



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

AT 392 539 B

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 255/86

(51) Int.Cl.⁵ : **G01N 21/27**
G01N 21/25, 21/64, 21/76

(22) Anmeldetag: 3. 2.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1990

(45) Ausgabetag: 25. 4.1991

(56) Entgegenhaltungen:

DE-DS2948904 DD-PS 106086 GB-PS2103786

(73) Patentinhaber:

AVL GESELLSCHAFT FÜR VERBRENNUNGSKRAFTMASCHINEN
UND MESSTECHNIK MBH. PROF.DR.DR.H.C. HANS LIST
A-8020 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

WOLFBEIS OTTO S. DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).

(54) VERFAHREN ZUR OPTISCHEN BESTIMMUNG DER KATALYTISCHEN ENZYMAKTIVITÄT EINER PROBE, UND
EINE ANORDNUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

(57) Bekannte Verfahren zur optischen Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität einer Probe, bei welchen Enzymsubstrate verwendet werden, die unter dem Einfluß der zu messenden Enzyme gespalten werden und in farbige oder fluoreszierende Produkte zerfallen, wobei die Zunahme an Farbe oder Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit als Maß für die enzymatische Aktivität gilt, haben den Nachteil, daß sie nur für optisch transparente Probenlösungen geeignet sind. Vollblutmessungen, insbesondere in-vivo-Bestimmungen der Enzymaktivität, sind daher unmöglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren umgeht diese Nachteile dadurch, daß ein Enzymsubstrat am Ende eines Lichtleiters angeordnet und mit der zu messenden Probe in Kontakt gebracht wird und daß die durch enzymatische Reaktion bedingte Änderung spektraler Eigenschaften des Enzymsubstrates bzw. dessen Reaktionsprodukte pro Zeiteinheit erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird.

AT 392 539 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität einer Probe, und eine Anordnung zur Durchführung des Verfahrens, wobei die zu messende Probe in Kontakt mit einem Enzymsubstrat steht.

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität von Enzymen spielt in der biochemischen und klinischen Analytik eine sehr große Rolle, Abweichungen von der Normalaktivität sind oft charakteristisch für das Auftreten von Krankheiten. Beispielsweise ist die Aktivität des Enzyms "Saure Phosphatase" beim Auftreten von Knochen- oder Prostata Tumoren deutlich erhöht, sodaß ihrer Bestimmung eine beträchtliche diagnostische Bedeutung zukommt.

Eine Vielzahl von Verfahren ist für die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten bekannt geworden. Sie sind zusammengefaßt in den Büchern von G. G. GUILBAULT: *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press, Oxford, 1970; sowie H. BERGMAYER: *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1977. Auch die Identifikation bakterieller Pathogene mit Hilfe synthetischer Protease-Substrate ist in letzter Zeit von Interesse geworden [publiziert von COBURN, LYTLE und HUBER, in *Anal. Chem.* 57, 1669 (1985)].

Es ist bekannt, die Aktivität von Enzymen mit Hilfe beispielsweise synthetischer, farbiger oder fluoreszierender Substrate zu bestimmen. Man verwendet dazu Enzymsubstrate, welche unter dem Einfluß der Enzyme gespalten werden und in farbige Produkte zerfallen. Die Zunahme von Farbe oder Fluoreszenzintensität mit der Zeit dient als Maßzahl der enzymatischen Aktivität. Unter den Hydrolasen, welche mit Hilfe dieser kinetischen Methode besonders gut bestimmbar sind, sind zu erwähnen die Carboxylesterasen, Phosphatasen, Sulfatasen, Dealkylasen, Glykosidasen und Proteasen.

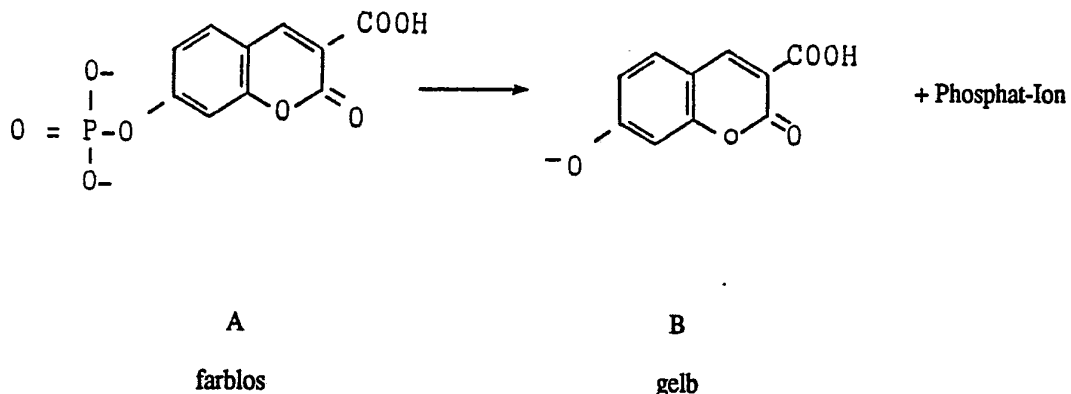
Als typisches Beispiel sei die aus *Analytical Biochemistry*, 143, 146 (1984) von KOLLER und WOLFBEIS bekanntgewordene Methode zur Bestimmung der Phosphatasen angeführt, welche darauf beruht, daß ein Phosphorsäureester der folgenden Struktur A

25

30

35

40



durch das Enzym "Saure Phosphatase" in zwei Bruchstücke gespalten wird. Es entsteht ein ionisches Hydrolyseprodukt B sowie ein freies Phosphat-Ion. Das Phenolat-Ion B ist, im Gegensatz zum Ausgangssubstrat A, gekennzeichnet durch eine intensive gelbe Farbe sowie eine blaugrüne Fluoreszenz. Die Zunahme der Farbe bzw. Fluoreszenz mit der Zeit kann als direktes Maß für die Aktivität der "Sauren Phosphatase" verwendet werden.

Diese Bestimmungsmethode ist sehr empfindlich und erlaubt den photometrischen Nachweis von etwa 0,001 Aktivitätseinheiten Phosphatase pro Milliliter Probe, sowie von ca. 60 Mikroeinheiten pro Milliliter bei der fluorimetrischen Bestimmung.

Entsprechende Verfahren für die Bestimmung von Carboxylesterasen, Sulfatasen, oder Amylasen sind ebenfalls bekannt.

Proteasen können, wie in der oben zitierten Arbeit von COBURN, LYTLE und HUBER beschrieben, in analoger Weise mit Hilfe synthetischer Peptide oder Amide bestimmt werden. Allen diesen Verfahren ist gemeinsam, daß durch die enzymatische Reaktion ein verschiedenfarbiges oder -fluoreszierendes Produkt entsteht.

