

PATENT-SCHRIFT 143 180

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	143 180	(44)	06.08.80	Int. Cl. ³	3(51) G 01 N 33/54
(21)	WP G 01 N / 212 921	(22)	16.05.79		

-
- (71) ZI für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
- (72) Scheller, Frieder, Dr. Dipl.-Chem.; Pfeiffer, Dorothea, Dipl.-Biol.; Jänchen, Michael, Dr. Dipl.-Chem.; Seyer, Ingrid; Siepe, Martina, DD
- (73) siehe (72)
- (74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, AG Patent- und Neuererwesen, 1115 Berlin, Lindenberger Weg 70
-

(54) Enzymelektrode zur NAD(P)-Bestimmung

(57) Die Erfindung bezieht sich auf eine Enzymelektrode zur NAD(P)-Bestimmung. Sie eignet sich besonders für den Einsatz in klinischen Labors und in der Mikrobiologie. Das Ziel der Erfindung besteht darin, mit einer Enzymelektrode bei kurzer Meßzeit und Wiederverwendbarkeit des Enzyms die NAD(P)-Konzentration und damit Substrate NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen sowie die enzymatische Aktivität von Dehydrogenasen, z.B. LDH in physiologischen und mikrobiologischen Lösungen zu bestimmen. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode ist eine O₂- oder H₂O₂-anzeigende Elektrode, die mit einer Enzymschicht versehen ist, in der die Glukoseoxidase und Glukosedehydrogenase homogen oder in getrennten Schichten aufgebracht und mit einem Dialyseschlauch abgedeckt ist. In die Meßlösung wird eine definierte Glukosemenge zugegeben. Die NAD(P)-Bestimmung ist mit dieser Elektrode einfacher und billiger durchzuführen.

Erfinder	Dr. F. Scheller	ZIM
	D. Pfeiffer	ZIM
	M. Jänchen	FMD
	I. Seyer	ZIM
	M. Siepe	ZIM

Enzymelektrode zur NAD(P)-Bestimmung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode zur Bestimmung der Konzentration von Nicotinsäureadenin-dinukleotid (NAD) und Nicotinsäureadenin-dinukleotidphosphat (NADP) (zusammen als NAD(P) bezeichnet) und ermöglicht die Bestimmung der Konzentration von Substraten NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen sowie der Dehydrogenaseaktivität. Da in vivo etwa 200 verschiedene Dehydrogenasen (DH) vorkommen, ist die Enzymelektrode besonders für den Einsatz im klinischen Labor geeignet. Außerdem ist sie für die NAD(P)-Messungen in der Mikrobiologie und Nahrungsgüterwirtschaft geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die verbreitete Methode zur Bestimmung der NAD(P)-Konzentration ist der optische Test. Er beruht auf der Messung der UV-Absorption des Reduktionsproduktes NAD(P)H bei 340 nm. Diese Methode wird auch zur Konzentrationsmessung der Substrate NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen angewandt.

Die elektrochemische Messung der NAD(P)-Konzentration ist nur in sauerstofffreier Lösung möglich, da sich die H_2O_2

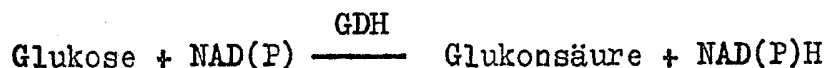
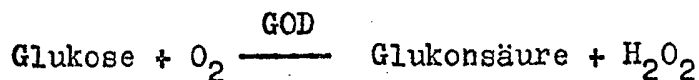
und die 1. NAD(P)-Reduktionsstufe überlagern. Dabei führt das Entlüften zur Denaturierung der Proteinmoleküle.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist es, mit einer Enzymelektrode bei kurzer Meßzeit und Wiederverwendbarkeit der Enzyme die NAD(P)-Konzentration und damit die Substrate NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen sowie die enzymatische Aktivität von Dehydrogenasen in physiologischen und mikrobiologischen Lösungen zu bestimmen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, durch Kombination der Enzyme Glukoseoxidase (GOD) und Glukosedehydrogenase (GDH) ein Signal zu erhalten, das von der NAD(P)-Konzentration abhängt. Die Aufgabe wird mit einer Enzymelektrode dadurch gelöst, daß die beiden Enzyme gemeinsam in einer Schicht vor einer üblichen Sauerstoffelektrode angeordnet sind und der Meßlösung eine definierte Menge Glukose zugesetzt ist. In Abwesenheit von NAD(P) tritt durch die Glukoseoxidation ein O_2 -Verbrauch auf, der der zugesetzten Glukosemenge proportional ist (Prinzip der Glukoseelektrode (F. Scheller et al., Z.med.Lab.Diagn. 18, 312 (1977))). Bei Zugabe von NAD(P) zu dieser Lösung wird ein Teil der Glukose durch die GDH vor der Elektrode zu Glukonsäure umgesetzt, so daß eine Verkleinerung des Signals für Glukose auftritt, die von der NAD(P)-Menge abhängt.



