvorved β -amylase og andre enzymer benyttes til hydrolyse af stivelse til glucose, som derefter måles via koblede, enzymatiske reaktioner. Denne fremgangsmåde er imidlertid ikke tilfredsstillende på grund af tilstedeværelsen af glucose i mange analysereagenser, hvilken glucose vil reagere via de koblede, enzymatiske reaktioner under dannelse af et let påviseligt produkt, ud over det, som dannes ved den enzymatiske stivelseshydrolyse. Koncentrationen af denne endogene glucose er almindeligvis væsentlig i forhold til den mængde glucose, som normalt dannes ved den enzymatiske hydrolyse, og som følge heraf må den i forvejen tilstedeværende glucose udelukkes fra analyseprøven, inden analysen gennemføres.

30

35

En anden metode er den jodometriske, der er baseret på den velkendte reaktion mellem jod og stivelse, hvorved der dannes en blå farve. Når den blåfarvede stivelses-jodopløsning hydrolyseres med β -amylase, aftager den blå farve, efterhånden som β -amylasen nedbryder stivelsen. Farveændringen i den blå stivelses-jodopløsning er dermed et mål på β -amylasekoncentration. Denne teknik har imidlertid ikke været anset for pålidelig eller tilstrækkelig bestemt på grund af, at farveændringen ikke forholder sig lineært til koncentrationen af β -amylase.

10

Fra Bergmeyer, H.U. "Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., Bd. 1, s. 532-543, 826-829 og 923-927, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1974, kendes metoder til aktivitetsbestemmelse af phosphoglucomutase, 6-phosphogluconatdehydrogenase, phosphoglucoseisomerase og 3-phosphoglyceratkinase. Phosphoglucomutases aktivitet bestemmes under anvendelse af glucose-6-phosphatdehydrogenase som indikator-enzym. Endvidere kan α -amylaseaktivitet bestemmes ved at måle maltose og glucose, der hidrører fra nedbrydningen af stivelse med α -amylase. Fra "J. Biol. Chem.", 199, 153-163 (1952) og "J. Biol. Chem.", 236, 2186-2189 (1961) er det kendt, at α -maltose med enzymet maltosephosphorylase under tilstedeværelse af phosphorylationer, kan omdannes til glucose og β -D-glucose-1-phosphat ved, at β -D-glucose-1-phosphat danner et substrat for phosphoglucomutase til dannelse af glucose-6-phosphat. I "Analytical Biochemistry", 57, 303-305 (1974) beskrives en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af maltose under anvendelse af maltosephosphorylase koblet med et glucoseoxidasesy-stem. Fra "Analytical Biochemistry", 53, 108-114 (1973) kendes en fremgangsmåde til spektrofotometrisk bestemmelse af β -glucose-1-phosphat i nærvær af α -glucose-1-phosphat og glucose-6-phosphat og under anvendelse af β -mutase. I "J. Gen. Appl. Microbiol.", 14, 359-371 (1968) beskrives oprensning af og 6-phosphogluconatdehydrogenases egenskab til oxidativ decarboxylering af 6-phosphogluconat under dannelse af ribulose-5-phosphat og CO_2 . Endvidere beskrives der i "Ärtzl. Lab.", 17, 340-343, 1971, bestemmelse af α -amylaseaktiviteten sammenkoblet med α -glucosidase, hexokinase og glucose-6-phosphatdehydrogenase som indikator-enzym. I "Agr. Biol. Chem.", 37, 2813-2819, 1973, beskrives oprensning af maltosephosphorylase og undersøgelse og dette enzyms specificitet med henblik på anvendelse af samme til kvantitativ bestemmelse af maltose i nærvær af

stivelseshydrolysater. Fra "Methods of Enzymatic Analyses", vol. 1, Academic Press, New York, s. 109-110 og 123-127, 1974, kendes endvidere bestemmelse af glucose ved en "hjælpereaktion" under anvendelse af et "hjælpeenzym", som omdanner glucose til glucose-6-phosphat, der kan indgå som substrat i en NADP-afhængig indikatorreaktion. Reaktionen er således koblete. Der kan desuden udføres flere "hjælpereaktioner" efter hinanden.