Dabei konnte die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten bis jetzt ausschließlich in-vitro erfolgen, da keine der bekannten Methoden für eine Anwendung am lebenden Organismus geeignet ist. Dies erscheint jedoch aus verschiedenen Gründen wünschenswert, da beispielsweise eine in-vivo-Bestimmung viel schneller und in Echtzeit durchgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu ist mit Hilfe bislang bekannter Methoden zuerst eine Probennahme notwendig, wobei Verfälschungen, wie sie bei Probennahme und Probenvorbereitung auftreten, nicht verhindert

werden können.

Außerdem sind die genannten und auch alle anderen Bestimmungsmethoden mit Hilfe synthetischer Enzymsubstrate praktisch nur dann geeignet, wenn optisch transparente Lösungen bzw. Proben vorliegen. Für Vollblut sowie für in-vivo-Bestimmungen sind sie ungeeignet.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren bzw. eine Anordnung zur Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität vorzustellen, welches die oben angeführten Nachteile nicht aufweist und insbesondere eine in-vivo-Bestimmung der Enzymaktivität zuläßt.

10 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Enzymsubstrat am Ende eines Lichtleiters angeordnet und mit der zu messenden Probe in Kontakt gebracht wird und daß die durch enzymatische Reaktion bedingte Änderung spektraler Eigenschaften des Enzymsubstrates bzw. dessen Reaktionsprodukte pro Zeiteinheit erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird. Die vorliegende Erfindung löst das Problem der in-vivo-Bestimmung somit dadurch, daß ein Enzymsubstrat für beispielsweise hydrolytisch aktive Enzyme dem Ende eines Lichtleiters zugeordnet wird. Dieses Ende wird dann mit der Probe in Kontakt gebracht, wobei durch die enzymatische Aktivität der Probe das Enzymsubstrat in seinen spektralen Eigenschaften verändert wird. Die Änderung wird über den Lichtleiter verfolgt und als Maß für die aktuelle Enzymaktivität herangezogen. 15 Erstmals ist damit auch eine Aktivitätsbestimmung im Vollblut und anderen optisch nicht transparenten Flüssigkeiten ohne vorhergehender Probenvorbereitung möglich.

20 In einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dabei vorgesehen, daß die durch enzymatische Reaktion bedingte Änderung der Absorption des vorzugsweise synthetischen Enzymsubstrates über den Lichtleiter erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird.

25 In einer anderen Ausgestaltung der Erfindung kann die durch enzymatische Reaktion bedingte spektrale Änderung der Fluoreszenzstrahlung des vorzugsweise synthetischen Enzymsubstrates, beispielsweise die Änderung der Fluoreszenzintensität oder die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, über den Lichtleiter erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen werden. Dabei wird bei der ersten Methode das vom Enzymsubstrat bzw. dessen Reaktionsprodukte rückgestreute Anregungslicht gemessen, welches in seiner Intensität abhängig ist von dem durch die katalytische Enzymaktivität beeinflussten Absorptionsvermögen des Substrates. Bei der anderen Methode wird beispielsweise mittels eines Filters oder eines energiedispersiven Detektorsystems die durch die katalytische Aktivität des Enzyms verursachte Änderung der Fluoreszenzintensität des Enzymsubstrates über den Lichtleiter gemessen und die Meßwerte einer Auswertung zugeführt.

30 Eine Ausgestaltung des Verfahrens sieht vor, daß zusätzlich zur Enzymaktivität in an sich bekannter Weise der pH-Wert der Probe gemessen wird, und daß dieser Meßwert zur Korrektur der vorab bestimmten Enzymaktivität herangezogen wird.

35 Es ist bekannt, daß die Geschwindigkeit vieler enzymatischer Reaktionen stark vom pH-Wert der Lösung abhängt. Daneben ist auch der Dissoziationsgrad vieler bei der Hydrolyse freigesetzter Farbstoffe pH-abhängig. Da der pH-Wert physiologischer Proben in gewissen Bereichen variieren kann, ist es notwendig, die tatsächlich gemessene Enzymaktivität hinsichtlich des pH-Wertes zu korrigieren. Dies erfolgt am besten in empirischer Weise. Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität ist von sehr vielen Enzymen bereits bekannt, muß aber für den Fall eines immobilisierten Enzymsubstrates neu bestimmt werden. Zur Messung des individuellen pH-Wertes der Probe ist es also sinnvoll, gleichzeitig mit der Messung der Enzymaktivität auch den pH-Wert zu erfassen. Die Bestimmung der wahren Enzymaktivität erfolgt dann am besten dadurch, daß man eine empirisch festgelegte Beziehung zwischen Aktivität und relativer Signaländerung als Funktion des aktuellen pH-Wertes zur Bestimmung heranzieht.

40 Eine Anordnung der eingangs genannten Art zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die zu messende Probe in Kontakt mit einem Enzymsubstrat steht, ist dadurch gegeben, daß am Ende eines Lichtleiters ein Reaktionsraum vorliegt, in welchem das Enzymsubstrat chemisch oder physikalisch immobilisiert vorliegt, wobei eine an sich bekannte Lichtmeßeinrichtung, bestehend aus Lichtquelle, Photodetektor mit nachfolgender Signalauswertung vorgesehen ist, welche das vom Enzymsubstrat oder dessen Reaktionsprodukten emittierte Fluoreszenzlicht oder reflektierte Anregungslicht mißt. Dabei ist es von Vorteil, wenn mittels eines Strahlenteilers ein Teil des Anregungslichtes einem Referenzphotodetektor zugeleitet wird, wodurch Schwankungen der Anregungslichtquelle eliminiert werden können. Je nach Art der Fragestellung bzw. der Natur des Enzyms sind dabei verschiedene meßtechnische Anordnungen möglich. Allen Anordnungen ist aber gemeinsam, daß ein beispielsweise synthetisches Enzymsubstrat am Ende eines Lichtleiters angeordnet vorliegt und daß die Änderung der spektralen Eigenschaften mit Hilfe eines Lichtleiters verfolgt wird.

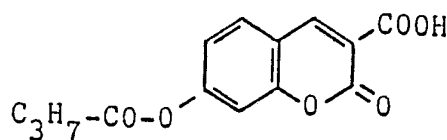
45 Als Photodetektoren verwendet man zweckmäßigerweise Photomultiplier, Phototransistoren oder Photodioden. Da letztere billig, aber nur in sichtbarem Spektralbereich empfindlich sind, werden bevorzugt solche Enzymsubstrate eingesetzt, deren Spaltung bei Wellenlängen über 450 nm, idealerweise über 500 nm, verfolgt werden kann. Die Vorteile einer analytischen Wellenlänge von über 460 nm liegen in der Möglichkeit der Verwendung kostengünstiger licht-emittierender Dioden als Lichtquellen.

