



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248 348

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13 04 85
(21) PV 2732-85

(51) Int. Cl.⁴
C 12 Q 1/48

(40) Zveřejněno 12 06 86
(45) Vydáno 01 08 88

(75)
Autor vynálezu

HOMOLKA JIŘÍ prof. MUDr. DrSc., PRAHA

(54)

Způsob stanovení aktivity enzymů

Řešení se týká způsobu stanovení enzymů, zejména alkalické a kyselé fosfatázy, aspartátaminotransferázy, alaninaminotransferázy a laktátdehydrogenázy, který spočívá v tom, že se vzorkem s obsahem zkoumaného enzymu působí na substrát, který v závislosti na enzymatické aktivitě uvolňuje látky s volnou thiolovou skupinou, přičemž při stanovení aktivit enzymů, které přemísťují jiné než thiolové skupiny, například aminoskupiny, vodík a další, se látky s volnou thiolovou skupinou uvolní návaznými reakcemi s přidavnými enzymy, jejichž průběh uvolňování se sleduje elektrochemickou reakcí.
Způsob stanovení lze využít v lékařství.

Vynález se týká způsobu stanovení aktivity enzymů, které mají význam v lékařství, zejména alkalické fosfatázy - ALP /E.C. 3.1.3.1./ a případně kyselé fosfatázy - ACP /E.C. 3.1.3.2./, aspartátaminotransferázy - AST /E.C. 2.6.1.1./ a alaninaminotransferázy - ALT /E.C. 2.6.1.2./, obě se dříve nazývaly transaminázami GO a GP, a dále laktátdehydrogenázy - LD /E.C. 1.1.1.27./ i dalších.

Způsoby stanovení aktivit alkalické a kyselé fosfatázy jsou dnes založeny na štěpení substrátu - např. nitrofenylfosfátu-, jehož odštěpená část je barevná, např. nitrofenol a vývin barvy a její fotometrie je mírou aktivity enzymu. Aspartátaminotransferáza a alaninaminotransferasa se stanovovaly nedokonalými metodami s fotometrií ve viditelné oblasti světla /metoda Reitman, Frankel/, ale tato metoda pro svou nedokonalost je opuštěna a nahrazena kontinuální fotometrií v ultrafialovém světle při 340 nm nebo fluorometricky. Podstatou jsou redox změny nikotinamidadenin dinukleotidu, čímž dochází ke změnám absorbance. Tato reakce je tedy indikující reakcí a často se k ní dospěje řetězem dalších reakcí a přidavkem jiných enzymů a látek. Přirozeně vyžaduje tento postup možnost kontinuální fotometrie a její registrace v ultrafialovém světle, což je relativně nákladné.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob stanovení aktivity enzymů, zejména alkalické a kyselé fosfatázy, aspartátaminotransferázy, alaninaminotransferázy a laktátdehydrogenázy podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vzorkem obsahujícím zkoumaný enzym působí na substrát, který v závislosti na enzymatické aktivitě uvolňuje látky s volnou thiolovou skupinou, jejichž průběh uvolňování se sleduje elektrochemickou reakcí. Při stanovení aktivit enzymů, které přemísťují jiné než thiolové skupiny,

například aminoskupiny, vodík a další, se látky s volnou thiolovou skupinou uvolní návaznými reakcemi s přidavnými enzymy, například koenzym A se uvolní z acetylkoenzymu A přidáním citrát-syntézy při stanovení aktivity aspartátaminotransferázy, nebo přidáním pyruvátcarboxylazy a citrátsyntézy při stanovení aktivity alaninaminotransferázy, nebo laktátdehydrogenázy. Na substrát po odstranění kyslíku se působí vzorkem s obsahem zkoumaného enzymu, načež se na zapisovači sleduje průběh napěťového potenciálu mezi látkou s volnou thiolovou skupinou a kalomelovou elektrodou, z rozdílu úhlu mezi přímkou odpovídající slepému pokusu a přímkou odpovídající vzorku s enzymem se stanoví enzymatická aktivita vzorku.

