

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK  
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

# PATENTSCHRIFT 145 328

**Ausschließungspatent**

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                     |      |          | Int. Cl. <sup>3</sup> |
|------|---------------------|------|----------|-----------------------|
| (11) | 145 328             | (44) | 03.12.80 | 3(51) G 01 N 33/54    |
| (21) | AP G 01 N / 214 830 | (22) | 06.08.79 |                       |
| (31) | P 28 34 704.8       | (32) | 08.08.78 | (33) DE               |

- 
- (71) siehe (73)  
(72) Deneke, Ulfert, Dr.; Michal, Gerhard, Dr.; Beutler, Hans-Otto, Dr., DE  
(73) Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim-Waldhof, DE  
(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin, Wallstraße 23/24
- 

- (54) Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat
- 

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat (ADP) in biologischen Flüssigkeiten zur Erkennung von Herz-, Leber- und Nierenerkrankungen. Ziel der Erfindung sind kurze Meßzeit, hohe Genauigkeit und die Möglichkeit einer Messung in einfachen photometrischen Geräten. Das Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von ADP in wäßriger Lösung durch Phosphorylierung mit einer Kinase in Gegenwart eines phosphorylierten Substrats derselben unter Bildung von ATP und entphosphoryliertem Substrat wird erfindungsgemäß in der Weise ausgeführt, daß das entphosphorylierte Substrat, gegebenenfalls unter Zwischenschaltung einer weiteren Hilfsreaktion mit NAD(P) in Gegenwart einer Dehydrogenase umgesetzt und gebildetes NAD(P)H direkt gemessen oder mit einem Tetrazoliumsalz in Gegenwart eines Elektronenüberträgers umgesetzt wird unter Bildung eines Formazans und letzteres gemessen wird.

Berlin, den 11.12.1979

**214830** - 1 -

AP G 01 N/214 830

55 859/12

Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat (ADP) in wäßriger Lösung.

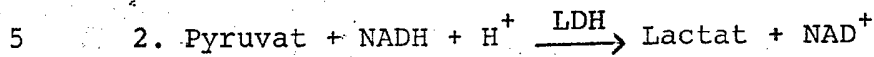
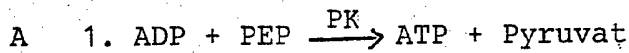
Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Schon seit langem besteht in der Biochemie an der Messung des ADP und der Messung ADP-liefernder Reaktionen großes Interesse. ADP-Bildung ist das Maß für den ATP-Umsatz, also die Verwertung des zentralen Energieträgers des Organismus. Aber auch in der klinischen Chemie hat die ADP-Messung große Bedeutung, wenn Herz-, Leber- und Nierenerkrankungen diagnostiziert werden. Der ADP-Nachweis im Zuge ADP-liefernder Reaktionen hat ebenfalls in der Biochemie und klinischen Chemie große Bedeutung. Hier sei der Nachweis der Pyruvat-Kinase und der Creatin-Kinase für Enzymbestimmungen und der Creatinin- und Glycerinnachweis für Metaboliten-Bestimmungen genannt.

Der Bestimmung von ADP in biologischen Flüssigkeiten, wie Seren, Gewebe, bakteriell kontaminiertem wäßrigem Material oder anderen wäßrigen Flüssigkeiten kommt daher große praktische Bedeutung zu.

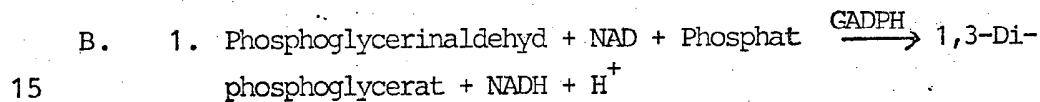
Für den enzymatischen Nachweis von ADP wurden drei verschiedene Verfahren angewendet. Das erste beruht auf der Phosphorylierung des ADP zum ATP mit PEP (Phosphoenolpyruvat) und PK (Pyruvat-Kinase) und Nachweis des ent-

stehenden Pyruvats mit NADH/LDH (Lactatdehydrogenase).



Dieses Verfahren ist schon lange bekannt und beschrieben in Nature 178, 632 (1956).

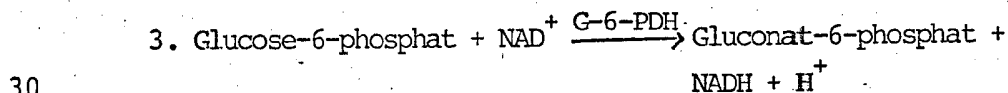
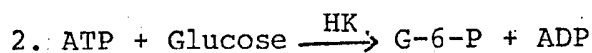
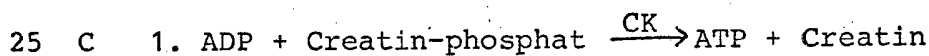
10 Die beiden anderen Verfahren beruhen ebenfalls auf der Phosphorylierung des ADP, z.B. mit Creatinphosphat und CK und Nachweis des gebildeten ATP.



PGK = Phosphoglycerinkinase

20 GAP-DH = Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

Auch diese Reaktion ist lange bekannt und beschrieben in BBA 1, 292 (1947).



HK = Hexokinase

G-6-PDH = Glucose-6-phosphatdehydrogenase

35 Diese Reaktion wird bereits seit mindestens 1955 verwendet, beschrieben wird sie z.B. in A. Kornberg, Methods of Enzym. 2, 497 (1955).

Diese bekannten Methoden weisen nun verschiedene Mängel auf, die ihre Anwendung erschweren oder verteuern. Zwar ist der Nachweis nach A grundsätzlich geeignet, als Indikatorsystem für Reaktionen zu dienen, die aus ATP ADP liefern und hat sich zu diesem Zweck durchgesetzt, es wird aber die Abnahme der NADH-Extinktion gemessen. In solchen Tests kann aus meßtechnischen Gründen nur eine begrenzte Anfangsextinktion an NADH vorhanden sein. Das hat zur Folge, daß das hier verwendete Indikatorenzym LADH nicht mit seinem Substrat NADH gesättigt ist und demnach nicht seine maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Das muß durch erhöhten Enzymeinsatz ausgeglichen werden. Dies ist nicht nur unwirtschaftlich, sondern beinhaltet auch die Gefahr, daß andere störende Enzymaktivitäten in größerem Maße in das Testsystem eingeschleppt werden. Ein weiterer Nachteil ergibt sich daraus, daß bei hohen ADP-Konzentrationen das NADH schon verbraucht sein kann, bevor vollständiger Umsatz eingetreten ist. Man mißt dann falsch zu niedrige Werte.

Ein gravierender Mangel des Verfahrens B beruht darin, daß nach dem Prinzip der vorgeschalteten Indikatorreaktion eine bestimmte Menge ADP zwar eine stöchiometrisch errechenbare NADH-Bildung verursacht, jedoch daß keine ganzzahlige Stöchiometrie vorliegt und daher die Berechnung sehr kompliziert wird. Eine Anwesenheit von ATP verursacht außerdem eine zusätzliche Verschiebung des Gleichgewichts, was die Rechnung weiter erschwert. Daher wird dieses Verfahren in der Praxis kaum angewendet. Außerdem ist eine Verstärkung des Meßsignals durch nachgeschaltete Formazanreaktion nicht möglich.