50 Als Lichtquellen kommen in Frage Glühlampen, Gasentladungslampen, licht-emittierende Dioden (LEDs) oder Laser. Der Strahlenteiler kann auch durch einen dichroitischen Spiegel ersetzt werden, um so das gestreute oder reflektierte Anregungslicht besser vom Fluoreszenzlicht zu trennen. Der Lichtleiter ist vorzugsweise eine einzelne Fiber, kann aber auch ein Fiberbündel sein.

Das Fluoreszenzlicht kann vom reflektierten Anregungslicht natürlich auch mit Hilfe von Filtern getrennt werden.

Das Enzymsubstrat kann direkt an der polierten Austrittsfläche des Lichtleiters chemisch oder physikalisch immobilisiert werden. Es ist jedoch auch möglich, das Enzymsubstrat nach Entfernung des Mantels im Endbereich des Lichtleiters an der Umfangsfläche des Kerns des Lichtleiters zu immobilisieren. Die Lichtschwächen bzw. die Fluoreszenz wird in diesem Fall durch die sogenannte evaneszierende Lichtwelle bewirkt, da bei der Totalreflexion an der Grenzfläche des Lichtleiters die elektromagnetische Welle einige Nanometer tief in das Enzymsubstrat, welches hier das optisch dünnere Medium ist, eintritt. Das Anregungslicht kann dort absorbiert werden, bzw. Fluoreszenz induzieren, wenn sich innerhalb der Reichweite der evaneszierenden Welle ein Farbstoff befindet. Reflektiertes bzw. emittiertes Licht wird durch den Lichtleiter zurückgeleitet und gemessen.

Die Immobilisierung der Enzymsubstrate kann auf verschiedene Weise erfolgen. So wurde z. B. das vom Cumarin abgeleitete Substrat der folgenden Struktur,



I

welches für eine Bestimmung für die Butyryl-Cholinesterase geeignet ist, auf folgende Weise am Ende eines Lichtleiters immobilisiert:

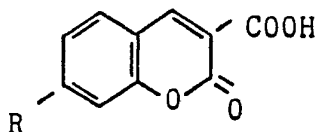
Das blanke Ende eines 200 Mikrometer dicken Quarzlichtleiters wurde fein poliert und mit einer 20 %igen wäßrigen Lösung von Schwefelsäure aktiviert. Dadurch werden oberflächliche ionische Verunreinigungen entfernt und die Oberfläche chemisch reaktiver gemacht. Anschließend wurde die Glasoberfläche mit dem Glasderivatisierungs-Reagens Aminopropyl-triethoxysilan in bekannter Weise umgesetzt. Diese Umsetzung besteht im wesentlichen darin, daß die aktive Oberfläche des Glases in einer 10 %igen Lösung des Silans in Toluol 2 Stdn. lang auf 100° erhitzt, anschließend mit Aceton gewaschen und bei 120° getrocknet wird. Man erhält dadurch einen Lichtleiter, dessen Ende freie Aminogruppen trägt.

An diese Aminogruppen können nun mit Hilfe an sich bekannter chemischer Methoden Enzymsubstrate geknüpft werden. Das vorhin genannte Substrat I wurde mit Hilfe des Peptidkupplungs-Reagenzes Ethyl-N⁺-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid immobilisiert.

Alternativ kann man das Substrat auch in das entsprechende Carbonsäurechlorid überführen und dann mit den Aminogruppen der Glasoberfläche zur Reaktion bringen.

Bringt man die so erhaltenen Endstücke der optischen Fibern in Kontakt mit einer Lösung, welche das Enzym Butyryl-Cholinesterase enthält, so beobachtet man in einer Meßanordnung, nach Anspruch 5 in kurzer Zeit eine deutliche Zunahme der Lichtabsorption bei einer analytischen Wellenlänge von 410 - 430 nm, sowie eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 460 - 470 nm.

In analoger Weise zu diesem Beispiel können die vom gleichen Grundmolekül abgeleiteten typischen Substrate für Sulfatasen, Amylasen, bzw. Proteasen der folgenden Strukturen II, III, IV immobilisiert werden:



II R = -OSO₃⁻ Na⁺

III R = -O-Amylose

IV R = Aminosäure (n)-NH-

In allen Fällen bewirkt die enzymatische Aktivität der Probe eine Zunahme der Absorption bei 420 nm bzw. der Fluoreszenz bei 460 nm.

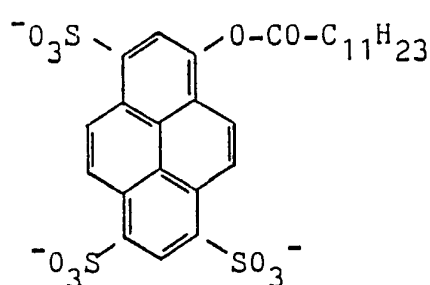
Das Substrat für das Enzym Lipase der folgenden Struktur V,

5

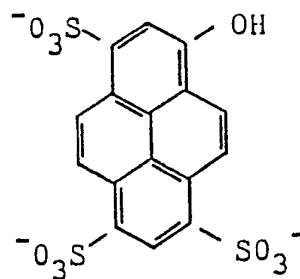
10

15

20



V



VI

25 welches vom 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonat, bezeichnet mit VI, abgeleitet ist, kann als Beispiel für ein synthetisches Enzymsubstrat dienen, welches auf elektrostatische Weise immobilisiert werden kann. Die Immobilisierung beruht auf der Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Sulfonato-Gruppen des Substrates und den positiv geladenen oberflächlichen Ammoniumgruppen des Anionentauschers, welcher als Trägermaterial eingesetzt wird.