Uváděný způsob vychází z možnosti elektrochemické kontinuální detekce vznikajících thioskupin buď přímo štěpením substrátu, nebo návaznými reakcemi s přidavnými enzymy, za použití přístroje popsaného v žs. AO č. 134 022.

Pro fosfatázy vhodným substrátem je např. S-fenylthiofosfát /lithná sůl/ nebo S-/p-methoxy-fenyl/thiofosfát /anilinová sůl/, kde enzymatickým štěpením za příslušného pH vznikají odštěpením fosfátu zbytky mající volnou thiolovou skupinu. Tím kontinuálně stoupá jejich koncentrace a na elektronickém kompenzačním zapisovači vzniká lineární zápis průběhu enzymové aktivity fosfatáz.

Způsob stanovení enzymatické aktivity podle vynálezu je blíže objasněn na příkladech.

Příklad 1

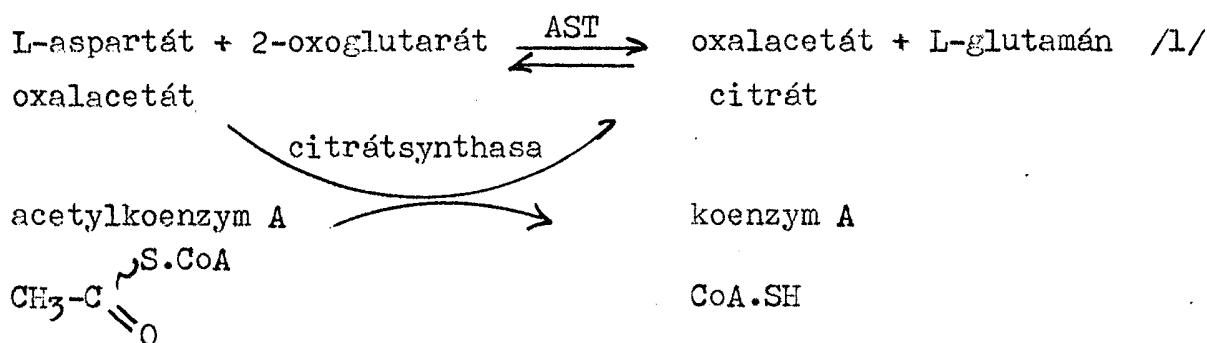
Při provádění způsobu podle vynálezu se používají tato činidla: karbonát-bikarbonátový pufr 0,1 M, pH 10,0 pro alkalickou fosfatázu nebo natriumcitrátový s kys. chlorovodíkovou pufr 0,1 M, pH 4,9 pro kyselou fosfatázu, substrát S-/p-methoxy-fenyl/thiofosfát /anilinová sůl/ v koncentraci $2 \cdot 10^{-3}$ M rozpuštěný v příslušném pufru, dále stlačený dusík v láhvi.

Do nádobky se odměří 4 ml pufru a 0,5 ml roztoku substrátu, probublá se 2 min. dusíkem a vytemperuje se směs na teplotu 30 °C; nechá se kapat rtuťová kapková elektroda s dobou kapky kolem 3 sekund a zaznamená se na zapisovači slepá zkouška. Pak se přidá

0,2 ml vzorku s enzymem, znovu se probublá směs 20 sekund dusíkem a potom se zaznamenává lineární průběh enzymatické aktivity. Úhel přímky se slepou zkouškou je mírou aktivity fosfatázy. Kalibruje se 1 milimolárním redukováným glutathionem.

Příklad 2

Pro měření aktivity aspartátaminotransferázy - AST se užívá běžný substrát: L-aspartát a 2-oxoglutarát ve vhodném pufru, ale dále se nově přidává citrátsyntháza /E.C. 4.1.3.7/ a acetylkoenzym A. Pak reakce probíhá takto:



Se vznikem citrátu vzniká i koenzym A, který má volnou thiolovou skupinu a opět vzniká lineární zápis průběhu enzymatické aktivity AST.