Diese Nachteile besitzt das Verfahren C nicht. Dafür kommen zwei andere Mängel zum Tragen. Da das Verfahren C darauf beruht, ADP zu ATP zu phosphorylieren und dieses ATP dann nachzuweisen, ist es einleuchtend, daß dieses

214830 - 4 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

Verfahren nicht dazu geeignet ist, aus ATP im gekoppelten Test gebildetes ADP nachzuweisen. Wie im weiteren ausgeführt, besteht aber großes Interesse daran, viele Reaktionen zu messen, die aus ATP, ADP liefern. Es ist aber anzustreben, für diese Nachweise stets dasselbe Indikatorsystem zu verwenden, weil die benötigten Enzyme und Reagentia um so günstiger produziert werden können, je größer die Produktionsansätze gemacht werden. Zum anderen ist es grundsätzlich nachteilig, Messungen im UV-Licht durchzuführen, da Meßeinrichtungen zur Messung im UV-Licht stets wesentlich teurer und aufwendiger sind als Meßeinrichtungen für die Messung im sichtbaren Licht.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist, ein Verfahren zur Bestimmung von ADP zu schaffen, welches die Nachteile der bekannten Verfahren nicht aufweist. Insbesondere ist es ein Ziel der Erfindung, ein derartiges Verfahren zu schaffen, welches kurze Meßzeiten und nur eine Inkubation erfordert, die Absorptionszunahme oder bei Enzymbestimmungen die Absorptionszunahme pro Minute mißt, eine Messung im sichtbaren Licht gestattet, damit einfachere photometrische Einrichtungen benutzt werden können und gleichzeitig an verschiedene Reaktionen gekoppelt werden kann, welche ADP aus ATP liefern.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Adenosindiphosphat in eine Verbindung zu überführen, die mit großer Genauigkeit in einfachen photometrischen Einrichtungen gemessen werden

**214830** - 5 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

kann.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat (ADP) in wäßriger Lösung durch Phosphorylierung mit einer Kinase in Gegenwart eines phosphorylierten Substrats derselben unter Bildung von ATP und entphosphoryliertem Substrat, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das entphosphorylierte Substrat, gegebenenfalls unter Zwischenschaltung einer weiteren Hilfsreaktion mit NAD(P) in Gegenwart einer Dehydrogenase umgesetzt und gebildetes NAD(P)H direkt gemessen oder mit einem Tetrazoliumsalz in Gegenwart eines Elektro-

nenüberträgers umgesetzt wird unter Bildung eines Formazans und letzteres gemessen wird.

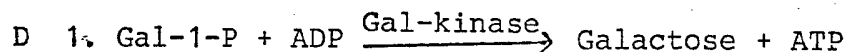
Das Grundprinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht also darin, nicht wie bisher, mit einer Reaktion zu koppeln, in der NADH verbraucht wird, sondern umgekehrt, mit einer Reaktion, in welcher NAD oder NADP reduziert werden zum NADH bzw. NADPH. Für das Verfahren der Erfindung sind mehrere Ausführungsformen möglich, da sich einige verschiedene derartige Reaktionen als mit quantitativen Reaktionsabläufen koppelbar herausgestellt haben.

Es ist jedoch nicht in jedem Falle möglich, das Phosphorfreisubstrat der ersten Reaktion, bei welcher ADP aufphosphoryliert wird zu ATP direkt mit dem NAD oder NADP und einer Dehydrogenase umzusetzen. In solchen Fällen muß eine Hilfsreaktion zwischengeschaltet werden, insbesondere eine Decarboxylierungsreaktion, Transaminierungsreaktion oder Kupplung mit einer Hexose oder Pentose.

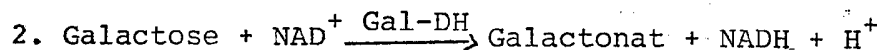
Desgleichen ist es gelegentlich günstig, gebildetes NAD(P) nicht direkt zu messen, sondern in einen Farbstoff zu überführen, indem ein geeignetes Tetrazoliumsalz in Gegenwart eines Elektronenüberträgers, wie Diaphorase, zum entsprechenden gefärbten Formazan umgesetzt wird und die gebildete Färbung gemessen wird. Geeignete Tetrazoliumsalze und Elektronenüberträger sind dem Fachmann bekannt. Lediglich beispielsweise seien hier 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Nitroblau, Tetrazoliumchlorid und 2-(p-Jodphenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid erwähnt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dieses mit Galactose-kinase und Galactose-dehydrogenase in der durch die nachstehenden

Gleichungen veranschaulichten Reaktionsfolge durchgeföhrt:



5



Gal-1-P = Galactose-1-phosphat

Gal-kinase = Galactose-kinase

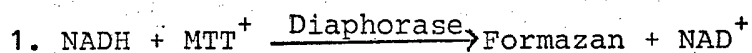
10 Gal-DH = Galactose-dehydrogenase

Diese Gleichungen sind an sich seit langem bekannt aus Biochem. J. 44, 460 (1949) und J. Biol. Chem. 227, 745 (1957).

15

Überraschenderweise wurde jedoch nunmehr gefunden, daß es möglich ist, diese Reaktionen miteinander und mit Reaktionen zu koppeln, die aus ATP ADP bilden. Hierdurch wird die Absorptionszunahme durch das gebildete NADH zum Maß der Menge an ADP oder, falls bei den gekoppelten Reaktionen, die ADP aus ATP bilden, Enzymaktivitäten gemessen werden, die Absorptionszunahme pro Zeiteinheit durch das gebildete NADH zum Maß für die gesuchte Enzymaktivität. Eine derartige Kopplung wurde bisher nicht für möglich gehalten, wie schon allein daraus hervorgeht, daß seit mehr als 20 Jahren nach einem befriedigenden Verfahren zur Bestimmung von ADP gesucht wird und auch die Reaktionen schon so lange bekannt sind.

30 Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausführungsform dieser Ausführungsform wird noch eine Reaktion nachgeschaltet, welche mit einem Tetrazoliumsalz in Gegenwart eines Elektronenüberträgers zur Rückoxydation des gebildeten NADH unter gleichzeitiger Bildung von gefärbtem Formazan führt, welches leicht im sichtbaren Licht gemessen werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform entspricht dies der nachstehenden Gleichung:



MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid.

5

Als Elektronenüberträger wird die aufgeführte Diaphorase bevorzugt. Es können jedoch auch andere Elektronenüberträger, die dem Fachmann bekannt sind, verwendet werden. Als sehr gut geeignet hat sich dabei insbesondere Phenazinmethosulfat (PMS) und Phenanthrolinmethosulfonat erwiesen.

10

Als Tetrazoliumsalz wird das bereits erwähnte MTT bevorzugt. Es können aber auch andere Tetrazoliumsalze verwendet werden. Gute Ergebnisse wurden insbesondere auch mit Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) und 2-(p-Jodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (INT) erzielt. Die Auswahl des Tetrazoliumsalzes erfolgt unter Berücksichtigung der Löslichkeit des gebildeten Formazanfarbstoffs. Weist letzterer nämlich eine geringe Löslichkeit auf, so können bei hohen ADP-Konzentrationen Ausfällungen des Farbstoffs erfolgen, welche zu Meßschwierigkeiten führen. Aus diesem Grunde wird zweckmäßig bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Messung eines Formazanfarbstoffs ein oberflächenaktives Mittel zugesetzt, welches das Löslichkeitsverhalten des Farbstoffs verbessert. Beispiele für geeignete oberflächenaktive Mittel sind Desoxycholsäure, Saponin, Alkylaryl-polyäthylenglykol-ester und -äther, Sorbitanester, wie Sorbimacrogololeat, Polyäthylenglykol-lauryläther und dergleichen. Die Konzentration an oberflächenaktivem Mittel liegt im allgemeinen zwischen 0,3 und 3 % im Test.

35

Zulässige Schwankungsbreite:

Die Art des Puffers ist unkritisch. Geeignete sind z.B. Tris-, Tra-, Imidazol-, Succinat, Glycin-, Glycylglycin-

puffer.

Pufferstärke 0,005 bis 0,5 Mol/l

pH 6 bis 10,5

Gal-Kinase 0,1 bis 20 U/ml

5 Gal-DH 0,05 bis 20 U/ml

Auch die anderen, unten näher beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung lassen sich mit der Formazanbildung kuppeln. Bei manchen dieser Reaktionen ist diese Kupp-  
 10 lung aus Gleichgewichtsgründen sogar bevorzugt. Im folgenden sind die weiteren Ausführungsformen beschrieben.

