



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 60887
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty 13 04 1982
Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 12 Q 1/00

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	763653
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	20.12.76
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	20.12.76
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	25.06.77
(44) Nähtäväksiapanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.12.81
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	24.12.75

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2558536.8

- (71) Boehringer Mannheim GmbH., Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Joachim Ziegenhorn, Unterpfaffenhofen, August Wilhelm Wahlefeld, Weilheim, Alexander Hagen, Tutzing, Wolfgang Gruber, Tutzing-Unterzeismering, Hans Ulrich Bergmeyer, Tutzing, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Menetelmä entsyymisubstraattien kineettiseksi määrittämiseksi sekä reagenssi menetelmän toteuttamista varten - Förfarande för kinetisk enzymsubstratbestämning samt reagens för genomförande av förfarandet

Keksinnön kohteina ovat menetelmä entsyymisubstraattien kineettiseksi määrittämiseksi sarjareaktioitten avulla sekä tämän toteuttamiseen soveltuva reagenssi.

Eniten käytetty menetelmä entsyymaattisessa substraattimäärityksessä on niin sanottu päätearvomenetelmä. Tässä menetelmässä mitataan entsyymaattisen reaktion määritettävä substraatti reaktion päätyttyä, siis kun koko substraatti on reagoinut. Useissa tavanmukaisissa substraattimäärityksen päätearvomenetelmissä, erikoisesti myös analyysiautomaatteja käytettäessä, on ajantarve nykyisin 10-20 minuuttia analyysia kohti. Tämä tilanne on epätydyttävä, koska ajantarve on liian suuri, ja mittauslaitteiden sekä analyysiautomaattien optimaalinen hyväksikäyttö estyy.

On tunnettua, että käyttämällä kineettistä menetelmää, jossa substraattipitoisuus määritetään mittaamalla määritysreaktion nopeus, voidaan saavuttaa tavallisesti esiintyvän analyysiajan huomattava

lyheneminen. Tähän vaikuttaa lisäksi se seikka, että tässä menetelmässä, päinvastoin kuin päätearvomenetelmässä, ei yleensä tarvita vertausarvojen määrittystä.

Kineettisen substraattimäärityksen teoreettiset perusteet on seikkaperäisesti käsitelty julkaisussa Anal. Chem. 43, 697 ja Advan. Chem. Instrum. 7, 141. Niistä käy ilmi, että erikoisen tärkeitä ovat ensimmäisen tai näennäisesti ensimmäisen kertaluvun reaktiot, koska niitä voidaan analyysiautomaatissa helposti seurata niin sanotun määrääika-periaatteen ("fixed-time"-Prinzip) mukaan.

Määrääika-menetelmissä mitataan määritettävän aineen tai jonkin jälkituotteen pitoisuudenmuutos tiettyinä aikavälinä. Jos määritysreaktio valittuna aikavälinä tapahtuu ensimmäisen tai näennäisesti ensimmäisen kertaluvun mukaan, on voimassa yhtälö:

$$c_0 = - \frac{\Delta c}{e^{-kt_1} - e^{-kt_2}}$$

Tässä merkitsee k reaktion nopeusvakioita, c_0 määritettävän aineen alkupitoisuutta ja Δc sen pitoisuudenmuutosta mittausaikavälinä $\Delta t = t_2 - t_1$. Yhtälöstä ilmenee, että mitattu pitoisuudenmuutos on suoraan verrannollinen haettuun alkupitoisuuteen, kun k , t_1 ja t_2 pidetään vakioina. Viimeksimainitut ehdot ovat helposti täytettävissä analyysiautomaateissa, minkä vuoksi tätä menetelmää voidaan erittäin edullisesti soveltaa tällaisissa laitteissa.

Myöskin on jo tunnettua valita menetelmän ehdot siten, että saadaan näennäisesti nollannen kertaluvun reaktio. Kvantitatiivinen määrittäminen on tällöin tosin mahdollista vain käyttäen likiarvomenetelmiä, jotka usein edellyttävät kalibrointikäyrien laatimista.