30 In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung kann auch vorgesehen sein, daß der Reaktionsraum flächig ausgebildet ist, wobei das Enzymsubstrat auf einem dünnen Trägerfilm immobilisiert vorliegt, welcher auf das Ende des Lichtleiters aufgespannt ist. Im folgenden wird in typischer Weise die Herstellung einer Membran mit einem elektrostatisch immobilisierten Enzymsubstrat beschrieben:

35 Man taucht eine Anionentauschermembran in eine Lösung von 1 g 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonat VI in 50 ml Methanol. Nach ca. 2 min zieht man die gelb gefärbte und grün fluoreszierende Membran heraus und wäscht sie zuerst mit ca. 0,06 molarem Phosphatpuffer von pH 7, dann mit Wasser. Nach dem Trocknen wird sie in eine Lösung von 100 mg Laurinsäureanhydrid in Dioxan gelegt, wodurch das oberflächlich gebundene VI in V übergeht. Die Lösung des Laurinsäureanhydrids wurde hergestellt durch Auflösen von 0,1 g Laurinsäure in 1 ml Dioxan, Zugabe von 0,1 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags. Nach zwei Stunden kann die Membran aus der Lösung genommen und mit trockenem Aceton gewaschen werden. Sie weist nun eine blau-violette Fluoreszenz auf, ihre gelbe Farbe ist verschwunden.

40 Wird diese Membran am Ende eines Lichtleiters aufgespannt und in Kontakt mit einer Lösung des Enzyms Lipase gebracht, so wird das Substrat durch das Enzym in ein gelbes, stark grün fluoreszierendes Hydrolyseprodukt überführt. Die Zunahme der Absorption bei 460 nm bzw. der grünen Fluoreszenz bei 520 - 535 nm wird mit Hilfe des Lichtleiters verfolgt. Sie ist ein direktes Maß für die in der Probe herrschende Enzymaktivität. Die Spaltung dieses Substrates erfolgt allerdings nicht nur durch das Enzym Lipase, sondern auch durch Serumalbumin. Da die Aktivität des letzteren oft beträchtlich höher ist, kann der Sensor auch zur Bestimmung des Humanserumalbumins, z. B. im Blut, herangezogen werden.

45 Die zuletzt beschriebene Methode eignet sich auch zur Herstellung anderer immobilisierter Enzymsubstrate für Hydrolasen. Sie ist nicht nur als alternative Methode zur Herstellung von enzym-empfindlichen Schichten zu verstehen, sondern kann auch zur Regenerierung bereits verbrauchter Sensoren dienen.

50 Die durch verschiedene Hydrolasen bewirkten Spaltungen der immobilisierten Enzymsubstrate erfolgen auf einer festen Oberfläche, nämlich dem Trägermaterial für das Substrat.

55 Solche Spaltungen erfolgen aber bei chemisch immobilisierten Substraten oft wesentlich langsamer als in Lösungen, wo die Substrate dem Angriff der Enzyme von allen Seiten ausgesetzt sind. Je langsamer die Hydrolyse wird, desto stärker machen sich daneben störende Einflüsse durch die stets in geringem Maß ablaufende nicht-enzymatische Hydrolyse der Substrate bemerkbar.

Es wird nun gefunden, daß sich die Hydrolysegeschwindigkeit immobilisierter synthetischer Substrate durch Enzyme wesentlich beschleunigen läßt, wenn sich erfindungsgemäß zwischen der Oberfläche des Lichtleiters bzw. der des Trägerfilms und dem Enzymsubstrat langkettige Spacergruppen befinden.

60 Als Spacergruppen dienen z. B. langkettige Diamine, wie das Hexamethyldiamin. Eine Spacergruppe kann aber auch direkt mit dem Silylierungsreagens eingeführt werden, etwa mit Hilfe sogenannter "long chain amines".

Um störende Einflüsse stark gefärbter Probenmaterialien, z. B. Blut, auf das optische System zu verhindern,

kann das Endstück des Lichtleiters mit einer Schutzhülle bedeckt werden, welche das Eindringen gefärbter großer Partikel, z. B. Erythrocyten, verhindern soll. Enzyme können hingegen diese Schutzhülle durchdringen. Ein ideales Material für proteinpermeable Schutzhüllen ist Cellulose.

5 Anstatt die Enzymsubstrate direkt am Ende eines Lichtleiters zu immobilisieren, ist es erfindungsgemäß auch möglich, daß der Reaktionsraum von einer enzympermeablen Membran umschlossen ist, welche das Enzymsubstrat enthält und für zelluläre Bestandteile der Probe undurchlässig ist. Ein solcher Reaktionsraum muß für das zu bestimmende Enzym zugänglich sein, gleichzeitig darf aber das Enzymsubstrat aus diesem nicht ausdiffundieren können.

10 Das Ausdiffundieren des Enzymsubstrates kann erfindungsgemäß dadurch verhindert werden, daß das Enzymsubstrat an ein wasserlösliches oder wasserquellbares Polymer gebunden vorliegt, z. B. durch chemische Immobilisierung. Als wasserlösliche oder -quellbare Polymere, welche als Träger für die im Reaktionsraum befindlichen Enzymsubstrate dienen können, kommen z. B. in Frage: Dextran, Agarose, Polyethylenimin, Polyacrylamid oder Polyalkohole. Entscheidend für die Wahl des polymeren Trägers ist in diesem Fall der Umstand, daß die Moleküle des Trägerpolymers groß genug sind, um ein Austreten durch die Schutzhülle zu vermeiden. Durch enzymatische Hydrolyse wird das immobilisierte Substrat gespalten und erleidet dadurch eine Änderung seiner spektralen Eigenschaften. Diese Änderung wird über den Lichtleiter verfolgt und dient als Maß für die Enzymaktivität. Da der freigesetzte Farbstoff aber in gewissem Umfang durch die Cellulosemembran ausdiffundieren kann, ist es unbedingt erforderlich, daß die enzymatische Reaktion wesentlich schneller abläuft als die Diffusion aus der Reaktionsblase.

20 In der zuletzt angeführten Anordnung können nur solche Enzymsubstrate zur Verwendung kommen, deren spektrale Eigenschaften sich durch die enzymatische Reaktion deutlich ändern. Dies liegt daran, daß der Lichtleiter sowohl das Enzymsubstrat als auch seine Spaltprodukte optisch erfaßt.

25 Deshalb wird in einer Weiterbildung der Erfindung vorgeschlagen, daß das Enzymsubstrat an der inneren Mantelfläche eines, vorzugsweise zylindrischen, Reaktionsraumes immobilisiert ist, wobei der Reaktionsraum an seiner der Probe zugewandten Seite eine enzympermeable Membran aufweist, welche für zelluläre Bestandteile der Probe undurchlässig ist, wobei die durch enzymatische Reaktion gebildeten Reaktionsprodukte ins Innere des Reaktionsraumes eindiffundieren. Dadurch, daß nun das Substrat von seinen Spaltprodukten räumlich getrennt vorliegt, kann man spezifisch die Bildung der Spaltprodukte verfolgen.