E 1.  $\text{ADP} + \text{Formyl-P} \xrightarrow{\text{Formiat-kinase}} \text{Formiat} + \text{ATP}$   
 15

2.  $\text{Formiat} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{F-DH}} \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}_2 + \text{H}^+$

F-DH = Formiat-dehydrogenase

20 Zulässige Schwankungsbreite

Für Puffer und Pufferstärke gelten die Angaben zu Ausführung D.

pH 6,0 bis 10,0

Formiatkinase 0,05 bis 50 U/ml

25 Formiat-DH 0,1 bis 100 U/ml

F 1.  $\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$

2.  $\text{Pyruvat} \xrightarrow{\text{Pyruvat-decarboxylase}} \text{Acetaldehyd} + \text{CO}_2$

30

3.  $\text{Acetaldehyd} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Aldehyd-DH}} \text{Acetat} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

Zulässige Schwankungsbreite

35 Art und Stärke des Puffers: hier gelten die Ausführungen zur Ausführungsform D ebenfalls

pH 4,5 bis 7,5

PK 0,05 bis 50 U/ml

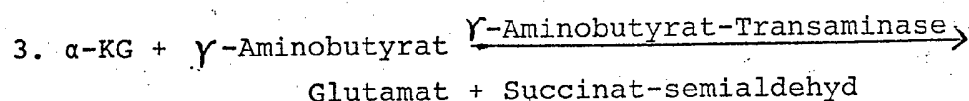
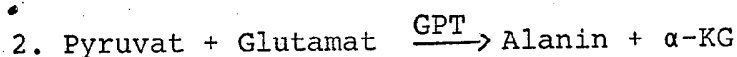
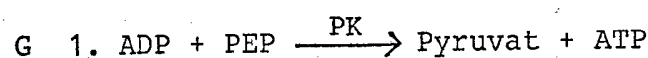
Al-DH 0,05 bis 50 U/ml

Pyr-DC 0,05 bis 50 U/ml

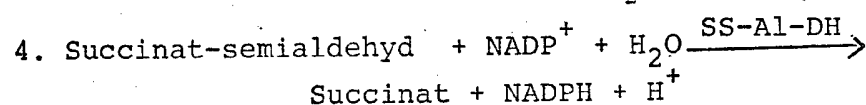
5

Besonders bevorzugt wird nachstehende Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

10



15



GPT = Glutamat-pyruvat-transaminase

$\alpha\text{-KG}$  =  $\alpha$ -Ketoglutarat

20 SS-Al-DH = Succinatsemialdehyd-dehydrogenase

Zulässige Schwankungsbreite

Für Puffer und Pufferstärke gilt das zu Ausführungsform D angegebene.

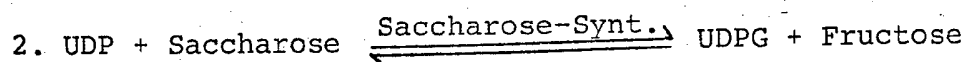
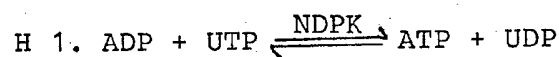
25

pH 6,0 bis 10,5

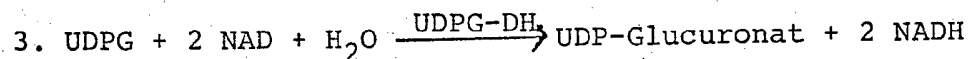
PK, GOT, GAB-GT, SS-AL-DH je 0,05 bis 50 U/ml

Ebenfalls besonders bevorzugt wird schließlich auch nachstehende Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

30



35



NDPK = Nucleosid-diphosphatkinase

214830 - 11 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

Zulässige Schwankungsbreite

Für Art und Stärke des Puffers gelten die Angaben zu  
Ausführungsform D.

pH-Bereich 6 bis 10,5

UDPG-DH 0,01 bis 15 U/ml

NDPK 1 bis 50 U/ml

Saccharose-Synt. 0,05 bis 10 U/ml

Vorteilhafterweise kann das erfindungsgemäße Verfahren  
derart ausgeführt werden, daß man ADP mit

- a) Galacto-Kinase und Galactose-1-Phosphat umsetzt und mit  
der gebildeten Galactose NAD in Gegenwart von Galactose-  
dehydrogenase reduziert oder
- b) Formiat-Kinase und Formylphosphat umsetzt und mit dem  
gebildeten Formiat in Gegenwart von Formiat-dehydro-  
genase NAD oxydiert oder
- c) Pyruvat-Kinase und Phosphoenol-pyruvat umsetzt, gebil-  
detes Pyruvat mit Pyruvat-decarboxylase decarboxyliert  
und mit dem gebildeten Acetaldehyd und Aldehyddehydro-  
genase NAD oxydiert oder
- d) nach c) gebildetes Pyruvat mit Glutamat und GPT  
(Glutamat-pyruvat-transaminase) in Alanin und  $\alpha$ -Keto-  
glutarat transaminiert, letzteres mit  $\beta$ -Aminobutyrat  
und  $\beta$ -Aminobutyrat-transaminase in Glutamat und  
Succinat-semialdehyd überführt und letzteres mit  
Succinat-semialdehyd-dehydrogenase zur Oxydation von  
NADP heranzieht oder
- e) UTP und Nucleosid-diphosphat-kinase umsetzt, gebildetes  
UDP mit Saccharose und Saccharosesynthetase in Fructose  
und Iridindiphosphatglucose umwandelt und mit letzterer  
und Uridindiphosphat-glucosedehydrogenase NAD reduziert.

**214830** - 12 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

Die Einzelheiten für die Durchführung dieser Ausführungsformen sind bei den Beispielen, die diese Ausführungsformen näher erläutern, angeführt.

Wie schon erwähnt, ist die Anwendung der Erfindung besonders vorteilhaft für Reaktionen, bei denen ADP aus ATP gebildet wird. In der folgenden Tabelle sind daher Beispiele von Enzymen und Substraten aufgeführt, bei denen das zu messende ADP aus ATP gebildet wird und die Erfindung angewandt werden kann. Wie in den Beispielen näher erläutert, können auch hier gekoppelte Reaktionen ausgeführt werden. Sowohl Enzym als auch aufgeführte Substrate sind jeweils erfindungsgemäß bestimmbar. Welches erfindungsgemäße Verfahren im einzelnen angewandt werden soll, ist von der nachzuweisenden Reaktion im wesentlichen unabhängig.