Edellä mainituissa julkaisuissa sekä muissa kineettistä substraattimääritystä koskevissa kirjoituksissa (Bergmeyer, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analys 2. Aufl., Bd II, s. 1172-1173, 1941) on ensi sijassa käsitelty menetelmän soveltuvuutta yksivaiheisiin reaktioihin. Tällaisilla reaktioilla on kuitenkin vain rajoitettu merkitys. On nimittäin usein tarpeellista muodostaa koejärjestelmä useista osareaktioista riittävän spesifisyyden ja käyttökelpoisuuden saavuttamiseksi. Toisaalta ei ole tunnettua, miten

tällaisia yhdistettyjä koejärjestelmiä voidaan käyttää substraattipitoisuuksien rutiininomaiseksi kineettiseksi määrittämiseksi. Aivan päinvastoin on viime aikoina viitattu siihen, että reaktiosarjat tekevät kineettiset määrittäykset ongelmallisiksi (Chem. Rundschau, 26, 24 (1973)), koska esimerkiksi osallistuvien entsyymien aktiivisuuden häviäminen tekee menetelmän nopeasti käytökelvottomaksi. Niinpä tähän saakka on oltu sitä mieltä, että yksivaiheinen menetelmä nimenomaan entsyymikineettisissä substraatinmäärittäyksissä on parempi kuin kaksivaiheinen (ja vastaavasti yleensä monivaiheinen) menetelmä. Tämä selittää sen, minkä vuoksi kaksi- tai monivaiheiset koejärjestelmät, joita käyttäen substraattipitoisuudet voidaan rutiininomaisesti määrittää kineettisesti, eivät ole tulleet käyttöön.

Niinpä keksinnön tarkoituksena on aikaansaada menetelmä substraattipitoisuuksien määrittämiseksi sarjareaktioiden avulla kineettisesti, joka menetelmä voidaan toteuttaa rutiininomaisesti ja jossa monivaiheisen koejärjestelmän osavaiheet tapahtuvat kokonaan tai osittain entsyymikatalyyysiä käyttäen.

Tämä tavoite saavutetaan keksinnön mukaan menetelmällä, joka on tarkoitettu entsyymisubstraattien kineettiseen määrittämiseen sarjareaktioiden avulla, ja jolle on tunnusomaista, että valitaan se osareaktio, jolla on suurin spesifisyys reaktiosarjan lähtösubstraattiin nähden ja lisätään muun tai muiden osareaktioiden entsyymiä tai entsyymejä sellainen ylimäärä, joka on ainakin kaksi kertaa reaktion suorittamiseksi tarvittava määrä, siten että eniten spesifinen osareaktio muodostuu reaktionopeutta määräväksi ja seuraa ensimmäisen tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun kineetiikkaa, ja mittaamalla muutos mainitun reaktiotuotteen pitoisuudessa ennalta määrätyn ajan kuluessa.

Sarjareaktioilla tarkoitetaan tässä vähintään kahden osareaktion sarjaa, joista reaktioista ainakin kahta katalysoidaan entsyymaattisesti ja joissa substraatin reagointi ja varsinainen mitausreaktio (indikaattorireaktio) tapahtuvat eri vaiheissa.

Käytettäessä keksinnön mukaisessa menetelmässä entsyymejä ylimäärä saavutetaan lisäksi se etu, että säilytyksen aiheuttamaa näiden entsyymien aktiivisuuden muuttuminen tulee kompensoiduksi. Eni-

ten spesifiseen osareaktioon osallistuvan entsyymin aktiivisuuden vähenemisellä ei sen sijaan ole olennaista merkitystä, koska tämä ei yleensä vaikuta Michaelis-vakion arvoon. Tietystikin on estettävä tämän entsyymin aktiivisuuden täydellinen häviäminen, mihin tarkoitukseen voidaan käyttää tavanomaisia entsyymin stabilointimenetelmiä, jotka ovat tuttuja asiantuntijalle.

Entsyymin ylimäärällä tarkoitetaan tässä vähintään kaksi kertaa, sopivimmin moninkertaisesti niin suurta entsyymimäärän käyttöä kuin mikä reaktion tapahtumiseksi nopeasti olisi tarpeen. Lisätessä eri määriä osavaiheisiin käytettäviä entsyymejä tulevat, kuten edellä on mainittu, eri osareaktioitten nopeudet huomattavasti vaihtelevaan, täten voidaan suhteellisen yksinkertaisella tavalla tehdä eniten spesifinen reaktio nopeutta määrittäväksi.