30 Erfindungsgemäß wird die optische Trennung dadurch ermöglicht, daß das Enzymsubstrat außerhalb des durch den gegebenen Austrittswinkel α des Anregungslichtes gebildeten Anregungslichtkegels an der Mantelfläche des zylindrischen Reaktionsraumes immobilisiert ist. Die Zylinderwand samt dem oberflächlich aufgetragenen Substrat befindet sich nun außerhalb der durch den Austrittswinkel α gegebenen numerischen Apertur des Lichtleiters, sodaß das Substrat, solange keine enzymatische Reaktion abläuft, vom Lichtleiter nicht erfaßt wird.

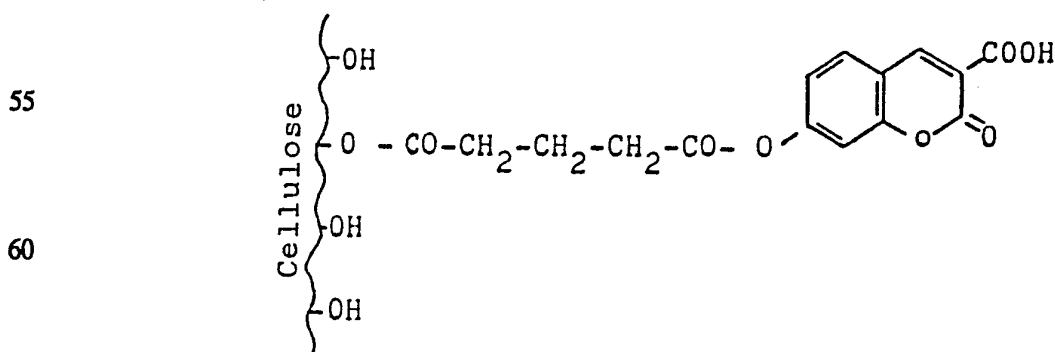
35 Dringt nun das zu bestimmende Enzym in den Reaktionsraum ein, so findet eine enzymatische Reaktion unter Freisetzung eines Farbstoffes statt. Der Farbstoff verteilt sich im Reaktionsraum und seine Farbe bzw. Fluoreszenz wird vom Licht weiter erfaßt. Die Zunahme an Farbe bzw. Fluoreszenzintensität wird als Maß für die katalytische Enzymaktivität herangezogen.

Die letztgenannte Anordnung weist einige prinzipielle Vorteile auf.

- 40 a) Enzymsubstrat und Spaltprodukt können wegen der räumlichen Trennung spektral nicht mehr überlappen, sodaß hohe Blindwerte vermieden werden.
b) Es können nicht nur synthetische Enzymsubstrate eingesetzt werden, sondern auch natürliche Substrate, welche mit Farbstoff markiert sind.

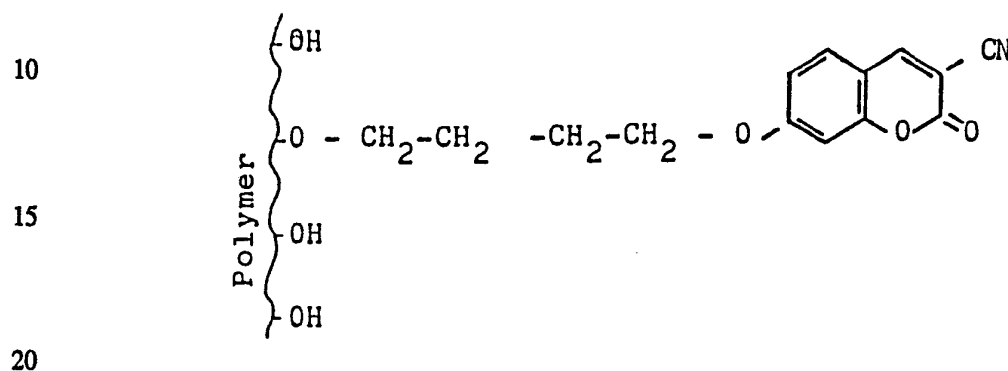
45 Die folgenden Beispiele illustrieren die große Anwendungsbreite der erfindungsgemäßen Anordnung, wobei fast immer die Immobilisierung durch chemische Verknüpfung von polymerem Träger, Spacergruppe, und den eigentlichen Farbstoffen erfolgt:

50 1.) Die Immobilisierung der 7-Hydroxycumarin-3-carbonsäure über eine Spacergruppe (Adipinsäure) an eine Cellulosemembran oder an die Oberfläche eines anderen OH-gruppen-tragenden Polymers führt zu einer Oberfläche der folgenden Struktur:



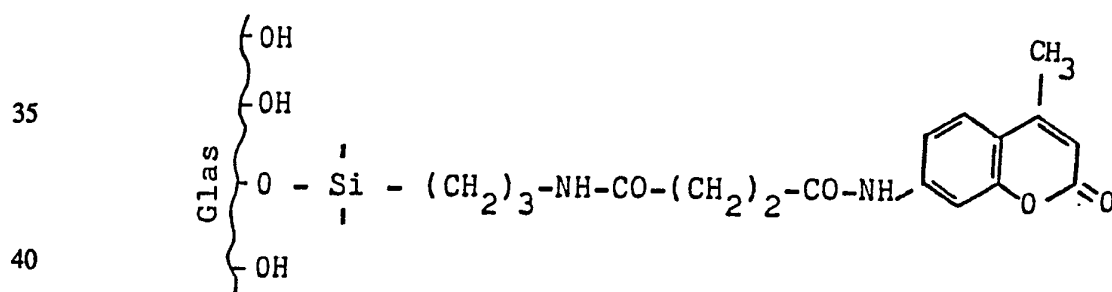
Die enzymatische Spaltung der CO-O-Bindung durch ein Enzym aus einer Gruppe der Carboxylesterasen führt zur Freisetzung des Farbstoffes, welcher dann in das Blickfeld des Lichtleiters diffundiert und bestimmt wird.

- 2.) Die Immobilisierung von 3-Cyano-7-hydroxycumarin an OH-haltige Polymere über eine $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ Spacergruppe führt zu einem Strukturelement der folgenden chemischen Formel:



25 Der entstehende immobilisierte Farbstoff ist ein synthetisches Substrat für Dealkylasen. Diese spalten die Ethergruppen und setzen den Fluoreszenzfarbstoff 7-Hydroxy-cumarin-3-carbonsäure frei, welcher vom Lichtleiter wieder erfaßt werden kann.