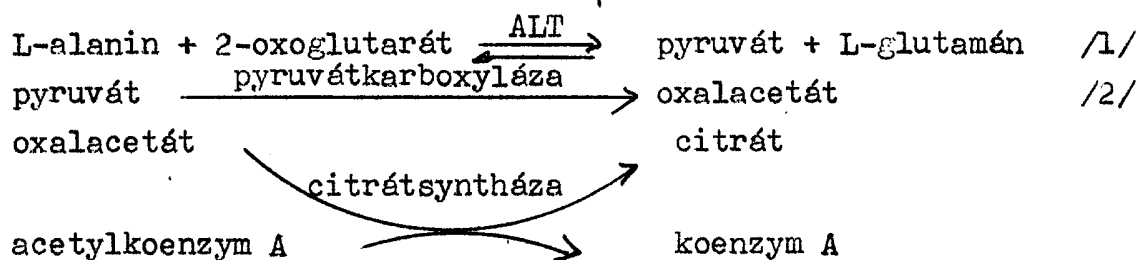
Při provádění způsobu dle vynálezu se používají tato činidla: substrát /obsahující ve 100 ml fosfátového nebo jiného pufru 0,1 M, pH 7,8 : 17 mmol L-aspartátu, 1,5 mmol 2-oxoglutarátu, 2,5 mg citrátsynthasy -cca 400 jednotek, 0,01 mmol acetylkoenzymu A/ a dusík stlačený v lahvi.

Do nádoby se odměří 4 ml substrátu, probublá se 2 min. dusíkem a vytemperuje se roztok na 30 °C; nechá se kapat rtuťová kapková elektroda s dobou kapky kolem 3 sekund a zaznamená se slepá zkouška. Pak se přidá 0,2 ml vzorku s aspartátaminotransferázou, znovu se probublá směs 20 sekund dusíkem a potom se zaznamenává lineární průběh enzymatické aktivity. Úhel přímky se slepou zkouškou je mírou aktivity aspartátaminotransferázy. Kalibruje se 1 milimolárním redukováným glutathionem.

Příklad 3

Pro měření aktivity alaninaminotransferázy - ALT se užívá běžný substrát: L-alanin a 2-oxoglutarát ve vhodném pufru, ale

dále se nově přidá pyruvátkarboxyláza /E.C. 6.4.1.1/, citrátsyntháza /E.C. 4.1.3.7/ a acetylkoenzym A. Pak reakce probíhá takto:



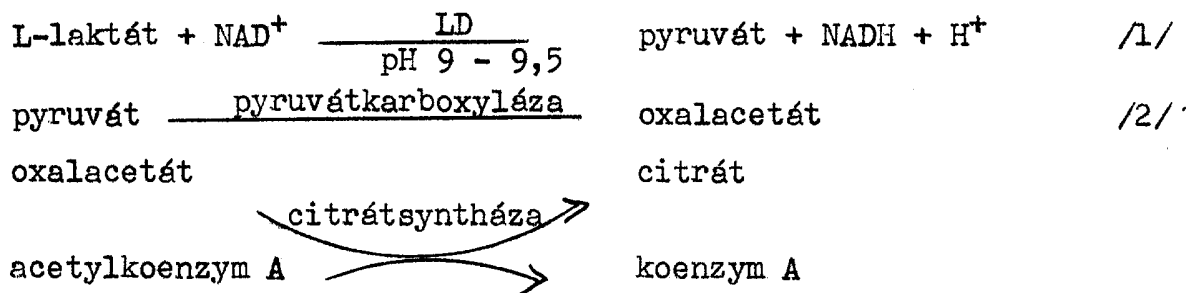
Opět se vznikem citrátu vzniká i koenzym A, který má volnou thio-lovou skupinu a vzniká lineární zápis průběhu enzymatické aktivity alaninaminotransferázy.

Při provádění způsobu dle vynálezu se používají tato činidla: substrát /obsahující ve 100 ml fosfátového nebo jiného pufru 0,1 M, pH 7,8 : 40 mmol L-alaninu, 1,5 mmol 2-oxoglutarátu, 1,5 mg pyruvátkarboxylázy- cca 10 jednotek, 0,13 mM adenosintrifosfátu, 2,5 mg citrátsyntházy - cca 400 jednotek, 0,01 mmol acetylkoenzymu A/ a dusík stlačený v lahvi.