Käytettäviä entsyymejä voidaan vaihdella ja valita entsyymi, joka on täysin määrättyä alkuperää, ja jolla on haluttu Michaelis-vakio. Erilaista alkuperää olevilla entsyymeillä, jotka katalysoivat samoja reaktioita, voi olla erilaiset Michaelis-vakiot sen mukaan, onko ne saatu esim. mikro-organismeista tai nisäkkäiden maksasta.

Myös pH-arvon avulla voidaan vaikuttaa reaktionopeuteen keksinnön mukaisessa mielessä. Niinpä voidaan sen osareaktion entsyymiä, joka aiotaan tehdä nopeutta määrittäväksi, käyttää epäoptimaalisella pH-arvolla, mikä aiheuttaa tämän entsyymin Michaelis-vakion suurenemisen. Samalla tavalla on myös mahdollista käyttää hyväksi entsyymien riippuvuutta lämpötilasta, vaikka tätä ei pidetä edullisena, koska yleisenä pyrkimyksenä on yhtenäistää entsyymaattisten määritysreaktioiden lämpötila.

Reaktioketjun eniten spesifisellä osareaktiolla tarkoitetaan sitä osareaktiota, joka osoittaa suurinta spesifisyyttä reaktion lähtösubstraatin suhteen ja joka voidaan muodostaa nopeutta määrittäväksi kuten yllä on mainittu. Tämä osareaktio voi olla, mutta sen ei tarvitse olla entsyymaattisesti katalysoitu. Esimerkki näennäisesti ensimmäisen kertaluvun epäentsyymaattisesta reaktiosta, jolla on erittäin suuri spesifisyys, on mutarotaatio α - ja β -glukoosin välillä. Jos sinänsä eniten spesifistä osareaktiota ei voida tehdä nopeutta määrittäväksi, esimerkiksi entsyymin liian pienestä todellisesta tai näennäisestä Michaelis-vakiosta johtuen, niin kelpaa seuraavaksi spesifisin osareaktio, joka voidaan muodostaa nopeutta määrittäväksi, keksinnön mukaiseksi eniten spesifiseksi osareaktioksi.

Keksinnön olennaisena tunnusmerkkinä on, että nopeutta määrittävä vaihe muodostetaan sellaiseksi, että se tapahtuu ensimmäisen tai näennäisesti ensimmäisen kertaluvun mukaan. Jos eniten spesifinen osareaktio, joka muodostetaan nopeutta määrittäväksi, ilman muuta tapahtuu ensimmäisen kertaluvun mukaan, niin erikoistoimenpiteet tässä suhteessa eivät ole tarpeen. Toisin on järjestyksessä toisen ja korkeamman kertaluvun reaktioitten laita. Tällöin reaktio voidaan muuttaa seuraamaan näennäisesti ensimmäistä kertalukua. Tämä voidaan, kuten asiantuntijalle on tunnettua, aikaansaada siten, että toisen tai jonkin muun reaktioon osallistuvan aineen, joka ei ole määritettävä substraatti tai sen reaktiotuote, pitoisuus pidetään reaktion aikana vakiona käyttämällä ainetta ylimäärin. Sitäpaitsi pitää, mikäli on kyseessä entsyymaattinen reaktio, valita entsyymi, jolla on niin suuri Michaelis-vakio, että se tulee olemaan suuri verrattuna kokeessa esiintyvään substraattipitoisuuteen.

Keksinnön kohteena on lisäksi reagenssi käytettäväksi entsyymisubstraattien kineettiseen määrittelyyn entsyymaattisten sarjareaktioiden avulla. Tällainen reagenssi sisältää sinänsä tunnettuja entsyymejä ja reaktioon osallistuvia aineita, ja keksinnön mukaiselle reagenssille on tunnusomaista se, että reagenssi sisältää ylimäärän, joka on ainakin kaksi kertaa reaktion suorittamiseksi tarvittava määrä, vähemmän spesifisen osareaktion tai vähemmän spesifisten osareaktioiden entsyymiä tai entsyymejä, eniten spesifisen osareaktion saattamiseksi reaktionopeutta määrääväksi.