- 3.) Untenstehend wird das Strukturelement eines auf einer Glasoberfläche immobilisierten Proteasesubstrats gezeigt:



45 An der Oberfläche des Reaktionsraumes kann auch ein mit einem Farbstoff markiertes natürliches Substrat immobilisiert werden, z. B. ein Protein. Dazu kann z. B. Hühnereiweiß-Lysozym an der Oberfläche der Wand immobilisiert und dann mit Fluoresceinisothiocyanat fluoreszenzmarkiert werden. Im Kontakt mit dem Enzym Trypsin wird dieses Substrat gespalten. Fluorescein und fluorescein-markierte Bruchstücke des Lysozyms

50 diffundieren in den vom Lichtleiter optisch erfaßten Raum ein und können dort fluorimetrisch erfaßt werden.

Immobilisierte Proteine sind leicht herstellbar, können aber auch käuflich erworben werden. Auch Saccharide, also zuckerartige Verbindungen sind in immobilisierter Form kommerziell erhältlich, z. B. immobilisiertes N-Acetylglucosamin, Lactose, Melibiose, N-Acetylgalactosamin, Fucose, Mannose, Cellobiose, Galactose und Glucose. Diese Materialien können an der Wand des Reaktionsraumes angebracht und mit einem Farbstoff

55 markiert werden. Als solche Farbstoffe sind geeignet, Fluorescein-isothiocyanat, Dansylchlorid, Fluorescamin, Naphthylisocyanat und Europiumchelate. Durch enzymatische Reaktion werden die markierten Moleküle freigesetzt, worauf sie in den Reaktionsraum diffundieren und vom Lichtleiter erfaßt werden können.

Das Material, von welchem der Reaktionsraum umgeben ist, kann selbst das Substrat sein. Es kann sich dabei z. B. um die Amylose, welche zu den Polyglucosiden gehört, handeln, welche an der inneren Oberfläche

60 fluoreszenzmarkiert werden muß. Auch Polypeptide oder Fettsäureester kommen als Materialien, welche sowohl Substrate als auch Wandmaterial sind, in Frage. Natürlich kann es sich dabei nur um wasserunlösliche

Materialien handeln.

Der Vorteil, der sich durch die Verwendung angefärbter natürlicher Enzymsubstrate ergibt, liegt darin, daß man auf diese Weise die hohe Spezifität ausnützen kann, welche Enzyme für natürliche Substrate besitzen. In Verbindung mit der Fluorimetrie hat man damit das Ziel einer sowohl empfindlichen als auch spezifischen Bestimmungsmethode erreicht.

Viele Enzyme treten nicht nur in einer Form auf, sondern bilden weitere Untergruppen. Ein typisches Beispiel dafür sind die Phosphatasen. Unter diesen gibt es solche, welche in alkalischer Lösung ein Aktivitätsmaximum besitzen, sogenannte alkalische Phosphatasen, und solche, welche in saurer Lösung ein Aktivitätsmaximum besitzen, nämlich saure Phosphatasen. Die Bestimmung der klinisch wichtigen sauren Phosphatasen kann bei z. B. pH 7,4 nicht mehr erfolgen, ohne gleichzeitig die Aktivität der alkalischen Phosphatasen zumindest anteilig mitzuerfassen.

Zur Umgehung dieses Problems wird es notwendig, eine Anordnung mit zwei enzymesensitiven fiberoptischen Kathetern zu verwenden. Diese müssen sich dadurch unterscheiden, daß die beiden Enzymsubstrate am jeweiligen Ende unterschiedliche Affinität zu den Enzymen besitzen und sich auch in der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit unterscheiden. Die Affinität eines Enzyms zu dem Substrat wird durch die Michaelis-Menten-Konstante angegeben, die maximale Geschwindigkeit durch eine Größe, welche die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit angibt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der in den Fig. 1 bis 5 dargestellten Ausführungsbeispiele näher erläutert. Es zeigen Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Anordnung nach der Erfindung sowie die Fig. 2 bis 5 jeweils verschiedene Ausführungsformen eines Details der Fig. 1.

In Fig. 1 wird das aus der Lichtquelle (1) fallende Licht mit einer Kollimatorlinse (2) gesammelt und nach dem Passieren eines Filters (3) durch eine Fokussierlinse (4) in das eintrittsseitige Ende (5) eines Lichtleiters (6) eingekoppelt. Die Wellenlänge des Lichtes wird dabei mit Hilfe des Filters (3) auf das Absorptionsmaximum des durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzten Farbstoffs eingestellt. Ein Teil des Lichtes wird durch einen Strahlenteiler (7) auf einen Referenzphotodetektor (8) gelenkt. Dieser Referenzdetektor dient dazu, Intensitätsschwankungen der Lichtquelle (1) zu eliminieren.

Über den Lichtleiter (6) wird das Licht zum beispielsweise synthetischen Enzymsubstrat (9) geleitet, welches sich im Reaktionsraum (22) am austrittsseitigen Ende (10) des Lichtleiters (6) in immobilisierter Form befindet. Wird nun das Enzymsubstrat (9) durch ein entsprechendes Enzym gespalten, so wird das auftretende Licht aufgrund der Bildung farbiger Reaktionsprodukte (9') mehr und mehr absorbiert und somit eine Schwächung erfahren. Ist der entsprechende Farbstoff fluoreszenzfähig, so wird andererseits eine immer stärker werdende Fluoreszenzintensität zu beobachten sein.

Sowohl reflektiertes Licht als auch Fluoreszenzlicht werden durch denselben Lichtleiter (6) zurückgeleitet und durch die halbverspiegelte Oberfläche (11) des Strahlenteilers (7) mit Hilfe der Linsen (12, 13) auf einen Photodetektor (14) gelenkt. Mißt man die Fluoreszenz, so schaltet man zwischen Strahlenteiler (7) bzw. Linse (12) und Detektor (14) noch ein zweites optisches Filter (15), welches für reflektiertes Anregungslicht undurchlässig ist, wodurch man sehr selektiv nur das Fluoreszenzlicht erfassen kann. Das am Photodetektor (14) gemessene Signal (S) bzw. das am Referenzphotodetektor (8) gemessene Referenzsignal (R) wird verstärkt und einer hier nicht dargestellten Anzeige- bzw. Auswertevorrichtung zugeführt.

Fig. 2 zeigt vergrößert das Ende (10) des Lichtleiters (6), welcher einen Kern (16) und einen Mantel (17) mit unterschiedlichem Brechungsindizes aufweist. Dabei ist das Substrat (9) auf einem dünnen Trägerfilm (18), z. B. aus Cellulose, Ionentauschermembran oder Polyacrylamid immobilisiert, welcher dann als flächig ausgebildeter Reaktionsraum (22) auf das austrittsseitige Ende (10) des Lichtleiters (6) aufgespannt wird.