Tabelle 1

| <u>Enzym</u>        | <u>(EC Nr.)</u> | <u>Substrate</u>               |
|---------------------|-----------------|--------------------------------|
| Hexokinase          | 2.7.1.1         | ATP/Hexosen                    |
| Glucokinase         | 2.7.1.2         | ATP/Glucose                    |
| Fructokinase        | 2.7.1.4         | ATP/Fructose                   |
| Galactokinase       | 2.7.1.6         | ATP/Galactose                  |
| Mannokinase         | 2.7.1.7         | ATP/Mannose                    |
| Glucosaminkinase    | 2.7.1.8         | ATP/2-Amino-2-desoxy-D-glucose |
| Phosphoglucokinase  | 2.7.1.10        | ATP/Glucose-1-P                |
| Phosphofructokinase | 2.7.1.11        | ATP/Fructose-6-P               |

|    | Enzym                         | (EC Nr.) | Substrate                                                |
|----|-------------------------------|----------|----------------------------------------------------------|
|    | Glucono-kinase                | 2.7.1.12 | ATP/D-Gluconat                                           |
|    | Adenosin-kinase               | 2.7.1.20 | ATP/Adenosin                                             |
|    | NAD-Kinase                    | 2.7.1.23 | ATP/NAD                                                  |
| 5  | Glycerin-kinase               | 2.7.1.30 | ATP/Glycerin                                             |
|    | Glycerat-kinase               | 2.7.1.31 | ATP/Glycerat                                             |
|    | Cholin-kinase                 | 2.7.1.32 | ATP/Cholin                                               |
|    | Pyruvat-kinase                | 2.7.1.40 | ATP/Pyruvat                                              |
|    | Glucurono-kinase              | 2.7.1.43 | ATP/Glucuronat                                           |
| 10 | Galacturono-kinase            | 2.7.1.44 | ATP/Galacturonat                                         |
|    | Arabino-kinase                | 2.7.1.54 | ATP/Arabinose                                            |
|    | Mannitol-kinase               | 2.7.1.57 | ATP/Mannit                                               |
|    | Inosin-kinase                 | 2.7.1.73 | ATP/Inosin                                               |
|    | Acetat-kinase                 | 2.7.2.1  | ATP/Acetat                                               |
| 15 | Carbamat-kinase               | 2.7.2.2  | ATP/NH <sub>3</sub> /CO <sub>2</sub>                     |
|    | Asparat-kinase                | 2.7.2.4  | ATP/Asparat                                              |
|    | Carbamoyl-phosphat-synthase   | 2.7.2.5  | 2 ATP/NH <sub>3</sub> /CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O |
|    | Formiat-kinase                | 2.7.2.6  | ATP/Formiat                                              |
| 20 | Carbamoyl-phosphat-synthase   | 2.7.2.9  | 2 ATP/Glutamin/CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O         |
|    | Guanidinoacetat-kinase        | 2.7.3.1  | ATP/Guanidinacetat                                       |
|    | Creatin-kinase                | 2.7.3.2  | ATP/Creatin                                              |
|    | Arginin-kinase                | 2.7.3.3  | ATP/L-Arginin                                            |
| 25 | Ammoniak-kinase               | 2.7.3.8  | ATP/NH <sub>3</sub>                                      |
|    | Polyphosphat-kinase           | 2.7.4.1  | ATP/(Phosphat) <sub>n</sub>                              |
|    | Adenylat-kinase               | 2.7.4.3  | ATP/AMP                                                  |
|    | Nucleosid-monophosphat-kinase | 2.7.4.4  | ATP/Nucleosid-monophosphat                               |
| 30 | Nucleosid-diphosphat-kinase   | 2.7.4.5  | ATP/Nucleosid-diphosphat                                 |
|    | Guanylat-kinase               | 2.7.4.6  | ATP/GMP                                                  |
|    | Cytidylat-kinase              | 2.7.4.14 | ATP/CMP                                                  |
|    | Succinyl-CoA-Synthetase       | 6.2.1.5  | ATP/Succinat/CoA                                         |
| 35 | Glutaryl-CoA-Synthetase       | 6.2.1.6  | ATP/Glutarat/CoA                                         |

|    | Enzym                                 | EC Nr.) | Substrate                                     |
|----|---------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|
|    | Malyl-CoA-Synthetase                  | 6.2.1.9 | ATP/Malat/CoA                                 |
|    | Glutamin-Synthetase                   | 6.3.1.2 | ATP/Glutamat/ $\text{NH}_3$                   |
|    | Asparagin-Synthetase                  | 6.3.1.4 | ATP/Aspartat/ $\text{NH}_3$                   |
| 5  | $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase | 6.3.2.2 | ATP/Glutamat/Cystein                          |
|    | Glutathion-Synthetase                 | 6.3.2.3 | ATP/ $\gamma$ -Glutamyl-cystein/Glycin        |
|    | D-Alanylalanin-Synthetase             | 6.3.2.4 | ATP/2 D-Alanin                                |
| 10 | Harnstoff-carboxylase                 | 6.3.4.6 | ATP/Harnstoff/ $\text{CO}_2$                  |
|    | Pyruvat-carboxylase                   | 6.4.1.1 | ATP/Pyruvat/ $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}_2$ |
|    | 5'-Nucleosidase                       | 3.1.3.5 | ATP/ASN/ $\text{NH}_3$ /Glutamat              |
|    | Adenosin-Desaminase                   | 3.5.4.4 | ATP/ASN/ISN/ $\text{NH}_3$ /-                 |
| 15 |                                       |         | Glutamat                                      |

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagens zur Bestimmung von ADP mit einem Gehalt an einer Kinase, einem phosphorylierten, von ADP verschiedenen Substrat derselben und Puffer, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine für die entphosphorylierte Form dieses Substrats oder für ein transaminiertes, decarboxyliertes oder hexosidiertes Folgeprodukt derselben spezifische Dehydrogenase und das Coenzym der Dehydrogenase enthält. Zusätzlich kann dieses Reagens ein Tetrazoliumsalz und einen dafür geeigneten Elektronenüberträger sowie gegebenenfalls ein oberflächenaktives Mittel oder/-und ein System zur Bildung von ADP aus ATP sowie die von den jeweils verwendeten Enzymen benötigten Salze enthalten.

Das System zur Bildung von ADP aus ATP besteht entweder aus ATP und der für die jeweils unter ADP-Bildung zu bestimmenden substanzspezifischen Kinase oder, falls es zur Aktivitätsbestimmung dieser Kinase verwendet werden soll, aus ATP und dem zweiten Substrat der Kinase.

Das erfindungsgemäße Reagens kann in trockener lyophilisierter Form oder als gebrauchsfertige wässrige Lösung

**214830 - 15 -**

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

vorliegen. In einer besonderen Ausführungsform kann es auch auf einem geeigneten Träger imprägniert oder inkorporiert als Teststreifen vorliegen.

#### Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Ausführungsbeispielen näher erläutert. In den nachfolgenden Beispielen werden folgende Abkürzungen verwendet:

|            |                                                             |
|------------|-------------------------------------------------------------|
| Al-DH      | Aldehyd-dehydrogenase                                       |
| Formiat-DH | Formiat-dehydrogenase                                       |
| GPT        | Glutamat-pyruvat-transaminase                               |
| GAB-GT     | $\gamma$ -Aminobutyrat- $\alpha$ -ketoglutarat-transaminase |
| SS-Al-DH   | Succinatsemialdehyd-dehydrogenase                           |
| GOT        | Glutamat-oxalacetat-transaminase                            |
| NDPK       | Nucleosid-5'-diphosphat-kinase                              |
| UTP        | Uridin-5'-triphosphat                                       |
| ADP        | Adenosin-5'-diphosphat                                      |
| ATP        | Adenosin-5'-triphosphat                                     |
| PEP        | Phosphoenol-pyruvat                                         |
| PK         | Pyruvat-kinase                                              |
| NAD        | Nicotinamid-adenin-dinucleotid                              |
| NADH       | Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert                   |
| NADP       | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat                     |
| NADPH      | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert          |
| CK         | Creatin-kinase                                              |
| MTT        | 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid  |
| Gal-1-P    | D-Galactose-1-phosphat                                      |

**214830**

- 16 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

|            |                                           |
|------------|-------------------------------------------|
| Gal-Kinase | Galactose-kinase                          |
| Gal-DH     | Galactose-dehydrogenase                   |
| UDPG-DH    | Uridin-5'-diphospho-glucose-dehydrogenase |
| Pyr-DC     | Pyruvat-decarboxylase                     |
| ADA        | Adenosin-desaminase                       |