Keksintö mahdollistaa entsyymikineettisten substraattimittausten suorittamisen sarjareaktioita käsittävissä koejärjestelmissä ja samalla näiden määritysten suorittamiseen tarvittavan ajan lyhentämisen. Samalla saavutetaan olennainen riippumattomuus osallistuvien entsyymien aktiivisuudesta, niin että menetelmä toimii täsmällisesti myös silloin, kun osallistuvien entsyymien aktiivisuudet ovat varastoinnin vuoksi alentuneet merkittävästi.

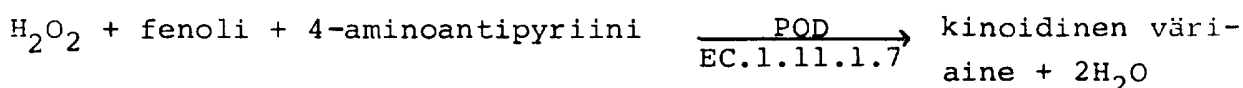
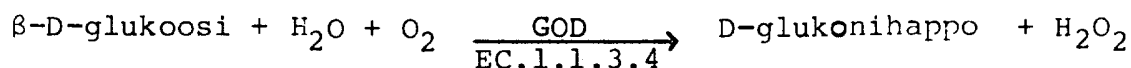
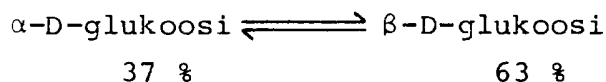
Lisäksi keksintö mahdollistaa sellaisten monivaiheisten entsyymikineettisten substraattimittausten suorittamisen kaikissa käytössä olevissa analyysiautomaateissa, joissa keksinnön mukaisesti on vaikeuksitta mahdollista sovittaa reagenssien kvantitatiivinen koostumus mille tahansa analyysiautomaatille soveltuvaksi.

Seuraavat esimerkit selittävät keksintöä edelleen.

Esimerkki 1

Verensokerinmääritys GOD/PAP-menetelmän mukaan

Määritys tapahtuu seuraavan yhtälön mukaisesti:



Peroksidaasi-entsyymiä (POD) annostellaan sellainen ylimäärä, että tarkkaan näennäisesti ensimmäisen kertaluvun mukaan tapahtuva muta-rotaatio α - ja β -glukoosin välillä tai glukoosiin nähden suuren K_M -arvon vuoksi samoin näennäisesti ensimmäisen kertaluvun mukaan ta-pahtuva glukoosioksidaasi (GOD)-reaktio tulee nopeutta määrittäväksi vaiheeksi.

Tämä saavutetaan reagenssilla, jolla on seuraava koostumus:

80 - 120 millimoolia fosfaattipuskuria, pH 7,0
 0,8 U/ml tai enemmän POD
 12 U/ml tai enemmän GOD
 0,60 - 1,80 millimoolia 4-aminoantipyriiniä
 3,0 - 13,5 millimoolia fenolia