Es ist auch möglich, das Enzymsubstrat (9), wie in Fig. 3 dargelegt, auf der äußeren Fläche (19) des zylinderförmigen Kerns (16) eines Lichtleiters (6) aufzubringen, wobei im Endbereich des Lichtleiters der Mantel (17) entfernt wird. Dabei kann der Lichtleiter (6) an seiner kreisförmigen Austrittsfläche (20) eine lichtreflektierende Kappe (21) tragen.

Fig. 4 zeigt wieder schematisch das Ende (10) eines Lichtleiters (6), an welchem sich ein blasenförmiger Reaktionsraum (22) befindet, welcher durch eine proteinpermeable Membran (23), z. B. aus Cellulose, begrenzt ist. Im Reaktionsraum (22) befindet sich das Enzymsubstrat (9), welches aber, da es aus relativ kleinen Molekülen aufgebaut ist, durch die Wand der Membran (23) ausdiffundieren würde. Um dies zu verhindern, wird das Enzymsubstrat (9) an ein wasserlösliches Polymer mit größeren Molekülen immobilisiert. Als Träger für die im Reaktionsraum (22) vorliegenden Enzymsubstrate kommen vor allem wasserlösliche oder quellbare Polymere in Frage.

Mit der in Fig. 5 dargestellten Anordnung gelingt es, die Reaktionsprodukte (9') vom ursprünglich vorliegenden Enzymsubstrat (9) räumlich zu trennen. Am Ende (10) eines Lichtleiters (6) befindet sich dabei ein zylindrischer Reaktionsraum (24), dessen der Probe zugewandte Seite mit einer enzympermeablen Membran (23), z. B. aus Cellulose oder porösem Polycarbonat, abgedeckt ist. An der inneren Mantelfläche (25) des den Reaktionsraum (24) bildenden Zylinders (26) befindet sich das farbige oder fluoreszierende Enzymsubstrat (9). Es ist im Gegensatz zu den vorhin beschriebenen Anordnungen nicht homogen im Reaktionsraum verteilt, sondern liegt ausschließlich an der inneren Mantelfläche (25) des Zylinders (26) chemisch, elektrostatisch oder physikalisch immobilisiert vor.

Sobald das zu messende Enzym entlang des Pfeiles (29) durch die Membran (23) in den Reaktionsraum (24) eintritt, findet die enzymatische Reaktion unter Freisetzung der Reaktionsprodukte (9') statt. Die Reaktionsprodukte (9') können sich frei im Reaktionsraum (24) bewegen und diffundieren auch in jenem Bereich der durch den Austrittswinkel (α) des Anregungslichtes definiert ist. Dabei ist darauf zu achten, daß der Durchmesser (27) und die Länge (28) des den Reaktionsraum begrenzenden Zylinders (26) so gewählt werden, daß das austretende Anregungslicht nicht auf die Mantelfläche des Zylinders bzw. auf das daran immobilisierte Enzymsubstrat (9) fällt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur optischen Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität einer Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Enzymsubstrat am Ende eines Lichtleiters angeordnet und mit der zu messenden Probe in Kontakt gebracht wird und daß die durch enzymatische Reaktion bedingte Änderung spektraler Eigenschaften des Enzymsubstrates bzw. dessen Reaktionsprodukte pro Zeiteinheit erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die durch enzymatische Reaktion bedingte Änderung der Absorption des vorzugsweise synthetischen Enzymsubstrates über den Lichtleiter erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die durch enzymatische Reaktion bedingte spektrale Änderung der Fluoreszenzstrahlung des vorzugsweise synthetischen Enzymsubstrates, beispielsweise die Änderung der Fluoreszenzintensität oder die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, über den Lichtleiter erfaßt und zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß zusätzlich zur Enzymaktivität in an sich bekannter Weise der pH-Wert der Probe gemessen wird, und daß dieser Meßwert zur Korrektur der vorab bestimmten Enzymaktivität herangezogen wird.

5. Anordnung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die zu messende Probe in Kontakt mit einem Enzymsubstrat steht, **dadurch gekennzeichnet**, daß am Ende (10) eines Lichtleiters (6) ein Reaktionsraum (22, 24) vorliegt, in welchem das Enzymsubstrat (9) chemisch oder physikalisch immobilisiert vorliegt, wobei eine an sich bekannte Lichtmeßeinrichtung, bestehend aus Lichtquelle (1), Photodetektor (14) mit nachfolgender Signalauswertung vorgesehen ist, welche das vom Enzymsubstrat (9) oder dessen Reaktionsprodukten (9') emittierte Fluoreszenzlicht oder reflektierte Anregungslicht mißt (Fig. 1).

6. Anordnung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Reaktionsraum (22) flächig ausgebildet ist, wobei das Enzymsubstrat (9) auf einem dünnen Trägerfilm (18) immobilisiert vorliegt, welcher auf das Ende (10) des Lichtleiters (6) aufgespannt ist (Fig. 2).

7. Anordnung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich zwischen der Oberfläche des Lichtleiters (6) bzw. der des Trägerfilms (18) und dem Enzymsubstrat (9) langkettige Spacergruppen befinden.

8. Anordnung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Reaktionsraum (22) von einer enzympermeablen Membran (23) umschlossen ist, welche das Enzymsubstrat (9) enthält und für zelluläre Bestandteile der Probe undurchlässig ist (Fig. 4).

9. Anordnung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Enzymsubstrat (9) an ein wasserlösliches oder wasserquellbares Polymer gebunden vorliegt.

10. Anordnung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Enzymsubstrat (9) an der inneren Mantelfläche (25) eines, vorzugsweise zylindrischen, Reaktionsraumes (24) immobilisiert ist, wobei der Reaktionsraum (24) an seiner der Probe zugewandten Seite eine enzympermeable Membran (23) aufweist, welche für zelluläre Bestandteile der Probe undurchlässig ist, wobei die durch enzymatische Reaktion gebildeten Reaktionsprodukte (9') ins Innere des Reaktionsraumes (24) eindiffundieren (Fig. 5).

AT 392 539 B

11. Anordnung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzymsubstrat (9) außerhalb des durch den gegebenen Austrittswinkel α des Anregungslichtes gebildeten Anregungslichtkegels an der Mantelfläche (25) des zylindrischen Reaktionsraumes (24) immobilisiert ist (Fig. 5).