Do nádoby se odměří 4 ml substrátu, probublá se 2 min. dusíkem a vytemperuje se roztok na 30 °C; nechá se kapat rtuťová kapková elektroda s dobou kapky kolem 3 sekund a zaznamená se slepá zkouška. Pak se přidá 0,2 ml séra, znovu se probublá směs 20 sekund dusíkem a potom se zaznamenává lineární průběh enzymatické aktivity. Úhel přímky se slepou zkouškou je mírou aktivity alaninaminotransferázy. Kalibruje se 1 milimolárním redukovaným glutathionem.

Příklad 4

Pro měření aktivity laktátdehydrogenázy - LD užívá se běžný substrát: L-laktát a NAD⁺ ve vhodném pufru a nově se přidá pyruvátkarboxyláza /E.C. 6.4.1.1/ a citrátsyntháza /E.C. 4.1.3.7/ a acetylkoenzym A. Pak reakce probíhá takto:



Se vznikem citrátu vzniká i koenzym A, který má volnou thiolovou skupinu a vzniká lineární zápis průběhu enzymatické aktivity laktátdehydrogenazy.

Při provádění způsobu dle vynálezu se používají tato činidla: substrát /obsahující ve 100 ml karbonátového nebo jiného pufru 0,1 M, pH 9,3 : 0,1 mmol L-laktátu, 0,02 mmol NAD -nikotinamid adenin dinukleotid, 1,5 mg pyruvátkarboxylázy - cca 10 jednotek, 0,13 mmol adenosintrifosfátu, 2,5 mg citrátsyntházy - cca 400 jednotek, 0,01 mmol acetylkoenzymu A/ a dusík stlačený v láhvi.

Do nádobky se odměří 4 ml substrátu, probublá se 2 min. dusíkem a vytemperuje se roztok na 30 °C; nechá se kapat rtuťová kapková elektroda s dobou kapky kolem 3 sekund a zaznamenává se slepá zkouška. Pak se přidá 0,2 ml vzorku s enzymem, znovu se probublá směs 20 sekund dusíkem a potom se zaznamenává lineární průběh enzymatické aktivity. Úhel přímky se slepou zkouškou je mírou aktivity laktátdehydrogenazy. Kalibruje se 1 milimolárním redukováním glutathionem.

Tím se využívá jednoduchého a levného přístroje k měření aktivity popsaných klinicky důležitých enzymů v séru, což jinak je možné jen s nákladným zařízením pro kontinuální fotometrii v ultrafialovém světle.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

248 348

1. Způsob stanovení aktivity enzymů, zejména alkalické a kyselé fosfatázy, aspartátaminotransferázy, alaninaminotransferázy, a laktátdehydrogenázy, vyznačující se tím, že se vzorkem obsahujícím zkoumaný enzym působí na substrát, který v závislosti na enzymatické aktivitě uvolňuje látky s volnou thiolovou skupinou, přičemž při stanovení aktivit enzymů, které přemísťují jiné než thiolové skupiny, například aminoskupiny, vodík a další, se látky s volnou thiolovou skupinou uvolní návaznými reakcemi s přídatnými enzymy, načež průběh uvolňování se sleduje elektrochemicky.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na substrát po odstranění kyslíku působí vzorkem s obsahem zkoumaného enzymu, načež se sleduje průběh napěťového potenciálu mezi látkou s volnou thiolovou skupinou a kalomelovou elektrodou a z rozdílu úhlu mezi přímkou odpovídající slepému pokusu a přímkou odpovídající vzorku s enzymem se stanoví enzymatická aktivita vzorku.
3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se při stanovení aktivity aspartátaminotransferázy uvolní koenzym A z acetylkoenzymu A přidáním citrátsyntházy.
4. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se při stanovení aktivity alaninaminotransferázy nebo laktátdehydrogenázy uvolní koenzym A z acetylkoenzymu A přidáním pyruvátkarboxylázy nebo citrátsyntházy.