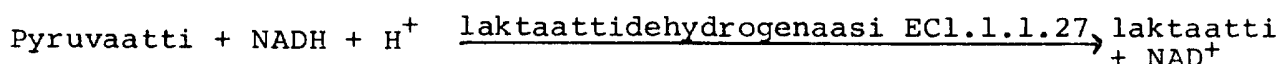
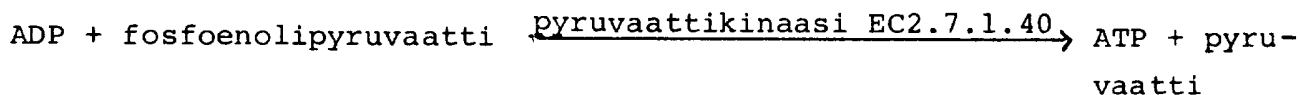
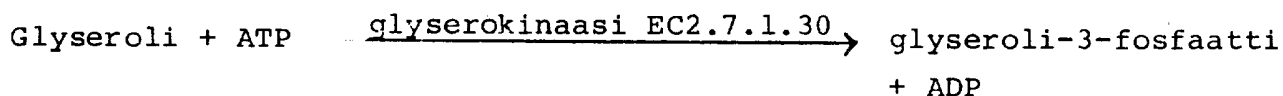
Yllä oleva reagenssi soveltuu erikoisesti menetelmän toteuttamiseen nopeissa keskipako-analysointilaitteissa. Ensimmäinen lukema otetaan noin 35 sekuntia sen jälkeen kun reagenssi on sekoitettu tutkitta-van näytteen kanssa, ja toinen lukema 1,5 - 3,5 minuuttia myöhemmin. Käyttämällä 500 - 600 μ l reaktioseosta ja 5 - 20 μ l näytettä voi-daan verensokeripitoisuus aina arvoon 1000 mg/100 ml saakka määrittää.

Esimerkki 2

Triglyseridin määritys

Triglyseridit hajotetaan entsymaattisesti glyseroliksi ja rasvaha-poksi.

Glyserolin määrittäminen tapahtuu seuraavien yhteenliittyvien reaktioiden mukaan:



Menetelmä toteutetaan kineettisesti käyttäen seuraavia reagensseja:

Reagenssi 1:

- 45 - 55 millimoolia/l fosfaattipuskuria, pH 7,0
- 4,6 - 3,1 millimoolia/l magnesiumsulfaattia
- 300 - 400 mikromoolia/l natriumdodesyyli-sulfaattia
- 2,3 - 3,5 millimoolia/l ATP
- 280 - 420 mikromoolia/l fosfoenolipyruvaattia
- 120 - 230 mikromoolia/l NADH
- 7,7 x 10⁴ U/l tai enemmän lipaasia
- 5,8 x 10² U/l tai enemmän esteraasia
- 9,6 x 10² U/l tai enemmän pyruvaattikinaasia
- 5,3 x 10³ U/l tai enemmän laktaattidehydrogenaasia

Reagenssi 2:

- 2,9 x 10³ U/l glyserokinaasia

Reaktio mitataan nopeassa keskipako-analysointilaitteessa aallonpituudella 340 nm ja lämpötilassa 25°C. Lisättäessä ATP-pitoisuutta kokeessa pyruvaattikinaasin Michaelis-vakio kasvaa näennäisesti niin paljon, että se tulee olemaan suuri verrattuna kokeen glyseroli-ylärajaan. Muita entsyymejä annostellaan ylimäärä. Siten pyruvaattikinaasireaktio tulee nopeutta määrittäväksi, ja glyserolipitoisuus voidaan määrittää reaktionopeuden perusteella.

Määrittämiseksi sekoitettiin keskenään 10 µl tutkittavaa seeruminäytettä, 30-50 µl fysiologista keittosuolaliuosta ja 500-600 µl reagenssia 1, joka ei vielä sisältänyt glyserokinaasia, ja seoksen annettiin seistä 10 minuuttia. Sen jälkeen lisättiin glyserokinaasi,

ja ensimmäisen lukema otettiin 50 sekunnin sekä toinen lukema 150-200 sekunnin kuluttua.

Menetelmä soveltuu käytettäväksi triglyseridin pitoisuusalueella 500-9000 mg/l.

Regressiovertaussuora $y = 0,99 x + 0,51$

Korrelaatiokerroin $r = 0,999$.

Esimerkki 2 a

Glyserolin määrittäminen

Menetelmä toteutetaan kineettisesti käyttäen seuraavia reagensseja:

Reagenssi 1:

45 - 55 millimoolia/l fosfaattipuskuria, pH 7,0
4,6 - 3,1 millimoolia/l magnesiumsulfaattia
300 - 400 mikromoolia/l natriumdodesyyli-sulfaattia
2,3 - 3,5 millimoolia/l ATP
280 - 420 mikromoolia/l fosfoenolipyruvaattia
120 - 230 mikromoolia/l NADH
 $9,6 \times 10^2$ U/l tai enemmän pyruvaattikinaasia
 $5,3 \times 10^3$ U/l tai enemmän laktaattidehydrogenaasia

Reagenssi 2:

$2,9 \times 10^3$ U/l tai enemmän glyserokinaasia

Reaktio mitataan nopeassa keskipako-analysaattorissa aallonpituudella 340 nm ja lämpötilassa 25°C.