Beispiel 1

Bestimmung von ADP mit Gal-Kinase unter NADH-Bildung.  
Temperatur 25 °C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Küvetten,  
Testvolumen 2,02 ml

| Ausgangslösung                          | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentration<br>im Test |
|-----------------------------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| K-Phosphat-puffer, pH 7,5<br>0,1 ml     | 0,2           | 0,2              | 10 mMol/l                |
| MgCl <sub>2</sub> 0,1 Mol/l             | 0,2           | 0,2              | 10 mMol/l                |
| Gal-1-P 60 mMol/l                       | 0,1           | 0,1              | 3 mMol/l                 |
| NAD 40 mMol/l                           | 0,1           | 0,1              | 2 mMol/l                 |
| Gal-Kinase 100 U/ml                     | 0,1           | 0,1              | 5 U/ml                   |
| Gal-DH 12,5 U/ml                        | 0,1           | 0,1              | 0,625 U/ml               |
| H <sub>2</sub> O                        | 1,2           | 1,2              | -                        |
| mischen, dann starten mit<br>ADP-Lösung | 0,02          | -                | -                        |

mischen, inkubieren, nach Stillstand der Extinktionszunahme  
Extinktion der Probe gegen Extinktion des Leerwerts messen.  
Aus der Differenz ergibt sich der ADP-Gehalt der Probe  
nach der Formel

$$\text{ADP (mMol/l)} = \Delta E \cdot 29,71$$

**214830**

- 17 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

Beispiel 2

Bestimmung von ADP mit PK/Pyruvat-DC unter NADH-Bildung.  
Temperatur 25 °C, Meßwellenlänge 365 nm, Testvolumen  
2 ml, 1 cm Küvetten.

214830

- 18 -

| Ausgangslösung              | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentration<br>im Test |
|-----------------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| Imidazol-puffer, 0,2 Mol/l  | 1,0           | 1,0              | 0,1 mMol/l               |
| 5 pH 6,5                    |               |                  |                          |
| MgSO <sub>4</sub> 0,2 Mol/l | 0,1           | 0,1              | 10 mMol/l                |
| NAD 40 mMol/l               | 0,1           | 0,1              | 2 mMol/l                 |
| PEP 10 mMol/l               | 0,1           | 0,1              | 0,5 mMol/l               |
| Pyr-DC/PK/Al-DH             |               |                  |                          |
| 10 je 100 U/ml              | 0,05          | 0,05             | je 2,5 U/ml              |
| H <sub>2</sub> O            | 0,65          | 0,65             | -                        |
| mischen, dann starten mit   |               |                  |                          |
| ADP                         | 0,2           | -                | -                        |

- 15 mischen, inkubieren, nach Stillstand der Extinktions-  
zunahme Extinktion der Probe gegen Extinktion des Leer-  
werts bestimmen, Gehalt an ADP berechnen nach

$$\text{ADP /mMol/l)} = \Delta E \cdot 29,71$$

20

### Beispiel 3

Bestimmung von ADP mit Formiat-kinase unter NADH-  
Bildung. Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm,

- 25 1 cm Kübetten, Testvolumen 2,02 ml

| Konzentration der Ausgangs-<br>lösung | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentra-<br>tion im<br>Test |
|---------------------------------------|---------------|------------------|-------------------------------|
| 30 Dimethylglutarat pH 6,9            | 1,0           | 1,0              | 50 mMol/l                     |
| 0,1 Mol/l                             |               |                  |                               |
| Formylphosphat 0,1 Mol/l              | 0,1           | 0,1              | 5 mMol/l                      |
| Formiatkinase 20 U/ml                 | 0,1           | 0,1              | 1 U/ml                        |
| Formiat-DH 200 U/ml                   | 0,1           | 0,1              | 10 U/ml                       |
| 35 NAD 0,08 Mol/l                     | 0,1           | 0,1              | 4 mMol/l                      |
| MnSO <sub>4</sub> 0,1 Mol/l           | 0,1           | 0,1              | 5 mMol/l                      |
| H <sub>2</sub> O                      | 0,5           | 0,5              | -                             |
| mischen, dann starten mit ADP         | 0,02          | -                | -                             |

214830

- 19 -

mischen, inkubieren, nach Stillstand der Extinktionszunahme Extinktion der Probe gegen Leerwert bestimmen, Gehalt an ADP berechnen nach

$$5 \quad \text{ADP (mMol/l)} = \Delta E \cdot 29,71$$

#### Beispiel 4

Bestimmung von ADP mit GPT, GAB-GT und SS-Al-DH unter  
10 NADPH-Bildung, Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Küvetten, 2,22 ml Testvolumen.

| Konzentration der Ausgangs-<br>lösung |                                      | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentra-<br>tion im<br>Test |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------|-------------------------------|
| 15                                    | Imidazol-puffer, pH 7,6<br>0,1 Mol/l | 1,0           | 1,0              | 50 mMol/l                     |
|                                       | MgSO <sub>4</sub> 100 mMol/l         | 0,1           | 0,1              | 5 mMol/l                      |
|                                       | PEP 20 mMol/l                        | 0,1           | 0,1              | 1 mMol/l                      |
| 20                                    | NADP 20 mMol/l                       | 0,1           | 0,1              | 1 mMol/l                      |
|                                       | Glutamat 0,6 Mol/l                   | 0,2           | 0,2              | 60 mMol/l                     |
|                                       | γ-Aminobutyrat 0,9 Mol/l             | 0,2           | 0,2              | 90 mMol/l                     |
|                                       | PK 40 U/ml                           | 0,1           | 0,1              | 2 U/ml                        |
|                                       | GPT 100 U/ml                         | 0,1           | 0,1              | 5 U/ml                        |
| 25                                    | GAB-GT 50 U/ml                       | 0,1           | 0,1              | 2,5 U/ml                      |
|                                       | SS-Al-DH 50 U/ml                     | 0,1           | 0,1              | 2,5 U/ml                      |
| mischen, inkubieren, starten mit      |                                      |               |                  |                               |
| 30                                    | ADP                                  | 0,02          | -                | -                             |

mischen, Stillstand der Extinktionszunahme abwarten, aus der Differenz der Extinktion zwischen Probe und Leerwert den Gehalt an ADP berechnen.

35

$$\text{ADP (mMol/l)} = \Delta E \cdot 30,29$$

## Beispiel 5

Bestimmung von Creatinin unter Formazanbildung.

Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 576 nm, 1 cm Küvet-  
5 ten, 2,5 ml Testvolumen.

| Konzentration der Ausgangs-<br>lösung |                                   | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentration<br>im Test |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| Glycin-puffer, enth. 5 %              |                                   | 1,0           | 1,0              | 2 %                      |
| 10                                    | Triton X100, 0,25 Mol/l<br>pH 8,0 |               |                  | 0,1 Mol/l                |
|                                       | NADP 0,1 Mol/l                    | 0,05          | 0,05             | 2 mMol/l                 |
|                                       | ATP 0,05 Mol/l                    | 0,05          | 0,05             | 1 mMol/l                 |
|                                       | PEP 20 mMol/l                     | 0,05          | 0,05             | 0,4 mMol/l               |
| 15                                    | Glutamat 50 mMol/l                | 0,05          | 0,05             | 1 mMol/l                 |
|                                       | γ-Aminobutyrat 0,475 Mol/l        | 0,5           | 0,5              | 95 mMol/l                |
|                                       | MgCl <sub>2</sub> 0,1 Mol/l       | 0,05          | 0,05             | 2 mMol/l                 |
|                                       | MTT 1,5 mMol/l                    | 0,5           | 0,5              | 0,3 mMol/l               |
|                                       | CK 500 U/ml                       |               |                  | 10 U/ml                  |
| 20                                    | PK 200 U/ml                       |               |                  | 4 U/ml                   |
|                                       | GPT 200 U/ml                      |               |                  | 4 U/ml                   |
|                                       | Diaphorase 25 U/ml                | 0,05          | 0,05             | 0,5 U/ml                 |
|                                       | GAB-GT 200 U/ml                   |               |                  | 4 U/ml                   |
|                                       | SS-Al-DH 200 U/ml                 | 0,05          | 0,05             | 4 U/ml                   |
| 25                                    | Probe                             | 0,05          | —                | —                        |
| mischen, starten mit                  |                                   |               |                  |                          |
|                                       | Creatininase 500 U/ml             | 0,05          | 0,05             | 10 U/ml                  |

30

mischen, 15 Minuten inkubieren, nach Ende der Extinktions-  
zunahme Extinktion der Probe gegen Leerwert messen,  
Creatiningehalt berechnen nach

35

$$\text{Creatinin (mMol/l)} = \Delta E \cdot 2,994.$$

Die Reaktionsbedingungen sind durch die optimierte Creatininbestimmung festgelegt. Für die erfindungsgemäße Anwendung der ADP-Bestimmung gilt das unter Beispiel 4 Gesagte.

