

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

268 737

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/542

(21) PV 4959-88.B

(22) Přihlášeno 08 07 88

(40) Zveřejněno 12 07 89

(45) Vydáno 31 08 90

(75)
Autor vynálezu

ŘÍČNÝ JAN RNDr. CSc.,
TUČEK STANISLAV MUDr. DrSc.,
ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., PRAHA

(54)

Způsob kvantitativního luminometrického
stanovení peroxidu vodíku a substrátu
oxidáz

(57) Řešení se týká způsobu kvantitativního luminometrického stanovení peroxidu vodíku a substrátů oxidáz. Tento způsob spočívá v injekci vzorku substrátu do kontinuálního proudu média. Stykem média s imobilizovaným enzymem odpovídajícím příslušnému substrátu vzniká při enzymatické oxidaci substrátu peroxid vodíku. Ten přichází dále do styku s imobilizovanou peroxidázou umístěnou v zorném poli luminometru. Médium obsahuje chemickou látku, která při reakci s peroxidem vodíku katalyzované peroxidázou vykazuje luminescenci. Samotná kvantifikace se děje na základě srovnání mezi odezvami na neznámý stanovovaný vzorek substrátu a na známé množství zkoumané látky. Tato stanovení je možno využít v oblasti biochemie, lékařské biochemie, fyziologie a farmaceutického průmyslu.

Vynález se týká způsobu kvantitativního luminometrického stanovení peroxidu vodíku a substrátů oxidáz.

Vytvoření analytických metod umožňujících kvantitativní stanovení biologicky významných látek s vysokou citlivostí je velkým problémem v biochemických laboratořích. Pro měření některých látek, které je možno působením oxidáz přeměnit na peroxid vodíku, je používáno luminiscence, při které je do kyvety luminometru napipetován příslušný stanovovaný substrát, jemu odpovídající oxidáza, peroxidáza a luminol příp. jiný akceptor elektronů. Oxidáza převede substrát na peroxid vodíku, který v přítomnosti peroxidázy reaguje s luminolem za vzniku luminiscence. Velikost luminiscence, registrované luminometrem, odpovídá původnímu množství stanovovaného substrátu. Metoda i její aplikace jsou podrobně popsány v knize M.A.Detuca /ed./, *Methods in Enzymology*, vol. 57, *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Academic Press New York, 1978/.

Tato metoda, přestože je vysoce citlivá, má své nevýhody. Nutnost přidání nového množství enzymů pro každé jednotlivé měření znamená vysokou spotřebu specifických enzymů. Měření samotné je pomalé a pracné. Tyto nevýhody odstraňuje způsob měření podle vynálezu. Jsou v něm uplatněny dva základní prvky novosti. Injekce měřených vzorků substrátů je prováděna přímo do kontinuálního proudu média, čímž odpadá přidávání jednotlivých enzymů ke každému vzorku a použité enzymy jsou navíc imobilizovány na vhodném nosiči, se kterým proudící médium přichází do styku.

Způsob kvantitativního stanovení peroxidu vodíku a substrátů oxidáz spočívá tedy v injekci vzorku substrátu do kontinuálního proudu média. Stykem média s imobilizovaným enzymem odpovídajícím příslušnému substrátu vzniká při enzymové oxidaci substrátu peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku prochází pak s médiem kolonkou s imobilizovanou peroxidázou na nosiči, který je propustný pro světelné záření, např. drobné skleněné nebo plastové kuličky, stěny skleněné nebo plastové kapiláry apod.

Medium obsahuje chemickou látku např. luminol, isoluminol apod., která při reakci s peroxidem vodíku katalyzované peroxidázou slouží jako akceptor elektronů a při oxidaci vykazuje luminiscenci. Proto je imobilizovaná peroxidáza umístěna přímo v zorném poli luminometru.

Světelný signál, vznikající při enzymatické redukci peroxidu vodíku, je přímo úměrný koncentraci peroxidu vodíku a tedy i původního vzorku substrátu pro použitou imobilizovanou oxidazu. Samotná kvantifikace se děje na základě srovnání mezi odezvami na neznámý stanovovaný vzorek substrátu a na známé standardní množství zkoumané látky.

Princip tohoto způsobu stanovení je možno využít v oblasti biochemie, lékařské biochemie, fyziologického a farmaceutického výzkumu. Charakteristickým příkladem látek, které mohou být tímto způsobem stanoveny, jsou glukosa, cholin a cholesterol.

Příklad

Popsaný způsob byl použit ke stanovení množství acetylcholinu (ACh) v extraktech z mozkové tkáně. K tomuto účelu byla použita kombinace tří imobilizovaných enzymů na třech za sebou následujících kolonách: acetylcholinesteráza /vytváří z acetylcholinu cholin/, cholinoxidáza /vytváří z cholinu peroxid vodíku/ a peroxidáza

/katalyzuje interakci mezi peroxidem vodíku a luminolem, přítomným v proudicím médiu, a tím vznik luminiscence/. Do kontinuálního proudu média byly ve třímínutových intervalech vstřikovány jednak vzorky známých množství ACh /500 pmol, 200 pmol, 100 pmol atd./, jednak 250 μ l množství tkáňových extraktů. Odpověď luminometru na standardní množství ACh se v průběhu pokusu neměnila. Porovnáním mezi odpověďmi na známá množství ACh a na tkáňové extrakty bylo možno vypočítat koncentraci ACh v jednotlivých extraktech.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob kvantitativního luminometrického stanovení peroxidu vodíku a substrátů oxidáz v médiu obsahujícím chemickou látku, která při reakci s peroxidem vodíku, katalyzované peroxidázou, slouží jako akceptor elektronů a při oxidaci vykazuje luminiscenci, vyznačený tím, že substrát oxidáz se injektuje do kontinuálního proudu média, se kterým se přivádí do styku s imobilizovaným enzymem, odpovídajícím příslušnému substrátu, převede se kvantitativně na peroxid vodíku, který dále prochází kolonkou umístěnou v zorném poli luminometru a obsahující imobilizovanou peroxidázu, přičemž signály luminometru odpovídají přímo úměrně množství příslušného substrátu případně peroxidu vodíku.