Selvom alle ovennævnte metoder er tilstrækkelige til at give en generel angivelse af β -amylasekoncentrationen, er de dog ikke helt tilfredsstillende, da de enten ikke er brugbare til nøjagtige videnskabelige målinger og/eller er for tidsrøvende.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe en fremgangsmåde til analyse for β -amylase, ved hvilken fremgangsmåde de problemer, som er forbundet med de hidtil kendte metoder til bestemmelse af β -amylasekoncentrationer, overvindes, og en metode til hurtig, enkel, pålidelig og reproducerbar bestemmelse af β -amylasekoncentrationer i en forelagt prøve tilvejebringes.

Dette formål opnås med fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der udføres samtidige reaktioner, som udføres ved et pH på fra 6 til 7,5, og som indbefatter:

(i) Omsætning af polysaccharidet i nærvær af β -amylaseprøven til dannelse af β -maltose,

(ii) omsætning af β -maltose med mutarotase til dannelse af α -maltose,

(iii) omsætning af α -maltose med phosphorylase i nærvær af maltosephosphorylase til dannelse af glucose og β -D-glucose-1-phosphat,

(iv) omsætning af β -D-glucose-1-phosphat i nærvær af β -D-phosphoglucomutase og glucose-1-6-diphosphat samt Mn^{2+} -, Mg^{2+} -, Co^{2+} -, Zn^{2+} - og/eller Ni^{2+} -ioner til dannelse af glucose-6-phosphat, og

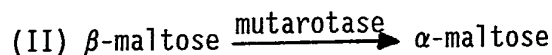
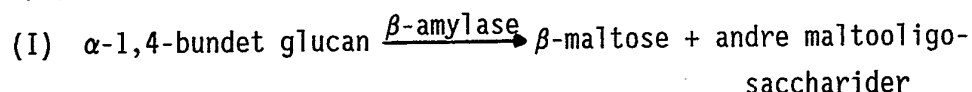
(v) omsætning af glucose-6-phosphat i nærvær af

glucose-6-phosphat-dehydrogenase og et co-enzym udvalgt fra gruppen omfattende β -nicotinamid-adenindinucleotid, β -nicotinamidadenindinucleotidphosphat og blandinger heraf til dannelse af den reducerede form af co-enzymet og 6-phosphogluconat, og,

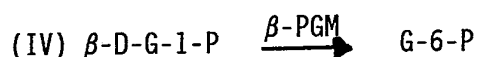
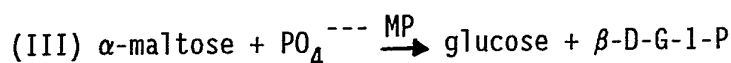
5

at dannelseshastigheden for det reducerede co-enzym måles, hvorhos den β -amylase, som måles, er hastighedsbegrænsende.

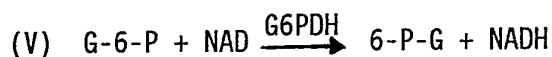
Den kinetiske metode til analyse for β -amylase ifølge opfindelsen
10 omfatter således følgende samtidige reaktioner:



15



20



hvor koncentrationen af β -amylase i den vandige opløsning bestemmes ved måling af dannelseshastigheden for NADH, hvilket er et mål for β -amylasekoncentrationen.

25

I ovenstående reaktionsskemaer og i det følgende er nedenstående forkortelser anvendt:

Forkortelser:

30

PO_4^{---}

- phosphorylation

MP

- maltosephosphorylase

$\beta\text{-D-G1P}$

- $\beta\text{-D-glucose-1-phosphat}$

$\beta\text{-PGM}$

- $\beta\text{-D-phosphoglucomutase}$

35

G-1,6-diP

- D-glucose-1,6-diphosphat

G-6-P

- glucose-6-phosphat

6-PG

- 6-phosphogluconat

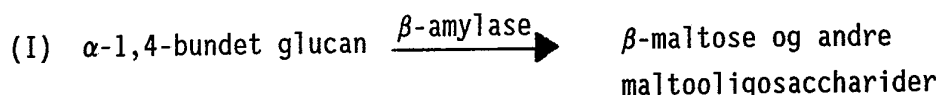
G6PDH

- glucose-6-phosphat-dehydrogenase

6PDH	- 6-phosphogluconat-dehydrogenase
NAD	- β -nicotinamid-adenindinucleotid
NADH	- reduceret form af β -nicotinamid-adenindinucleotid

5

Med hensyn til den første af ovennævnte reaktioner:



10

kan den α -1,4-bundne glucan være et hvilket som helst polysaccharid, som primært består af glucose, hvori glucosemolekylerne hovedsagelig er forbundne ved α -1,4-bindinger, der kan angribes af β -amylasen. Eksempler på sådanne polysaccharider er stivelse, amylopectin, amylose, glycogen, dextrin og nedbrydningsprodukter heraf og homologue af maltooligosaccharider, såsom maltotriose, maltotetraose og maltopentaose eller blandinger heraf.