5

#### Beispiel 6

Bestimmung der CK unter NADPH-Bildung.

Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Küvetten, 2,2 ml Testvolumen.

| Konzentration der Ausgangslösung |             | Probe (ml) | Konzentration im Test |
|----------------------------------|-------------|------------|-----------------------|
| Glycin-puffer, pH 9              | 169 mMol/l  |            | 84,5 mMol/l           |
| 15 Creatin                       | 64 mMol/l   |            | 32 mMol/l             |
| NaCl                             |             | 1,1        | 76,5 mMol/l           |
| MgCl <sub>2</sub>                | 72,6 mMol/l | 0,1        | 3,3 mMol/l            |
| ATP                              | 35,2 mMol/l | 0,05       | 0,8 mMol/l            |
| PEP                              | 30,8 mMol/l | 0,05       | 0,7 mMol/l            |
| 20 NADP                          | 44 mMol/l   | 0,1        | 2 mMol/l              |
| Glutamat                         | 44 mMol/l   | 0,05       | 1 mMol/l              |
| γ-Aminobutyrat                   | 0,418 Mol/l | 0,5        | 95 mMol/l             |
| PK                               | 176 U/ml    |            | 4 U/ml                |
| GPT                              | 176 U/ml    |            | 4 U/ml                |
| 25 GAB-GT                        | 176 U/ml    |            | 4 U/ml                |
| SS-Al-DH                         | 176 U/ml    | 0,05       | 4 U/ml                |
| Probe                            |             | 0,2        | -                     |

mischen, 2 Minuten inkubieren, dann nach je 1 Minute  
30  $\Delta E$  ablesen und die CK-Menge in der Probe berechnen nach

$$CK \text{ (U/ml)} = \Delta E/\text{min} \cdot 3,143$$

35 Die Reaktionsbedingungen sind durch die optimierte Creatinkinasebestimmung festgelegt. Für die erfindungsgemäße Anwendung der ADP-Bestimmung gilt das unter Beisp. 4 Gesagte.

Beispiel 7

Bestimmung von ADP unter NADH-Bildung.

Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Küvet-  
5 ten, Testvolumen 1,6 ml.

| Ausgangslösung |                      | ml   | Endkonzentration<br>im Test |
|----------------|----------------------|------|-----------------------------|
| 10             | Glycylglycin, pH 8,0 |      |                             |
|                | 0,05 mMol/l          | 2,1  | 33,0 mMol/l                 |
|                | NAD                  | 0,1  | 1,13 mMol/l                 |
|                | Saccharose           | 0,5  | 78,1 mMol/l                 |
|                | UDPG-DH              | 0,05 | 0,05 U/ml                   |
| 15             | NDPK                 | 0,05 | 6,25 U/ml                   |
|                | UTP                  | 0,1  | 0,52 mMol/l                 |
|                | Saccharose-          |      |                             |
|                | synthetase           | 0,1  | 0,38 U/ml                   |

mischen, pipettieren in Mikrokübetten

20

|                  | Leerwert<br>(ml) | Probe<br>(ml) |
|------------------|------------------|---------------|
| mix              | 1,5              | 1,5           |
| H <sub>2</sub> O | 0,1              | -             |
| 25 Probe         | -                | 0,1           |

mischen, nach Stillstand der Extinktionszunahme Ex-  
tinktion der Probe gegen Leerwert messen und ADP-Ge-  
halt berechnen nach.

30

$$\text{ADP (mMol/l)} = \Delta E \cdot 2,353$$

Zulässige Schwankungsbreite:

Art und Stärke des Puffers:

35 Siehe Beispiel 1

pH-Bereich 6,0 - 10,5

UDPG-DH 0,01 - 15 U/ml

214830

- 23 -

NDPK 0,2 - 50 U/ml

Sacchar. Synthetase 0,05 - 10 U/ml

Beispiel 8

5

Bestimmung von Creatinin unter NADH-Bildung

Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm

Mikroküvetten, Testvolumen 1,55 ml.

10 Herstellung des Reagentienmixes

| Konzentration der Ausgangs-<br>lösung |                      | ml   | Konzentra-<br>tion im<br>Test |
|---------------------------------------|----------------------|------|-------------------------------|
| 15                                    | Glycylglycin, pH 8,0 | 0,1  | mMol/l                        |
|                                       | NAD                  | 35   | mMol/l                        |
|                                       | Saccharose           | 0,5  | Mol/l                         |
|                                       | UDPG-DH              | 3    | U/ml                          |
|                                       | NDPK                 | 400  | U/ml                          |
| 20                                    | UTP                  | 16,5 | mMol/l                        |
|                                       | ATP                  | 16,7 | mMol/l                        |
|                                       | Saccharose Synth.    | 12   | U/ml                          |
|                                       | CK                   | 500  | U/ml                          |
|                                       | Probe                |      |                               |
|                                       |                      | 1,9  | 61 mMol/l                     |
|                                       |                      | 0,1  | 1,13 mMol/l                   |
|                                       |                      | 0,5  | 80,6 mMol/l                   |
|                                       |                      | 0,05 | 0,05 U/ml                     |
|                                       |                      | 0,05 | 6,45 U/ml                     |
|                                       |                      | 0,1  | 0,53 mMol/l                   |
|                                       |                      | 0,1  | 0,54 mMol/l                   |
|                                       |                      | 0,1  | 0,38 U/ml                     |
|                                       |                      | 0,05 | 8 U/ml                        |
|                                       |                      | 0,05 | -                             |

25

mischen, in Mikroküvette pipettieren:

|                        | Leerwert<br>(ml) | Probe<br>(ml) |
|------------------------|------------------|---------------|
| 30 Mix                 | 1,5              | 1,5           |
| H <sub>2</sub> O       | 0,05             | -             |
| Creatininase, 350 U/ml | -                | 0,05          |

Nach Stillstand der Extinktionszunahme Extinktion der

35 Probe gegen Extinktion des Testleervolumens messen  
und Creatinin-gehalt der Probe berechnen nach

$$\text{Creatinin (mMol/l)} = \Delta E \cdot 9,12$$

Die Reaktionsbedingungen sind durch die optimierte Creatininbestimmung festgelegt. Für die erfindungsge-  
 5 mäßige Anwendung der ADP-Bestimmung gilt das unter Bei-  
 spiel 7 Gesagte.

#### Beispiel 9

#### 10 Bestimmung von Ammoniak unter NADH-Bildung.

Meßtemperatur 25°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Mikro-  
 küvetten, Testvolumen 1,6 ml.

Die verwendeten Enzyme sollten weitgehend frei von  
 15 Ammoniumionen sein.