Lisättäessä ATP-pitoisuutta kokeessa pyruvaattikinaasin Michaelis-vakio kasvaa näennäisesti niin paljon, että se tulee olemaan riittävän suuri verrattuna kokeen glyseroli-ylärajaan. Muita entsyymejä annostellaan ylimäärä. Siten pyruvaattikinaasireaktio tulee nopeutta määrittäväksi, ja glyserolipitoisuus voidaan määrittää reaktionopeuden perusteella.

Määrittämiseksi sekoitettiin keskenään 100 µl tutkittavaa seeruminäytettä, 100 µl fysiologista keittosuolaliuosta ja 500-

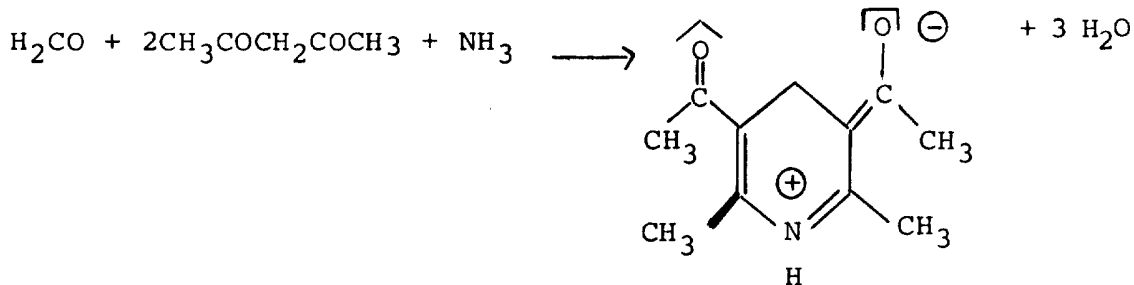
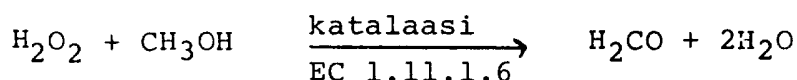
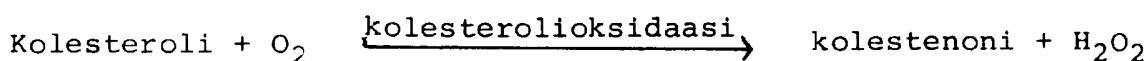
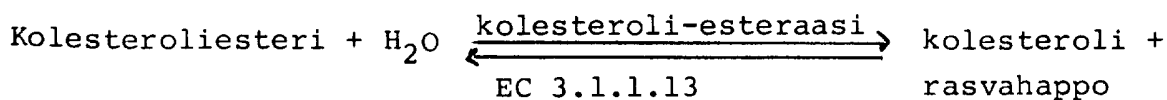
600 µl reagenssia 1, joka ei vielä sisältänyt glyserokinaasia. Sen jälkeen lisättiin glyserokinaasi, ja ensimmäinen lukema otettiin 50 sekunnin sekä toinen lukema 150-200 sekunnin kuluttua.

Menetelmä soveltuu käytettäväksi glyserolipitoisuusalueella 50-900 mg/l.

Esimerkki 3

Kolesterolin kokonaismäärä

Määrittäminen tapahtuu seuraavan yhtälön mukaan:



$$\lambda_{\text{maks}} = 412 \text{ nm}$$

Annosteltaessa kolesteroliesteraasi- ja kolesterolioksidaasi-entsyymejä ylimäärä tulee näennäisesti ensimmäisen kertaluvun mukaisesti tapahtuva värireaktio nopeutta määrittäväksi. Menetelmä toteutetaan esimerkiksi Eppendorf 5032-automaatissa käyttäen seuraavaa reagenssia:

0,45 - 0,75 moolia/l ammoniumfosfaattipuskuria, pH 7,0

1,36 - 2,04 moolia/l metanolia

16 - 24 millimoolia/l asetyyliasetonia

0,79 - 1,19 g/l hydroksipolyetoksidodekaania

500 kU/l tai enemmän katalaasia

20 U/l tai enemmän kolesteroliesteraasia

20 U/l tai enemmän kolesterolioksidaasia

Muuten saman koostumuksen omaava vertausreagenssi ei sisällä kolesterolioksidaasia.