15

Stivelse er den foretrukne form af glucanen som følge af, at den frembyder den bedste kombination af opløselighed, lav pris, genvinding og stabilitet. "Superlose 500" er handelsbetegnelsen for en stivelse, som foretrækkes ved bestemmelse af β -amylase. Denne stivelse har god koldtvandsopløselighed, giver bedre respons og linearitet end andre stivelser, god reproducerbarhed og er ikke turbid i opløsning. "Superlose 500" er en modificeret amylose, som distribueres af Stein-Hall Company, New York City. "Superlose 500" er et hvidt granulært materiale med et fugtighedsindhold på ca. 10%, en pH-værdi på 7 og en filmtrækstyrke på over 51,4 kg/cm². Viskositeten af "Superlose 500" i Brookfield Pa.s ved 66°C er $185 \cdot 10^{-3}$ for 14% tørstof, $55 \cdot 10^{-3}$ for 10% tørstof, og $10 \cdot 10^{-3}$ for 5% tørstof. Ved 24°C er viskositeten $2000 \cdot 10^{-3}$ for 14% tørstof, $275 \cdot 10^{-3}$ for 10% tørstof og $30 \cdot 10^{-3}$ for 5% tørstof. "Superlose 500" opløses let i vand ved stuetemperatur i modsætning til de fleste stivelser, som kræver en vis grad af omrøring og/eller opvarmning, inden de går i opløsning. "Superlose 500" er fremstillet af den modificerede amylosefraktion af kartoffelstivelse og indeholder ikke nogen væsentlig mængde stivelses-amylopectinfraktion.

20

25

30

35

"GR brand starch" er handelsbetegnelsen på en anden stivelse, som

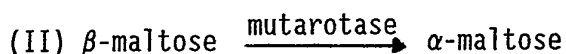
kan benyttes i den foretrukne udførelsesform. "GR brand starch" distribueres af E. Merck Company, 500 Executive Blvd., Elmsford, New York, og forhandles af Merck European, Darmstadt, Tyskland. Denne stivelse dialyseres inden anvendelse og har følgende egenskaber:

5 maksimalt sulfataskeindhold på 7 vægtprocent og et tørringstab på 10 vægtprocent, 1 g "GR stivelse" har en reduceringsevne ækvivalent med 7 mg maltose, pH værdien er mellem 6,5 og 7,5, og den udviser en gunstig sensitivitetsprøve.

10 Ved bestemmelse af β -amylase er det nødvendigt, at β -amylasen er hastighedsbegrænsende. Mængderne af de andre bestanddele i reagenssystemet bør dermed være til stede i sådanne mængder, at det sikres, at den observerede reaktionshastighed for det fuldstændige analyse-

15 β -amylasekatalyserede reaktion (reaktion I). Til analysen foretrækkes det at benytte en koncentration på mellem ca. 1,0 og ca. 20 g af en α -1,4-bundet glucan pr. liter reagens. En glucankoncentration på ca. 5 g pr. liter reagens foretrækkes.

20 Med hensyn til den anden ovenfor nævnte reaktion:

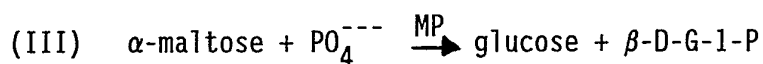


omdannes den ved den første reaktion dannede β -maltose under katalytisk indvirkning af mutarotase til α -maltose. Mutarotasen bør foreligge i en koncentration på mindst 2.000 enheder, fortrinsvis 60.000 enheder, pr. liter reagens.

25

Ved den tredje af ovenanførte reaktioner:

30



omsættes den α -maltose, som dannes ved den anden reaktion, med phosphationer under anvendelse af maltosephosphorylase som enzymatisk katalysator til dannelse af glucose og β -D-glucose-1-phosphat.