5

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

Ausgegeben

25. 04.1991

Blatt 1

Int. Cl.⁵: G01N 21/27

G01N 21/25

G01N 21/64

G01N 21/76

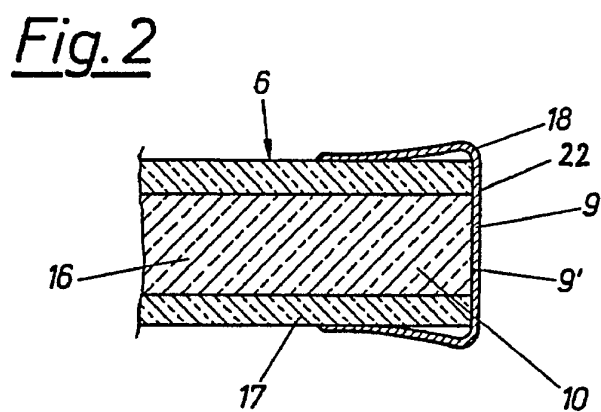
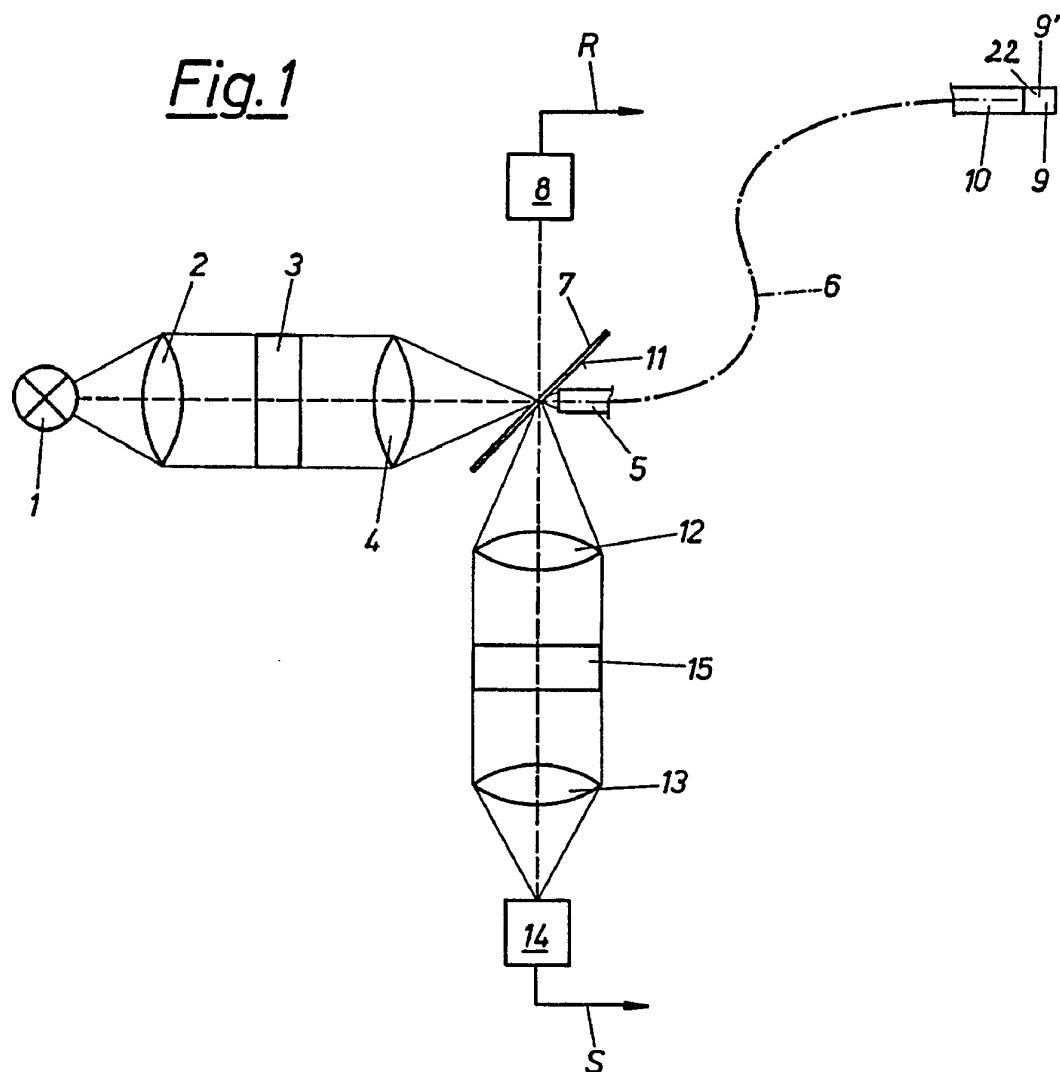


Fig. 3

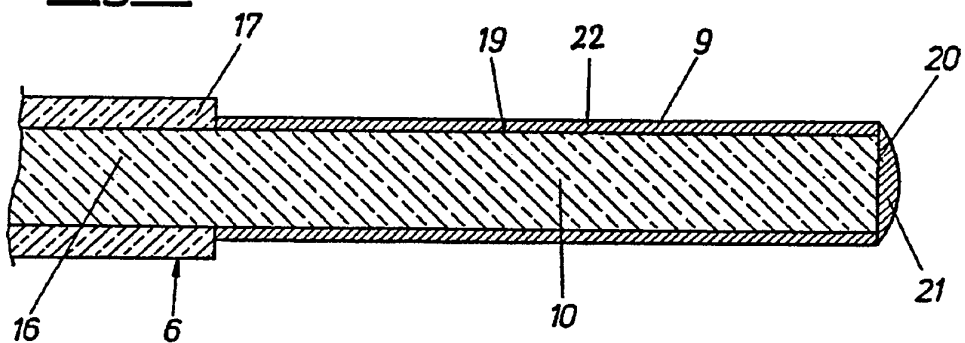


Fig. 4

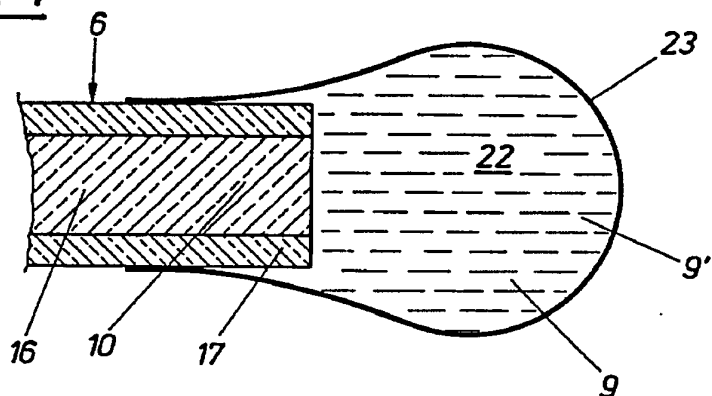


Fig. 5