#### Herstellung des Reagentienmixes:

|    | Konzentration der Ausgangs-          | ml   | Endkonzentration<br>im Test |
|----|--------------------------------------|------|-----------------------------|
| 20 | lösung                               |      |                             |
|    | Imidazol-puffer, pH 7,8<br>0,1 Mol/l | 1,5  | 47 mMol/l                   |
|    | Glutaminsäure 0,1 Mol/l              | 0,2  | 6,2 mMol/l                  |
|    | MgCl <sub>2</sub> 0,41 Mol/l         | 0,1  | 12,8 mMol/l                 |
| 25 | KCl 0,26 Mol/l                       | 0,1  | 8,1 mMol/l                  |
|    | NAD 35 mMol/l                        | 0,1  | 1,09 mMol/l                 |
|    | Saccharose 0,5 Mol/l                 | 0,5  | 78,1 mMol/l                 |
|    | UTP 16,5 mMol/l                      | 0,1  | 0,52 mMol/l                 |
|    | ATP 32,3 mMol/l                      | 0,1  | 1,01 mMol/l                 |
| 30 | Glutamin-synthetase 3 U/ml           | 0,05 | 0,05 U/ml                   |
|    | Saccharose-synthetase 12 U/ml        | 0,1  | 0,38 U/ml                   |
|    | NDPK 400 U/ml                        | 0,05 | 6,25 U/ml                   |
|    | UDPG-DH 3 U/ml                       | 0,1  | 0,09 U/ml                   |

35 Mischen, in Mikroküvetten pipettieren.

|                    | Leerwert<br>(ml) | Probe<br>(ml) |
|--------------------|------------------|---------------|
| Mix                | 1,5              | 1,5           |
| 5 H <sub>2</sub> O | 0,1              | -             |
| Probe              | -                | 0,1           |

- Nach Stillstand der Extinktionszunahme Extinktion  
der Probe gegen Extinktion des Leerwerts messen und  
10 Ammoniak-gehalt der Probe berechnen nach

$$\text{Ammoniak (mMol/l)} = \Delta E \cdot 2,253$$

Zulässige Schwankungsbreite:

- 15 Art und Stärke des Puffers: siehe Beispiel 1  
pH-Bereich 6,9 bis 7,8  
UDPG-DH 0,02 bis 15 U/ml  
Saccharose-synthetase 0,1 bis 10 U/ml  
NDPK 0,2 bis 50 U/ml  
20 Glutamin-synthetase 0,02 bis 10 U/ml

Beispiel 10

Bestimmung von Ammoniak unter NADH-Bildung.

25

Die Bestimmung kann auch mit Hilfe der Carbat-kinase  
(z.B. aus Streptococcus faecalis) ausgeführt werden.

- Meßtemperatur 37°C, Meßwellenlänge 365 nm, 1 cm Mikro-  
30 küvetten Testvolumen 1,6 ml.

Herstellung eines Reagentienmixes:

| Konzentration der Ausgangslösung |             | ml   | Konzentration<br>im Test |
|----------------------------------|-------------|------|--------------------------|
| Imidazol-puffer, pH 7,8          | 0,1 Mol/l   | 1,5  | 47 mMol/l                |
| Kaliumcarbonat                   | 0,5 Mol/l   | 0,2  | 31,2 mMol/l              |
| 5 MgCl <sub>2</sub>              | 0,41 Mol/l  | 0,1  | 12,8 mMol/l              |
| NAD                              | 35 mMol/l   | 0,1  | 1,09 mMol/l              |
| Saccharose                       | 0,5 Mol/l   | 0,5  | 78,1 mMol/l              |
| UTP                              | 15,6 mMol/l | 0,1  | 0,52 mMol/l              |
| ATP                              | 32,3 mMol/l | 0,1  | 1,01 mMol/l              |
| 10 UDPG-DH                       | 3 U/ml      | 0,1  | 0,09 U/ml                |
| NDPK                             | 400 U/ml    | 0,05 | 6,25 U/ml                |
| Saccharose-synthetase            | 12 U/ml     | 0,1  | 0,38 U/ml                |
| Carbamat-kinase                  | 100 U/ml    | 0,15 | 4,69 U/ml                |

15 Mischen, in Mikroküvetten pipettieren.

|                     | Leerwert<br>(ml) | Probe<br>(ml) |
|---------------------|------------------|---------------|
| Mix                 | 1,5              | 1,5           |
| 20 H <sub>2</sub> O | 0,1              | -             |
| Probe               | -                | 0,1           |

Bei 37°C etwa 20 Minuten stehenlassen.

Nach Ende der Extinktionszunahme Extinktion der Probe  
25 gegen Extinktion des Leerwerts messen.

Ammoniak-gehalt berechnen nach:

$$\text{Ammoniak (mMol/l)} = \Delta E \cdot 4,706.$$

Beispiel 11

30

Bestimmung von NH<sub>3</sub> unter NADPH-Bildung

Meßtemperatur 25°C

Meßwellenlänge 365 nm

1 cm-Küvetten

35 Testvolumen 2,25 ml

# 214830

- 27 -

| Konzentration der<br>Ausgangslösung | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentration<br>im Test |
|-------------------------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| Imidazol-Puffer,<br>pH 7,0          | 500 mMol/l    | 1,0              | 1,0                      |
| 222 mMol/l                          |               |                  |                          |
| 5 KCl                               | 400 mMol/l    | 0,1              | 0,1                      |
| 18 mMol/l                           |               |                  |                          |
| MgCl <sub>2</sub>                   | 800 mMol/l    | 0,1              | 0,1                      |
| 35 mMol/l                           |               |                  |                          |
| NADP                                | 20 mMol/l     | 0,1              | 0,1                      |
| 0,9 mMol/l                          |               |                  |                          |
| ATP                                 | 32 mMol/l     | 0,1              | 0,1                      |
| 1,4 mMol/l                          |               |                  |                          |
| PEP                                 | 20 mMol/l     | 0,1              | 0,1                      |
| 0,9 mMol/l                          |               |                  |                          |
| 10 Glutamat                         | 100 mMol/l    | 0,2              | 0,2                      |
| 8,9 mMol/l                          |               |                  |                          |
| γ-Aminobutyrat                      | 900 mMol/l    | 0,2              | 0,2                      |
| 80 mMol/l                           |               |                  |                          |
| PK                                  | 30 U/ml )     |                  |                          |
| 1,3 U/ml                            |               |                  |                          |
| GPT                                 | 60 U/ml )     | 0,1              | 0,1                      |
| 2,7 U/ml                            |               |                  |                          |
| GAB-GT                              | 60 U/ml )     |                  |                          |
| 2,7 U/ml                            |               |                  |                          |
| 15 SS-DH                            | 50 U/ml )     |                  |                          |
| 2,2 U/ml                            |               |                  |                          |
| Probe                               | 0,2           | -                | -                        |
| Wasser                              | -             | 0,2              | -                        |

mischen, Vorreaktion ablaufen lassen, starten mit

20

|                     |      |      |          |
|---------------------|------|------|----------|
| Glutamin-Synthetase |      |      |          |
| 10 U/ml             | 0,05 | 0,05 | 0,2 U/ml |

mischen, ca. 20 min inkubieren, nach Ende der Extink-  
25 tionszunahme Extinktion der Probe gegen Leerwert be-  
stimmen, Gehalt an NH<sub>3</sub> berechnen nach

$$\text{NH}_3 \text{ (mMol/l)} = \Delta E \cdot 3,214$$

30 Zulässige Schwankungsbreite:

Art und Stärke des Puffers: Phosphat-, Succinat-,  
Imidazol-, bedingt auch TRIS- und TRA-Puffer; pH 6,8  
bis 7,8.

35 PK, GPT, GAB-GT, SS-DH: je 0,05 - 50 U/ml  
Glutamin-Synthetase: 0,02 - 10 U/ml

Beispiel 12

Bestimmung von 5'-Nucleotidase unter NADPH-Bildung.