35

Phosphationerne kan tilføres fra en hvilken som helst kilde, som er forligelig med reagenssystemet. Uorganiske phosphater er et eksempel på en sådan kilde. Det foretrukne phosphat er en blanding af K_2HPO_4

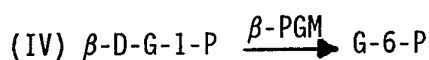
og KH_2PO_4 , som udgør en pufret opløsning med en pH-værdi på ca. 6,5, hvilket er det optimale.

Koncentrationen af phosphationer bør ligge på et niveau, som sikrer, at β -amylase er den hastighedsbegrænsende forbindelse. Det er imidlertid ønskeligt ikke at have en for høj koncentration af phosphationer som følge af, at store koncentrationer kan inhibere aktiviteten af β -PGM-enzymet. Det foretrækkes at have en molær koncentration på fra ca. 0,01 til ca. 0,1 af uorganisk fosfat, idet ca. 0,025 molær er den mest foretrukne.

Maltosephosphorylase er et enzym, som katalyserer reaktionen mellem α -maltose og uorganisk fosfat. Mindst ca. 200 internationale enheder (IU) af dette enzym pr. liter reagens er nødvendige, men ca. 2.000 IU pr. liter foretrækkes.

Den foretrukne kilde til maltosephosphorylase er en stamme af mikroorganismen Lactobacillus brevis (ATCC 8287), som er blevet dyrket af Beckman Instruments, Inc., Microbics Operations, Carlsbad, Californien, og enzymet er blevet ekstraheret og rensat ved sædvanlige fremgangsmåder derfra. Andre kilder til dette enzym er stammer af Neisseria meningitides, Neisseria perflava og andre Lactobacilli-stammer.

Med hensyn til den fjerde af ovennævnte reaktioner:



katalyserer enzymet β -phosphoglucomutase (β -PGM) omdannelsen af β -D-glucose-1-phosphat til glucose-6-phosphat. β -Phosphoglucomutase er til stede i en mængde på mindst ca. 100 IU pr. liter reagens, således at β -amylase i reaktionen I forbliver den hastighedsbegrænsende bestanddel. Fortrinsvis anvendes ca. 500 IU β -PGM pr. liter reagens ved analyse af β -amylase. Den foretrukne kilde til β -PGM er Lactobacillus Brevis (ATCC 8287). Den dyrkes og renses ved sædvanlige enzymrensingsmetoder. Andre kilder er stammer af Neisseria meningitides, Neisseria perflava og Euglena gracilis.

Glucose-1,6-diphosphatet (G-1,6-diP) i enzymsystemet virker som

cofaktor for β -PGM. β -PGM kræver β -formen af G-1,6-diP for aktivitet, men det antages, at α -formen af denne cofaktor også kan virke. Den foretrukne koncentration af G-1,6-diP bør være mindst ca. 0,01 g pr. liter reagens. Den optimale koncentration er ca. 0,075 g pr. liter.

De divalente kationer i form af Mn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} eller Ni^{+2} virker i enzymsystemet som cofaktor for β -PGM. Kationerne Mn^{+2} , Mg^{+2} eller Co^{+2} foretrækkes fremfor Zn^{+2} eller Ni^{+2} . Kationkoncentrationen bør være mindst ca. 1 millimol pr. liter reagens og er fortrinsvis 8,4 millimol pr. liter.

Hvad angår den femte af ovennævnte reaktioner:

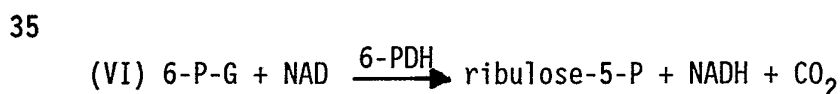


omsættes glucose-6-phosphat med β -nicotinamid-adenindinucleotid og G6PDH under dannelse af 6-phosphogluconat og NADH.

20 Mængden af NAD bør være tilstrækkelig stor til at holde β -amylasen som den hastighedsbegrænsende bestanddel. Et egnet område for NAD-koncentrationen er fra ca. 1 til ca. 10 millimol pr. liter reagens. Den foretrukne koncentration af NAD er ca. 2,5 millimol. β -Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat (NADP) kan erstatte NAD.

25 Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) bør også være til stede i en koncentration på mindst ca. 500 IU pr. liter reagens, således at denne reaktion ikke er den hastighedsbegrænsende reaktion. Den foretrukne koncentration af G-6-PDH-enzymet er ca. 5000 IU pr. liter reagens. Den foretrukne kilde for G-6-PDH er Leuconostoc mesenteroides (ATCC 12291), men det kan fås fra andre kilder.