Die erfindungsgemäße Enzymelektrode arbeitet also ohne die Verwendung eines Kofaktors. Sie erlaubt sowohl die kontinuierliche als auch die punktweise Bestimmung der NAD(P)-Konzentration mit einfachen Geräten (pO_2 -Meter). Damit ist auch die Bestimmung des NAD(P)-Verbrauches, d.h. der NAD(P)H-Bildung möglich.

Zur Bestimmung von Substraten von NAD(P)H-abhängigen DH ist es zweckmäßig, daß die Enzymschicht zur GOD und GDH zusätzlich mit der für das Substrat spezifischen DH versehen ist.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an 2 Ausführungsbeispielen erläutert werden.

1. Beispiel

200 U GOD und 50 U GDH mit 3 U Mutarotase werden in 0,3 ml Lösung von 5 mg Acrylamid aufgelöst und auf einer Fläche von 2 cm^2 zwischen 2 Glasplatten ausgestrichen und photopolymerisiert. Ein $3 \times 3 \text{ mm}$ großes Filmstück wird auf der Polyäthylenfolie der Clark-Elektrode unmittelbar vor der Indikatorelektrode (Pt) plaziert. Über die Enzymschicht wird ein Dialyseschlauch mit einem O-Ring über den Elektrodenmantel gespannt. Die so präparierte Enzymelektrode taucht in die gerührte Meßlösung von 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,6, und ist an ein pO_2 -Meter mit Schreiber angeschlossen.

Nachdem sich der Grundstrom eingestellt hat, wird eine Menge an Glukose zugegeben, so daß die Konzentration in der Meßlösung 0,5 mM beträgt. Nach 2 Minuten ist der stationäre Stromwert erreicht und es erfolgt 8-mal die Zugabe von jeweils 0,25 mM NAD (Aufnahme der Eichkurve). Dabei tritt jeweils eine Verkleinerung des Glukosesignals ein, wobei nach dem steilen Abfall unmittelbar nach NAD-Zugabe der Übergang zu einem konstanten Gebiet erfolgt. Der Meßwert ergibt sich als Schnittpunkt der linearen Extrapolation beider Gebiete.

Zur Messung der LDH-Aktivität wird eine Lösung, die 0,5 mM Glukose und 1 mM NAD sowie 0,1 M Laktat enthält in die Meßzelle eingefüllt. Nachdem der Strom einen konstanten Wert besitzt, werden $20 \mu\text{l}$ der LDH-haltigen Serumprobe zugegeben. Durch die Enzymreaktion erfolgt ein Anstieg der Strom-Zeit-Kurve, da die NAD-Konzentration verkleinert wird. Aus der Eichkurve kann damit die LDH-Aktivität errechnet werden.

2. Beispiel

Eine photopolymerisierte Enzymschicht, die nur GOD enthält, wird wie in Beispiel 1 auf die O_2 -Elektrode aufgebracht. An-

- schliessend wird eine zweite Polyacrylamidschicht von 20 μ Dicke, die 30 U GDH und 20 U Alkoholdehydrogenase je cm^2 enthält, über die GOD-Schicht gelegt und mit einem Dialyseschlauch auf der Stirnfläche des Elektrodenmantels fixiert. Diese Elektrode taucht in 5 ml temperierte Grundlösung, die 0,5 mM Glukose, 1 mM NAD in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6 enthält.
- Nachdem sich der Strom stabilisiert hat, werden 100 μ l der G Äthanol-haltigen Meßprobe zugegeben. In der Enzymreaktion wird eine zur Konzentration an Äthanol äquimolare NAD-Menge verbraucht und deshalb der Strom erhöht. Diese Erhöhung ergibt die Äthanolkonzentration aus der Eichkurve, die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurde.

Erfindungsanspruch

1. Enzymelektrode zur Bestimmung von NAD(P) mittels einer O_2 - oder H_2O_2 -anzeigenden Elektrode dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode mit einer Enzymschicht, in der Glukoseoxidase und Glukosedehydrogenase homogen oder in getrennten Schichten aufgebracht und durch einen Dialyseschlauch abgedeckt ist, wobei in die Meßlösung eine definierte Menge Glukose zugesetzt ist.
2. Enzymelektrode nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymschicht zur Glukoseoxidase und -dehydrogenase zusätzlich Laktat- oder Alkoholdehydrogenase enthält.