Meßtemperatur 25°C

5 Meßwellenlänge 365 nm

1 cm-Küvetten

Testvolumen 2,25 ml

| Konzentration der                                |            | Probe<br>(ml) | Leerwert<br>(ml) | Konzentra-<br>tion im<br>Test |
|--------------------------------------------------|------------|---------------|------------------|-------------------------------|
| 10 Ausgangslösung                                |            |               |                  |                               |
| K-Phosphat-Puffer,                               |            |               |                  |                               |
| pH 7,2                                           | 100 mMol/l | 1,0           | 1,0              | 444 mMol/l                    |
| KCl                                              | 400 mMol/l | 0,1           | 0,1              | 18 mMol/l                     |
| 15 MgCl <sub>2</sub>                             | 800 mMol/l | 0,1           | 0,1              | 35 mMol/l                     |
| NADP                                             | 20 mMol/l  | 0,1           | 0,1              | 0,9 mMol/l                    |
| ATP                                              | 32 mMol/l  | 0,1           | 0,1              | 1,4 mMol/l                    |
| PEP                                              | 20 mMol/l  | 0,1           | 0,1              | 0,9 mMol/l                    |
| Glutamat                                         | 100 mMol/l | 0,2           | 0,2              | 8,9 mMol/l                    |
| 20 γ-Aminobutyrat                                | 900 mMol/l | 0,2           | 0,2              | 80 mMol/l                     |
| β-Glycerophosphat                                | 80 mMol/l  | 0,1           | 0,1              | 3,5 mMol/l                    |
| PK                                               | 30 U/ml )  |               |                  | 1,3 U/ml                      |
| GPT                                              | 60 U/ml )  |               |                  | 2,7 U/ml                      |
| GAB-GT                                           | 60 U/ml )  | 0,1           | 0,1              | 2,7 U/ml                      |
| 25 SS-DH                                         | 50 U/ml )  |               |                  | 2,2 U/ml                      |
| ADA                                              | 200 U/ml ) |               |                  | 8,8 U/ml                      |
| Probe                                            |            | 0,1           | 0,1              |                               |
| mischen, ca. 10 min inkubieren, dann starten mit |            |               |                  |                               |
| AMP                                              | 80 mMol/l  | 0,05          | -                | 1,8 mMol/l                    |

30

$$5'\text{-Nucleotidase (U/ml)} = \Delta E/\text{min} \cdot 6,43$$

Zulässige Schwankungsbreite:

Puffer: Phosphat, Succinat

pH : 6,8 - 7,3

35 ADA : 1,2 - 20 U/ml

214830 - 29 -

11.12.1979  
AP G 01 N/214 830  
55 859/12

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Adenosindiphosphat (ADP) in wäßriger Lösung durch Phosphorylierung mit einer Kinase in Gegenwart eines phosphorylierten Substrats derselben unter Bildung von ATP und entphosphoryliertem Substrat, gekennzeichnet dadurch, daß das entphosphorylierte Substrat, gegebenenfalls unter Zwischenschaltung einer weiteren Hilfsreaktion mit NAD(P) in Gegenwart einer Dehydrogenase umgesetzt und gebildetes NAD(P)H direkt gemessen oder mit einem Tetrazoliumsalz in Gegenwart eines Elektronenüberträgers umgesetzt wird unter Bildung eines Formazans und letzteres gemessen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als entphosphoryliertes Substrat Galactose, Formiat, Pyruvat oder Nucleosid-diphosphat verwendet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß als zwischengeschaltete Hilfsreaktion eine Decarboxylierung, Transaminierung oder Hexosidierung verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß man ADP mit
  - a) Galacto-Kinase und Galactose-1-Phosphat umsetzt und mit der gebildeten Galactose NAD in Gegenwart von Galactose-dehydrogenase reduziert oder
  - b) Formiat-Kinase und Formylphosphat umsetzt und mit dem gebildeten Formiat in Gegenwart von Formiat-dehydrogenase NAD oxydiert, oder

214830 - 30 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

- c) Pyruvat-Kinase und Phosphoenol-pyruvat umsetzt, gebildetes Pyruvat mit Pyruvat-decarboxylase decarboxyliert und mit dem gebildeten Acetaldehyd und Aldehyddehydrogenase NAD oxydiert oder
  - d) nach c) gebildetes Pyruvat mit Glutamat und GPT (Glutamat-pyruvat-transaminase) in Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat transaminiert, letzteres mit  $\beta$ -Aminobutyrat und  $\beta$ -Aminobutyrat-transaminase in Glutamat und Succinat-semialdehyd überführt und letzteres mit Succinat-semialdehyd-dehydrogenase zur Oxydation von NADP heranzieht oder
  - e) UTP und Nucleosid-diphosphat-kinase umsetzt, gebildetes UDP mit Saccharose und Saccharosesynthetase in Fructose und Iridindiphosphatglucose umwandelt und mit letzterer und Uridindiphosphat-glucosedehydrogenase NAD reduziert.
5. Reagens zur Bestimmung von ADP mit einem Gehalt an einer Kinase, einem phosphorylierten, von ADP verschiedenen Substrat derselben und Puffer, gekennzeichnet dadurch, daß es eine für die entphosphorylierte Form des Substrats oder für ein transaminiertes, decarboxyliertes oder hexosidiertes Folgeprodukt derselben spezifische Dehydrogenase und das Coenzym der Dehydrogenase enthält.
6. Reagens nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß es zusätzlich ein Tetrazoliumsalz, einen dafür geeigneten Elektronenüberträger und gegebenenfalls ein oberflächenaktives Mittel enthält.
7. Reagens nach Punkt 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß es Galactose-Kinase, Galactose-1-phosphat, Galactosedehydrogenase und NAD enthält.

**214830** - 34 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

8. Reagens nach Punkt 7, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,1 bis 20 U/ml Galactose-Kinase, 0,05 bis 20 U/ml Galactose-dehydrogenase, bezogen auf fertige wäßrige Lösung, und Puffer, pH 6,0 bis 10,5, enthält.
9. Reagens nach Punkt 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß es Formiat-Kinase, Formylphosphat, Formyl-dehydrogenase und NAD enthält.
10. Reagens nach Punkt 9, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,05 bis 50 U/ml Formiat-Kinase, 0,1 bis 100 U/ml Formiat-dehydrogenase, bezogen auf fertige wäßrige Lösung, und Puffer, pH 6,0 bis 10,0 enthält.
11. Reagens nach Punkt 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß es Pyruvat-Kinase, Phosphoenol-pyruvat, Glutamat, Glutamat-pyruvat-transaminase,  $\gamma$ -Aminobutyrat,  $\gamma$ -Aminobutyrat-transaminase, Succinat-semialdehyd-dehydrogenase und NADP enthält.
12. Reagens nach Punkt 11, gekennzeichnet dadurch, daß es die Enzyme in einer Menge von je 0,05 bis 50 U/ml, bezogen auf fertige wäßrige Lösung, und Puffer, pH 6,0 bis 10,5 enthält.
13. Reagens nach Punkt 5 oder 6, gekennzeichnet dadurch, daß es Nucleosid-diphosphat-kinase, Uridin-triphosphat, Saccharose, Saccharose-synthetase, Uridin-diphosphat-glucose-dehydrogenase und NAD enthält.
14. Reagens nach Punkt 13, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,01 bis 15 U/ml Uridin-diphosphat-glucose-dehydrogenase, 1 bis 50 U/ml Nucleosid-diphosphat-kinase,

**214830** - 32 -

11.12.1979

AP G 01 N/214 830

55 859/12

0,05 bis 10 U/ml Saccharose-synthetase und Puffer,  
pH 6,0 bis 10,5 enthält.

15. Reagens nach einem der Punkte 5 bis 14, gekennzeichnet  
dadurch, daß es zusätzlich ein System zur Bildung von  
ADP aus ATP enthält.
16. Reagens nach einem der Punkte 6 bis 15, gekennzeichnet  
dadurch, daß es auf einem Teststreifen imprägniert oder  
inkorporiert vorliegt.