Det er ønskeligt at benytte en sjette reaktion som en del af analysen:



Formålet med denne sjette reaktion er at forøge sensitiviteten og nøjagtigheden af analysen ved at forøge den dannede mængde NADH.

Den minimale koncentration af 6-PDH bør være mindst ca. 200 IU pr. liter reagens. Den optimale koncentration af 6-PDH er ca. 700 IU pr. liter. Den foretrukne kilde til dette enzym er Leuconostoc mesenteroides (ATCC 12291), hvorfra enzymet er blevet udvundet og rensat ved sædvanlige kendte fremgangsmåder, men det kan fås fra andre kilder.

Natriumchlorid kan tilsættes reagenssystemet til forøgelse af aktiviteten af β -amylasen.

Puffere omfattende dibasisk kaliumphosphat (K_2HPO_4) og monobasisk kaliumphosphat (KH_2PO_4) kan benyttes til at tilvejebringe den optimale pH-værdi, hvorved reaktionssekvensen gennemføres. Ikke-phosphatpuffere kan benyttes, men fosfatpuffere foretrækkes, fordi de samtidig udgør en kilde til phosphorylationer.

Eksempler på andre puffere, som er blevet afprøvet og har vist sig at være tilfredsstillende, er piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsyre), tris(hydroxymethyl)aminomethan, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsyre og triethanolamin. Eksempler på andre puffere, som også kan være tilfredsstillende er N-(2-acetamido)iminodiddikesyre, N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonsyre og N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsyre.

NADH-Dannelseshastigheden og omregningen af denne hastighed til β -amylasekoncentrationen gennemføres ved velkendte metoder. En af disse metoder benytter spektrofotometrisk udstyr til at måle ændringen i lysabsorbans som følge af dannelsen af NADH ved bølglængder beliggende mellem 300 og 370 millimicron (nm) ved et temperaturområde på fra ca. 15°C til ca. 50°C. En bølglængde på ca. 340 nm ved ca. 37°C foretrækkes.

Når hastigheden for absorbansændringen måles, kan koncentrationen af β -amylase beregnes efter nedenstående ligning, hvori absorbansændringen måles ved en bølglængde på 340 nm og ved en temperatur på 37°C:

$$\text{IU/liter} = \frac{\Delta A \times V_t \times 1000}{V_s \times 6,22}$$

5

ΔA = forandring i absorbans/minut

V_t = totalt reaktionsrumfang

V_s = rumfang prøve indeholdende β -amylase

6,22 = millimolært absorptivitetstal for NADH ved 340

10

nm.

15

Reagenssystemet til bestemmelse af β -amylasekoncentrationen indeholder udgangsmaterialet for reaktion I, α -1,4-bundet glucan og alle bestanddelene, med undtagelse af β -amylase, som er nødvendige for, at alle de fem reaktioner kan forløbe som angivet, d.v.s. mutarotase, phosphorylationer, MP, β -PGM og G6PDH. Dette reagenssystem kan tilvejebringes og benyttes som en blanding eller tilvejebringes i form af et sæt bestående af et antal reagenser, som hver for sig indeholder én eller flere af ingredienserne i reagenssystemet, som alle sammenblandes, når reagenserne benyttes i β -amylase-analysen. Alle førnævnte bestanddele i reagenssystemet har vist sig at være stabile som én blanding, og det foretrækkes derfor, at reagenssystemet tilvejebringes som én blanding, idet det er lettere at arbejde med ét reagens fremfor et antal reagenser.

25

Opfindelsen omfatter derfor også et reagens til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilket reagens er ejendommeligt ved, at det omfatter:

30

(a) et polysaccharid af glycoseenheder, der primært er sammenknyttet via α -1,4-bindinger,

(b) phosphorylationer,

35

(c) maltosephosphorylase,

(d) et co-enzym udvalgt fra gruppen bestående af β -nicotinamid-adenindinucleotid, β -nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat og blandinger heraf,

- (e) glucose-6-phosphatdehydrogenase,
- (f) β -D-phosphoglucomutase,
- 5 (g) mutarotase,
- (h) glucose-1,6-diphosphat,
- (i) Mn^{2+} -, Mg^{2+} -, Co^{2+} -, Zn^{2+} - og/eller Ni^{2+} -ioner, og eventu-
- 10 elt
- (j) 6-phosphogluconatdehydrogenase,

15 hvorhos ovenstående stoffer er til stede i sådanne mængder, at den β -amylase, som skal bestemmes, er hastighedsbegrænsende.