Määrityksen suorittamiseksi Eppendorf 5032-automaatissa 0,01 ml tutkittavaa näytettä sekoitetaan 1,0 ml:aan reagenssia, ja seosta haudutetaan 20 minuuttia lämpötilassa 37°C. Sen jälkeen ekstinktio luettiin elohopeaviivan 405 nm kohdalta.

Muuten saman koostumuksen omaavan vertauserän, paitsi että se ei sisältänyt kolesterolioksidaasia, suhteen meneteltiin tarkkaan samoin kuin edellä. Ekstinktioerosta koe-erän ja vertauserän välillä on kolesterolimäärä laskettavissa.

Regressiosuora $y = 0,98 x + 1,98$;
korrelaatiokerroin $r = 0,997$.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä entsyymisubstraatin kineettiseksi määrittämiseksi, jossa menetelmässä substraatti saatetaan reagoimaan ainakin kahden entsyymaattisen osareaktion reaktiosarjassa, jossa saadaan määritettävissä oleva reaktiotuote, t u n n e t t u siitä, että valitaan se osareaktio, jolla on suurin spesifisyys reaktiosarjan lähtösubstraattiin nähden ja lisätään muun tai muiden osareaktioiden entsyymiä tai entsyymejä sellainen ylimäärä, joka on ainakin kaksi kertaa reaktion suorittamiseksi tarvittava määrä, siten että eniten spesifinen osareaktio muodostuu reaktionopeutta määrääväksi ja seuraa ensimmäisen tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa, ja mitataan muutos mainitun reaktiotuotteen pitoisuudessa ennalta määrätyn ajan kuluessa.

2. Reagenssi entsyymisubstraattien kineettistä määrittämistä varten entsyymaattisten sarjareaktioiden avulla patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä, joka reagenssi sisältää sinänsä tunnettuja entsyymejä ja reaktioon osallistuvia aineita, t u n n e t t u siitä, että reagenssi sisältää ylimäärän, joka on ainakin kaksi kertaa reaktion suorittamiseksi tarvittava määrä, vähemmän spesifisen osareaktion tai vähemmän spesifisten osareaktioiden entsyymiä tai entsyymejä, eniten spesifisen osareaktion saattamiseksi reaktionopeutta määrääväksi.

Patentkrav

1. Förfarande för kinetisk bestämning av ett enzymsubstrat, i vilket förfarande substratet omsättes i en reaktionsserie av åtminstone två enzymatiska delreaktioner, där en mätbar reaktionsprodukt erhålles, k ä n n e t e c k n a t av att den delreaktionen som är mest specifik beträffande reaktionsseriens utgångssubstrat utväljes och ett överskott av åtminstone två gånger den för utförande av reaktionen behövliga mängden av den andra eller de andra delreaktionernas enzym eller enzymer tillsättes, sålunda att den mest specifika delreaktionen blir hastighetsbestämmande och följer första eller pseudo-första ordningstalets kinetik, och ändring i den nämnda reaktionsprodukts koncentration bestämmes inom ett förutbestämt tidsintervall.

2. Reagens för kinetisk bestämning av ett enzymsubstrat med enzymatiska seriereaktioner enligt förfarandet enligt patentkra-

vet 1, vilken reagens innehåller i och för sig kända enzymer och i reaktionerna deltagande ämnen, k ä n n e t e c k n a d av att reagensen innehåller ett överskott av åtminstone två gånger den för utförande av reaktionen behövliga mängden av den mindre specifika delreaktionens eller de mindre specifika delreaktionernas enzym eller enzymer för att bringa den mest specifika delreaktionen hastighetsbestämmande.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Bergmeyer, H.U., Methoden der Enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd II, p. 1172-1173, 1741.