Eksempel

Bestanddele i analyseblanding til β -amylasebestemmelse

20

Nedenstående angiver sammensætningen af det foretrukne reagens fremstillet som en 1-liters opløsning i deioniseret vand:

	"Superlose 500"	5,00 gram
25	dibasisk kaliumphosphat	2,65 gram
	monobasisk kaliumphosphat	1,33 gram
	maltosephosphorylase	2000 IU
	β -phosphoglucomutase	500 IU
	NAD $\cdot$ 4H ₂ O	1,8 gram
30	glucose-6-phosphatdehydrogenase	5000 IU
	6-phosphogluconatdehydrogenase	700 IU
	MgCl ₂ $\cdot$ 6H ₂ O	1,7 gram
	natriumchlorid	0,5 gram
	G-1,6-diP	0,075 gram
35	Mutarotase	60.000 IU

pH-Værdien indstilles til fra ca. 6,0 til ca. 7,5, idet en pH-værdi på 6,5 foretrækkes.

Reagenssystemet kan opbevares og benyttes i form af en vandig opløsning, eller opløsningen kan frysetørres ved sædvanlige foranstaltninger og rekonstitueres med vand, når den er klar til brug. Reagenssystemet kan også fremstilles under anvendelse af dets bestanddele i pulveriseret form, som opløses med vand umiddelbart inden brugen.

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde ved kinetisk analyse for β -amylase i vandig opløsning ved omsætning af et polysaccharid, som har glucoseenheder, der primært er sammenknyttet via α -1,4-bindinger, i nærvær af en β -amylaseholdig prøve og bestemmelse af nedbrydningsproduktet frembragt ved den enzymatiske reaktion, k e n d e t e g n e t ved, at der udføres samtidige reaktioner, som udføres ved et pH på fra 6 til 7,5, og som indbefatter:
- 10 (i) Omsætning af polysaccharidet i nærvær af β -amylaseprøven til dannelse af β -maltose,
- (ii) omsætning af β -maltose med mutarotase til dannelse af α -maltose,
- 15 (iii) omsætning af α -maltose med phosphatation i nærvær af maltosephosphorylase til dannelse af glucose og β -D-glucose-1-phosphat,
- 20 (iv) omsætning af β -D-glucose-1-phosphat i nærvær af β -D-phosphoglucomutase og glucose-1-6-diphosphat samt Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} og/eller Ni^{2+} ioner til dannelse af glucose-6-phosphat, og
- (v) omsætning af glucose-6-phosphat i nærvær af glucose-6-phosphat-dehydrogenase og et co-enzym udvalgt fra gruppen omfattende β -nicotinamid-adenindinucleotid, β -nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat og blandinger heraf til dannelse af den reducerede form af co-enzymet og 6-phosphogluconat, og
- 25 at dannelseshastigheden for det reducerede co-enzym måles, hvorhos den β -amylase, som måles, er hastighedsbegrænsende.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at i trin (v) omsættes 6-phosphogluconat i nærvær af co-enzym og
- 35 6-phosphogluconat-dehydrogenase til dannelse af den reducerede form af co-enzymerne og ribulose-5-phosphat.
3. Reagens til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter

- 5
- (a) et polysaccharid af glycoseenheder, der primært er sammenknyttet via α -1,4-bindinger,
- (b) phosphorylationer,
- (c) maltosephosphorylase,
- 10 (d) et co-enzym udvalgt fra gruppen bestående af β -nicotinamid-adenindinucleotid, β -nicotinamid-adenindinucleotidphosphat og blandinger heraf,
- (e) glyco-6-phosphatdehydrogenase,
- 15 (f) β -D-phosphoglucomutase,
- (g) mutarotase,
- (h) glucose-1,6-diphosphat,
- 20 (i) Mn^{2+} -, Mg^{2+} -, Co^{2+} -, Zn^{2+} - og/eller Ni^{2+} -ioner, og eventuelt
- (j) 6-phosphogluconatdehydrogenase,
- 25 hvorhos ovenstående stoffer er til stede i sådanne mængder, at den β -amylase, der skal bestemmes, er hastighedsbegrænsende.
- 30
- 35